

بهینه‌سازی تولید فیتاز در تخمیر غوطه‌وری توسط *آسپرژیلوس فیکوم* با استفاده از روش سطح پاسخ

مهسا بادامچی^۱، زهره حمیدی اصفهانی^{۲*}، سلیمان عباسی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی.

۲، ۳- دانشیار، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی.

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۲۲)

چکیده

در این تحقیق شرایط بهینه تولید آنزیم فیتاز توسط *آسپرژیلوس فیکوم* PTCC 5288 در محیط غوطه‌وری و در ارلن از نظر میزان منبع کربنی (گلوکز) در پنج سطح (۲، ۳/۵، ۵، ۶/۵ و ۸ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)؛ منبع نیتروژنی (سولفات آمونیوم) در پنج سطح (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)؛ منبع فسفر (فیتات موجود در سبوس گندم) در پنج سطح (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و زمان گرم‌خانه‌گذاری در پنج سطح (۴۸، ۱۲۰، ۱۹۲، ۲۶۴ و ۳۳۶ ساعت) به روش آماری سطح پاسخ (Response surface methodology) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بهینه‌سازی عددی نشان داد به منظور تولید حداکثر آنزیم، گلوکز باید ۵/۲۳ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر، سولفات آمونیوم ۱/۶ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر، سبوس گندم ۳/۲۸ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر و مدت زمان تخمیر ۱۹۸/۳۰ ساعت باشد. تحت شرایط بهینه‌ی پیش‌بینی شده توسط مدل، فعالیت فیتاز ۳۹/۶۱ واحد آنزیم بر میلی‌لیتر گردید. برای تایید مدل، آزمایشی در شرایط مقادیر بهینه پیش‌بینی شده برای هر عامل انجام گرفت. میزان فعالیت آنزیم در شرایط آزمایش ۴۰/۲۱ واحد آنزیم بر میلی‌لیتر شد که مقایسه‌ی آن با مقدار پیش‌بینی شده، کارایی مدل ارائه شده را تایید می‌کند.

کلید واژگان: بهینه‌سازی، فیتاز، اسید فیتیک، تخمیر غوطه‌وری، *آسپرژیلوس فیکوم*، روش سطح پاسخ.

* مسئول مکاتبات: Hamidy_z@modares.ac.ir

۱- مقدمه

در بسیاری از نقاط دنیا محصولات غذایی با پایه گیاهی غذای اصلی عمده انسان‌ها به‌شمار می‌روند [۱]. اسید فیتیک شکل ذخیره‌ای فسفات در گیاهان است. نمک‌های اسید فیتیک، فیتات نامیده می‌شوند که در طی دوره رسیدن در دانه‌گیاه (غلات، حبوبات و دانه‌های روغنی) تجمع پیدا می‌کنند [۲]. فسفر موجود در این حالت برای انسان و حیوانات تک معده به علت عدم وجود آنزیم تجزیه‌کننده فیتات در روده، قابل استفاده نیست. بعلاوه طبق گزارش‌های موجود فیتات با پروتئین‌ها چه در سطوح پایین پ-هاش و چه در سطوح بالای پ-هاش تشکیل کمپلکس می‌دهد [۳]. آنزیم فیتاز به طور متوالی گروه‌های ارتوفسفر را از هسته اینوزیتول فیتات جدا می‌کنند. امروزه تولید آنزیم در بیوتکنولوژی با نرخ فروش جهانی سالیانه نزدیک به دو بلیون دلار، یک عرصه رو به رشد به‌شمار می‌رود. از این میان، سهم آنزیم فیتاز ۱۵۰ میلیون دلار است که این قیمت همچنان در حال افزایش است [۴]. بعلاوه استفاده از قارچ‌های رشته‌ای برای تولید محصولات مهم تجاری در طی نیم قرن اخیر به سرعت توسعه یافته است. دو سویه آسپرژیلوس شامل آسپرژیلوس نایجرو آسپرژیلوس فیکوم متداولترین سویه‌های منتخب برای تولید تجاری فیتاز محسوب می‌شوند [۵]. آنزیم فیتاز دارای استفاده وسیعی در صنعت استاز جمله فیتاز در بیورآکتورهای مقرون به-صرفه برای تولید اینوزیتول فسفات‌ها که یک محصول سلامتی بخش است در مقیاس بزرگ مورد استفاده قرار گیرد؛ یکی دیگر از استفاده‌های صنعتی نوین از فیتاز برای جداسازی کارآمدتر β -glycinin و conglycinin از سویا است؛ همچنین فیتازهای گرمادوست دارای این پتانسیل هستند که به عنوان یک افزودنی قدرتمند در صنعت پالپ و کاغذ مورد استفاده قرار گیرند. فیتاز می‌تواند با گزیلاناز در حالت هم‌افزایی برای فرآیند پالپ عمل کند [۶].

تولید آنزیم به روش تخمیر حالت غوطه‌وری مدت مدیدی است که پابرجا است بررسی محققان روی الگوهای رشد در کشت‌های حالت جامد در مقایسه با تخمیر غوطه‌وری با محدودیت‌هایی همراه است از جمله در اکثر تحقیقات منتشر شده نگرانی در رابطه با بهینه کردن شرایط محیطی در جهت دستیابی به حداکثر

سرعت‌های تولید و مصرف سوستر وجود دارد [۵]. در یک بررسی که در سال ۲۰۰۴ صورت پذیرفت عوامل موثر بر تولید فیتاز توسط *Thermoascus aurantiacus* (TUB F 43) که یک قارچ گرمادوست است در محیط مایع حاوی گلوکز، نشاسته، پپتون و مکمل‌های معدنی با سبوس گندم بهینه شد [۷]. در تحقیقی دیگر که در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت متغیرهای کشت (نشاسته محلول، پپتون، توئین ۸۰ و فیتات سدیم) موثر بر تولید فیتاز توسط کپک گرمادوست *Sporotrichum thermophile* در محیط غوطه‌وری بهینه شد [۸]. لذا در این تحقیق سعی می‌شود با توجه به کارهای اندکی که در رابطه با تولید فیتاز در محیط غوطه‌وری صورت گرفته شرایط تولید فیتاز با در نظر گرفتن منبع فسفری با قیمت پایین همچون سبوس گندم جهت کاهش هزینه تولید و با استفاده از روش سطح پاسخ، بهینه شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ریزسازواره

آسپرژیلوس فیکوم PTCC 5288 به صورت آگار شیب دار از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های عفونی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. به منظور تکثیر و تولید اسپور به مقدار زیاد، ریز سازواره بر روی بشقابک‌های حاوی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار کشت داده شده و تا زمان اسپورزایی کامل در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. به منظور تکرار پذیری آزمون‌ها از نظر تعداد اسپور تلقیح شده در دفعات متعدد، ویال‌هایی با تعداد 3×10^7 اسپور در میلی‌لیتر برای هر بار تلقیح تهیه شد و سپس در شرایط برودت ۸۰ - درجه سانتی‌گراد تا زمان تلقیح نگهداری شد.

۲-۲- تخمیر غوطه‌وری

پس از تهیه محیط کشت طبق روش طراحی شده در آزمایش (جدول ۱) از نظر منابع سولفات آمونیوم و سبوس گندم، املاح نیز در مقادیر ۰/۰۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر KCl، ۰/۰۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ و ۰/۰۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ افزوده شد. سترون‌سازی در ۱۲۱ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت.

جدول ۱ طرح آزمایش و نتایج آزمون فعالیت فیتاز مشاهده شده و پیش بینی شده طرح سطح پاسخ

شماره آزمایش	A گلوکز (گرم در ۱۰۰ میلی لیتر)	B سولفات آمونیم (گرم در ۱۰۰ میلی لیتر)	C سبوس گندم (گرم در ۱۰۰ میلی لیتر)	D مدت زمان گرمخانه- گذاری (ساعت)	فعالیت فیتاز (U/mL)		
					مشاهده شده ۱	مشاهده شده ۲	پیش بینی شده
۱	۳/۵۰	۲/۰۰	۲/۰۰	۱۲۰/۰۰	۲۸/۴۸۱۹	۲۸/۹۰۹۱	۲۷/۴۳
۲	۳/۵۰	۲/۰۰	۲/۰۰	۲۶۴/۰۰	۴۲/۴۱۹۱	۴۶/۰۱۱۱	۴۳/۶۳
۳	۳/۵۰	۲/۰۰	۴/۰۰	۱۲۰/۰۰	۳۰/۶۴۸۲	۳۱/۹۱۹۲	۳۰/۵۸
۴	۳/۵۰	۲/۰۰	۴/۰۰	۲۶۴/۰۰	۴۳/۸۵۵۸	۳۶/۵۸۳۳	۴۱/۰۸
۵	۳/۵۰	۴/۰۰	۲/۰۰	۱۲۰/۰۰	۲۹/۵۲۰۸	۳۱/۲۶۷۱	۳۴/۲۶
۶	۳/۵۰	۴/۰۰	۲/۰۰	۲۶۴/۰۰	۳۹/۹۱۰۱	۳۹/۴۶۸۴	۳۷/۹۶
۷	۳/۵۰	۴/۰۰	۴/۰۰	۱۲۰/۰۰	۲۹/۶۴۲۴	۲۳/۷۶۲۵	۲۷/۰۸
۸	۳/۵۰	۴/۰۰	۴/۰۰	۲۶۴/۰۰	۲۸/۴۳۷۷	۲۴/۳۷۰۴	۲۵/۰۹
۹	۶/۵۰	۳/۰۰	۲/۰۰	۱۲۰/۰۰	۳۲/۶۵۹۷	۳۵/۹۴۲۳	۳۴/۸۰
۱۰	۶/۵۰	۳/۰۰	۲/۰۰	۲۶۴/۰۰	۴۸/۴۴۲۶	۷۰/۷۰۲۲	۵۹/۶۷
۱۱	۶/۵۰	۱/۰۰	۴/۰۰	۱۲۰/۰۰	۳۵/۵۵۵۵	۳۳/۷۶۵	۳۶/۸۷
۱۲	۶/۵۰	۵/۰۰	۴/۰۰	۲۶۴/۰۰	۵۸/۷۴۳۵	۶۲/۷۰۰۳	۵۶/۰۴
۱۳	۶/۵۰	۴/۰۰	۲/۰۰	۱۲۰/۰۰	۳۱/۲۰۰۸	۳۲/۰۶۲۹	۳۱/۲۶
۱۴	۶/۵۰	۴/۰۰	۲/۰۰	۲۶۴/۰۰	۴۰/۳۸۵۴	۴۷/۱۱۶۳	۴۳/۶۳
۱۵	۶/۵۰	۴/۰۰	۴/۰۰	۱۲۰/۰۰	۲۴/۴۲۵۶	۲۲/۰۴۹۴	۲۳/۰۱
۱۶	۶/۵۰	۴/۰۰	۴/۰۰	۲۶۴/۰۰	۲۸/۶۱۴۵	۲۷/۲۷۷۲	۲۹/۶۸
۱۷	۲/۰۰	۳/۰۰	۳/۰۰	۱۹۲/۰۰	۳۷/۶۰۰۲	۳۳/۶۱۰۲	۳۵/۶۸
۱۸	۸/۰۰	۳/۰۰	۳/۰۰	۱۹۲/۰۰	۴۷/۹۳۴۲	۴۶/۸۴۱۱	۴۷/۶۵
۱۹	۵/۰۰	۱/۰۰	۳/۰۰	۱۹۲/۰۰	۳۷/۵۶۷۲	۳۵/۰۲۴۹	۳۷/۹۱
۲۰	۵/۰۰	۵/۰۰	۳/۰۰	۱۹۲/۰۰	۱۹/۶۳۹۹	۱۹/۶۳۹۹	۱۸/۳۷
۲۱	۵/۰۰	۳/۰۰	۱/۰۰	۱۹۲/۰۰	۳۷/۸۴۳۳	۳۹/۲۴۷۳	۳۸/۱۸
۲۲	۵/۰۰	۳/۰۰	۵/۰۰	۱۹۲/۰۰	۲۷/۰۶۷۲	۲۶/۲۹۳۵	۲۷/۳۸
۲۳	۵/۰۰	۳/۰۰	۳/۰۰	۴۸/۰۰	۳۲/۳۱۷۱	۳۵/۴۱۱۸	۳۱/۵۰
۲۴	۵/۰۰	۳/۰۰	۳/۰۰	۳۳۶/۰۰	۵۰/۲۱۱۳	۵۳/۱۲۸۸	۵۴/۳۷
۲۵	۵/۰۰	۳/۰۰	۳/۰۰	۱۹۲/۰۰	۳۴/۹۴۶۷	۳۶/۵۶۱۲	۳۵/۴۷
۲۶	۵/۰۰	۳/۰۰	۳/۰۰	۱۹۲/۰۰	۳۵/۷۹۸۶	۳۴/۵۶۰۷	۳۵/۴۷
۲۷	۵/۰۰	۳/۰۰	۳/۰۰	۱۹۲/۰۰	۳۹/۸۴۳۸	۳۸/۷۰۵۴	۳۵/۴۷
۲۸	۵/۰۰	۳/۰۰	۳/۰۰	۱۹۲/۰۰	۲۵/۱۷۷۲	۳۸/۱۶۳۸	۳۵/۴۷

مرکزی (سطح کد شده صفر) تکرار شدند. هدف از تکرار آزمایش در نقاط مرکزی، بررسی خطای آزمایش در طرح است. آزمایش‌ها در دو تکرار انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج بهینه‌سازی متغیرهای موثر بر تولید فیتاز در محیط غوطه‌وری توسط روش سطح

پاسخ

چهار عامل میزان گلوکز (A)، سولفات آمونیوم (B)، سبوس گندم (C) و مدت زمان گرمخانه‌گذاری (D) برای بررسی در این مرحله انتخاب شدند. مقادیر پاسخ بدست آمده از انجام آزمایش و همچنین مقادیر پاسخ پیش بینی شده توسط مدل در جدول ۱ نشان داده شده است. از جدول ۱ مشخص می‌شود که یک اختلاف قابل توجه در میزان فعالیت فیتاز بر اساس شرایط تخمیر وجود دارد. میزان فعالیت آنزیم در محدوده ۱۹/۶۳۹۹ تا ۷۰/۷۰۲۲ (U/mL) متغیر بود.

معادله ۱ مدل عمومی چند جمله‌ای درجه دوم را برای تولید آنزیم فیتاز را نشان می‌دهد.

معادله (۱)

$$Y = a + a_1A + a_2B + a_3C + a_4D + a_{12}AB + a_{13}AC + a_{14}AD + a_{23}BC + a_{24}BD + a_{34}CD + a_{11}A^2 + a_{22}B^2 + a_{33}C^2 + a_{44}D^2$$

که در آن $a_1, a_2, a_3, a_4, a_{12}, a_{13}, a_{14}, a_{23}, a_{24}, a_{34}, a_{11}, a_{22}, a_{33}, a_{44}$ ضرایب هر متغیر هستند.

A, B, C و D به ترتیب مقدار گلوکز، سولفات آمونیوم، سبوس گندم و مدت زمان گرمخانه‌گذاری می‌باشند. AB, AC, AD, BC, BD و CD به ترتیب اثر متقابل گلوکز و سولفات آمونیوم، گلوکز و سبوس گندم، گلوکز و مدت زمان گرمخانه‌گذاری، سولفات آمونیوم و سبوس گندم، سولفات آمونیوم و مدت زمان گرمخانه‌گذاری می‌باشند. A^2, B^2, C^2 و D^2 به ترتیب اثر درجه دوم گلوکز، سولفات آمونیوم، سبوس گندم و مدت زمان گرمخانه‌گذاری می‌باشند. ضرایب مدل چند جمله‌ای درجه دوم پس از تجزیه و

به منظور جلوگیری از واکنش مایلارد گلوکز جداگانه سترون شد. پس از خنک شدن محیط کشت با مقدار مشخصی از سوسپانسیون اسپور تلقیح شده و به مدت‌های مشخص شده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد هم‌زمان با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه صورت گرفت.

۳-۲- استخراج آنزیم

مخلوط تخمیری حاصله به فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شده و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. قسمت شفاف فاز روماند بلافاصله برای سنجش آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. محیط مایع مستقیماً سانتریفیوژ شد.

۴-۲- اندازه‌گیری آنزیم

۵۰۰ میکرولیتر از آنزیم خام استخراجی که ۱۰ برابر رقیق شده بود با ۲۵۰ میکرولیتر بافر استات ۰/۲ مولار و ۲۵۰ میکرولیتر فیتات سدیم ۱۵ میلی مولار مخلوط شد و به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آبگرم ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. واکنش با افزودن ۱ میلی‌لیتر تری کلرو اسید استیک ۱۵ درصد خاتمه یافت. ۰/۵ میلی‌لیتر از مخلوط حاصله با ۴ میلی‌لیتر مخلوط اسید سولفوریک ۵ نرمال، مولیبدات آمونیوم ۱۰ میلی مولار و استون (که به نسبت ۲:۱:۱ با هم مخلوط شده بودند) و ۰/۴ میلی‌لیتر اسید سیتریک ۱ مولار مخلوط شد و جذب در ۳۵۵ نانومتر خوانده شد [۹]. منحنی استاندارد فسفر با استفاده از پتاسیم هیدروژن فسفات در غلظت ۳۰ تا ۳۶۰ میکرو مولار رسم شد.

۴-۵- بهینه‌سازی متغیرهای انتخاب شده توسط

روش سطح پاسخ

برای تعیین مقادیر بهینه‌ی متغیرهای انتخاب شده از روش آماری سطح پاسخ با استفاده از طرح آزمایش مرکب مرکزی^۱ (CCD) با ۴ متغیر (گلوکز، سولفات آمونیوم، سبوس گندم و مدت زمان گرمخانه‌گذاری) در ۵ سطح استفاده شد. یک طرح آزمایش با ۲۸ آزمایش در سطوح مختلف برای چهار عامل و یک پاسخ (فعالیت فیتاز) (جدول ۱)، با استفاده از نرم افزار Design Expert Version 7.0.0 طراحی و اجرا شد. چهار آزمایش در نقاط

1. Central composite design

همانطور که از جدول ۲ مشخص است در بین اثرات خطی، میزان گلوکز (A)، سولفات آمونیوم (B)، سبوس گندم (C) و مدت زمان گرمخانه‌گذاری (D) و اثرات متقابل گلوکز و سولفات آمونیوم (AB)، گلوکز و مدت زمان گرمخانه‌گذاری (AD)، سولفات آمونیوم و سبوس گندم (BC)، سولفات آمونیوم و مدت زمان گرمخانه‌گذاری (BD) و در مورد اثرات درجه دوم، A^2 ، B^2 و D^2 در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار می‌باشند. اثر متقابل سبوس گندم و مدت زمان گرمخانه‌گذاری (CD) در سطح احتمال ۹۵ درصد معنی‌دار می‌باشد.

۳-۲- مقادیر بهینه پیش‌بینی شده توسط مدل درجه دوم برای متغیرها

مقادیر بهینه پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار Design Expert برای متغیرهای گلوکز (A)، سولفات آمونیوم (B)، سبوس گندم (C) و مدت زمان گرمخانه‌گذاری (D) به ترتیب ۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر، ۱/۵۹ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر، ۳ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر و ۱۹۸/۳۰ ساعت می‌باشد. در این حالت میزان فیتاز تولیدی ۳۹/۶۱ واحد آنزیم بر میلی‌لیتر است. برای تایید مدل، آزمایشی در شرایط مقادیر بهینه پیش‌بینی شده برای هر عامل انجام گرفت. میزان فعالیت آنزیم در شرایط آزمایش ۴۰/۲۱ واحد آنزیم بر میلی‌لیتر شد. که مقایسه‌ی آن با مقدار پیش‌بینی شده، کارایی مدل ارائه شده را تایید می‌کند. بعلاوه این میزان به دست آمده بیش از ۳ برابر فیتاز تولیدی توسط سینتی^۳ و ساتیانارایانا در سال ۲۰۰۸ توسط قارچ *Sporotrichum thermophile* در محیط غوطه‌وری و با استفاده از ۳ درصد سبوس گندم است [۸]. در مقایسه با سایر بررسی‌ها این میزان بیش از ۳ برابر فیتاز تولیدی *Rhizomucor pusillus* و ۵ برابر فیتاز تولیدی توسط *Pichia anomala* است [۱۰ و ۱۱]. این نتایج به روشنی بیان می‌کند میزان فعالیت فیتاز به ویژگی‌های ریزسازواره و شرایط تولید بستگی دارد.

۳-۳- اثر متقابل گلوکز و سولفات آمونیوم بر تولید آنزیم فیتاز

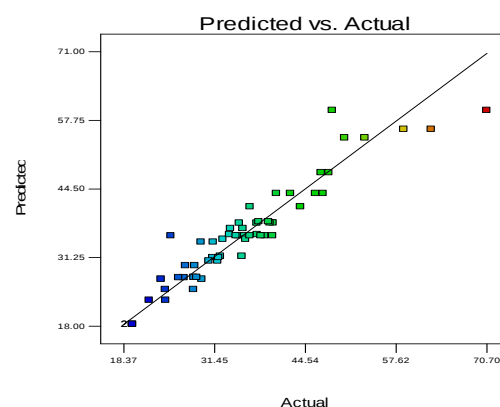
تحلیل توسط نرم‌افزار و حذف ترم‌های غیر معنی‌دار توسط روش FORWARD در نرم‌افزار به دست آمدند و نتیجه حاصله معادله کلی ۲ می‌باشد که در زیر ارائه گردیده است (معادله بر اساس کد متغیرها است).

معادله (۲)

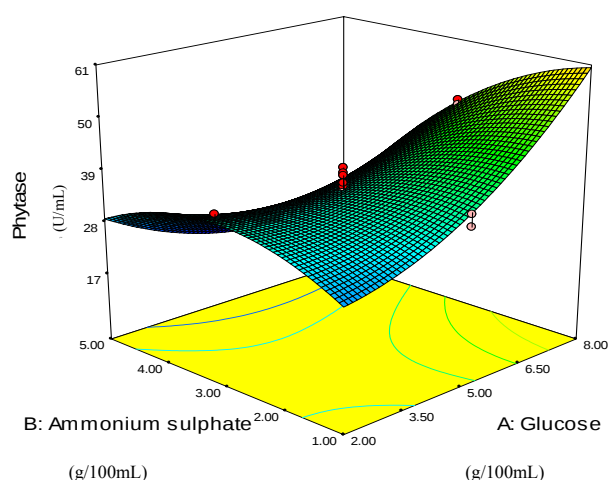
$$Y = + 2/3499/46 A - 4/88 B - 2/70 C 5/72 + D - 2/59 AB + 2/17 AD - 2/58 BC - 3/12 BD 1/43 - CD + 1/72 A^2 - 1/267 B^2 + 2/03 D^2$$

Y = میزان فعالیت آنزیم فیتاز

سطح معنی‌داری معادله‌ی ۲ به وسیله F-test و تجزیه‌ی واریانس (ANOVA) بررسی شد (جدول ۲). چنانکه در جدول تجزیه‌ی واریانس نشان داده شده است، مدل نهایی در عدد F دارای سطح معنی‌داری بسیار بالایی می‌باشد. همچنین مدل نهایی دارای عدم تطابق^۲ غیر معنی‌دار، ضریب تبیین $R^2 = 0/8806$ و ضریب تبیین اصلاح شده $Adj R^2 = 0/8472$ می‌باشد. همچنین شکل ۱ همبستگی بین داده‌های مربوط به مدل را نشان می‌دهد و بیانگر آن است که مدل چند جمله‌ای درجه دوم نهایی (معادله ۲) کارآمد بوده و قادر است به طور رضایت بخشی تغییرات مقدار تولید فیتاز را توجیه نماید و در مراحل بعدی پیش‌بینی و بهینه سازی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱ نمودار داده‌های تجربی در برابر داده‌های پیش‌بینی شده توسط مدل.

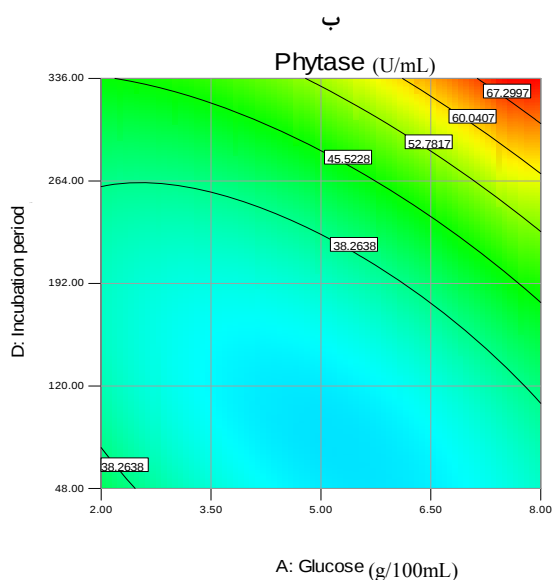
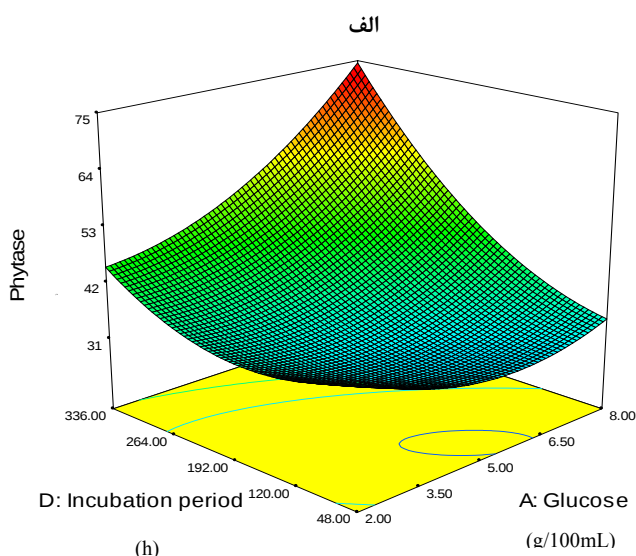


شکل ۲ نمودار سه بعدی اثر متقابل گلوکز و سولفات آمونیوم بر تولید آنزیم فیتاز در شرایطی که عوامل سبوس گندم و مدت زمان گرمخانه‌گذاری در نقطه مرکزی خود ثابت در نظر گرفته شده‌اند.

در شکل ۲ نمودار سه بعدی مربوط به دو عامل گلوکز و سولفات آمونیوم در شرایطی که عوامل سبوس گندم و مدت زمان گرمخانه‌گذاری در نقطه مرکزی خود ثابت در نظر گرفته شده‌اند را نشان داده شده است. با افزایش سولفات آمونیوم در محدوده ۲ تا ۴ و با افزایش گلوکز در محدوده ۲ تا ۸ میزان تولید فیتاز افزایش می‌یابد. شکل ۲ به خوبی نشان می‌دهد که اثر درجه دوم گلوکز معنی‌دار است. همچنین این شکل تاییدی بر داده‌های جدول ۲ است که بیان می‌کند اثر متقابل گلوکز و سولفات آمونیوم ($P < 0.001$) معنی‌دار است.

جدول ۲ تجزیه‌ی واریانس نتایج آزمایش‌های بهینه‌سازی

عوامل	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربع	F	P
مدل	۵۰۶۴/۶۱	۱۲	۴۲۰/۰۵	۲۲/۴۹	<۰/۰۰۰۱
A	۴۲۹/۴۴	۱	۴۲۹/۴۴	۲۶/۶۹	<۰/۰۰۰۱
B	۱۱۴۵/۰۹	۱	۱۱۴۵/۰۹	۷۱/۱۷	<۰/۰۰۰۱
C	۳۴۹/۹۳	۱	۳۴۹/۹۳	۲۱/۷۵	<۰/۰۰۰۱
D	۱۵۶۹/۲۹	۱	۱۵۶۹/۲۹	۹۷/۵۴	<۰/۰۰۰۱
AB	۲۱۴/۹۶	۱	۲۱۴/۹۶	۱۳/۳۶	۰/۰۰۰۷
AD	۱۵۰/۵۵	۱	۱۵۰/۵۵	۹/۳۶	۰/۰۰۳۶
BC	۲۱۳/۰۲	۱	۲۱۳/۰۲	۱۳/۲۴	۰/۰۰۰۷
BD	۳۱۲/۱۰	۱	۳۱۲/۱۰	۱۹/۴۰	<۰/۰۰۰۱
CD	۶۴/۹۹	۱	۶۴/۹۹	۴/۰۴	۰/۰۴۹۴
A ²	۱۵۰/۹۱	۱	۱۵۰/۹۱	۷/۱۶	۰/۰۰۳۶
B ²	۱۴۱/۹۹	۱	۱۴۱/۹۹	۱۰/۰۳	۰/۰۰۶۴
D ²	۲۱۱/۹۳	۱	۲۱۱/۹۳	۱۰/۳۹	۰/۰۰۰۷
باقی مانده	۶۸۳/۶۴	۴۳	۱۵/۹۰		
عدم تطابق	۱۶۶/۰۵	۱۲	۱۳/۸۴	۰/۸۳	۰/۶۲۱۳
خطای خالص	۵۱۷/۵۹	۳۱	۱۶/۷۰		
همبستگی کل	۵۷۲۴/۲۵	۵۵			



شکل ۳ نمودار سه بعدی (الف) اثر متقابل گلوکز و مدت زمان گرمخانه‌گذاری بر تولید آنزیم فیتاز در شرایطی که عوامل سبوس گندم و آمونیوم سولفات در نقطه مرکزی خود ثابت در نظر گرفته شده‌اند.

۳-۵- اثر متقابل سبوس گندم و سولفات آمونیوم بر تولید آنزیم فیتاز

زمان گرمخانه‌گذاری در نقطه مرکزی خود ثابت در نظر گرفته شده‌اند را نشان داده شده است. شکل ۴ الف بیان می‌کند اثر متقابل سبوس گندم و سولفات آمونیوم ($P < 0.001$) معنی‌دار است. شکل ۴ ب به وضوح نشان می‌دهد که با افزایش سبوس گندم و

بنابراین با افزایش گلوکز میزان فیتاز افزایش می‌یابد و این افزایش به سولفات آمونیوم تا میزان ۴ درصد وابسته است. از آنجایی که ترشح بیشتر متابولیت‌های خارج سلولی در طی تخمیر، ارتباط مستقیمی با توده‌ی زیستی دارد، افزودن قندهایی که به آسانی متابولیزه می‌شوند مانند گلوکز، باعث افزایش سریع توده‌ی زیستی می‌گردد. گزارش شده که قندهای ساده مانند گلوکز باعث افزایش تولید فیتاز بوسیله *آسپرژیلوس نایچر* در طی تخمیر حالت غوطه‌وری و تخمیر حالت جامد می‌شود [۱۲ و ۱۳]. در تحقیقی که توسط رامajanدران و همکاران انجام گرفت، آمونیوم نیترات، مناسب‌ترین منبع نیتروژن برای تولید فیتاز توسط قارچ رازیوپوس بر روی سویسترای کنجاله کنجد، معرفی شد و نشان داده شد که آمونیوم سولفات، تاثیر منفی بر تولید فیتاز توسط رازیوپوس دارد [۱۴].

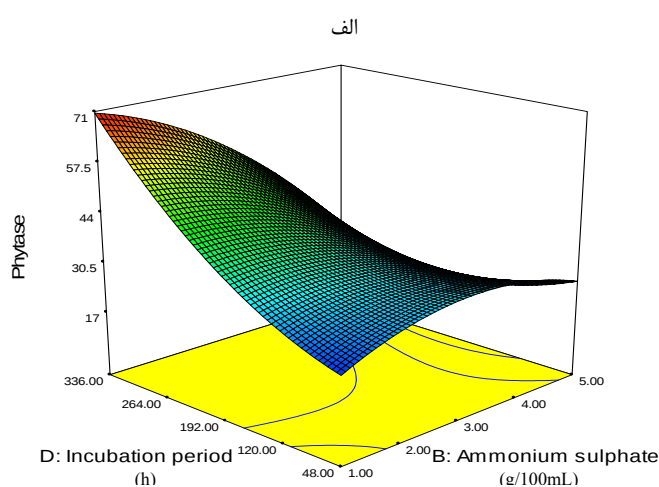
۳-۴- اثر متقابل گلوکز و مدت زمان گرمخانه-

گذاری بر تولید آنزیم فیتاز

در شکل ۳ نمودار سه بعدی و کنتور مربوط به دو عامل گلوکز و مدت زمان گرمخانه‌گذاری در شرایطی که عوامل سبوس گندم و سولفات آمونیوم در نقطه مرکزی خود ثابت در نظر گرفته شده‌اند را نشان داده شده است. شکل ۳ الف تاییدی بر داده‌های جدول ۲ است که بیان می‌کند اثر متقابل گلوکز و مدت زمان گرمخانه-گذاری ($P < 0.001$) معنی‌دار است. همانطوری که در شکل ۳ ب مشخص است، با افزایش گلوکز و مدت زمان گرمخانه‌گذاری تولید فیتاز به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. مدت زمان تخمیر وابسته به سرعت رشد و الگوی تولید آنزیم سویه است. در تولید فیتاز از *آسپرژیلوس نیچر*، بعد از ۷ روز تخمیر مقدار آنزیم به حداکثر می‌رسد [۱۵]. در محدوده مطالعه شده گلوکز (۲ تا ۸ درصد) اثر بازدارندگی مشاهده نشد در حالی که در بررسی ال-باتال و کارم تولید آنزیم فیتاز توسط *آسپرژیلوس نایچر* در غلظت گلوکز بیش از ۱۰ درصد اثر بازدارندگی مشاهده شد [۱۶].

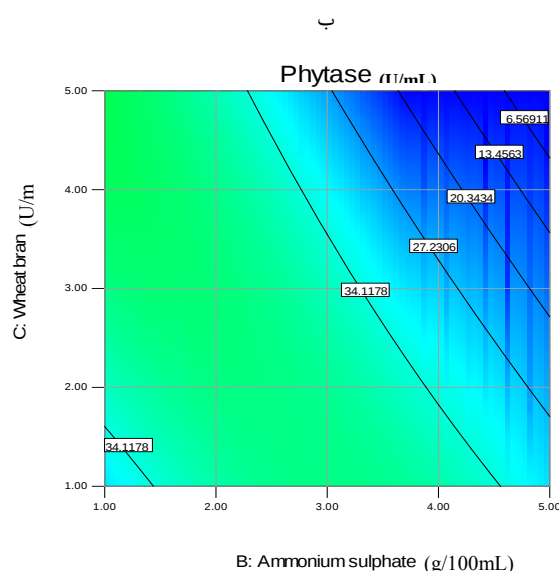
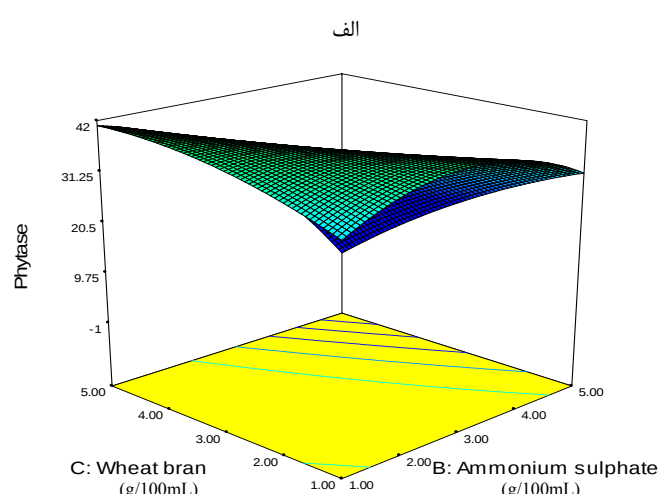
۳-۶- اثر متقابل مدت زمان گرمخانه‌گذاری و سولفات آمونیوم بر تولید آنزیم فیتاز

در شکل ۵ نمودار سه بعدی و کنتور مربوط به دو عامل مدت زمان گرمخانه‌گذاری و سولفات آمونیوم در شرایطی که عوامل سبوس گندم و گلوکز در نقطه مرکزی خود ثابت در نظر گرفته شده‌اند را نشان داده شده است. شکل ۵ الف تائیدی بر داده‌های جدول ۲ است که بیان می‌کند اثر متقابل زمان و دما ($P < 0.001$) معنی‌دار است. همان طوری که در شکل ۵ ب مشهود است با افزایش مدت زمان گرمخانه‌گذاری و کاهش منبع نیتروژنی (آمونیوم سولفات) تولید فیتاز افزایش می‌یابد. همچنین مدت زمان‌های طولانی از لحاظ صنعتی مناسب نمی‌باشد. در یک بررسی با گذشت زمان تولید آنزیم توسط آسپرژیلوس نایجر در تخمیر غوطه‌وری افزایش یافت و بیشینه تولید فیتاز پس از ۱۵ روز ۴۱ واحد آنزیم در میلی‌لیتر بود. با افزایش بیشتر زمان به علت تشکیل اسپور در محیط رنگ محیط سیاه می‌شود و فعالیت فیتاز کاهش می‌یابد [۱۹].



شکل ۵ کنتور (ب) اثر متقابل مدت زمان گرمخانه‌گذاری و سولفات آمونیوم بر تولید فیتاز آنزیم در شرایطی که عوامل سبوس گندم و گلوکز در نقطه مرکزی خود ثابت در نظر گرفته شده‌اند

سولفات آمونیوم میزان تولید فیتاز کاهش می‌یابد. این امر می‌تواند ناشی از اثر بازدارندگی یا سرکوبی ناشی از تجمع مواد نیتروژنی باشد. طبق بررسی‌های بوگار و همکاران از بین منابع نیتروژن (آمونیوم سولفات، عصاره مخمر، اوره، آمونیوم نیترات) آمونیوم سولفات مناسب‌تر می‌باشد [۱۷]. نتیجه تحقیق سینق و ساتیانارایانا نشان داد که جانشینی فیتات سدیم با سبوس گندم (۳ درصد) تولید فیتاز را تقویت می‌کند ولی هنگامی که میزان سبوس گندم افزایش می‌یابد محیط تخمیری از حالت غوطه‌وری به حالت نیمه جامد درمی‌آید [۱۸].



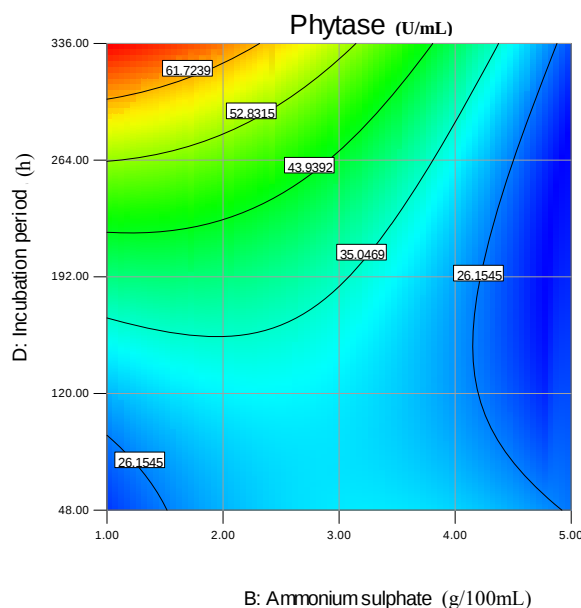
شکل ۴ کنتور (ب) اثر متقابل سبوس گندم و سولفات آمونیوم بر تولید آنزیم فیتاز در شرایطی که عوامل گلوکز و مدت زمان گرمخانه‌گذاری در نقطه مرکزی خود ثابت در نظر گرفته شده‌اند.

هنگامی که از سبوس گندم به عنوان منبع فسفر استفاده می‌شود آزاد شدن فسفر به تدریج صورت گرفته و مانع از سرکوبی یا بازخورندگی می‌شود. از آنجایی که فیتات سدیم ماده بسیار گران قیمتی است جایگزین کردن آن با سبوس گندم بسیار اقتصادی است. به علت این که مدت زمان‌های طولانی از لحاظ صنعتی مناسب نمی‌باشد مدت زما ت تقریبی ۸ روزه بدست آمده توسط روش سطح پاسخ در این تحقیق نیز مناسب است.

۵- منابع

- [1] Kumar, V., Sinha, K. A., Makkar, P. S. H. and Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food Chemistry, 120: 945–959.
- [2] Sabu, A., Pandey, A., Daud, M.J. and Szakacs, G. (2005). Tamarind seedpowder and Palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid-state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. Bioresource Technology, 96:1223–1228.
- [3] Hellström, M. A., Vázquez-Juárez R., Svanberg, U. and Andlid, A. T. (2010). Biodiversity and phytase capacity of yeasts isolated from Tanzanian togwa. International Journal of Food Microbiology, 136: 352–358.
- [4] Greiner, R., Konietzny, U., (2006). Phytase for food application. Food Technology and Biotechnology, 44: 125–140.
- [5] Singh, B. and Satyanarayana, T. (2007). Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications. Bioresource Technology, 99: 2824–2830.
- [6] Polaina, J. and McCabe, P.A. (2007). Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Dordrecht: Published by Springer, The Netherlands. pp. 505–507.
- [7] Nampoothiri, K. M., Tomes G. J., Roopesh, K., Szakacs, E., Nagy, V., Soccol, C. R. and Pandey, A. (2004). Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology, 118: 112–123.
- [8] Singh, B. and Satyanarayana, T. (2008). Improved phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in submerged

ب



شکل ۵: کنتور (ب) اثر متقابل مدت زمان گرمخانه‌گذاری و سولفات آمونیوم بر تولید فیتاز آنزیم در شرایطی که عوامل سبوس گندم و گلوکز در نقطه مرکزی خود ثابت در نظر گرفته شده‌اند

۴- نتیجه گیری

نتایج بهینه سازی عددی نشان داد به منظور تولید حداکثر آنزیم، گلوکز باید ۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر، سولفات آمونیوم ۱/۶ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر، سبوس گندم ۳ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر و مدت زمان تخمیر ۱۹۸/۳۰ ساعت باشد. تحت شرایط بهینه‌ی پیش بینی شده توسط مدل، فعالیت فیتاز ۳۹/۶۱ واحد آنزیم بر میلی‌لیتر گردید. برای تایید مدل، آزمایشی در شرایط مقادیر بهینه پیش بینی شده برای هر عامل انجام گرفت. میزان فعالیت آنزیم در شرایط آزمایش ۴۰/۲۱ واحد آنزیم بر میلی‌لیتر شد. که مقایسه‌ی آن با مقدار پیش بینی شده، کارایی مدل ارائه شده را تایید می‌کرد. میزان فیتاز تولیدی با استفاده از سبوس گندم رضایت بخش بود چرا که ضایعات کشاورزی حاوی مواد کربنی و نیتروژنی هستند که توسط ریزسازواره‌ها قابل استفاده است و استفاده از آن‌ها در تخمیر میکروبی به علت در دسترس بودن و قیمت ارزان در حال توسعه است. سبوس گندم علاوه بر منابع مذکور حاوی اسید فیتیک است که موجب تحریک تولید آنزیم فیتاز می‌شود. بعلاوه

- production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. *Process Biochemistry*, 40: 1749-1754.
- [15] Mandviwala, T. N. and Khire, J. M. (2000). Production of high activity thermostable phytase from thermotolerant *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 24: 237-243.
- [16] El-Batal, A.I. and Abdel Kareem, H. (2001). Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during submerged fermentation. *Food Research International*, 34: 715-720.
- [17] Bogar, B., Szakacs, G., Linden, J. C., Pandey, A. and Tengerdy, R. P. (2003). Optimization of phytase production. *Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 183-189.
- [18] Ramachandran, S., Roopesh, K., Nampoothiri, K., Szakacs, G. and Pandey, A. (2005). Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. *Process Biochemistry*, 40: 1749-1754.
- [19] Soni, S. K. and Khire, J. M. (2007). Production and partial characterization of two types of phytase from *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:1585-1593.
- fermentation due to statistical optimization. *Bioresource Technology*, 99: 824-830.
- [9] Heinonen, J. K and Lahti, R. J. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal Biochemistry*, 113:313-317.
- [10] Chadha, B. S., Harmeet, G., Mandeep, M., Saini, H. S. and Singh, N. (2004). Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucos pusillus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 105-109.
- [11] Vohra, A. and Satyanarayana, T. (2002). Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*. *Process Biochemistry*, 37: 999-1004.
- [12] Vats, P. and Banerjee, U. C. (2002). Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger var teigham* obtained from rotten wood-logs. *Process Biochemistry*. 38: 211- 217.
- [13] Vats, P. and Banerjee, U.C. (2004). Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases). *Enzyme and Microbial Technology*. 35: 3-14.
- [14] Ramachandran, S., Roopesh, K., Nampoothiri, K., Szakacs, G. and Pandey, A. (2005). Mixed substrate fermentation for the

Optimization of phytase production by *Aspergillus ficuum* in submerged fermentation using Response surface methodology

Badamchi, M.¹, Hamidi-Esfahani, Z.^{2*}, Abbasi, S.³

1- M.Sc. student of Faculty of Agriculture, Food Science and Technology Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2,3- Associate Professor, Faculty of Agriculture, Food Science and Technology Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: 89/5/10 Accepted: 90/7/22)

In this research, the culture condition improvement on phytase production by *Aspergillus ficuum* PTCC 5288 was investigated using submerged fermentation method in 250 ml shake flask. Four factors which influencing phytase production, including carbon source (glucose) in five level (2, 3.5, 5, 6.5 and 8 g/100 mL), nitrogen source (ammonium sulphate) five levels (1, 2, 3, 4 and 5 g/100 mL), phosphor source (wheat bran) five levels (1, 2, 3, 4 and 5 g/100 mL), and fermentation time five levels (48, 120, 192, 264 and 336 hour) were studied. The optimum levels of these significant factors were determined via response surface methodological approach as: 5.23g/100 mL glucose, 1.6 g/100 mL ammonium sulphate, 3.28 g/100 mL glucose wheat bran and 198.30 hours. The maximum predicted amount of phytase was 39.61 U/mL and the produced amount of phytase under these conditions was 40.21 U/mL, which indicates the efficacy of the model for prediction of phytase production content under different conditions of the medium.

Keywords: Optimization, Phytase, Phytic acid, Submerged fermentation, *Aspergillus ficuum*, Response surface methodology.

*Corresponding Author E-mail address: Hamidy_z@modares.ac.ir