

تولید و بهینه‌سازی کوچیک اسید توسط قارچ اسپرژیلوس ایزوله‌شده بومی با

روش Response Surface

مهدی شهریاری نور^{۱*} (Ph.D)، فرید عزیزی جلیلیان^۲ (Ph.D)، حسینعلی صفاخواه^۳ (M.Sc)

۱- گروه زیست‌شناسی، میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، رشت، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۳- مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: کوچیک اسید، با ساختار شیمیایی ۵-هیدروکسی-۲-هیدروکسی متیل-۷-پیرون یک اسید آلی است که در طی فرآیند تخمیر هوازی با استفاده از سوبستراهای گوناگون، توسط انواع مختلفی از قارچ‌ها، به‌طور زیستی تولید می‌شود. در این مطالعه تولید و بهینه‌سازی کوچیک اسید توسط قارچ اسپرژیلوس ایزوله‌شده بومی با روش Response Surface پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از روش تخمیر در کشت غوطه‌ور به منظور تولید کوچیک اسید توسط سویه جداسازی شده از جنس اسپرژیلوس به‌کار گرفته شد. بررسی اولیه با استفاده از طراحی Plackett-Burman از میان منابع مختلف نیتروژن مورد آزمایش شامل عصاره مخمر، پپتون، سولفات آمونیوم، کلرید آمونیوم و اوره و منابع مختلف کربن شامل فروکتوز، ساکاروز، گلوکز، لاکتوز، مالتوز در تولید کوچیک اسید بررسی گردید.

یافته‌ها: بر اساس آزمایشات انجام شده، پپتون و گلوکز موثرترین فاکتور از نظر منابع کربن و نیتروژن در تولید کوچیک اسید مشاهده گردیدند ($p < 0.05$). در مرحله بعدی بهینه‌سازی طی بررسی تاثیر فاکتورهای محیطی از قبیل دما و pH و همچنین پپتون و گلوکز به عنوان منابع کربن و نیتروژن در تولید کوچیک اسید با به‌کارگیری روش Response Surface ۳۴/۴ گرم در لیتر حاصل شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصله برای به‌دست آوردن حداکثر تولید کوچیک اسید باید میزان گلوکز ۰/۷۱/۸٪، پپتون ۴/۳۷٪، دما ۹/۲۹ درجه سانتی‌گراد و pH=۶/۷۵ در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: کوچیک اسید، بهینه‌سازی، اسپرژیلوس

مقدمه

بسیاری از کشورها استفاده می‌شود، گرفته شده است. ساختار شیمیایی آن به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفت و به عنوان ۵-هیدروکسی-۲-هیدروکسی متیل-۷-پیرون شناخته شد [۵]. از کاربردهای کوچیک اسید در پزشکی می‌توان به خواص آنتی‌باکتریال، ضد قارچ و سرکوب‌کننده درد [۶-۸] در فرآورده‌های غذایی به عنوان افزایش‌دهنده طعم و

کوچیک اسید، یک اسید آلی است که در طی فرآیند تخمیر هوازی با استفاده از سوبستراهای گوناگون، توسط انواع مختلفی از قارچ‌ها، به طور زیستی تولید می‌شود [۱-۴]. نام کوچیک اسید از کلمه "کوچی"، شروع‌کننده قارچی یا ماده تلقیحی که در بسیاری از کارخانجات تولید غذاهای شرقی در

گلوکز (۷۰ g/l)، KH_2PO_4 (۱ g/l)، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (۱/۲۵)، محیط کشت مغذی آگار با افزودن ۸ g/l آگار به محیط برات فوق به دست می‌آید. جهت جداسازی قارچ‌های هیدرولیزکننده نشاسته، محیط کشت باید حاوی ۱۰ g/l نشاسته ذرت، ۵ g/l عصاره مخمر و ۱۸ g/l آگار باشد. محیط کشت جهت جداسازی سویه‌های تولیدکننده کوچیک اسید شامل گلوکز (۱۰ g/l)، KH_2PO_4 (۱ g/l)، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (۱/۲۵)، پیتون (۱۰/۵ g/l) PH. محیط ۳/۵ با استفاده از HCl یک مولار قبل از استریل کردن تنظیم شود.

جهت جداسازی سویه مناسب نمونه‌های گرفته شده از خاک را در محیط برات مغذی به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌نماییم. از هر یک از نمونه‌های برات یک لوپ بر روی محیط نشاسته آگار به صورت خطی کشت داده و سپس به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌نماییم. مقدار اندکی ید جامد را در داخل پلیتی که به صورت معکوس قرار گرفته گذاشته تا سطح محیط کشت در معرض بخار ید متصاعد شده قرار گرفته و هاله روشنی در اطراف کلنی‌ها مشاهده شود. تک کلنی انتخاب شده جهت انجام آزمایشات بعدی و تولید اسپور را به محیط مغذی آگاردار منتقل می‌نماییم. سویه‌های جدا شده هیدرولیزکننده نشاسته جهت تولید کوچیک اسید سپس تلقیح اسپورها در لوله‌های ۱۶ میلی‌متری شامل ۱۰ ml محیط گلوکز- پیتون صورت می‌گیرد. گونه جدا شده تولیدکننده کوچیک اسید جهت کشت مجدد در محیط مغذی آگاردار به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌نماییم. جهت تهیه مایه تلقیح ۵ میلی‌لیتر از محلول اسپور (تقریباً ۱۰۶ میلی‌لیتر) را در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری کشت می‌دهیم. ارلن‌ها به مدت ۱۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌نماییم. جهت شناسایی در زیر میکروسکوپ از رنگ لاکتو فنل استفاده شد. جهت بررسی از تصاویر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۵۰۰X، ۲۰۰۰X، ۳۰۰۰X استفاده شد. هم‌چنین شناسایی گونه قارچ با استفاده

آنتی‌اکسیدان [۹-۱۱]، در کشاورزی به عنوان آنتی‌ملانوزیس، حشره‌کش فعال [۱۲-۱۴] و در محصولات آرایشی بهداشتی به عنوان عامل سفیدکننده، محافظت‌کننده از اشعه فرابنفش، مهارکننده تیروزیناز و فعالیت مهارکننده رادیکال‌های آزاد نقش دارد [۱۵]. بیش‌ترین فواید کوچیک اسید در صنایع آرایشی و بهداشتی یافت می‌شود. کوچیک اسید توانایی محافظت از اشعه ماورای بنفش را دارد که به وسیله آن، تولید میزان بالای رنگیزه در پوست، به وسیله جلوگیری از تولید ملانین از طریق ممانعت از تشکیل تیروزیناز، متوقف می‌کند. این آنزیم مسئول تولید رنگیزه در پوست می‌باشد [۱۶]. به طور کلی، گونه‌های اسپرژیلوس‌ها، که عمدتاً متعلق به گروه *A. tamari* می‌باشند، به طور گسترده‌ای در تخمیر کوچیک اسید استفاده می‌شود. کوچیک اسید تولید شده با استفاده از *A. oryzae* 26 گرم از کوچیک اسید گرم/گلوکز را به همراه دارد. علاوه بر این، تولید کوچیک اسید شده توسط *A. candidus* و *A. parasiticus* توسط El-Aasar و همکارانش در سال ۲۰۰۶ گزارش شده است [۴]. منابع کربنی مختلفی ممکن است به عنوان منبع کربن برای تخمیر کوچیک اسید استفاده شوند. این منابع می‌تواند شامل نشاسته، ساکارز، مالتوز، گلوکز، فروکتوز، مانوز، گالاکتوز، گزیلوز، آرابینوز، سوربیتول، استات، اتانول، گلیسرول و آرابینوز باشد. استفاده از منابع کربنی مختلف از جمله نشاسته، سوکروز، فروکتوز، گلوکز و گزیلوز در تخمیر کوچیک اسید توسط *A. oryzae* به وسیله Kitada و همکاران بررسی شده است [۱]. تعیین تغییرات نسبت کربن به نیتروژن در تولید کوچیک اسید مهم بوده زیرا به مهار یا افزایش تولید کوچیک اسید و هم‌چنین تولید بهینه آن منجر می‌شود. هدف از این تحقیق جداسازی، تولید و بهینه‌سازی کوچیک اسید توسط قارچ‌های ایزوله شده بومی با روش Response Surface می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی قارچ تولیدکننده کوچیک اسید. محیط کشت مغذی محلول مورد استفاده در این مطالعه شامل

کوجیک اسید در محیط کشت بر اساس رسم منحنی استاندارد کوجیک اسید بین $0-400 \mu\text{g/ml}$ محاسبه می‌گردد. جهت به دست آوردن وزن خشک میسلیم قارچ را چند بار با آب مقطر شسته و سپس در آون به مدت ۲۴ ساعت در ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک می‌نماییم. و سپس وزن خشک قارچ را محاسبه می‌نماییم.

تعیین کیفی کوجیک اسید با استفاده از Chromatography Thin layer. به میزان ۲ گرم از FeCl_3 را در ۱۰۰ میلی‌لیتر 0.5 N HCl حل نموده و در یک بطری کدر می‌ریزیم. به مقدار $4 \mu\text{l}$ از $500 \mu\text{l/ml}$ استاندارد کوجیک اسید و نمونه را بر روی لایه نازک ورق‌های آلومینیوم کروماتوگرافی 60 P_{254} که با 0.2 mm لایه نازک سلیکا ژل پوشیده شده است. سپس هر یک از نقاط با استفاده از سشوار خشک می‌شود. روش بهینه‌سازی و طراحی آزمایش. این طراحی در دو مرحله و با دو روش متفاون با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 انجام می‌شد:

۱- طراحی آزمایش Plackett-Burman

۲- طراحی آزمایش Response surface (RSM) methodology

طراحی آزمایش Plackett-Burman

با استفاده از طراحی Plackett-Burman ابتدا یک بررسی مقدماتی برای تعیین بهترین منبع کمکی کربن و ازت به‌عنوان منابع القاکننده تولید کوجیک اسید انجام شد. بدین ترتیب مهم‌ترین فاکتورهای تاثیرگذار بر تولید کوجیک اسید غربال‌گری می‌گردد. بر این اساس هر فاکتور در دو سطح ۱- (سطح پایین) و ۱+ (سطح بالایی) مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب بر اساس جدول‌های شماره ۱، ۲ و ۳ طراحی انجام و غلظت‌ها انتخاب شد. بدین ترتیب تاثیر متغیرها به شکل خطی یا غیر خطی در تولید کوجیک اسید مشخص می‌گردد.

از روش مولکولی با استفاده از تنها یک لوپ از کلنی قارچ در آب مقطر به‌عنوان نمونه و بلافاصله استفاده از کیت تشخیصی Easyplex Real-time Multiplex PCR که قادر به تشخیص شانزده گونه قارچی است در آزمایشگاه پاتوبیولوژی فرزاد همدان انجام گردید.

تخمیر در بستر غوطه‌ور طی بهینه‌سازی تولید کوجیک اسید. جهت کشت در محیط غوطه‌ور سویه انتخابی جهت تولید کوجیک اسید را در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری شامل محیط 1 g/l KH_2PO_4 ، 50 g/l Glucose، 5 g/l Yeast extract، 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ کشت می‌دهیم. برای تهیه محلول تلقیح ۱ میلی‌لیتر اسپور $12 \times 10^9 \text{ spore/ml}$ را در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و 250 rpm برای ۲۱ روز کشت می‌دهیم. جهت بررسی وجود کوجیک اسید در محیط کشت از روش Thin layer Chromatography (TLC) استفاده می‌شود. صفحه آلومینیومی TLC که با سلیکا ژل پوشانده شده را به همراه مخلوطی از آب، اسید استیک، استون و اتیل استات به نسبت ۵:۳:۱:۱ به‌عنوان حلال و 2% FeCl_3 در 0.5 mol/l HCl به‌عنوان معرف مورد استفاده قرار می‌گیرد. مقدار غلظت کوجیک اسید در محیط با استفاده از روش کلرومتری یک بر پایه واکنش بین کوجیک اسید و FeCl_3 بر اساس روش Benty (۱۹۵۷) تعیین می‌شود [۱۲]. میزان گلوکز توسط آنزیمی گلوکز اکسیداز با استفاده از کیت تشخیصی سیگما (با شماره کاتالوگ ۱۰۰-۳۱۵) و در طول موج ۵۰۵ نانومتر مشخص می‌گردد.

روش‌های اندازه‌گیری

تعیین میزان کوجیک اسید با استفاده از روش‌های شیمیایی. به میزان ۱ میلی‌لیتر از محلول آنزیمی را با $5/2$ میلی‌لیتر 0.1 M HCl و $200 \mu\text{l}$ 0.2 M FeCl_3 مخلوط می‌کنیم. سپس را با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر می‌خوانیم. برای این منظور از ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و $2/5$ میلی‌لیتر 0.1 M HCl و $200 \mu\text{l}$ 0.2 M FeCl_3 به‌عنوان بلانک استفاده می‌کنیم. میزان

طرح آزمایش Plackett-Burman بر اساس مدل زیر

استوار است.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i$$

پاسخ و انجام آنالیز واریانس از نرم‌افزار Minitab 16 استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱. متغیرهای گذشته و متغیرهای حقیقی در تولید کوچیک اسید با

استفاده از طراحی RSM

فاکتور	واحد	-۲	-۱	۰	+۱	+۲
گلوکز	% (w/v)	۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰
پیتون	% (w/v)	۰	۱	۳	۵	۷
دما	°C	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
pH		۴	۵	۶	۷	۸

در این مدل Y پاسخ و β_0 ثابت مدل و β_i ضریب خطی و X_i سطح ابتدایی متغیر است. در این مدل امکان بررسی اثرات متقابل فاکتورهای تاثیرگذار وجود ندارد و صرفاً برای غربالگری و ارزیابی فاکتورهای مهم تاثیرگذار بر پاسخ کاربرد دارد. هر آزمایش ۳ بار تکرار گردید و میانگین نتایج به‌عنوان پاسخ نهایی در نظر گرفته شد. با بررسی آنالیز رگرسیون متغیرها، فاکتورهای معنادار برای تولید کوچیک اسید طی بهینه‌سازی بعدی به روش RSM مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس برنامه‌ریزی انجام شده به روش Plackett-Burman به شرح ذیل در مجموع ۱۲ آزمایش به منظور انتخاب بهترین فاکتورها طراحی گردید.

تعیین صحت مدل سطح پاسخ. بدین منظور پس از تعیین بهترین مقادیر تولید (طی پیشگویی نرم‌افزار) همین شرایط به‌طور تجربی مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج حاصله با نتایج پیشگویی مورد مقایسه قرار گرفت.

آنالیز آماری. نتایج به‌صورت (انحراف معیار) $\text{mean} \pm \text{SD}$ حداقل طی ۳ تکرار آزمایش ارائه شد و آنالیز آماری با آزمون t-test انجام شد. احتمال $P < 0.05$ از نظر آماری معنادار تلقی گردید [۱۷].

بهینه‌سازی آماری تولید کوچیک اسید به روش RSM با این روش می‌توان اثرات اصلی را بر تولید کوچیک اسید یا بازدهی تولید را ارزیابی نمود. طراحی مرکب مرکزی از ۴ متغیر مستقل شامل گلوکز (C_1)، پیتون (C_2)، دما (C_3) و pH (C_4) برای تخمیر در تولید کوچیک اسید تشکیل گردید.

برای هر فاکتور نسبت به صفر، مقادیری تعیین گردید که به آن‌ها مقادیر کد شده اطلاق می‌گردد. با استفاده از این ۴ فاکتور و ۵ سطح گذشته، ۳۰ آزمایش طراحی گردید. داده‌های حاصل از آزمایش در معادله با بررسی اثرات هر فاکتور به تنهایی و اثرات متقابل هر متغیر پیشگویی گردید.

در این معادله پاسخ پیش‌بینی شده (فعالیت کوچیک اسید) که به شکل واحد (U) بیان می‌گردد، α_0 ثابت مدل α_i ضریب خطی α_{ij} اثرات مربع (هر متغیر) اثرات متقابل C_j و C_j و ... متغیرها هستند. از این معادله برای بهینه‌سازی مقادیر پارامترهای مستقل تاثیرگذار بر پاسخ استفاده می‌شود. برای تعیین آنالیز رگرسیون چندگانه و ترسیم پلات‌های سطح

نتایج

در این پژوهش جداسازی و شناسایی سویه مولد آنزیم کوچیک اسید مورد بررسی قرار گرفته است.

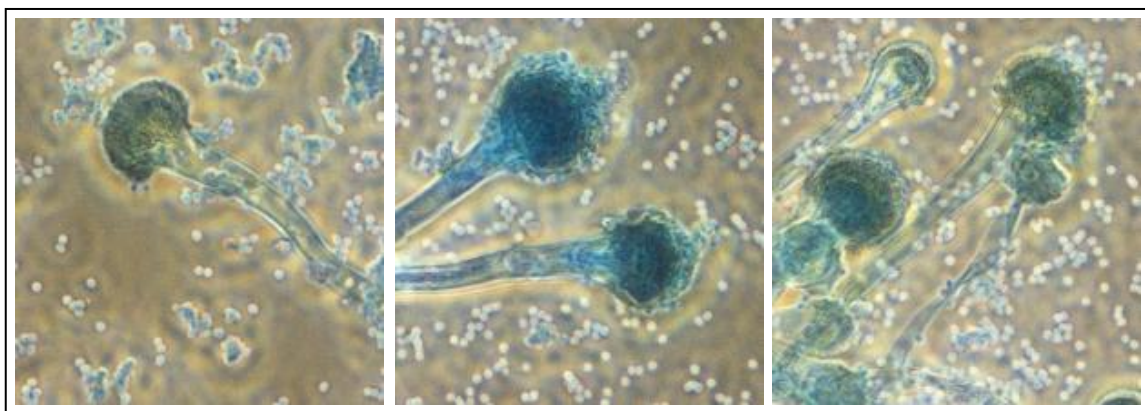
نتایج به‌دست آمده در این پژوهش را می‌توان به ۲ دسته کلی تقسیم کرد:

نتایج مربوط به شناسایی و جداسازی سویه‌های جدا شده. بعد از انکوباسیون نمونه‌ها طی ۱۴ روز، شناسایی گونه‌ی قارچ اسپرژیلوس در محیط‌های اختصاصی (CZ و CY20s, CYA25° C, CYA37° C, MEA) با کمک اسلاید کالچ صورت گرفت. پیش از مطالعات میکروسکوپی، به کمک خط کش (بر حسب میلی‌متر mm) سائز کلنی‌ها در ۵ محیط کشت اختصاصی اندازه‌گیری شد. از دو سری پلیت جهت اندازه‌گیری دقیق استفاده شد. پلیت‌های حاوی کلنی‌های چندتایی و پلیت‌های حاوی کلنی تک. در هر

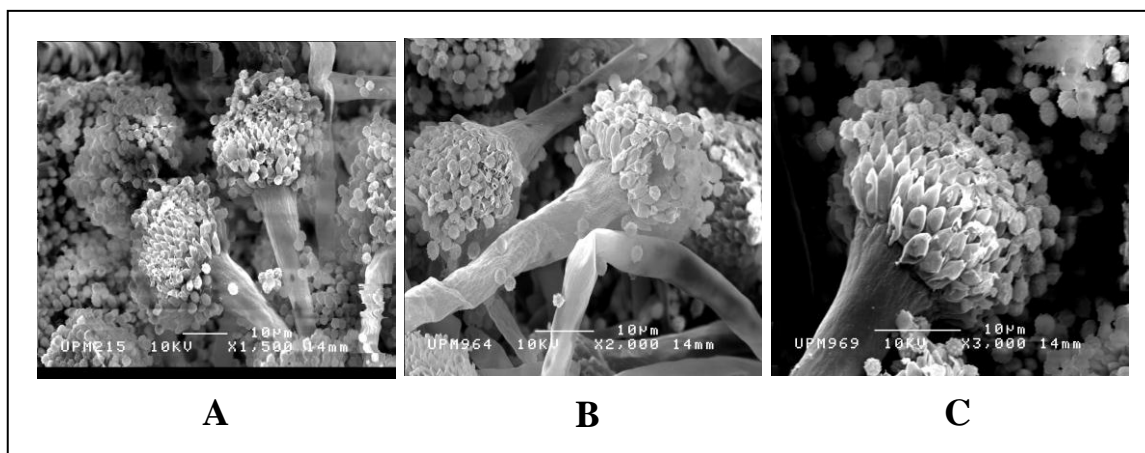
نتایج مربوط به بهینه‌سازی تولید کوچیک اسید ارزیابی اولیه برخی فاکتورهای موثر بر تولید کوچیک اسید با استفاده از طراحی آزمایش Plackett-Burman طراحی آزمایش Plackett-Burman ابزار است برای دستیابی سریع اثر فاکتورهای مختلف را به عنوان اجزا تشکیل‌دهنده محیط کشت در تولید کوچیک اسید بررسی می‌نماید. فاکتورهای مورد بررسی در این روش ترکیبی رابطه معنی داری با تولید آنزیم داشتند (جدول ۲).

بر اساس ۱۲ آزمایش طراحی شده به روش Burman Plackett ده پارامتر (فروکتوز، ساکاروز، گلوکز، لاکتوز، مالتوز، عصاره مخمر، پیتون، سولفات آمونیوم، کلرید آمونیوم و اوره) مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی نتیجه نشان داد فعالیت آنزیم در محدوده (g/l) ۲۹۸-۵ واحد متغیر است.

کدام از محیط‌های اختصاصی ساینبدی مشخصی مد نظر است که با توجه به آن‌ها و با مراجعه به جدول تعیین زیر گونه‌های آسپرژیلوس عمل شناسایی انجام گردید. گونه‌ی شناسایی شده در زیر نامبرده شده است. نتایج نشان داد که گونه‌ی جداسازی شده مربوط به *Aspergillus* sp. است. از نظر میکروسکوپی داری کلنی کرکی بوده که به رنگ سبز آبی خاکستری مشاهده می‌شود. هم‌چنین از نظر میکروسکوپی دارای میسلیم هم‌راه با دیواره عرضی، کونیدیفور است که بر روی کونیدیفور، وزیکول کشیده و تقریباً گرد قرار گرفته است، ۲/۳-۱/۳ روی وزیکول استریگمای یک ردیفی قرار دارد و بر روی استریگما کونیدی قرار دارد. که این علائم می‌تواند از مهم‌ترین وجه تشخیص آسپرژیلوس فلاووس از بقیه گونه‌های آسپرژیلوس باشد (شکل ۱و ۲). هم‌چنین شناسایی گونه قارچ با استفاده از روش مولکولی با کیت تشخیصی Easyplex Real-time Multiplex PCR پس از آنالیز نتایج با نرم‌افزار دستگاه، قارچ آسپرژیلوس فلاووس تشخیص داده شد.



شکل ۱. نمونه های میکروسکوپی قارچ آسپرژیلوس فلاووس



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نمونه قارچ آسپرژیلوس فلاووس با بزرگنمایی A:1500X; B:2000X; C:3000X

جدول ۲. طراحی Plackett Burman برای ده متغیر حقیقی با فعالیت حاصله در تولید کوچیک اسید

شماره آزمایش	فروکتوز %	ساکاروز %	گلوکز %	لاکتوز %	مالتوز %	عصاره مخمر %	پیتون %	سولفات آمونیوم %	کلرید آمونیوم %	اوره %	کوچیک اسید (g/l)
۱	۵	۵	۵	۱۰	۱۰	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۱	29/8
۲	۵	۵	۵	۵	۵	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	6/817
۳	۵	۵	۱۰	۱۰	۱۰	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۵	5/567
۴	۵	۱۰	۵	۵	۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۵	3/385
۵	۱۰	۵	۱۰	۱۰	۵	۰/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۵	3/2
۶	۱۰	۱۰	۵	۱۰	۵	۰/۱	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	26/049
۷	۱۰	۱۰	۵	۱۰	۱۰	۰/۱	۰/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۱	4/759
۸	۱۰	۱۰	۱۰	۵	۱۰	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۰/۱	۰/۱	4/811
۹	۱۰	۵	۵	۵	۱۰	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۰/۵	3/456
۱۰	۵	۱۰	۱۰	۱۰	۵	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۰/۱	0/5
۱۱	۱۰	۵	۱۰	۵	۵	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۱	0/10
۱۲	۵	۱۰	۱۰	۵	۱۰	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۵	۰/۵	7/358

صرفنظر از متغیرهایی که معنادار نبودند، معادله برای تولید

آنزیم به صورت زیر نوشته می‌شود:

$$Y = 7/97 - 4/39X_1 + 3/67X_2 - 0/3X_3 + 3/63X_4 + 3/24X_5$$

(X_1 = گلوکز, X_2 = لاکتوز, X_3 = پیتون, X_4 = سولفات آمونیوم, X_5 = کلرید آمونیوم)

بر اساس مقادیر t محاسبه شده در مرحله بهینه‌سازی

گلوکز و پیتون به روش RSM به کار گرفته شدند.

آنالیز رگرسیون ضرائب و t-value مربوط به ۱۰ پارامتر مورد بررسی نشان داد (جدول ۳) که از بین پارامترهای مختلف مورد آزمایش گلوکز و پیتون بهترین منبع کربن و نیتروژن می‌باشند ($P < 0/05$).

طراحی آزمایش و بهینه‌سازی فرآیند به روش سطح پاسخ

این تحقیق به روش تخمیر در بستر غوطه‌ور انجام شد.

نتایج حاکی از این بود که طی بهینه‌سازی به روش سطح

پاسخ، نتایج تخمیر در بستر غوطه‌ور معنادار بود. بر اساس ۳۰

آزمایش طراحی شده به روش RSM چهار فاکتور بهینه‌سازی

مورد بررسی قرار گرفت.

RSM یک رویکرد آماری است که فاکتورهای تاثیرگذار

را به صورت منفرد و متقابل شامل درجه حرارت انکوباسیون،

pH، گلوکز و میزان پیتون برای تولید کوچیک اسید مورد

بررسی قرار می‌دهد (جدول ۴).

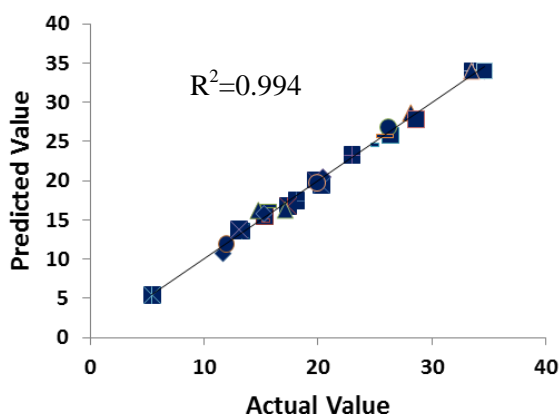
معادله چندجمله‌ای ضریب رگرسیون به طور تجربی نشان

می‌دهد که بین فعالیت آنزیم کوچیک اسید (Y) و متغیرها

ارتباط معنی‌دار وجود دارد.

$$Y = 33/97 + 3C_2 - 0/63C_3 + 3/6C_4 - 2/21C_{12} - 3/04C_{22} - 4/75C_{32} - 5/35C_{42} - 1/61C_{1C_3} + 0/9C_{2C_4}$$

(C_1 = گلوکز, C_2 = پیتون, C_3 = دما, C_4 = pH)



شکل ۳. انطباق بین مقدار تجربی و مقدار پیش بینی شده در تولید کوچیک اسید

آنالیز واریانس (ANOVA) ثابت کرد که پیتون، دما و

pH به صورت منفرد، گلوکز، پیتون، دما و pH به صورت مربع

و گلوکز و دما و هم‌چنین پیتون و pH به صورت متقابل تاثیر

معناداری در تولید آنزیم کوچیک اسید دارند ($P < 0/05$).

مقدار تجربی و مقدار پیش‌بینی شده در تولید کوچیک اسیدرا نشان می‌دهد.

حداکثر میزان تولید کوچیک اسید در غلظت گلوکز ۱۰٪ و پیتون ۳٪ در دمای 30°C و $\text{pH}=6$ به میزان ۶۰۵/۳۴ مشاهده شد (جدول ۵). همچنین شکل ۳ میزان انطباق بین

جدول ۳. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) برای انتخاب منابع کربن و ازت با روش طراحی Plackett-Burman

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	مقدار P
ثابت	۱۰۱۳	10	۱۰۱/۳۹	۷۲۵/۴۹	۰/۰۲۸۹
فروکتوز	۱۰/۰۱	۱	۱۰/۰۱	۷۱/۶۱	۰/۰۷۴۹
ساکاروز	۰/۴۰	۱	۰/۴۰	۲/۸۵	۰/۳۴۰۶
گلوکز	۲۳۰/۷۷	۱	۲۳۰/۷۷	۱۶۵۱/۲۵	۰/۰۱۷۵
لاکتوز	۱۶۱/۶۳	۱	۱۶۱/۶۳	۱۱۶۵/۵۸	۰/۰۱۷۸
مالتوز	۲۰/۷۸	۱	۲۰/۷۸	۱۴۸/۷۳	۰/۰۵۲۱
عصاره مخمر	۲/۶۰	۱	۲/۶۰	۱۸/۶۴	۰/۱۴۴۹
پیتون	۳۰۳/۷۶	۱	۳۰۳/۷۶	۲۱۷۳/۵۸	۰/۱۳۷
سولفات آمونیوم	۱۵۷/۹۰	۱	۱۵۷/۹۰	۱۱۲۹/۸۴	۰/۰۱۸۹
کلرید آمونیوم	۱۲۵/۶۵	۱	۱۲۵/۶۵	۸۹۹/۱۲	۰/۰۲۱۲
اوره	۰/۳۸	۱	۰/۳۸	۲/۷۲	۰/۳۴۷۱

جدول ۴. طراحی RSM برای متغیرهای حقیقی در تولید کوچیک اسید

شماره آزمایش	گلوکز % (w/v)	پیتون % (w/v)	دما ($^{\circ}\text{C}$)	pH	کوچیک اسید (g/l)
۱۶	۰	۳	۳۰	۶	۲۴/۶۴
۱۷	۱۵	۵	۲۵	۵	۹/۸
۱۸	۵	۱	۲۵	۵	۱۱/۶۵۵
۱۹	۱۵	۵	۳۰	۵	۱۵/۰۳
۲۰	۱۵	۵	۲۵	۷	۲۸/۱۳
۲۱	۵	۱	۲۵	۷	۱۵/۶۵۵
۲۲	۱۰	۰	۳۰	۶	۱۵/۲۵
۲۳	۱۰	۳	۳۰	۶	۳۴/۶۰۵
۲۴	۱۰	۳	۳۰	۶	۳۴/۶۰۲
۲۵	۵	۱	۳۰	۵	۱۳/۲۷
۲۶	۱۰	۷	۳۰	۶	۲۸/۶۰۵
۲۷	۱۰	۳	۳۰	۶	۳۲/۴۵
۲۸	۱۵	۱	۲۵	۵	۱۵/۳۳
۲۹	۱۵	۵	۳۵	۷	۲۲/۹۶۵
۳۰	۱۰	۳	۳۰	۶	۲۴/۱۳
۱	۱۵	۱	۲۵	۷	۲۰/۴۱۲
۲	۱۰	۳	۳۰	۶	۳۳/۵۹
۳	۱۰	۳	۳۰	۴	۵/۴۴
۴	۱۵	۱	۳۵	۵	۱۱/۹۴
۵	۵	۵	۲۵	۷	۲۶/۳۵۵
۶	۱۰	۳	۴۰	۶	۱۳/۰۹
۷	۵	۵	۳۵	۷	۲۶/۱۵
۸	۵	۵	۲۵	۵	۱۴/۷۵
۹	۱۰	۳	۳۰	۸	۱۹/۹۳
۱۰	۲۰	۳	۳۰	۶	۲۵/۸۷۵
۱۱	۱۵	۱	۳۵	۷	۱۷/۳۵
۱۲	۵	۱	۳۵	۷	۲۰/۲۷۵
۱۳	۱۰	۳	۲۰	۶	۱۷/۱۱۵
۱۴	۵	۵	۳۵	۵	۱۸/۱۰۵
۱۵	۱۰	۳	۳۰	۶	۳۳/۴۵

جدول ۵. آنالیز واریانس (ANOVA) برای مدل مربع سطح پاسخ در تولید

کوچیک اسید

منبع	ضریب	درجه آزادی	مقدار P
مدل	۱۹۳۲/۹	۱۴	۰/۰۰۰۱
خطی			
گلوکز	۲/۱۶	۱	۰/۱۰۲۴
پیتون	۲۱۶/۵۹	۱	۰/۰۰۰۱
دما	۹/۴۵	۱	۰/۰۰۲۴
pH	۳۱۱/۰۵	۱	۰/۰۰۰۱
مربع		۱	
گلوکز × گلوکز	۱۳۳/۵۶	۱	۰/۰۰۰۱
پیتون × پیتون	۲۵۳/۳۴	۱	۰/۰۰۰۱
دما × دما	۶۱۷/۶۵	۱	۰/۰۰۰۱
pH × pH	۷۵۸/۰۰	۱	۰/۰۰۰۱
متقابل		۱	
گلوکز × پیتون	۰/۸۱	۱	۰/۳۰۳۵
گلوکز × دما	۴۱/۴۸	۱	۰/۰۰۰۱
گلوکز × pH	۰/۹۵	۱	۰/۲۶۵۷
پیتون × دما	۲/۶۹	۱	۰/۰۷۱۴
پیتون × pH	۱۲/۹۷	۱	۰/۰۰۰۷
دما × pH	۰/۰۲۵	۱	۰/۵۸۴۲
Lack of fit	۹/۲۰	۱۰	۰/۱۱۵۸
جمع	۱۹۴۴	۲۹	
	R2=۹۹/۴۵	R2.adj=۹۸/۹۳	

تدریج از میزان تولید کاسته می‌شود در حالی که با افزایش میزان دما تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش تولید کوچیک اسید و پس از آن با افزایش دما تولید کوچیک اسید با شیب تندی کاهش می‌یابد (شکل ۵).

طراحی تاثیر متقابل میزان گلوکز و میزان pH در تولید کوچیک اسید نشان می‌دهد که تولید کوچیک اسید در طراحی سطح پاسخ در صورتی که میزان درصد پیتون ۳٪ و دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد باشد در هر محدوده از میزان درصد گلوکز با افزایش pH میزان تولید کوچیک اسید افزایش یافته و پس از رسیدن به نقطه حداکثری در pH=6 میزان افزایش درصد گلوکز تاثیر چشمگیری در تولید کوچیک اسید نخواهد داشت (شکل ۶).

طراحی تاثیر متقابل میزان پیتون و میزان دما در تولید کوچیک اسید نشان می‌دهد که تولید کوچیک اسید در طراحی سطح پاسخ در صورتی که میزان درصد گلوکز ۱۰٪ و میزان pH=6 باشد. با افزایش درصد پیتون تا حدود ۴٪ در مقابل افزایش درجه حرارت تا میزان ۳۰ درجه سانتی‌گراد ابتدا تولید کوچیک اسید افزایش می‌یابد و پس از رسیدن به نقطه حداکثر با افزایش دما میزان تولید کوچیک اسید با شیب تندی کاهش می‌یابد. در مقابل با افزایش میزان درصد پیتون کاهش تولید کوچیک اسید به تدریج مشاهده می‌شود (شکل ۷).

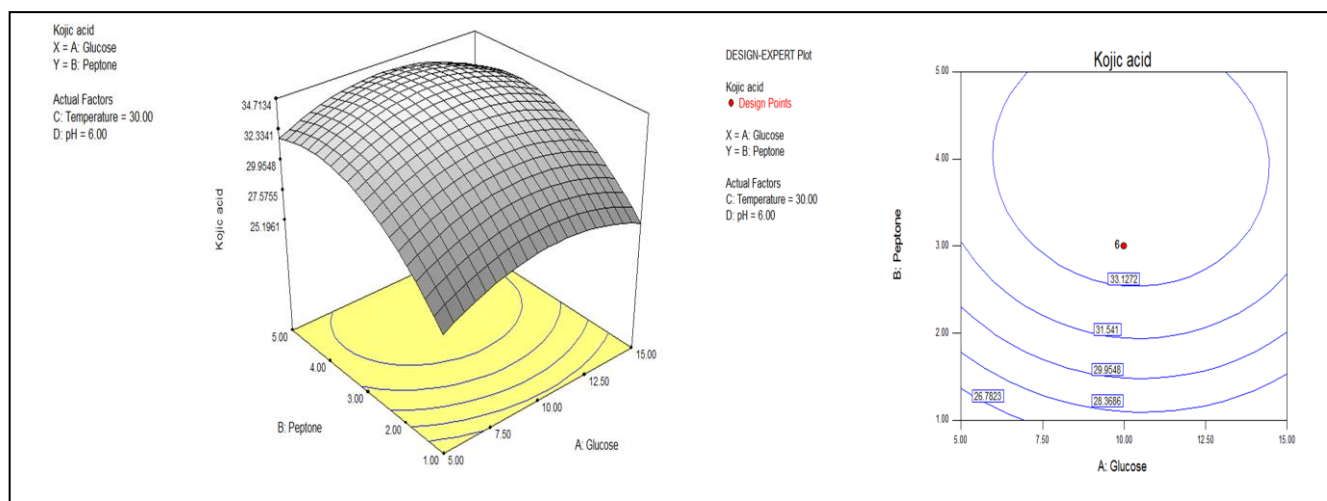
طراحی تاثیر متقابل میزان پیتون و میزان pH در تولید کوچیک اسید نشان می‌دهد که تولید آنزیم کوچیک اسید در طراحی سطح پاسخ در صورتی که میزان درصد گلوکز ۱۰٪ و دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد باشد در هر محدوده از میزان درصد پیتون با افزایش pH میزان تولید کوچیک اسید افزایش یافته و پس از رسیدن به نقطه حداکثری در pH=6 میزان افزایش درصد پیتون حتی با میزان نزدیک ۶٪، تاثیری در تولید کوچیک اسید نخواهد داشت (شکل ۸).

طراحی تاثیر متقابل میزان دما و میزان pH در تولید کوچیک اسید نشان می‌دهد که تولید کوچیک اسید در طراحی سطح پاسخ در صورتی که میزان گلوکز ۱۰٪ و مقدار پیتون ۳٪ باشد با افزایش میزان دما در مقابل افزایش pH ابتدا میزان

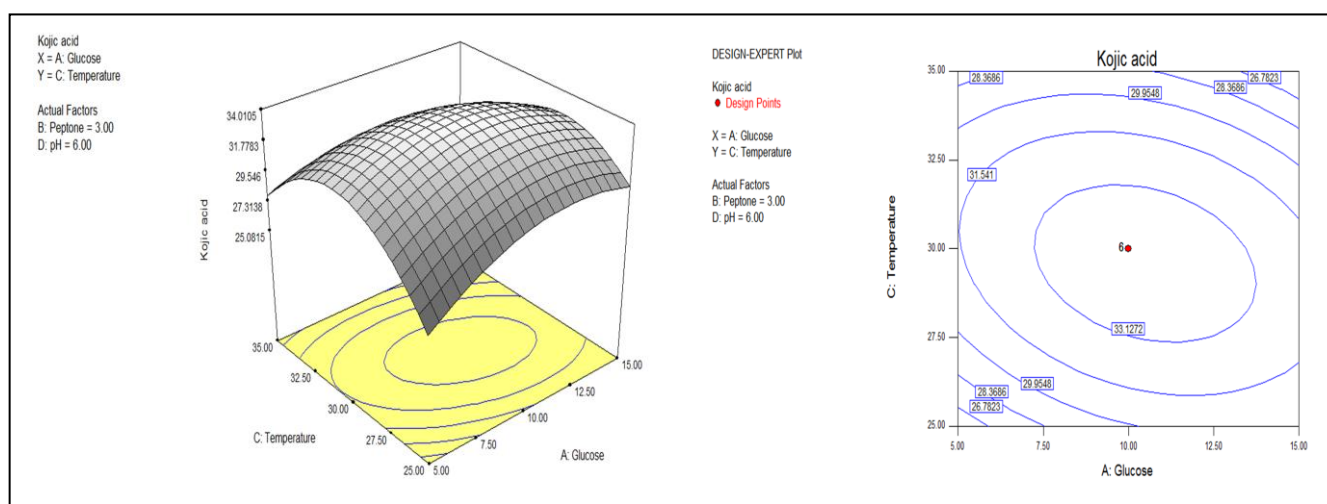
طراحی تاثیر متقابل میزان گلوکز و پیتون در تولید کوچیک اسید نشان می‌دهد که تولید کوچیک اسید در طراحی سطح پاسخ در صورتی که میزان pH=6 و دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد باشد با افزایش میزان گلوکز در مقابل درصد پیتون ابتدا افزایش و پس از رسیدن به نقطه حداکثر تولید کاهش می‌یابد. با افزایش درصد پیتون میزان تولید کوچیک اسید به تدریج تا حدود چهار درصد افزایش و پس از آن میزان تولید کوچیک اسید به تدریج کاهش می‌یابد (شکل ۴). طراحی تاثیر متقابل میزان گلوکز و میزان دما در تولید کوچیک اسید نشان می‌دهد که تولید آنزیم کوچیک اسید در طراحی سطح پاسخ در صورتی که میزان درصد پیتون ۳٪ و میزان pH=6 باشد با افزایش درصد گلوکز تا حدود ۱۰٪ میزان تولید کوچیک اسید افزایش می‌یابد و پس از آن با رسیدن به نقطه حداکثر به

بدین منظور پس از تعیین بهترین مقادیر تولید طی پیشگویی نرم افزار (گلوکز ۸/۷۱٪، پپتون ۴/۳۷٪، دما ۲۹/۹ درجه سانتی گراد و $pH=6.75$ بوده که میزان تولید کوچیک اسید $34/6 \text{ g/l}$ خواهد بود). لذا آزمایشی بر اساس این پیشنهاد انجام شد و میزان تولید کوچیک اسید $34/4 \text{ g/l}$ حاصل گردید.

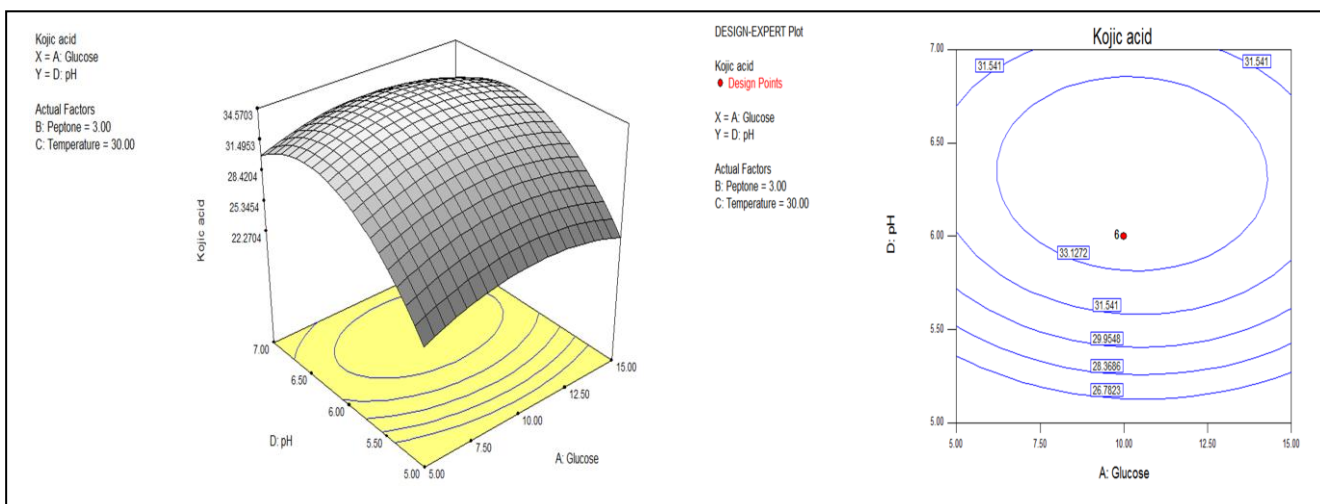
تولید کوچیک اسید افزایش و پس از رسیدن به نقطه حداکثر کاهش می یابد. این افزایش و کاهش به ازای هر یک از دو متغیر مورد بررسی به طور متناسب رخ می دهد (شکل ۹). صحت مدل سطح پاسخ. بر اساس معادله رگرسیون به دست آمده، بهینه سطوح متغیرهای مورد آزمایش برای حداکثر تولید آنزیم به وسیله نرم افزار آماری ۱۶ Minitab پیش بینی شد. این پیش بینی شامل میزان انطباق مدل به وسیله تعیین ضریب (R^2) است.



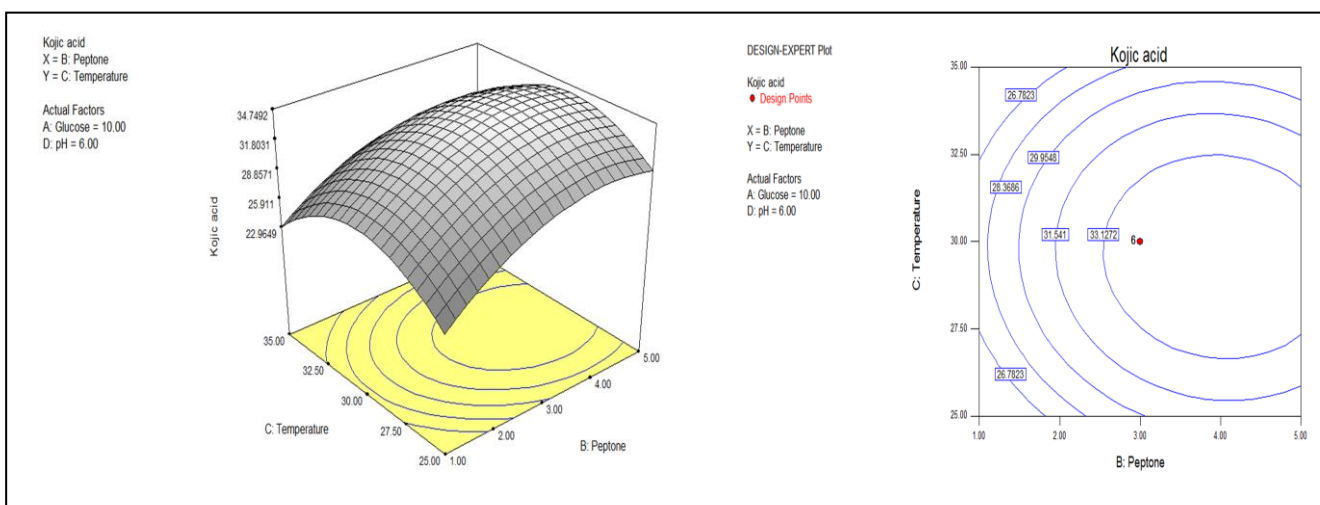
شکل ۴. طراحی تاثیر متقابل میزان گلوکز و پپتون در تولید کوچیک اسید



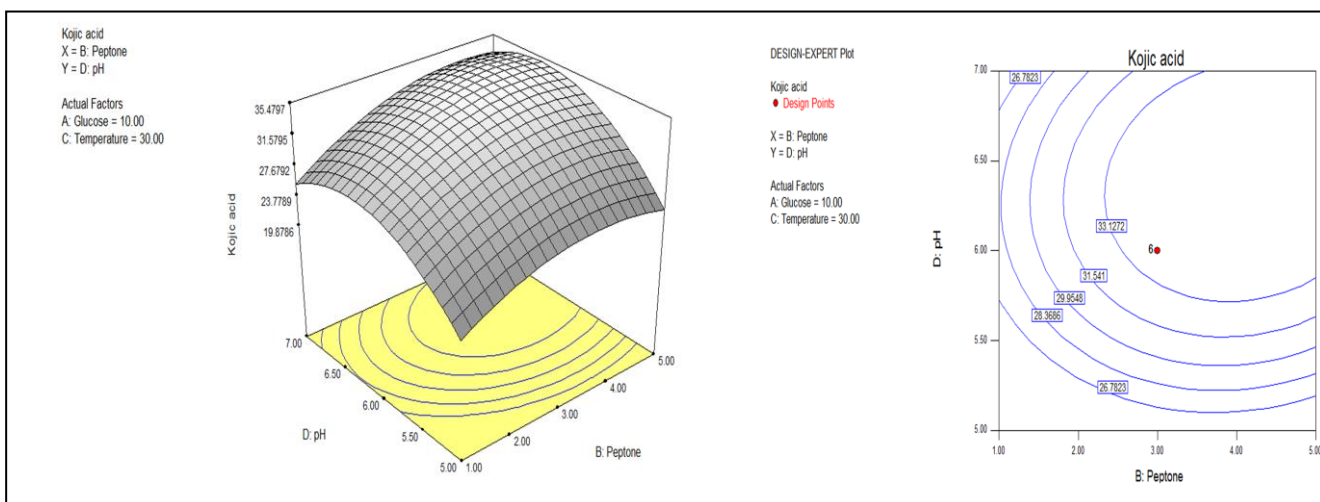
شکل ۵. طراحی تاثیر متقابل میزان گلوکز و دما در تولید کوچیک اسید



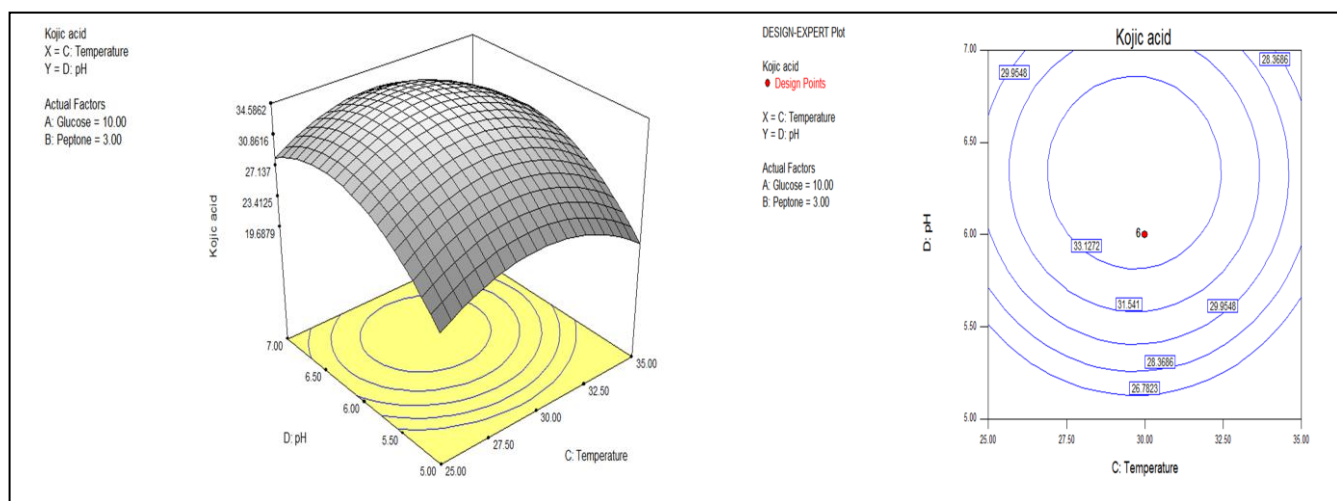
شکل ۶. طراحی تاثیر متقابل میزان گلوکز و میزان pH در تولید کوچیک اسید



شکل ۷. طراحی تاثیر متقابل میزان پپتون و میزان دما در تولید کوچیک اسید



شکل ۸. طراحی تاثیر متقابل میزان پپتون و میزان pH در تولید کوچیک اسید



شکل ۹. طراحی تاثیر متقابل میزان دما و میزان pH در تولید کوجیک اسید

در بررسی‌های انجام شده در مطالعات بیش‌ترین عمل‌کرد کوجیک اسید در تخمیر با استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن به دست آمده بود، پس از آن ساکارز و فروکتوز بیش‌ترین رشد را دارا بودند. میزان تولید مشاهده شده در محدوده ۰/۵-۰/۶ گرم کوجیک اسید بر گرم قند بوده که از تخمیر توسط گونه‌های مختلف تولیدکننده کوجیک اسید به دست آمده بود [۵]. بنابراین، گلوکز نه تنها به عنوان یک منبع کربن برای رشد سلولی میکروارگانیسم، بلکه به عنوان پیش ماده برای سنتز کوجیک اسید نیز استفاده می‌گردد. Chen در سال ۱۹۹۱ گزارش داد که ساکارز یک منبع مناسب‌تر کربن نسبت به گلوکز برای تولید کوجیک اسید توسط *A. candidus* می‌باشد که در آن میزان تولید ۰/۵ گرم کوجیک اسید/گرم ساکارز برای تخمیر با استفاده از ساکارز به دست آمد که در مقایسه با عمل‌کرد به دست آمده از قند گلوکز (۰/۲۵ گرم کوجیک اسید/گرم گلوکز) تولید حدود دو برابر بیش‌تر بوده است [۱۸]. بر طبق نتایج حاصله در این تحقیق و با استفاده از آزمایش طراحی شده به روش Burman Plackett در مقایسه بین قندهای فروکتوز، ساکارز، گلوکز، لاکتوز، مالتوز مورد بررسی به عنوان منبع کربن، گلوکز به عنوان مناسب‌ترین منبع کربن در تولید کوجیک اسید توسط قارچ آسپرژیلوس ایزوله شده در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که منابع کربنی مختلفی ممکن است به عنوان منبع کربن شامل نشاسته، ساکارز، مالتوز، گلوکز، فروکتوز، مانوز، گالاکتوز، گزیلوز، آرابینوز، سوربیتول، استات، اتانول، گلیسرول و برای تخمیر کوجیک اسید استفاده شوند می‌توان گفت که پلی ساکاریدهای با زنجیره طولانی، مانند نشاسته، به عنوان منبع کربن فقیر برای تخمیر کوجیک اسید در نظر گرفته می‌شوند. گونه آسپرژیلوس فلاووس (S33-2) قادر به رشد در نشاسته پخته شده و تولید سطح قابل ملاحظه‌ای کوجیک اسید می‌باشد. به طوری‌که میزان تولید ۲۵/۰ گرم کوجیک اسید/گرم نشاسته در تخمیر با استفاده از نشاسته ذرت در مطالعات قبلی به دست آمد. غلظت گلوکز به عنوان منبع کربن، نیز می‌تواند به میزان زیادی بر تولید کوجیک اسید تاثیرگذار باشد. Kitada در سال ۱۹۶۷ در بررسی‌های خود نشان داد که غلظت گلوکز در حدود ۲۵ تا ۱۵۰ گرم در لیتر توسط *A. oryzae* می‌تواند در تولید کوجیک اسید موثر می‌باشد. [۱] هم‌چنین El-Aasar در سال ۲۰۰۶ گزارش داد که بیش‌ترین میزان تولید کوجیک اسید با بازده حدود ۰/۴۳ g کوجیک اسید در تخمیر هنگامی که ۶۰ گرم/لیتر گلوکز، ۴۰ گرم/لیتر ساکارز و ۶۰ گرم/لیتر ملاس جغندر به کار گرفته شود به دست آمده است [۴].

مخمر + 2 g/l آمونیوم سولفات) استفاده کرده و عمل‌کرد تولید نسبتاً بالای کوچیک اسید (25 g/l) توسط اسپرژیلوس فلاووس را گزارش نمودند [۲۰]. طبق مطالعات انجام شده، محیط کشت حاوی 100 g/l گلوکز به عنوان منبع کربن و غلظت عصاره مخمر در محدوده غلظت 2/5-0/5 g/l و یا پیتون در غلظت 1-5 g/l به عنوان منبع ازت به طور معمول در تخمیر کوچیک اسید توسط گونه‌های اسپرژیلوس استفاده می‌شود. با توجه به وجود غلظت بالای از عصاره مخمر یا پیتون در محیط کشت، گلوکز قادر به تبدیل به کوچیک اسید نبوده بنابراین برای رشد سلول‌ها استفاده می‌شود. محدودیت در تامین نیتروژن مورد نیاز به منظور محدود کردن رشد به طوری که گلوکز بیش‌تری را بتوان به کوچیک اسید تبدیل نمود. با استفاده از 100 g/l گلوکز، تولید بهینه اسید کوچیک در 2/3 g/l (NH₄)₂SO₄ و 2 g/l پیتون به دست آمد.

بنابراین، محدود کردن نیتروژن محیط به منظور محدود کردن رشد ضروری است، به طوری که گلوکز بیش از حدی که در محیط کشت باقی‌مانده است می‌تواند به کوچیک اسید و عدم رشد سلول‌های قارچ تبدیل شود [۲۰].

هم‌چنین در مورد عوامل محیطی موثر در تولید کوچیک اسید، بیش‌تر مطالعات انجام شده روی اثر pH محیط کشت بر رشد و تولید کوچیک اسید بر اساس pH اولیه محیط کشت پایه‌ریزی شده است [۲۱، ۲۲]. اثرات pH اولیه روی تولید کوچیک اسید توسط *A. parasiticus* به وسیله Lin و همکارانش مطالعه شد که از عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن استفاده شد [۲۱]. محققین گزارش دادند که pH بهینه برای تولید کوچیک اسید 4/5 و 6/2 بود [۲۳]. Katagiri و Kitahara دریافتند که pH اولیه به میزان 5 برای رشد *A. oryzae* مطلوب بود اما یک pH اولیه به میزان 2/4 برای افزایش سنتز کوچیک اسید مورد نیاز بوده که این نشان‌دهنده‌ی این موضوع است که pH بهینه برای تولید کوچیک اسید با pH بهینه برای رشد سویه‌های تولیدکننده این اسید متفاوت است و نتیجه حاصل از این تحقیق بیانگر میزان pH حدود 6/75 در تولید کوچیک اسید به وسیله قارچ

Kitada و همکاران در سال ۱۹۶۷ گزارش دادند که منابع نیتروژن آلی به طور کلی بهتر از منابع نیتروژن غیر آلی در تخمیر کوچیک اسید عمل می‌نمایند [۱]. در این تحقیق، فاکتورهای عصاره مخمر، پیتون، سولفات آمونیوم، کلرید آمونیوم و اوره به عنوان منبع نیتروژن با استفاده از آزمایش طراحی شده به روش Burman Plackett مورد بررسی قرار گرفت و بر طبق نتایج حاصله پیتون به عنوان مناسب‌ترین منبع نیتروژن در تولید کوچیک اسید توسط قارچ اسپرژیلوس ایزوله شده در نظر گرفته شد. این به این علت است که کمپلکس منابع نیتروژن آلی مانند پیتون و عصاره مخمر ممکن است حاوی ویتامین‌هایی باشد، که می‌تواند به عنوان یک پیش ماده برای تولید کوچیک اسید عمل نماید. هم‌چنین، برخی از منابع نیتروژن آلی دارای یک سیستم بافری مناسب بوده، در حالی که منابع نیتروژن غیر آلی، مانند آمونیاک، به میزان قابل توجهی باعث کاهش pH در هنگام جذب NH₄⁺ می‌شوند. pH پایین ممکن است در سنتز کوچیک اسید در طول تخمیر موثر بوده و باعث مهار رشد آن شود. در مواردی عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن آلی مطلوب برای تولید کوچیک اسید در مقایسه با پیتون و polypeptone گزارش شده است. با این حال، Kitada و همکاران ۱۹۶۷ و Coupland و Niehaus در سال ۱۹۸۷ بیان کردند که پیتون بهتر از عصاره مخمر در تولید اسید کوچیک اسید عمل می‌نماید [۱۹، ۱]. حضور فاکتورهای مهم رشد از قبیل ویتامین‌ها و oligoelements در منابع خاص نیتروژن، نقش مهمی را در افزایش تولید کوچیک اسید ایفا می‌کنند. نتایج Coupland و Niehaus در سال ۱۹۸۷ نشان داد که افزودن 10 mM آمونیوم سولفات و گلیسرین به محیط کشت حاوی 2 گرم/لیتر پیتون باعث سرکوب سنتز کوچیک اسید می‌شود. از سوی دیگر، Kwak و Rhee در سال ۱۹۹۲ تولید بالای کوچیک اسید (83g/l)، با استفاده از مخلوطی از منابع نیتروژن (0/5 g/l) عصاره مخمر + 0/75g/l (NH₄)₂SO₄ گزارش دادند [۱۱]. هم‌چنین Megalla و همکاران در سال ۱۹۸۷ مخلوطی از منابع ازت (1 g/l) عصاره

- [4] El-Aasar SA. Cultural conditions studies on kojic acid production by *Aspergillus parasiticus*. *Int J Agric Biol* 2006; 8: 468-473.
- [5] Yabuta T. The constitution of kojic acid, a γ -pyrone derivative formed by *Aspergillus flavus* from carbohydrates. *J Chem Soc Trans* 1924; 125: 575-587.
- [6] Nandan R, Polasa H. Inhibition of growth of kojic acid biosynthesis in *Aspergillus* by some chlorinated hydrocarbons. *Indian J Microbiol* 1985; 25: 21-25.
- [7] Kahn V, Lindner P, Zakin V. Effect kojic acid on the oxidation of o-dehydrophenols by mushrooms tyrosinase. *J Agric Food Chem* 1995; 18: 253-271.
- [8] Brtko J, Rondahl L, Fickova M, Hudecova D, Eybl V, Uher M. Kojic acid and its derivatives: history and present state of art. *Cent Eur J* 2004; 12: 16-18.
- [9] Bentley R. From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. *Nat Prod Rep* 2006; 23: 1046-1062.
- [10] Basappa SC, Sreenivasamurthy V, Parpia HAB. Aflatoxin and kojic acid production by resting cells of *Aspergillus flavus* Link. *J Gen Microbiol* 1970; 61: 81-86.
- [11] Kwak MY, Rhee JS. Control mycelia growth for kojic acid production using ca-alginate immobilized fungal cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992; 36: 578-583.
- [12] Takamizawa K, Nakashima S, Yahashi Y, Kubata BK, Suzuki T, Kawai K, Horitsu H. Optimization of kojic acid production rate using the Box-Wilson method. *J Ferment Bioeng* 1996; 82: 414-416.
- [13] Gould BS. The metabolism of *Aspergillus tamari* Kita, Kojic acid production. *Biochem J* 1938; 32: 797.
- [14] Coupland K, Niehaus Jr WG. Effect of nitrogen supply, Zn²⁺ and salt concentration on kojic acid and versicolorin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*. *Exp Mycol* 1987; 11: 206-213.
- [15] Ohyama Y, Mishima Y. Melanosis-inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism. *Fragrance J* 1990; 6: 53-58.
- [16] Wilson BJ. Miscellaneous *Aspergillus* toxins. In Ciegler A (ed.) *Microbes Toxins, Fungal Toxins VI*, Academic Press, New York; 1971.
- [17] Wan HM, Chen CC, Giridhar R, Chang TS. Repeated-batch production of kojic acid in a cell-retention fermenter using *Aspergillus oryzae* M3B9. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005; 32: 227-233.
- [18] Chen JS, Wei CI, Rolle RS, Balaban MO, Otwell SW, Marshall MR (1991). Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases. *J Agric Food Chem* 1991; 39: 1396-1401.
- [19] Coupland K, Niehaus Jr WG. Effect of nitrogen supply, Zn²⁺ and salt concentration on kojic acid and versicolorin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*. *Exp Mycol* 1987; 11: 206-213.
- [20] Wood BJ. *Microbiology of fermented food* (2nd Edition). Springer, London; 1998.
- [21] Synytsa A, Blafkova P, Synytsa A, Copikova J, Spevacek J, Uher M. Conjugation of kojic acid with chitosan. *Carbohydr Polym* 2008; 72: 21-31.
- [22] Ravi-Kumar MNV (2000). A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 2000; 46: 1-27.
- [23] Ichimoto I, Fuji K, Tatsumi C. Studies on kojic acid and its related γ -pyrone compounds. Part IX. Synthesis of maltol from kojic acid (Synthesis of maltol (3)). *Agric Biol Chem* 1965; 2: 325-330.
- [24] Kitada M, Kenaeda J, Miyazaki K, Fukimbara T. Studies on kojic acid fermentation (VI). Production and recovery of kojic acid fermentation on industrial scale. *J Ferment Technol* 1971; 49: 343-349.
- [25] Choi SH, Kim S, Kim H, Suk K, Hwang JS, Lee BG, Kim AA, Kim SY. (4-methoxy-benzylidene)-(3-methoxy-phenyl)-amine, a nitrogen analog of silbene as a

آسپرژیلوس ایزوله شده می‌باشد [۲۴]. از طرف دیگر بر اساس تحقیقات El-Aasar و همکارانش، بهترین pH برای تولید کوجیک اسید توسط *A. parasiticus*، pH 5 می‌باشد [۱۶] هم چنین pH بهینه برای کوجیک اسید به انواع کربن و نیتروژنی که استفاده شده بستگی دارد بسیار مهم است. Kitada و همکارانش مشخص کردند زمانی که ترکیب گلوکز و ساکاروز به عنوان منبع کربن و هم چنین پیتون یا عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن برای تولید کوجیک اسید مورد استفاده قرار گرفتند pH بهینه این محیط به میزان ۴-۵ بود. از طرف دیگر وقتی نیترات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن استفاده شد pH بهینه برای ماکزیم تولید این اسید به ۴/۰۸ رسید [۲۵]. به علاوه Tatsumi و همکارانش منتشر کردند که ماکزیم تولید کوجیک اسید توسط *A. flavus* در pH بهینه بین ۶-۷ صورت می‌گیرد زمانی که از استات به عنوان منبع کربن استفاده می‌شود [۲۶]. کاربرد کوجیک اسید به صورت صنعتی خصوصاً صنایع در حال رشد و تقاضا برای استفاده از آن در حال افزایش است. اگرچه تکنیک‌های تخمیر مختلفی برای تولید کوجیک اسید می‌تواند به کار برده شود، ثابت شده که تخمیر غوطه‌ور بالاترین میزان بازدهی را در تولید کوجیک اسید از خود نشان داده است. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که گلوکز و پیتون به عنوان بهترین منابع کربن و نیتروژن در تولید کوجیک اسید به وسیله سویه‌های مختلف قارچ‌ها استفاده شوند. از سوی دیگر تاکنون هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر تولید کوجیک اسید در داخل کشور ارائه نشده است و این اولین تحقیق در داخل کشور با سویه جداسازی بومی می‌باشد.

منابع

- [1] Kitada M, Ueyama H, Fukimbara T. Studies on kojic acid fermentation (I) Cultural condition in submerged culture. *J Ferment Technol* 1967; 45: 1101-1107.
- [2] Ariff AB, Salleh MS, Ghani B, Hassan MA, Rusul G, Karim MI. Aeration and yeast extract requirements for kojic acid production by *Aspergillus flavus* Link. *Enzyme Microbiol Technol* 1996; 19: 545-550.
- [3] Wakisaka Y, Segawa T, Imamura K, Sakiyama T, Nakanishi K. Development of a cylindrical apparatus for membrane-surface liquid culture and production of kojic acid using *Aspergillus flavus* NRRL 484. *J Ferment Bioeng* 1998; 85: 484-494.

[26] Tatsumi C, Ichimoto I, Uchida S, Nonomura S. Production of comenic acid from kojic acid by microorganism. J Ferment Technol 1969; 47: 178-184.

potent inhibitor of melanin production. Chem Pharm Bull 2002; 50: 450-452.

Production and optimization of kojic acid by locally isolated fungi *Aspergillus sp.* using response surface methodology

Mahdi Shahriarinour (Ph.D)^{*1}, Farid Azizi Jalilian (Ph.D)², Hossein Ali Safakhah (M.Sc)³

1 – Dept. of biology/Microbiology, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2 – Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

3 – Physiology Research Center and Dept. of Physiology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 10 Aug 2015; Accepted: 13 Dec 2015)

Introduction: Kojic acid with the chemical structure of 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -Piron is an organic acid that is biologically produced through aerobic fermentation process by using various substrates and via the function of variety of fungi. This study was aimed to study the optimization of Kojic acid production by Locally Isolated Fungi *Aspergillus sp.*, using 'Response Surface Methodology'.

Materials and Methods: Kojic acid was produced by fermentation of isolated strain of genus *Aspergillus* in submerged culture medium. Initial investigation in Kojic acid production process was performed via Plackett-Burman method and by using different nitrogen sources such as yeast extract, peptone, ammonium sulfate, ammonium chloride, urea as well as different carbon sources, including fructose, sucrose, glucose, lactose and maltose.

Results: Based on our study, peptone and glucose were the most effective factors with carbon and nitrogen sources in production of kojic acid ($P < 0.05$). The next step was production of 34.4g/L kojic acid by optimizing the effect of environmental factors such as temperature, pH, glucose and peptones, such as carbon and nitrogen sources, used in production of kojic acid and by employing 'Response Surface Methodology'.

Conclusion: Based on the results of this study, the maximum production of kojic acid can be achieved by using; glucose (8.71%), peptone (37.4%), temperature (29.9 ° C) and adjusting pH to 6.75 in the production process.

Keywords: Kojic Acid, Optimization, *Aspergillus*

* Corresponding author. Tel: +98 9359310560

mahdi.shahriari@iaurasht.ac.ir