تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز از آب پنیر توسط مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس*

ناهید ابراهیمی[1]، فاطمه نجاتی[2]*

۱. دانش آموخته کارشناس ارشد صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

نویسنده مسئول: *nejati.iut3@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۶

چکیده

بتاگالاکتوزیداز یکی از آنزیم‌های صنعتی مهم است که قادر به تجزیه لاکتوز به گلوکز و فروکتوز است. در این مطالعه دو سویه از مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* (GY101 و BY101) جهت تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز، با استفاده از محیط کشت آب پنیر مورد بررسی قرار گرفتند. آب پنیر با هر یک از دو سویه تلقیح گردید و با هوادهی ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۴۴ ساعت از نظر تولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور افزایش تولید آنزیم، اثر افزودن عصاره مخمر (۰/۲ و ۰/۵ درصد)، سولفات منیزیم (۰/۵ درصد) و سولفات منگنز (۰/۵ درصد) در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت و در دماهای ۳۰ درجه سانتی گراد و ۳۷ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت و میزان فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. بیشترین تولید آنزیم پس از ۱۴۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد توسط سویه GY101 و BY101 با افزودن عصاره مخمر (۰/۵ درصد) به ترتیب ۲/۲۵ و U/mL ۲/۱۸ و با افزودن سولفات منیزیم به ترتیب ۲/۱۲ و U/mL ۱/۹۴ تعیین شد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، آب پنیر محیط مناسبی برای تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز توسط مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* در حضور عصاره مخمر و مکمل‌های سولفات منیزیم و منگنز است. دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بهترین دما برای تولید آنزیم در هر دو سویه مشخص شد و افزودن مکمل‌های معدنی و عصاره مخمر تأثیر مثبتی بر تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز دارد. در حالی که سویه GY101 نسبت به BY101 سویه مناسب‌تر و سولفات منیزیم نسبت به سولفات منگنز مکمل مناسب‌تری شناخته شد و با افزایش غلظت عصاره مخمر در محدوده مورد بررسی میزان فعالیت آنزیمی افزایش یافت.

واژگان کلیدی: مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس*، آنزیم بتاگالاکتوزیداز، آب پنیر، مکمل‌های معدنی، عصاره مخمر.

مقدمه

آنزیم‌ها ترکیباتی پروتئینی هستند که به‌منزله کاتالیزورهای حیاتی ممکن است سبب تغییرات مطلوب یا نامطلوب فیزیکی و شیمیایی در مواد غذایی شوند. آنزیم بتاگالاکتوزیداز از خانواده گلیکوزیل هیدرولازها است (EC: 23, 1, 2, 3) که قادر به هیدرولیز پیوندهای آلفا-دی گالاکتوزیدها، آلفا-ال آرابینوزیدها و آزاد کردن آن‌ها به هِمی استال است. وزن مولکولی این آنزیم تقریباً ۷۶ کیلودالتون و برای فعالیت، به یون‌های فلزی منیزیم، منگنز و پتاسیم نیاز دارد. این آنزیم از حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها به دست می‌آید و انواع میکروبی آن در مقایسه با منابع حیوانی و گیاهی به میزان بیشتری تولید می‌شوند و کاربرد زیادی در صنعت و فناوری دارند (Szczodrak, 2000). در سه دهه اخیر کاربرد بتاگالاکتوزیداز در هیدرولیز لاکتوز در صنعت محصولات لبنی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Mateo et al., 2007).

امروزه پساب کارخانه‌های تولیدکننده فرآورده‌های لبنی به‌ویژه صنایع پنیرسازی از دیدگاه زیست محیطی مسئله‌ای پر اهمیت محسوب می‌شود (Laxmi et al., 2011). آب پنیر یکی از محصولات جانبی کارخانه‌های لبنی است که باوجود ترکیبات مغذی متعدد در آن (لاکتوز، پروتئین، مواد معدنی، اسیدهای آلی، ویتامین) اغلب جزء ضایعات کارخانه‌ی لبنی به شمار می‌رود. لذا استفاده از سویه‌های میکروبی مناسب به‌منظور به‌کارگیری بهینه این منبع ارزان در جهت تولید انواع فرآورده‌های بیولوژیکی در کاهش هزینه‌های تولید و کاهش آلودگی‌های زیست محیطی امری ضروری است. با توجه به اینکه گونه‌های مختلف میکروبی قادر به تولید این آنزیم می‌باشند، انتخاب میکروارگانیسم

مناسب جهت تولید این آنزیم از بین گونه‌های بی‌خطر برای استفاده انسانی بسیار مهم است (Akcan, 2011). از این رو تحقیقاتی در زمینه تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز با به‌کارگیری پودر آب پنیر توسط میکروارگانیسم‌هایی نظیر *آسپرژیلوس اورایزا* (Santos et al., 2017)، *کلویورومایسس لاکتیس* (You et al., 2017)، *لاکتوباسیلوس روتری* (Li et al., 2015)، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* (Princely et al., 2013) و غیره، صورت گرفته است. *کلویورومایسس مارکسیانوس* یک میکروارگانیسم سالم و امن در صنعت غذا به شمار می‌رود (Belem and Lee, 1998) و با توجه به تحمل دامنه حرارتی بالا، سرعت بالای رشد اهمیت تکنولوژیکی بالایی دارد (Manera et al., 2008). این مخمر از جمله تولیدکنندگان آنزیم بتاگالاکتوزیداز در حضور لاکتوز گزارش شده است. از آنجا که تاکنون تحقیقی در رابطه با تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز توسط سویه‌های (BY101 و GY101) مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* از آب پنیر، به‌عنوان منبع لاکتوز صورت نگرفته است در این تحقیق به تولید و بررسی پارامترهای مؤثر بر تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز از آب پنیر توسط میکروارگانیسم‌های مذکور پرداخته شده است.

مواد و روش کار

در این مطالعه، جهت تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز از دو سویه BY101 و GY101 که بیشترین تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز را طی غربالگری اولیه نشان داده‌اند (نجاتی و همکاران، ۱۳۹۴)، استفاده شد. به‌منظور فعال‌سازی مخمرها از محیط کشت YPG براث حاوی ۱۰ گرم گلوکز، ۴ گرم عصاره مخمر و ۶ گرم پپتون در هر لیتر آب مقطر استفاده شد. آب پنیر مورد نیاز از کارخانه لبنیات شیمبار (شهرکرد، ایران) تهیه و در ظروف استیل در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری گردید. جهت استفاده، پس از رفع انجماد و یکنواخت کردن کامل آن، مقدار لازم از آب پنیر در ظرف استریل ریخته شد و در بن ماری ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه حرارت‌دهی گردید. در ادامه، ۵۰ میلی‌لیتر از آب پنیر خنک شده به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری استریل، منتقل و پس از تلقیح با مخمر (۲ درصد)، به‌منظور بررسی دمای مناسب تولید آنزیم، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یا ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور هوادهی ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۴۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت نمونه برداری انجام گردید (Virtanen et al., 2007) و آزمون‌های اندازه‌گیری پروتئین و فعالیت آنزیمی انجام شد.

بررسی اثر مکمل‌های معدنی و عصاره مخمر بر فعالیت آنزیم

در این مطالعه پس از بهینه‌سازی دما از عصاره مخمر (۰/۲ و ۰/۵ درصد)، سولفات منگنز (۰/۵ درصد) و سولفات منیزیم (۰/۵ درصد) به‌عنوان مکمل در افزایش تولید آنزیم استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم

مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های سانتریفوژ شده (۱۰۰۰ دور در دقیقه، ۵ دقیقه) به همراه ۱۵۰ میکرولیتر بافر به مدت ۵ دقیقه در هات‌پلیت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا (PNPG با غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به آن اضافه گردید و به محض ظهور رنگ زرد و ثابت شدن آن، میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۰/۱ مولار افزوده شد. پس از آن، جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل SUV۲۱۰۰، یونیک امریکا) در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نمونه شاهد به جای نمونه تخمیری از آب مقطر استفاده گردید. در نهایت میزان فعالیت آنزیم بر اساس یونیت در میلی‌لیتر (U/mL) گزارش گردید (Moller et al., 2008).

اندازه گیری پروتئین

برای سنجش پروتئین از روش برادفورد (کمپانی بایورد) استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول بایورد و ۷۸۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد و پس از ۱۵ دقیقه میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد و میزان پروتئین به‌صورت گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (Mohr et al. 2008).

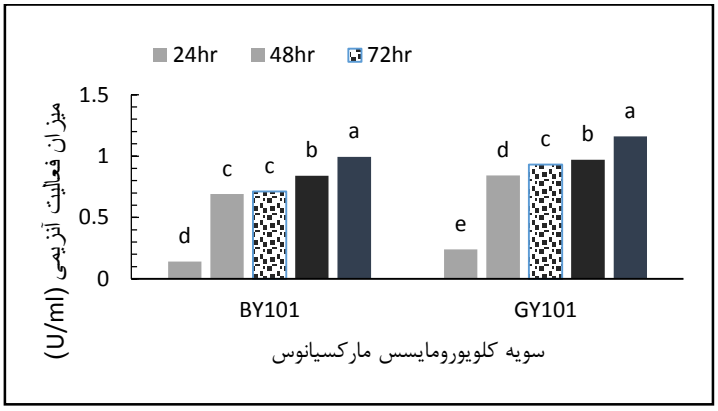
آنالیز آماری

در این مطالعه کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی و در ۳ تکرار انجام شد. میانگین‌ها با نرم‌افزار SPSS 21 و بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند. نمودارهای حاصل در نرم افزار Excel 2013 رسم گردید و مورد مقایسه و بررسی قرار گرفتند.

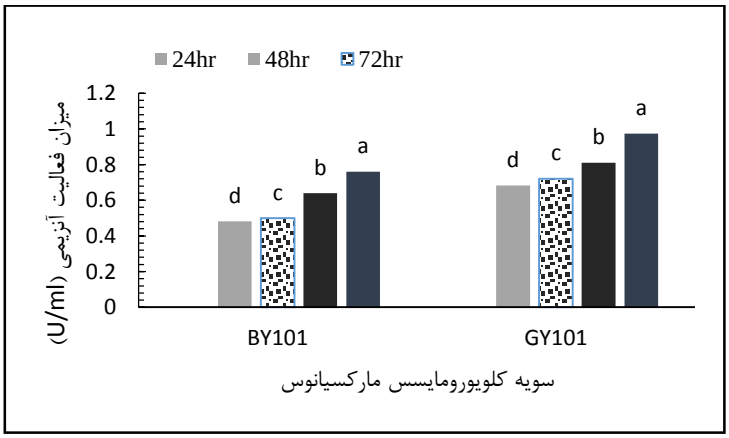
نتایج

اثر دما بر تغییرات فعالیت آنزیم

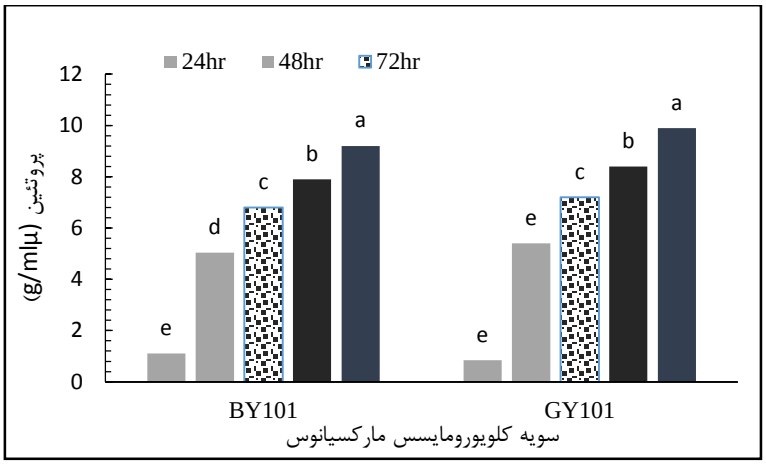
در بخش اول این مطالعه اثر دو دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر میزان تولید آنزیم در طی تخمیر بررسی و میزان پروتئین آن اندازه‌گیری شد. با افزایش دما میزان تولید پروتئین کاهش یافت و میزان فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف ارتباط معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$). به طوری که میزان فعالیت آنزیمی در ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای هر دو سویه نسبت به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مراتب بیشتر بود. نمودارهای ۱ و ۲ به ترتیب تأثیر دمای ۳۰ و ۳۷ درجه را بر تولید آنزیم نشان می‌دهند و نمودارهای ۳ و ۴ به ترتیب تأثیر دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد را بر تولید پروتئین نشان می‌دهند.



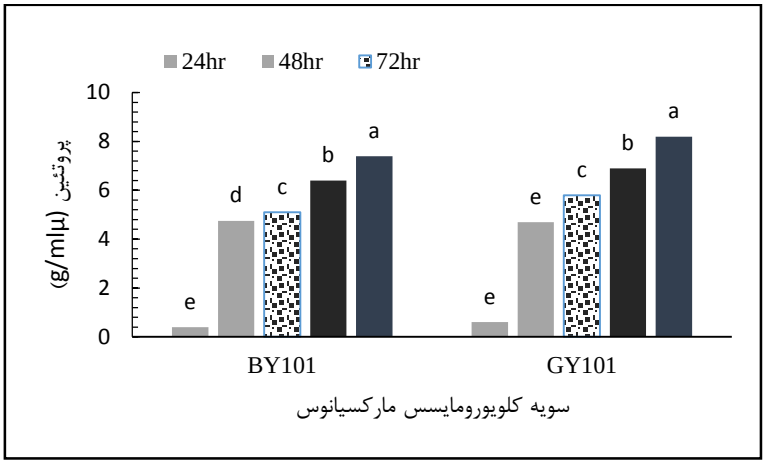
نمودار ۱. تأثیر دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز
*حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).



نمودار ۱. تأثیر دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز
*حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).



نمودار ۳. تأثیر دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر تولید پروتئین توسط آنزیم بتاگالاکتوزیداز
*حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).



نمودار ۴. تأثیر دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر تولید پروتئین توسط آنزیم بتاگالاکتوزیداز
*حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

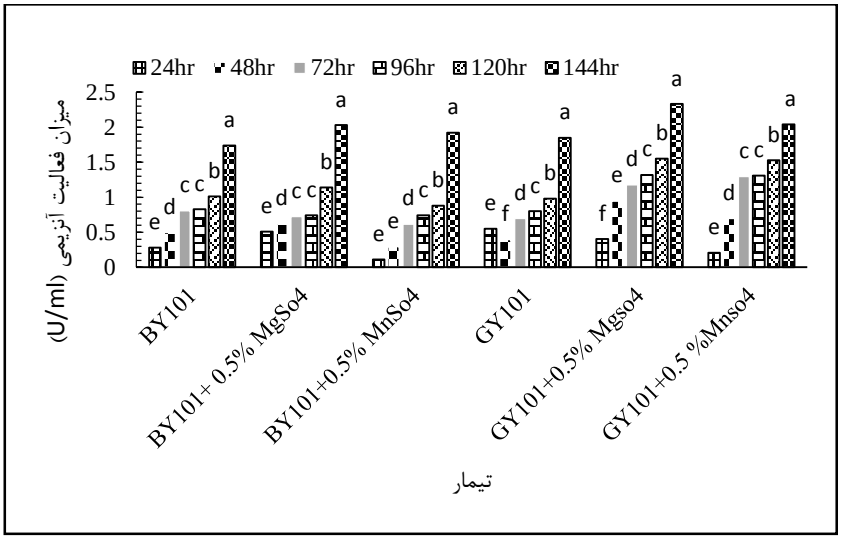
اثر مکمل‌های معدنی بر تولید آنزیم

نتایج نشان داد که افزودن مکمل‌های سولفات منگنز و سولفات منیزیم بر میزان افزایش فعالیت آنزیمی تأثیر معنی‌دار دارد (p<۰/۰۵). میزان فعالیت آنزیمی نمونه‌ها با افزودن مکمل‌های معدنی روند افزایشی داشت به طوری که پس از ۱۴۴ ساعت به بیشترین میزان خود رسید. در میان تیمارهای مورد مطالعه، تیمار GY101 حاوی مکمل سولفات منیزیم نسبت به تمامی تیمارها دارای بالاترین (۲/۱۲±۰/۲۱ U/mL) و پس از آن تیمار BY101 حاوی سولفات منیزیم (U/mL ۱/۹۴±۰/۱۹) بالاترین فعالیت آنزیمی را نشان داد و تیمار BY101 بدون مکمل معدنی کمترین (U/mL ۱/۵۵±۰/۱) میزان فعالیت آنزیمی را نشان دادند. بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق افزودن سولفات منیزیم نسبت به سولفات منگنز تأثیر بیشتری بر میزان فعالیت آنزیمی داشته است به طوری که با افزودن ۵ درصد وزنی سولفات منیزیم به محیط کشت GY101 پس از ۱۴۴ ساعت میزان فعالیت آنزیمی U/mL ۲/۱۲±۰/۲۱ و برای سولفات منگنز U/mL ۱/۹۱±۰/۰۹ بوده است (نمودار ۵).

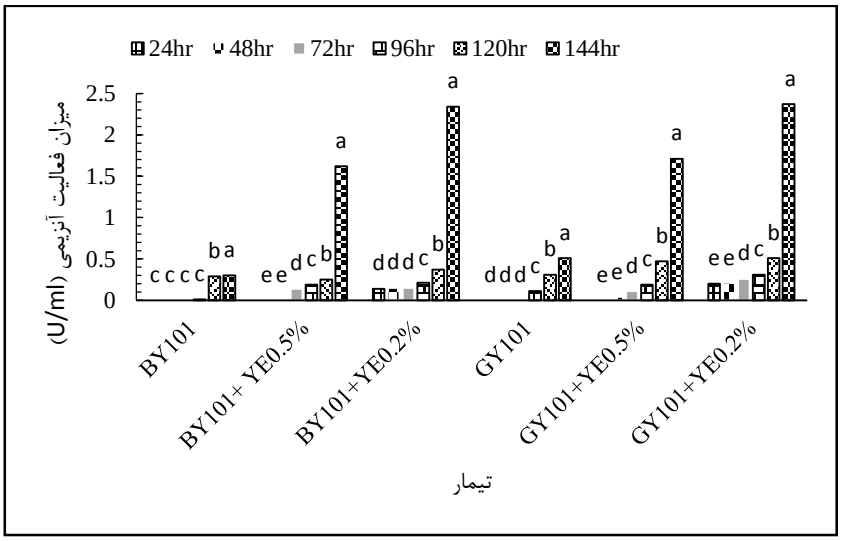
تأثیر عصاره مخمر بر تغییرات فعالیت آنزیم

نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف (۲/۰ و ۵/۰ درصد) عصاره مخمر بر روی فعالیت آنزیم تأثیر معنی‌دار دارد (p<۰/۰۵). همچنین، با افزایش میزان درصد عصاره مخمر از ۲/۰ درصد به ۵/۰ درصد، فعالیت آنزیمی پس از ۱۴۴

ساعت افزایش یافت به طوری که میزان فعالیت آنزیمی سویه GY101 حاوی ۲/۰ درصد بعد از ۱۴۴ ساعت، ۵۷/۰U/mL ±۶۵/۱ بود که با افزایش میزان عصاره به ۵/۰ درصد، میزان آن به ۲۵/۲ U/mL±۱۴/۰ افزایش یافت (نمودار ۶).



نمودار ۵. تأثیر افزودن ۰/۵ درصد وزنی سولفات منگنز ($MnSo_4$) و منیزیم سولفات ($MgSo_4$) بر فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز تولیدی توسط سویه‌های CY101 و BY101 از مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* در طی زمان
*حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).



نمودار ۶. تأثیر افزودن غلظت‌های مختلف (۰/۲ و ۰/۵ درصد وزنی) عصاره مخمر بر تغییرات فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز تولیدی توسط سویه‌های CY101 و BY101 از مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* در طی زمان
*حروف مختلف در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

بحث

یکی از موارد مهم در جهت ارزشمند نمودن پروسه تولید یک محصول بیولوژیک، مدت زمان بهینه و کوتاه برای تولید فرآورده و وجود بستر رشد مناسب برای میکروارگانیسم است؛ بنابراین یافتن گونه‌هایی که دارای توانایی بالقوه در این زمینه می‌باشند حائز اهمیت و مورد توجه است. این میکروارگانیسم‌ها دارای توانایی رقابت با سایر میکروارگانیسم‌های صنعتی می‌باشند، پس می‌توان با ادامه تحقیقات، آن‌ها را جایگزین

باکتری‌های استارتر نموده و پروسه تولید را از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نماییم. از آنجا که آنزیم بتاگالاکتوزیداز آنزیم‌های گران قیمت به شمار می‌رود و از سوی دیگر در سال‌های اخیر مصرف آن در صنعت لبنیات افزایش یافته است، استفاده از یک منبع ارزان مثل آب پنیر در فرآیند تولید آن حائز اهمیت است؛ بنابراین این مطالعه باهدف ایجاد شرایط بهینه برای مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* به‌منظور تولید آنزیم از آب پنیر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دو گونه مخمر GY10 و BY101 مورد مطالعه، در دماهای پائین، فعالیت بیشتری از خود نشان دادند و برای فعال‌سازی آن‌ها نیاز به حرارت بالا نیست؛ بنابراین از یک طرف باعث صرفه‌جوئی در انرژی و از طرف دیگر باعث افزایش فعالیت آنزیم گردید؛ بنابراین نتایج این بررسی بیانگر این است که استفاده از دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد و مکمل‌های منگنز و منیزیم سولفات ۰/۵ درصد، سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم به وسیله مخمر شده‌اند، به طوری که افزودن مکمل عصاره مخمر ۰/۵ درصد بعد از گذشت ۱۴۴ ساعت بالاترین تولید آنزیم را توسط مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* داشته است.

با مقایسه میزان فعالیت آنزیمی در دو دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد ارائه شده در نمودار ۱ و ۲ مربوط به هر سویه مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* به روشنی کاهش میزان تولید آنزیم با افزایش دما قابل ملاحظه است. همچنین مقایسه میزان فعالیت آنزیمی در نمودارهای ۱ و ۲ نشان دهنده این مطلب است که در هر دو دمای مورد بررسی و شرایط یکسان سویه GY101 فعالیت بالاتری نسبت به سویه BY101 در تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز نشان داده است. یائو و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت آنزیمی آنزیم فیتاز را در سه دمای ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد بررسی کردند، نتایج نشان داد که میزان تولید آنزیم با افزایش دما کاهش معنی‌داری دارد (Yao et al., 2012) که نتایج مطالعه حاضر نیز با نتایج به دست آمده از مطالعه یائو و همکاران مطابقت دارد. همچنین این نتایج با نتایج ریچاردسون و همکاران (۲۰۱۲) که بر روی جداسازی باکتری‌های تولید کننده آنزیم فیتاز و بهینه‌سازی تولید آنزیم کار کرده‌اند، مطابقت دارد. در این مطالعه آن‌ها تأثیر دما را برای تعیین بهترین سویه مورد بررسی قراردادند که نتایج آن‌ها نشان داد در دمای کمتر، سویه‌ها دارای فعالیت آنزیمی بالاتری نسبت به دماهای بالاتر هستند (Richardson et al., 2012).

نتایج بررسی میزان تولید پروتئین در دو دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان داد که میزان تولید پروتئین طی مدت زمان مورد بررسی روندی افزایشی داشته است. به طوری که پس از ۱۴۴ ساعت حداکثر مقدار پروتئین موجود در محلول مربوط به سویه GY101 و معادل ۹/۹ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است که نسبت به میزان پروتئین تولیدی توسط سویه BY101 در شرایط یکسان بیشتر بوده است. با مقایسه نمودارهای ۳ و ۴ می‌توان دریافت که با افزایش دما از ۳۰ به ۳۷ درجه میزان تولید پروتئین کاهش یافته است که این نشان دهنده تأثیر معنی‌دار دما بر روی میزان تولید پروتئین است. نتایج تحقیق صورت گرفته توسط زمانی (۱۳۷۹) جهت تعیین فاکتورهای بهینه در رشد مخمر *کلویورومایسس فراژیلیس* به‌منظور تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز نشان داد که دما، pH و سرعت هوادهی از جمله عوامل محیطی تأثیرگذار در راستای بهینه‌سازی محیط کشت هستند و شرایط بهینه رشد مخمر *کلویورومایسس فراژیلیس* به‌منظور تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز را دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH برابر با ۸/۶ و میزان هوادهی ۱۰۰ دور در دقیقه شناسایی نمودند. بالاترین مقدار بتاگالاکتوزیداز تولید شده توسط مخمر مورد استفاده، در محیطی شامل ۱۰ درصد لاکتوز به‌عنوان منبع کربن به دست آمد. نتایج این مطالعه همچون مقاله‌ی حاضر، نشان می‌دهد که تخمیر

در دمای کمتر باعث تولید فعالیت آنزیم بیشتری گردیده است.

بررسی تأثیر غنی‌سازی محیط کشت با ترکیبات معدنی مختلف بر میزان تولید آنزیم نشان‌دهنده روند افزایشی میزان فعالیت آنزیمی نمونه‌ها با افزودن مکمل‌های معدنی است به طوری که میزان فعالیت آنزیمی پس از ۱۴۴ ساعت به بیشترین میزان خود رسید و به‌کارگیری سولفات منیزیم نسبت به سولفات منگنز تأثیر بیشتری بر افزایش فعالیت آنزیمی داشته است. چی و زائو (۲۰۰۳) در بررسی شرایط بهینه برای تولید پلولان از مخمر *رودوتورولاباکاروم* به محیط کشت مورد استفاده ۸ درصد گلوکز، ۲ درصد سویای هیدرولیز شده، ۰/۵ درصد پتاسیم سولفات، ۰/۱ درصد نمک سدیم کلراید، ۰/۲ درصد منیزیم سولفات و ۰/۲۶ درصد آمونیوم سولفات اضافه نمودند. نتایج نشان داد که افزودن مکمل‌هایی همچون منگنز سولفات، گلوکز، سویای هیدرولیز شده، پتاسیم سولفات، سدیم کلراید، آمونیوم سولفات و منیزیم سولفات جهت تولید پولولان توسط مخمر نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری حاصل نموده است که این نتایج نیز با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (Chi and Zhao, 2003).

در بررسی تأثیر عصاره مخمر بر تغییرات فعالیت آنزیمی نتایج نشان داد که با افزایش میزان درصد عصاره مخمر از ۰/۲ درصد به ۰/۵ درصد میزان فعالیت آنزیمی افزایش یافته است که این نتایج نشان دهنده تأثیر مثبت افزودن عصاره بر میزان فعالیت آنزیمی است. همچنین مقایسه تأثیر عصاره مخمر (۵ درصد) بر تغییرات فعالیت آنزیمی با به‌کارگیری دو سویه مختلف نشان داد که پس از ۱۴۴ ساعت فعالیت آنزیمی در تیمار حاوی سویه GY101 نسبت به تیمار حاوی سویه BY101 بیشتر است. نتایج تحقیقات چی و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم آلکالین پروتئیناز توسط مخمر *آئروبازیدیوم پولولانس* نشان داد که با افزودن عصاره مخمر و افزایش درصد به‌کارگیری آن از ۲ به ۴ درصد، میزان تولید آنزیم افزایش می‌یابد (Chi et al., 2007). نتایج تحقیق حاضر نیز تولید بیشتر آنزیم را طی افزایش عصاره مخمر نشان داد. جوکار و همکاران (۱۳۸۳) مطالعه‌ای جهت تعیین شرایط بهینه تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز توسط *لاکتوباسیلوس دلبروکی* به‌منظور تولید شیر با لاکتوز هیدرولیز شده انجام دادند. نتایج نشان داد که عصاره مخمر و پودر آب پنیر بر میزان تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز تأثیر قابل ملاحظه‌ای دارد. همچنین محمدزاده و همکاران (۱۳۹۳) به بررسی سینتیک و بهینه‌سازی شرایط رشد مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* به‌منظور تولید بیوامولسیفایر مانان، با استفاده از پودر آب پنیر پرداختند. نتایج نشان داد بهینه‌سازی عوامل مؤثر با روش سطح پاسخ، شرایط مناسب تولید مانان را، با بیشینه ۲۰۹/۲۳ (میلی گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط) در غلظت‌های ۵۲/۶۰ گرم بر لیتر لاکتوز، ۱۰/۳۸ گرم بر لیتر عصاره مخمر، pH برابر ۵/۳۶ و دمای ۳۱/۹۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت بیشینه رشد ویژه ۰/۴۰۱ (بر ساعت) دارد.

نتیجه‌گیری

مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* در این تحقیق نشان داد که در حضور عصاره مخمر (۰/۵ درصد) و مکمل‌های سولفات منگنز و سولفات منیزیم (۰/۵ درصد)، توانایی بالایی برای تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز دارد. نتایج حاصله از آزمایش‌های صورت گرفته حاکی از آن بود که دو گونه مخمر GY101 و BY101 مورد مطالعه، در دماهای پایین، فعالیت بالاتری نسبت به دمای بالا از خود نشان دادند. بررسی اثر دما بر میزان تولید آنزیم نشان داد که میزان تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز با افزایش دما کاهش یافته است. همچنین افزودن مکمل‌های سولفات منگنز و سولفات منیزیم جهت تولید بتاگالاکتوزیداز توسط دو گونه مخمر GY10 و BY101 سبب افزایش معنی‌داری در تولید این آنزیم نسبت به نمونه شاهد گردید. در حالی

که مکمل منیزیم سولفات نسبت به سولفات منگنز اثر بیشتری بر افزایش فعالیت آنزیمی داشته است. بررسی‌ها نشان داد افزایش عصاره مخمر سبب تولید بیشتر آنزیم توسط هر دو گونه مخمر گردید و با افزایش درصد عصاره مخمر میزان فعالیت آنزیمی افزایش می‌یابد. نتایج این تحقیق نشان داد دو سویه GY10 و BY101 در حضور عصاره مخمر و مکمل‌هایی نظیر سولفات منیزیم و منگنز و در محیط آب پنیر به‌خوبی می‌تواند جهت تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز بکار گرفته شود.

منابع

۱. جوکار، ابوالفضل. (۱۳۸۳). تعیین شرایط بهینه تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز توسط *Lactobacillus delbroukii* به‌منظور تولید شیر با لاکتوز هیدرولیز شده، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.

۲. زمانی، فرزاد. (۱۳۷۹). تعیین فاکتورهای بهینه در رشد مخمر *Kluyveromyces frogilis* به‌منظور تولید آنزیم بتاگالاکتوسیداز، نخستین همایش سراسری دانشجویان مهندسی شیمی.

۳. محمدزاده، جلال.، طباطبایی یزدی، فریده.، مرتضوی، سیدعلی.، کدخدایی، رسول و کوچکی، آرش. (۱۳۹۳). بررسی مانوپروتئین استخراج شده از مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* بر شاخص‌های کیفی و پایداری امولسیون روغن در آب. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، جلد ۳، شماره ۴، صفحه ۳۴۶-۳۳۱.

۴. نجاتی، فاطمه.، فلیس، جوانا.، بابایی، مهدی.، فراچتی، فابیو.، تبالدی، مارتا.، توریانی، ساندرا.، تاجبخش، اشکان.، براتی، وحید و جلیل، سیروس. (۱۳۹۴). شناسایی ژنتیکی مخمرهای مقاوم به سیکلوهگزامید جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۱۲، شماره ۴۶، صفحه ۱۷۵-۱۶۷.

5. Akcan, N., 2011. High level production of extracellular-galactosidase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in submerged fermentation. African J Microb Res. 5(26): 4615-4621.

6. Belem, M.A., and Lee, B.H. 1998. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. Crit Rev Food Sci Nutr. 38: 565-98.

7. Chi, Z., Ma, C., Wang, P., and Li., F. 2007. Optimazation of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. Biores Tech. 98: 534-538.

8. Chi, Z., and Zhao, S. 2003. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan productionby a new pullulan-producing yeast strain. Enzyme Microb Tech. 33: 206 –211.

9. Laxmi, N.P., Mutamed, M.A. and Nagendra, P.S., 2011. Effect of nitrogen sources on production of β-galactosidase from Bifidobacterium animalis Bb12 and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ATCC 11842 grown in whey under different culture conditions. Int Food Res J. 18(1).

10. Li, M., Zhu, H., Qin, H., Zhang, Y. and Yang, H., 2015. Optimization of a whey containing medium for β-Galactosidase production by *Lactobacillus reuteri*. Adv in Appl Biotech. 599-608.

11. Manera, A.P., daCosta Ores, J., Ribeiro, V.A., Veiga Burkert, C.A., and Kalil, S.J. 2008. Optimization of the Culture Medium for the Production of β-Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. Food Tech Biotech. 46: 66-72.

12. Mateo, C. Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., and Fernandez-Lafuente, R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme and Microb Tech. 40: 1451-1463.

13. Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., and Schrezenmeir, J. 2008.

Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. Eur J Nutr. 47: 171-182.
14. Mohr,G., Del Campo, M., Mohr,S., Yang,Q., Jia,H., Jankowsky, E., Lambowitz, A. M. 2008. Function of the C-terminal domain of the DEAD-box protein Mss116p analyzed in vivo and in vitro. J Mol Biol. 375(5):1344-64.
15. Princely, S., Basha, N.S., Kirubakaran, J. J. and Dhanaraju, M. D., 2013. Biochemical characterization, partial purification, and production of an intracellular beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. Europ J Exp Biol. 3(2): 242-251.
16. Richardson, A. E., Hadobas, P. A., & Hayes, J. E., 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus phytase* from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. Plant J. 25(6): 641-649.
17. Santos, L.F.D., Gonçalves, C.M., Ishii, P.L. and Suguimoto, H.H., 2017. Deproteinization: an integrated-solution approach to increase efficiency in β-galactosidase production using cheese whey powder (CWP) solution. Rev Ambient Água. 12(4): 643-651.
18. Szczodrak, J. 2000. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β-galactosidase from Kluyveromyces fragilis. J Mol Catal B- Enzym. 10: 631-637.
19. Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., and Korhonen, H. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. J Appl Microb. 102: 106-115.
20. Yao, M.Z., Zhang, Y.H., Lu, W.L., Hu, M.Q., Wang, W., and Liang, A.H. 2012. Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. J Appl Microb. 112: 1-14.
21. You, S., Chang, H., Yin, Q., Qi, W., Wang, M., Su, R. and He, Z., 2017. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of β-galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. Bioresour Tech. 245: 1271-1276.

Production of β-galactosidase enzyme from whey using *Kluyveromyces marxianus*

Ebrahimi N[1], Nejati F[2*]

1. MSc Graduated of Food Sciences Department, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

***Corresponding author:** *nejati.iut3@gmail.com*

Received: 7 September 2017 Accepted: 7 November 2017

Abstract

Beta-galactosidase is one of the most important industrial enzymes capable of decomposing lactose into glucose and fructose. In this study, two strains of *Kluyveromyces marxianus* (GY101 and BY101) were investigated for the production of the β-galactosidase from whey as a culture media. Whey was inoculated with each strain and examined for enzyme production with aeration at 100 rpm for 144 hours. In order to increase the enzyme production, the effect of adding yeast extract (0.2 and 0.5%), magnesium sulfate (0.5%) and manganese sulfate (0.5%) at 24, 48, 96, 120 and 144 hours at 30°C and 37°C were investigated and the enzyme activity was measured. The highest enzyme production after 144 hours at 30°C with GY101 and BY101 strains by adding yeast extract (0.5%) were 2.25 and 2.18 U/ml, and with magnesium sulfate added 2.12 and 1.94 U/ml, respectively. According to the results of this study, whey cheese is an appropriate environment for the production of the β-galactosidase enzyme using *K. marxianus* with the presence of yeast extract and magnesium and manganese sulfate as supplements. The best temperature for the production of the enzyme in both strains was 30°C, and the addition of mineral supplements and yeast extract had a positive effect on the production of β-galactosidase. While the GY101 strain was more suitable than BY101 and magnesium sulfate was more suitable than manganese sulfate, and the enzyme activity increased with increasing yeast extract concentration.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, β-galactosidase enzyme, Whey, Mineral supplements, Yeast extract