SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

Archive of SID

اولین همایش ملی میان وعده های غذایی
مشهد مقدس - ۱۰ و ۱۱ اردیبهشت ماه ۱۳۹۳

بررسی خصوصیات لیپاز حاصل از آسپرژیلوس نایجر

مهدیه قمری[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۲] ، ایران عالم زاده[۳]، هانیه صفری[۴]

[۱]دانشجوی دکترای صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد *(m_ghamary85@yahoo.com)*

[۲]هیئت علمی دانشکده کشاورزی، گروه صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد *(tabatabai@ferdowsi.um.ac.ir)*

[۳]هیئت علمی دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف *(alemzadeh@sharif.edu)*

[۴]دنشجوی کارشناسی مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف *(hsafari92@gmail.com)*

چکیده

لیپازها دسته مهمی از آنزیم ها در صنایع غذایی با کاربردهای ویژه می باشند.در میان میکروارگانیسم های مختلف تولید کننده این آنزیم کپک آسپرژی‌لوس نایجر به دلیل ایمنی تولیدات آن در صنایع غذایی و دارویی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این بررسی ۳ سویه مختلف آسپرژیلوس نایجر جهت تولید آنزیم لیپاز مورد بررسی قرار گرفت . شناسایی بهترین سویه به صورت کشت در پلیت حاوی آگار روغن زیتون /رودامین B و همچنین ارزیابی مستقیم محلول آنزیمی صورت گرفت و بهترین سویه جهت بهینه سازی شرایط تولید لیپاز انتخاب گردید . دو خصوصیت فعالیت و پایداری آنزیم در pH های مختلف و همچنین در دماهای مختلف، مورد بررسی قرار گرفت . این لیپاز دارای بیشترین فعالیت در pH ۷ و پایداری آنزیم در ش رایط اسیدی می باشد . فعالیت لیپاز در دمای حدود ۳۵ درجه سانتیگراد بهینه بود و پایداری آن در دماهای بالا کاهش می یابد.

واژه های کلیدی : لیپاز، آسپرژیلوس نایجر، غربالگری سویه، خصوصیات آنزیم

مقدمه

لیپازها یا تری آسیل گلیسرول هیدرولازها (EC 3.1.1.3)، آنزیم هایی هستند که علاوه بر هیدرولیز تری گلیسریدها در حد فاصل فاز آب-چربی، در محیط های با محتوای آب کم، واکنش معکوس یعنی سنتز استرها را

www.SID.ir

Archive of SID

نیز کاتالیز می کنند [۱]. امروزه، لیپازهای میکروبی، کاربردهای وسیعی در صنایع غذایی و دارویی، سنتز ترکیبات آلی و فرمولاسیون دترجنت ها دارند و بعنوان سومین آنزیم های مهم صنعتی در بیوتکنولوژی مطرح هستند.
لیپاز در حیوانات، گیاهان و میکرو ارگانیسم یافت می شود. قارچ های رشته ای به عنوان بهترین تولید کنندگان لیپاز شناخته شده اند و در حال حاضر بدلیل تولید لیپاز خارج سلولی و تسهیل است خراج از محیط کشت منابع ترجیح داده شده می باشند. لیپاز حاصل از گونه آسپرژیلوس نایجر به دلیل قرار گرفتن در لیست گرس و غیر پاتوژنی آنها جهت کاربرد در صنایع غذایی و داراویی دارای اهمیت می باشند [۲].
لیپازها دارای طیف وسیعی از خصوصیات کاتالیستی می باشند که به ط ور زیادی وابسته به سویه تولید کننده آنها می باشد. خصوصیات کاربردی همانند pH بهینه، دمای بهینه و پایداری در برابر pH ها و دماهای گوناگون سبب کاربرد آنها در صنایع مختلف می گردد.
در این مطالعه هدف، غربالگری بهترین سویه آسپرژیلوس نایجر از نظر تولید میزان لیپاز و بررسی خصوصیات لیپاز حاصل از سویه انتخاب شده است.

مواد و روش ها

میکروارگانیسم مورد استفاده و محیط کشت نگهداری : در این پژوهش ۳ سویه میکروبی تولید کننده لیپاز از کپک آسپرژیلوس نایجر با شماره PTCC ۵۰۱۰، PTCC ۵۰۱۲، PTCC ۵۱۶۲، از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. بعد از باز کردن آمپول میکروبی، جهت تکثیر و نگهداری کوتاه مدت سوش از محیط PDA استفاده شد. اسلنت های تهیه شده در ۴ درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری شدند . به منظور جلوگیری از کاهش فعالیت سوش و آلودگیهای احتمالی، هر ماه ی کبار اسلنتهای جدیدی از آن تهیه گردید.

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) ۲٪ و رودامین B (w/v) ۰.۱٪ انجام پذیرفت. بعد از ۴ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، 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 [۳].

کشت میکروبی و تولید آنزیم: ۱ میلی لیتر سوسپانسیون اسپوری حاوی 10^7 اسپور در میلی لیتر به ۱۰۰ میلی لیتر محیط تخمیر در ارلن فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری تلقیح گردید . محیط کشت حاوی گلوکز، مخلوط عصاره مخمر و پپتون، روغن زیتون، KH_2PO_4 و $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ به ترتیب میزان ۲، ۱، ۲، ۰.۲ و ۰.۰۵ ٪ بود. جهت جلوگیری از واکنش مایلارد قند به صورت جداگانه استریل شده و در م وقع تلقیح به محیط کشت اصلی استریل شده، اضافه می گردد. شرایط کشت نیز شامل دما ۳۰°C، زمان ۵ روز، سرعت همزدن ۱۸۰ rpm، pH=۷ می باشد.

استخراج لیپاز: جهت حذف میسیلیوم محیط کشت با کاغذ واتمن فیلتر می گردد، سپس سانتریفوژ با سرعت rpm ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام می گردد. در مرحله بعد محلول رویی جهت سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار می گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش فعالیت آنزیم: فعالیت آنزیم لیپاز طبق روش یامادا و همکاران اندازه گرفته شد[۴]. 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[1] و اسید چرب آزاد شده، سید اولئیک است).

بررسی خصوصیات آنزیم لیپاز

اثر دما: جهت بررسی اثر دما روی فعالیت لیپاز، واکنش تعیین فعالیت در رنج دمایی ۲۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد انجام شد.

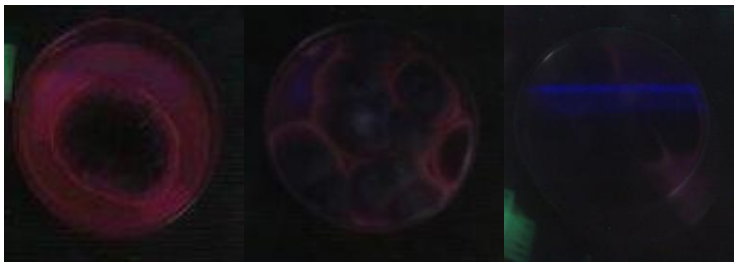
اثر pH: برای مطالعه اثر pH فعالیت لیپاز در pH های مختلف در رنج ۳ تا ۹ اندازه گیری گردید. pH مخلوط های واکنش با استفاده از بافرهای مختلف تهیه گردید (بافر سیترات برای pH=۳-۶، بافر فسفات برای pH =۷-۸ و بافر بورات برای pH=۹-۱۰).

پایداری دمایی و پایداری در برابر pH : جهت بررسی پایداری دمایی، آنزیم استخراج شده در دماهای ۲۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد برای ۲۴ ساعت قرار گرفت . پس از انکوباسیون، به سرعت آنزیم در حمام یخ برای ۱۵ دقیقه خنک شده و فعالیت باقیمانده تعیین می گردد. جهت بررسی پایداری در برابر pH، آنزیم استخراج شده در محلول بافری در مقادیر مختلف pH در رنج ۴ تا ۱۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردید.

بحث و نتایج

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 ردامین B به رنگ صورتی دیده می شوند. رشد میکروارگانیسم و ترشح لیپاز به محیط کشت سبب هیدرولیز سوبسترا و واکنش آن با ردامین B و تشکیلهاله 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 آسپرژیلوس نایجر PTCC ۵۰۱۰ و کمترین هاله در سویه PTCC ۵۰۱۲ می باشد (شکل ۱).



شکل۱. هاله فلورسانس در اثر فعالیت لیپولیتیکی *A. niger* روی پلیت آگار روغن زیتون/رودامین B. از چپ به راست به ترتیب سویه ۵۰۱۰،۵۱۶۲ و ۵۰۱۲ مشاهده می شود.

[1] PVA

www.SID.ir

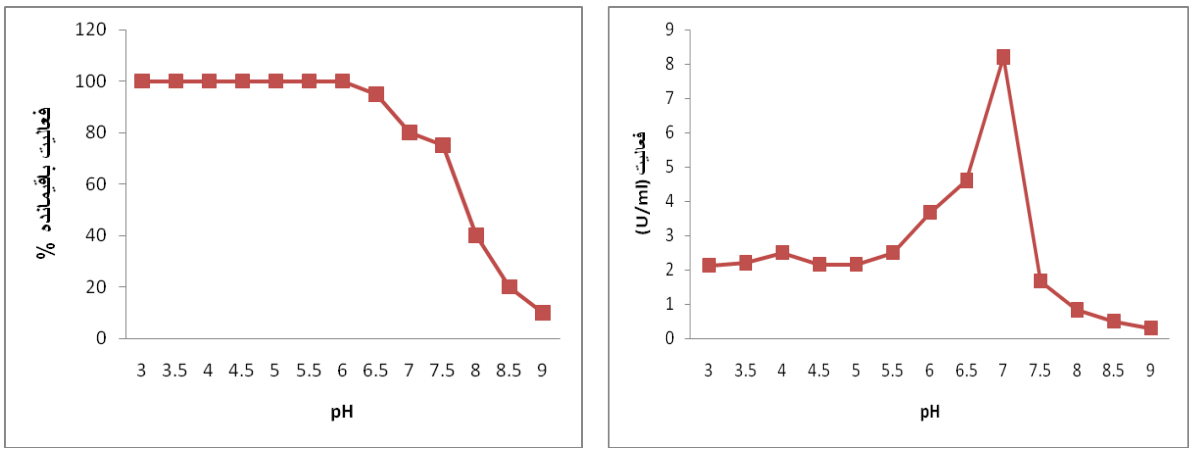
Archive of SID

در مرحله دوم جهت شنا سایی بهترین سوش ، کشت میکروبی درون ارلن انجام گرفت و پس از استخراج محلول آنزیمی خام،فعالیت آنزیمی بدست آمد. سوش *A.niger* PTCC5010 با فعالیت ۸U/ml دارای بیشترین فعالیت و سوش های PTCC5162 و PTCC 5012 به ترتیب دارای فعالیت های U/ml ۵ و ۲ بودند. بنابراین با توجه به نتایج دو مرحله غربالگری سوش *A.niger* PTCC5010 به عنوان بیشترین تولید کننده آنزیم لیپاز جهت بررسی های بعدی انتخاب گردید.

بررسی خصوصیات آنزیم

اثر pH و پایداری در برابر pH آنزیم استخراج شده : ارزیابی فعالیت آنزیم لیپاز در شرایط مختلف pH انجام گرفت و نتایج در نمودار۱ مشاهده می شود. فعالیت بهینه آنزیم استخراج شده در ۷ =pH مشاهده گردید و به طور کلی فعالیت این لیپاز در شرایط اسیدی بیشتر از شرایط قلیایی است. این نتیجه مشابه نتایج *A. niger* MTCC 2594 می باشد که برابر ۷ گزارش شده است [۵]. همچنین ادهم و احمد pH بهینه برای فعالیت لیپاز حاصل از *A. niger NRRL3* را در حدود ۷.۲ [۶] و فالونی و همکاران برای A. niger J-1، ۶.۵ را گزارش نموده اند [۷].

همانطور که در نمودار ۱(سمت چپ) مشاهده می شود ، فعالیت باقیمانده پس از گذشت ۱ ساعت در pH های اسیدی تا حدود ۷ نزدیک به ۱۰۰٪ می باشد ولی در۸ =pH تنها ۴۰٪ فعالیت باقیمانده است. در نتیجه این آنزیم در شرایط اسیدی پایداری مطلوبی دارد.



نمودار۱. اثر pH روی فعالیت لیپاز (نمودار سمت راست) و اثر pH روی فعالیت باقیمانده لیپاز(نمودار سمت چپ).

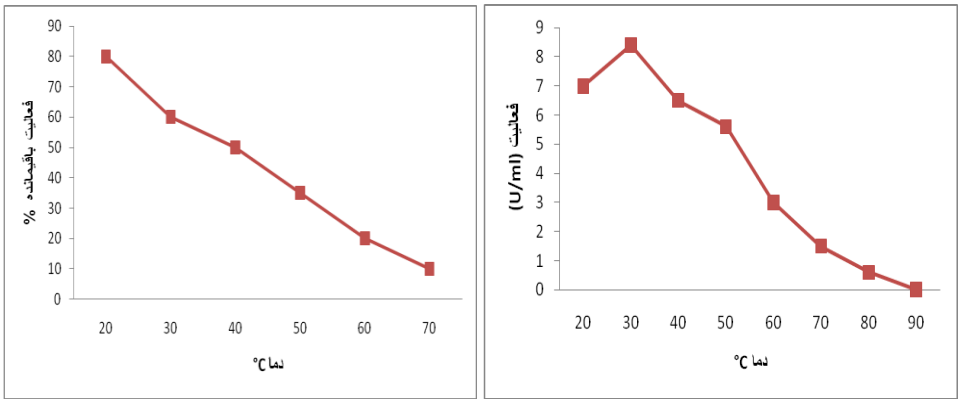
اثر دما و پایداری دمایی آنزیم استخراج شده:

فعالیت لیپاز در رنج دمایی ۲۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین فعالیت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد مشاهده گردید (نمودار ۲. سمت راست). دمای بهینه برای A. niger J-1، ۴۰ °C و برای *A. niger* MYA 135 ۳۰-۳۵°C گزارش گردید [۷ و ۸].

پایداری آنزیم لیپاز حاصل از *A. niger* PTCC 5010 با افزایش دما به شدت کاهش می یابد . به طوریکه تا ۲۵ °C ۷۵٪ فعالیت باقیمانده و در دمای ۴۰ °C نیمی از فعالیت از دست رفته است . نتایج مشابه ای برای لیپاز های قارچی دیگر گزارش شده است [9 و 10]. این خصوصیات لیپاز حاصل را جهت استفاده در کارخانجات چای سازی مناسب می سازد، زیرا در آنجا واکنش در دمای ۱۵ °C تا ۲۰ و pH نسبتاً اسیدی انجام می گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۲. اثر دما روی فعالیت لیپاز (نمودار سمت راست) و اثر دما بر فعالیت باقیمانده لیپاز (نمودار سمت چپ).

نتیجه‌گیری

از میان ۳ سویه آسپرژیلوس نایجر با شماره PTCC ۵۰۱۰، PTCC ۵۰۱۲ و PTCC ۵۱۶۲، پس از دو مرحله غربالگری توسط پلیت آگار روغن زیتون / رودامین B و همچنین ارزیابی مسقیم آنزیم خام استخراج شده از محیط کشت، آسپرژیلوس نایجر با شماره PTCC ۵۰۱۰ با داشتن قطر هاله فلورسانس بیشتر در پ لیت و فعالیت U/ml ۸ انتخاب گردید. بررسی خصوصیات این نوع لیپاز نشان دهنده دارا بودن حداکثر فعالیت در pH خنثی و تحمل بالا در برابر شرایط اسیدی می باشد. فعالیت بهینه این لیپاز در دمای °C ۳۰ و پایداری آن در دماهای پایین می باشد.

مراجع

.[1] Zhang, L.Q., Zhang, Y.D., Xu, L., Li, X.L., Yang, X.C., Xu, G.L., Wu, X.X., Gao, H.D., Du, W.B., Zhang, X.T., and Zhang, X.Z.,2001. Lipase catalyzed synthesis of RDG diamide in aqueous water miscible organic solvents. *Enzyme Microb. Technol. 29*, pp. 129–135.

[2] Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C. , and van Dijck, P.W.M., 2002. On the safety of *Aspergillus niger* – A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol. 59*,pp. 426–435.

[3] Kouker, G.,and Jaeger, K., 1966. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases, *Appl. Environ. Microbiol. 53*, pp. 211–213.

[4] 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, pp. 351-358

[5] Kamini, N.R., Mala, J.G.S., and Puvanakrishnan, R., 1998. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake, *Process Biochem. 33*,pp. 505–511.

[6]Adham, N.Z., and Ahmed, E.M., 2009. Extracellular lipase of Aspergillus niger NRRL3 production, partial purification and properties. *Ind. J Microbiol*, 49, pp.77–83.

[7]. 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), pp, 235-240.

[8] 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), pp.247-252.

www.SID.ir

Archive of SID

[9] Mozaffar, Z., Weete, J.D., 1993. Purification and properties of an extracellular lipase from *Pythium ultimum*, *Lipids*, *28*, pp. 377–392

[10] Phillips, A., and Pretorius, G.H.J., 1991. Purification and characterization of an extracellular lipase of *Galactomyces geotrichum*, *Biotechnol. Lett. 13*, pp. 833–838.

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI