# بهینه سازی تولید لیپاز مخمر *یاررووییا لیپولیتیکا* با روش طراحی آزمایش تاگوچی

**فرشاد درویشی*، برومند حسینی و پریسا فتحی رضایی**

**مراغه، دانشگاه مراغه، گروه زیست شناسی**

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۶

## چکیده

لیپاز (EC 3.1.1.3) یک دسته بسیار مهم از آنزیمهای صنعتی است. مخمر غیرمعمول *یاررووییا لیپولیتیکا* برای انسان غیر بیماریزا و برای چند فرآیند صنعتی ایمن شناخته شده است. این مخمر می تواند انواع مختلفی از لیپاز را تولید کند. تولید لیپاز خارج سلولی به ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی وابسته است. روغن زیتون به عنوان منبع کربن، عصاره مخمر و تریپتون به عنوان منابع نیتروژن و pH در سطوح مختلف برای بهینه سازی تولید لیپاز در سویه جهش یافته مخمر *Yarrowia lipolytica* FDY1390 توسط روش طراحی آزمایش تاگوچی مورد بررسی قرار گرفتند. نرم افزار Qualitek-4 برای طراحی آزمایش به روش تاگوچی استفاده شد. بیشترین تولید آنزیم لیپاز (۳۴۰ واحد در میلی لیتر) در محیط کشت حاوی ۲۰ گرم در لیتر روغن زیتون ، ۱۵ گرم در لیتر عصاره مخمر و تریپتون و pH برابر ۴ پس از ۷۲ ساعت از فرآیند تخمیر به دست آمد. بهینه سازی تولید لیپاز سبب کاهش هزینه و استفاده صنایع مختلف از این آنزیم می شود.

**واژه های کلیدی:** لیپاز، *یاررووییا لیپولیتیکا*، بهینه سازی، طراحی آزمایش، روش تاگوچی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۱۰۷-۳۷۲۷۸۹۰۰-۰۴۱ ، پست الکترونیکی: f.darvishi@ymail.com

## مقدمه

لیپاز یا تری آسیل گلیسرول آسیل هیدرولاز EC 3.1.1.3 هیدرولیز تری گلیسیریدها به گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد را در سطح بین آب و روغن کاتالیز می کند (۱۴). لیپاز به عنوان یک کاتالیزور زیستی پیشرو در صنایع زیستی و فناوری چربیها با کاربردهای مختلف صنعتی مورد توجه است (۱۷). تعداد لیپازهای مورد استفاده از سال ۱۹۸۰ افزایش یافته است که این افزایش در نتیجه دستاوردهای بزرگ در زمینه کلونینگ و بیان آنزیم از میکروارگانیسم ها و افزایش تقاضا برای این کاتالیزور زیستی با ویژگیهای جدید و خاص از جمله اختصاصیت و ثبات بالا، تحمل نسبت به دامنه وسیع pH و دما بوده است (۲۰).

مخمر *یاررووییا لیپولیتیکا*، بر خلاف مخمرهای *ساکارومایسس سرویزیه* و *شیزوساکارومایسس پومبه* که مطالعه آنها در فرآیندهای مختلف بیشتر مرسوم و معمول است، در گروه مخمر های غیر معمول (non-conventional) قرار دارد. این مخمر های غیر معمول، برای انسان غیر بیماریزا و برای چند فرآیند صنعتی از قبیل تولید اسیدهای آلی و آنزیمها ایمن شناخته شده (generally recognized as safe or GRAS) هستند (۲و۳). ترشح لیپاز در *یاررووییا لیپولیتیکا* در سال ۱۹۴۸ گزارش شد. لیپاز در این مخمر به سه صورت درون سلولی، متصل به دیواره و خارج سلولی تولید می شود. ژن *LIP2* مسئول تنظیم و تولید همه لیپازهای خارج سلولی است (۲۲و۲۹). آنزیم لیپاز *یاررووییا لیپولیتیکا* با ایجاد آرایش فضایی اختصاصی، دارای فعالیت آنزیمی بالا برای آبکافت، ساخت و ترانس- استریفیکاسیون دامنه وسیعی از استرها و روغنهاست که به همین دلیل می‌توان از آن برای انجام بیوترانسفورماسیونهای (biotransformation) میکروبی در صنایع دارویی، غذایی و شوینده‌ها استفاده کرد

(۲۷،۲). همچنین این آنزیم به خاطر پایداری بالا، عدم نیاز به کوفاکتور، فعالیت سنتزی در حلالهای آلی و طیف گسترده سوبسترای مورد استفاده می‌تواند برای تبدیل مخلوط راسمیک به ترکیبات دارویی تک انانتیومری به کار رود (۱۳و۳۰). با توجه به کاربردهای فراوان این آنزیم در صنایع مختلف، بهینه سازی تولید آن در زیست قناوری مورد توجه است (۸).

در سال ۱۹۴۰ گنیچی تاگوچی در راستای افزایش کیفیت صنایع مخابرات ژاپن مفاهیم جدیدی را برای بهینه سازی و بهبود کیفیت ارائه کرد که به روش تاگوچی معروف است. تاگوچی برای طراحی و اجرای آزمایشها مجموعه ای از جداول را با نام آرایه متعامد (orthogonal array) تهیه کرد. این جداول برای وضعیتهای مختلف آزمایش، از بین تعداد کل آزمایشها در روش فاکتوریل کامل انتخاب می شوند که می تواند چند عامل را در چند سطح همزمان با در نظر گرفتن اثرات متقابل آنها بررسی کند. روش تاگوچی آزمایشهایی را که عوامل انتخاب شده بیشترین اثر را در بین تمامی حالات ممکن دارد را مشخص و پیشنهاد می کند. پس از انجام آزمایشها طبق آرایه های متعامد، باید با نرم افزار تجزیه و تحلیل انجام شود. شرایط بهینه با بررسی آثار اصلی هر یک از عوامل تعیین می شود و به این ترتیب سطح بهینه از میان سطوح مختلف تعیین و به دست می آید.

در این تحقیق تأثیر سطوح مختلف روغن زیتون، عصاره مخمر، تریپتون و pH به عنوان فاکتورهای مؤثر بر روی تولید لیپاز توسط مخمر *Y. lipolytica* FDY1390 و با روش طراحی آزمایش به شیوه تاگوچی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روشها

**کشت و نگهداری سویه میکروبی:** در این تحقیق از سویه جهش یافته *Y. lipolytica* FDY1390 استفاده شد که قابلیت بالایی در تولید لیپاز دارد (۴). از محیط کشت YPD حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز، ۲۰ گرم در لیتر پپتون و ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر و ۱۷ گرم در لیتر آگار برای کشت این مخمر استفاده گردید. کشت مخمر در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد به مدت ۳-۲ روز قرار گرفت. از دمای ۴ درجه سانتی گراد برای نگهداری مخمر استفاده شد (۱).

**تهیه مایع تلقیح:** پس از فعال سازی سویه بر روی محیط YPD، یکی از کلنیها به ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط YPD مایع و فاقد آگار به عنوان مایع تلقیح انتقال داده شد. سپس ارلن در انکوباتور شیکر دار با دمای ۲۹ درجه سانتی گراد با سرعت چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۸ ساعت انکوبه گردید (۱۹).

**طراحی آزمایش به روش تاگوچی:** برای طراحی آزمایش به روش تاگوچی از نرم افزار Qualitek-4 استفاده شد. این نرم افزار توانایی بررسی همزمان چندین پاسخ با ویژگیهای مختلف را دارا می باشد و به طور تخصصی برای روش تاگوچی طراحی شده است. در روش تاگوچی ابتدا عوامل و سطوح مورد نظر تعیین می شود و سپس با استفاده از نرم افزار جدول آرایه های متعامد طراحی می گردد. پس از انجام آزمایشها، نرم افزار با تجزیه و تحلیل مقدار عوامل بهینه را پیشنهاد می دهد که بر اساس آن باید آزمایش تأییدی انجام شود. محیط کشت تولید لیپاز حاوی روغن زیتون، عصاره مخمر و تریپتون است در نتیجه عوامل اصلی مورد بررسی در این تحقیق روغن زیتون، عصاره مخمر، تریپتون و pH در چهار سطح (جدول ۱) بودند که پس از وارد نمودن این اطلاعات، نرم افزار ۱۶ آزمایش مختلف را طبق جدول ۲ برای انجام آزمایشها پیشنهاد نمود.

در ۱۶ ارلن ۲۵۰ میلی لیتری، ۵۰ میلی لیتر محیط کشت با سطوح ترکیبی عوامل اصلی طبق جدول (۲) تهیه و اتوکلاو گردید. به محیطهای فوق یک درصد مایع تلقیح از

سویه مخمر در شرایط استریل اضافه شد. بلافاصله پس از تلقیح، ارلنها به خوبی هم زده شده و برای شمارش مخمرها از آنها نمونه برداری صورت گرفت.

جدول ۱- عوامل اصلی (روغن زیتون، عصاره مخمر، تریپتون، pH ) و سطوح آنها. این سطوح برای روغن زیتون، عصاره مخمر، تریپتون بر حسب گرم در لیتر است.

| عامل | سطح ۱ | سطح ۲ | سطح ۳ | سطح ۴ |
|---|---|---|---|---|
| روغن زیتون | ۵ | ۱۰ | ۱۵ | ۲۰ |
| عصاره مخمر | ۰ | ۵ | ۱۰ | ۱۵ |
| تریپتون | ۰ | ۵ | ۱۰ | ۱۵ |
| pH | ۴ | ۵ | ۶ | ۷ |

جدول ۲- آرایه متعامد برای سطوح مختلف عوامل اصلی روغن زیتون، عصاره مخمر، تریپتون وpH. اعداد ۱، ۲، ۳ و ۴ مقدار سطوح عوامل اصلی را نشان می دهد که در جدول (۱) تعریف شدند.

| شماره آزمایش | روغن زیتون | عصاره مخمر | تریپتون | pH |
|---|---|---|---|---|
| آزمایش شماره ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ |
| آزمایش شماره ۲ | ۱ | ۲ | ۲ | ۲ |
| آزمایش شماره ۳ | ۱ | ۳ | ۳ | ۳ |
| آزمایش شماره ۴ | ۱ | ۴ | ۴ | ۴ |
| آزمایش شماره ۵ | ۲ | ۱ | ۲ | ۳ |
| آزمایش شماره ۶ | ۲ | ۲ | ۱ | ۴ |
| آزمایش شماره ۷ | ۲ | ۳ | ۴ | ۱ |
| آزمایش شماره ۸ | ۲ | ۴ | ۳ | ۲ |
| آزمایش شماره ۹ | ۳ | ۱ | ۳ | ۴ |
| آزمایش شماره ۱۰ | ۳ | ۲ | ۴ | ۳ |
| آزمایش شماره ۱۱ | ۳ | ۳ | ۱ | ۲ |
| آزمایش شماره ۱۲ | ۳ | ۴ | ۲ | ۱ |
| آزمایش شماره ۱۳ | ۴ | ۱ | ۴ | ۲ |
| آزمایش شماره ۱۴ | ۴ | ۲ | ۳ | ۱ |
| آزمایش شماره ۱۵ | ۴ | ۳ | ۲ | ۴ |
| آزمایش شماره ۱۶ | ۴ | ۴ | ۱ | ۳ |

سپس ارلنها به منظور انکوبه نمودن به انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی گراد و با سرعت چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه منتقل شدند. در ادامه هر ۲۴ ساعت به مدت ۴ روز پیاپی از ارلنها در شرایط استریل نمونه برداری گردید و رشد مخمرها و فعالیت لیپاز مورد بررسی قرار می گرفت.

**اندازگیری رشد و فعالیت آنزیمی:** از لام نئوبار برای بررسی رشد و شمارش تعداد سلولهای مخمر استفاده شد. روش تیتراسیون برای سنجش فعالیت لیپاز به کار رفت. پس از هر بار نمونه برداری، نمونه ها در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد و از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. یک میلی لیتر از محلول رویی به طور مستقیم و یا رقیق شده به ۵ میلی لیتر از سوبسترای سنجش فعالیت لیپاز ( مخلوطی از روغن زیتون با هیدروکسید سدیم یک دهم مولار و پلی وینیل الکل دو درصد ) به همراه ۴ میلی لیتر بافر فسفات یک دهم مولار با pH حدود ۷ اضافه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری شیکر دار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مرحله برای متوقف کردن واکنش، ۵ میلی لیتر از محلول متوقف کننده (ترکیبی از الکل و استون به نسبت یک به یک حجمی/ حجمی) اضافه شد. در ادامه ۳ تا ۵ قطره از محلول فنل فتالئین دو در صد افزوده شد و با محلول هیدروکسید سدیم ۵۰ میلی مولار تیتر گردید. فعالیت لیپاز به صورت واحد در میلی لیتر گزارش می شود که یک واحد فعالیت آنزیمی، معادل مقدار آنزیمی است که یک میکرومول اسید چرب را در یک دقیقه تحت شرایط سنجش آزاد سازد. کلیه آزمایشها حداقل با دو تکرار انجام شدند (۴).

## نتایج

محیط کشت تولید لیپاز حاوی روغن زیتون، عصاره مخمر و تریپتون است. در این تحقیق اثر روغن زیتون به عنوان منبع کربن و عامل اول در محدوده غلظتهای ۵ تا ۲۰ گرم

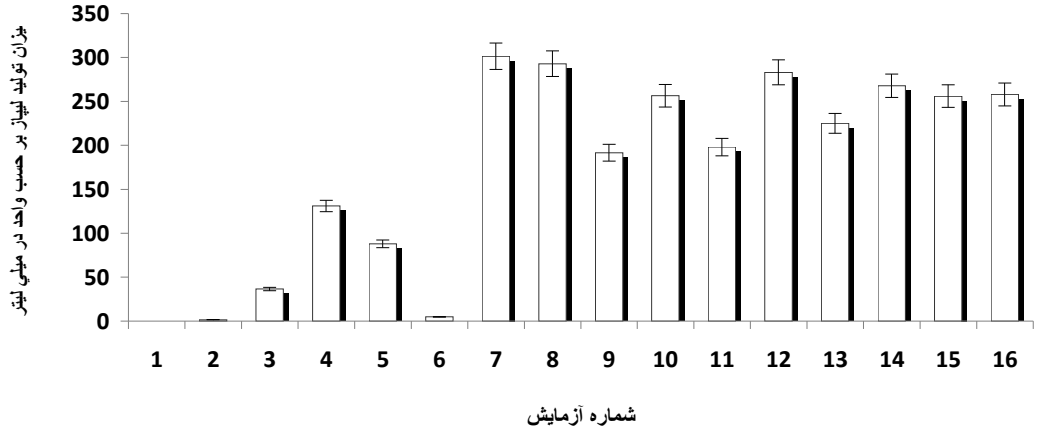
در لیتر (در چهار سطح ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر)، عصاره مخمر و تریپتون به عنوان منابع نیتروژنی و عوامل دوم و سوم در محدوده غلظتهای ۰ تا ۱۵ گرم در لیتر(در چهار سطح ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم در لیتر) و همچنین عامل pH در محدوده های ۴ تا ۷ (در چهار سطح ۴، ۵، ۶ و ۷) بر تولید لیپاز توسط *یاروویا لیپولیتیکا* مورد بررسی قرار گرفت.

روند رشد سویه مخمر در محیطهای کشت روغن و میزان تولید لیپاز با فواصل زمانی ۲۴ ساعت تا چهار روز پس از آغاز فرآیند تخمیر اندازه گیری شد. پس از ۷۲ ساعت سویه جهش یافته *Y. lipolytica* FDY1390 بیشترین میزان لیپاز تولید نمود و به علت اینکه هدف از بهینه سازی در این تحقیق دستیابی به حداکثر میزان تولید لیپاز بود در نتیجه داده های حاصل پس از ۷۲ ساعت برای تجریه و تحلیل به نرم افزار وارد شد. شکل ۱ میزان تولید لیپاز بر حسب واحد در میلی لیتر پس از ۷۲ ساعت از شروع تخمیر را برای ۱۶ آزمایش (آرایه) نشان می دهد.

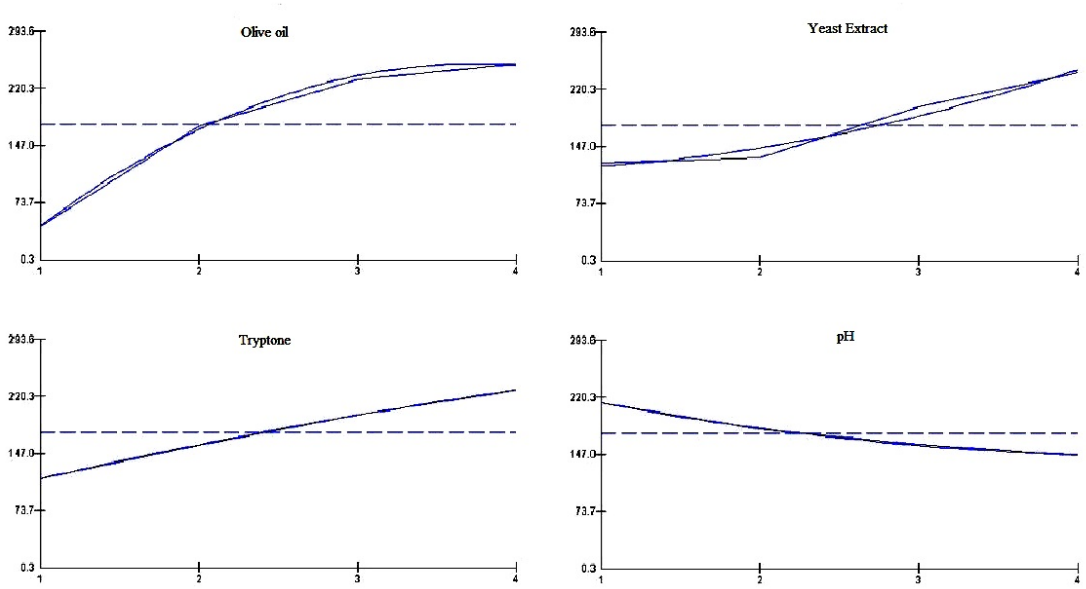
نتایج به دست آمده از آزمایشها که در شکل ۱ نمودار آنها رسم شده است جهت تجزیه و تحلیل استاندارد به نرم افزار Qualitek-4 وارد شد و اثر سطوح عوامل بر روی میزان تولید لیپاز محاسبه شد. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می گردد، در مورد روغن زیتون، عصاره مخمر و تریپتون با افزایش سطح، میزان تأثیر نیز افزایش می یابد. اما در مورد pH مشخص شد که این عامل در سطوح پایین تر یعنی سطوح اسیدی تأثیر بیشتری بر میزان تولید لیپاز دارد.

در ادامه برای بررسی بهتر و مشخص کردن بیشترین تأثیر عوامل اصلی بر روی تولید لیپاز تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار انجام شد. همان طور که جدول ۳ نشان می دهد مهم ترین شاخص تأثیر گذار بر تولید لیپاز، روغن زیتون در حدود ۵۳ درصد است و پس از آن عصاره مخمر، تریپتون و pH به ترتیب در حدود ۱۷، ۱۳ و ۴ درصد هستند.

پس از مشخص شدن فاکتورهای اصلی و تعیین اثرات متقابل بین سطوح آنها، نرم افزار آزمایشی را با توجه به تجزیه و تحلیلهای انجام شده برای دستیابی به حداکثر میزان تولید لیپاز پیشنهاد نمود که بر این اساس آزمایش تأییدی انجام شد (جدول ۴).




شکل ۱- نتایج تولید لیپاز برای ۱۶ آزمایش (آرایه) روش تاگوچی پس از ۷۲ ساعت از آغاز فرآیند تخمیر؛ محاسبه فعالیت آنزیمی با استفاده از رابطه Lipase activity (U/ml) = 50*((vs-vb)/15)*Fv*Fd صورت گرفت در این رابطه vs= میزان محلول تیتراسیون مصرفی برای نمونه؛ vb= میزان محلول تیتراسیون مصرفی برای شاهد؛ Fv= فاکتور حجم نمونه؛ Fd= فاکتور رقت نمونه است.




شکل ۲- تأثیر سطوح عوامل اصلی (روغن زیتون، عصاره مخمر و تریپتون، pH) بر روی متوسط تولید آنزیم لیپاز. خطوط منقطع نشانگر متوسط نتایج تولید لیپاز در آزمایشهای مختلف است.

جدول ۳- تجزیه و تحلیل آماری عوامل اصلی مؤثر بر روی تولید لیپاز

| عامل | (f) درجه آزادی | (S) مجموع مربعات | (V) واریانس | (F) نسبت F | (S'') جمع خالص | P(%) درصد |
|---|---|---|---|---|---|---|
| روغن زیتون | ۳ | ۲۱۴۳۹۸,۷۲۴ | ۷۱۴۶۶,۲۴۱ | ۴۵,۹۹۳ | ۲۰۹۷۳۷,۲۶۲ | ۵۳,۰۷۸ |
| عصاره مخمر | ۳ | ۷۲۷۶۱,۵۲۶ | ۲۴۲۵۳,۸۴۲ | ۱۵,۶۰۹ | ۶۸۱۰۰,۰۶۴ | ۱۷,۲۳۴ |
| تریپتون | ۳ | ۵۸۰۱۵,۵۲۷ | ۱۹۳۳۸,۵۰۹ | ۱۲,۴۴۵ | ۵۳۳۵۴,۰۶۵ | ۱۳,۵۰۲ |
| pH | ۳ | ۲۰۴۴۳,۷۷۵ | ۶۸۱۴,۵۹۱ | ۴,۳۸۵ | ۱۵۷۸۲,۳۱۳ | ۳,۹۹۴ |
| خطا | ۱۹ | ۲۹۵۲۲,۵۹۲ | ۱۵۵۳,۸۲ | | | ۱۲,۱۹۲ |
| **کل** | ۳۱ | ۳۹۵۱۴۲,۱۴۷ | | | | ۱۰۰ |

در طرح آزمایش پیشنهادی مقدار روغن زیتون ۲۰ گرم در لیتر، عصاره مخمر و تریپتون ۱۵ گرم در لیتر و pH برابر ۴ اعمال در نظر گرفته شد. پس از انجام این آزمایش، تولید حداکثری ۳۴۰ واحد لیپاز در میلی لیتر به دست آمد.

جدول۴- طرح آزمایش پیشنهادی توسط نرم افزار برای دستیابی به حداکثر میزان تولید لیپاز

| عامل | سطح تعریف شده | سطح | مشارکت عامل |
|---|---|---|---|
| روغن زیتون | ۲۰ | ۴ | ۷۷,۲۳۱ |
| عصاره مخمر | ۱۵ | ۴ | ۶۶,۷۳۱ |
| تریپتون | ۱۵ | ۴ | ۵۳,۹۸۱ |
| pH | ۴ | ۱ | ۳۸,۶۰۶ |

## بحث

*یاروویا لیپولیتیکا* یک مخمر هوازی و غیر بیماریزا است که توانایی رشد در محیطهای آب گریز را دارد. همچنین دارای قابلیت سوخت و ساز تری گلیسریدها و اسیدهای چرب به عنوان منبع کربن است (۲۱،۶). منبع کربن موجود در محیط کشت می تواند باعث تحریک تولید لیپاز شود و یا تولید آن را مهار کند (۱۲). محیطهای کشت حاوی مواد چرب مثل روغن زیتون، اسید اولئیک و... باعث القای تولید لیپاز می شوند (۹).

بهره وری بیشتر می تواند با بهینه سازی محیط کشت به دست آید. بهینه سازی میزان هر ترکیبی که در یک محیط کشت به کار می رود معمولاً یک روش وقت گیر است، اما بهینه سازی عوامل و متغیر های کلیدی از جمله منابع کربنی و نیتروژنی یک روش منطقی می باشد. چرا که منبع کربن از مهم ترین عامل مؤثر بر بیان و تولید لیپاز است (۱۵ و ۲۵). با تجزیه و تحلیلهای نرم افزار مشخص شد که سطح چهارم عوامل روغن زیتون، عصاره مخمر و تریپتون دارای بیشترین تأثیر ممکن می باشد و در مورد عامل pH ، بیشترین تأثیر ممکن مربوط به سطح اول این عامل است. نرم افزار Qualitek-4 قادر به محاسبه اثر متقابل عوامل مختلف به صورت دو به دو می باشد. برهمکنش بین عصاره مخمر و pH دارای بیشترین اهمیت بوده و اثر دو عامل روغن زیتون و pH دارای کمترین اهمیت ممکن بود.

روغن زیتون منبعی سرشار از اسید اولئیک است که باعث تنظیم مثبت بیان ژن مسئول تولید لیپاز می شود (۷). یکی از مباحث اصلی در هنگام بهینه سازی محیط کشت میکروارگانیسم ها، تعیین اثر عواملی است که می توانند رشد سلول میکروبی و یا ساخت متابولیتهای مورد نظر را به واسطه برهمکنشهای پیچیده تحت تأثیر قرار دهند (۵). در بیوتکنولوژی از روشهای آماری برای طراحی آزمایش و به تبع آن بهینه سازی استفاده می شود که باعث بهبود همزمان بسیاری از عوامل می شود و به این ترتیب تعداد آزمایشاتی که می بایست به انجام برسند بسیار کم خواهد شد (۲۶ و ۲۸). بهینه سازی به روش تاگوچی با توصیف آرایه های متعامد خطای آزمایش را تا حد زیادی کاهش داده و کارآیی و تکرار پذیری آزمایشات را افزایش می دهد (۲۴). از طراحی به این روش در زمینه های مختلف بیوتکنولوژی از قبیل بهینه سازی فرآیندهای تخمیری استفاده شده است (۲۳).

گالواگنو و همکارانش از دو روش کسری از فاکتوریل کامل پلاکت بورمن و ترکیب مرکزی برای بهینه سازی تولید توده سلولی و لیپاز از گلیسرول به عنوان منبع کربن توسط *یاررویا لیپولیتیکا* استفاده نمودند که بیشترین تولید بهینه شده لیپاز ۱۲ واحد در میلی لیتر بود (۱۰). کیشان و همکارانش نیز از روشهای پلاکت بورمن و ترکیب مرکزی برای بهینه سازی تولید لیپاز استفاده کردند و توانستند ۹/۴ واحد در میلی لیتر لیپاز تولید کنند (۱۸). گونکالوس و همکارانش با روش پاسخ سطح تولید لیپاز را بهینه نمودند و به حداکثر تولید ۱۳ واحد در میلی لیتر دست یافتند (۱۱). در این تحقیق از روش تاگوچی به عنوان یکی از روشهای طراحی آزمایش کسری از فاکتوریل استفاده شد و با کمترین تعداد آزمایش و صرف زمان کمتر تولید از حد متوسط ۱۷۴ واحد به حدود ۳۴۰ واحد در میلی لیتر در کشت بسته (batch) رسید.

برای غلبه بر مشکلات موجود در روشهای ستنی در زمینه بهینه سازی تولید لیپاز، می توان طرحهای آماری مختلفی مانند روش طراحی آزمایش به شیوه تاگوچی را به کار برد (۱۶). این روش طراحی آزمایش باعث کاهش هزینه و زمان بهینه سازی تولید می گردد. مطالعه و به کار گرفتن بهینه سازی تولید لیپاز سبب کاهش هزینه های تولید و زمینه ساز طیف گسترده تری از کاربردهای صنعتی می شود.

## سپاسگزاری

از ستاد توسعه زیست فناوری و مرکز رشد واحد های فناور مراغه وابسته به پارک علم و فناوری استان آذربایجان شرقی به خاطر حمایتهای مادی و معنوی سپاسگزاری و قدردانی می گردد.

## منابع

1. Amaral, P.F.F. De Almeida, A.P.R. Peixoto, T. Rocha-Leao, M.H.M. Coutinho, J.A.P. and Coelho, M.A.Z. 2007. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in

*Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 23(3): 339-344.

2. Barth, G. and Gaillardin, C. 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Reviews. 4(19): 219-237.

3. Casaregola, S. Neuveglise, C. Lepingle, A. Bon, E. Feynerol, C. Artiguenave, F. and et al. 2000. Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: *Yarrowia lipolytica*. FEBS Letters. 487(1): 95-100.

4. Darvishi, F. Destain, J. Nahvi, I. Thonart, P. and Zarkesh-Esfahani, H. 2011. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. New Biotechnology. 28(6):756-760

5. Fabiszewska, A.U. Kotyrba, D. and Nowa, D. 2015. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. Annals of Microbiology. 65( 3): 1495-1503.

6. Fickers, P. Benetti, P.H. Wache, Y. Marty, A. Mauersberger, S. Smit, M.S. and et al. 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Research. 5(6-7): 527-543.

7. Fickers, P. Destain, J. and Thonart, P. 2009. Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase production by fed-batch fermentation. Journal of Basic Microbiology. 49: 212–215.

8. Fickers, P. Marty, A. and Nicaud, J.M. 2011. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. Biotechnology Advances. 29(6): 632-644.

9. Freitas, L.B.T. Perez, V.H. Santos, J.C. and Castro, H.F. 2007. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23:1725-1731.

10. Galvagno, M.A. Iannone, L.J. Bianchi, J. Kronberg, F. Rost, E. Carstens, M.R. and et al. 2011. Optimization of biomass production of a mutant of *Yarrowia lipolytica* with an increased lipase activity using raw glycerol. Revista argentina de microbiología. 43:218-225.

11. Gonçalves, F.A.G. Colen, G. and Takahashi, J.A. 2013. Optimization of cultivation conditions for extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica* using response surface method. African Journal of Biotechnology. 12(17): 2270-2278.

12. Guerzoni, M.E. Lanciotti, R. Vannini, L. Galgano, F. Favati, F. Gardini, F. and et al. 2001. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. International Journal of Food Microbiology. 69(1-2): 79-89.

13. Guieysse, D. Sandoval, G. Faure, L. Nicaud, J.M. Monsan, P. and Marty, A. 2004. New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. Tetrahedron: Asymmetry. 15(22): 539-543.

14. Gupta, N. Sahai, V. and Gupta, R. 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization New Microsoft Word Document.docxand production in a bioreactor. Process Biochemistry. 42(4): 518-526.

15. Gupta, R. Gupta, N. and Rathi P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology. 64(6): 763-781.

16. Houng, J.Y.L. Wu, J.Y. Shen, S.C. and Hsu, H.F. 2006. Enhancement of asymmetric bioreduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by the design of composition of culture medium and reaction conditions. Process Biochemistry. 42: 1-7.

17. Joseph, B. Ramteke, P.W. and Thomas, G. 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. Biotechnology Advances. 26(5): 457-470.

18. Kishan, G. Gopalakannan, P. Muthukumaran, C. Thirumalai, K. Dharmendira K.M. and Tamilarasan K. 2013. Statistical optimization of critical medium components for lipase production from *Yarrowia lipolytica* (MTCC 35). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 11(2): 111-116.

19. Mafakher, L. Mirbagheri, M. Darvishi, F.Nahvi, I. Zarkesh-Esfahani, H. and Emtiazi G. 2010. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. New Biotechnology. 27(4): 337-340

20. Menoncin, S. Domingues, N.M. Freire, D.M. G. Toniazzo, G. Cansian, R.L. Oliveira, J.V. and et al. 2010. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state

fermentationof soybean bran. Food and Bioprocess Technology. 3(4): 537-544.

21. Papanikolaou, S. Chevalot, I. Galiotou-Panayotou, M. Komaitis, M. Marc, I. and Aggelis G. 2007. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. Electronic Journal of Biotechnology. 10(3): 425-435

22. Pereira-Meirelles, F.V. Rocha-Leao, M.H.M. and Sant'Anna, G.L. 2000. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. Biotechnology Letters. 22(1): 71-75.

23. Prasad, M.V.S. Rao, S.R. Pati, B.R. and Sarma, P.N. 2005, Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. Biochem Eng J. 24: 17-26.

24. Rao, S.R. Prakasham, S. and Hobbs. P.J. 2008. The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: A critical appraisal. Biotechnol J. 3: 510-523.

25. Sharma, R. Chisti, Y. and Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances. 19(8):627-662.

26. Teng, Y.X.Y. 2008. Culture conditions improvement for wholecell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. Bioresour Technol. 99: 3900-3907.

27. Vakhlu, J. and Kour, A. 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic Journal of Biotechnology. 9(1):69-85.

28. Wang, D.X.Y. and Shan, T. 2008. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizupus chinesis* and optimization of the lipase fermentation media. Biochem Eng. 41:30–37.

29. Yu, M.R. Lange, S. Richter, S. Tan, T.W. and Schmid, R.D. 2007. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. Protein Expression and Purification. 53(2): 255-263.

30. Yu, M.R. Qin, S.W. and Tan, T.W. 2007. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. Process Biochemistry. 42(3): 384-391.

# Optimization of *Yarrowia lipolytica* lipase production by Taguchi experiment design method

**Darvishi F.[1], Hosseini B.[1] and Fathirezaei P.[2]**

**[1] Microbial Biotechnology Dept., University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran**

**[2] Biochemistry Dept., University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran**

## Abstract

Introduction: Lipase (EC 3.1.1.3) is one of the most important classes of industrial enzymes. The non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* is non-pathogenic to humans and is known as safe for some industrial processes. This yeast can produce different types of lipase. Extracellular lipase production depends on medium composition and environmental conditions. Materials and Methods: Olive oil as carbon source, yeast extract and tryptone as nitrogen sources and pH in different levels were optimized for lipase production by mutant strain *Yarrowia lipolytica* FDY1390 with Taguchi experiment design method. Qualitek-4 software was used to Taguchi experiment design method. Results: The highest level of lipase production (340 U/mL) was obtained in medium containing 20 g/L Olive oil, 15 g/L yeast extract and tryptone, pH 4 after 72 h of fermentation process. Conclusion: Optimization of lipase production reduces the cost and various industries use this enzyme.

**Key words**: Lipase, *Yarrowia lipolytica*, Optimization, Experiment design, Taguchi method.