Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Optimization of lipase enzyme activity and variables of fermentation conditions containing grape juice substrate in Aspergillus niger culture medium[1]

Nima Zargaran | Masters, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran. nimazargaran96@gmail.com
Reza Habibipour | Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran **(Corresponding author).** habiby.reza@gmail.com
Narges Ghobadi | Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran. nargesghobadi@gmail.com

Abstract

Objective: Lipase enzyme is one of the important enzymes in food, detergent and textile industries. Also, today, industries related to this enzyme such as processing of organic materials, synthesis of biosurfactants, beverages and cosmetic, pharmaceutical and food industries have expanded significantly. In this regard, the aim of the current research is to optimize the activity of lipase enzyme and the variables of fermentation conditions containing grape juice substrate in Aspergillus niger culture medium.

Materials and methods: In this research, for the first time, in order to achieve the maximum activity of the enzyme in the culture medium containing the carbon source of grape juice, the effective variables in the fermentation process of Aspergillus niger, i.e. temperature, acidity, concentration of grape juice and nitrogen source (yeast extract-peptone) with the help of Design Expert software was optimized.

Findings: The acidity equal to 7.5, the amount of concentration of grape juice and the combination of yeast extract and peptone (with a ratio of two to one) were obtained with 1.5 and 0.75%, respectively. Lipase activity after optimizing the conditions of the culture medium was equal to 17.694 U/ml.

Conclusion: Aspergillus niger records significant lipase activity in the culture medium with the factors of temperature, concentration of grape juice and yeast extract and peptone in its optimal amount and acidity equivalent to 7.5. Therefore, the carbon and nitrogen sources used in this research are suitable sources for use in the culture medium of this microorganism to produce lipase enzyme.

Keywords: Aspergillus niger, Lipase enzyme, Grape juice, Culture medium.

1. **Received:** 2021/12/30 ; **Received in revised form:** 2022/01/25 ; **Accepted:** 2022/03/05 ; **Published online:** 2022/03/21
© the authors http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir
Publisher: Qom Islamic Azad University **Article type:** Research Article

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۳۴۳۴-۲۵۳۸
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

بهینه‌سازی فعالیت آنزیم لیپاز و متغیرهای شرایط تخمیری حاوی سوبسترای شیره انگور در محیط کشت *آسپرژیلوس نایجر*[۱]

نیما زرگران | کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران. nimazargaran96@gmail.com
رضا حبیبی‌پور | دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران (نویسنده مسئول). habiby.reza@gmail.com
نرگس قبادی | استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران. nargesghobadi@gmail.com

چکیده

هدف: آنزیم لیپاز از آنزیم‌های با اهمیت در صنایع غذایی، مواد شوینده و نساجی می‌باشد. همچنین امروزه صنایع وابسته به این آنزیم نظیر فرآوری مواد آلی، سنتز بیوسورفکتنت‌ها، نوشیدنی‌ها و صنایع آرایشی، دارویی و غذایی گسترش چشمگیری داشته‌اند. در این راستا، هدف پژوهش حاضر بهینه‌سازی فعالیت آنزیم لیپاز و متغیرهای شرایط تخمیری حاوی سوبسترای شیره انگور در محیط کشت آسپرژیلوس نایجر است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش برای اولین بار جهت دستیابی به بیشترین فعالیت آنزیم در محیط کشت حاوی منبع کربنی شیره انگور، متغیرهای موثر در فرآیند تخمیر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* یعنی دما، اسیدیته، غلظت شیره انگور و منبع نیتروژنی (عصاره مخمر-پپتون) با کمک نرم‌افزار Design Expert بهینه‌سازی گردید.

یافته‌ها: اسیدیته معادل ۷/۵، مقدار غلظت شیره انگور و ترکیب عصاره مخمر و پپتون (با نسبت دو به یک) به ترتیب با میزان ۱/۵ و ۰/۷۵ درصد بدست آمد. فعالیت لیپاز پس از بهینه‌سازی شرایط محیط کشت برابر با ۱۷/۶۹۴ U/ml بود.

نتیجه‌گیری: *آسپرژیلوس نایجر* در محیط کشت با فاکتورهای دما، غلظت شیره انگور و عصاره مخمر و پپتون در میزان بهینه خود و اسیدیته معادل ۷/۵، فعالیت لیپاز قابل توجهی ثبت می‌نماید. بنابراین منابع کربنی و نیتروژنی بکار رفته در این پژوهش، منابع مناسبی برای استفاده در محیط کشت این میکروارگانیسم جهت تولید آنزیم لیپاز می‌باشند.

کلیدواژه‌ها: *آسپرژیلوس نایجر*، آنزیم لیپاز، شیره انگور، محیط کشت.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۴۰۰/۱۰/۰۹؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۰/۱۱/۰۵؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۱۲/۱۴؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۱/۰۱/۰۱
© نویسندگان **ناشر:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم **نوع مقاله:** مقاله پژوهشی

۱. مقدمه

لیپازها کربوکسی استرازهایی هستند که توانایی هیدرولیز آسیل گلیسیریدهای با زنجیره آسیل بیشتر از ۱۰ 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 غیرآبی را دارند (۲). لیپازها نوعی گلیکوپروتئین هستند که در بدن اغلب جانداران یافت می‌شوند. این آنزیم‌های محلول در آب، در متابولیسم تری گلیسریدها نقش دارند و موجب گوارش آن‌ها در بدن می‌شوند. لیپازها به عنوان مواد کاتالیستی که سرعت واکنش را افزایش می‌دهند، مورد توجه هستند (۳). همچنین از پرکاربردترین آنزیم‌هایی است که به عنوان بیوکاتالیست در صنایع مختلف، از جمله صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). در دو دهه اخیر توجه به لیپاز به علت کاربردهای گسترده آن در صنایع مختلف از قبیل صنایع غذایی، صنایع داروسازی، نساجی، محیط زیست و بیوسنسور، افزایش یافته است (۵). 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 اهمیت دارند (۶).

توجه به کاربردهای وسیع آنزیم لیپاز در صنایع مختلف و عدم تولید آن در کشور و صرف هزینه‌های هنگفتی که برای وارد کردن آن می‌شود، انجام تحقیقات مختلف در ابعاد گوناگون برای فراهم کردن زمینه تولید این آنزیم در داخل کشور و خودکفایی، ضروری به نظر می‌رسد (۷). باکتری‌ها و قارچ‌ها منابع اصلی تولیدکننده لیپاز به‌شمار می‌روند. هرچند قارچ‌ها و به خصوص مخمرها منابع بهتری برای تولید لیپاز هستند و برای کاربردهای صنعتی ترجیح داده می‌شوند (۸)؛ زیرا لیپازهای قارچی اغلب خارج از سلولی هستند و آسان‌تر از محیط تخمیر جداسازی می‌شوند (۹). گونه‌های وحشی تولیدکننده لیپاز اغلب لیپاز کمی را تولید می‌کنند. 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 (۱۰). ترکیب محیط کشت تخمیر تاثیر بسیار زیادی در میزان تولید آنزیم لیپاز دارد. بازدهی تولید لیپاز به شدت تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی قرار می‌گیرد که تغییرات منابع کربن و نیتروژن از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشند مطالعات نشان داده است که پپتون یک منبع نیتروژن بسیار بهتر از اوره و سولفات آمونیوم، برای تولید لیپاز است (۱۱).

با توجه به اینکه گونه‌های *آسپرژیلوس*، لیپازهای مختلفی را فراهم می‌آورند؛ بنابراین، خواص

آنزیمی متفاوتی از آن‌ها گزارش شده است (۱۲). متغیرهای متعدد محیطی و اثر تغییرات آن‌ها بر روی کیفیت و مقدار فعالیت آنزیم تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها، همواره مورد توجه کارشناسان و تولیدکنندگان آنزیم‌های صنعتی بوده است. یکی از روش‌های کنترل و تنظیم صحیح این متغیرها، بهره‌گیری از نرم‌افزارهای بهینه‌سازی است. به این ترتیب با بهینه‌سازی‌های نرم‌افزاری می‌توان محیط کشت‌های بازیافتی و ارزان را با ترکیب درصدهای بهینه برای رشد و فعالیت میکروارگانیسم مورد استفاده قرار داد (۱۳).

استفاده از موادی نظیر شیره گیاهان یا محصولات کشاورزی در دسترس به عنوان سوبسترای در محیط کشت میکروارگانیسم‌ها می‌تواند منجر به کاهش هزینه‌های تولید آنزیم شود. استفاده از شیره خرما به عنوان منبع کربن در محیط کشت *آسپرژیلوس نایجر* در گذشته سابقه مفید و موثری به همراه داشته است (۱۴). در نتیجه می‌توان گفت ترکیبات محیط کشت نقش مهمی را در تولید لیپاز ایفا می‌کنند. روش کلی بررسی حداکثر تولید لیپاز، بررسی تک‌تک فاکتورها بوده که هم نیازمند صرف وقت بسیار است و هم اثر متقابل فاکتورها را بیان نمی‌کند. در این پژوهش از روش طراحی CCD[1] جهت بررسی متغیرهای موثر بر فرآیند تولید آنزیم، میانکنش فاکتورهای مختلف و بدست آوردن ترکیبی بهینه از متغیرهای تحت آزمایش استفاده شده است. این مطالعه آماری اطلاعات کاربردی و ارزشمندی را در زمینه میانکنش بین فاکتورها به صورت دو به دو، جهت دستیابی به بیشترین فعالیت آنزیم لیپاز فراهم ساخته است (۱۵).

منابع کربنی و نیتروژنی مورد نیاز برای رشد و فعالیت میکروارگانیسم، میزان اسیدیته و دمای محیط در مقادیر بهینه جهت دستیابی به بیشترین فعالیت آنزیم لیپاز می‌بایست در چند سطح مختلف بررسی شود (۱).

انگور سرشار از ترکیبات مغذی است که نقش تغذیه‌ای، دارویی و درمانی و فرآورده‌های آن کاملاً شناخته شده است. ایران با تولید بیش از ۴ /۲ میلیون تن انگور در سال ۲۰۱۶، از عمده تولیدکنندگان این محصول ارزشمند در جهان محسوب می‌شود. انگور دارای ۷۹ درصد آب، ۱۴ درصد قندهای مختلف، املاح معدنی و مجموعه‌ای از عناصر و ترکیبات و املاحی مانند آهن، منیزیم، منگنز، کلر، ید، D، C، B، A سودمند است. انگور دارای ویتامین‌های آرسنیک، فسفر و سیلیس بوده و دارای

1. Central Composite Design

مقدار زیادی تانن می‌باشد. قند انگور به طور مستقیم و آسان وارد خون شده و در عضلات و کبد ذخیره می‌شود (۱۶). متغیرهای ذکر شده شامل منبع کربنی بوده که در این مطالعه، شیره انگور در نظر گرفته شده است؛ همچنین ترکیب عصاره مخمر و پپتون که (به ترتیب با نسبت دو به یک)، به عنوان منبع نیتروژنی انتخاب شده است (۱۷). شرایط کشت مانند دما و اسیدیته نیز به عنوان متغیرهای دیگر در روند بهینه‌سازی جهت دستیابی به بیشترین مقدار فعالیت لیپاز بررسی گردید (۱).

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. آماده‌سازی و نگهداری سویه

پژوهش حاضر پس تصویب در کمیته اخلاق با شناسه IR.IAU.H.REC.1400.006 انجام شد. میکروارگانیسم مورد مطالعه، *آسپرژیلوس نایجر MTCC 50101* از انستیتو پاستور تهیه گردید و پس از بررسی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی جهت تکثیر و نگهداری کوتاه مدت سوش مورد نظر، از محیط کشت SDA[1] استفاده شد. اسلنت‌ها در ۳۰ درجه سلسیوس به مدت پنج روز انکوبه شدند و سپس در یخچال (چهار درجه سلسیوس) تا زمان استفاده نگهداری شدند (۱۸). سپس نُه میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۱ درصد توئین ۸۰ (به منظور جداسازی بهتر اسپورها از یکدیگر و شمارش دقیق‌تر) به اسلنت پنج روزه اضافه شد و آن را تکان داده تا اسپورها در آب معلق شدند. در مرحله بعد، به کمک نئوبار، اسپورها در $۱/۵\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی لیتر برای تمام آزمایشات تنظیم شدند (۱۹ و ۲۰).

۲-۲. کشت در محیط بهینه شده

یک میلی لیتر سوسپانسیون اسپوری حاوی $۱/۵\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی لیتر به ۱۰۰ میلی لیتر محیط تخمیر در ارلن فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری تلقیح شدند، و در سه سطح مختلف از دما (۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس) و اسیدیته (۶، ۶/۷۵ و ۷/۵) از قبل تعیین شده، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. ترکیبات محیط کشت در حجم ۱۰۰ میلی لیتر که شامل مونو پتاسیم فسفات ۰/۲ درصد جرمی، منیزیوم سولفات ۰/۰۵ درصد جرمی و سه سطح مختلف از غلظت شیره انگور در سطوح ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد جرمی و منبع نیتروژن (ترکیبی از عصاره مخمر و پپتون

1. Sabouraud dextrose agar

به نسبت دو به یک) در سطوح ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ درصد و دو درصد از روغن زیتون به عنوان محرک آنزیمی تهیه شد. جهت جلوگیری از واکنش مایلارد قند به صورت جداگانه استریل شده و در موقع تلقیح به محیط کشت اصلی استریل شده اضافه گردید (۲۱).

۲-۳. استخراج و سنجش فعالیت لیپاز

جهت حذف میسیلیوم، محیط کشت با کاغذ واتمن فیلتر شد. سپس سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰rpm به مدت پنج دقیقه انجام شد. در مرحله بعد محلول جداسازی شده جهت سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (۲۲). فعالیت آنزیم لیپاز طبق روش تیترمتری به کمک pH متر، اندازه‌گیری شد تا میزان فعالیت نهایی آنزیم لیپاز بدست آمد. در این روش ۰/۵ میلی‌لیتر آنزیم (سوسپانسیون) به سه میلی‌لیتر بافر فسفات با اسیدیته شش و یک میلی‌لیتر پیش ماده روغن زیتون اضافه گردید و به مدت پنج دقیقه تکان داده شد. سپس با افزودن ۲۵ میلی لیتر استون-اتانول (۱:۱) واکنش متوقف گردید. اسیدهای چرب آزاد شده در برابر هیدروکسید پتاسیم ۰/۰۵ مولار تا اسیدیته ۱۰ تیتر شدند. یک لوله شاهد نیز به همین ترتیب تهیه گردید؛ با این تفاوت که به جای سوسپانسیون، از محیط کشت بدون میکروارگانیسم استفاده شد. یک واحد فعالیت لیپاز برابر است با مقدار آنزیمی که یک میکرومول اسید چرب را از پیش ماده در یک میلی‌لیتر در دقیقه تحت شرایط استاندارد سنجش آزاد کند (۲۳).

۲-٤. اندازه‌گیری توده سلولی

وزن خشک توده سلولی، با فیلتر کردن محیط کشت نمونه (با استفاده از کاغذ صافی و شستشوی مجدد برای اطمینان) جداسازی شده و سپس مواد فیلتر شده تا ۶۰ درجه سلسیوس جهت رسیدن به وزن ثابت، خشک شد و نتیجه به عنوان میزان وزن خشک توده سلولی برحسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر گزارش گردید (۲۴).

۳. یافته‌ها

فعالیت لیپاز ۳۰ تیمار در شرایط مختلف تخمیر، به منظور بهینه‌سازی محیط کشت در جدول (۱) قابل مشاهده است. شرایط تیمارها با نرم‌افزار دیزاین اکسپرت طراحی گردید تا با توجه به مقادیر فعالیت لیپاز در هر یک از تیمارها، معادله لازم جهت تعریف رابطه میان پارامترها و مقدار فعالیت لیپاز بدست آمد. معادله پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار، برای داده‌های این پژوهش طبق آنالیزهای نرم‌افزاری از نوع معادله درجه دوم می‌باشد. همچنین مقدار بایومس اندازه‌گیری شده به

منظور فعالیت شاهد در رابطه با این پژوهش نیز در جدول (۱) آمده است.

جدول ۱- مقادیر بایومس آسپرژیلس نایجر و اکتیویته آنزیم لیپاز درشرایط مختلف تخمیر

Std	Number	A: Temperature	B: pH	C: Carbon Source	D: Nitrogen Source	Lipase Activity (U/ml)	Biomass (g/100ml)
18	1	35	6.75	2	1	9	1.985
27	2	30	6.75	2	1	9	2.465
17	3	25	6.75	2	1	0.5	1.053
28	4	30	6.75	2	1	6.5	1.400
3	5	25	7.5	1.5	0.75	16.5	2.141
6	6	35	6	2.5	0.75	14	1.827
11	7	25	7.5	1.5	1.25	16	2.478
15	8	25	7.5	2.5	1.25	9	1.886
13	9	25	6	2.5	1.25	6	1.402
8	10	35	7.5	2.5	0.75	9	1.515
1	11	25	6	1.5	0.75	15	2.276
22	12	30	6.75	2.5	1	9	1.736
24	13	30	6.75	2	1.25	9.5	1.240
16	14	35	7.5	2.5	1.25	3	1.763
5	15	25	6	2.5	0.75	7.5	1.728
20	16	30	7.5	2	1	9.5	1.352
26	17	30	6.75	2	1	4.5	1.541
7	18	25	7.5	2.5	0.75	7	1.320
21	19	30	6.75	1.5	1	6	1.248
29	20	30	6.75	2	1	6	1.827
2	21	35	6	1.5	0.75	1.5	1.038
10	22	35	6	1.5	1.25	5.5	1.465
12	23	35	7.5	1.5	1.25	7.5	1.688
30	24	30	6.75	2	1	1.5	1.273
4	25	35	7.5	1.5	0.75	14.5	2.591
14	26	35	6	2.5	1.25	11.5	1.667
9	27	25	6	1.5	1.25	13	2.082
19	28	30	6	2	1	6.5	1.471
25	29	30	6.75	2	1	6	1.430
23	30	30	6.75	2	0.75	15	2.041

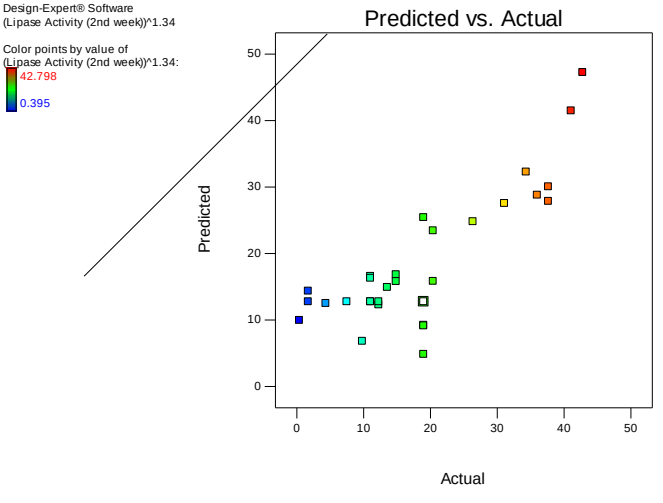
همان‌طور که در جدول (۲) آمده است، با توجه به آنالیز واریانس، ارزش P مدل، کوچک‌تر از ۰/۰۴ بوده که به معنی مناسب بودن مدل CCD برای پژوهش حاضر است. مقدار درجه آزادی برابر با ۱۴ نشان می‌دهد که مدل بدست آمده با ۱۴ جمله معنادار قابل تعریف است. بی‌معنی بودن مقدار Lack of Fit نشان می‌دهد که داده‌های پژوهش به طور کافی، با مدل کفایت دارند. همچنین مقادیر R^2، $R^2_{predicted}$، $R^2_{adjusted}$ و سایر اطلاعات آماری مدل در این جدول قابل مشاهده بوده و نشان‌دهنده کفایت کافی مدل است.

جدول ۲ – آنالیز واریانس مدل بدست آمده برای اکتیویته آنزیم لیپاز برحسب متغیرهای مورد مطالعه

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	P-Value	
Model	2962.21	14	211.59	2.45	0.0481	significant
Lack of Fit	1133.73	10	113.37	3.50	0.0896	not significant
Pure error	161.95	5	32.39			
Total error	4257.89	29				

$$R^2 = 0.6957 \; ; \; R^2_{adjusted} = 0.4117 \; ; \; R^2_{predicted} = 0.7056$$

با توجه به شکل (۱)، مقادیر پیش‌بینی شده در برابر مقادیر واقعی فعالیت لیپاز، پراکندگی مناسب بصری به همراه دارند. در نتیجه داده‌ها از کفایت آماری مناسبی برخوردار هستند.



شکل ۱ – نمودار میزان فعالیت آنزیم لیپاز پیش‌بینی شده نسبت به میزان اندازه‌گیری شده

شرایط انتخابی به عنوان نقطه بهینه‌شده هر چهار متغیر مورد بررسی در این پژوهش، مطابق با

جدول (۳) شامل دمای ۲۵ درجه سلسیوس، اسیدیته معادل ۷/۵، مقدار غلظت شیره انگور ۱/۵ درصد جرمی و غلظت عصاره مخمر و پپتون ۰/۷۵ درصد جرمی می‌باشد.

جدول ۳- شرایط بهینه برای تخمیر و تولید آنزیم لیپاز با استفاده از شیره انگور در محیط کشت قارچی

Number	Temperature (Celsius)	pH	Grape juice concentration (mass percentage)	Concentration of yeast extract and peptone (mass percentage)	Lipase activity (U/ml)	Desirability	
1	25	7.5	1.5	0.75	17.694	1	Selected

بیشترین فعالیت لیپاز در مقدار غلظت ۱/۵ درصد از شیره انگور بدست آمده که دلیل آن جذب سریع این قند توسط سویه مورد مطالعه می‌باشد. اصولاً در فرآیندهای تولید لیپاز، از محیط‌های کشت حاوی یک کربوهیدرات ساده یا پیچیده به عنوان منبع کربن استفاده می‌شود (۲۵). نتایج پژوهش حاضر با پژوهش‌های سنگل و بهبهانی (۲۷) از این نظر که سویه نایجر در حضور منابع کربنی بیشترین فعالیت لیپاز را حاصل می‌نماید، همسو می‌باشد (۲۶). قمری و همکاران غلظت بهینه گلوکز را در فرآیند تولید لیپاز ۲/۷۴ درصد گزارش کرده‌اند (۱۷). همچنین فالونی و همکاران بهترین غلظت گلوکز برای تولید لیپاز توسط *A.niger J-1* را دو درصد جرمی گزارش کردند (۲۷). نیتروژن یکی از سوبستراهای اصلی برای رشد میکروارگانیسم است که معمولاً از منابع طبیعی فراهم می‌گردد (۲۸). حداکثر فعالیت لیپاز در مقدار بهینه غلظت ۰/۷۵ درصد از عصاره مخمر و پپتون بدست آمد. افزایش منبع نیتروژنی تا مقادیر کم‌تر از یک درصد سبب افزایش تولید لیپاز (شیب مثبت) شد که پس از آن کاهش محسوسی قابل مشاهده است. با افزایش مقادیر شیره انگور و عصاره مخمر-پپتون، میزان فعالیت لیپاز کاهش می‌یابد؛ زیرا تراکم بالای توده سلولی، مانع هوارسانی مناسب می‌شود (۱۷). محققان در گذشته از منابع متعدد نیتروژنی جهت تولید لیپاز توسط آسپرژیلوس استفاده نمودند؛ به عنوان مثال یک درصد عصاره مخمر و دو درصد پلی پپتون (۲۹)، سه درصد پپتون (۲۷)، ۱/۵ درصد عصاره گوشت و ۰/۲۵ درصد اوره (۳۰)، یک درصد سولفات آمونیوم (۳۱). در دمای ۲۵ درجه سیلسیوس، بیشترین فعالیت لیپاز قابل ملاحظه است. آنزیم‌ها در دماهای مختلف، فعالیت آنزیمی متفاوتی از خود نشان می‌دهند، و در دماهای بالاتر ناپایدار هستند و فعالیت خود را از دست می‌دهند. دمای غیرفعال شدن آنزیم را همواره به تجزیه ساختار پروتئینی آنزیم نسبت می‌دهند (۳۲). قمری و همکاران، دمای ۳۰ درجه سلسیوس را به عنوان دمای بهینه با بیشترین فعالیت لیپاز معرفی کردند (۱۷). فعالیت آنزیم از میزان اسیدیته

محیط به صورت قابل توجهی تاثیر می‌پذیرد. این امر به این دلیل است که اتصال سوبسترا و کاتالیزور بیشتر به توزیع بار، هم بر روی سوبسترا و هم آنزیم بستگی دارد. توزیع بار بر پروتئین‌ها توسط حالت زنجیرهای قابل یونیزه در اسید آمینه‌های تشکیل‌دهنده آن‌ها تعیین می‌شود که این امر خود به اسیدیته بستگی دارد و می‌تواند به طور مستقیم بر اتصال سوبسترا و خاصیت کاتالیزوری تاثیر گذارد (۳۲). در این بررسی pH بهینه معادل ۷/۵، بیشترین فعالیت لیپاز را به همراه داشت. در تحقیقات متعدد مقادیر اسیدیته بهینه معادل ۷/۵ (۱۷)، ۷ (۳۳)، ۶/۸ (۳۴) و ۶ (۳۵ و ۳۶) ثبت شده است.

٤. نتیجه‌گیری

پس از بررسی شرایط محیط کشت نظیر دما، pH، غلظت شیره انگور و عصاره مخمر-پپتون جهت دستیابی به بیشترین فعالیت لیپاز تولید شده توسط *آسپرژیلوس نایجر* در محیط کشت حاوی شیره انگور بهینه شد. با استفاده از روش آماری، پاسخ عکس‌العمل سطح (RSM) با طرح CCD نتایج نشان داد دمای ۲۵ درجه سلسیوس، pH معادل ۷/۵، غلظت ۱/۵ درصد جرمی از شیره انگور (به عنوان منبع کربن) و ۰/۷۵ درصد جرمی از عصاره مخمر و پپتون (به عنوان منبع نیتروژن) بهترین نتیجه را از نظر فعالیت لیپاز به همراه دارد. راندمان فعالیت لیپاز در این محیط کشت به ازای یک لیتر محیط کشت برابر با ۱۷۶۹۴U بود. با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش و مطالعات آتی به نظر می‌رسد ضایعات میوه انگور، سوبسترای خوبی جهت تولید لیپاز می‌باشد.

References

1. Bussamara R, Fuentefria AM, Oliveira ESD, Broetto L, Simcikova M, Valente P, Schrank A & Vainstein MH. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*. 2010; 101: 268–2
2. Nwuche CO & Ogbonna, JCh. Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2011; 54(1): 113-116.
3. Whitaker JR, Voragen AG & Wong DW. *Handbook of food enzymology.* 1st ed., 2003.
4. Ghamari M, Tabataba I, Yazdi F, Alam Zadeh I, Vosoghi M, Varidi M & Safari H. Optimization of Physical Parameters effecting lipase production by *Aspergillus niger* PTCC 5010 in culture medium containing date waste and Studying the properties of the produced enzyme. *Food Science and Technology*. 2016; 13(57): 159-167. (In Persian)
5. Rekha KS & et al. Production and optimization of lipase from Candida rugosa using groundnut oil cake under solid state fermentation. *International Journal Research in Engineering and Technology*. 2012; 1(4): 571-577.
6. Thakur S. Lipases, its sources, properties and applications: A Review. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 2012; 3(7): 147-154
7. Ahmadpour F & et al. Cloning and expression of Bacillus pumilus lipase gene in Pichia pastoris. *Genetics in the Millennium*. 2012; 1: 2997-3.
8. Haliru M & Bukola Ch. Screening of microorganisms isolated from different environmental samples for extracellular lipase production. *Assumption University Journal of Technology*. 2012; 15(3): 179-186.
9. Tiwari P, Upadhyay MK, Silawat N & Verma HN. Optimization and characterization of a thermo tolerant lipase from *Cryptococcus albidus. Der pharma Chemica.* 2011; 3(4): 501-508.
10. Thabet HM, Pasha C, Ahmad MM & Linga VR. Isolation of Novel Lipases Producing Sporobolomyces salmonicolor OVS8 from oil mill spillage and enhancement of lipase production. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2012; 5(4): 301-306
11. Coelho MAZ, Amaral PFF & Belo I. Yarrowia lipolytica: an industrial workhorse. *Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotethnology*. 2010; 14: 930-944.
12. Ghamari M, Tabatabaie F, Alemzade I & Safari H. *Investigation of lipase properties of Aspergillus niger.* Food Science and Technology Research Institue; 2013.
13. Faostat F., Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017).
14. Ghamari M, Tabatabaie F, Alemzade I, Vosooghi M & Varidi M. Optimization of culture medium containing date waste for lipase production by *Aspergillus niger* using RSM method. *Food Science and Technology*. 2015; 14(65): 85-96
15. Fernández-Lorente G & et al. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng*. 2005; 92: 773-779.

16. Kazem NA & Salehi M. Introduction of Taguchi experimental design and a practical example. *Neda*. 2007; 1(2): 11-20. (In Persian)
17. Ghobadi N, Ogino C & Ohmura N. Characterizations of the Submerged Fermentation of *Aspergillus oryzae* Using a Fullzone Impeller in a Stirred Tank Bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016; 123(1): 1-8. **DOI:** 10.1016/j.jbiosc.2016.07.001
18. Elibol M & Ozer D. Influence of Oxygen Transfer on Lipase Production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem*. 2000; 36: 325-329.
19. Burkert JFM, Maugeri F & Rodrigues MI. Optimization of extracellular lipase production by Geotrichum sp. *Using factorial design. Bioresour. Technol*. 2004; 91: 77-84
20. Amoozegar MA & Saleh Ghamari E. Optimization of lipase production in *Salinivibrio* sp. SA2 by Taguchi design. *Nova Biol. Rep*. 2017; 3: 288-294.
21. Falony G, Armas JC, Dustet Mendoza JC & Martínez Hernández JL. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technol. Biotechnol*. 2006; 44(2): 235-240.
22. Plascencia-Jatomea M, Viniegra G, Olayo R, Castillo-Ortega MM, & Shirai K. Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*. 2003; 3(10): 582-586.
23. Parvaneh V. *Quality control and the chemical analysis of food*. University of Tehran press; 2006.
24. Adham NZ & Ahmed EM. Extracellular lipase of *Aspergillus niger* NRRL3 production, partial purification and properties. *Ind. J Microbiol*. 2009; 49: 77-83.
25. Acikel U, Ersana M & Acikel YS. The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R.delemar* . *Turk J Biol*. 2011; 35: 35-44.
26. Macris JB, Kourentzi E & Hatzinikolaou DG. Studies on the localization and regulation of lipase production by Aspergillus niger. *Process Biochem*. 1996; 31: 807-812.
27. Sangal A & Behbahani M. Isolation and optimization of pectinase production of a useful industrial enzyme from Aspergillus niger, Rhizopus ores and Penicillium chrysogenum. *Biology of microorganisms*. 2016; 5(17): 121-140
28. Pimentel M & et al. Lipase from a Brazilian strain of Penicillium citrinum. *Applied biochemistry and biotechnology*.1994; 49(1): 59-74.
29. Onishi Y, Yoshida J & Sekiguchi J. Lipase production of Aspergillus oryzae. *Ferment. Bioeng*. 1994; 77: 490-495.
30. Abraham S, Kamini NR & Gowthaman MK. Process strategies for alkaline lipase production using Aspergillus niger MTCC 2594. *Journal of Applied pharmacy*. 2022; 1(3): 126-133.
31. Bornscheuer UT (ed.). *Enzymes in lipid modification Weinheim*. Wiley-VCH; 2000.
32. Banu A, Kalpana M, Gnanaprabhal RG, Pradeep VB & Palaniswamy M. Production and characterization of pectinase enzyme from *penicillium chrysogenum*. *Indian Journal of Science and Technology*. 2012; 3(4): 377-81.
33. Huwang F, Kim KS, Zimmerman W & Fiechter A. Pectinolytic enzymes from

actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Apply Environment*. *Microbiology.* 1994; 60(7): 2107-12.

34. Naghavi NS & et al. Optimization of exopectinase activity of Monilia isolated from tangerine in immersed fermentation. *Biology of microorganisms*. 2012; 1(1): 23-30
35. Reddy LP & Sreeramulu A. Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of chitoor district. *Int J Life Sc Bt & pharm Res*. 2012; 1: 186-93.
36. Ardestani F & Businessman R. Simulation of protozoan protein production process from Aspergillus niger based on non-structural kinetic models. *Quarterly Journal of Food Science and Technology*. 2015; 4: 308-319.