

تحلیل آماری و بهینه سازی شرایط عملیاتی تولید آنزیم لیپاز از قارچ رایزوپوس اوریزا

شبنم قنبرزاده، مهسا اسماعیل زاده، زینب صالحی⁺، پژمان قلیچ

آزمایشگاه آموزشی - تحقیقاتی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران تهران، ایران

چکیده: در این بررسی به منظور بهینه سازی تولید آنزیم لیپاز به وسیله قارچ رایزوپوس اوریزا در محیط کشت مایع، طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ با استفاده از نقطه مرکزی توسط نرم افزار Design Expert 7.0.0، به کار گرفته شد. در این فرایند، برای بهینه سازی با انتخاب متغیرهای نسبت جرمی منبع کربنی به نیتروژنی (C/N)، دور چرخش (دور بر دقیقه، rpm) و پی اچ اولیه (pH) در بازه تغییرها به ترتیب (۰.۲-۱)، (۱۰۰-۲۵۰) و (۵-۸) شد. آزمایش‌ها با استفاده از محرک روغن زیتون (به عنوان منبع کربنی) و در دمای ثابت ۳۲ درجه سلسیوس انجام گرفت. میزان فعالیت آنزیم لیپاز تولید شده با استفاده از روش تیتراسیون اسیدهای چرب آزاد به وسیله سود ۰/۱ مولار سنجش، و جرم توده زیستی نیز محاسبه شد (هدف اندازه گیری فعالیت آنزیم و جرم توده زیستی تولیدی بعد از ۴۸ و ۹۶ ساعت). تحلیل آماری داده‌های تجربی به دست آمده از اندازه گیری فعالیت آنزیم لیپاز منجر به ارایه مدل برازش با اطمینان ۹۵٪، برای فعالیت آنزیم پس از مدت کشت ۴۸ ساعت شد، که بیانگر تأثیر دلخواه افزایش دور همزن و بازی بودن محیط و همچنین نشانگر تأثیر دلخواه افزایش دور همزن و کاهش نسبت جرمی منبع کربنی به نیتروژنی برای فعالیت آنزیم لیپاز پس از مدت کشت ۹۶ ساعت می باشد. شرایط بهینه جهت تولید آنزیم لیپاز، به ترتیب برای مدت کشت بعد از ۴۸ و ۹۶ ساعت، در نسبت جرمی منبع کربنی به نیتروژنی (۰/۲)، دور چرخش (۱۰۰) و پی اچ اولیه (۸)، با تولید بیشترین فعالیت برون سلولی آنزیم لیپاز (۴/۸۰۹ و ۲/۴۸ U/mL) به دست آمد که نسبت به پژوهش‌های همانند پیشین فرایند کارآمدتری نشان می دهد.

واژگان کلیدی: بهینه سازی، رایزوپوس اوریزا، تحلیل آماری، شرایط عملیاتی، روش سطح پاسخ.

KEYWORDS: Optimization; *Rhizopus oryzae*; Statistical, Operation Conditions; Response surface methodology.

مقدمه

آنزیم‌های هیدرولیزکننده نقش مهمی را در حوزه زیست فناوری به برای تطبیق پذیری گسترده آن‌ها با پیش ماده‌های خاص و فضاگرینی خود بازی می‌کنند [۱]. لیپازها دسته‌ای از هیدرولیزکننده‌هایی هستند که هیدرولیز تری گلیسیریدها به گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد را تسهیل می‌کنند [۲]. از قابلیت‌های مهم لیپازها توانایی فعالیت کاتالستی آن‌ها در واکنش‌های تبدیلی مانند ترانس استریفیکاسیون، استریفیکاسیون، اسیدولیز و الکیلز در محلول‌های آلی است [۳]. توانایی لیپازها برای انجام تبدیل‌های زیستی، آن‌ها را در صنایع غذایی، لبنی،

آنزیم‌های هیدرولیزکننده نقش مهمی را در حوزه زیست فناوری به برای تطبیق پذیری گسترده آن‌ها با پیش ماده‌های خاص و فضاگرینی خود بازی می‌کنند [۱]. لیپازها دسته‌ای از هیدرولیزکننده‌هایی هستند که هیدرولیز تری گلیسیریدها به گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد را

* عهده دار مکاتبات

+E-mail: zsalehy@ut.ac.ir

و در شرایط (pH=7، دما= ۳۰ درجه سلسیوس، نسبت منبع کربنی به نیتروژنی= ۲/۷۹، و دوره‌همن ۲۵۰) به میزان فعالیت ۴۵/۹ U/mL [۲۰] که نشان دهنده‌ی رابطه مستقیم pH و دور همزن با فعالیت آنزیمی است. در شرایط (pH=۶، دما= ۳۰ درجه سلسیوس، نسبت منبع کربنی به نیتروژنی= ۲/۲ و دوره‌همن ۱۵۰) به میزان فعالیت ۰/۳۷۰ U/mL در حجم ۵۰ میلی لیتر [۲۱] گزارش شده است. در مطالعه‌ای بر روی قارچ *کاندیدا*، با پارامترها (pH=7، دما= ۲۸ درجه سلسیوس، نسبت منبع کربنی به نیتروژنی= ۰/۶ و دوره‌همن ۱۵۰) به میزان فعالیت ۴۱۵۰ U/mL در حجم ۱۰۰ میلی لیتر [۲۲] و در شرایط (pH=۶، دما= ۲۸ درجه سلسیوس، نسبت منبع کربنی به نیتروژنی= ۱/۴۴ و دوره‌همن ۱۵۰) به میزان فعالیت ۲۰/۲۶ U/mL در حجم ۱۰۰ میلی لیتر دست یافته شد [۲۳] برای گونه ای از رازوپوس با پارامترهای (pH=۵/۵، دما= ۳۰ درجه سلسیوس، نسبت منبع کربنی به نیتروژنی= ۰/۷ و دوره‌همن ۲۰۰) به میزان فعالیت ۱۳/۸۷ U/mL [۲۴] و برای گونه‌های از *رازیوپوس/اوریزا* در شرایط (pH=۵/۵، دما= ۳۰ درجه سلسیوس، نسبت منبع کربنی به نیتروژنی= ۰/۳۴ و دوره‌همن ۱۸۰) به میزان فعالیت ۸۷۰ U/mL دست یافته‌اند [۲۵]. همانطور که از نتیجه‌های پیشین پیداست، میزان تولید و فعالیت آنزیمی مبتنی بر تغییرهای pH، دور همزن و نسبت منبع کربنی به نیتروژنی و شاید بر همکنش این پارامترها با یکدیگر می باشد.

روش‌های طراحی آزمایش ابزار بسیار مهم برای اصلاح عملکرد فرایندهای تولید، بهینه سازی و توسعه فرایندهای نوین می باشند. در آزمایش‌های شامل مطالعه اثرات دو یا تعداد بیش‌تر از دو عامل، از طراحی آزمایشی با نام طرح‌های عاملی استفاده می‌شود [۲۶]. طرح عاملی، طرحی است که در هر آزمون کامل و تکرار آن، همه ترکیب‌های ممکن سطوح، بررسی شوند. طرح‌های عاملی، خود به دسته‌های دو سطحی، سه سطحی و رویه پاسخ تقسیم می‌شوند که طرح‌های عاملی دو سطحی در مرحله‌های اولیه آزمایش‌ها زمانی که عامل‌های زیادی وجود دارند برای تشخیص متغیرهای موثر استفاده می شوند. در طرح‌های عاملی سه سطحی، رابطه بین متغیر و پاسخ با یک رابطه درجه دو ارائه می‌شود و افزون بر آزمایش‌های پیشنهادی که بر اساس بازه عامل‌های تعیین می شوند؛ برای مدل سازی و تجزیه و تحلیل پاسخ‌ها، از روش سطح پاسخ^۱ استفاده می‌شود که از کارایی بالایی در ارزیابی فرایندهای بیو تکنولوژی برخوردار است. این روش فرایندی

شونده‌ها، شیمیایی و دارویی محبوب کرده است [۴]. لپازها به‌طور معمول در صنایع چربی و روغن، غذا، چرم، پارچه، شوینده، کاغذ، مواد شیمیایی، لوازم آرایشی و سنتز پلیمر به کار می روند [۵، ۶]. لپازها به صورت گسترده در طبیعت توزیع شده‌اند [۷]. آن‌ها توسط گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها تولید می شوند [۸]. در دو دهه اخیر بیش‌تر لپازهای میکروبی کاربرد صنعتی پیدا کردند و به‌تقریب به‌طور کامل جایگزین دیگر انواع لپازها مانند لپاز جانوری شده‌اند. لپازهای نوع میکروبی به علت انتخاب پذیری، پایداری و دامنه گسترده سوبسترا انتخابی مورد توجه قرار گرفتند. [۹، ۱۰]. در حال حاضر در حوزه زیست فناوری بیش‌تر از گونه قارچی، باکتریایی و مخمر در زمینه تولید لپاز به ویژه لپاز برون سلولی استفاده شده است [۱۱، ۱۲]. از میان دو روش تخمیر در محیط جامد و مایع، تخمیر مایع به جهت سادگی عملیات، رشد سریع، اقتصادی تر بودن و بازده بالاتر انتخاب مناسب‌تری برای تولید آنزیم قارچی از نوع برون سلولی آن می باشد [۱۳].

رازیوپوس، *آسپرژیلوس*، *موکور*، *پنسیلیوم* و *کاندیدا* از منبع‌های قابل توجه تجاری برای تولید لپاز می باشند [۱۴]. آنزیم‌های میکروبی از آنزیم‌های حاصل از حیوانات و گیاهان مفیدترند، زیرا تولید آن‌ها ساده تر، ارزان تر و ایمن تر می باشد [۱۵].

مقدار لپاز تولیدی تحت تاثیر پارامترهای متنوعی چون نوع و غلظت منابع کربنی و نیتروژنی، نمک‌های غیرآلی، میزان اکسیژن رسانی، pH اولیه، دما، دور چرخش و غیره می‌باشد [۱۶].

نتیجه‌های بسیاری در پژوهش‌های انجام شده در رابطه با پارامترهای تاثیرگذار (pH، دما، نسبت منبع کربنی به نیتروژنی و دور چرخش) بر مقدار رشد و تولید آنزیم لپاز دیده شده است. در یک بررسی روی قارچ *رازیوپوس الیگوسپروس*، (pH=7، دمای ۳۰ درجه سلسیوس، نسبت منبع کربنی گلوکز به منبع نیتروژنی پیتون ۰/۳ و دور چرخش ۲۰۰ دور بر دقیقه) میزان فعالیت آنزیم لپاز تولید شده ۲/۷۹ U/mL گزارش شده است [۱۷]. در بررسی دیگر بر روی قارچ *رازیوپوس/اوریزوس*، با پارامترها به ترتیب (pH=۵/۵، دما برابر ۳۰ درجه سلسیوس، نسبت منبع کربنی به نیتروژنی= ۰/۰۸۴ و دوره‌همن ۱۲۰) به میزان فعالیت ۳/۹۸ U/mL برای حجم ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت دست یافته‌اند [۱۸]. در مطالعه‌های دیگر بر روی همین نوع قارچ در شرایط (pH=7/۱۸، دما= ۲۶/۵ درجه سلسیوس، نسبت منبع کربنی به نیتروژنی= ۰/۲۵ و دوره‌همن ۱۳۰) میزان فعالیت ۳/۱ U/mL در حجم ۱۰۰ میلی لیتر [۱۹]

(۱) Response Surface Method (RSM)

جدول ۱- پارامترهای مؤثر انتخابی بر تولید آنزیم لیپاز از قارچ رایزوپوس اوریزا

محدوده‌ی تعیین شده	عنوان پارامترها	کد پارامترها
0/2 - 1	C/N	A
100 - 250	Rpm	B
5 - 8	pH	C

و ۲٪ وزنی آگار استفاده شد.

تخمیر ناپیوسته مایع

یک لوپ آغشته به قارچ رایزوپوس اوریزا برای تلقیح هر یک از ارلن های دارای ۵۰ میلی لیتر محیط کشت استفاده شد. محیط کشت شامل (۰/۱ گرم سدیم نیترات، ۰/۰۵ گرم منیزیم سولفات، ۰/۱ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات و مقادیرهای متغیر پلی پپتون و روغن زیتون متناسب با مقادیرهای C/N در جدول طراحی آزمایش) بود. همچنین دور چرخش دستگاه و pH اولیه محیط کشت با استفاده از دو محلول سودسوزآور و هیدروکلریک اسید ۴ مولار، طبق جدول طراحی آزمایش تنظیم شد. پس از تلقیح، ارلن ها درون دستگاه شیکر انکوباتور پیوسته در دمای ثابت ۳۲ درجه سلسیوس، به مدت ۴۸ و ۹۶ ساعت نگهداری شد. پس از بیرون آوردن ارلن ها با استفاده از دستگاه بوختر، مایع زیرین جداسازی برای سنجش فعالیت لیپاز مورد استفاده قرار گرفت. حدود پایین، وسط و بالای هر یک از متغیرهای یاد شده به ترتیب (۶/۲-۱/۰-۰)، (۲۵۰-۱۷۵-۱۰۰) و (۵-۶/۵-۸) می باشد. شایان ذکر است که بازه‌های انتخابی برای پارامترها، براساس مطالعه‌های دیگر پژوهشگران تعیین شده است [۳۲-۳۴].

سنجش فعالیت آنزیم برون سلولی لیپاز

فعالیت لیپاز با استفاده از امولسیون روغن زیتون تخمین زده شد. امولسیون روغن زیتون ۵۰ میلی لیتری، محتوی ۱ میلی لیتر محلول کلسیم کلرید ۰/۰۵ مولار، ۹ میلی لیتر بافر استات ۰/۲ مولار، ۰/۵ میلی لیتر روغن زیتون و ۱ میلی لیتر از محلول زیرین جداسازی است. برای آن که آنزیم برون سلولی لیپاز، عمل هیدرولیز را بر روی روغن زیتون انجام دهد و تولید اسید چرب کند، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با دور ۱۵۰ دور بر دقیقه درون دستگاه شیکر قرار گرفت. تیتراسیون با محلول سود ۰/۱ مولار انجام شد. هر واحد از فعالیت لیپاز (U)، یک میلی مول از اسیدهای چرب آزاد شده

مشمول بر بررسی واریانس‌ها (جدول آنوا^۱) است [۲۷] و هدف از آن بهینه سازی پاسخ، درون یابی برای نقطه‌های آزمایش نشده و تخمین درست از پاسخ احتمالی در آن نقطه‌ها می باشد [۲۹، ۲۸].

روش های متنوعی برای بهینه سازی فرایند تخمیر برای رسیدن به بیشترین بازده تولید لیپاز در مطالعه‌های شناسایی شده‌اند و بیش تر پژوهشگران بهبود آن را پس از بهینه‌سازی گزارش کردند. برخی از پژوهشگران تولید لیپاز از رایزوپوس اوریزوس را به روش سطح پاسخ بهینه کردند و به میزان فعالیت ۴/۳۲ U/mL دست پیدا کردند [۳۰]. در مقاله دیگری با استفاده از روش سطح پاسخ، بازده تولید آنزیم لیپاز، ۸۷.۳۷٪ گزارش شده است [۳۱].

در این مطالعه، از گونه قارچی رایزوپوس اوریزا برای تولید آنزیم لیپاز استفاده شده است. همچنین تأثیر پارامترهایی همچون منبع کربنی و نیتروژنی، پی اچ اولیه و دور چرخش در بهبود تولید آن، بررسی شد. طرح آزمایش این بخش از روش سطح پاسخ با استفاده از نقطه مرکزی^۲، انجام شده است که شامل سه پارامتر سه سطحی و پنج نقطه مرکزی می باشد. طی بررسی و تحلیل نتیجه‌ها، فعالیت آنزیم و میزان جرمی توده زیستی در آزمایش‌های صورت گرفته از این روش استخراج شده است.

بخش تجربی

مواد و دستگاه ها

ترکیب‌های محیط کشت و دیگر مواد شیمیایی استفاده شده، از مرک^۳ آلمان و روغن زیتون و پلی پپتون به ترتیب از اوجی بلانکا^۴ اسپانیا و لیوفیلکم^۵ ایتالیا خریداری شده است. دستگاه شیکر انکوباتور مدل کونر آی اس اف^۶ ساخت کشور ایتالیا، دستگاه اتوکلاو ریجان طب ساخت کشور ایران، pH متر مدل متروهم^۷ ساخت کشور سوئد و ترازوی دیجیتالی مدل پرسیس^۸ با دقت ۰.۰۰۰۱ گرم ساخت کشور آلمان شد.

میکروارگانسیم و نگهداری محیط کشت

گونه قارچی رایزوپوس اوریزا با مشخصه پی تی سی سی^۹ 5174 از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. به منظور نگهداری طولانی مدت قارچ رایزوپوس اوریزا از محیط کشت جامد، دارای محلول آبی ۴٪ وزنی پتیتو دکستر آگار^{۱۰}

(۱) ANOVA Tables

(۳) Merck KGaA

(۵) Liofilchem

(۷) Metrohem

(۹) PTCC

(۲) Central Composite

(۴) Hojiblanca

(۶) Kuhner ISF

(۸) Percisa

(۱۰) Potato Dextro Agar

جدول ۲- مقدارهای آزمایشگاهی فعالیت آنزیم لیپاز و جرم توده زیستی به دست آمده از قارچ رایزوپوس اریزا در حجم محیط کشت ۵۰ میلی لیتری در دمای ثابت ۳۲ درجه سلسیوس

شماره آزمایش	نتیجه‌های آزمایشگاهی						
	جرم توده زیستی (گرم) بعد از مدت		فعالیت آنزیمی (U/mL) بعد از مدت		پارامترها		
	۹۶ ساعت	۴۸ ساعت	۹۶ ساعت	۴۸ ساعت	(C) pH اولیه	(B) دور چرخش	(A) نسبت منبع کربنی به نیتروژنی
۱	۰/۴۲۱۲	۰/۱۰۷۲	۲/۳۳	۱/۳۳	۸	۲۵۰	۰/۲
۲	۰/۵۰۹	۰/۲۹۳۳	۱/۳۳	۱	۶/۵	۱۷۵	۰/۶
۳	۰/۵۴۶۸	۰/۵۰۷۷	۲/۴	۲/۳۳	۶/۵	۱۷۵	۰/۰۳
۴	۰/۴۶۸۲	۰/۵۱۲۱	۲	۳	۶/۵	۲۸۱/۰۷	۰/۶
۵	۰/۵۰۹	۰/۲۹۳۳	۱/۵۵	۱/۲۵	۶/۵	۱۷۵	۰/۶
۶	۰/۳۲۸۱	۰/۰۶۹۹	۲	۱	۵	۱۰۰	۰/۲
۷	۰/۵۳۹۳	۰/۲۹۰۹	۱/۶۶	۱/۳۳	۸	۱۰۰	۱
۸	۰/۵۰۹	۰/۲۹۳۳	۱/۱۵	۰/۸۵	۶/۵	۱۷۵	۰/۶
۹	۰/۲۲۳	۰/۹۷۲	۱/۷۳	۱/۶۶	۴/۳۸	۱۷۵	۰/۶
۱۰	۰/۵۴۰۷	۰/۰۸۸	۴/۳۳	۲/۳۳	۵	۲۵۰	۱
۱۱	۰/۵۰۹	۰/۲۹۳۳	۱/۳۳	۱	۶/۵	۱۷۵	۰/۶
۱۲	۰/۴۴۶	۰/۲۶۰۷	۱/۶۶	۱/۶۶	۸/۶۲	۱۷۵	۰/۶
۱۳	۰/۵۰۷۸	۰/۲۹۳۴	۱/۳۳	۱	۶/۵	۱۷۵	۱/۱۷
۱۴	۰/۵۰۹	۰/۲۹۳۳	۱/۳۳	۱	۶/۵	۱۷۵	۰/۶
۱۵	۰/۳۰۱	۰/۴۸۳۲	۲	۱/۶۶	۶/۵	۶۸/۹۳	۰/۶

A: نسبت منبع کربنی به نیتروژنی، B: (rpm) دور چرخش، C: pH اولیه

همان‌گونه که در جدول ۳ - الف و ب دیده می‌شود مقدار P value مربوط به مدل و پارامترهای دخیل در این مدل‌های تحلیل آماری معتبر و کم‌تر از ۰/۰۵ می‌باشند که به این معناست که مدل‌های تحلیل آماری ارایه شده در این شرایط برای فعالیت آنزیمی طبق پارامترهای معرفی شده با ۹۵٪ اطمینان قابل استناد و استفاده می‌باشد. معادله‌های تحلیل آماری استخراج شده از این آنالیز واریانس به صورت زیر ارائه گردیده است.

$$Y = -۴/۳۵۵۹ - ۱/۱۷۵۵۷ * A + ۰/۰۲۴۶۹۳ * B + ۱/۱۹۲۸۵ * C - ۰/۰۳ - ۷/۱۳۵۳۴ * ۱۰^{-۰} * B * C + ۷/۷۳۱۸ * ۱۰^{-۰} * B^2 \quad (۱)$$

$$Y' = -۰/۰۲۶۴۲۵ + ۱/۰۲۲۹۲ * A + ۶/۴۶۸۸۹ * ۱۰^{-۰} * B + ۰/۲۳۳۶۶ * C + ۰/۰۱۸۶۷۵ * A * B - ۱/۲۵۰۰۰ * A * C -$$

$$۷/۰۵۱۵۷ * ۱۰^{-۰} * B * C + ۲/۴۰۶۸۳ * A^2 - ۰/۰۵ + ۸/۰۴۶۰۹ * ۱۰^{-۰} * B^2 + ۱/۱۳۳۳۷ * C^2 \quad (۲)$$

که در این معادله‌ها، Y و Y' به ترتیب، فعالیت آنزیم لیپاز تولید شده از قارچ رایزوپوس اریزا بعد از مدت ۴۸ ساعت و ۹۶ ساعت می‌باشد. همچنین نمادهای A، B و C به ترتیب بیانگر نسبت جرمی منبع کربنی به نیتروژنی، دور چرخش و pH اولیه هستند.

بر میلی لیتر آنزیم بر دقیقه در دمای ۳۲ درجه سلسیوس تعریف می‌شود [۳۵].

تعیین توده زیستی

غلظت توده زیستی (وزن توده خشک شده) با استفاده از روش وزن سنجی تعیین شد [۳۶].

نتیجه‌ها و بحث

جدول ۲ (جدول طراحی آزمایش به همراه نتیجه‌ها) نتیجه‌های به دست آمده از انجام تعدادی آزمایش، به منظور بهینه‌سازی تولید آنزیم لیپاز از قارچ رایزوپوس اریزا در محیط کشت مایع، با انتخاب متغیرهای A با عنوان نسبت جرمی منبع کربنی به نیتروژنی (C/N)، B با عنوان دور چرخش (دور بر دقیقه rpm) و C با عنوان pH اولیه را نشان می‌دهد. بنا بر پاسخ‌های به دست آمده از آزمایش‌های تجربی جدول ۲، به کمک نرم افزار طراحی آزمایش، تحلیل آماری روی این داده‌ها صورت گرفت. جدول (۳) تجزیه و تحلیل آماری واریانس داده‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۳- تجزیه و تحلیل آماری داده‌های واریانس برای فعالیت آنزیم لیپاز (U/ml) پس از مدت (الف) ۴۸ ساعت و (ب) ۹۶ ساعت و همچنین برای میزان جرم توده زیستی (گرم) به دست آمده، پس از مدت (پ) ۴۸ ساعت و (ت) ۹۶ ساعت

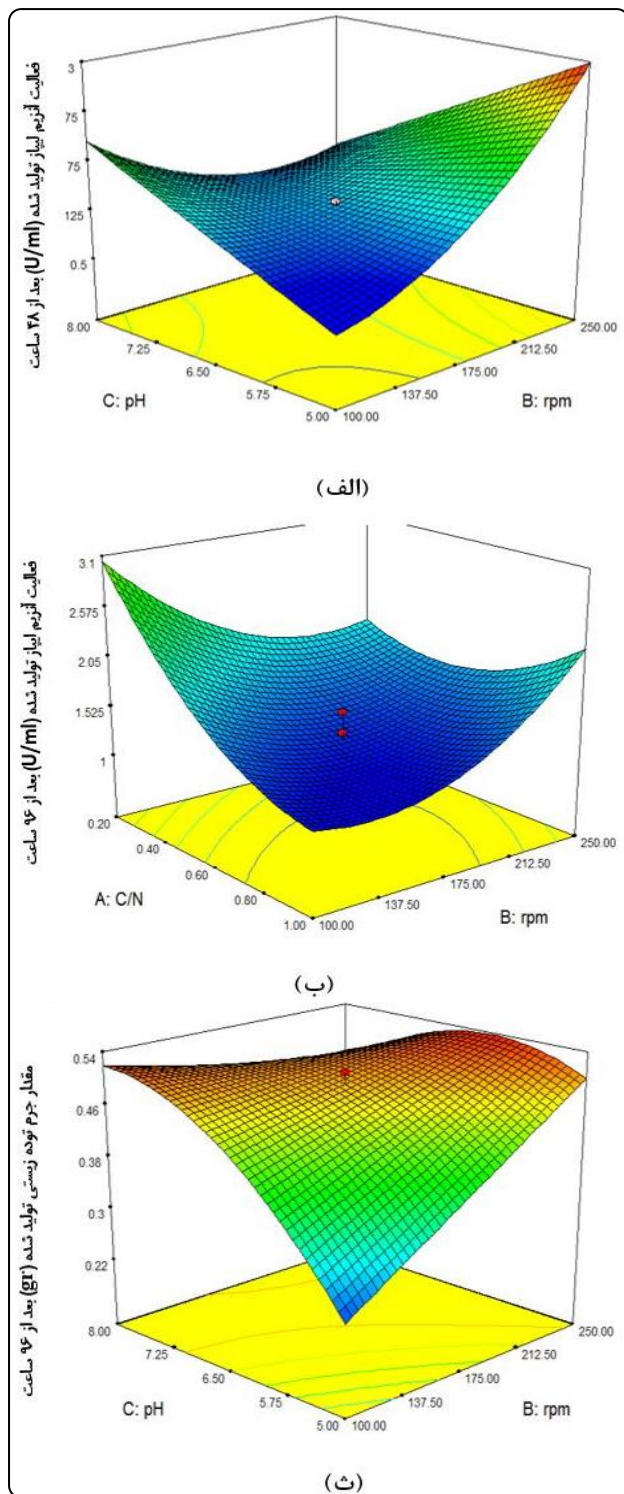
(الف)					(ب)				
پارامتر	مربع میانگین	درجه آزادی	F value	P value	پارامتر	مربع میانگین	درجه آزادی	F value	P value
مدل	۰/۹	۹	۱۱/۰۵	۰/۰۰۸۳	مدل	۰/۸۳	۵	۵/۵۲	۰/۰۱۳۴
A	۰/۵۷	۱	۷/۰۴	۰/۰۴۵۲	A	۰/۸۸	۱	۵/۸۹	۰/۰۳۸۲
B	۰	۱	۰	۱	B	۱/۳	۱	۸/۶۶	۰/۰۱۶۴
C	۲/۴۵*۱۰ ^{-۰/۳}	۱	۰/۰۳	۰/۸۶۹	C	۰/۰۵۶	۱	۰/۳۷	۰/۵۵۶۱
AB	۰/۶۳	۱	۷/۷۲	۰/۰۳۸۹	BC	۱/۲۹	۱	۸/۵۸	۰/۰۱۶۸
AC	۱/۱۲	۱	۱۳/۸۴	۰/۰۱۳۷	B ^۲	۱/۴۶	۱	۹/۷۴	۰/۰۱۲۳
BC	۱/۲۶	۱	۱۵/۴۹	۰/۰۱۱	باقیمانده	۰/۱۵	۹	-	۰/۰۱۳۴
A ^۲	۱/۱۴	۱	۱۴/۰۸	۰/۰۱۳۳					
B ^۲	۱/۵۸	۱	۱۹/۴۴	۰/۰۰۷					
C ^۲	۰/۶۹	۱	۸/۵۵	۰/۰۳۲۹					
باقیمانده	۰/۰۸۱	۵	-						
(ت)					(پ)				
پارامتر	مربع میانگین	درجه آزادی	F value	P value	پارامتر	مربع میانگین	درجه آزادی	F value	P value
مدل	۰/۰۴	۹	۰/۶۱	۰/۷۵۷	مدل	۰/۰۳۳	۴	۵/۶	۰/۰۱۲۵
A	۰/۰۲۳	۱	۰/۳۵	۰/۵۸۰۷	B	۰/۰۱۴	۱	۳/۲۸	۰/۱۰۰۱
B	۴/۱۸*۱۰ ^{-۰/۴}	۱	۶/۳۴*۱۰ ^{-۰/۳}	۰/۹۳۹۶	C	۰/۰۲۱	۱	۴/۹۶	۰/۰۵
C	۰/۲۵	۱	۳/۸۴	۰/۱۰۷۴	BC	۰/۰۲۷	۱	۶/۵۵	۰/۰۲۸۴
AB	۰/۱۹	۱	۲/۹۵	۰/۱۴۶۸	C ^۲	۰/۰۳۲	۱	۷/۶	۰/۰۲۰۲
AC	۵/۳۳*۱۰ ^{-۰/۳}	۱	۰/۰۸۱	۰/۷۸۷۵	باقیمانده	۴/۱۷*۱۰ ^{-۰/۳}	۱۰	-	
BC	۰/۰۳۲	۱	۰/۴۸	۰/۵۱۷۹					
A ^۲	۰/۰۳۶	۱	۰/۵۵	۰/۴۹۱۱					
B ^۲	۳/۱۲*۱۰ ^{-۰/۳}	۱	۰/۰۴۷	۰/۸۳۶۵					
C ^۲	۰/۰۱۲	۱	۰/۱۸	۰/۶۸۸۷					
باقیمانده	۰/۰۶۶	۵	-						

A: pH اولیه، C: (rpm) دور چرخش، B: (C/N) نسبت منبع کربنی به نیتروژنی

اثر متقابل دور همزن و میزان اسیدی بودن محیط کشت روی فعالیت آنزیمی را نمایش داده است به طوری که با افزایش میزان اسیدی بودن محیط، فعالیت آنزیمی کاهش و همچنین با افزایش دور همزن میزان فعالیت آنزیمی افزایش یافته است. دلیل این امر این است که با افزایش دور همزن دیواره ی سلولی پاره شده و آنزیم های درون سلولی نیز به محیط کشت افزوده می شوند و خود را در اندازه گیری ها نشان می دهند. توجه دیگر در این باره می تواند افزایش میزان اکسیژن دهی به سویه در دور همزن بالا باشد که سبب تولید بیش تر آنزیم توسط سویه می شود. هر چند اثر بر همکنشی این دو پارامتر نیز در میزان فعالیت آنزیمی اثری معنادار دارد. همچنین در معادله (۲)، افزون بر پارامتر نسبت منبع کربنی به نیتروژنی، که همچنان برای حیات و تولید آنزیم لیپاز لازم است،

آنالیز واریانس جدول ۳ (الف) و (ب) در این مطالعه نشان می دهد که پارامتر pH به تنهایی روی نتیجه های فعالیت آنزیمی اثر معناداری ندارد، ولی بر همکنش آن با میزان منبع کربنی و نیتروژنی و دور همزن در محیط کشت، دارای اهمیت آماری است و تاثیر آن را نمی توان نادیده گرفت. بنابراین نمی توان این پارامتر را از مدل آماری حذف نمود.

با توجه به معادله (۱) فعالیت آنزیمی به نسبت منبع کربنی به نیتروژنی و pH اولیه وابستگی بیش تری دارد که می توان این نتیجه گیری را داشت که در آغاز فرایند، قارچ برای رشد و نمو به مواد غذایی کربنی برای تولید انرژی نیاز بیش تری دارد. همچنین در ساعات اولیه رشد، pH محیط کم تر دچار تغییرات شده است بنابراین پارامتر مناسب و تأثیرگذار بر رشد قارچ گزارش شده است. شکل ۱- الف به خوبی



شکل ۱- منحنی‌های رسم شده با استفاده از روش سطح پاسخ و نشان‌دهنده تأثیرهای متغیرها بر فعالیت آنزیم لیباز به‌دست آمده از قارچ *رایزوپوس اوریزا* به ترتیب بعد از مدت کشت (الف) ۴۸ ساعت و (ب) ۹۶ ساعت و (ث) نشان دهنده جرم توده زیستی (گرم) به‌دست آمده پس از مدت ۹۶ ساعت

به پارامتر دورهمزن نیز مرتبط است. زیرا دور همزن بالا به اکسیژن رسانی بهتر به توده‌ی زیستی کمک می‌کند که این مساله در مدل ۹۶ ساعت بیش‌تر اهمیت پیدا می‌کند چرا که میزان توده‌ی زیستی بیش‌تر شده و محیط به اکیزن رسانی به مراتب بهتری نیازمند است. از این رو پارامتر دور همزن مهم می‌شود. از سوی دیگر دور همزن بالا باعث شکسته شدن دیواره‌های سلولی در توده‌ی زیستی می‌شود و این موضوع باعث رها شدن آنزیم‌های لیپاز درون سلولی در محیط نمونه می‌شود که افزایش فعالیت آنزیمی را به دنبال دارد. طبق شکل ۱ - ب فعالیت آنزیمی در این مدل تحلیل آماری با افزایش دور همزن و کاهش نسبت منبع کربنی به نیتروژنی (افزایش منبع نیتروژنی)، افزایش می‌یابد [۳۷].

همان‌گونه که در شکل ۱ (ث) پیداست، اثر pH روی میزان رشد توده‌ی زیستی دارای اثر انحناست و باید فاکتور توان دوم این پارامتر در مدل آماری لحاظ شود.

از سویی اثر تغییرهای نسبت منبع کربنی به نیتروژنی از سایر پارامترها، روی میزان فعالیت آنزیمی محسوس‌تر است (شکل ۱ (ب)) که اهمیت متابولیسم‌های منتهی به تولید لیپاز در سلول‌های *رایزوپوس اوریزا* را در این فرآیند بیش‌از پیش مشخص می‌نماید. همان‌گونه که جدول ۳ - پ نتیجه‌های جرم توده زیستی برای مدت زمان ۴۸ ساعت بعد از کشت را نشان می‌دهد، نمی‌توان مدل معتبری برای این نتیجه‌های ارائه نمود. با توجه به کنترل ناپذیری محیط آزمایشگاه و تغییرهای ناشی از محیط، به نظر می‌رسد که رفتار سویه برای تولید توده زیستی برای ارایه مدل تحلیل آماری، مناسب نمی‌باشد. این موضوع می‌تواند به تفاوت در نسبت اسپورهای موجود در هر نمونه به دلیل کنترل ناپذیری مربوط به مرحله تلقیح از محیط جامد به محیط مایع باشد و یا پارامترهای دیگری نیز در ایجاد این عدم اعتبار تحلیل آماری دخیل باشند. چرا که در زمان‌های کوتاه و اولیه، زمانی که محیط کشت وارد فاز مرگ می‌شود چندان قابل بررسی نیست و اثرهای بازدارنده، با مکانیسم‌های متنوع ممکن است روی محیط کشت مورد نظر اعمال شوند که خارج از کنترل آزمایش‌های مورد نظر بوده است. طبق نتیجه‌های جرم توده‌زیستی برای مدت زمان ۹۶ ساعت پس از کشت که در جدول (۳-ت) نشان داده شده است، می‌توان مدل اصلاح شده معتبری برای این نتیجه‌ها ارایه نمود. به طور همانند آنالیز واریانس انجام گرفته و مدل اصلاح شده طبق معادله (۳) ارایه شده است که از نظر تحلیل آماری معتبر و قابل استناد است.

(۱) Inhibitor effects

استاندارد برحسب نقطه‌های مدل را نشان می‌دهد. از آنجا که خطاهای رسم شده از الگوی خاصی پیروی نمی‌کنند؛ به این معناست که مدل‌های پیشنهادی، مدل‌های مناسبی هستند [۳۸]. مدل جرم توده ی زیستی همان گونه که از نمودار خطای استاندارد آن پیداست، دچار خطایی سیستماتیک است که می‌تواند دلیل دیگری بر این استنباط باشد که استفاده از لوپ، نمی‌تواند کنترل خوبی روی تعداد اسپورهای اولیه ی در مرحله ی تلقیح را کنترل کند و آزمایش را دچار خطای سیستماتیک می‌کند. بنابراین مدل آماری برای توده ی زیستی، به‌ویژه در ۴۸ ساعت اولیه نمی‌تواند معتبر باشد، هر چند با مرور زمان بیشتر و رسیدن به فاز تعادلی رشد، این خطای سیستماتیک کمتر به چشم می‌آید. روش‌های نوین برای کنترل تعداد سلول‌های مورد مطالعه در شرایط مخالف در سال‌های اخیر ارایه شده است که از جمله دقیق‌ترین و کاربردی‌ترین آن‌ها می‌توان کشت تک سلول‌ها در کانال‌های میکروفلویدیک در سامانه‌های میکرونی آزمایشگاه روی چیپ نام برد که در سال‌های اخیر توسط آزمایشگاه زیست فناوری دانشگاه تهران مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۳۸].

در مطالعه ای روی قارچ پنیسیلیوم افزایش غلظت منابع نیتروژنی سبب رشد میزان فعالیت آنزیم لیپاز از ۰/۴ به ۱۳ U/mL شده است. به روشنی می‌توان گفت که منابع‌های آلی و معدنی نیتروژنی سبب بهبود رشد سلولی و سنتز آنزیم می‌شوند [۳۷]. در این بررسی نیز منابع‌های نیتروژنی سهم بزرگتری از ترکیب‌های محیط کشت را به خود اختصاص داده‌اند. پژوهشگران تأثیر نسبت منابع کربنی به نیتروژنی در تولید آنزیم‌های به‌دست آمده از قارچی به نام اسپرگیلوس را بررسی کردند. عدد بهینه فعالیت آنزیم ها، در نسبت های کوچک منابع کربنی به نیتروژنی گزارش شد [۳۹]. با توجه به نتیجه‌های به‌دست آمده از جدول ۲ نیز روشن است که با کاهش مقدار نسبت منابع کربنی به نیتروژنی (C/N)، فعالیت آنزیم لیپاز تولیدی و میزان جرم توده زیستی افزایش می‌یابد؛ که بیانگر تطابق نتیجه‌های به‌دست آمده در این بررسی با پژوهش‌های پژوهشگران دیگر است. طبق نمودارهای به‌دست آمده از تحلیل آماری شکل ۱، بیشترین بازده فعالیت آنزیم و توده زیستی در شرایطی است که مقدار اضافی از منابع نیتروژنی در برابر منابع کربنی حضور داشته باشد. در این مطالعه با استفاده از روش سطح پاسخ، بهینه سازی تولید آنزیم لیپاز و چگونگی تأثیرهای عامل‌های گوناگون از جمله منابع غذایی، دور چرخش و pH اولیه بر فعالیت آنزیم تولید شده مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این متغیرها نقش بسیار زیادی بر تولید آنزیم لیپاز بازی می‌کنند.

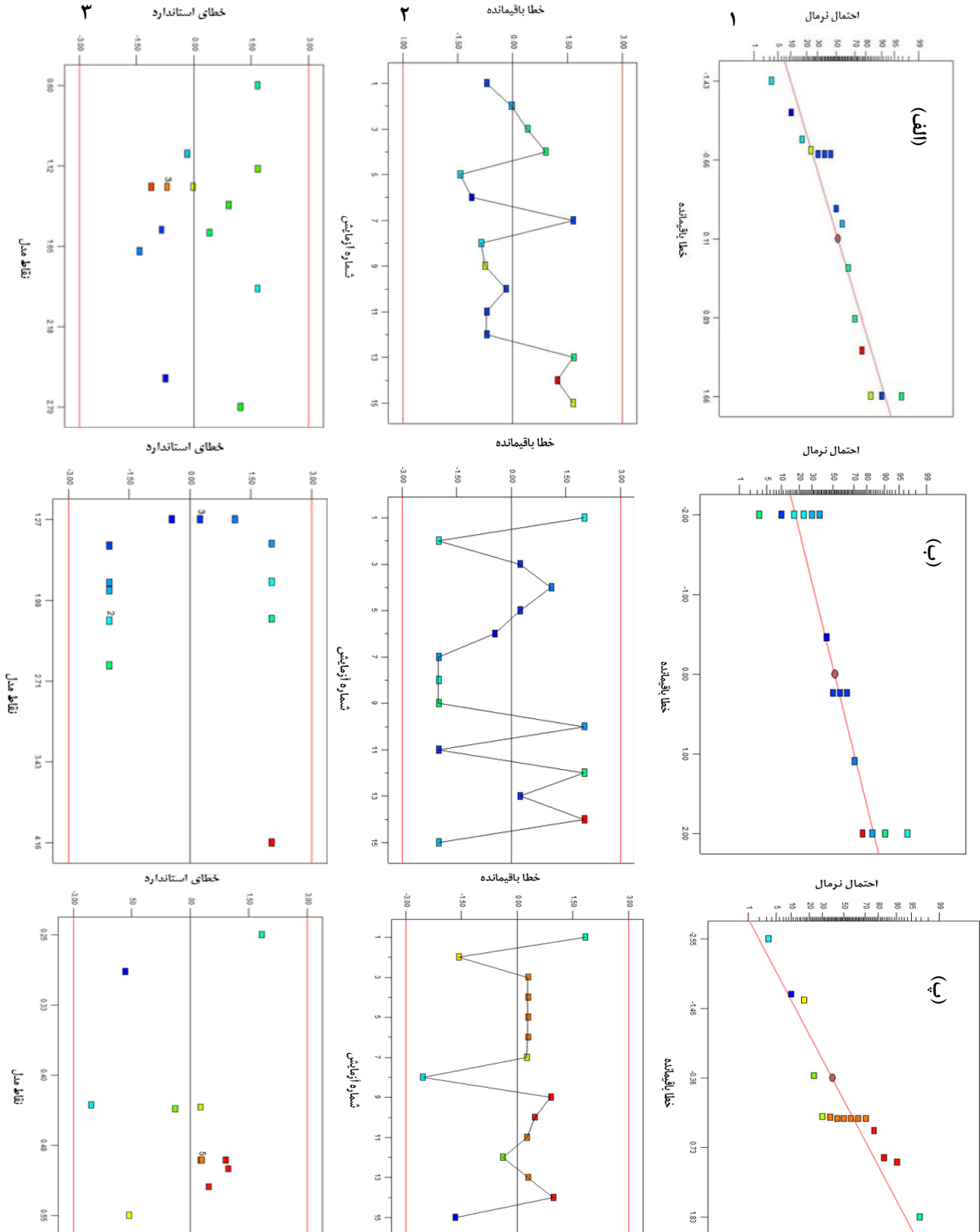
تفاوت قابل توجه در نتیجه‌های به‌دست آمده برای جرم توده زیستی در مدت زمان ۴۸ ساعت و ۹۶ ساعت، را می‌توان به عامل زمان مرتبط دانست و امکان رسیدن محیط کشت به یک شرایط پایدار و تعادلی و مکانیسم‌های مربوط به فاز مرگ سلولی در محیط کشت‌های مختلفی، که مورد آزمایش قرار گرفته‌اند.

$$Y'' = -1/86332 + 5/32837 * 10^{-1} * B + 0/52247 * C - 7/34889 * 10^{-1} * B * C - 0/28457 * C^2 \quad (3)$$

که در معادله (۳)، Y'' جرم توده زیستی حاصل از قارچ رایزوپوس اوریزا بعد از مدت ۹۶ ساعت می‌باشد. همچنین نمادهای A، B و C به ترتیب بیانگر نسبت جرمی منبع کربنی به نیتروژنی، دور چرخش و pH اولیه هستند.

همان‌گونه که در جدول ۳ - ت مشخص است، مقادیر P value مربوط به مدل و پارامترهای دخیل در این مدل تحلیل آماری معتبر و کم‌تر از ۰/۰۵ می‌باشند که به این معناست که مدل تحلیل آماری ارایه شده در این شرایط برای توده‌های زیستی طبق پارامترهای معرفی شده با ۹۵٪ اطمینان قابل استناد و استفاده می‌باشد. در توضیح این مدل، پارامتر نسبت منبع کربنی به نیتروژنی در میزان توده زیستی پس از ۹۶ ساعت تأثیر معنادار ندارد که این به دلیل به تعادل رسیدن و پایداری محیط کشت در فاز مرگ سلولی می‌تواند تلقی شود. همچنین اثر توان دوم پارامتر pH روی نتیجه‌ها و همچنین بر هم کنش بین دور همزن و pH روی نتیجه‌ها از نکته‌های دارای اهمیت این مدل به حساب می‌آیند. و همچنین از شکل ۱- ث استنباط می‌شود که میزان تولید توده زیستی با افزایش pH کاهش و با افزایش دور همزن افزایش می‌یابد. البته این موضوع تحت تأثیر بر هم کنش‌های مربوط به این دو پارامتر هم می‌تواند باشد، به‌عنوان نمونه در pH های اسیدی تر اثر دور همزن بر عکس اثر آن در محیط‌های قلیایی است.

منحنی های (۱- الف، ب، پ) در شکل ۲، بیانگر نمودار احتمال نرمال بر حسب خطای باقیمانده است. در این نمودارها نقطه‌ها در امتداد یک خط می‌باشند و مقدار ضریب تعیین، بیش از ۸۰٪ است که نشان دهنده‌ی برازش مناسب و قابل پذیرش مدل بر داده‌های آزمایشگاهی به‌دست آمده است. منحنی‌های (۲- الف، ب، پ) در شکل ۲، نشان دهنده‌ی نمودار خطای باقی‌مانده بر حسب ترتیب انجام شدن آزمایش‌ها می‌باشد. با توجه به این نمودارها، خطاها از الگوی ویژه‌ای پیروی نمی‌کنند و تصادفی می‌باشند. منحنی‌های (۳- الف، ب، پ) در شکل ۲، نمودارهای تغییرات خطای



شکل ۲- منحنی‌های بده‌دست آمده از داده‌های تجزیه و تحلیل آماری بهینه‌سازی فعالیت آنزیم لیپاز بعد از مدت کشت (ستون الف) ۴۸ ساعت و (ستون ب) ۹۶ ساعت و جرم توده زیستی (گرم) آنزیم لیپاز بعد از مدت (ستون پ) ۹۶ ساعت توسط قارچ رایزوپوس اوریزا

بیش تر از مقدار فعالیت آنزیم تولیدی در بررسی های همانند می باشد. این چنین برداشت می شود که استفاده از روش سطح پاسخ، در بهینه سازی و بیان تأثیرهای عوامل مختلف ذکر شده بر فعالیت آنزیم لیپاز و همچنین جرم توده زیستی موفق عمل کرده است. بنابراین روشی به صرفه، کاربردی و معتبر از نظر آماری برای تولید بهینه ی آنزیم لیپاز معرفی شده است. در پژوهش های بعدی، می توان با استفاده از روش های نوین میزان کنترل را روی تعداد اسپورهای مورد کشت افزایش داده و در عین حفظ بهره ی اقتصادی روش تولید، بازده فرایند را باز هم افزایش داد [۴۰].

قدردانی

در پایان از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه تهران به سبب امکاناتی که در اختیارمان قرار دادند، کمال تشکر را داریم.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۲۵

پژوهشگران در بررسی های صورت گرفته بر روی قارچ *رایزوپوس اورینزا*، در شرایطی که نسبت منبع کربنی به نیتروژنی ۰/۲۵، دور چرخش ۱۳۰ دور بر دقیقه و pH ۷/۱۸ بوده است، مقدار فعالیت آنزیم لیپاز تولیدی را ۳/۱ U/mL و در بررسی دیگر روی این قارچ در شرایطی که نسبت منبع کربنی به نیتروژنی ۱/۲۵، دور چرخش ۱۰۷ دور بر دقیقه و pH ۶ بوده است، مقدار فعالیت آنزیم لیپاز تولیدی را ۴/۳۲ U/mL گزارش کردند [۱۹، ۳۲].

در این بررسی شرایط بهینه برای تولید آنزیم لیپاز از قارچ *رایزوپوس اورینزا* با استفاده از روش سطح پاسخ این گونه است: دما ۳۲ درجه سلسیوس؛ نسبت منبع کربنی به نیتروژنی ۰/۲؛ دور چرخش ۱۰۰ دور بر دقیقه و pH اولیه ۰.۸. بیش ترین فعالیت آنزیم ۲/۴۸ و ۴/۸۰۹ U/mL و بیش ترین جرم توده زیستی ۰/۵۲۰۱ و ۰/۶۱۹۷ گرم به ترتیب بعد از مدت ۴۸ و ۹۶ ساعت به دست آمد. با توجه به مقدارهای به دست آمده برای فعالیت آنزیم لیپاز و نزدیکی نتیجه ها، به نتیجه های سایر پژوهشگران، می تواند درستی و دقت فعالیت آنزیم لیپاز را در این بررسی تأیید کند. شایان ذکر است که مقدار فعالیت آنزیم تولیدی ۴/۸۰۹ U/mL در مدت زمان ۹۶ ساعت،

مراجع

- [1] Vaquero, M.E., et al., Heterologous Expression of a Fungal Sterol Esterase/Lipase in Different Hosts: Effect on Solubility, Glycosylation and Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **120(6)**: 637-643. (2015).
- [2] Bussamara, R., et al., Isolation of a Lipase-Secreting Yeast for Enzyme Production in a Pilot-Plant Scale Batch Fermentation. *Bioresource Technology*, **101(1)**: 268-275. (2010).
- [3] Marzuki, N.H.C., et al., Sustainable Production of the Emulsifier Methyl Oleate by *Candida Rugosa* Lipase Nanoconjugates. *Food and Bioproducts Processing*, **96**: 211-220. (2015).
- [4] Ashjari, M., Mohammadi, M. R. Badri, Selective Concentration of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid from Fish Oil with Immobilized/Stabilized Preparations of *Rhizopus Oryzae* Lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **122**: 147-155. (2015).
- [5] Sathishkumar, R., et al., A Statistical Approach for Optimization of Alkaline Lipase Production by Ascidian Associated—*Halobacillus Trueperi* RSK CAS9. *Biotechnology Reports*, **8**: 64-71. (2015).
- [6] Singh, A.K., Mukhopadhyay, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **166(2)**: 486-520. (2012).
- [7] Colla, L.M., et al., Surface Response Methodology for the Optimization of Lipase Production Under Submerged Fermentation by Filamentous Fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, **47(2)**: 461-467. (2016).

- [8] Sivaramakrishnan, R. Incharoensakdi, A. Purification and Characterization of Solvent Tolerant Lipase from *Bacillus* Sp. for Methyl Ester Production from Algal Oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **121(5)**: 517-522. (2016).
- [9] Ungcharoenwiwat, P. Aran, H. Purification and Characterization of Lipase from *Burkholderia* Sp. EQ3 Isolated from Wastewater from a Canned Fish Factory and Its Application for the Synthesis of Wax Esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **115**: 96-104. (2015).
- [10] زارع باقی آباد، وجیهه؛ طباطبایی یزدی، فریده؛ مرتضوی، علی؛ وریدی، مهدی؛ بهینه سازی تولید آنزیم لیپاز مخمر *Cryptococcus albidus* با استفاده از رویه سطح پاسخ، نشریه جهاد دانشگاهی، ۱۳۹۵. ۱۳.
- [11] Salihu, A., et al., Lipase Production: an Insight in the Utilization of Renewable Agricultural Residues. *Resources, Conservation and Recycling*, **58**: 36-44. (2012).
- [12] Ülker, S. Karaoğlu, Ş.A. Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from *Mucor Hiemalis* F. Corticola Isolated from Soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **114(4)**: 385-390. (2012).
- [13] Potumarthi, R., et al., Surface Immobilization of *Rhizopus Oryzae* (ATCC 96382) for Enhanced Production of Lipase Enzyme by Multiple Responses Optimization. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, **7(S3)**: (2012).
- [14] Liu, C.-H., et al., Optimizing Lipase Production from Isolated *Burkholderia* sp. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **43(4)**: 511-516. (2012).
- [15] Teng, Y., Y. Xu, Wang, D. Production and Regulation of Different Lipase Activities from *Rhizopus Chinensis* in Submerged Fermentation by Lipids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **57(1)**: 292-298. (2009).
- [16] Maldonado, R.R., et al., Evaluation of Lipase Production by *Geotrichum Candidum* in Shaken Flasks and Bench-Scale Stirred Bioreactor Using Different Impellers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **1(2)**: 147-151. (2012).
- [17] JAVED, M.M., optimization or Cultural Conditions for the Production or Lipase by Submerged Culture or *Rhizopus Oligosporous* rUV-31. *Pak. J. I 'Ot*, **35(4)**: 519-525. (2003).
- [18] Rajendran, A. Thangavelu, V. Statistical Experimental Design for Evaluation of Medium Components for Lipase Production by *Rhizopus Arrhizus* MTCC 2233. *LWT-Food Science and Technology*, **42(5)**: 985-992. (2009).
- [19] Yang, X., et al., Production of Lipase by Repeated Batch Fermentation with Immobilized *Rhizopus Arrhizus*. *Process Biochemistry*, **40(6)**: 2095-2103. (2005).
- [20] Ёрданова, М., et al., Влияние на Компонентите на Хранителната Среда Върху Биосинтезата на Липаза от Микромицетен Щам *Rhizopus Arrhizus* КБ-2.
- [21] Elibol, M. Ozer, D. Response Surface Analysis of Lipase Production by Freely Suspended *Rhizopus Arrhizus*. *Process Biochemistry*, **38(3)**: 367-372. (2002).
- [22] Tan, T., et al., Screening of High Lipase Producing *Candida* Sp. and Production of Lipase by Fermentation. *Process Biochemistry*, **39(4)**: 459-465. (2003).

- [23] Salihu, A., et al., Optimization of Lipase Production by *Candida Cylindracea* in Palm Oil Mill Effluent Based Medium using Statistical Experimental Design. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **69(1)**: 66-73. (2011).
- [24] Teng, Y. Xu, Y. Culture Condition Improvement for whole-Cell Lipase Production in Submerged Fermentation by *Rhizopus Chinensis* using Statistical Method. *Bioresource technology*, **99(9)**: 3900-3907. (2008).
- [25] Kantak, J.B., et al., Isolation, Identification and Optimization of a New Extracellular Lipase Producing Strain of *Rhizopus* Sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **164(7)**: 969-978. (2011).
- [26] Papagora, C., Roukas, T. Kotzekidou, P. Optimization of Extracellular Lipase Production by *Debaryomyces Hansenii* Isolates from Dry-Salted Olives using Response Surface Methodology. *Food and Bioproducts Processing*, **91(4)**: 413-420. (2013).
- [27] Zandi-Atashbar, N., Ensafi, A.A. Ahoor, A.H. Nano-CeO₂/SiO₂ as an Efficient Catalytic Conversion of Waste Engine Oil Into Liquid Fuel. *Journal of Cleaner Production*, **166**: 1010-1019. (2017).
- [28] Massart, D.L., et al., Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Elsevier Science Inc. 639-647. (1997).
- [۲۹] عالم زاده، ایران؛ وثوقی، منوچهر؛ وریدی، مهدی؛ صفری، هانیه؛ بهینه سازی محیط کشت حاوی شیر خرمای جهت تولید لیپاز توسط *آسپرژیلوس نایجر* به روش پاسخ عکس العمل سطح، نشریه جهاد دانشگاهی، ۱۴.۱۳۹۶.
- [30] Rajendran, A. Thangavelu, V. Application of Central Composite Design and Artificial Neural Network for the Optimization of Fermentation Conditions for Lipase Production by *Rhizopus Arrhizus* MTCC 2233. *J. Bioprocess. Biotechniq*, **2(3)**: 1. (2012).
- [31] Zhu, S., et al., Optimization of Lipase-Catalyzed Synthesis of Acetylated EGCG by Response Surface Methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **97**: 87-94. (2013).
- [32] Barrigón, J.M., Montesinos, J.L. Valero, F. Searching the Best Operational Strategies for *Rhizopus Oryzae* Lipase Production in *Pichia Pastoris* Mut+ Phenotype: Methanol Limited or Methanol Non-Limited Fed-Batch Cultures? *Biochemical Engineering Journal*, **75**: 47-54. (2013).
- [33] Brígida, A.I., et al., Lipase from *Yarrowia Lipolytica*: Production, Characterization and Application as an Industrial Biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **101**: 148-158. (2014).
- [34] Colla, L.M., et al., Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* Through Solid-State and Submerged Fermentation. *BioMed Research International*, **2015**. (2015).
- [35] Hiol, A., et al., Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from a Thermophilic *Rhizopus Oryzae* Strain Isolated from Palm Fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, **26(5-6)**: 421-430. (2000).
- [36] Li, E. Mira de Orduña, R. A Rapid Method for the Determination of Microbial Biomass by Dry Weight Using a Moisture Analyser with an Infrared Heating Source and an Analytical Balance. *Letters In Applied Microbiology*, **50(3)**: 283-288. (2010).

- [37] Lima, V.M., et al., Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Lipase Production by *Penicillium Aurantiogriseum*. *Food Technology and Biotechnology*, **41(2)**: 105-110. (2003).
- [۳۸] سلماسی، د.ش.ف.م.، "کاربرد آمار و طراحی آزمایش ها در رشته های علوم و مهندسی". چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۹۶. ۱۶۶-۱۶۷.
- [39] Montesinos, J., E. Dalmau, and C. Casas, Lipase Production in Continuous Culture of *Candida Rugosa*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **78(7)**: 753-761. (2003).
- [40] Ghelich, P., Salehi, Z., Mohajerzede, S., & Jafarkhani, M. Experimental and Numerical Study on a Novel Microfluidic Method to Fabricate Curcumin Loaded Calcium Alginate Microfibres. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, (2018).