بهینه‌سازی تولید آنزیم لیپاز مخمر *Cryptococcus albidus* با استفاده از رویه سطح پاسخ

وجیهه زارع باقی آباد[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۲*]، سید علی مرتضوی[۲]، مهدی وریدی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲٤)

چکیده

لیپاز به علت توانایی کاتالیز طیف گسترده‌ای از واکنش‌های تبدیلی نظیر هیدرولیز، استریفیکاسیون و ترانس استریفیکاسیون به طور گسترده‌ای در صنایع مختلف از قبیل صنایع غذایی، صنایع دارویی، پتروشیمی، صنایع مواد شوینده و ... مورد استفاده قرار می‌گیرد.مخمرها یکی از تولیدکنندگان اصلی لیپازها به شمار می‌روند. در این تحقیق از متدولوژی رویه سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی به منظور بررسی تاثیر pH (۷/۵ – ۵/۵)، زمان گرمخانه‌گذاری(۷- ۳ روز) و درصد عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی(۱۰۰- ۰ درصد) بر تولید و فعالیت لیپاز و بیومس تولید شده مخمر *کریپتوکوکوس آلبیدوس* و بهینه‌سازی فرایند تولید لیپاز و بیومس تولید شده، بهره گرفته شد. بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، درصد عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی و زمان گرمخانه‌گذاری به ترتیب موثرترین فاکتورها بر تولید و فعالیت لیپاز و میزان بیومس تولید شده بودند. براساس آزمایش‌های انجام شده شرایط بهینه تولید لیپاز و میزان بیومس تولید شده جهت حصول بیشینه فعالیت لیپاز(۹۸/۹٦ واحد آنزیمی) و وزن خشک سلولی (۱/۱٤ گرم بر ۱۰۰میلی لیتر محیط کشت)؛ pH۵/۵٦، زمان گرمخانه‌گذاری ۷روز و درصد عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی ۱۰۰ درصد تعیین گردید.

کلید واژگان: آنزیم لیپاز، بهینه‌سازی، رویه سطح پاسخ، مخمر کریپتوکوکوس

*مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

لیپازها کربوکسی استرآزهایی هستند که توانایی هیدرولیز آسیل گلیسریدهای با زنجیره ی آسیل بیشتر از ۱۰ اتم کربن را دارند [۱]. لیپازها علاوه بر هیدرولیز، توانایی کاتالیز طیف گسترده‌ای از واکنش‌های تبدیلی از قبیل استریفیکاسیون، ترانس استریفیکاسیون، الکلیز و اسیدولیز در محیط‌های غیر آبی را دارند [۲]. در دو دهه اخیر توجه به لیپاز به علت کاربردهای گسترده‌ی آن در صنایع مختلف از قبیل صنایع غذایی، صنایع داروسازی، صنایع نساجی، محیط زیست و بیوسنسور افزایش یافته است [۳]. امروزه لیپازهای میکروبی تقریباً به طور کامل جایگزین دیگر انواع لیپازها مانند لیپازهای جانوری شده‌اند. لیپازهای میکروبی به دلیل پایداری، قدرت انتخاب‌پذیری و دامنه وسیع سوبسترای انتخابی مورد اهمیت‌اند [٤]. باکتری‌ها و قارچ-ها منابع اصلی تولید کننده لیپاز به شمار می‌روند. هرچند قارچ‌ها و به خصوص مخمرها منابع بهتری برای تولید لیپاز هستند و برای کاربردهای صنعتی ترجیح داده می‌شوند [٥]. زیرا لیپازهای قارچی اغلب خارج از سلولی هستند و آسان‌تر از محیط تخمیر جداسازی می‌شوند [٦].

گونه‌های وحشی تولید کننده لیپاز اغلب لیپاز کمی را تولید می-کنند. مطالعات نشان داده است که می‌توان با تغییر ژنتیکی گونه مورد نظر و همچنین بهینه‌سازی محیط تخمیر تولید آنزیم لیپاز را به میزان قابل توجهی افزایش داد [۷]. ترکیب محیط کشت تخمیر تاثیر بسیار زیادی در میزان تولید آنزیم لیپاز دارد.به عنوان مثال گرباوسیس و همکاران ۲۰۰۷ با بهینه‌سازی شرایط کشت *Candidautilis* فعالیت لیپاز تولید شده را تا ۷۰ برابر افزایش دادند [۸]. همچنین نوع تخمیر نیز در بازدهی تولید آنزیم لیپاز تاثیر قابل توجهی دارد. هرچند تخمیر بر مبنای بستر جامد با استفاده از ضایعات کشاورزی به‌عنوان سوبسترا موفقیت‌آمیز اعلام شده است اما در مقیاس صنعتی کنترل دما، pH، رطوبت، اکسیژن و سوبسترا مشکل به‌نظر می‌آید بنابراین استفاده از سیستم‌های کشت غوطه‌وری به‌علت مزایای متعددی مانند: یکنواخت نگهداشتن دما و pH در محیط و امکان وارد کردن مقادیر زیاد اکسیژن به درون سیستم و ایجاد شرایط نسبتا هموژن به منظور دست‌یابی به حداکثر رشد میکروارگانیسم، توصیه می‌شود [۹].

بیشترین مخمری که برای تولید لیپاز در مقیاس تجاری از آن استفاده می‌شود مخمر *Candida rugosa* می‌باشد. لیپاز این مخمر دارای فعالیت بالایی می‌باشد و توانایی بسیار خوبی در کاتالیزوری فرایندهای هیدرولیز و سنتز دارد(۱۰). هرچند تلاش برای کشف میکروارگانیسم‌های با فعالیت لیپازی بالا و همچنین دستیابی به لیپازی با کارایی‌های بالاتر همچنان ادامه دارد. به عنوان مثال تامیو و همکاران در سال ۲۰۱۳ استفاده از لیپاز *Cryptococous flavescens* که تحت تیمارهای مختلف خالص سازی شده بود، برای توسعه عطر و طعم در پنیر مخصوصاً پنیرهای ایتالیایی مثل موزرلا، پارمسان، چدار، و رومی موفقیت‌آمیز اعلام کردند [۱۱].

برای بهینه‌سازی شرایط کشت به منظور دستیابی به حداکثر تولید آنزیم لیپاز روش‌های متفاوتی ارائه شده است. درمیان این روش-ها، روش رویه سطح پاسخ(RSM) در مقایسه با دیگر روش-های مرسوم، در بسیاری از فرایندهای بیوتکنولوژی ترجیح داده می‌شود. زیرا این روش می‌تواند بین عوامل و پاسخ‌ها ارتباط برقرار نماید و سطح مطلوب هر عامل را تعیین کند. این درحالیست که در دیگر روش‌ها یکی از عوامل در برابر زمان تغییر داده می‌شود و دیگر سطوح عوامل ثابت در نظر گرفته می-شوند. که در این صورت اثرات متقابل میان عوامل در نظر گرفته نمی‌شود و در واقع به طور کامل نمی‌تواند شرایط بهینه را برای آزمایش تعیین کند [۱۲].

در پژوهش‌های پیشین مخمرهای لیپولیتیک موجود در کنجاله کنجد استان یزد جداسازی شدند و برای تعیین گونه برتر در شاخصه تولید آنزیم لیپاز، تست‌های کیفی و کمی لازم انجام پذیرفت. درمیان مخمرهای لیپولیتیک موجود مخمر *کریپتوکوکوس* شناسایی شده بیشترین تولید آنزیم لیپاز را از نظر کمی نشان داد(این گونه حتی از گونه مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* که از کنجاله کنجد جداسازی شده بود هم فعالیت لیپازی بیشتری را نشان داد) [۱۳]. و ما را برآن داشت تا تحقیقات خود را در زمینه‌ی بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم لیپاز توسط این گونه با جدیت ادامه دهیم. بنابراین هدف از انجام پژوهش، دستیابی به شرایط بهینه تولید آنزیم لیپاز توسط گونه *کریپتوکوکوس* جدا شده از کنجاله کنجد با استفاده از روش سطح پاسخ برای تعیین مقادیر بهینه‌ی فاکتورهای مورد بررسی بود.

۲- مواد و روش‌ها

مواد

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل محیط کشت Malt Extract Agarاز شرکت مرک آلمان، محیط کشت Czapek Dox Broth از شرکت کیولب، عصاره مخمر و پپتون از شرکت مرک آلمان، صمغ عربی، پارانیتروفنیل پالمیتات، ایزوپروپانول و تریتون X100 از شرکت سیگما، بافر تریس HCl با ۸ =pH و سدیم کلراید از شرکت مرک آلمان بود.

روش‌ها

ریزسازواره مورد استفاده

از مخمر کریپتوکوکوسآلبیدوس که در تحقیقات پیشین از کنجاله کنجد جداسازی شده بود، استفاده گردید(۱۳). از محیط کشت Malt Extract Agar (شامل ترکیبات ۲۰ گرم عصاره مالت به همراه ۲۰ گرم آگار در ۱ لیتر آب مقطر) برای کشت این مخمر در دمای ۲۹ °C به مدت ۳-۲ روزه استفاده گردید و در دمای نگهداری ٤ °C نگهداری شد(١٤).

آماده‌سازی محیط تلقیح

گونه مخمر در محیط کشت YM (۳ g/L عصاره مخمر، g/L ۵ عصاره مالت، g/L ۵ پپتون و g/L ۱ روغن کنجد، pH=٦/٢) برای ٤٠ ساعت در دمای۲۵ °C کشت داده شد.از این محیط (10^7سلول بر میلی لیتر) برای تلقیح استفاده شد [۱۲].

آماده‌سازی محیط کشت تخمیر

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی(10^7سلول بر میلی‌لیتر) تهیه شده را به ارلن مایر ۱۵۰ میل‌لیتری محتوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تلقیح شد. کشت‌ها در انکوباتور شیکردار با سرعت به هم زدن ۱۵۰rpm و دمای۳۰ °C گرمخانه‌گذاری شدند. شرایط کشت بر طبق ماتریکس طراحی شده، محیا شد. محیط کشت پایه، محیط Czapek Dox broth بود. فاکتورهای بهینه‌سازی شامل pH، زمان گرمخانه‌گذاری و درصد عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت پایه بود. در جدول ۱ فاکتورهای مورد بررسی و سطوح به کارگرفته شده، آورده شده است.

تهیه عصاره کنجاله کنجد

بدین منظور پودر کنجاله کنجد به نسبت ۱ به ۱۵ با آب دوبار تقطیر مخلوط و در ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. با استفاده از حمام آبی اولتراسوند(UP200H , Dr.Hielscher) در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه با توان ۱۰۰ و ۲۰ کیلوهرتز تحت امواج فراصوت قرار گرفتند. بعد از اتمام این مرحله عصاره‌ها از فیلتر کاغذی عبور داده شدند و با دور۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا ذرات باقیمانده ته‌نشین شوند و سپس دوباره سوپرناتانت از فیلتر کاغذی گذرانده شد. مایه عبوری به عنوان عصاره در نظر گرفته شد [١٦و١٥].

تهیه سوپرناتانت محیط کشت

برای تهیه سوپرناتانت محیط‌کشت، محیط‌کشت‌ها در دورrpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ و از فیلتر کاغذی وات‌من شماره ۱ عبور داده شدند. مایع عبوری به‌عنوان سوپرناتانت محیط‌کشت استفاده شد [۱۷].

اندازه‌گیری کمی فعالیت لیپاز به روش رنگ‌سنجی

در این روش از پارانیتروفنیل پالمیتات (pNPP) به‌عنوان سوبسترای آنزیم لیپاز برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی به‌کار رفت که محصول نهایی این آنزیم، اسیدچرب و پارانیتروفنل(pNP) است. پارانیتروفنل رنگ زردی ایجاد می‌نماید که در طول ٤١٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر قابل اندازه‌گیری است.

محلول سوبسترا با اضافه کردن محلولA (شامل محلولی با غلظت ١٦/٥ mM از پارا نیتروفنیل پالمیتات در ۱۰ میلی لیتر ایزوپروپانول) به محلول B(شامل ۵۰ mM بافر تریس HCl با ۸ =pH (٠/٤٪تریتون X=100 و ٠/١٪ صمغ عربی) به‌نسبت ۱ به ۹ آماده گردید. محلول آنزیم نیز بعد سانتریفیوژ محیط‌کشت و جداکردن ذرات و سلول‌ها با استفاده از فیلتر کاغذی واتمن شماره ۱ تهیه گردید.

سپس ۱۰۰میکرولیتر از محلول آنزیم به ۹۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا اضافه گردید و پس از ۱۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C ،جذب پارانیتروفنول در طول موج ٤١٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر(UV/Vis مدل Lightwave S2000) خوانده شد و واحد آنزیم به صورت یک واحد فعالیت آنزیم برابر است با مقداری از آنزیم که یک میکرومولپارا

نیتروفنول را از سوبسترا در هر دقیقه آزاد کرده است، گزارش گردید. نمودار استاندارد با استفاده از محلول ۰، ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار پارانیتروفنل در ایزوپروپانول و جذب نوری آن در ٤۱۰ نانومتر تهیه شد [۱۷].

اندازه‌گیری بیومس

بعداز فیلتراسیون محیط کشت براث بر روی فیلتری که قبلا به وزن ثابت رسیده بود(فیلتر کاغذی استفاده شده برای تهیه سوپرناتانت محیط کشت در اندازه‌گیری فعالیت لیپاز)، ابتدا فیلتر، با آب مقطر شسته شد و سپس در دمای ۱۱۰-۱۰۵ °C در آون تازمانیکه به وزن ثابت برسد، خشک شد. وزن بیومس برحسب وزن خشک سلول(گرم) بر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه شد [۱۸].

طرح آماری

RSM مجموعه‌ای از تکنیک ای آماری است که در بهینه‌سازی فرایندها بکار می‌رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می‌گیرد. با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش یافته و کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها، قابل برآورد هستند. از این رو روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی برای بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورها انتخاب شد. در این تحقیق اثر متغیرهای مستقل شامل X1pH ، X2 زمان گرمخانه‌گذاری و X3 درصد عصاره کنجاله کنجد در سه سطح و شش تکرار در نقطه مرکزی طرح (برای محاسبه تکرار پذیری فرایند) مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). در مرحله دوم، طرح آماری گزینش شده و رابطه مدل مورد استفاده برای پیش‌بینی، برازش شده و مورد ارزیابی قرار گرفت.مرحله سوم شامل ارائه گرافیکی رابطه مدل و تعیین شرایط عملیاتی بهینه بود که به وسیله نمودار رویه پاسخ انجام پذیرفت. تنظیمات اعمال شده برای فرایند بهینه‌سازی در جدول ٦ آورده شده است [۱۹].

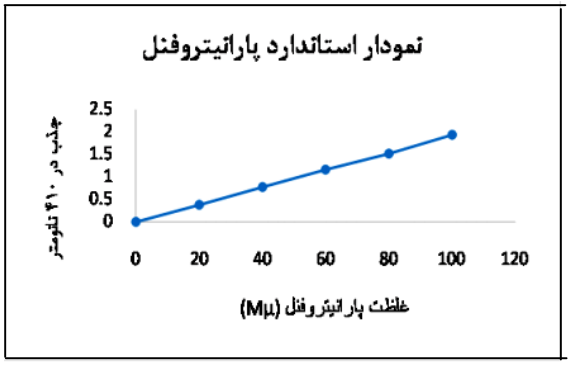
جدول ۱ نمایش متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر آن ها

فاکتور	نام	واحد	سطح پایین	سطح بالا
۱	pH	–	۵/۵	۷/۵
۲	زمان گرمخانه گذاری	روز	۳	۷
۳	عصاره کنجاله کنجد	درصد (٪)	۰	۱۰۰

از نرم افزار Design Expert 7.0.3جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ استفاده گردید. متغیرهای وابسته (پاسخ‌ها) شامل فعالیت لیپاز بر حسب واحد آنزیمی و وزن خشک بیومس بر حسب گرم بر ۱۰۰میلی-لیتر محیط کشت بود. تعداد کل آزمایش‌ها برابر ٤۰ بوده و آزمایش در دو تکرار انجام شد.

۳- نتایج و بحث

در این پژوهش عملکرد مخمر *کریپتوکوکوس آلبیدوس* در تیمارهای مختلف برای تولید آنزیم لیپاز بررسی شد. وزن خشک بیومس بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت و فعالیت آنزیمی لیپاز بر حسب واحد آنزیمی در میلی‌لیتر (U/ml) با روش رنگ‌سنجی پارانیتروفنیل پالمیتات اندازه‌گیری گردید. نتایج حاصله در جدول ۲ مشاهده می‌شود. در شکل ۱ منحنی استاندارد جذب پارانیتروفنل در ٤۱۰ نانومتر نشان داده شده است.



شکل ۱ منحنی استاندارد جذب پارانیتروفنل در طول موج ٤۱۰نانومتر

جدول ۲ تیمارهای مربوط به بهینه‌سازی شرایط تخمیر

تیمار	pH	زمان (روز)	عصاره کنجاله کنجد(٪)	فعالیت لیپاز (U/ml)	وزن خشک بیومس (gr/100ml)	تیمار	pH	زمان (روز)	عصاره کنجاله کنجد(٪)	فعالیت لیپاز (U/ml)	وزن خشک بیومس (gr/100ml)
۱	۵/۵۰	۵	۵۰	۵۹/۷۳	۰/۸۶	۱۱	۷/۵۰	۷	۰	۱٤/۸	۰/٦۸۲
۲	۵/۵۰	۷	۰	۲۹/۳	۰/۸٦	۱۲	٦/۵۰	۵	۵۰	٦۰/٦	۰/۷٤٤
۳	۵/۵۰	۳	۱۰۰	٤٤/۹٦	۰/٦۹۲	۱۳	٦/۵۰	۳	۵۰	۲۸/۸۳	۰/۵۹۳
٤	٦/۵۰	۷	۵۰	۵٤/۲۳	۰/۸٦۵	۱٤	۷/۵۰	۳	۱۰۰	۱۸/۸۸	۰/٦۹۸
۵	۷/۵۰	۳	۰	۹/۹۳	۰/۵۰۲	۱۵	٦/۵۰	۵	۵۰	٦۲/۷	۰/٦۷٦
٦	٦/۵۰	۵	۵۰	۵٤/۹٦	۰/۸۱٦	۱٦	٦/۵۰	۵	۵۰	۵۹/۹٦	۰/۷٤٤
۷	۷/۵۰	۷	۱۰۰	۵۰/۰۳	۱/۱۵۳	۱۷	۵/۵۰	۳	۰	۲۱/۳	۰/۵۹٦
۸	۷/۵۰	۵	۵۰	۲۰/۲٦	۰/۷۵۹	۱۸	٦/۵۰	۵	۵۰	۵۸/٤۳	۰/۷۷۲
۹	۵/۵۰	۷	۱۰۰	۹۸/۹٦	۱/۱٤۲	۱۹	٦/۵۰	۵	۱۰۰	۸۸	۰/۸۹
۱۰	٦/۵۰	۵	۵۰	۵۹/۷٦	۰/۸۳۷	۲۰	٦/۵۰	۵	۰	٤۷/۸٦	۰/٦۳۷

انتخاب بهترین مدل:

پس از تجزیه داده‌ها جهت تعیین بهترین مدل پیشنهادی از میان پنج مدل موجود Quadratic، Cubic، Mean ، 2FI و linear با توجه به جدول آنالیز واریانس (جدول ۳) تجزیه واریانسی، مدلی که مقدار مجموع مربعات آن دارای اختلاف معنی‌دار بوده و مقدار lack of fit آن معنی‌دار نشود به‌عنوان بهترین مدل انتخاب می‌شود. با توجه به این موضوع و پس از بررسی نتایج به دست آمده و مقایسه میان مدل‌های رگرسیونی نتایج حاکی از آن بود که مدل Quadratic برای تمامی آزمون-های اندازه‌گیری شده در این مطالعه،دارای اختلاف معنی‌دار با سایر مدل‌ها بود. و این مدل تنها مدلی بود که Lack of fit برای آن معنی‌دار نشده بود. در نتیجه مدل Quadratic برای بررسی روند تغییرات پارامترهای اندازه‌گیری شده در این مطالعه انتخاب شد. پس از انتخاب بهترین مدل در سطح آماری ۵ درصد، جهت بررسی پارامترهای اثرگذار در مطالعه با توجه به جدول تجزیه واریانس، پارامتری که آزمون F برای آن معنی‌دار نباشد، از مدل حذف می‌شود و سایر پارامترها که دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بودند، در مدل نگهداری شد. لازم به ذکر است در صورتیکه که پارامتر خطی یک متغیر در یک مدل اثر معنی‌داری نداشته باشد ولی اثر متقابل آن ، با یکی از متغیرهای دیگر ، که آن متغیر دارای اثر معنی‌داری در مدل بوده، دارای اثر معنی‌داری باشد آن پارامتر در مدل نگه داشته می‌شود. سپس معادله کلی، با استفاده از ضرایب داده شده برای هر پارامتری حاصل می‌گردد. در نهایت در میان پارامترهای مختلف، پارامتری که بیشترین مجموع مربعات را داشته باشد، به‌عنوان اثرگذارترین پارامتر و پارامتری که کمترین مجموع مربعات را داشته باشد، به‌عنوان کم اثرگذارترین پارامتر انتخاب می‌شود.

نتایج آنالیز آماری فعالیت لیپاز، بیانگر تاثیر معنی‌دار (درسطح ۵ درصد) هر سه تیمار مراحل تخمیر بر تولید و فعالیت لیپاز است. بررسی تغییرات فعالیت لیپاز نشان داد معادله حاصل، R^2 (۰/۹۸۲٤) خیلی بالا و معنی‌داری (در سطح ۵ درصد) برای پیشگویی آن برخوردار است. با توجه به جدول آنالیز واریانس (جدول۳) ملاحظه می‌شود شرایط تخمیر و گرمخانه‌گذاری (pH، زمان و محیط کشت) به صورت معادله درجه دوم بر مقدار آنزیم تولید شده موثر است. و با توجه به ضرایب معادله مشخص شد که درصد عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی بیشترین اثر را در تولید و فعالیت لیپاز دارد.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس فعالیت لیپاز و وزن خشک بیومس به ترتیب در جدول‌های۳و٤آورده شده است.

جدول ۳ آنالیز واریانس نتایج حاصل از فعالیت لیپاز تولید شده تحت شرایط مختلف بهینه‌سازی

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمالF	احتمال P
مدل	۱۰۵۹۵/۹۵	۹	۱۱۷۷/۳۳	٦۲/۱٤	<۰/۰۰۰۱
باقیمانده	۱۸۹/٤۷	۱۰	۱۸/۹۵		
عدم برازش مدل	۱۵٦/۰۵	۵	۳۱/۲۱	٤/٦۷	۰/۰۵۸۱
خطای خالص	۳۳/٤۳	۵	٦/٦۹		
تصحیح شده کل	۱۰۷۸۵/٤۳	۱۹			

adequate precision= ۲۸/٦۸۲ ، R^2_{adj}= ۰/۹٦٦٦ ، =R^2_{pred} ۰/۸۱۷۵ ، =R2 ۰/۹۸۲٤

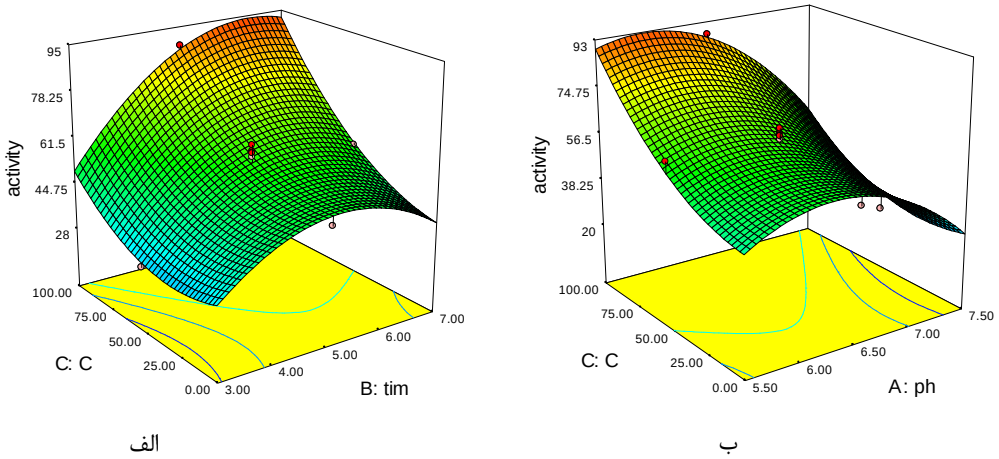
بهینه‌سازی

تاثیر دو متغیر pH اولیه محیط کشت و زمان گرمخانه-گذاری بر تولید و فعالیت لیپاز

نتایج آنالیز آماری در سطح ۵ درصدنشان داد که اثر متقابل این دو متغیر تاثیر معنی‌داری بر تولید و فعالیت لیپاز مخمر *کریپتوکوکوس آلبیدوس*ندارند.

تاثیر دو متغیر pHاولیه محیط کشت و درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی بر تولید و فعالیت لیپاز

نتایج آنالیزهای آماری (در سطح ۵ درصد) حاکی از معنی‌داری تاثیر متقابل دو متغیر pH و درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی بود. با مشاهده شکل (۲. الف) ملاحظه می‌شود که در میزان درصدهای پایین عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی با افزایش pH از ۵/۵ تا ۷ فعالیت لیپاز افزایش و به دنبال آن کاهش می‌یابد به گونه‌ای که در درصدهای پایین عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیطکشت آزمایشگاهی بیشترین فعالیت لیپاز در pH ۷/۰- ٦/۵ به دست آمد. هرچند که در درصدهای بالاتر عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی طول این روند افزایشی، کاهش یافته و بیشترین فعالیت لیپاز در pH بین ٦/۲۰ – ۵/٤۰ به دست آمد. بیشترین فعالیت لیپاز با درصدهای بالای عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی و pHهای پایین محیط کشت به دست آمد.



الف ب

شکل۲ نمودار سطح پاسخ تغییرات pH و درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیطکشت آزمایشگاهی (الف) و تغییرات زمان ودرصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیطکشت آزمایشگاهی (ب) بر تولید و فعالیت لیپاز

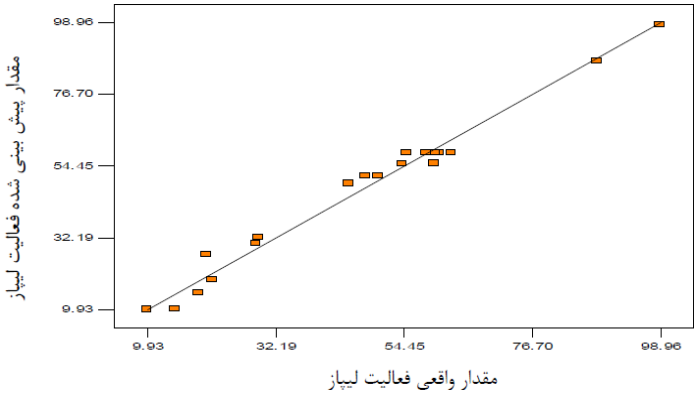
تاثیر دو متغیر زمان گرمخانه‌گذاری و درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد به محیط کشت آزمایشگاهی بر تولید و فعالیت لیپاز

نتایج آنالیز آماری در سطح ۵ درصد نشان داد که دو عامل درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط-کشت آزمایشگاهی و زمان تاثیر معنی‌داری بر تولید و فعالیت آنزیم لیپاز تولید شده دارند. با ملاحظه‌ی شکل ۲ ب مشاهده می-شود که در غلظت‌های کم عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط‌کشت آزمایشگاهی با افزایش زمان تا حدود ٦ روز فعالیت لیپاز افزایش، و به دنبال آن کاهش می‌یابد. با افزایش غلظت عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی، این تاثیر افزایشی زمان بر فعالیت لیپاز، افزایش و تا ٦/۵ روز ادامه می‌یابد و به دنبال آن کاهش ناچیزی را به دنبال دارد.

نتایج نشان داد بیشترین فعالیت لیپاز در pH ۵/۸۵ ، زمان ۵ روز و ۱۸ ساعت و میزان عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی ۹۹/٦۷ درصد، با فعالیت لیپازی U/ml ۹۹/۲۹۲۳ به دست آمد.مدل پیشنهادی حاصل از آنالیز آزمایش های انجام شده توسط نرم افزار در زیر آورده شده است.

$$Activity=-795.35196+227.13443X_1+52.00756X_2+0.28281X_3-1.62394X_1X_2-0.12284X_1X_3+0.090346X_2X_3-17.45441X_1^2-3.97985X_2^2 4.1922X_3^2$$

مقایسه مقادیر مشاهده شده با مقادر پیش‌بینی شده تطابق نزدیک این اعداد را نشان می دهد(شکل ۳).



شکل۳ مقایسه‌ی مقادیر مشاهده شده فعالیت لیپاز با مقادیر پیش‌بینی شده فعالیت لیپاز

این امر نشان دهنده همبستگی بسیار خوب نتایج به دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش‌بینی شده با روش آماری است.

رشد سلولی (بیومس)

نتایج آنالیز آماری بیومس بیانگر تاثیر معنی‌دار (درسطح ۵ درصد) دو تیمار pH و زمان تخمیر بر رشد بیومس است. بررسی تغییرات بیومس نشان داد معادله حاصل R^2 (۰/۹٦۰۸) خیلی بالا و معنی‌داری (در سطح ۵ درصد) برای پیشگویی آن برخوردار است. با توجه به جدول آنالیز واریانس (جدول ٤) ملاحظه می-شود شرایط تخمیر و گرمخانه‌گذاری(pH، زمان و محیط کشت) به صورت معادله درجه دوم بر بیومس تولید شده موثر است. و با توجه به ضرایب معادله مشخص شد که زمان بیشترین اثر را در رشد بیومس دارد.

جدول٤ آنالیز واریانس نتایج حاصل از رشد بیومس تحت آزمایش‌های مختلف انجام شده

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمالF	احتمال P
مدل	۰/٤۹	۹	۰/۰۵۵	۲۷/۲۰	<۰/۰۰۰۱
باقیمانده		۱۰			
عدم برازش مدل	۳/٤۲۱	۵	٦/۸٤۲	۰/۲۱	۰/۹٤٦۲
خطای خالص	۰/۰۱۷	۵	۳/۳۲۷		
تصحیح شده کل	۰/۵۱	۱۹			

adequate precision= ۲۰/٦۸۳ ، R^2_{adj}= ۰/۹۲۵٤ ، R^2_{pred}= ۰/۸۷٦۹ ، R2= ۰/۹٦۰۸

تاثیر دو متغیر pH و زمان بر تولید بیومس

نتایج آنالیز آماری تاثیر متقابل دو متغیر pH و زمان بر رشد بیومس (در سطح ۵ درصد) نشان داد که این تاثیر متقابل این دو متغیر تاثیر معنی‌داری بر تولید و فعالیت لیپاز تولید شده توسط مخمر *کریپتوکوکوس آلبیدوس*ندارند.

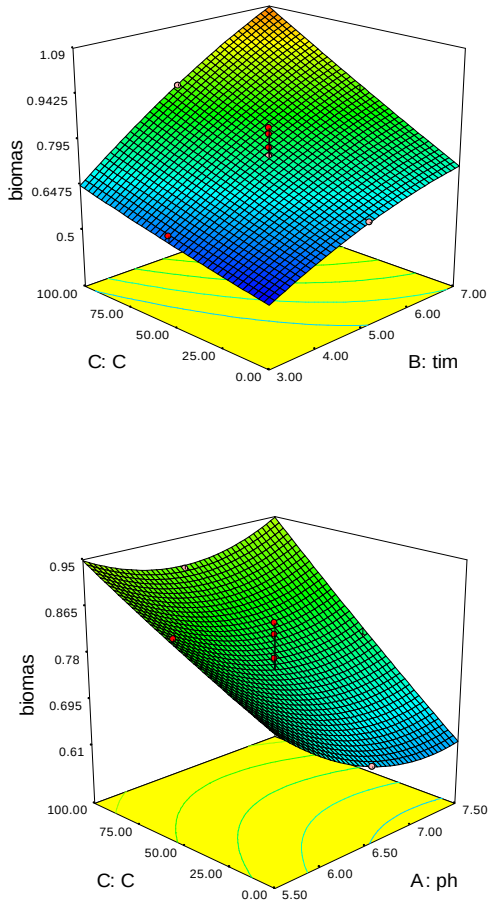
تاثیر دو متغیر pH و درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی بر تولید بیومس

نتایج آنالیز آماری در سطح ۵ درصد نشان داد که دو عامل درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی و زمان تاثیر معنی‌داری بر رشد بیومس دارند.

به گونه‌ای که با افزایش درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی رشد بیومس به صورت خطی افزایش می‌یافت. در درصدهای پایین عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی رشد بیومس در pHهای پایین (۵/۵)، بالا و در pHهای بالاتر(pH=٦/٥) کاهش می‌یافت. در درصدهای بالای عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی روند رشد بیومس ابتدا با افزایش pH، کاهش ولی به دنبال آن با افزایش pH به طور محسوسی افزایش می‌یافت به طوری که حتی این روند افزایش بیومس از مقدار بیومس در pHهای پایین نیز بیشتر بود(شکل ٤ الف).

تاثیر دو متغیر زمان و درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد به محیط کشت آزمایشگاهی بر تولید بیومس

نتایج آنالیز آماری در سطح ۵ درصد نشان داد که دو عامل درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی و زمان تاثیر معنی‌داری بر رشد بیومس دارند. به گونه‌ای که با افزایش درصد عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی میزان بیومس به صورت تدریجی افزایش می‌یابد. و با افزایش زمان میزان بیومس به صورت تقریباً خطی افزایش می‌یابد(شکل ٤ب).



شکل٤ نمودار سطح پاسخ تغییرات pH و درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد (الف) و تغییرات زمان و درصدهای مختلف عصاره کنجاله کنجد (ب) بر رشد سلولی

بیشترین رشد بیومس هنگامی بدست آمد که pH ۵/۵ ، زمان ۷روز و عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به عنوان مکمل به محیط کشت آزمایشگاهی ۱۰۰ ٪ باشد. مدل پیشنهادی حاصل از آنالیز آزمایش های انجام شده توسط نرم افزار در زیر آورده شده است.

$$Biomass=2.66805-0.71417X_1+0.15729X_2+-5.19423X_3-4.93750X_1X_2+7.22500X_1X_3+5.76250X_2X_3+0.051318X_1^2-7.29545X_2^2+2.12727X_3^2$$

در این مطالعه رشد و تولید لیپاز توسط مخمر*کریپتوکوکوس آلبیدوس*بهینه‌سازی شد. مخمر *کریپتوکوکوس آلبیدوس* نشان داد که توانایی بالایی در تولید لیپاز در محیط کشت غنی شده با عصاره کنجاله کنجد دارد. که می‌تواند به‌علت داشتن درصدی از روغن کنجد در عصاره کنجاله کنجد به نسبت ٪ ۲/۵۵ باشد.

مقدار پروتئین بالا در این عصاره به‌علت وجود پروتئین بالا در کنجاله، تاثیر امواج فراصوتو رها شده شدن مواد درون‌سلولی به‌داخل عصاره می‌باشد [۲۰]. همچنین حضور آمینواسیدهای مختلف از جمله گلایسین(۵/۳ درصد پروتئین خام) و هیستیدین(۲/۹ درصد پروتئین خام) که حضور آن‌ها در تولید آنزیم لیپاز ضروری می‌باشد، در کنجاله کنجد می‌تواند مزید بر علت باشد(جدول ۵) [۲۱].

جدول۵ آنالیزهای شیمیایی کنجاله کنجد و عصاره کنجاله کنجد

نوع نمونه	پروتئین خام	روغن خام	فیبر خام	ماده خشک	خاکستر
عصاره کنجاله کنجد	٦/٥	۲/۵۵	۱/۸۹	۱۸/٦٤	۲/۹۸۳

نتایج به دست آمده در این پژوهش با نتایج به دست آمده توسط یانگ و همکاران(۲۰۱۲) مطابقت داشت. یانگ و همکاران گزارش کردند که استفاده از همی‌سلولزهای استخراجی از تیمار اولتراسوند بر روی سوبسترای سبوس برنج، نسبت به دیگر تیمارها، در محیط کشت، تولید آنزیم گزیلاناز توسط قارچ *Aspergillus japonicas*را به طور معنی‌داری(در سطح ۵ درصد) افزایش داده است [۱٦].

تیواری و همکاران در سال ۲۰۱۱ تولید لیپاز توسط *Cryptococcus albidus*را بهینه‌سازی کردند. فعالیت لیپاز با استفاده از سوبسترای پارا نیتروفنیل استات در طول موج ٤۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. آن‌ها گزارش کردند که فعالیت لیپاز با رشد بیومس رابطه‌ی مستقیم دارد. و بیشترین تولید لیپاز در روز پنجم گرمخانه‌گذاری با فعالیت٤۷/۲ U/mlبود. در این مطالعه کنجاله روغنی به‌عنوان منبع خوبی از سوبسترا برای تولید انبوه لیپاز با کمترین هزینه معرفی شد. این ارگانیسم در این محیط، فعالیت لیپازی٦۸/۷ U/ml را نشان داد [٦].

لاکشمی و همکاران (۱۹۹۷) در تحقیقات خود نشان دادند که در میان روغن‌های گیاهی(روغن بادام زمینی، روغن کنجد، روغن کرچک، روغن پالم، روغن نارگیل و روغن آفتابگردان)، روغن کنجد به‌عنوان بهترین محرک تولید لیپاز توسط *Candida rugosa* (DSM 2031) می‌باشد[۲۲].

کامینی و همکاران (۲۰۰۰) دو متغیر pH و دما را برای تولید لیپاز توسط *S2Cryptococos* بهینه‌سازی نمودند. آن‌ها pH و دمای بهینه را به ترتیب ۵/٦ و۲۵° C درجه گزارش کردند. فعالیت لیپاز در این حالت ٦۵/۷ U/ml و رشد بیومس ۱۱/٦ میلی‌گرم وزن خشک در میلی‌لیتر در ۱۲۰ ساعت مشخص شد. آن‌ها گزارش کردند هرچند که در pH ٤ تا ۷ نیز آنزیم لیپاز به خوبی تولید می‌شد. ولی در pH ۳ تولید لیپاز به شدت کاهش می‌یابد. همچنین در دمای ۲۰ تا°C ۳۷ درجه نیز لیپاز به خوبی تولید می‌شد ولی تولید لیپاز در دمای °C۳۰ ، ۲۰ درصد کاهش می‌یافت [۱۳].

جدول ٦ پارامترهای بهینه‌یابی تولید و فعالیت لیپاز و رشد سلولی(بیومس)

نام	هدف	حد پایین	حد بالا	وزن	اهمیت
pH	در محدوده	۵/۵	۷/۵	۱	۳
زمان	در محدوده	۳	۷	۱	۳
درصد عصاره کنجاله کنجد	در محدوده	٪ ۰	٪۱۰۰	۱	۳
فعالیت لیپاز	بیشینه	۹/۹۳	۹۸/۹٦	۱	۵
بیومس	بیشینه	۰/۵۰۲	۱/۱۵۳	۱	٤

به منظور بهینه‌یابی شرایط تخمیر بر اساس فعالیت لیپاز تولید شده و میزان بیومس، حد بالا، پایین و مطلوب هر یک از ویژگی‌ها و وزن و اهمیت آن‌ها تعیین شد(جدول ٦). نتایج نشان داد pH، ۵/۵٦ و زمان، ۷ روز و درصد عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت،۱۰۰ درصد، بهترین نتیجه حاصل می‌شود. در این صورت فعالیت لیپاز ۹۸/۹٦ U/ml و میزان بیومس ۱/۱٤gram/100ml می‌باشد.

٤- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق بیانگر کارایی مفید متولوژی رویه پاسخ در بهینه‌سازی تولید آنزیم لیپاز مخمر *کریپتوکوکوس آلبیدوس*بود. از میان شرایطی که برای بهینه‌سازی فعالیت لیپاز مخمر *کریپتوکوکوس آلبیدوس*اعمال شد، مشخص شد که تولید و فعالیت لیپاز به میزان زیادی تحت تاثیر فاکتور درصد عصاره کنجاله کنجد افزوده شده به محیط کشت آزمایشگاهی قرار دارد. در مرحله بعدی زمان گرمخانه‌گذاری بیشترین تاثیر را بر تولید لیپاز دارد. و اثر pH نسبت به دو فاکتور دیگر به میزان کمتری بود. لازم به ذکر می‌باشد که که بهینه‌سازی تولید آنزیم لیپاز مخمر *کریپتوکوکوس آلبیدوس*یک کار آغازین بود که انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. به هر حال از نتایج به دست آمده می‌توان این گونه برداشت نمود، که با تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌توان شرایط لازم برای تولید آنزیم لیپاز در کشور با توجه به هزینه بالای واردات و وجود سوبستراهای ارزان قیمت فراوان(ضایعات کشاورزی و صنعتی) در کشور و کاربرد وسیع آین آنزیم در زمینه‌های گوناگون، فراهم نمود.

۵- قدردانی و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به‌علت کمک‌های مادی و معنوی صورت گرفته در راستای انجام طرح پژوهشی پایان‌نامه با کد ۲۹۵۹۱ تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

٦- منابع

[1] Bussamara,R., Fuentefria,A.M., Oliveira, E. S. D., Broetto. L., Simcikova. M., Valente, P., Schrank.A Vainstein.M.H., 2010. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. Bioresource Technology.101: 268–2

[2] Nwuche, C. O., and Ogbonna.J.Ch.2011. Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. Brazilian Archives of Biology and Technology,54(1).113-116.

[3] Rekha,K.S. S., Lakshmi, M. V. V., Sri Devi,V., and Siddartha Kumar,M. 2012. production and optimization of lipase from Candida rugosa using groundnut oil cake under solid state fermentation.International Journal Research in Engineering and Technology, 1(4):571-577.

[4] Thakur, s., 2012, Lipases, its sources, properties and applications: A Review. International Journal of Scientific & Engineering Research. 3(7):147-154

[5] Haliru, M., Bukola, Ch. A-T., 2012, Screening of microorganisms isolated from different environmental samples for extracellular lipase production. Assumption University Journal of Technology. 15(3): 179-186

[6] Tiwari1, P., Upadhyay. M. K., Silawat. N., and Verma. H. N., 2011. Optimization and characterization of a thermo tolerant lipase from Cryptococcus albidus. Der Pharma Chemica, 3 (4):501-508

[7] Thabet, H. M., Pasha, C., Ahmad, Md. M., Linga,V.R., 2012, Isolation of Novel Lipases Producing Sporobolomyces salmonicolor OVS8 from oil mill spillage and enhancement of lipase production. Jordan Journal of Biological Sciences. 5(4): 301 – 306

[8] Grbavcic, Z. A., Dimitrijevic, B.I.S., bezbradica,I.D.,Siler Marinkovic,S., and Knezevic,Z. 2007. Journal of the Serbian chemical society,72(8-9):757-765.

[9] Zarebaghiabad,V.2014.Feasibility of study isolation lipolytic yeast from sesame mealand optimization of lipase enzyme production in the system submerged culture.MSc Thesis.29-31

[10] Vakhlu,J., Kour, A., 2006, Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic Journal of Biotechnology.9(1) :214 – 223

[11] Tamio, M., Kana,A., Yui,I.,Yoshiho, K., Hideo, E., and Shinobu, I. 2013. Characterization and application of lipase 39-A from Cryptococcus flavescens for cheese flavoring. Food Science Technology Research, 19(1):89-95.

[12] Lo, C. F., Yu, C. Y., Kuan, I.C., and Lee,S. L. 2012. Optimization of lipase production by Burkholderia sp. using response surface methodology. International Journal of Molecular Sciences,13:14889-14897.

[13] Zarebaghiabad, V., Tabatabaee, F., Mortazavi, S. A., varidi. M. 2014. Isolation and identification of lipolytic yeasts from sesame meal Yazd province and determination the potential of lipase production in them. Journal of Food science& Technology. 51(13):125-136.

[14] Amaral, P. F.F., Almeida, A. P. R., Peixoto, T., M. Rocha-Leao, M. H.,Coutinho, J. A. P and Coelho, M. A. Z. 2007. Benefical effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in Yarrowia lipolytica cultures for lipase production. World Journal of Microbiology Biotechnology. 23:339-344.

[15] Haydari majd, M., Mortazavi, S.A., Asili, J., bolorian, S. 1391. Optimization of extraction of phenolic compounds from plant Flomidoschema parviflora Using ultrasound device. Journal of Herbal Medicines.3(1):7-13.

[16] Yang.chun-yao., sheli.I-chuan., fang.j.tony.,2012, Fermentation of rice hull by Aspergillus japonicus under ultrasonic pretreatment. Ultrasonic sonochemistry.19:687-691.

[17] Balaji,V., Ebenezer,P., Aneli, M. B., Robert F. H. D., 2012, Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. World Journal Microbiol Biotechnol, 28:71–80.

[18] Naqvi.S.H.,Khan.M.Y., Rafiq.M., Dahot.M.U., 2012, Screening of lipase producing Fungi and Catalytic Activity from Molasses Culture Medium. Sindh university research journal.44(1):105-112.

[19] Milani.E.,Golimovahhed.Q.A., and Hosseini.F.2011.Application of response surface methodology for optimization of Inulin extraction from SalsifypPlant.Iranian Food Science and Technology Research Journal.21(1):35-43.

[20] Zolfaghari. B., yekdaneh. A. 1389. Recent advances in the field of plant-derived compounds. Journal of Herbal Medicines.1:51-55.

[21] Ramachandran, S., Singh ,S. K., Larroche, Ch., Soccol, C. R., and Pandey, A. 2007. Oil cakes and their biotechnological applications–a review. Bioresource Technology, 98: 2000–2009.

[22] Lakshmi, B. S., Kangueane, P.,Abraham, B., and Pennathur, G.1999. Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from Candida rugosa (DSM2031). Letters in Applied Microbiology, 29:66-70.

[23] Kamini. N. R., Fujii. T., Kurosu. T., and Iefuji.h. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, Cryptococcus sp. S-2. Process biochemistry,36: 317-324.

Optimization of lipase production using surface response methodology of yeast *Cryptococcusalbidus*

Zare Baghi Abad, V. [1], Tabatabai Yazdi, F. [2*], Mortazavi, S. A. [2], Varidi, M. [3]

1. M Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Assistant Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 93/6/14 Accepted: 93/9/26)

The lipase is used broadly in different industries such as food, drug, petroleum and detergent industry due to the catalyst ability of wide range of conversion reactions such as hydrolyzed, esterification and transesterification . Yeasts are one of the main generators of lipases. In this paper, we use RSM and CCD in order to examine the effect of PH (5.5-7.5), time incubator (3-7days) and sesame meal extracts added to experimental medium (0-100%) on lipase generation and activity, generated biomass of *Cryptococcus albidus*and optimization of lipase generation process and generated biomass. The results showed that the percentages of sesame meal extracts added to experimental medium and time incubator are the most effective factors on lipase generation and activity and amount of generated biomass, respectively. Based on conducted experiments, optimized conditions of lipase generation and amount of generated biomass are determined PH 5.56 time incubator 7 days and percentages of sesame meal extracts added to experimental medium 100 percent in order to achieve maximum lipase activity (98.96 unit enzyme) and cell dry weight (1.14 gram per 100 mili liter medium).

Keywords: Lipase enzyme, Optimization, RSM, *Cryptococcus* yeast

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