بهینه سازی محیط کشت حاوی شیره خرما جهت تولید لیپاز توسط آسپرژیلوس نایجر به روش پاسخ عکس العمل سطح

مهدیه قمری[1]، فریده طباطبایی یزدی[2*]، ایران عالم زاده[3]، منوچهر وثوقی[4]، مهدی وریدی[5]، هانیه صفری[6]

١- فارغ التحصیل دکترای علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٢- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٣- استاد دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف
٤- استاد دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف
٥- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٦- فارغ التحصیل کارشناسی مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف

(تاریخ دریافت: ٩٣/٠٩/٢٥ تاریخ پذیرش: ٩٣/١٠/٢٦)

چکیده

از میان آنزیم ها، لیپازها گروه مهمی با کاربردهای گسترده در صنایع مختلف را تشکیل می دهند. سویه های مختلف کپک *A.niger* جهت تولید لیپاز خارج سلولی به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته اند. جهت غربالگری بهترین سویه تولید کننده لیپاز از روش پلیت آگار روغن زیتون/رودامین B و همچنین ارزیابی مستقیم محلول آنزیمی استفاده شد. سپس بهترین سویه برای تولید لیپاز با استفاده از کشت غوطه وری در محیط حاوی شیره خرما مورد بررسی قرار گرفت. از روش RSM جهت بهینه سازی ترکیبات محیط کشت شامل منبع کربن،منبع پروتئین و محرک آنزیمی استفاده شد. بیشترین میزان لیپاز تولیدی در محیط کشت حاوی ٢,٧٤٪ شیره خرما، ١,٠٦٪ ترکیب عصاره مخمر و پپتون و ٢,٠٦٪ روغن زیتون بدست آمد. بازده تولید لیپاز تولید شده توسط *A.niger* در محیط حاوی شیره خرما پس از بهینه سازی ترکیبات محیط کشت بر حسب واحد آنزیم تولیدی به ازای یک لیتر محیط کشت برابر با U ١٠٢٠٠ می باشد. بازده تولید لیپاز توسط شیره خرما پس از بهینه سازی ترکیبات محیط کشت نیز برابر با ٣٧٢,٢٦ واحد به ازای هر گرم شیره خرمای مصرفی بود. بیشترین تولید آنزیم در ١٠٢ ساعت پس از کشت مشاهده شد.

کلید واژگان: لیپاز، *A.niger*، RSM، شیره خرما

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

استفاده از ضایعات کشاورزی و صنعت به عنوان سوبسترا می-تواند منجر به کاهش هزینه های تولید آنزیم، به طورچشمگیر باشد زیرا محیط کشت معمولا ۲۵-۵۰ ٪ از کل هزینه های تولید را شامل می‌شود[۱]. لیپاز یکی از پرکاربرد ترین آنزیم هایی است که به عنوان بیوکاتالیست در صنایع مختلف، از جمله صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات زیادی به منظور استفاده از ضایعات مختلف برای تولید لیپاز توسط میکروارگانیسم‌های مختلف صورت گرفته است. جوانه گندم به صورت سوبسترای مخلوط توسط *Aspergillus japonicus* MTCC 1975 [۲]، جوانه گندم،استوک صابون و استیرن توسط*A. niger* [۳]، گندم راوا[1]و محلول خیسانده ذرت توسط *Aspergillus sp.* [٤]، جوانه گندم و کیک روغن کنجد توسط *A. niger* MTCC 2594 [٥]، سبوس برنج، سبوس کنجد، ضایعات موز، ضایعات هندوانه و ضایعات خربزه توسط*B. coagulans* [٦]، ملاس توسط *R.delemar* [۷]، برخی مثال هایی می باشند که برای تولید لیپاز استفاده شده اند.

ایران یکی از بزرگترین کشورهای تولید کننده خرما است و متاسفانه مقادیر نسبتاً زیادی از خرمای تولیدی (حدود ۲۵٪) در مراحل مختلف تولید و فراوری محصول و به دلایل مختلف ضایع می‌شوند [۸]. بدیهی است که توسعه صنعت تبدیل ضایعات خرما به مواد با ارزش تر کمک بسیار مهمی جهت حل مشکل ضایعات خرمای کشور است. ضایعات خرما غنی از قند و دیگر مواد مغذی می باشند که می تواند به عنوان سوبسترای عالی برای کشت میکروارگانیسم ها مورد استفاده قرار کیرد. به عنوان مثال اسید سیتریک از *آسپرژیلوس نایجر* [۸]، پکتین لیاز از *آسپرژیلوس نایجر* [۹]، زانتان از *زانتوموناس کمپستریس* [۱۰]، صمغ کوردلان از *آگروباکتریوم رادیوباکتر* [۱۱] گلوتامیک اسید از *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*[۱۲] با استفاده از ضایعات خرما به عنوان سوبسترا تولید شده اند.

ترکیبات محیط کشت نقش مهمی را در تولید لیپاز ایفا می کنند. روش کلی بررسی حداکثر تولید لیپاز بررسی تک تک فاکتورهاست که هم زمان زیادی را طلب کرده و هم اثر متقابل فاکتورها را بیان نمی‌کند. استفاده از تکنیک‌های آماری نظیر RSM[2] (روش پاسخ عکس العمل سطح) از کارایی بالایی در ارزیابی فرایندهای بیوتکنولوژیکی برخوردار است. بهینه‌سازی تولید لیپاز توسط RSM در مورد میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله *Cadida* sp. 99–125، *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus pumillus* گزارش شده است [۱۳-۱۵].

کپک آسپرژیلوس نایجر[3] با دارا بودن معیارهای غیر پاتوژنی و غیر سمی بودن و تولید آنزیم خارج سلولی بطور معمول برای تهیه آنزیم‌های غذایی استفاده می‌شود. در این مطالعه ۳ سویه *A.niger* جهت تولید آنزیم لیپاز مورد غربالگری قرار خواهد گرفت. سپس بهترین سویه جهت تعیین محیط کشت بهینه حاوی شیره خرما مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

۲- مواد و روش ها

مواد: میکروارگانیسم شامل ۳ سویه میکروبی تولید کننده لیپاز از کپک *A.niger* (*A.niger* PTCC5010, *A.niger* PTCC5012, *A.niger* PTCC5162 خریداری شده از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران)، روغن زیتون (شرکت ایرانی اویلا)، شیره خرما (کارخانه خرما بن بندر عباس). همه مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشات دارای درجه آزمایشگاهی و از شرکت مرک آلمان تهیه شده بودند.

محیط کشت نگهداری میکروارگانیسم و تهیه کشت اولیه: جهت تکثیر و نگهداری کوتاه مدت سوش از محیط PDA استفاده شد. اسلنت ها در ۳۰°C به مدت ۵ روز انکوباسیون شدند. اسلنت های تهیه شده در ٤ درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. به منظور جلوگیری از کاهش فعالیت سوش و آلودگیهای احتمالی، هر ماه یکبار اسلنتهای جدیدی از آن تهیه گردید. پس از تهیه اسپور بر روی اسلنت، اسپورها در آب مقطر استریل حاوی۰,۱ ٪ توئین ۸۰ (به منظور جداسازی بهتر اسپورها از یکدیگر و شمارش دقیق تر) معلق شده و با کمک لام نئوبار غلظت اسپورها 10^7 اسپور در میلی لیتر تنظیم گردید.

1. Wheat rawa

2. Response Surface Method
3. *Aspergillus niger*

ارزیابی فعالیت لیپولیتیکی روی پلیت حاوی آگار روغن زیتون/رودامین B: ارزیابی کیفی لیپاز با استفاده از کشت کپک ها روی پلیت های آگار دار حاوی روغن زیتون (v/v) ٢٪ و رودامین B (w/v) ٠,٠٠١٪ انجام پذیرفت.ترکیبات محیط کشت شامل نوترینت براس ٠,٨٪، NaCl ٠,٤٪، آگار ١٪، روغن زیتون ٢٪ پس از تنظیم pH روی ٧ استریل شده و تا دمای ٦٠°C سرد شد. ١ml محلول ردامین B (١mg/ml حل شده در آب مقطر و استریل شده توسط فیلتراسیون) به آن اضافه شد و به شدت همزده و سپس درون پلیت ریخته و سرد گردید. بعد از ٤ روز انکوباسیون در دمای ٣٠°C، پلیت ها در زیر تابش UV مورد بررسی قرار گرفت. هاله نارنجی رنگ فلورسانس در اطراف کلونی ها به عنوان مرحله اول غربالگری استفاده گردید [١٦]. در مرحله دو از غربالگری کشت میکروارگانیسم درون ارلن فلاسک حاوی ١٠٠ میلی لیتر محیط کشت حاوی روغن زیتون (v/v) ٢٪ (سایر ترکیبات گلوکز ٢٪، KH_2PO_4 ٠,٢٪ و $MgSO_4 \cdot 7$ H_2O ٠,٠٥ ٪ و پپتون ٠,٨٪)انجام گرفت و بعد از ٤ روز انکوباسیون در دمای ٣٠°C و ١٨٠rpm فعالیت آنزیمی اندازه گیری شد.

کشت میکروبی و تولید آنزیم: ١ میلی لیتر سوسپانسیون اسپوری حاوی 10^7 اسپور در میلی لیتر به ١٠٠ میلی لیتر محیط کشت در ارلن فلاسک ٥٠٠ میلی لیتری تلقیح گردید و در ٣٠°C با pH=٧ و سرعت همزدن ١٨٠rpm به مدت ٥ روز در انکوباتور شیکر دار قرار داده شد. ترکیبات ثابت محیط کشت شامل نمک های KH_2PO_4 ٠,٢٪ و ٠,٠٥ ٪ $MgSO_4 \cdot 7$ H_2O و ترکیبات متغییر شامل منبع کربن (شیره خرما بر حسب میزان قند احیا)، منبع نیتروژن (مخلوط عصاره مخمر و پپتون) و محرک آنزیمی (روغن زیتون) می باشد. جهت جلوگیری از واکنش مایلارد قند به صورت جداگانه استریل شده و در موقع تلقیح به محیط کشت اصلی استریل شده، اضافه می گردد. ترکیبات شیره خرما شامل میزان رطوبت، خاکستر[١٧] و قنداحیاء [١٨] در جدول ١ مشاهده می شود.

Table 1 Compositions of date waste

Compositions	Material in date waste (%)
Moisture	26
Ash	1.9
Reduction sugar	72.3

بهینه سازی ترکیبات محیط کشت: روش پاسخ عکس العمل سطح برای مطالعه اثر ترکیبات محیط کشت روی تولید لیپاز با اندازه گیری میزان فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. محدوده متغییرها با انجام آزمایش های اولیه تعیین گردید. با استفاده از طرح فاکتوریل باکس- بنکن با سه فاکتور (منبع کربن، منبع ازت، فعال کننده آنزیمی) و سه سطح شامل ٥ تکرار در نقطه مرکزی و متغییر وابسته یا پاسخ میزان فعالیت آنزیمی، ١٧ آزمایش توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت ٧، طراحی گردید. در جدول ٢ متغییرها و پاسخ، و در جدول ٣ تیمارهای طراحی شده برای بهینه سازی ترکیبات محیط کشت مشاهده می‌شود. برای برازش سطح پاسخ از معادله درجه دوم استفاده خواهد شد.

Table 2 Range of variables at different levels for the Optimization of culture medium

Name	Units	Type	low	center	High
carbon	%	Independent variable	-1 (1.5)	0 (2)	+1 (2.5)
nitrogen	%	Independent variable	-1 (0.75)	0 (1)	+1 (1.25)
Olive oil	%	Independent variable	-1 (1)	0 (2)	+1 (3)
activety	u/ml	Response	-	-	-

استخراج لیپاز: جهت حذف میسیلیوم محیط کشت با کاغذ واتمن فیلتر می‌گردد، سپس سانتریفوژ با سرعت ١٠٠٠ rpm به مدت ٥ دقیقه انجام می گردد. در مرحله بعد محلول رویی جهت سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار می گیرد.

سنجش فعالیت آنزیم: فعالیت آنزیم لیپاز طبق روش اوتا و یامادا اندازه گرفته شد[۱۹]. این روش بر اساس هیدرولیز امولسیون روغن زیتون و پلی وینیل الکل استوار می‌باشد. واحد فعالیت لیپاز (LU) را چنین تعریف نماییم: مقدار فعالیت آنزیمی که یک میکرومول اسید چرب را در مدت ۱ دقیقه در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و بافر فسفات pH=7 ،از سوبسترا آزاد نماید(که در این‌جا سوبسترا،امولسیون روغن‌زیتون به علاوه پلی‌وینیل الکل[۴] و اسید چرب آزاد شده، اسید اولئیک است).

اندازه‌گیری توده سلولی: وزن خشک توده سلولی توسط فیلتر کردن محیط کشت نمونه، روی کاغذ میلی پور توسط قیف میلی پور و دوبار شستشوی مواد روی قیف تعیین می-شود. سپس مواد فیلتر شده در ۶۰°C تا رسیدن به وزن ثابت خشک خواهد شد و نتیجه به صورت میزان وزن خشک توده سلولی در لیتر گزارش می‌شود [۲۰].

بررسی اعتبار مدل: برای تایید بهینه بودن ترکیبات محیط کشت، یک آزمایش با استفاده از نتایج بدست آمده از نقطه بهینه، در ۳ تکرار انجام گرفته و میانگین آنها برای اطمینان از نتایج آنالیز RSM مورد استفاده قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- انتخاب بهترین سویه تولید کننده لیپاز

جهت شناسایی بهترین سویه جهت تولید لیپاز در مرحله اول کشت در پلیت حاوی آگار روغن زیتون /رودامین B انجام گرفت. پلیت های تهیه شده به دلیل وجود رودامین B به رنگ صورتی دیده می شوند. رشد میکروارگانیسم و ترشح لیپاز به محیط کشت سبب هیدرولیز سوبسترا و واکنش آن با رودامین B و تشکیل هاله فلورسانس نارنجی رنگ در اطراف کلونی می گردد که با تابش UV قابل مشاهده می باشد. با مقایسه قطر هاله تولید شده می توان بهترین سویه را انتخاب نمود. نتایج حاصل نشان دهنده بیشترین هاله در اطراف کلونی *A.niger* PTCC5010 و کمترین هاله در سویه *A.niger* PTCC5012 می‌باشد (شکل ۱).

مونومر یا دی گلیسریدها و اسید های چرب آزاد شده توسط عمل آنزیم در محیط با رودامین B ترکیب شده و دایمرهایی را تشکیل می دهند که به صورت هاله فلورسانس قابل مشاهده می‌باشد [۲۱]. روش پلیت روغن زیتون/رودامین B به تغییرات pH غیر حساس بوده و اجازه جداسازی مجدد میکروارگانیسم از محیط را بدون اثر بازدارندگی در رشد یا تغییر در خصوصیات فیزیولوژیکی را می‌دهد.

سایر روش‌های غربالگری میکروارگانیسم‌های تولید کننده لیپاز مانند محیط‌های حاوی فنول رد[۵]، برموفنول بلو[۶]، برموکروزل گرین[۷]، ویکتوریا بلو[۸]، نوترال رد[۹]، کریستال ویولت[۱۰]، متیل رد[۱۱] و غیره براساس کاهش pH در محیط در نتیجه آزاد سازی اسید چرب بر اثر هیدرولیز و تغییر رنگ حاصل از آن استوار است [۲۲-۲۵].

در مرحله دوم جهت شناسایی بهترین سوش، کشت میکروبی درون ارلن انجام گرفت و پس از استخراج محلول آنزیمی خام،فعالیت آنزیمی بدست آمد. سوش PTCC5010 *A.niger* با فعالیت ۷ U/ml دارای بیشترین فعالیت و سوش های *A.niger* PTCC5162 و *A.niger* PTCC 5012 به ترتیب دارای فعالیت های ۵ U/ml و ۲ بودند. بنابراین با توجه به نتایج دو مرحله غربالگری سوش PTCC5010 *A.niger* به عنوان بیشترین تولید کننده آنزیم لیپاز جهت بررسی های بعدی انتخاب گردید.

۳-۲- بهینه سازی ترکیبات محیط کشت

در جدول۳ میزان فعالیت آنزیمی در مقادیر آزمایشی و پیش بینی شده با استفاده از مدل درجه دوم برای تیمار ها مختلف مشاهده می شود.

4. PVA

5. phenol red
6. Bromophenol blue
7. Bromocresol green
8. Victoria blue
9. Neutral red
10. Crystal violet
11. Methyl red

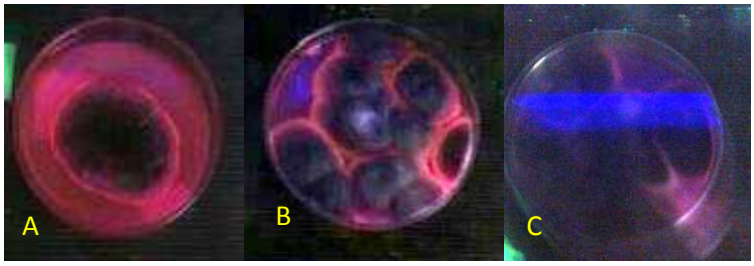

Fig 1 Florescent halo effect lipolytic activity by *A. niger* in Rhodamine B plate. (A) *A. niger* PTCC5162, (B) *A. niger* PTCC5010 and (C) *A. niger* PTCC5012

Table 3 Box-Behnken design for lipase production

Run	A: carbon source %	B: nitrogen source %%	C : olive oil %	Lipase activity U/ml Actual	Predicted
1	2	1	2	11	10.08
2	2.5	1	1	5.3	5.53
3	2.5	0.75	2	5.8	5.35
4	2	1	2	10.2	10.08
5	1.5	1	3	6.5	6.26
6	2	1	2	9.5	10.08
7	1.5	1	1	6.1	5.79
8	2	1	2	10.5	10.08
9	2.5	1.25	2	6.75	6.67
10	2	1.25	3	6.9	6.66
11	1.5	0.75	2	4.7	4.77
12	2.5	1	3	5.9	6.2
13	2	0.75	1	3.8	4.03
14	2	1.25	1	6	5.84
15	2	0.75	3	4.2	4.35
16	1.5	1.25	2	7.1	7.56
17	2	1	2	9.2	10.08

با بررسی داده ها در مدل های مختلف (خطی، 2FI و درجه دوم) و آنالیز ANOVA پس از آن، مشخص شد که مدل درجه دوم پلی نومیال[12]، بهترین توصیف فعالیت لیپاز می‌باشد.

مدل درجه دو برای پیش بینی پاسخ Y_1 و (فعالیت) به صورت زیر می‌باشد:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{ij=1}^{3} \beta_{ij} x_i x_j$$

12. second-order polynomial

در اینجا Y پاسخ، X_i و X_j متغیرهای مستقل، β_0، β_iو β_j ، β_{ij}، β_{ii} عرض از مبدا و ضرایب ثابت هستند.

نتایج آنالیز با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) در جدول ٤ خلاصه شده است.

Table4 ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Source	Sum of Squares	Degree of freedom	Mean Square	F-value	p-value	
Model	77.58	9	8.62	19.87	0.0003	*significant*
Lack of Fit	0.89	30.55	0.30	0.55	0.67	*Not significant*
Pure Error	2.15	4	0.54			
Cor Total	80.62	16				

R^2= 0.96; $R^2_{adjusted}$= 0.91; $R^2_{predicted}$= 0.78

ارزش P مدل به میزان ۰,۰۰۰۳ ، به معنی معنی دار بودن مدل است. lack of fit ارزش P ۰,٦۷ بود که به معنای بی معنی بودن lack of fit است. کیفیت lack of fit مدل توسط R^2 بررسی شد که برابر با ۰,۹٦ می باشد. $R^2_{predict}$ و R^2_{adj} به ترتیب ۰,۷۸ و ۰,۹۱ (جدول ٤ و شکل ۲) بدست آمد.
لیست ضرایب برای پاسخ در ترم های کد شده در جدول ۵ نشان داده شده است.

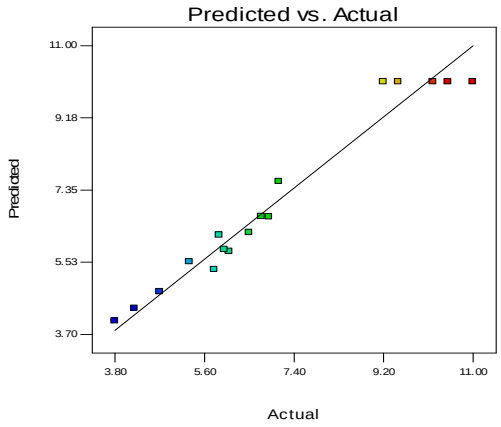

Fig 2 lipase activity predicted vs. actual values

Table 5 Final Equation in Terms of Coded Factors

Response		A	B	C	AB	AC	BC	A^2	B^2	C^2
Y	10.08	-0.081	1.03	0.29	-0.36	0.05	0.13	-1.63	02.36	02.5

۳-۳- پلات‌های پاسخ سطح و اثر فاکتورها

بعد از تشخیص اعتبار مدل به لحاظ آماری، می‌توان آن را به منظور آنالیز و برآورد اثر سطوح مختلف متغیرها بر میزان تولید لیپاز به کار برد. پلات های پاسخ سطح ارتباط بین متغیرهای مستقل و متغیر وابسته را نشان می‌دهد، در حالی‌که متغیر دیگر در مقدار بهینه ثابت نگه داشته می‌شود. در نتیجه با مطالعه این نمودارها و سطوح پاسخ، نواحی مطلوب نمودار براساس شرایط تولید لیپاز شناسایی می‌شود و در عین حال می توان بهینه‌سازی تکمیلی را انجام داد. در شکل ۳ تا ۵ این پلات ها مشاهده می شود.

۴-۳- تعیین نقاط بهینه

در نهایت مقدار بهینه فعالیت لیپاز همراه با مشخصات نقطه بهینه برای هر یک از پارامترها در جدول ٦ آورده شده است.

Table 6 optimum condition obtained by response surface modeling

Carbon source %	Nitrogen source %	Olive oil %	Activity (u/ml)	Desirability	
1.98	1.06	2.06	10.206	0.89	selected

همانطور که از نتیجه بدست آمده از بهینه سازی مشخص است بیشترین میزان تولید لیپاز در میزان ۱,۹۸٪ قند احیا در منبع کربنی، معادل با ۲,۷٤٪ شیره خرما بدست آمده است که به دلیل جذب سریع این کربوهیدرات توسط سلول بوده که منجر به نرخ رشد بالاتر و فعالیت بیشتر لیپازمی‌شود [۲٦]. محیط های کشت مورد استفاده برای تولید لیپاز معمولاً حاوی یک

کربوهیدرات ساده یا کمپلکس به عنوان منبع کربنی هستند، معمولا تولید لیپاز به طبیعت کربوهیدرات مصرف شده حساسیت کمتری نشان می‌دهد، قند احیا به دلیل جذب سریع این کربوهیدرات توسط سلول منجر به نرخ رشد بالاتر می-شود. این نتایج با تحقیقات Mahadik و همکاران همسو می-باشد[۲۷]. ادهم و احمد غلظت بهینه گلوکز برای تولید لیپاز توسط *A.niger* NRRL3 را ۲٪ گزارش کرده اند [۲۸]. همچنین فالونی و همکاران بهترین غلظت گلوکز برای تولید لیپاز توسط *A. niger* J-1 را نیز ۲٪ گزارش نموده اند [۲۲]. زمانی که میزان منبع نیتروژنی پایین است، میزان تولید آنزیم کم بوده و با افزایش میزان منبع کربنی سبب افزایش تولید آنزیم تا حدود ۲,۱٪ منبع کربنی می‌شود و پس از آن میزان تولید آنزیم با شیب کمتری کاهش می یابد. زیرا در حداقل میزان منبع نیتروژنی میزان تولید توده سلولی بسیار کم بوده و از آنجا که آنزیم لیپاز در نزدیک به انتهای فاز لگاریتمی تولید می شود، میزان تولید آنزیم پایین است. با افزایش منبع کربنی در حداقل میزان منبع نیتروژنی میزان اسید سیتریک به عنوان محصول جانبی افزایش می یابد و در ۲,۵٪ به حداکثر میزان خود می رسد. بنابراین به نظر می رسد، به دلیل کمبود توده سلولی به طور کلی، علارغم افزایش جزیی آن با افزایش منبع کربنی به دلیل تولید محصول جانبی پس از ۲,۱٪ منبع کربنی، تولید آنزیم کاهش یافته است (شکل ۳).

در بررسی تغییرات منبع کربنی در حداکثر میزان منبع نیتروژنی، مشاهده می شود که میزان تولید آنزیم به صورت مطلوب بوده و با افزایش قند احیا میزان تولید آنزیم تا حدود ۱,۹ افزایش می یابد و پس از آن کاهش می یابد و در ۲,۵ ٪ به حداقل می رسد. در حضور حداکثر میزان منبع نیتروژنی افزایش منبع کربنی منجر به نرخ رشد بالاتر و تولید آنزیم بیشتر شده اما در غلظت های بالای منبع کربنی، میزان توده سلولی تولیدی بسیار بالا بوده وتوده سلولی حجیم و به هم چسبیده ای را تشکیل می دهد که هم سبب کاهش میزان هوادهی به سلول شده و هم به نظر می رسد به انتهای فاز لگاریتمی رسیده باشد و منابع کربن و نیتروژن صرف تولید توده سلولی زیاد به عنوان محصول جانبی شده اند نه تولید آنزیم(شکل ۳).

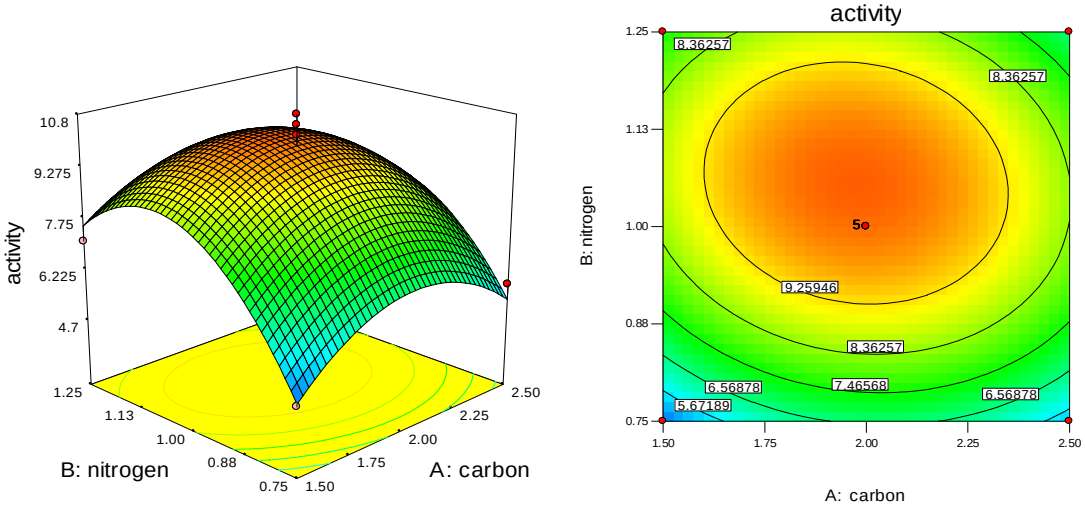

Fig 3 Response surface plots of carbon and nitrogen source in lipase production (olive oil=2%).

جهت حداکثر تولید لیپاز میزان منبع نیتروژنی ۱,۰٦٪ جهت بهینه سازی بدست آمد. علت مشاهده این نتیجه آن است که منابع نیتروژنی نقش مهمی را در سنتز لیپاز ایفا می کنند. افزایش منبع نیتروژنی سبب افزایش تولید لیپاز با شیب مثبت و تند تا حدود ۱٪ شده و پس از آن کاهش می یابد. شیب افزایش تولید لیپاز در مقادیر پایین منبع کربن بیشتر و تندتر بوده و در مقادیر بالای منبع کربن این شیب ملایم می شود زیرا در این حالت تولید توده سلولی بسیار افزایش یافته و کاهش میزان هم خوردن و هوادهی سبب کاهش میزان تولید آنزیم لیپاز گردیده است (شکل ٤). محققان مختلف از منابع گوناگون نیتروژنی جهت تولید آنزیم لیپاز توسط آسپرژیلوس استفاده کرده از جمله ۰,۸٪ پپتون [۲۹]، ۳٪ پپتون [۱۷]، ۱,۵٪ عصاره گوشت و ۰,۲۵٪ اوره [۳۰]، ۱٪ عصاره مخمر و ۲٪ پلی پپتون [۳۱]، ۲g/l نیترات آمونیوم [۲۱] و ۱٪ سولفات آمونیوم [۲۲].

بیشترین میزان تولید لیپاز در حضور ۲,۰٦٪ روغن زیتون بدست آمد. منابع کربن لیپیدی[13]، به طور کلی برای به دست آوردن عملکرد بالا لیپاز به نظر ضروری می رسد و منجر به تحریک تولید آنزیم لیپاز می‌شود. این منبع علاوه بر تحریک تولید لیپاز سبب افزایش میزان تولید توده سلولی نیز می گردد.

13. Lipidic

در میان تری گلیسریدها مشاهده شده است که روغن زیتون در تولید لیپاز محرک موثرتری بوده است. تری گلیسریدها در تولید لیپاز می توانند به صورت محرک و بازدارنده عمل کنند. این مطلب در پلات های مربوط به اثر محرک آنزیمی در تولید لیپاز (شکل ٤و٥) مشاهده می شود.

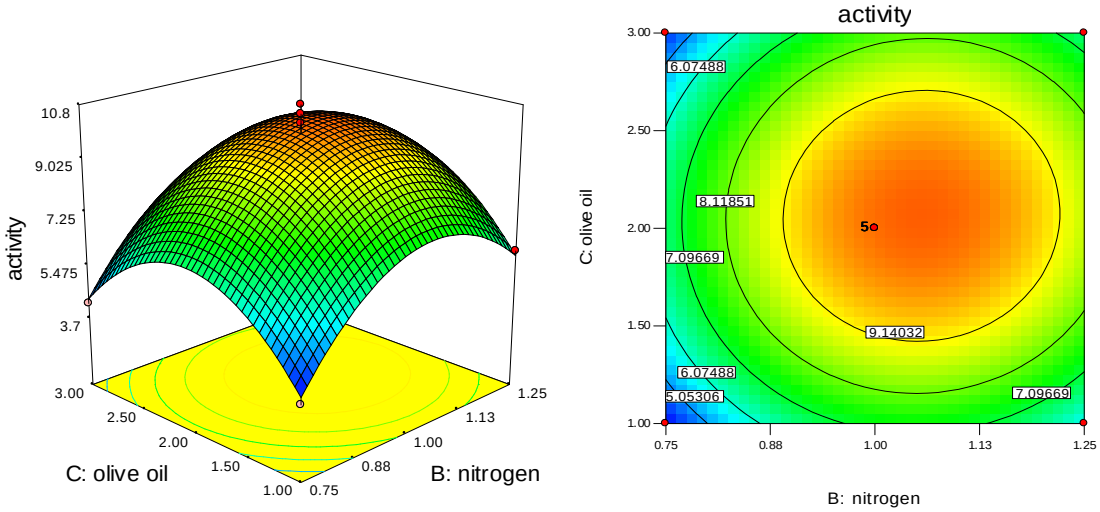

Fig 4 Response surface plots of nitrogen source and olive oil in lipase production (carbon source=2%).

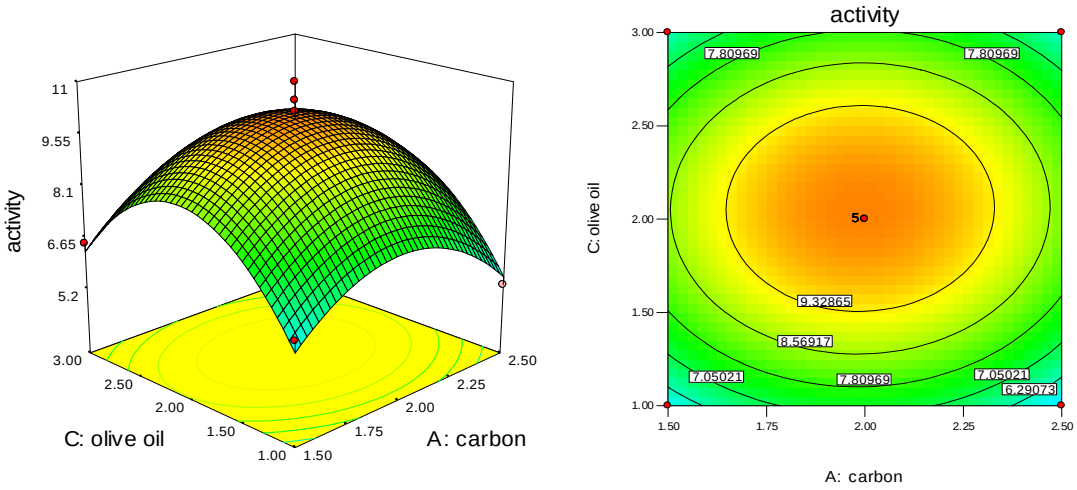

Fig 5 Response surface plots of carbon source and olive oil in lipase production (nitrogen source=1%).

افزایش درصد روغن زیتون از ۱ تا ۲٪ سبب افزایش میزان تولید لیپاز با شیب مثبت و زیاد می شود که بدلیل اثر محرکی در تولید آنزیم می باشد. اما پس از ۲,۰٦٪ شیب منحنی کمتر ومنفی می شود. علت منفی شدن شیب منحنی تولید اسیدهای چرب آزاد در غلظت بالای روغن زیتون است که به عنوان بازدارنده عمل می کنداین نتیجه همسو با نتایج محققان دیگر است که غلظت ۲٪ روغن زیتون را برای تولید لیپاز توسط *A.niger* NRRL3 *A.niger* J-1 و *A.niger* MYA135 اعلام نموده اند.[۱۷،۳۲،۳۳].

بازده تولید لیپاز تولید شده توسط *A.niger* در محیط حاوی شیره خرما پس از بهینه سازی ترکیبات محیط کشت بر حسب واحد آنزیم تولیدی به ازای یک لیتر محیط کشت برابر با U ۱۰۲۰۰ می باشد. بازده تولید لیپاز توسط شیره خرما پس از بهینه سازی ترکیبات محیط کشت نیز برابر با ۳۷۲,۲٦ واحد به ازای هر گرم شیره خرمای مصرفی بود.

٣-٥- آزمایش اعتبار مدل

برای تعیین اعتبار مدل، کشت میکروارگانیسم با استفاده از شرایط بهینه بدست آمده انجام گرفت. ماکسیمم فعالیت لیپاز (١٠,٣ U/ml) بدست آمده به مقادیر پیش بینی شده توسط مدل (١٠,٢ U/ml) بسیار نزدیک بود.

٣-٦- منحنی رشد و تولید آنزیم در شرایط بهینه بدست آمده

تعیین تعداد کپک ها در مراحل مختلف زمانی رشد با اندازه گیری میزان توده سلولی انجام ورشد ویژه(μ) محاسبه گردید. منحنی رشد و تولید آنزیم لیپاز *A.niger* در محیط حاوی شیره خرما در شکل ٦ مشاهده می شود.

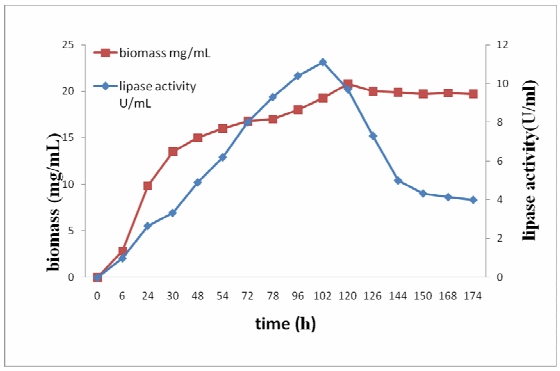

Fig 6 growth curve and produce lipase by *A.niger* in culture medium containing date waste

بیشترین تولید آنزیم در ١٠٢ ساعت پس از کشت، یعنی انتهای فاز لگاریتمی مشاهده شد. گاش و همکاران نیز تولید لیپاز را در انتهای فاز لگاریتمی یا ابتدای فاز سکون گزارش کردند [٣٤] . رشد ویژه h^{-1} ٠,٤٠٢ بدست آمد.

٤- نتیجه گیری

با کمک غربالگری *A.niger* PTCC 5010 با داشتن قطر هاله فلورسانس بیشتر در پلیت و فعالیت آنزیمی بیشتر انتخاب گردید. تولید آنزیم توسط *A.niger* در کشت غوطه وری با استفاده از شیره خرما به عنوان منبع کربن انجام گرفت. مقدار R^2 برابر با ٠,٩٦ برای مدل به خوبی رابطه مطلوب میان مدل و داده های آزمایشی را نشان می دهد. بیشترین میزان لیپاز تولیدی در محیط کشت حاوی ٢,٧٤٪ شیره خرما، ١,٠٦٪ ترکیب عصاره مخمر و پپتون و ٢,٠٦٪ روغن زیتون پس از بهینه سازی توسط RSM بدست آمد. بازده تولید لیپاز تولید شده توسط *A.niger* در محیط حاوی شیره خرما پس از بهینه سازی ترکیبات محیط کشت بر حسب واحد آنزیم تولیدی به ازای یک لیتر محیط کشت برابر با U ١٠٢٠٠ و بازده تولید لیپاز توسط شیره خرما در این محیط برابر با ٣٧٢,٢٦ واحد به ازای هر گرم شیره خرمای مصرفی بود. بیشترین تولید آنزیم در ١٠٢ ساعت پس از کشت مشاهده شد. با توجه به نتایج بدست آمده ضایعات خرمای غیر فیبری (شیره خرما)، سوبسترای خوبی جهت تولید لیپاز می‌باشند. این نتیجه مشابه با مطالعات دیگری است که از ضایعات کشاورزی جهت تولید لیپاز استفاده کرده اند.

٥- منابع

[1] Burkert, J.F.M., Maugeri, F., and Rodrigues, M.I. 2004. Optimization of extracellular lipase production by Geotrichum sp. using factorial design . Bioresour. Technol. 91: 77–84.

[2] 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),203-8

[3] Damaso, M.C.T., Passianoto, M.A., Freitas, S.C., Freire, D.M.G., Lago, R.C.A., and Cour, S. 2008. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation . Brazilian Journal of Microbiology. 39 (4): 676–681.

[4] Adinarayana, K., Raju, K.V.V.S.N.B., Zargar, M.I., Devi, R.B., Lakshmi, P.J., and Ellaiah P. 2004. Optimization of process parameters for production of lipase in solid-state fermentation by newly isolated *Aspergillus* species. Indian J. Biotechnol. 3: 65–69.

[5] Mala, J. G. S., Edwinoliver, N. G., Kamini, N. R., and Puvanakrishnan, R. 2007. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from Aspergillus niger MTCC 2594. Journal of General and Applied Microbiology, 53, 247–253.

[6] Alkan, H., Baysal, Z., Uyar, F., and Dogru, M. 2007. Production of lipase by a newly isolated Bacillus coagulans under solid-statefermentation using melon waste.

[16] Kouker, G.,and Jaeger, K.1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases, *Appl. Environ. Microbiol. 53*, pp. 211–213.
[17] Parvaneh, v. 2006. Quality control and the chemical analysis of food. University of Tehran press.
[18] Miller G.L. 1959. Use of DinitrosaIicyIic Acid reagent for determination of reducing sugar. Analytic Chimistry.31 (3): 426- 428.
[19] Ota Y., and Yamada.K. 1966. Lipase from candida paralipolytica Part I. Anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyle alcohol. *Agric Biol Chem*. 30: 351-358.
[20] Acıkel, U., Ersana, M., and Ac¸ıkel, y.s. *2011*. The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. delemar*. Turk J Biol. 35 :35-44
[21] Hou, C.T., and T. Johnston. 1992. Screening of lipase activities with cultures from the agricultural research service Culture Collection. Journal of the American Oil Chemists' Society. 69: 1088-1097.
[22] Bornscheuer UT, editor. 2000.Enzymes in lipid modificationWeinheim: Wiley-VCH.
[23] Yadav, R.P., Saxena, R.K., Gupta, R.G and Davidson, W.S. 1998. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus. Biotechnol. Appl. Biochem*. 28: 243– 249.
[24] Sinnett, D., Richer, C., and Baccichet, A. 1998. Rapid Zymogram for Lipase. BioTechniques 24:754-756.
[25] Snellman, E.A., Sullivan, E.R., and Colwell, R.R. 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, Lip A, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. Eur J Biochem 269:5771–5779.
[26] Macris J.B., Kourentzi , E., and Hatzinikolaou, D.G. 1996. Studies on the localization and regulation of lipase production by Aspergillus niger. Process Biochem. 31:807–812.
[27] Mahadik, N.D., Puntambekar, U.S., Batawde, K.B., Khire, J.M., and Gokhale, D.V. 2002. Production of acidic lipase by Aspergillus niger in solid state fermentation. Process Biochem. 38:715–721.
[28] 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.
[29] Kaushik, R, Saran, S., Isar, J., Saxena, R. K. 2006. Statistical optimization of medium Applied Biochemistry and Biotechnology, 136: 183–192.
[7] Acıkel, U., Ersana, M., and Acıkel, y.s. 2010. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. food and bioproducts processing. 8: 31–39.
[8] 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.
[9] Farbeh, F., Rezazad Bari, M., and Alizadeh Khaledabad, M. 2010. Optimization of Pectinlyase Production from Date Pulp by *Aspergillus niger* Using Response Surface Methodology. Food Reserch. 3(2):13-22.
[10] Khosravi darani, K., Farhadi, Gh., Mohammadi Far, M., Hadian, Z., Sead Ahmadian, F., Camille Fnvd, R., Haj Seyed Javadi, N., Kohi Kamali, P., and Kamali, z. 2009. Comparison of xanthan production by *Xanthomonas campestris* in solid state fermentation and submerged in a laboratory scale. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology. 4 (1): 49-56.
[11] Moosavi Nasab, M., Askari, H., and Bakhtiyari, M. 2008. Production of curdlan biopolymer from Date fruit extract by *Agrobacterium radiobacter* and investigation of its rheological properties.18th National Congress on Food Technology.Mashhad. Iran.
[12] Davati, N., Hamidi Esfahani, Z., and Shojaosadati, S. A. 2010. Optimization of medium composition for microbial production of glutamic acid from Date fruit wastes using fractional factorial method. Food Science and Technology. 7(2): 61-66.
[13] He Y.Q., and Tan T.W. 2006. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99–125. J. Mol. Catal. B Enzym. 43:9–14.
[14] Kumar R., Mahajan S., Kumar A., Singh D. 2011. Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. New Biotechnol. 28:65–71.
[15] Ruchi G., Anshu G., and Khare S.K. 2008. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. Bioresour. Technol.99:4796–4802.

components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 40 :121–126.

[30] Abraham, S., Kamini, N. R., and Gowthaman, M. K. 2011. Process strategies for alkaline lipase production using *Aspergillus niger* MTCC 2594. Journal of Applied Pharmacy. 1(3): 126-133.

[31] Ohnishi, Y., Yoshida, J., and Sekiguchi, J. 1994. Lipase production of Aspergillus oryzae. Ferment. Bioeng. 77:490–495.

[32] 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.

[33] 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.

[34] Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta. R., Yadav, R. P., and Davidson, S. 1996. Microbial Lipases: Production and applications. *Sci Prog*, 79:119-157.

Optimization of culture medium containing date waste for lipase production by *Aspergillus niger* using RSM method

Ghamari, M. [1], Tabatabaei yazdi, F. [2*], Alemzade, I. [3], Vosooghi, M. [4], Varidi, M. [5], Safari, H. [6]

1. Ph.D. Graduated, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad
3. Professor, College of chemistry and oil engineer, Sharif University
4. Professor, College of chemistry and oil engineer, Sharif University
5. Assistant Professor, 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: 2014/12/16 Accepted: 2015/01/16)

Among the enzymes, lipases are an important group with wide applications in various industries. Different strains of A.niger have been widely studied for the production of extracellular lipase. The agar plate method for screening of lipase producing strain by olive oil / rhodamine B was used along with direct assessment of the enzyme solution. The best lipase producer strain was used for the study by submerged culture in medium containing date waste. RSM method was used to optimize the composition of the culture medium containing the carbon source, nitrogen source and lipase inducer. The highest lipase production was observed in medium containing 2.74% date waste, 1.06% yeast extract and peptone and 2.06% olive oil respectively. The yield of lipase produced by *A.niger* in culture medium containing date waste after optimization of medium components was equal to 10200 U in units of enzyme produced per liter of culture medium. The yield of lipase taken from date waste after optimization of medium components was equal to 372.26 units per gram of consumed date waste. The maximum enzyme production was observed at 102 hours of culture.

Keywords: Lipase, *A.niger*, RSM, Date waste

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