مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم فسفولیپاز در محیط‌کشت غوطه‌وری توسط سویه *Trichoderma atroviride* sp. ZB-ZH292

زهرا بیگ‌محمدی[۱*]، زهره حمیدی اصفهانی[۲]، محمد علی سحری[۲]، کیانوش خسروی دارانی[۳]

۱- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳- گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۰

کلمات کلیدی:

فسفولیپاز،

Tricoderma atroviride،

طراحی پلاکت-برمن،

روش سطح پاسخ.

DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0

* مسئول مکاتبات:

z.beigmohammadi@iau-tnb.ac.ir

چکیده

فسفولیپازها گروه مهمی از آنزیم‌ها با کاربردهای گسترده در صنایع مختلف هستند. در این پژوهش بهینه‌سازی دو مرحله‌ای شامل استفاده از طرح غربالگری پلاکت- برمن و سپس بهینه‌سازی سطح پاسخ با هدف افزایش تولید فسفولیپاز سویه منتخب جهش‌یافته *Trichoderma atroviride* sp.ZB-ZH292 انجام شد. در مرحله اول جهت غربالگری و انتخاب مهمترین فاکتورها بر میزان توده زیستی و فعالیت فسفولیپاز، از طرح پلاکت - برمن با هفت متغیر دما، زمان، میزان فسفولیپید سویا (به عنوان منبع کربنی)، میزان پپتون (به عنوان منبع نیتروژنی)، نسبت مساوی از منو و دی‌پتاسیم‌هیدروژن فسفات (به عنوان منبع فسفر)، درصد تلقیح و سن تلقیح، در دو سطح استفاده گردید. بر اساس نتایج حاصل از غربالگری متغیرهای زمان گرمخانه‌گذاری ($P<۰/۰۱$)، دما گرمخانه‌گذاری ($P<۰/۰۱$) و فسفولیپید سویا ($P<۰/۰۵$) به عنوان منبع کربنی اثر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیمی داشتند و در نتیجه جهت اجرای بهینه‌سازی نهایی به عنوان متغیرهای مستقل در طرح مرکب‌مرکزی به روش آماری سطح پاسخ وارد شدند. بر این اساس طی ۲۰ آزمایش طراحی شده، اثر سه متغیر دمای گرمخانه‌گذاری (۲۰-۳۰ °C)، زمان گرمخانه‌گذاری (۵-۳ روز) و فسفولیپید سویا (٪ ۹-۳) بر میزان فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) میزان ٤/۳۲٪ فسفولیپید، دما ۲۹/۷۳ °C و زمان ۱۰۱/۷٦ ساعت گرمخانه‌گذاری به عنوان شرایط بهینه در تولید فسفولیپاز پیش‌بینی شدند. در این شرایط، میزان فعالیت فسفولیپاز (U/ml) ۳/۵۷ تعیین گردید که با نتیجه پیش‌بینی‌شده توسط مدل (۳/۵٦ U/ml) مطابقت داشت.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169]

۱- مقدمه

فسفولیپازها با قابلیت تأثیر بر فسفولیپیدها، قادر به جداسازی اسیدهای چرب و گروه‌های فسفاته در مولکول فسفولیپید، دارای کاربردهای بالقوه‌ای در بخش‌های مختلف صنعتی از قبیل صنایع‌غذایی (صمغ‌زدایی روغن‌ها، روغن‌زدایی از صمغ‌ها و تولید امولسیفایرهای با خصوصیات ویژه)، داروسازی و تولید واکسن‌ها، لوازم‌آرایشی، مواد شیمیایی روغنی و تولید شوینده‌ها می‌باشند [۳-۱]. این آنزیم‌ها با توجه به نحوه عملکرد، جایگاه و نوع پیوندی که تحت تأثیر قرار می‌دهند به انواع A_1، A_2، B، C و D تقسیم‌بندی می‌شوند و از منابع مختلفی از جمله منابع حیوانی و منابع میکروبی حاصل می‌شوند و طیف وسیعی از خصوصیات کاتالیستی آن‌ها وابسته به سویه تولید کننده می‌باشد [٤].

فسفولیپازها عموماً توسط ریزسازواره‌ها[1] و با استفاده از محیط-کشت تخمیر غوطه‌وری[2] تولید می‌شوند. این روش به دلیل امکان کنترل ساده‌تر پارامترها و تولید محصولات در حجم بالا، نسبت به سایر روش‌های کشت‌های تخمیری مورد توجه قرار گرفته‌است و بیش از ٪۹۰ بیوکاتالیست‌های صنعتی (آنزیم‌ها) با دستکاری ژنتیکی ریزسازواره‌ها، بهینه‌سازی محیط‌کشت و شرایط محیطی توسط کشت‌غوطه‌وری تولید می‌شوند [٥]. مطالعات بسیاری برای تعیین شرایط بهینه جهت تولید بیوکاتالیست‌های مختلف انجام شده‌است نشان می‌دهد این شرایط تحت تأثیر عوامل مؤثر بر تولید محصول موردنظر مانند غلظت و نوع منابع مختلف کربن، نیتروژن فسفر، pH محیط‌کشت، درجه حرارت مورد نیاز برای رشد، سن تلقیح، مدت زمان گرمخانه‌گذاری، تأثیر میزان هوا و هم‌زدن می‌باشند [٦]. روش کلی بررسی حداکثر تولید با بررسی تمامی فاکتورها شامل ترکیبات محیط‌کشت و شرایط محیطی علاوه بر صرف زمان و هزینه بالا، قادر به بیان اثر متقابل فاکتورها نیز نمی‌باشد. لذا استفاده از روش‌های آماری جهت کاهش هزینه‌ها و زمان بسیار ضروری به نظر می‌رسد. روش‌های آماری به‌ویژه غربالگری[3] و بهینه‌سازی[4] شرایط رشد ریزسازواره‌ها و یا تولید محصولات خاص مورد توجه قرار گرفته‌است. روش پلاکت- برمن روشی قوی و سریع است. این طراحی آماری در مواردی که تعداد فراوانی متغیر وجود دارد با حداقل تعداد آزمایش، قادر به ارزیابی متغیرها و انتخاب مؤثرترین آن‌ها بر پاسخ می‌باشد. با توجه به تعدد فاکتورها در آزمایش‌های بیوتکنولوژی، طراحی پلاکت- برمن در مراحل اولیه می‌تواند از کارایی بالایی برخوردار باشد [۷]. فاکتورهای انتخاب شده در مرحله غربالگری در روش‌های بهینه‌سازی مورد استفاده قرار می‌گیرند. روش بهینه‌سازی سطح پاسخ[5] (RSM) از کارایی بالایی در ارزیابی فرایندهای بیوتکنولوژی برخوردار است و در تولید بسیاری از فراورده‌های زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌است [۱۰-۸]. اصلی‌ترین مزیت این روش کاهش تعداد آزمایش‌های موردنظر جهت ارزیابی پارامترهای چندگانه، بررسی اثرات متقابل آن‌ها و بررسی رابطه بین متغییرهای مستقل و پاسخ‌ها می‌باشد [۱۱].

در پژوهش پیشین، سویه *Trichoderma atroviride* به عنوان تولیدکننده فسفولیپاز از پساب صنعت روغن جداسازی، شناسایی و با عنوان *T.atroviride* sp.ZB-ZH192 در پایگاه NCBI[6] با شماره KP233811 ثبت گردید و جهت افزایش تولید فسفولیپاز، توسط پرتوی گاما تحت جهش تصادفی قرار گرفت [۱۲]. در این پژوهش نیز برای اولین‌بار غربالگری و بهینه‌سازی شرایط جهت تولید فسفولیپاز در محیط کشت‌غوطه‌وری برای سویه *T.atroviride* sp.ZB-ZH292 (جهش‌یافته توسط اشعه گاما کبالت ٦۰ با سرعت ٤/٥۲ Gy/s، با مقدار تابش ٤۰۰Gy) بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

فسفولیپید سویا از شرکت بهپاک (بهشهر، ایران) و سایر مواد مورد استفاده در بخش شیمیایی و میکروبی با درجه خلوص بالا از شرکت‌های مرک و سیگما تهیه گردیدند. این پژوهش طی سال‌های ۱۳۹٤-۱۳۹۲ در گروه صنایع‌غذایی دانشگاه تربیت‌مدرس انجام شد.

۲-۲- محیط کشت نگهداری ریزسازواره و تهیه کشت اولیه

جهت تکثیر و نگهداری کوتاه مدت سویه *T.atroviride*

1. Microorganisms
2. Submerged Fermentation
3. Screening
4. Optimization
5. Response Surface Methodology
6. National Center for Biotechnology Information

sp.ZB-ZH292 در دمای ٤°C، از محیط کشت اسلنت PDA[1] استفاده شد. به منظور جلوگیری از کاهش فعالیت سوش و آلودگی‌های احتمالی، هر ماه اسلنت‌های جدیدی از آن تهیه گردید سپس اسپور کلنی‌های موردنظر تولید و تا زمان استفاده (طولانی‌مدت) با گلیسرول سترون (۳۰٪) ترکیب و در فریزر ۲۰- نگهداری شدند [۱۳]. پس از تهیه اسپور بر روی اسلنت، اسپورها در آب مقطر سترون حاوی ۰/۱٪ توئین ۸۰ (به منظور جداسازی بهتر اسپورها از یکدیگر و شمارش دقیق‌تر) معلق شده و با کمک لام هموسیتومتر غلظت اسپورها 10^6 spores/ml تنظیم گردید.

۲-۳- بررسی قابلیت تولید فسفولیپاز توسط ریزسازواره‌ها

بررسی تولید فسفولیپاز با استفاده از انتقال اسپور کلنی‌های سویه *T.atroviride* sp.ZB-ZH292 (10^6 spores/ml) به محیط کشت تخمیر غوطه‌وری شامل (g/L): فسفولیپید سویا، ٤؛ پپتون، ۷/۵؛ نشاسته، ۱۰؛ عصاره-گوشت، ۷/۵؛ کلریدسدیم، ۵؛ سولفات منیزیم هفت‌آبه، ۱؛ انجام شد. میزان pH محیط‌کشت و سرعت همزدن نیز به ترتیب برابر با ۷ و ۱۵۰ rpm تنظیم گردید [۱٤].

۲-٤- تعیین فعالیت آنزیمی

ابتدا میسلیوم از محیط کشت سانتریفوژ (Sigma 3-30ks, USA) با سرعت ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤°C حذف گردید. تعیین میزان فعالیت فسفولیپاز از محلول رویی بر اساس روش جیانگ و همکاران انجام شد [۱۵]. یک واحد آنزیم فسفولیپاز مقداری از آنزیم است که قادر است یک میکرومول اسید چرب قابل تیتراسیون را در واحد زمان (دقیقه) و در شرایط آزمایش، آزاد کند. جهت تهیه سوسپانسیون سوبسترا محلول ۲۵٪ فسفولیپید سویا و ٤٪ پلی‌ونیل‌الکل به نسبت ٤:۱ ترکیب شد. ٤ میلی‌لیتر از محلول سوسپانسیون، ۵ میلی‌لیتر از بافر سیتریک‌اسید (۰/۰۱M, pH: ۵/۰) و یک میلی‌لیتر از عصاره‌خام آنزیمی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C در گرمخانه شیکردار قرار گرفت. این واکنش با افزودن ۱۵ میلی‌لیتر الکل ۹۵٪ خاتمه یافت. تیتراسیون اسیدهای چرب آزاد شده توسط هیدروکسید سدیم ۰/۰۵ M صورت گرفت. غیرفعال کردن نمونه شاهد (بدون عصاره آنزیمی) نیز با قرار دادن آن در دمای ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. آزمایش‌ها در سه تکرار جهت محاسبه میانگین انجام شدند. میزان صحت و دقت روش تعیین فعالیت آنزیمی با استفاده از آنزیم استاندارد فسفولیپاز A_1 (PLA_1, Lecitase™ Ultra, Novozyme from *Thermomyces lanuginosus*) بررسی گردید.

۲-۵- تعیین میزان توده‌زیستی

وزن خشک توده‌زیستی توسط فیلتر کردن محیط کشت نمونه، روی کاغذ صافی واتمن ٤۲ و شستشوی مواد روی قیف با آب مقطر تا خروج آب شفاف از قیف تعیین شد. توده‌سلولی جدا شده تا رسیدن به وزن ثابت، در آون با دمای ٦۰°C خشک گردید [٦].

۲-٦- غربالگری و بهینه‌سازی شرایط و ترکیبات محیط‌کشت

جهت غربالگری عوامل مؤثر بر تولید فسفولیپاز و توده‌زیستی، و انتخاب فاکتورهای مؤثر، ۱۲ آزمایش در دو سطح کمترین (۱-) و بیشترین (۱)، با روش پلاکت - برمن و به کمک نرم‌افزار JMP 7.0 (SAS Institute Inc., 2007) طراحی گردید. دما (۲۰°C و ۳۰ °C)، زمان (۳ و ۷ روز)، درصد تلقیح (۲ و ٦٪)، سن تلقیح (۹ و ۱۵ ساعت)، میزان فسفولیپید سویا به عنوان منبع کربنی (۱۰ g/L و ۲)، میزان منبع نیتروژنی (۱۰ g/L و ۵) و میزان منبع فسفر، نسبت مساوی از منو و دی‌پتاسیم‌هیدروژن فسفات، (۱ g/L و ۰) فاکتورهای مورد بررسی در این پژوهش بودند. همه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام گرفتند و میانگین آن‌ها به عنوان پاسخ استفاده گردید [۱٦].

پس از تعیین فاکتورهای مؤثر، بهینه‌سازی با استفاده از روش RSM و طرح مرکب مرکزی (CCD)[2] با سه متغیر در سه سطح و ٦ تکرار در نقطه مرکزی، با متغیر پاسخ (میزان فعالیت فسفولیپاز) و با استفاده از نرم افزار دیزاین اکسپرت (DX 7)[3]، طراحی گردید. آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند. آزمون بررسی اعتبار مدل نیز به منظور تأیید تطابق بین نتیجه پیش‌بینی شده و مقدار اندازه‌گیری‌شده واقعی در ۳ تکرار انجام و میانگین آن‌ها گزارش شد.

1. Potato Dextrose Agar

2. Central Composite Design
3. Design-Expert® version 7.0.0

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169]

۳- نتایج و بحث

۳-۱- غربالگری فاکتورهای مؤثر بر تولید فسفولیپاز و رشد توده‌زیستی

غربالگری فاکتورهای مؤثر بر فعالیت فسفولیپاز و رشد توده زیستی سویه جهش‌یافته *T.atroviride* sp.ZB-ZH292 با استفاده از روش پلاکت – برمن با هفت متغیر در دو سطح انجام شد (جدول ۱). نتایج نشان داد براساس (>۲/۴۴۷) t-Value و (<۰/۰۵) *P*-Value، سه متغیر دما، زمان و میزان فسفولیپید سویا به عنوان منبع‌کربنی با سطح اطمینان ۹۵٪ (*P*<۰/۰۵) دارای اثر معنی‌دار بر میزان تولید فسفولیپاز بودند اما معنی‌دار بودن در اثر متقابل این فاکتورها مشاهده نگردید (جدول ۲).

Table 1 The Effect of Different Factors on of Phospholipase and Biomass production from *T. atroviride* sp.ZB-ZH292 by Plackett Burman Method

	C (g/L)	N(g/L)	P(g/L)	S. S. (%)	S. A. (%)	Temp. (°C)	Time (Day)	PL (U/ml)	Biomass (g/L)
1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	3.02	11.64
2	1	-1	-1	1	-1	1	1	3.75	12.34
3	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	3.32	11.14
4	-1	1	-1	1	1	1	-1	3.28	10.15
5	1	1	1	-1	-1	-1	1	3.37	11.36
6	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	2.63	7.86
7	1	-1	1	-1	1	1	-1	3.23	8.81
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	3.02	10.52
9	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	2.50	7.71
10	1	1	-1	1	-1	-1	-1	2.90	10.21
11	1	1	1	1	1	1	1	2.92	13.86
12	-1	1	1	-1	-1	1	-1	3.08	9.06

C: Carbon Source (Soy Phospholipid); N: Nitrogen Source; P: Phosphate Source; S.S: Seed Source; S.A: Seed Age; Temp: Temperature; PL: Phospholipase

Table 2 The Effect of Different Factors on Phospholipase Activity from *T. atroviride* sp.ZB-ZH292 by Plackett Burman Method

Factors	Effect	t-value	p-value
Temp.	0.278	6.19*	0.0024**
Time	0.248	5.52*	0.0042**
C	0.148	3.30*	0.0208*
N	0.076	1.70	0.0996
S. S.	0.076	1.70	0.0996
S. A.	-0.001	-0.04	0.9736
P	0.001	0.04	0.9736
Temp.*Time	-0.046	-1.04	0.2661
Temp.*C	0.008	0.19	0.8707
Time*C	0.030	0.67	0.4846
Temp.*N	0.015	0.11	0.9226

C: Carbon Source (Soy Phospholipid); N: Nitrogen Source; P: Phosphate Source; S.S: Seed Source; S.A: Seed Age; Temp: Temperature; PL: Phospholipase; t-value=2.447; *: *P*<0.05; **: *P*<0.01

غربالگری فاکتورهای مؤثر بر رشد توده‌زیستی نیز بیانگر معنی‌دار بودن (*P*<۰/۰۵) متغیرهای زمان و میزان پپتون به عنوان منبع نیتروژنی بود. اگرچه عامل دما در این بخش معنی‌دار گزارش نگردید اما تأثیر آن بر میزان تولید توده‌زیستی قابل مشاهده بود. در بررسی رشد توده زیستی نیز همانند بررسی فعالیت آنزیمی، اثر متقابل فاکتورها در غربالگری معنی‌دار نبودند (جدول ۳). دما و زمان تخمیر از فاکتورهای مؤثر در تولید محصولات زیست فناوری می‌باشند. میزان تولید فسفولیپاز نیز نسبت به دما و زمان دارای یک حداکثر است، با عبور از نقطهٔ حداکثر، رشد و اسپورزایی شدید ریزسازواره،

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169]

سبب توقف رشد می‌شود و در نتیجه تولید آنزیم پایین می‌آید [۱۷-۱۶]. فعالیتهای متابولیکی فراوانی در حین تخمیر برای تولید آنزیم‌ها بوقوع می‌پیوندد و در همهٔ این فعالیتها طول عمر اسپور و میزان تلقیح نیز مؤثر می‌باشند. افزایش میزان تلقیح، ابتدا میزان تولید را بالا می‌برد ولی در ادامه، افزایش تعداد ریزسازواره‌ها فرآیند را به سمت انبوه شدن سلول، کاهش میزان مواد مغذی و در بسیاری موارد مصرف محصول به نفع تولید تودهٔ زیستی، سوق می‌دهد و در نتیجه تولید محصول کاهش پیدا می‌کند. افزودن منبع ازت به سوبسترا موجب افزایش میزان تولید آنزیم می‌شود، ولی حذف و افزایش بیش از حد آن نیزنتیجهٔ عکس دارد و موجب تولید محصولات جانبی بیش از فرآورده موردنظر و یا افزایش رشد ریزسازواره و کاهش تولید آنزیم گردد [۱۸].

Table 3 The Effect of Different Factors on Biomass from *T. atroviride* sp.ZB-ZH292 by Plackett Burman Method

Factors	Effect	t-value	p-value
Time	1.437	6.22*	0.0033*
N	0.674	2.92*	0.0287*
Temperature	0.520	2.25	0.0504
S.S.	0.424	1.83	0.0908
C	0.337	1.46	0.1541
P	-0.154	-0.67	0.5627
S.A.	0.071	0.31	0.7921
Time*N	0.050	0.21	0.8505
Time*Temp.	0.074	0.32	0.7844
N*Temp.	-.0173	-0.75	0.4315
Time*S.S.	0.046	0.20	0.8598

C: Carbon Source (Soy Phospholipid); N: Nitrogen Source; P: Phosphate Source; S.S: Seed Source; S.A: Seed Age; Temp: Temperature; PL: Phospholipase; t-value=2.447; *: $P<0.05$

براساس نتایج به دست آمده، منبع نیتروژنی بر رشد ریزسازواره کاملاً معنی‌دار (جدول۳) بود ولی بر میزان تولید آنزیم اثر معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۲). در پژوهش انجام شده جهت بررسی تولید آنزیم فسفولیپاز توسط سویه *T. atroviride* 292 شد تولید فسفولیپاز در فاز لگاریتمی صورت می‌گیرد و این آنزیم وابسته به رشد می‌باشد. میزان منبع نیتروژنی نیز همانند دما و زمان تخمیر، جهت تولید فسفولیپاز دارای یک حداکثر است، با عبور از نقطهٔ حداکثر رشد توده زیستی بیشتر از تولید آنزیم اتفاق می‌افتد [۱۲].

۳-۲- بهینه‌سازی شرایط تولید فسفولیپاز

سطوح فاکتورهای مؤثر میزان فسفولیپید سویا، دما و زمان گرم‌خانه‌گذاری و نتایج طراحی آزمایش جهت بهینه‌سازی شرایط تولید فسفولیپاز به همراه میزان فعالیت فسفولیپاز تولیدشده توسط *T.atroviride* sp.ZB-ZH292 به ترتیب در جدول‌های ٤ و ٥ مشاهده می‌شوند. با بررسی داده‌ها در مدل‌های مختلف مشخص گردید مدل درجه دوم (کوادراتیک[1])، با عدم برازش[2] معادل ۰/٥٤ و مقادیر R^2، R^2 اصلاح‌شده و R^2 پیش‌بینی‌شده به ترتیب ۰/۹٦، ۰/۹۳ و ۰/۸۳ بسیار معنی‌دار است (جدول ٦) و این مقادیر می‌تواند بیانگر مناسب بودن مدل پیشنهادی باشد.

1. Quadratic
2. lack of fit

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-29]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169]

Table 4 Variable Levels for Optimization of Phospholipase Production *T.atroviride* ZB-ZH292 by RSM

Name	Unit	Maximum level	Intermediate level	Minimum level
Soy Phospholipid	%	+1 (9)	0 (6)	-1 (3)
Temperature	°C	+1 (30)	0 (26)	-1 (22)
Time	day	+1 (5)	0 (4)	-1 (3)

Table 5 Results of Optimization of Phospholipase Production from *T.atroviride* ZB-ZH292 by RSM

Run	Temperature	Time	SPL	PL.A (U/ml)	
				Actual Values	Predicted values
1	1	-1	1	3.26	3.25
2	-1	0	0	2.37	2.21
3	0	0	0	3.01	3.35
4	0	0	0	3.34	3.35
5	1	1	-1	3.56	3.47
6	-1	1	1	3.26	3.25
7	-1	-1	-1	0.86	0.94
8	0	-1	0	3.02	2.87
9	1	0	0	3.47	3.56
10	-1	1	-1	2.39	2.42
11	0	1	0	3.48	3.65
12	0	0	0	3.45	3.35
13	1	1	1	3.58	3.52
14	0	0	0	3.49	3.35
15	-1	-1	1	1.51	1.61
16	0	0	-1	3.21	3.11
17	0	0	1	3.47	3.44
18	0	0	0	3.23	3.35
19	0	0	0	3.41	3.35
20	1	-1	-1	3.11	3.18

PLA: Phospholipase Activity; SPL: Soy Phospholipid

Table 6 Analysis of Model Quadratic for optimization of Phospholipase Production from *T.atroviride* ZB-ZH292 by RSM

Source	Sum Square	Mean Square	Df	F Value	P Vaue
Model	1.83	0.61	3	17.61	0.0003^{**}
Lack of Fit	0.17	0.035	5	1.00	0.5014^{n}
Net Error	0.17	0.035	5		
Total Error	192.05	0.60	20		
	$R^2 = 0.96$	**$R^2_{adjusted} = 0.91$**		**$R^2_{predicted} = 0.83$**	

n: non-significant ; **: significant in 1% level (P<0.01)

با توجه به آنالیز واریانس (ANOVA) فاکتورهای مؤثر بر میزان فعالیت آنزیمی فسفولیپاز (جدول ۷)، و اثرات متقابل آن-ها و با توجه به ضرایب تعیین شده برای فاکتورهای کد شده و همچنین معنی‌دارنبودن اثر تمامی متغیرها بر پاسخ و حذف ضرایب متغییرهای فاقد اثر معنی‌دار، معادله نهایی زیر جهت نشان دادن رابطه متغیرهای مستقل و فعالیت فسفولیپاز تعیین گردید:

معادله (۱)

$$Y= +0.35 + 0.67\ \beta_1 + 0.44\ \beta_2 + 0.18\ \beta_3 - 0.30\ \beta_1 * \beta_2 - 0.15\ \beta_1 * \beta_3 - 0.47\ \beta_1^2$$

که در آن Y: فعالیت آنزیم فسفولیپاز؛ β_1: دمای گرمخانه‌گذاری؛ β_2: زمان گرمخانه‌گذاری و β_3 درصد فسفولیپید سویا می‌باشد.

در بررسی عبارات یک مدل فاکتور F بالاتر و فاکتور P کمتر نشان دهنده تأثیر بیشتر آن عبارات بر پاسخ و معنی‌داری مدل نهایی خواهد بود [۱۱]. با توجه به نتایج آنالیز واریانس ارائه شده در جدول ۷ و معادله بالا، هرسه متغیر دما، زمان و درصد فسفولیپید به عنوان منبع‌کربنی، و همچنین اثر متقابل دما- زمان و دما- درصد فسفولیپید معنی‌دار بودند. اگر چه عامل دما و پس از آن زمان اثر بیشتری بر فعالیت فسفولیپاز داشتند.

Table 7 Analysis of Variance to Optimization Condition for Phospholipase Production from *T.atroviride* ZB-ZH292

Sources	Sum of Square	Df	Mean Square	F Value	P Value
Model	9.48	9	1.05	30.42	$< 0.0001^{**}$
β_1	4.52	1	4.52	130.43	$< 0.0001^{**}$
β_2	1.92	1	1.92	55.41	$< 0.0001^{**}$
β_3	0.32	1	0.32	9.25	$< 0.0124^{*}$
$\beta_1 * \beta_2$	0.71	1	0.71	20.45	$< 0.0011^{*}$
$\beta_1 * \beta_3$	0.19	1	0.19	5.37	$< 0.0429^{*}$
$\beta_2 * \beta_3$	0.0002	1	0.0002	0.5776	0.9409^{n}
β_1^2	0.60	1	0.60	17.41	$< 0.0019^{*}$
β_2^2	0.053	1	0.053	1.52	0.2463^{n}
β_3^2	0.011	1	0.011	0.32	0.5858^{n}
Remaining	0.35	10	0.035	-	-
Lack of fit	0.17	5	0.035	1.00	0.5014^{n}
Net Error	0.17	5	0.035	-	-
Total Error	9.82	19	-	-	-

*: significant in 5% level (P<0.05); **: significant in 1% level (P<0.01)

Table 8 The values of different parameters on optimal point to phospholipase activity from *T.atroviride* sp.ZB-ZH292

Phospholipase Activity(U/ml)		Soy Phospholipid (٪)	Time (Day)	Temperature (°C)
Predicted values	Actual Value			
3.56	3.57	4.32	4.24	29.73

پس از تشخیص اعتبار مدل به لحاظ آماری، می‌توان آن را به منظور آنالیز و برآورد اثر سطوح مختلف متغیرها بر میزان تولید فسفولیپاز به کار برد. هر سه فاکتور دما، زمان و درصد فسفولیپید دارای اثر معنی‌داری بر فعالیت فسفولیپاز تولیدی سویه *T.atroviride* sp.ZB-ZH292 بودند (جدول ۷) و بیشترین میزان فعالیت در سطوح بالای هر سه متغیر با میزان ۳/۵۸ U/ml به دست آمد (جدول ۵). کانتورهای سطح پاسخ ارتباط بین متغیرهای مستقل و متغیر وابسته را نشان می‌دهند، در حالی‌که متغیر دیگر (متغیر سوم در این تحقیق) در مقدار بهینه ثابت نگه داشته می‌شود. نمودارهای دوبعدی و سه بعدی اثر متقابل دما و زمان گرمخانه‌گذاری در مقدار ثابت درصد فسفولیپاز و اثر متقابل دما و درصد فسفولیپید سویا در دمای ثابت نیز به ترتیب، در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. با مطالعه این نمودارها، نواحی مطلوب نمودار براساس پاسخ شناسایی گردیده و همچنین می‌توان بهینه‌سازی تکمیلی را نیز انجام داد. به‌طور کلی در بررسی اثر دما، زمان و درصد فسفولیپید بر فعالیت فسفولیپاز مشاهده شد که تغییرات هر سه پارامتر معنی دار بوده و از نظر اهمیت اثرات تکی به ترتیب زمان گرمخانه گذاری (P<۰/۰۱)، دمای گرمخانه گذاری (P<۰/۰۱) و سپس درصد فسفولیپید (P<۰/۰۵) بر فعالیت آنزیمی مؤثرتر هستند. دمای گرمخانه گذاری نقش کنترلی و محدود کننده در تغییرات فعالیت آنزیم دارد (زیرا اثرات درجه دوم و اثرات متقابل با تک تک متغیرها با ضریب منفی دارد)، بدین مفهوم که افزایش دما (همراه با افزایش زمان و یا همراه با افزایش درصد فسفولیپید) تا حدی (تا دمای نزدیک به ۲۷ °C) منجر به افزایش فعالیت آنزیمی شده است. اثرات متقابل دما- زمان در مقایسه با دما-درصد فسفولیپید، اثر معنی دارتری بر روند فعالیت آنزیمی داشته است (شکل ۱ و ۲).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169]

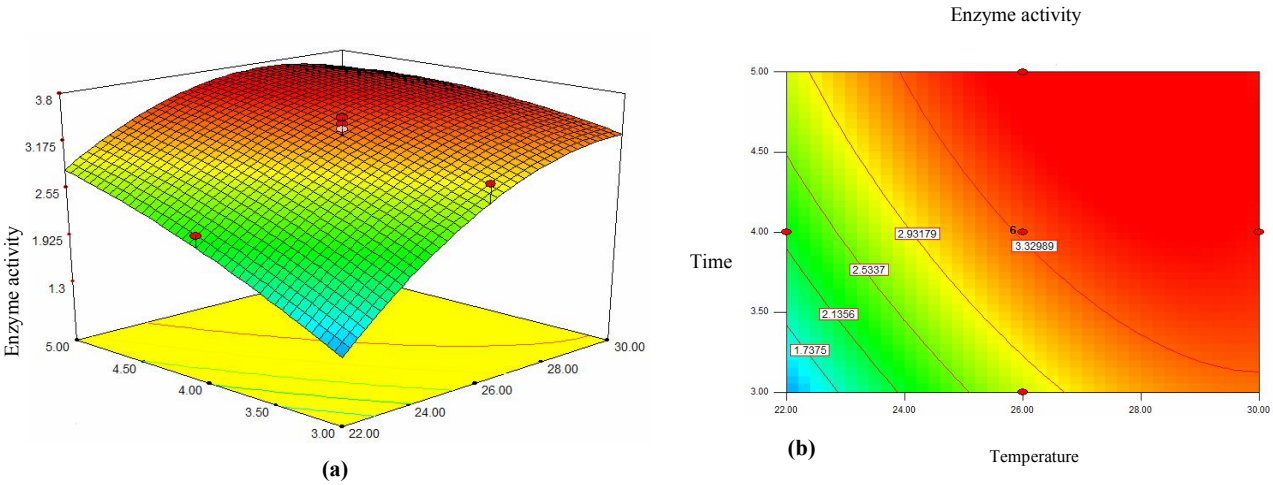

Fig.1 a) 2D Cantor b) 3D Cantor of enzyme activity changes in a constant amount of phospholipid content (4%)

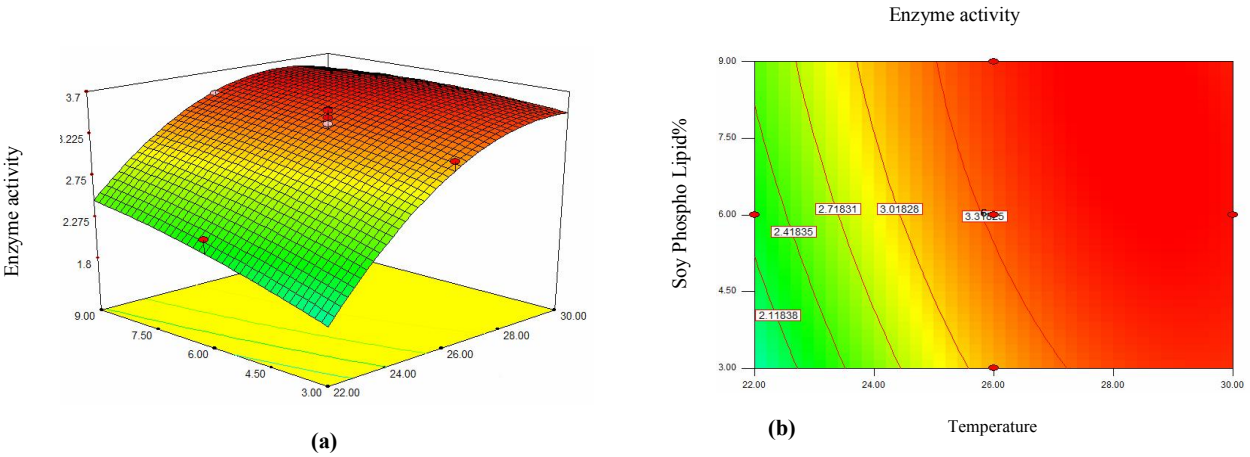

Fig 2 a) 3D Cantor b) 2D Cantor of enzyme activity changes in a constant amount of Time (4day)

شکل ۱ نشان می‌دهد در دوره‌های پایین‌تر زمانی (٤-۳ روز) با افزایش دما (۲٦°C-۲۲) فعالیت فسفولیپاز با شیب بالایی افزایش می‌یابد. همچنین این شکل نشان می‌دهد بیشترین فعالیت آنزیم در دماهای بالا (۳۰°C-۲٦) و زمان‌های بالا (٥-٤ روز) می‌باشد و در زمان‌های کشت ۳ تا ٤ روز با افزایش دما فعالیت آنزیم به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد ولی زمان کشت ٥ روز دما تأثیری بر افزایش فعالیت ندارد که این تغییرات نشان‌دهنده اثر متقابل زمان و دمای گرمخانه‌گذاری است. در واقع افزایش هم‌زمان دما و زمان با ایجاد شیب مثبت و بالارونده منجر به افزایش فعالیت آنزیمی گردید ولی با افزایش دما تا ۳۰ °C و زمان ٥ روز فعالیت فسفولیپازی تا حدی کاهش یافته‌است. این روند را می‌توان به کاهش مواد مغذی محیط کشت به ازای افزایش تعداد ریزسازواره‌ها با افزایش دما و زمان نسبت داد که منجر به ایجاد شرایط نامناسب برای رشد ریزسازواره‌ها و تولید کمتر فسفولیپاز می‌شود. سینگ و همکاران، در بررسی شرایط مختلف بر میزان فعالیت و زنده‌مانی چندین سویه تریکودرما دریافتند این ریزسازواره‌ها به شرایط‌محیطی و ترکیب محیط کشت بسیار حساس هستند. همچنین عنوان کردند در شرایط دمایی ۲٥ °C تا ۳۰ °C با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری در محیط کشت اختصاصی تریکوردما، میزان رشد و متعاقباً آنزیم‌های حاصل از آن، افزایش یافته است و این افزایش در دماهای مختلف، متفاوت بوده است. با افزایش دما از ۳۰ °C نیز کاهش رشد و تولید محصولات بیولوژیک آن مشاهده شده‌است [۱۹]. در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169]

پژوهشی اختصاصی بر روی *تریکودرما آتروویریدی*، مشخص شد دمای ۲۵ °C تا ۳۰ °C و محدوده pH ۷/۰–۷/۵ بهترین شرایط برای رشد آن تعیین گردید [۲۰] که با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش همسو می‌باشد.

استفاده از منابع کربن لیپیدی، برای به دست آوردن عملکرد بالای فسفولیپاز ضروری به‌نظر می‌رسد. در فرایند تولید آنزیم‌های لیپولیتیک مانند لیپازها و فسفولیپازها منابع کربنی تری‌گلیسریدی می‌توانند به صورت محرک و یا بازدارنده عمل کنند [۲۱]. در نمودارهای مربوط به اثر میزان فسفولیپید سویا در تولید فسفولیپاز (شکل ۲) مشاهده می‌شود با افزایش درصد فسفولیپید از ۳ تا ۹٪ سبب افزایش میزان فعالیت فسفولیپاز با شیب مثبت می‌شود که بدلیل محرک بودن در تولید آنزیم در دماهای پایین‌تر(۲۶–۲۲ °C) است. افزایش همزمان دما (۳۰–۲۶ °C) و میزان فسفولیپید سویا (۹٪–۶) سبب شد شیب منحنی تا حدی منفی گردد. علت این امر را می‌توان به تولید اسیدهای چرب آزاد در غلظت بالای فسفولیپید نسبت داد که به عنوان بازدارنده تولید آنزیم عمل می‌کنند. این نتایج همسو با نتایج سایر محققان در اثر بازدارندگی منابع کربنی لیپیدی در غلظت‌های بالا در تولید آنزیم‌های لیپولیتیک است [۲۳–۲۲].

مقدار بهینه فعالیت فسفولیپاز همراه با مشخصات نقطه بهینه برای هر یک از پارامترها در جدول ۸ نشان داده شده‌است. برای تعیین اعتبار مدل، کشت ریزسازواره در شرایط بهینه بدست آمده انجام گرفت. بیشینه فعالیت فسفولیپاز (U/ml ۳/۵۷) بدست آمده تقریباً معادل با مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل (U/ml ۳/۵۶) بود.

٤- نتیجه‌گیری

در این بررسی از طراحی پلاکت- برمن جهت غربالگری فاکتورهای موثر در فعالیت آنزیمی و روش سطح‌پاسخ جهت بهینه‌سازی فاکتورهای انتخابی از طرح غربالگری بر فعالیت فسفولیپاز سویه جهش‌یافته *T.atroviride* sp.ZB-ZH292 در محیط‌کشت غوطه‌وری استفاده‌گردید و پس از آن بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر با روش سطح پاسخ صورت گرفت. نتایج نشان داد که بهینه سازی دو مرحله‌ای با روش‌های آماری پلاکت–برمن و سطح پاسخ، روشی مناسب در ارزیابی فاکتورهای مؤثر و معرفی تیمار بهینه جهت رسیدن به بالاترین بازده می‌باشد. در این پژوهش در محیط کشت غوطه‌وری در شرایط بهینه به دست آمده شامل ۲۹/۷۳ °C، ۱۰۱/۷۶ ساعت و ٤/۳۲٪ فسفولیپید سویا، فعالیت آنزیمی U ۳۵۷۰ در لیتر تعیین گردید.

٥- منابع

[1] Guo, Z., Vikbjerg, A.F., Xu, X. (2005). Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnology Advances*, 23(3), 203–259.

[2] Richmond, G.S., Smith, T.K. (2011). Phospholipases A_1. *International Journal of Molecular Science*, 12(1), 588–612.

[3] Song, J.K., Han, J.J., Rhee, J.S. (2005). Phospholipases: occurrence and production in microorganisms, assay for high-throughput screening, and gene discovery from natural and man-made diversity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(10), 691-705.

[4] Song, J.K., Rhee, J.S. (2000). Simultaneous enhancement of thermo-stability and catalytic activity of phospholipase A1 by evolutionary molecular engineering. *Applied and Environmental Microbiology*., 66(3), 890–894.

[5] Burkert, J.F, Maugeri, F., Rodrigues, M.I. (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, 91(1), 77-84.

[6] Acikel, U., Ersana, M., Acikel, y.s. (2010). Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar. Food and Bioproducts Processing*. 88(1), 31-39.

[7] Plackett, R.L., Burman, J.P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments, Biometrika., 33(4), 305.

[8] Farbeh, F., Rezazad Bari, M., Alizadeh Khaledabad, M. (2010). Optimization of pectinlyase production from date pulp by *Aspergillus niger* using response surface methodology, *Food Research* 3(2), 13-22.

[9] Annapurna Kumari, A., Mahapatra, P., Banerjee, R. (2009). Statistical optimization of culture conditions by response surface methodology for synthesis of lipase with *Enterobacter aerogenes*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(6), 1349-1356.

[10] Yasmeen, Q., Asgher, M., Sheikh, M., Nawaz, H. (2013). Optimization of

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169]

ligninolytic enzymes production through response surface methodology. *BioResources*, 8(1), 944-968.

[11] Montgomery, D.C. (1991). Design and analysis of experiment. 3td ed., John Wiley, New York. pp: 427-510.

[12] Beig Mohammadi, Z., Hamidi Esfahani, Z., Sahari, M.A., Khosravi Darani, K. (2015). Isolation and identification of a strain producing the phospholipase enzyme from waste oil industry and its mutant. *Journal of Food Science and new technologies,* Inpress.

[13] Alp, S., Arikan, S. (2008). Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus species*. *Journal of Basic Microbiol*ogy, 48(5), 331-337.

[14] Jiang, F., Wang, J., Kaleem, I., Dai, D., Zhou, X., Li. C. (2011). Degumming of vegetable oils by a novel phospholipase B from *Pseudomonas fluorescens* BIT-18. *Bioresource Technol*ogy 102(17), 8052-8056.

[15] Jiang, X., Chang, M., Wang, X., Jin, Q., Wang, X. (2014). The effect of ultrasound on enzymatic degumming process of rapeseed oil by the use of phospholipase A1. *Ultrasonic Sonochemistry.*, 21(1), 142–148.

[16] Hosseni, S. M., Khosravi-Darani, K., Mohammadifar, M. A., Nikoopour, H. (2009). Production of mycoprotein by *Fusarium venenatum* growth on modified vogel medium. *Asian Journal of Chemistry,* 21(5), 4017-4022.

[17] Fatemi, S.S., Shojaosadati, S.A. Experimental design optimization of citric acid production by Aspergillus niger in solid state fermentation (2001). *Amirkabir Journal of Science and Technology,*11: 314–319.

[18] Khosravi Darani, K., Zoghi, A., Alavi, S.A., Fatemi, S.S. Application of Plackett Burman Design for Citric Acid Production from Pretreated and Untreated Wheat Straw (2008). *International Journal of Chemistry and Chemical Engineering,* 22:91-104

[19] Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A. (2014). Optimal physical parameters for growth of Trichoderma Species at varying pH, temperature and agitation. *Virology Mycology*, 3:127. doi: 10.4172/2161-0517.1000127.

[20] Singh, A., Shahid, M., Pandey, N.K., Kumar, S., Srivastava, M., Biswas, S.K. (2011). Influence of temperature, pH and media for growth and sporulation of *Trichoderma atroviride* and its shelf life study in different carrier based formulation. *Journal of Plant Disease Sciences,* 6(1), 32-34.

[21] Honardoost, S., Fooladi, J., Azin, M.,Ghadam, P. (2012). Effect of different lipidic carbon and nitrogen sources on production of lipase by native strain Geobacillus stearothermophilus. *Second International Congress of Microbiology*. 554-568.

[22] Pera, L.M., Romero, C.M., Baigori, M.D., Castro, G.R. (2006). Catalytic Properties of Lipase Extracts from Aspergillus niger. *Journal of Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 247–252.

[23] Falony, G., Armas, J.C., Dustet Mendoza, J.C., Martínez Hernández, J.L. (2006). Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Journal of Food Technology and Biotechnology,* 44(2), 235–240.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Optimization of phospholipase production condition in submerged medium for *Trichoderma atroviride* sp. ZB-ZH292

BeigMohammadi, Z.[1*], Hamidi Esfahani, Z.[2], Sahrai , M. A.[2], Khosravi Darani, K. [3]

1. Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Food Science and Technology Department, Agriculture Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Department of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Phospholipases are important groups of enzyme with wide applications in various industries. In this study, two-step optimization including Plackett-Burman screening design and response surface methodology (RSM) optimization were done with the goal of higher production level of phospholipase by selected mutant strains of *Trichoderma atroviride* sp.ZB-ZH292. First step was done by screening and evaluation of seven factors affecting the enzyme activity and biomass production by selected mutant, using Plackett-Burman design at two levels each namely temperature, time, amount of soybean phospholipids (as a carbon source), peptone level (as nitrogen source), equal ratio of mono and di-potassium hydrogen phosphate (as phosphorus source), seed size, and seed age. According to the result of screening design, incubation time (P<0.01), incubation temperature (P<0.01), and soybean phospholipids as a carbon source (P<0.05), had significant effect on the enzyme activity, so they were selected and used as independent variables in central composite design (CCD) under response surface methodology (RSM). In the analysis of 20 experimental runs, the effects of three independent variables including incubation temperature (20-30 °C), incubation time (3-5 day), and phospholipid concentration (3-9%) were evaluated on phospholipase activity. Analysis of variance (ANOVA) showed that the optimum values of soybean phospholipid, incubation temperature and incubation time were 4.32%, 29.73°C, and 101.76 h, respectively. At this optimum point, the phospholipase activity was found to be 3.57 (U/ml) which is in good agreement with the predicted value (3.56 (U/ml)) by the model.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2023/ 03/ 30
Accepted 2023/ 04/ 30

Keywords:

Phospholipase,
Tricoderma atroviride,
Plackett-Burman Design,
Optimization,
Response surface methodology.

DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0

*Corresponding Author E-Mail:
z.beigmohammadi@iau-tnb.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-29]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.14.0]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.135.169]