

بهینه سازی پارامترهای فیزیکی در میزان تولید آنزیم لیپاز توسط آسپرژیلوس نایجر PTCC5010 در محیط حاوی شیر خرمای 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

۴- استاد دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف

۵- دانشیار دانشکده کشاورزی، گروه صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۶- 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 متغیر 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 شیر خرمای، 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

۱- مقدمه

بطور تقریبی ۹۰٪ از تمام بیوکاتالیست‌های صنعتی توسط کشت غوطه‌وری^۱ (SmF)، بهینه‌سازی اختصاصی محیط کشت و دستکاری ژنتیکی میکروارگانیسم تولید می‌شوند [۲و۱]. مطالعات بسیاری برای تعیین محیط کشت بهینه و نیازهای غذایی جهت تولید لپياز 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 بر این، مورفولوژی آسپرژیلوس نایجر^۲ به طور معمول به صورت توده گلوله‌ای شکل^۳ 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 می‌باشد [۴]. 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، بهینه‌سازی شرایط کشت از اهمیت به‌سزایی برخوردار است [۳].

لپازها دارای طیف وسیعی از خصوصیات کاتالیستی می‌باشند که به طور زیادی وابسته به سویه تولید کننده آنها می‌باشد. گونه‌های مختلف آسپرژیلوس قادر به تولید لپازهای 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 می‌گردد. به همین دلیل جهت کاربرد لپياز تولید شده در صنایع مختلف، تعیین خصوصیات آنزیم لپياز تولیدی از هر میکروارگانیسم ضروری می‌باشد.

شیره خرما محیطی غنی از قند و دیگر مواد مغذی است که می‌تواند به عنوان سوبسترا جهت تولیدات بیوتکنولوژی و حل

مشکل ضایعات خرماي کشور مورد استفاده قرار گیرد. در کار تحقیقی گذشته موفق به بهینه‌سازی منابع کربن، نیتروژن و محرک آنزیمی در محیط حاوی شیره خرما شدیم [۶]. لذا در ادامه بررسی‌ها و به منظور افزایش تولید لپياز هدف این مطالعه، بهینه‌سازی شرایط کشت آسپرژیلوس نایجر در محیط حاوی شیره خرما شامل میزان هوادهی و pH جهت تولید بهینه لپياز و بررسی خصوصیات لپياز 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 پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت تکثیر و نگهداری کوتاه مدت سوش از محیط PDA استفاده شد. اسلنت‌های تهیه شده در ۴ 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 حاوی ۰٫۱٪ 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 نئویار تعداد اسپورها را 10^7 اسپور در میلی لیتر برای تمام آزمایشات تنظیم می‌کنیم [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، ۲، ۱، ۲، ۲، ۰٫۰۵ و ٪ 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

بررسی خصوصیات آنزیم لپاز

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

اثر pH: برای مطالعه اثر pH فعالیت لپاز در pH 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=۳-۶، بافر فسفات برای pH=۷-۸ و بافر بورات برای pH=۹-۱۰) [۱۳].

پایداری دمایی و پایداری در برابر pH: جهت بررسی پایداری دمایی، آنزیم استخراج شده در دماهای ۲۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد برای ۲۴ 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 ۴ 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 لپاز

فعالیت لپاز 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 متغیرها به صورت معادله درجه دوم پلی نومیال زیر بیان شد که در آن $Y = \text{فعالیت آنزیم}$ ، $X_1 = \text{هوادهی}$ ، $X_2 = \text{pH}$ می باشند:

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

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

استریل شده، اضافه می گردد [۶]. شرایط کشت نیز شامل دما 30°C ، زمان ۵ روز در نظر گرفته شد [۶] 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 (۷، ۶، ۵، $\text{pH}=7.5$ و سرعت همزدن=۲۰۰، ۱۸۰، ۱۶۰) با استفاده از طرح فاکتوریل CCD بهینه سازی شد که شامل ۵ تکرار در نقطه مرکزی با $\alpha=1$ و متغیر وابسته یا پاسخ میزان فعالیت آنزیمی بوده و ۱۳ آزمایش توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت^۴، طراحی گردید (جدول ۱). سطوح این متغیرها 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 لپاز توسط محققان مختلف گزارش شده است [۶، ۹ و ۱۰].

استخراج لپاز

جهت حذف میسلیوم محیط کشت با کاغذ واتمن فیلتر می گردد، سپس سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰ rpm 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 لپاز طبق روش اوتا و یامادا اندازه گرفته شد. این روش بر اساس هیدرولیز امولسیون روغن زیتون و پلی وینیل الکل استوار می باشد. واحد فعالیت لپاز (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 $\text{pH}=7$ ، از سویسترا آزاد نماید (که در این جا سویسترا، امولسیون روغن زیتون به علاوه پلی وینیل الکل^۵ و اسید چرب آزاد شده، اسید اولئیک است) [۱۲].

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

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

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	P	ارزش
مدل	۳۵,۸	۵	۷,۱۶	۴۷,۲۲	< ۰,۰۰۰۱	معنی دار
Lack of Fit	۰,۷۵	۳	۰,۲۵	۰,۴۳	۰,۱۴	بی معنی
خطای خالص	۰,۳۱	۴	۰,۰۷۷			
خطای کل	۳۶,۸۶	۱۲				

$$R^2 = ۰,۹۷; R^2_{adjusted} = ۰,۹۵; R^2_{predicted} = ۰,۸۳$$

جدول ۱ نتایج بهینه سازی شرایط کشت

فعالیت (U/ml)		B:pH	A: هوادهی (rpm)	تیمار
پیش بینی شده	آزمایشی			
۹,۹۶	۱۰,۵	۷	۱۸۰	۱
۱۰,۲	۹,۹	۶,۵	۱۸۰	۲
۱۱,۲۶	۱۱,۳	۷,۵	۲۰۰	۳
۱۰,۶۳	۱۰,۳	۷,۵	۱۸۰	۴
۶,۳	۶,۶	۷,۵	۱۶۰	۵
۹,۹۶	۱۰,۲	۷	۱۸۰	۶
۶,۷۳	۷	۶,۵	۱۶۰	۷
۶,۰۶	۵,۵	۷	۱۶۰	۸
۹,۹۶	۱۰	۷	۱۸۰	۹
۹,۹۶	۹,۸	۷	۱۸۰	۱۰
۱۰,۱۶	۱۰,۱	۷	۲۰۰	۱۱
۹,۹۷	۱۰	۶,۵	۲۰۰	۱۲
۹,۹۶	۹,۹	۷	۱۸۰	۱۳

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

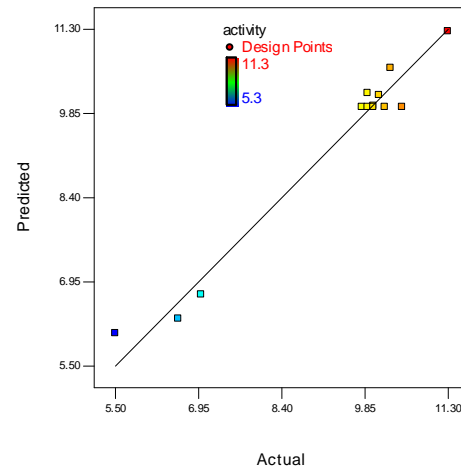
جدول ۳ مشخصات نقطه بهینه

شماره	هوادهی	pH	فعالیت	مطلوبیت
۱	۱۹۵,۶۶	۷,۴۸	۱۱,۳۷	۱
۲	۱۹۲	۷,۴۶	۱۱,۳۳	۱
انتخاب شد	۱۹۰	۷,۵	۱۱,۴۲	۱

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

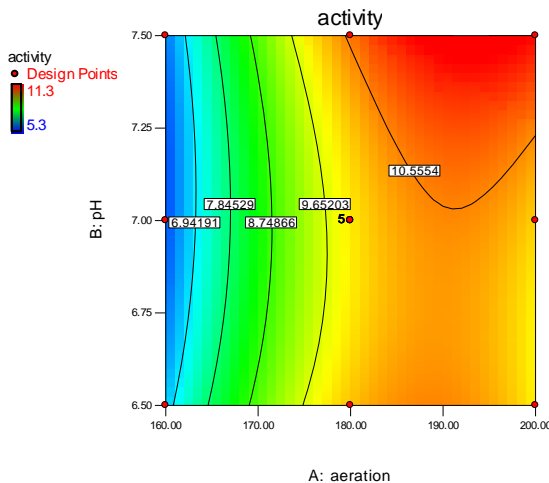
سرعت همزدن فاکتور مهم و تاثیر گذار در تولید لیپاز می باشد و در این تحقیق نیز تولید لیپاز با سرعت همزدن افزایش

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 $R^2_{predicted} = ۰/۸۳$ 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.

وسیله هوادهی و همزدن محیط کشت فراهم می‌شود. همزدن محیط کشت علاوه بر هوادهی موجب همگنی محیط کشت شده و شرایط را برای همه سلول‌ها یکسان می‌کند. میزان بهینه سرعت همزدن برای تولید لیپاز از این میکروارگانیسم برابر با ۱۹۰ rpm بدست آمد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌کنیم با افزایش میزان هوادهی از ۱۶۰ 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* [۱۵] و *Rhizopus chinensis* [۱۶] ۲۰۰ rpm گزارش شده است.



شکل ۲ اثر متقابل هوادهی و pH روی تولید لیپاز

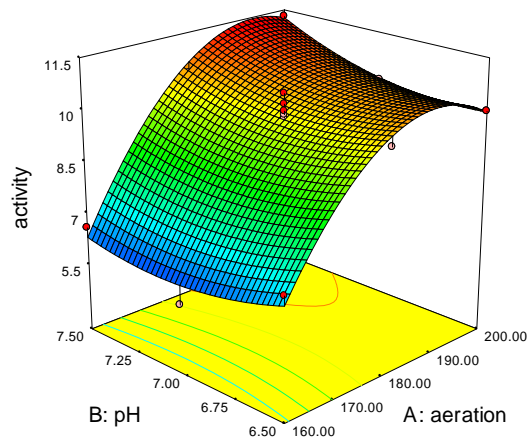
تا ۶٫۵ شرایط برای رشد سلولی مناسب تر شده و ضمن مصرف قند بیشتر، بیومس یا جرم سلولی بیشتری نیز تولید می‌شود. در مورد تولید اسید سیتریک بیشترین تولید در pH اولیه ۴٫۵ تا ۶ است و از pH حدود ۵٫۵ به بعد با یک کاهش نسبی روبه رو می‌شود. در pH = ۷ تولید اسید کمی افزایش یافته و در pH اولیه ۸ به شدت کاهش می‌یابد [۱۷].

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

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

از آنجایی که کپک‌ها 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 می‌شود بنابراین میزان رشد نیز در افزایش تولید لیپاز موثر است [۱۶].

یکی از پارامترهای مهم در تولید لیپاز میزان اکسیژن قابل دسترس میکروارگانیسم می‌باشد. وادهی و هارمن در سال ۱۹۶۹ نشان دادند که آنزیم لیپاز در محیط کشت‌های هوادهی شده تولید می‌گردد [۱۴]. اثر محدودیت اکسیژن در تولید لیپاز توسط توده میکروبی و کشت میکروارگانیسم‌های رشته‌ای چشمگیرتر است. این مشکل در مورد باکتری‌ها و مخمرهای بدم افتاده یا تثبیت شده در ژل‌های کروی شکل نیز اتفاق می‌افتد. در تولید آنزیم به روش غوطه‌وری، اکسیژن به صورت محلول در اختیار میکروارگانیسم قرار می‌گیرد. این انتقال به



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 شیر خرم جهت تولید اسید سیتریک اعلام کردند که با افزایش pH اولیه از ۳٫۵

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 11420 U می باشد همچنین راندمان تولید لیپاز توسط شیره خرما پس از بهینه سازی متغیرهای فیزیکی محیط کشت نیز برابر با $416,78$ واحد به ازای هر گرم شیره خرما مصرفی بود.

آزمایش اعتبار مدل

برای تعیین اعتبار مدل، کشت میکروارگانیزم با استفاده از شرایط بهینه بدست آمده انجام گرفت. بیشترین فعالیت لیپاز ($11,2 \text{ U/ml}$) بدست آمده به مقادیر پیش بینی شده توسط مدل ($11,42 \text{ U/ml}$) بسیار نزدیک بود.

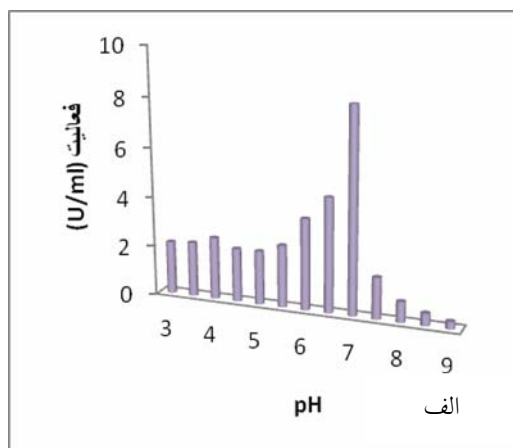
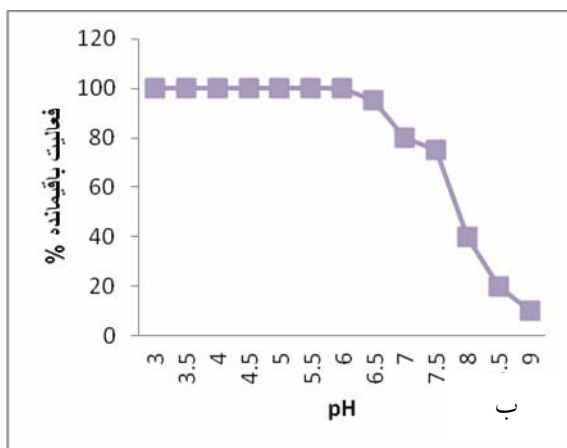
بررسی خصوصیات آنزیم

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 در $\text{pH}=7$ 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 را ۶,۵ [۷] گزارش نموده اند [۷].

تولید لیپاز با افزایش pH است ولی سرعت بالای همزدن کاهش تولید لیپاز در $\text{pH}=7$ 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 میکروارگانیزم در کمترین میزان خود است، ما شاهد بیشترین تولید آنزیم لیپاز در $\text{pH}=7,5$ 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 می گیرد. آنزیم لیپاز دارای ساختمان پروتئینی بوده و حاوی گروه های قابل یونیزه شدن می باشد. 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 $\text{pH}=7$ برای *Aspergillus japonicus* MTCC 1975 [۱۸]، $\text{pH}=9$ برای *Aspergillus terreus* [۱۹] و $\text{pH}=6$ برای *Aspergillus wentii* [۲۰].

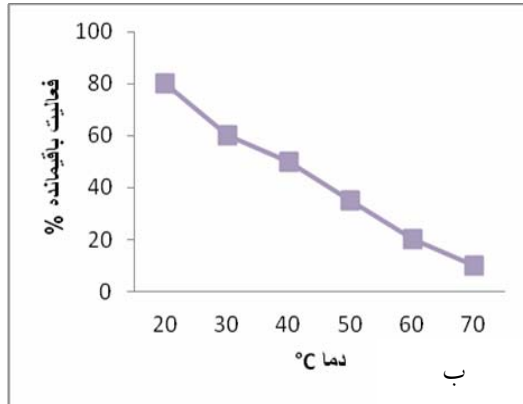


شکل ۳ اثر pH روی فعالیت لیپاز (الف) و اثر pH روی فعالیت باقیمانده لیپاز (ب).

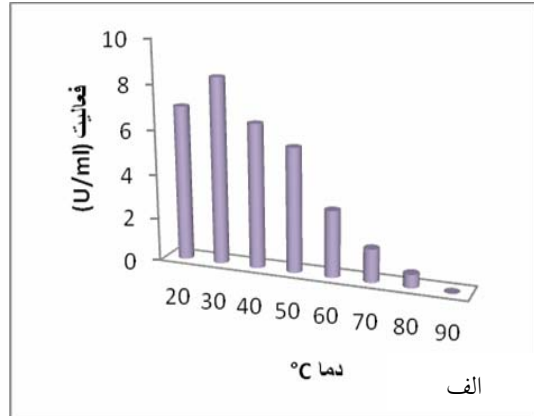
نزدیک به ۱۰۰٪ می باشد ولی در $\text{pH}=8$ تنها ۴۰٪ فعالیت

همانطور که شکل ۳ (ب) مشاهده می شود، فعالیت باقیمانده پس از گذشت ۱ ساعت در pH های اسیدی تا حدود ۷

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 ۴۰ °C نیمی از فعالیت از دست رفته است. نتایج مشابهی برای لیپازهای 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 °C و pH نسبتاً اسیدی انجام می گیرد [۲۴].



شکل ۴ اثر دما بر فعالیت باقیمانده لیپاز (ب) و اثر دما روی فعالیت لیپاز (الف)



۴- نتیجه گیری

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 می شود.

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 ۱۱۴۲۰ 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 $P = 0.0015$ و $R^2 = 0.91$ می باشد. pH معادل ۷.۵ و سرعت همزدن ۱۹۰ rpm بهترین نتیجه را در تولید لیپاز نشان دادند. بدلیل تولید پلت میکروبی توسط *A. niger* محدودیت انتقال جرم و اکسیژن بسیار حائز اهمیت است. به همین دلیل افزایش سرعت همزدن تا ۱۹۰ rpm سبب افزایش تولید آنزیم گردید ولی پس از آن تولید آنزیم کاهش یافت که در نتیجه درهم ریختگی 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

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] Acikel, U., Ersana, M., and Acikel, 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.

- [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.
- [22] 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.
- [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 *Aspergillus 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 paraliopolytica* 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.

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.

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