

Optimization of recombinant laccase production by *Yarrowia lipolytica* in a medium containing glucose as carbon source with Taguchi method

Farshad Darvishi*

Associate Professor of Microbiology, University of Maragheh, Iran, f.darvishi@ymail.com

Marzie Moradi

M.Sc. of Microbial Biotechnology, University of Maragheh, Iran, marzie.moradi88@gmail.com

Catherine Madzak

Professor of Microbiology, University of Paris, France, catherin.madzak@grignon.inra.fr

Claude Jolivald

Professor of Biochemical Engineering, University of Sorbonne, France, claud.jolivald@upmc.fr

Abstract

Introduction: Laccases (EC 1.10.3.2; benzenediol: oxygen oxidoreductase) are copper-containing oxidases that use molecular oxygen to oxidize various aromatic and non-aromatic compounds. Laccase is applied in delignification of lignocellulosic compounds for production of bioethanol, bioremediation of industrial wastewaters especially textile, food industries, and making biosensors.

Materials and methods: The Taguchi experimental design method was used for optimization of laccase production in recombinant strain *Yarrowia lipolytica* YL4. A L-16 Taguchi orthogonal array was used to optimize the carbon and nitrogen sources along with vitamin in four levels.

Results: The results showed that glucose, ammonium chloride, yeast extract and thiamine have significant effects on the production of laccase, respectively. The laccase activity reached to 1.52 U/mL after optimization of medium which is 7.6-fold higher than un-optimized medium.

Discussion and conclusion: According to the analysis of results, the Taguchi experimental design method is a successful approach to increase laccase and recombinant proteins production in *Y. lipolytica*.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, laccase, optimization, Taguchi experimental design method

* Corresponding author

Received: September 28, 2016 / **Accepted:** March 8, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحه ۴۹-۵۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸

بهینه‌سازی تولید آنزیم لاکاز نوترکیب توسط مخمر یارروویا لیپولیتیکا در محیط کشت حاوی گلوکز به عنوان منبع کربن با روش تاگوچی

فرشاد درویشی*: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه مراغه، ایران، f.darvishi@gmail.com
مرضیه مرادی: کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه مراغه، ایران، marzie.moradi88@gmail.com
کاترین مادزاک: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه پاریس، فرانسه، catherin.madzak@grignon.inra.fr
کلاد جولیت: استاد مهندسی بیوشیمی، دانشگاه سوربون، فرانسه، claud.jolivald@upmc.fr

چکیده

مقدمه: لاکازها از جمله آنزیم‌های اکسیداز حاوی مس هستند که اکسیژن مولکولی را برای اکسید کردن ترکیبات مختلف آروماتیک و غیر آروماتیک استفاده می‌کنند. لاکاز در لیگنین زدایی ترکیبات لیگنوسولوزی برای تولید بیواتانول، زیست پالایی پساب‌های صنعتی به ویژه صنایع منسوجات و غذایی و همچنین ساخت زیست‌حسگرها به کار برده می‌شود.

مواد و روش‌ها: روش طراحی آزمایش تاگوچی برای بهینه‌سازی تولید لاکاز در سویه مخمر نوترکیب یارروویا لیپولیتیکا YL4 و آرایه متعامد شانزده تایی تاگوچی برای بهینه کردن منابع کربن و نیتروژن همراه با ویتامین در چهار سطح استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که به ترتیب گلوکز، کلرید آمونیوم، عصاره مخمر و ویتامین روی تولید لاکاز اثر بسیاری دارند. فعالیت لاکاز پس از بهینه‌سازی محیط کشت به ۱/۵۲ واحد در میلی‌لیتر رسید که بیش از ۷/۶ برابر محیط کشت غیربهینه است.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس تجزیه و تحلیل نتایج، روش طراحی آزمایش تاگوچی رویکرد موفقی برای افزایش تولید لاکاز و پروتئین‌های نوترکیب در مخمر یارروویا لیپولیتیکا است.

واژه‌های کلیدی: یارروویا لیپولیتیکا، لاکاز، بهینه‌سازی، روش طراحی آزمایش تاگوچی

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

لاکاز (بنزودیول اکسیژن اکسیدوردو کتاز، EC 1.10.3.2) از آنزیم‌های اکسیدوردو کتاز حاوی مس است که اکسیژن مولکولی را برای اکسید کردن ترکیبات آروماتیک و غیر آروماتیک استفاده می‌کند (۱). لاکازها، گلیکوپروتئین‌های دایمر یا تترامری هستند که چهار اتم مس به ازای هر مونومر دارند (۲).

لاکاز در رنگ‌زدایی رنگ‌های صنعتی در پساب‌ها، اکسیداسیون و حذف ترکیبات فنلی و زئوبیوتیک‌ها کاربرد (۳ و ۴) و توانایی دپلمریزه کردن لیگنین را دارد (۵). به‌تازگی، کاربرد لاکاز به‌عنوان کاتالیزور زیستی در سنتز ترکیبات آلی درخور توجه بسیار شده است و این آنزیم با داشتن توانایی پلیمریزه کردن مواد، در صنایع غذایی کاربرد دارد (۶). نخستین بار یوشیدا در سال ۱۸۸۳، لاکاز را در شیرابه درختان لاکی چینی یا ژاپنی کشف کرد که به وفور در بافت‌های گیاهان یافت می‌شود. شناسایی و خالص‌سازی لاکاز از عصاره گیاهی خام دشوار است و بنابراین، لاکازهای گیاهی کمتر شناخته و استفاده شده‌اند. لاکازهای قارچی بیشتر در بازیدیوماست‌ها و آسکوماست‌ها یافت می‌شوند (۷) و (۸).

یارروویا به خانواده همی آسکوماست‌ها تعلق دارد که در پژوهش‌های بنیادی و زیست‌فناوری طی دهه‌های گذشته به آن توجه شده است (۹ و ۱۰). سویه یارروویا لیپولیتیکا از محیط‌های مختلفی مانند محیط‌های غنی از لیپید یا محیط‌های دریایی و شور جداسازی و توانایی آن در تجزیه پروتئین‌ها و لیپیدها با تولید لیپازهای خارج سلولی و فعالیت‌های پروتئولیتیکی به‌روشنی مشاهده شده است. بیشتر سویه‌های یارروویا در دماهای بیشتر از ۳۲ درجه سانتی‌گراد رشد نمی‌کنند و به‌شدت

هوازی هستند (۱۱-۱۳). مخمر یارروویا لیپولیتیکا میزبان یوکاریوتی جذاب برای تولید پروتئین‌های هترولوگ است و گنجایش ترش‌چی زیادی برای پروتئین‌های هترولوگ و نوترکیب دارد (۱۴ و ۱۵).

طراحی آزمایش به یافتن ارتباط بین عوامل آزمایش‌شده و تولید محصول کمک می‌کند (۱۶). روش تاگوچی شامل طراحی سیستم، طراحی عامل و طراحی تعادل فرایندهاست تا فرایند به بهترین کیفیت محصول منتج شود. مزیت عمده روش تاگوچی استفاده از طراحی عوامل است که روشی مهندسی برای طراحی فرایند یا محصول با تمرکز روی تعیین عوامل است تا بهترین سطوح شاخص کیفیت را با حداقل خطا ایجاد کند. روش تاگوچی روشی کارا و قوی برای طراحی فرایندهایی است که به‌شکل مداوم و بهینه در شرایط گوناگون عمل می‌کنند (۱۷).

هدف پژوهش حاضر، بهینه‌سازی تولید آنزیم نوترکیب لاکاز در محیط کشت حاوی گلوکز (منبع کربن) توسط مخمر یارروویا لیپولیتیکا با روش تاگوچی است.

مواد و روش‌ها

ریز موجودات استفاده‌شده و نگهداری آنها: لاکاز قارچ پوسیدگی سفید ترمس ورسیکالر^۱ (lacIIIb) با همکاری گروه پژوهشی کاترین مادزاک^۲ در مرکز ملی پژوهش‌های کشاورزی فرانسه (INRA) و کلاد جولولت^۳ در دانشگاه سوربون فرانسه با وکتور کامل بیانی/ترش‌چی بر پایه پروموتور هیبرید قوی در مخمر یارروویا لیپولیتیکا بیان شده است. میزان لاکازی که مخمر نوترکیب یارروویا لیپولیتیکا سویه YL4 تولید می‌کند، حدود ۰/۲ واحد در میلی‌لیتر گزارش شده است

محیط کشت تولید لاکاز یعنی محیط کشت^۶ PPB (حاوی ۲۰ گرم گلوکز، ۰/۳۲ گرم عصاره مخمر، ۱/۳۲ گرم دی‌هیدروژن پتاسیم فسفات، ۱/۳۲ گرم کلرید آمونیم، ۰/۱۳۲ گرم سولفات منیزیم، ۰/۳۳۴ میلی‌گرم تیامین در لیتر) به مقدار ۵۰ میلی‌لیتر در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری به میزان ۱ درصد تلقیح شد. نمونه برداری برای شمارش سلول‌های مخمر و سنجش فعالیت لاکاز انجام شد و سپس ارلن‌های تلقیح‌شده به شیکر-انکوباتور با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و دور چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه منتقل شدند و در مدت ۷ روز، هر ۲۴ ساعت نمونه برداری برای بررسی میزان رشد مخمر و سنجش تولید لاکاز در شرایط استریل انجام شد (۱۸).

طراحی آزمایش به روش تاگوچی: برای طراحی

آزمایش از نرم‌افزار (Qualitek- (Nutek Inc., MI) استفاده شد. در این روش، ابتدا عامل و سطوح پیش‌بینی و وارد نرم‌افزار می‌شوند. پس از وارد شدن نتایج آزمایش حاصل از سه تکرار، نرم‌افزار داده‌ها را با روش میانگین تجزیه و تحلیل و مقدار بهینه را برای عامل پیشنهاد می‌کند و بر اساس آن باید آزمایش تأییدی انجام شود. عامل اصلی پژوهش حاضر، مقدار گلوکز (منبع کربن)، عصاره مخمر و کلرید آمونیم (منابع نیتروژن) و ویتامین تیامین در چهار سطح بود که مقادیر در نرم‌افزار وارد شدند (جدول ۱) و بر اساس آنها، نرم‌افزار شانزده آزمایش را پیشنهاد کرد (جدول ۲). ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت طبق جدول ۲، در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و اتوکلاو شد. در شرایط استریل، ۱ درصد مایع تلقیح از سویه مخمر به همه محیط‌ها اضافه شد. سپس ارلن‌ها به درون انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه منتقل شدند و هر ۲۴ ساعت طی ۷ روز در شرایط

(۱۴ و ۱۸). سویه مخمر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون محیط کشت YPD (حاوی ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۲۰ گرم در لیتر گلوکز و پیتون در لیتر) به مدت ۶ ماه نگهداری می‌شود (۱۹).

سنجش فعالیت لاکاز: سنجش استاندارد فعالیت

لاکاز با اندازه‌گیری اکسیداسیون آنزیمی^۴ ABTS در ۴۲۰ نانومتر ($\epsilon = 3/6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) برای محصول اکسیدشده انجام می‌شود (۱۸). برای تهیه محلول رویی حاوی آنزیم، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل به ۵۰ میکرولیتر ABTS ۱ میلی‌مولار در بافر سیتریک اسید/هیدروژن فسفات دی‌سدیم (۰/۱ مولار با اسیدیت ۳) با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اشباع شده با هوا اضافه شد. سینتیک فعالیت آنزیم با دستگاه اسپکتروفتومتری طی ۱ دقیقه و در طول موج ۴۲۰ نانومتر بررسی شد. ۱ واحد در میلی‌لیتر (U/mL) فعالیت آنزیم، مقداری از آنزیم است که ۱ میکرومول از ABTS را طی ۱ دقیقه و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اکسید می‌کند (۱۸).

سنجش میزان رشد: برای بررسی و اندازه‌گیری

میزان رشد مخمرها از روش مستقیم شمارش با لام نوبار استفاده شد (۲۰).

فرایند تخمیر تولید لاکاز در ارلن: ابتدا سویه مخمر

در شرایط استریل روی محیط کشت YPD^۵ جامد کشت و برای مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس در شرایط استریل، یک کلنی به ۲۰ میلی‌لیتر محیط YPD مایع در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد و درون انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و دور چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، مایه تلقیح آماده شد.

نتایج

برای بهینه‌سازی تولید لاکاز در محیط کشت PPB حاوی گلوکز، طراحی آزمایش به روش تاگوچی برای تعیین سطوح مناسب عوامل اصلی استفاده شد. در روش تاگوچی، چهار عامل گلوکز، عصاره مخمر، کلرید آمونیم و تیامین در چهار سطح، عوامل اصلی در نظر گرفته شدند (۱۸). اثر گلوکز به عنوان منبع کربن و عامل اول در محدوده ۵۰ تا ۲۰۰ گرم در لیتر (در چهار سطح ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم در لیتر)، کلرید آمونیم و عصاره مخمر به عنوان منابع نیتروژن و به ترتیب عامل دوم و سوم در محدوده غلظت‌های ۱ تا ۴ گرم در لیتر (در چهار سطح ۱، ۲، ۳ و ۴ گرم در لیتر) و تیامین به عنوان تیامین و عامل چهارم در محدوده ۰ تا ۰/۹ میلی گرم در لیتر (در چهار سطح ۰، ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی گرم در لیتر) روی تولید لاکاز بررسی شد. این عوامل و سطوح آنها به نرم‌افزار Qualiteck-4 وارد شدند و نرم‌افزار، شانزده آزمایش را پیشنهاد کرد. پس از ساخت محیط کشت‌ها و تلقیح و گذشت ۶ روز که زمان اوج تولید است، سنجش لاکاز انجام و نتایج به نرم‌افزار وارد شد. میزان تولید لاکاز برای شانزده آزمایش پیشنهادی نرم‌افزار پس از شش روز در شکل ۱ دیده می‌شود.

نتایج آزمایش‌ها با نرم‌افزار تجزیه و تحلیل و مطابق شکل ۲ مشخص شد که سطح دو گلوکز (۱۰۰ گرم در لیتر)، سطح دو عصاره مخمر (۲ گرم در لیتر)، سطح سه کلرید آمونیم (یعنی ۳ گرم در لیتر) و سطح سه تیامین (۰/۶ میلی گرم در لیتر)، سطوح مناسب چهار عامل مؤثر در محیط کشت برای تولید لاکاز هستند.

استریل از ارلن‌ها نمونه‌برداری شد تا تعداد مخمرها و میزان تولید آنزیم بررسی شود. پس از انجام آزمایش‌ها، مطابق با آنچه نرم‌افزار با در نظر گرفتن سهم هر یک از عوامل در آزمایش در نظر می‌گیرد، مقدار سطوح بهینه هر عامل پیشنهاد می‌شود.

آزمایش‌ها برای سطوح مختلف منبع کربن (گلوکز)، منابع نیتروژن (کلرید آمونیم و عصاره مخمر) و تیامین تیامین مشخص شده در جدول ۱ طراحی شده‌اند.

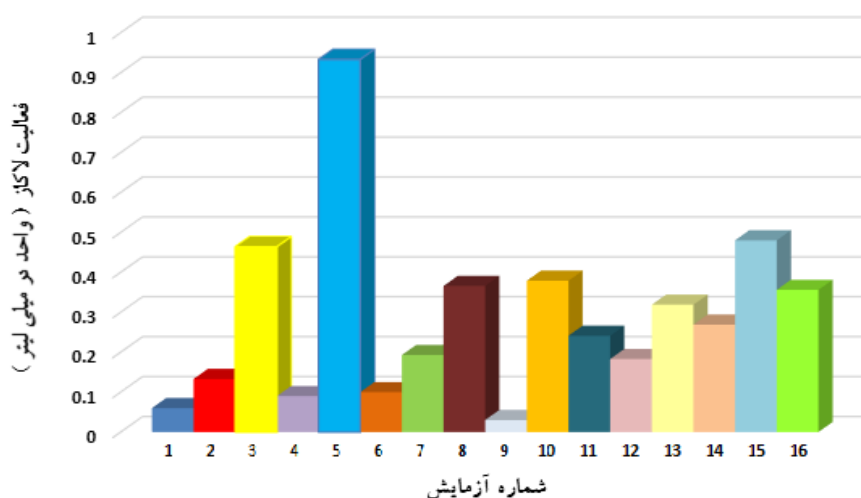
جدول ۱- عوامل و سطوح منتخب برای بهینه‌سازی به روش تاگوچی

عامل	سطح یک	سطح دو	سطح سه	سطح چهار
گلوکز	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰
کلرید آمونیم	۱	۲	۳	۴
عصاره مخمر	۱	۲	۳	۴
تیامین	۰	۰/۳	۰/۶	۰/۹

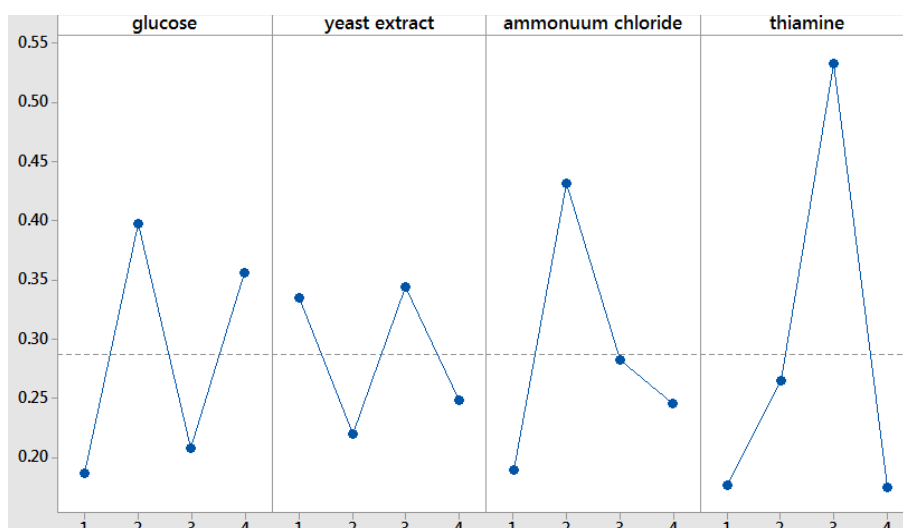
سطوح برای گلوکز، کلرید آمونیم، عصاره مخمر گرم بر لیتر و برای تیامین میلی گرم در لیتر است.

جدول ۲- آزمایش‌های طراحی شده (آرایه‌های متعامد M-16) به روش تاگوچی

شماره آزمایش	منبع کربن	کلرید آمونیم	عصاره مخمر	تیامین
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



شکل ۱- نتایج تولید لاکاز برای شانزده آزمایش طراحی شده به روش تاگوچی در محیط PPB حاوی گلوکز پس از ۶ روز



شکل ۲- اثر اصلی تغییر سطح هر یک از عوامل بر روند بهینه‌سازی تولید لاکاز توسط مخمر یارروویا لیپولیتیکا سویه YL4

لاکاز دارند.

جدول ۳- برهم کنش چهار عامل گلوکز، کلرید آمونیم، عصاره مخمر و تیامین بر تولید لاکاز

شماره	عوامل برهمکنش دهنده	ستون‌ها	درصد اهمیت
۱	گلوکز × کلرید آمونیم	۱ × ۲	۵۰/۱۶
۲	کلرید آمونیم × عصاره مخمر	۲ × ۳	۴۶/۵۱
۳	گلوکز × عصاره مخمر	۱ × ۳	۴۲/۰۸
۴	کلرید آمونیم × تیامین	۲ × ۴	۲۱/۸۷
۵	عصاره مخمر × تیامین	۳ × ۴	۱۲/۷۹
۶	گلوکز × تیامین	۱ × ۴	۵/۵۳

جدول ۳، تأثیر هر سطح از هر عامل را بر تولید بهینه

لاکاز در سویه یادشده نشان می‌دهد؛ مطابق این جدول، برهم کنش گلوکز و کلرید آمونیم با ۵۰ درصد اثر، بیشترین تأثیر را بر تولید لاکاز داشته است و پس از آن، اثر برهم کنش کلرید آمونیم و عصاره مخمر با مقدار ۴۶ درصد در جایگاه دوم قرار دارد. برهم کنش گلوکز و عصاره مخمر اثری برابر ۴۲ درصد، برهم کنش عصاره مخمر و تیامین ۱۲ درصد تأثیر و در نهایت، برهم کنش گلوکز و تیامین با ۵/۵ درصد کمترین تأثیر را بر تولید

آرایه‌های متعامد در طراحی آزمایش‌ها انتخاب شدند. نرم‌افزار Qualitek-4، هجده مجموعه آزمایش را طراحی کرد که شرایط بهینه پیش‌بینی شده نرم‌افزار اسیدیته ۴/۵، گلوکز ۱ درصد وزن بر حجم، سبوس گندم ۲ درصد وزن بر حجم، سیترات آمونیم ۰/۰۲ درصد، مایع تلقیح ۵ درصد، عصاره مخمر ۱ درصد، سولفات مس ۰/۵ میلی‌مولار و محلول نمک‌های معدنی ۱۵ درصد بود؛ با این شرایط بهینه پیش‌بینی شده، میزان تولید لاکاز به اندازه ۵۶/۷۶ درصد افزایش یافت (۲۳).

پاتل و همکاران، اهمیت منابع کربن و نیتروژن و تأثیر آنها بر تولید لاکاز توسط سویه پلوروتوس آستریتوس را بررسی کردند. تأثیر منابع کربن و نیتروژن بر میزان لاکازی که قارچ‌های تولیدکننده لاکاز تولید می‌کنند، اهمیت بسیاری دارد. پژوهش‌های بسیاری درباره اهمیت نوع و غلظت منابع نیتروژن با هم توافق دارند و این پارامتر تنظیم‌کننده قوی در تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیگنین توسط بازیدیمایست‌های پوسیدگی چوب است. غلظت‌های متفاوت کربن، میزان فعالیت لاکاز مختلفی را نشان می‌دهند؛ زمانی بیشترین فعالیت لاکاز به میزان ۳ واحد در میلی‌گرم حاصل شد که گلوکز به میزان ۱ درصد در محیط وجود داشت. غلظت‌های استفاده‌شده نیتروژن در محیط، آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیگنین را تنظیم می‌کنند؛ سطح کم نیتروژن، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیگنین را تحریک و سطح زیاد نیتروژن، تولید را محدود می‌کند. پژوهش‌های مشابه درباره غلظت نیتروژن، نتایج گفته‌شده را تأیید می‌کنند (۲۴). در پژوهش حاضر، گلوکز (منبع کربن) و عصاره مخمر و کلرید آمونیم (منابع نیتروژن) و تیامین (ویتامین و تحریک‌کننده رشد) برای افزایش تولید لاکاز نوترکیب توسط مخمر یاررویا لیپولیتیکا بهینه شدند و نتایج برای بهینه‌سازی و افزایش پروتئین‌های نوترکیب با سیستم بیانی مخمر یاررویا لیپولیتیکا استفاده می‌شوند.

روش تاگوچی، بهینه‌سازی پیچیده فرایندهای زیستی را تسهیل و به آسانی اثر هر عامل را بر پایه رابطه بین متغیرها و شرایط بهینه شناسایی می‌کند. پس از مشخص شدن عوامل اصلی و سطوح مناسب آنها، نرم‌افزار آزمایشی را برای بیشترین تولید لاکاز پیشنهاد کرد؛ در طرح پیشنهادی مقدار گلوکز ۱۰۰ گرم در لیتر، کلرید آمونیم ۳ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۲ گرم در لیتر و تیامین ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شد. بهینه‌سازی محیط تخمیر برای رشد بهینه میکروبی و افزایش تولید آنزیم انجام می‌شود (۲۱). نرم‌افزار، بیشترین مقدار تولید آنزیم لاکاز مورد انتظار را ۰/۸۴۳ واحد در میلی‌لیتر پیش‌بینی کرده بود؛ با انجام آزمایش بر اساس عوامل و سطوحی که نرم‌افزار پیشنهاد کرد، تولید لاکاز به ۱/۵۲ واحد در میلی‌لیتر رسید که میزان تولید نسبت به محیط کشت PPB غیربهینه، ۷/۶ برابر شد.

بحث و نتیجه‌گیری

سینگهال و همکاران از روش تاگوچی برای بهینه‌سازی تولید لاکاز در قارچ کریپتوکوکوس آلییدوس استفاده کردند. مقادیر تعیین‌شده نرم‌افزار برای اسیدیته به میزان ۶، گلوکز (منبع کربن) به مقدار ۰/۱ درصد، پیتون گوشت (منبع نیتروژن) به مقدار ۰/۵ درصد، سولفات مس به مقدار ۲ میلی‌مول بر لیتر و مایع تلقیح به مقدار ۱ درصد بود. پس از بهینه‌سازی، میزان تولید لاکاز به ۲ واحد در میلی‌لیتر افزایش یافت. مایع تلقیح با حدود ۵۲ درصد، بیشترین تأثیر و اسیدیته با مقدار ۷ درصد، کمترین تأثیر را بر تولید لاکاز داشتند (۲۲).

در مطالعه دیگری شرایط کشت غوطه‌ور برای اینکه سویه تریکودرما اسپرلوم، لاکاز تولید کند با آرایه‌های متعامد تاگوچی بهینه‌سازی شد. عوامل اسیدیته، گلوکز، سبوس گندم، سیترات آمونیم، میزان مایع تلقیح، عصاره مخمر، سولفات مس و محلول نمک‌های معدنی در سطوح

References

- (1) Hou H., Zhou J., Wang J., Du C., Yan B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry* 2004; 39(11): 1415-1419.
- (2) Dwivedi UN., Singh P., Pandey VP., Kumar A. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2011; 68(2): 117-128.
- (3) Kunamneni A., Plou FJ., Ballesteros A., Alcalde M. Laccases and their applications: A patent review. *Recent Patents on Biotechnology* 2008; 2(1): 10-24.
- (4) Mougin C., Jolivald C., Briozzo P., Madzak C. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemistry Letters* 2003; 1(2): 145-148.
- (5) Pannu JS., Kapoor RK. Microbial laccases: A mini-review on their production, purification and applications. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive* 2014; 3(12): 528-236.
- (6) Shraddh A., Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A. Laccase: Microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. *Enzyme Research* 2011; 2011: 1-11.
- (7) Strong PJ., Claus H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2011; 41(4): 373-434.
- (8) Madzak C., Otterbein L., Chamkha M., Moukha S., Asther M., Gaillardin C., et al. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 2005; 5(6-7): 635-646.
- (9) Darvishi F., Hosseini B. Effect of olive oil with different purity grades on *Yarrowia lipolytica* lipase production. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 13: 35-42.
- (10) Madzak C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015; 99(11): 4559-4577.
- (11) Flagfeldt DB., Siewers V., Huang L., Nielsen J. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2009; 26(10): 545-551.
- (12) Darvishi Harzevili F. Biotechnological applications of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Springer Berlin Heidelberg 2014; 1-77.
- (13) Darvishi F., Hosseini B. Investigation the effect of olive oil feeding strategies on *Yarrowia lipolytica* lipase production. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 15: 1-8.
- (14) Theerachat M., Emond S., Cambon E., Bordes F., Marty A., Nicaud JM., et al. Engineering and production of laccase from *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 2012; 125: 267-74.
- (15) Madzak C., Gaillardin C., Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: A review. *Journal of Biotechnology* 2004; 109(2): 63-81.
- (16) Myers WR., Montgomery DC. Response surface methodology. *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics* 2003, 1: 858-869.
- (17) Semioshkina N., Voigt G. An overview on Taguchi method. *Journal of Radiation Research* 2006; 47(2): 11-18.
- (18) Madzak C., Mimmi MC., Caminade E., Brault A., Baumberger S., Briozzo P., et al. Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. *Protein Engineering, Design and Selection* 2005; 19(2): 77-84.

- (19) Bergman LW. Growth and maintenance of yeast. *Methods in Molecular Biology* 2001; 177: 9-14.
- (20) Darvishi F., Destain J., Nahvi I., Thonart P., Zarkesh-Esfahani H. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. *New Biotechnology* 2011, 28(6): 756-760.
- (21) Periasamy R., Palvannan T. Optimization of laccase production by *Pleurotus ostreatus* IMI 395545 using the Taguchi DOE methodology. *Journal of Basic Microbiology* 2010; 50(6): 548-556.
- (22) Singhal A., Choudhary G., Thakur IS. Optimization of growth media for enhanced production of laccase by *Cryptococcus albidus* and its application for bioremediation of chemicals. *Journal of Civil Engineering* 2009; 36(7): 1253-1264.
- (23) Sabarathinam S., Jayaraman V., Balasubramanian M., Swaminathan K. Optimization of culture parameters for hyper laccase production by *Trichoderma asperellum* by Taguchi design experiment using L-18 orthogonal array. *Malaya Journal of Biosciences* 2014; 1(4): 214-225.
- (24) Patel H., Gupte A., Gupte S. Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources* 2009; 4(1): 268-284.

¹ *Trametes versicolor*

² Catherine Madzak

³ Claude Jolival

⁴ [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]
or ABTS

⁵ Yeast extract peptone dextrose (YPD)

⁶ Protein production broth (PPB)