بهینه سازی پارامترهای فیزیکی در میزان تولید آنزیم لیپاز توسط *آسپرژیلوس نایجر PTCC5010* در محیط حاوی شیره خرما و بررسی خصوصیات آن

مهدیه قمری[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۲] *، ایران عالم زاده[۳]، منوچهر وثوقی[۴]، مهدی وریدی[۵]، هانیه صفری[۶]

۱- دانشجوی دکترای صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشیار دانشکده کشاورزی، گروه صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف
٤- استاد دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف
۵- دانشیار دانشکده کشاورزی، گروه صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
٦- فارغ التحصیل کارشناسی مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۹)

چکیده

لیپازهای میکروبی یکی از پرکاربردترین آنزیم ها در صنایع گوناگون می باشند و لیپاز حاصل از کپک آسپرژیلوس نایجر به دلیل غیر سمی بودن محصولات آن در صنایع غذایی و دارویی از اهمیت زیادی برخوردار است. تولید آنزیم تحت تاثیر شرایط مختلف محیطی متغییر است، لذا در این تحقیق دو پارامتر میزان pH و سرعت همزدن در تولید لیپاز توسط آسپرژیلوس نایجر به روش پاسخ عکس العمل سطح (RSM) مورد بررسی قرار گرفت. pH معادل ۷/۵ و سرعت همزدن ۱۹۰rpm بهترین نتیجه را در تولید لیپاز به صورت کشت غوطه‌وری در محیط حاوی شیره خرما، نشان دادند. سپس میزان فعالیت و پایداری آنزیم در مقادیر مختلف pH و دما مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین فعالیت آنزیم در pH برابر ۷ مشاهده شد در حالیکه آنزیم در شرایط اسیدی پایدار می باشد. فعالیت لیپاز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بهینه بود و پایداری آن در دماهای بالا کاهش می یابد.

کلید واژگان: لیپاز، آسپرژیلوس نایجر، سرعت همزدن، pH، خصوصیات آنزیم

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

بطور تقریبی ۹۰ ٪ از تمام بیوکاتالیست‌های صنعتی توسط کشت غوطه وری (SmF)[1]، بهینه سازی اختصاصی محیط کشت و دستکاری ژنتیکی میکروارگانیسم تولید می‌شوند [۱و۲]. مطالعات بسیاری برای تعیین محیط کشت بهینه و نیازهای غذایی جهت تولید لیپاز انجام شده است. این نیازها تحت تاثیر نوع و غلظت منابع کربن و نیتروژن، PH محیط کشت و درجه حرارت مورد نیاز برای رشد و تاثیر میزان هوا می‌باشد [۳].

میکروارگانیسم‌های رشته‌ای همچون کپک‌ها معمولاً در غلظت بالای بیومس و در غیاب همزدن در محیط سوسپانسیون، به صورت توده میکروبی در می‌آیند. علاوه براین، مورفولوژی *آسپرژیلوس نایجر*[2] به طور معمول به صورت توده گلوله‌ای شکل[3] است. انتقال سوبسترا، محرک آنزیمی و همچنین اکسیژن به درون توده میکروبی و آزادسازی آنزیم تولید شده‌ی درون توده، به درون محیط کشت در تولید آنزیم بسیار مهم می باشد[٤]. pH محیط کشت نیز از جمله عوامل موثر و مهم در تولید آنزیم ها می‌باشد و رشد سلول های میکروبی به وسیله pH تحت تاثیر قرار می‌گیرد. بنابراین، جهت غلبه بر محدودیت‌های انتقال جرم و هوادهی، تولید با راندمان بالا و نیز آنزیمی با ویژگی‌های مطلوب و مورد نظر، بهینه سازی شرایط کشت از اهمیت به سزایی برخوردار است[۳] .

لیپازها دارای طیف وسیعی از خصوصیات کاتالیستی می باشند که به طور زیادی وابسته به سویه تولید کننده آنها می باشد. گونه‌های مختلف آسپرژیلوس قادر به تولید لیپازهای متعدد هستند. بنابراین، خواص آنزیمی متفاوت از آنها گزارش شده است[۵]. خصوصیات کاربردی همانند pH بهینه، دمای بهینه و پایداری در برابر pH ها و دماهای گوناگون سبب کاربرد آنها در صنایع مختلف می گردد. به همین دلیل جهت کاربرد لیپاز تولید شده در صنایع مختلف، تعیین خصوصیات آنزیم لیپاز تولیدی از هر میکروارگانیسم ضروری می باشد.

شیره خرما محیطی غنی از قند و دیگر مواد مغذی است که می‌تواند به عنوان سوبسترا جهت تولیدات بیوتکنولوژی و حل مشکل ضایعات خرمای کشور مورد استفاده قرار گیرد. در کار تحقیقی گذشته موفق به بهینه سازی منابع کربن، نیتروژن و محرک آنزیمی در محیط حاوی شیره خرما شدیم [٦]. لذا در ادامه بررسی ها و به منظور افزایش تولید لیپاز هدف این مطالعه، بهینه سازی شرایط کشت آسپرژیلوس نایجر در محیط حاوی شیره خرما شامل میزان هوادهی و pH، جهت تولید بهینه لیپاز و بررسی خصوصیات لیپاز حاصل از آن می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم مورد استفاده و محیط کشت نگهداری

آسپرژیلوس نایجر با شماره PTCC ۵۰۱۰ از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت تکثیر و نگهداری کوتاه مدت سوش از محیط PDA استفاده شد. اسلنت های تهیه شده در ٤ درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. به منظور جلوگیری از کاهش فعالیت سوش و آلودگیهای احتمالی، هر ماه یکبار اسلنتهای جدیدی از آن تهیه گردید [۷].

تهیه سوسپانسیون اسپوری

جهت آماده نمودن سوسپانسیون اسپوری، ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی۰,۱ ٪ توئین ۸۰ (به منظور جداسازی بهتر اسپورها از یکدیگر و شمارش دقیق تر) به اسلنت ۵ روزه اضافه کرده و آن را تکان می‌دهیم تا اسپورها در آب معلق شوند. سپس توسط لام نئوبار تعداد اسپورها را 10^7 اسپور در میلی لیتر برای تمام آزمایشات تنظیم می کنیم[۸].

کشت میکروبی و تولید آنزیم

۱ میلی لیتر سوسپانسیون اسپوری حاوی 10^7 اسپور در میلی لیتر به ۱۰۰ میلی لیتر محیط تخمیر در ارلن فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری تلقیح گردید.ترکیبات محیط کشت حاوی شیره خرما که میزان منبع کربن، نیتروژن و محرک آنزیمی آن بهینه شده است، شامل مخلوط عصاره مخمر و پپتون، روغن زیتون، KH_2PO_4 و $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ به ترتیب میزان ۲,۷٤، ۱، ۲، ۰,۲ و ۰,۰۵ ٪ بود. جهت جلوگیری از واکنش مایلارد قند به صورت جداگانه استریل شده و در موقع تلقیح به محیط کشت اصلی

1. Submerged Fermentation
2. *Aspergillus niger*
3. pellet-like cake

Archive of SID

www.SID.ir

استریل شده، اضافه می گردد [٦]. شرایط کشت نیز شامل دما ۳۰°C، زمان ۵ روز در نظر گرفته شد [٦] و سرعت همزدن و pH متغیر بودند.

بهینه سازی شرایط محیط کشت

مهمترین عوامل رشد شامل pH و سرعت همزدن هر کدام در سه سطح (٦,٥، ۷، pH=۷,٥ و سرعت همزدن=۱۸۰،۲۰۰، ۱٦۰) با استفاده از طرح فاکتوریل CCD بهینه سازی شد که شامل ۵ تکرار در نقطه مرکزی با α=۱ و متغییر وابسته یا پاسخ میزان فعالیت آنزیمی بوده و ۱۳ آزمایش توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت[4] ۷، طراحی گردید (جدول ۱). سطوح این متغییرها پس از انجام آزمایشات اولیه تعیین گردیده است. همه آزمایشات در ۳ تکرار انجام گرفت و میانگین آنها به عنوان پاسخ استفاده گردید. برای برازش پاسخ سطح از معادله درجه دوم استفاده شد و آنالیز آماری مدل با ارزیابی آنالیز واریانس انجام گرفت. استفاده از این روش جهت بهینه سازی تولید لیپاز توسط محققان مختلف گزارش شده است [٦، ۹ و۱۰].

استخراج لیپاز

جهت حذف میسیلیوم محیط کشت با کاغذ واتمن فیلتر می-گردد، سپس سانتریفوژ با سرعت rpm ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام می گردد. در مرحله بعد محلول رویی جهت سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار می گیرد [۱۱].

سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم لیپاز طبق روش اوتا و یامادا اندازه گرفته شد. این روش بر اساس هیدرولیز امولسیون روغن زیتون و پلی وینیل الکل استوار می‌باشد. واحد فعالیت لیپاز (LU) را چنین تعریف نماییم: مقدار فعالیت آنزیمی که یک میکرومول اسید چرب را در مدت ۱ دقیقه در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و بافر فسفات pH=7 ،از سوبسترا آزاد نماید(که در این‌جا سوبسترا،امولسیون روغن‌زیتون به علاوه پلی‌وینیل الکل[5] و اسید چرب آزاد شده، اسید اولئیک است) [۱۲].

بررسی خصوصیات آنزیم لیپاز

اثر دما: جهت بررسی اثر دما روی فعالیت لیپاز، واکنش تعیین فعالیت در رنج دمایی ۲۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد انجام شد [۱۰].

اثر pH: برای مطالعه اثر pH فعالیت لیپاز درpH های مختلف در رنج ۳ تا ۹ اندازه گیری گردید. pH مخلوط های واکنش با استفاده از بافرهای مختلف تهیه گردید (بافر سیترات برای pH=۳-٦، بافر فسفات برای pH =۷-۸ و بافر بورات برای pH=۹-۱۰) [۱۳].

پایداری دمایی و پایداری در برابرpH: جهت بررسی پایداری دمایی، آنزیم استخراج شده در دماهای ۲۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد برای ۲٤ ساعت قرار گرفت. پس از انکوباسیون، به سرعت آنزیم در حمام یخ برای ۱۵ دقیقه خنک شده و فعالیت باقیمانده تعیین می گردد[۷]. جهت بررسی پایداری در برابر pH، آنزیم استخراج شده در محلول بافری در مقادیر مختلف pH در رنج ٤ تا ۱۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردید [۱۳].

۳- نتایج و بحث

نتایج بهینه سازی شرایط محیط کشت جهت تولید لیپاز

فعالیت لیپاز بدست آمده از انجام آزمایش ها و فعالیت پیش بینی شده حاصل از معادله رگرسیون ۱۳ ترکیب آزمایشی در جدول ۱ نشان داده شده است. رابطه بین پاسخ و متغییرها به صورت معادله درجه دوم پلی نومیال زیر بیان شد که در آن Y= فعالیت آنزیم، X_1=هوادهی ، X_2 =pH می باشند.

$$Y= 9.58+ 1.95\ X_1+1\ X_2+ 0.34X_1X_2-2.06\ X_1^2+1.1\ X_2^2$$

مناسب و معنی‌دار بودن معادله مدل درجه دوم از نظر آماری با آنالیز واریانس (ANOVA) ارزیابی شد (جدول ۲).

4. Design Expert software ,Version7.0.0
5. PVA

Archive of SID

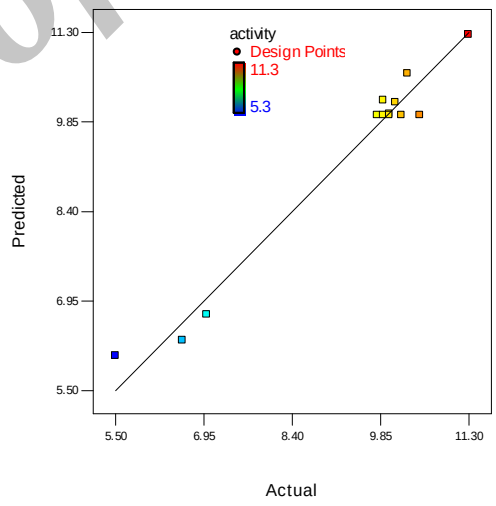
www.SID.ir

جدول ۲ نتایج آنالیز واریانس(ANOVA) برای مدل درجه دوم

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P	
مدل	۳۵,۸	۵	۷,۱۶	٤۷,۲۲	< ۰,۰۰۰۱	معنی دار
Lack of Fit	۰,۷۵	۳	۰,۲۵	۰,٤۳	۰,۱٤	بی معنی
خطای خالص	۰,۳۱	٤	۰,۰۷۷			
خطای کل	۳٦,۸٦	۱۲				

R^2= ۰,۹۷; R^2 adjusted= ۰,۹۵; R^2 predicted= ۰,۸۳

با توجه به آنالیز واریانس، چنانچه ارزش P مدل کوچک تر از ۰/۰۵ باشد، نشان دهنده ی آن است که مدل CCD برای بررسی شرایط محیط کشت ، مدل مناسبی بوده است و نتیجه بدست آمده نیز برابر کمتر از ۰/۰۰۰۱ نشان دهنده این مطلب می باشد. بی معنی بودن lack of fit نشان می دهد که پاسخ های بدست آمده آزمایشی به طور کافی با مدل مناسب هستند. میزان R^2 مدل برابر با ۰/۹۷ بدست آمد. میزان بالا و نزدیک به هم R^2 adjusted =۰/۹۵ و R^2 predicted =۰/۸۳۱ برای این مدل مطلوب می باشد (شکل ۱ و جدول ۲).



شکل ۱ نمودار میزان آنزیم پیش بینی شده نسبت به میزان واقعی

پس از فیت کردن مدل درجه دوم، می توان تاثیر هر یک از پارامترها را بر روی پاسخ دریافتی بررسی کرد. در شکل ۲ اثر متقابل میان pH و هوادهی مشاهده می شود. در میزان سرعت همزدن پایین میزان تولید آنزیم نیز پایین است و افزایش pH اثر چندانی در فعالیت لیپاز ندارد حتی در pH =۷ شاهد کاهش در میزان تولید لیپاز هستیم. در سرعت همزدن بالا، افزایش pH سبب افزایش تولید لیپاز به صورت تقریباً خطی می شود. به طور کلی با افزایش سرعت همزدن، تولید آنزیم افزایش یافته و سپس با شیب ملایمی دوباره کاهش می یابد.

جدول ۱ نتایج بهینه سازی شرایط کشت

تیمار	A: هوادهی (rpm)	B:pH	فعالیت (U/ml)	
			آزمایشی	پیش بینی شده
۱	۱۸۰	۷	۱۰,۵	۹,۹٦
۲	۱۸۰	٦,۵	۹,۹	۱۰,۲
۳	۲۰۰	۷,۵	۱۱,۳	۱۱,۲٦
٤	۱۸۰	۷,۵	۱۰,۳	۱۰,٦۳
۵	۱٦۰	۷,۵	٦,٦	٦,۳
٦	۱۸۰	۷	۱۰,۲	۹,۹٦
۷	۱٦۰	٦,۵	۷	٦,۷۳
۸	۱٦۰	۷	۵,۵	٦,۰٦
۹	۱۸۰	۷	۱۰	۹,۹٦
۱۰	۱۸۰	۷	۹,۸	۹,۹٦
۱۱	۲۰۰	۷	۱۰,۱	۱۰,۱٦
۱۲	۲۰۰	٦,۵	۱۰	۹,۹۷
۱۳	۱۸۰	۷	۹,۹	۹,۹٦

در نهایت۳ نقطه که دارای مقدار بهینه برای هر یک از پارامترها می باشند در جدول زیر (۳) آورده شده است.

جدول ۳ مشخصات نقطه بهینه

شماره	هوادهی	pH	فعالیت	مطلوبیت	
۱	۱۹۵,٦٦	۷,٤۸	۱۱,۳۷	۱	
۲	۱۹۲	۷,٤٦	۱۱,۳۳	۱	
۳	۱۹۰	۷,۵	۱۱,٤۲	۱	انتخاب شد

نقطه انتخابی داری میزان هوادهی ۱۹۰ rpm و pH =۷,۵ می‌باشد.

سرعت همزدن فاکتور مهم و تاثیر گذار در تولید لیپاز می باشد و در این تحقیق نیز تولید لیپاز با سرعت همزدن افزایش

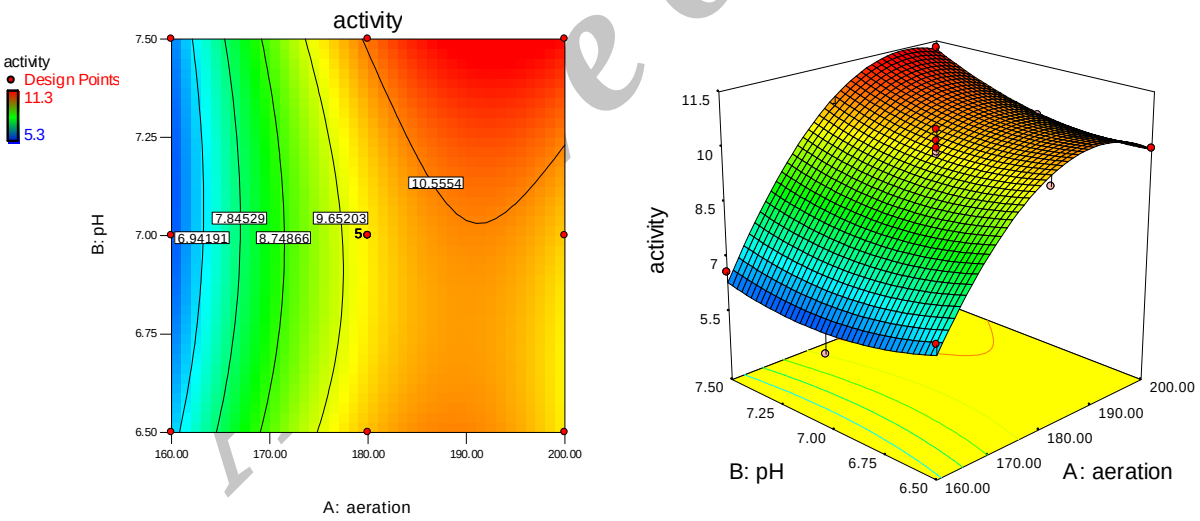
Archive of SID

www.SID.ir

یافت. هوادهی برای رشد و کارایی سلول های میکروبی مهم می باشد زیرا در انتقال جرم شامل انتقال مواد غذایی، سوبسترا، محصول مورد نظر، محصول جانبی و اکسیژن نقش دارد.

از آنجایی که کپک ها به صورت طبیعی هوازی هستند، مقدار زیادی اکسیژن محلول برای رشد، تکثیر و تولید لیپاز نیاز دارند. تولید لیپاز توسط *A.niger* نیز در نزدیک به انتهای فاز لگاریتمی تولید می شود بنابراین میزان رشد نیز در افزایش تولید لیپاز موثر است [٦].

یکی از پارامترهای مهم در تولید لیپاز میزان اکسیژن قابل دسترس میکروارگانیسم می‌باشد. وادهی و هارمن در سال ۱۹٦۹ نشان دادند که آنزیم لیپاز در محیط کشت های هوادهی شده تولید می گردد [١٤]. اثر محدودیت اکسیژن در تولید لیپاز توسط توده میکروبی و کشت میکروارگانیسم های رشته‌ای چشمگیرتر است. این مشکل در مورد باکتری ها و مخمرهای بدام افتاده یا تثبیت شده در ژل های کروی شکل نیز اتفاق می افتد. در تولید آنزیم به روش غوطه‌وری، اکسیژن به صورت محلول در اختیار میکروارگانیسم قرار می‌گیرد. این انتقال به وسیله هوادهی و همزدن محیط کشت فراهم می‌شود. همزدن محیط کشت علاوه بر هوادهی موجب همگنی محیط کشت شده و شرایط را برای همه سلول ها یکسان می‌کند. میزان بهینه سرعت همزدن برای تولید لیپاز از این میکروارگانیسم برابر با ۱۹۰rpm بدست آمد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌کنیم با افزایش میزان هوادهی از ١٦٠ تا ۱۹۰ دور بر دقیقه میزان تولید لیپاز به شدت افزایش یافته است و به میزان بهینه می‌رسد ولی پس از آن این روند به صورت کاهشی ولی به صورت ملایم و شیب کم خواهد بود. آنزیم‌ها به نیروهای مکانیکی خیلی حساس می‌باشند. تنش برشی در سرعت بالای همزدن ممکن است شکل پیچیده مولکول‌های کمپلکس را تخریب کند، آنچنان که درجه‌ای از دناتوراسیون اتفاق افتد. کاهش فعالیت آنزیمی مشاهده شده در سرعت‌های بالای همزدن در این بررسی ممکن است در نتیجه درهم‌ریختگی ساختار پروتئین در طی سنتز لیپاز باشد. بهترین سرعت همزدن جهت تولید لیپاز توسط *Aspergillus carneus* [١٥] و *Rhizopus chinensis* [١٦] ۲۰۰ rpm گزارش شده است.



شکل ۲ اثر متقابل هوادهی و pH روی تولید لیپاز

اثر pH اولیه محیط کشت نیز بر روی تولید لیپاز مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۲ قابل مشاهده است تنظیم pH اولیه در چگونگی انجام تخمیر و راندمان تولید لیپاز موثر است. حداکثر تولید لیپاز در pH ۷,۵ مشاهده شد. این سویه آسپرژیلوس نایجر قادر به تولید اسید سیتریک به عنوان محصول جانبی است. راشدی و مظاهری اسدی (۱۳۸۷) در تحقیق بر روی این سویه در محیط حاوی شیره خرما جهت تولید اسید سیتریک اعلام کردند که با افزایش pH اولیه از ۳,۵ تا ٦,۵ شرایط برای رشد سلولی مناسب تر شده و ضمن مصرف قند بیشتر، بیومس یا جرم سلولی بیشتری نیز تولید می شود. در مورد تولید اسید سیتریک بیشترین تولید در pH اولیه ٤,۵ تا ٦ است و از pH حدود ۵,۵ به بعد با یک کاهش نسبی روبه رو می شود. در pH =۷ تولید اسید کمی افزایش یافته و در pH اولیه ۸ به شدت کاهش می یابد [۱۷].

نتایج این بررسی نیز در میزان سرعت همزدن پایین نشان دهنده کاهش میزان تولید لیپاز در pH =۷ و افزایش دوباره

Archive of SID

www.SID.ir

تولید لیپاز با افزایش pH است ولی سرعت بالای همزدن کاهش تولید لیپاز در pH =۷ مشاهده نمی شود و تولید به صورت تقریباً خطی افزایش می یابد. از آنجا که در pH اولیه ۷,۵ مصرف قند و تولید توده سلولی در حداکثر خود و تولید اسید سیتریک به عنوان محصول جانبی این میکروارگانیسم در کمترین میزان خود است، ما شاهد بیشترین تولید آنزیم لیپاز در pH =۷,۵ بودیم.

در واقع تنظیم pH یکی از راههای کنترل فرآیند تخمیر در جهت تولید محصول مورد نظر است زیرا رشد سلول های میکروبی به وسیله pH تحت تاثیر قرار می‌گیرد. آنزیم لیپاز دارای ساختمان پروتئینی بوده و حاوی گروه های قابل یونیزه شدن می‌باشد. از این رو pH محیط کشت نیز بر روی ساختمان و عمل لیپاز موثر است. در مورد تولید آنزیم لیپاز، بدلیل تولید این آنزیم در نزدیک به انتهای فاز لگاریتمی، شرایط محیط کشت می بایست به گونه ای باشد که اجازه رشد سلولی را به قارچ آسپرژیلوس نایجر داده و از تولید محصولات جانبی تا حد ممکن جلوگیری نماید. بنابراین با تنظیم pH اولیه، ضمن کنترل رشد سلولی، می توان شرایط تخمیر را در جهت تولید محصول مورد نظر تغییر داد.pH بهینه جهت تولید لیپاز توسط آسپرژیلوس توسط محققان مختلف متفاوت گزارش شده است به عنوان مثال pH=۷ برای *Aspergillus japonicus* MTCC 1975 [۱۸]، pH=۹ برای *Aspergillus terreus* [۱۹] و pH=٦ برای *Aspergillus wentii* [۲۰].

راندمان تولید لیپاز توسط *A.niger* در محیط حاوی شیره خرما پس از بهینه سازی شرایط محیط کشت بر حسب واحد آنزیم تولیدی به ازای یک لیتر محیط کشت برابر با U ۱۱٤۲۰ می باشد همچنین راندمان تولید لیپاز توسط شیره خرما پس از بهینه سازی متغییرهای فیزیکی محیط کشت نیز برابر با ٤۱٦,۷۸ واحد به ازای هر گرم شیره خرمای مصرفی بود.

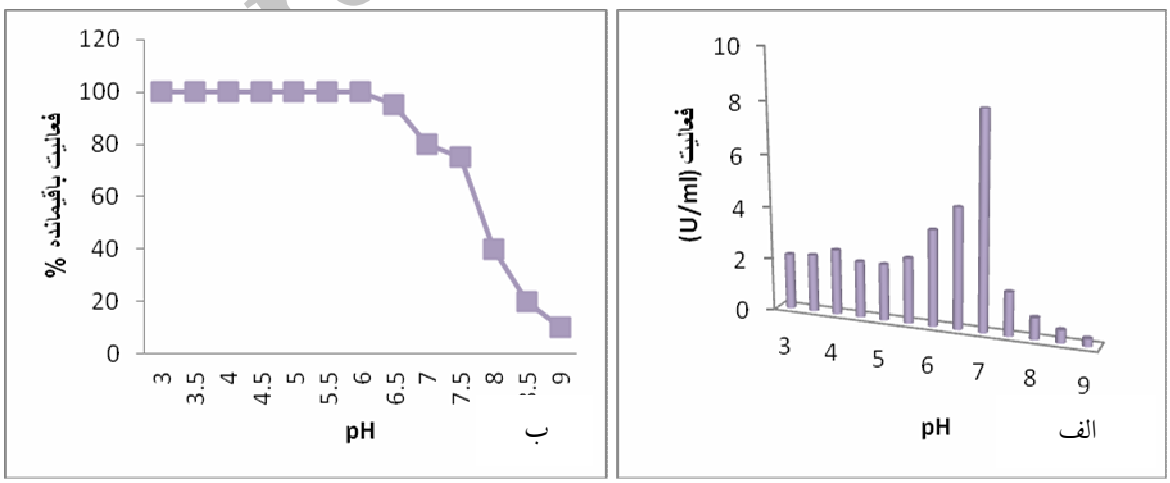
آزمایش اعتبار مدل

برای تعیین اعتبار مدل، کشت میکروارگانیسم با استفاده از شرایط بهینه بدست آمده انجام گرفت. بیشترین فعالیت لیپاز (U/ml ۱۱,۲) بدست آمده به مقادیر پیش بینی شده توسط مدل (U/ml ۱۱,٤۲) بسیار نزدیک بود.

بررسی خصوصیات آنزیم

اثر pH بر فعالیت آنزیم استخراج شده و پایداری آنزیم در برابر pH

ارزیابی فعالیت آنزیم لیپاز در شرایط مختلف pH انجام گرفت و نتایج در شکل ۳ مشاهده می شود. فعالیت بهینه آنزیم استخراج شده در۷ =pH مشاهده گردید و به طور کلی فعالیت این لیپاز در شرایط اسیدی بیشتر از شرایط قلیایی است. این نتیجه مشابه نتایج *A. niger* MTCC 2594 می باشد که برابر ۷ گزارش شده است [۲۱]. همچنین ادهم و احمد pH بهینه برای فعالیت لیپاز حاصل از *A. niger NRRL3* را در حدود ۷,۲ [۱۱] و فالونی و همکاران برای *A. niger* J-1، ٦,۵ را گزارش نموده اند [۷].



شکل ۳ اثر pH روی فعالیت لیپاز (الف) و اثر pH روی فعالیت باقیمانده لیپاز(ب).

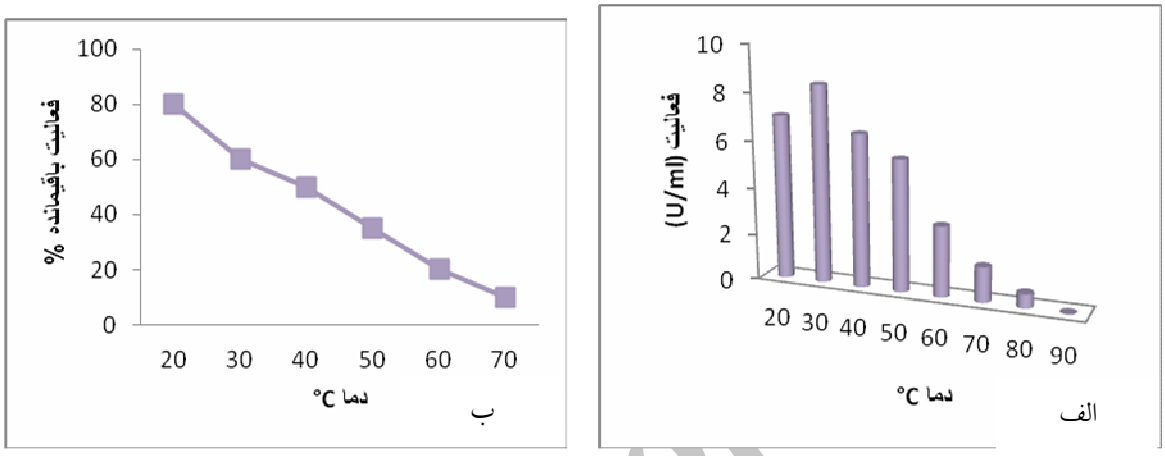
همانطور که شکل ۳ (ب) مشاهده می شود، فعالیت باقیمانده پس از گذشت ۱ ساعت در pH های اسیدی تا حدود ۷ نزدیک به ۱۰۰٪ می باشد ولی در۸= pH تنها ٤۰٪ فعالیت

www.SID.ir

باقیمانده است. در نتیجه این آنزیم در شرایط اسیدی پایداری مطلوبی دارد و مقاوم به شرایط اسیدی می‌باشد.

تاثیر دما روی فعالیت آنزیم استخراج شده و پایداری دمایی آن: فعالیت لیپاز در رنج دمایی ۲۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین فعالیت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد مشاهده گردید (شکل ٤. الف). دمای بهینه برای *A. niger* MYA 135 ۳۰-۳۵°C و برای *A. niger* J-1 ٤۰°C گزارش گردید [۷ و ۱۳].

پایداری آنزیم لیپاز حاصل از *A. niger* PTCC 5010 با افزایش دما به شدت کاهش می یابد. به طوریکه تا ۲۵ °C، ۷۵٪ فعالیت باقیمانده و در دمای ٤۰ °C نیمی از فعالیت از دست رفته است. نتایج مشابه ای برای لیپاز های قارچی دیگر گزارش شده است [۲۲ و ۲۳]. این خصوصیات لیپاز حاصل را جهت استفاده در کارخانجات چای سازی مناسب می سازد، زیرا در آنجا واکنش در دمای ۱۵ °C تا ۲۰ و pH نسبتاً اسیدی انجام می گیرد [۲٤].



شکل ٤ ثر دما روی فعالیت لیپاز (الف) و اثر دما بر فعالیت باقیمانده لیپاز (ب).

٤- نتیجه‌گیری

پس از بهینه سازی شرایط فیزیکی محیط کشت شامل pH و سرعت همزدن برای تولید لیپاز در کشت غوطه وری حاوی شیره خرما توسط *A.niger* مشخص گردید که راندمان تولید لیپاز پس از بهینه سازی شرایط محیط کشت بر حسب واحد آنزیم تولیدی به ازای یک لیتر محیط کشت برابر با ۱۱٤۲۰ U بود. روش آماری استفاده شده، پاسخ عکس العمل سطح (RSM) با طرح CCD بود. جهت برازش سطح پاسخ از معادله درجه دوم استفاده شد. آنالیز واریانس انجام شده، نشان دهنده معنی دار بودن مدل با ارزش P ۰,۰۰۱۵ و R^2=۰,۹۱ می باشد. pH معادل ۷,۵ و سرعت همزدن ۱۹۰rpm بهترین نتیجه را در تولید لیپاز نشان دادند. بدلیل تولید پلت میکروبی توسط *A.niger* محدودیت انتقال جرم و اکسیزن بسیار حائز اهمیت است. به همین دلیل افزایش سرعت همزدن تا rpm ۱۹۰ سبب افزایش تولید آنزیم گردید ولی پس از آن تولید آنزیم کاهش یافت که در نتیجه درهم‌ریختگی ساختار پروتئین در طی سنتز لیپاز در تنش بالا می باشد. سپس میزان فعالیت و پایداری آنزیم در pH های مختلف و همچنین در دماهای مختلف، مورد بررسی قرار گرفت. این لیپاز دارای بیشترین فعالیت در pH ۷ و پایداری آنزیم در شرایط اسیدی می باشد. فعالیت لیپاز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بهینه بود و پایداری آن در دماهای بالا کاهش می یابد. بنابراین این آنزیم به عنوان لیپاز مقاوم به اسید شناخته می‌شود.

۵- منابع

[1] Filer, K. 2001. The newest old way to make enzymes. Feed Mix, 9: 27–29.
[2] Pandey A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., and Nigam, P. 2001. Solid state fermentation in Biotechnology Fundamentals and Applications. Asiatech Publishers Inc., New Delhi.
[3] Elibol, M., and Ozer, D. 2000. Influence of Oxygen Transfer on Lipase Production by *Rhizopus arrhizus*. Process Biochem. 36: 325–329.
[4] Acıkel, U., Ersana, M., and Acıkel, Y. S. 2010. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. food and bioproducts processing, 8 : 31–39.

Archive of SID

www.SID.ir

[5] Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Segura, R.L., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., and. Palomo, J.M. 2005. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. Biotechnol. Bioeng. 92: 773–779.

[6] Ghamari, M., Tabatabaie, F., Alemzade, I., Vosooghi, M., and Varidi, M. 2015. Optimization of culture medium containing date waste for lipase production by *Aspergillus niger* using RSM method. Food Science and Technology, * : *-*.(submit, in press)

[7] Falony, G., Armas, J. C., Dustet Mendoza, J. C., and Martínez Hernández, J. L. 2006. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. Food Technol. Biotechnol. 44 (2):235-240.

[8] Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., and Shirai, K. 2003. Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*. Macromolecular Bioscience. 3(10): 582–586.

[9] Kaushik, R., Saran, S., Isar, J., and Saxena, R. K. 2006. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillu scraneus*. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, 40:121–126.

[10] Basheer, S. M., Chellappan, S., Beena, P. S., Sukumaran, R. K., Elyas, K. K., and Chandrasekaran, M. 2011. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. New Biotechnology , 28: 627- 638.

[11] Adham, N.Z., and Ahmed, E.M. 2009. Extracellular lipase of *Aspergillus niger* NRRL3 production, partial purification and properties. Ind. J Microbiol, 49:77–83.

12] Ota Y., and Yamada.K. 1966. Lipase from candida paralipolytica Part I. Anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyle alcohol. Agric Biol Chem. 30: 351-358.

[13] Pera, L. M., Romero, C. M., Baigori, M. D., and Castro, G. R. 2006. Catalytic Properties of Lipase Extracts from Aspergillus niger. Food Technol. Biotechnol. 44(2):247-252.

[14] Vadehi, D. V., and Harmon, L.G. 1969. Factors affecting production of staphylococcal lipase. Journal of Applied Bacteriology, 32: 147-150.

[15] Kaushik, R, Saran, S., Isar, J., and Saxena, R. K. 2006. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, 40: 121–126.

[16] Teng, Y., and Xu, Y. 2008. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by Rhizopus chinensis using statistical method. Bioresource Technology, 99: 3900–3907.

17. Rashedi, H., and Mazaheri Asadi, M. 2008.Optimization of the production of citric acid from date waste using liquid phase. Knowledge of microbiology. 1(1): 1-11.

18. Saratbabu, I., Sitakumari, K., Sridevi, V. V., and Rao, M. N. 2005. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for lipase production by Aspergillus japonicus MTCC 1975 under solid state fermentation . Biosci. Biotechnol. Res. Asia, 3(2):203-208.

19. Yadav, R. P., Saxena, R. K., Gupta, R., and Davidson, S. 1997. Production of biosurfactant from sugar alcohols and natural triglycerides by. Aspergillus terreus lipase.. J. Sci. Ind. Res, 56: 479–482.

20. Ramarethinam, S., Latha, K., and Rajalakshmi, N. 2002. Use of a fungal lipase for enhancement of aroma in black tea, Food Sci. Technol. 8: 328–332.

21. Kamini, N.R., Mala, J.G.S., and Puvanakrishnan, R. 1998. Lipase production from Aspergillus niger by solid-state fermentation using gingelly oil cake, Process Biochem. 33,pp. 505–511.

[2]Mozaffar, Z., and Weete, J.D. 1993. Purification and properties of an extracellular lipase from Pythium ultimum, Lipids, 28: 377–392

[23] lips, A., and Pretorius, G.H.J.1991. Purification and characterization of an extracellular lipase of Galactomyces geotrichum, Biotechnol. Lett. 13:833–838.

[24] ethinam, S., Latha, K., and Rajalakshmi, N. 2002. Use of a fungal lipase for enhancement of aroma in black tea, Food Sci. Technol. 8: 328–332.

Archive of SID

www.SID.ir

Optimization of Physical Parameters effecting lipase production by *Aspergillus niger* PTCC 5010 in culture medium containing date waste and Studying the properties of the produced enzyme

Ghamari, M. [1], Tabataba I Yazdi, F. [2*], Alam Zadeh, I. [3], Vosoghi, M. [4], Varidi, M. [5], Safari, H. [6]

1. Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
2. Assoc.Prof, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
3. Professor, Department of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology
4. Professor, Department of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology
5. Assoc.Prof, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
6. Graduated chemical engineer, Department of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology

(Received: 93/10/23 Accepted: 93/12/9)

Microbial Lipases are one of the most useful enzymes in various industries and the Lipase produced by *Aspergillus niger* fungus has a significant importance because of its product non toxin for usage in food and pharmaceutical industries. The production of the enzyme is affected by the conditions of its surrounding environment; thus, in this study the effect of two parameters of pH value and stirring rate in production of Lipase from *Aspergillus niger* source have been investigated with RSM method. The pH value of 7.5 and stirring rate of 190rpm have shown the best result in production of Lipase by submerged culture in medium containing date waste. Then the activity and stability of enzyme in different pH values and temperatures were investigated and the enzyme had its most activity in pH=7 while it is also stable in acidic conditions. The activity of Lipase was optimum in temperature of 30 Celsius and its activity is decreased in higher temperatures.

Key words: Lipase, *Asspergillus niger*, Stirring rate, pH, Enzyme characters.

Archive of SID

* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir

www.SID.ir