# بهینه سازی تولید آنزیم لیپاز در *Salinivibrio* sp. SA2 با طراحی تاگوچی

انسیه صالح‌قمری[۱*] و محمدعلی آموزگار[۲]

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۱/ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۲۲ / چاپ: ۱۳۹۵/۱۲/۲۸

[۱]گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
[۲]گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[*]مسئول مکاتبات: esaleh@khu.ac.ir

**چکیده.** آنزیم لیپاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های هیدرولیتیک است که در صنایع مختلف مانند صنایع غذایی، لبنیات، دارویی، شوینده‌ها و غیره کاربرد دارد. در این آزمایش، به‌منظور بهینه‌سازی تولید لیپاز در باکتری *Salinivibrio* sp. SA2، از روش طراحی آزمایش تاگوچی به‌منزلهٔ روشی قدرتمند برای بررسی متغیرهای مؤثر بر فرآیند تولید آنزیم، میان‌کنش فاکتورهای مختلف و به‌دست‌آوردن ترکیبی بهینه از متغیرهای تحت آزمایش استفاده شد. شرایط بهینه برای فاکتورهای pH، دما، دور شیکر، غلظت روغن زیتون و نوع نمک به‌ترتیب ۸، ۳۵ °C، ۱۰۰ rpm، ۲ درصد و کلرید سدیم ۱ M به‌دست آمد. عوامل با تأثیرمعنی‌دار بر فرآیند تولید لیپاز به‌ترتیب اهمیت pH، هوادهی و نمک تعیین شدند. حداکثر فعالیت لیپاز در شرایط بهینه و در سطح معنی‌داری ۵ درصد ($p< 0.05$)، ۱۲۰/۴ U/mg محاسبه شد.

**واژه‌های کلیدی.** باکتری نمک دوست نسبی، رودخانه گرمسار، طراحی آزمایش، فعالیت ویژه

# Optimization of lipase production in *Salinivibrio* sp. SA2 by Taguchi design

Ensieh Salehghamari[1*] & Mohammad Ali Amoozegar[2]

Received 01.03.2016/ Accepted 12.12.2016 /Published 18.03.2017

[1]Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Science, University of Kharazmi, Tehran, Iran
[2]Department of Microbiology, School of Biology, University College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
Correspondent author: esaleh@khu.ac.ir

**Abstract.** Lipase is one of the most important hydrolytic enzymes widely used in various commercial activities such as food, dairy, pharmaceutical and detergent inducteries. In this experiment, Taguchi method was attempted as a powerful method to optimize the factors affecting enzyme production and to investigate the interactions among these factors and their optimum combination in *Salinivibrio* sp. SA2. The optimum conditions for pH, temperature, shaker's rpm, olive oil concentration and salt type turned out to be 8, 35 °C, 100 rpm, 2% and sodium chloride 1 M, respectively. Significant factors influencing on the lipase production proved to be pH, agitation and Salt type. The maximum lipase activity in optimum condition and at the 5% significance level ($p< 0.05$) was 120.4 U/mg.

**Keywords.** experimental design, Garmsar river, moderate halophilic bacteria, specific activity

## مقدمه

آنزیم لیپاز باکتریایی یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های هیدرولیتیک است و به‌طور گسترده‌ای از نظر آنزیم‌شناسی بررسی شده است. آنزیم‌های لیپولیتیک، که به‌طور عمده لیپازها و استرازها هستند، در صنایع غذایی، شوینده‌ها، صنایع لبنی، چرم‌سازی، داروسازی و شیمیایی به‌طور وسیعی کاربرد دارند (Gupta *et al*., 2002; Jaerger *et al*., 1999). یکی از مهم‌ترین منابع آنزیم‌های لیپاز باکتری‌ها هستند. در این میان جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی تولیدکنندهٔ آنزیم‌های هیدرولیتیک به یافتن آنزیم‌های مقاوم به غلظت‌های بالای نمک منجر می‌شود. این آنزیم‌ها می‌توانند برای صنایع سخت که در آنها غلظت‌های بالای نمکی به غیرفعال شدن آنزیم‌ها منجر می‌شود، گزینهٔ مناسبی باشند (Mohaparta *et al*., 1998; Gutiérrez-Arnillas *et al*., 2016). باکتری‌های نمک‌دوست نسبی گروهی از باکتری‌های نمک‌دوست هستند که در غلظت (w/v) ۵-۱۵ درصد کلرید سدیم قادر به رشدند (Babavalian *et al*., 2013). نمک‌دوست‌های نسبی شامل جنس‌هایی همچون *Halomonas*، *Salinibacter* و *Salinivibrio* هستند که اخیراً در زمینه‌های فیزیولوژی، اکولوژی و ژنتیکی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Ventosa *et al*., 1998; Kumar *et al*., 2012). باوجود تولید آنزیم‌های مقاوم به

[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-10-12 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.3.3 ]
[ DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.288 ]

[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-10-12 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.3.3 ]
[ DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.288 ]

غلظت‌های نمکی بالا توسط باکتری‌های نمک‌دوست، مطالعات کاربردی کمتری در حوزهٔ زیست فناوری دربارهٔ آنها به انجام رسیده است (Esteban-Torres *et al*., 2015; Schreck & Grunden, 2014). برای مثال، باکتری‌های نمک‌دوست نسبی رشد سریع دارند، به غذایی ساده نیاز دارند و منابع کربنی مختلفی را می‌توانند استفاده کنند، ضمن اینکه کشت آنها به‌راحتی آلوده نمی‌شود (Kamekura & Kushner; 1984)، ولی با وجود این آنزیم‌های کمی از آنها شناسایی و بهینه‌سازی شده است (Ventosa & Nietoj, 1995; Esteban-Torres *et al*., 2015). تولید لیپاز توسط باکتری تحت تأثیرتعدادی فاکتور مانند منبع کربن، pH، دما، دور شیکر و نوع نمک است (Kim *et al*., 1996). در این مقاله تولید آنزیم لیپاز در sp. SA2 *Salinivibrio* به‌کمک روش تاگوچی بهینه‌سازی شده است. این مطالعهٔ آماری اطلاعات مناسبی را در زمینهٔ میان‌کنش بین فاکتورها و نیز کاهش تعداد آزمایش برای به‌دست‌آوردن شرایط بهینهٔ تولید آنزیم لیپاز فراهم ساخته است.

## مواد و روش‌ها

**مواد**. پارانیتروفنیل بوتیرات (*p*-NPB)، ۲- پروپانول و سدیم بورات از شرکت سیگما و روغن زیتون، نمک‌ها و محیط‌های کشت از شرکت مرک تهیه شدند.

**دستگاه‌ها**. میکروسکوپ نوری مدل Kalrlzeis، اسپکتروفتومتر Shimadzo مدل UV- 160A و سانتریفوژ Heraus مدل labfuge400

**باکتری**. *Salinivibrio* Sp. SA2 نوعی باکتری نمک‌دوست نسبی است که به کوشش Amoozegar و همکاران (2008) از رودخانهٔ گرمسار جداسازی شده است.

### تولید آنزیم لیپاز

### آماده‌سازی تلقیح

پیش‌کشت باکتری در محیط BHI آگار، ۳۴ درجهٔ سانتی‌گراد، pH ۷/۲-۷/۴ و دور شیکر ۱۰۰rpm با درصد حجمی ۱درصد از محلول ۵ مک فارلند کشت داده شد. محیط کشت تولید با کشت حدودا ۶ ساعته ($A_{600}$=۰/۶) از محیط پیش‌کشت به اندازهٔ (v/v) ۱درصد تلقیح شد.

### محیط کشت تولید لیپاز

ترکیبات محیط تولید نیمه‌صنعتی لیپاز شامل (gr/l): ۲ پپتون، ۱/۵ پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات، ۰/۵۵ دی‌پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات ، ۰/۵ سولفات‌آمونیوم، ۰/۰۵ سولفات‌منیزیم ، ۰/۰۱ کلریدکلسیم، ۷/۲۴ کلریدسدیم، ۰/۵ عصارهٔ مخمر و روغن زیتون (تهیه شده از شرکت سیگما) است که با ۱ درصد تلقیح از محیط پیش‌کشت به‌مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس، محیط کشت در ۱۰۰۰۰g برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوسپانسیون رویی جهت سنجش لیپاز تحت بررسی قرار گرفت (Dalmau *et al*., 2000).

### بهینه‌سازی آنزیم و طراحی آزمایش

برای بهینه‌سازی آنزیم لیپاز پنج فاکتور در دو سطح شامل دما، pH، دور شیکر، غلظت‌های روغن زیتون و دو نمک کلرید سدیم و کلرید پتاسیم تحت بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). این فاکتور ها و سطوح آن‌ها، بر اساس کار های قبلی انجام شده بر روی این آنزیم انتخاب شدند (Amoozegar *et al*., 2008). برای بهینه‌سازی فاکتورهای انتخاب‌شده به‌روش تاگوچی از آرایهٔ متعامد $L_{16}$ استفاده شد (جدول ۲). میان‌کنش هر فاکتور با چهار فاکتور دیگر نیز بررسی شد. برای تحلیل و سنجش دقیق‌تر نتایج آزمایش‌های طراحی‌شده با روش تاگوچی از یک تابع پاسخ تبدیل‌یافته استفاده می‌شود که به صورت نسبت علامت هر اثر (S) به اثرات ناشی از خطا (N) تعریف می‌شود. مزیت استفاده از این پاسخ جدید در تحلیل‌های آماری، نسبت به پاسخ اولیه، مقایسهٔ بزرگی آثار ناشی از هر عامل اصلی با آثار ناشی از عوامل خطا در اندازه‌گیری است. آزمایش‌ها سه مرتبه تکرار و میانگین مقادیر آنها به‌صورت نتایج نهایی به‌کمک نرم‌افزار Qualitek-4 تجزیه و تحلیل آماری شد و درنهایت، شرایط بهینهٔ واکنش تخمین زده شد.

### سنجش فعالیت آنزیم لیپاز

فعالیت هیدرولیتیک آنزیم در واکنشی شامل ۲/۳۲۵ ml از بافر بورات سدیم ۱۰۰ mM، pH ۷/۵ و ۲۵ µl محلول *p*-NPB در ۲- پروپانول و ۰/۱ ml سوسپانسیون حاوی آنزیم لیپاز اندازه‌گیری شد. غلظت نهایی مواد به‌صورت ذیل بود: پیش‌مادهٔ ۰/۱ mM، محلول آلی(v/v) ۱ درصد واکنش در ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام گرفت. تغییرات جذب در ۴۱۰ nm اندازه‌گیری شد. این روش در برنامهٔ Kinetic دستگاه اسپکتروسکوپی انجام شد و با داشتن ضریب جذب مولی (ε) پارانیتروفنول (۱۸۱/۸۱۰۶ $cm^2/mol$) و مسیر عبور نور در کووت، غلظت پارا-

[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.3.3 ]

[ DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.288 ]

**جدول ۱**- فاکتورها و سطوح بررسی شدهٔ آنها در بهینه‌سازی تولید آنزیم لیپاز در *Salinivibrio* sp. SA2 به روش تاگوچی.

**Table 1.** Factors and their levels of application on the optimization of the lipase production by *Salinivibrio* sp. SA2 using Taguchi method.

| | عامل | سطح ۱ | سطح ۲ |
|---|---|---|---|
| A | pH | ۷ | ۸ |
| B | روغن زیتون | ٪ ۱ (w/v) | ٪ ۲ (w/v) |
| C | دما | ۲۵درجهٔ سانتی‌گراد | ۳۵درجهٔ سانتی‌گراد |
| D | دور شیکر | ۱۰۰ rpm | ۱۵۰ rpm |
| E | نمک | KCl ۰/۱M | NaCl۱ M |

نیتروفنول تولیدشده به‌دست‌آمد. یک واحد آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که ۱ µmol پارانیتروفنول را در دقیقه تحت شرایط مشخص‌شده، آزاد نماید (Surinenite *et al*., 2002). نتایج به‌دست آمده برای سنجش فعالیت آنزیم لیپاز با واحد فعالیت آنزیم به ازاء کل پروتئین اندازه‌گیری شده (U/mg) بیان شده است.

## نتایج

در این پژوهش از روش آماری تاگوچی به‌منزلهٔ یکی از پرکاربردترین روش‌های بهینه‌سازی برای تولید آنزیم لیپاز در باکتری نمک‌دوست نسبی *salinivibrio* sp. SA2 استفاده شد. با بررسی فاکتورهای مؤثر بر تولید آنزیم لیپاز در سویهٔ SA-2، مشخص شد که پنج فاکتور نسبت به بقیه بیشترین تأثیر را دارند (Amoozgar *et al.,* 2008). این پنج فاکتور شامل غلظت روغن زیتون، غلظت و نوع نمک (کلریدسدیم و کلریدپتاسیم)، pH، دما و دور شیکر بودند که در این آزمایش در دو سطح بررسی شدند. نتایج به‌دست‌آمده در جدول ۱ آمده است. اثر متقابل جفت متغیرهای مختلف بر میزان تولید آنزیم لیپاز، تعیین سهم نسبی هر فاکتور در فرآیند بهینه‌سازی به‌وسیلهٔ روش تحلیل واریانس، تعیین شرایط بهینه و درنهایت سنجش میزان تولید آنزیم در شرایط بهینه تحت بررسی قرار گرفت. جهت بررسی دوسطحی این فاکتورها و نیز مطالعهٔ وجود میان‌کنش بین هر پنج فاکتور با یکدیگر از آرایه‌های متعامد $L_{16}$ استفاده شد. ۱۶ آزمایش انجام‌شده به همراه فعالیت آنزیم در هر آزمایش در سویهٔ مورد نظر در جدول ۲ آمده است. پس‌از انجام آزمایشات و به‌دست‌آمدن فعالیت ویژهٔ آنزیم، اثر اصلی هر فاکتور بدون درنظرگرفتن میان‌کنش بین آنها محاسبه شد (جدول ۳). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده بیشترین تولید آنزیم لیپاز در pH ۸، دمای ۳۵°C، دور شیکر ۱۰۰ rpm، غلظت روغن زیتون ۲ درصد و نمک کلرید سدیم M ۱ به‌دست آمد. براساس این داده‌ها سه فاکتور pH، دور شیکر و نوع نمک تأثیربیشتری در مقایسه با دو فاکتور دیگر در تولید آنزیم داشتند.

### محاسبه میان‌کنش‌ها

برخی تأثیرات بر تولید آنزیم ناشی از خود فاکتورها به‌طور مستقیم نیست، بلکه میان‌کنش بین آنها نیز بر تولید آنزیم تأثیر می‌گذارد. با استفاده از روش آماری تاگوچی میان‌کنش بین جفت متغیرهای واکنش بررسی و نتایج در جدول ۴ آورده شده است. با توجه به ده میان‌کنش مشاهده شده بیشترین درصد شدت تأثیر متقابل یعنی ۷۰/۱ بین دما و pH و کمترین درصد میان‌کنش معادل ۰/۱ درصد بین نوع نمک و pH به‌دست آمده است. همچنین، با توجه به جدول ۴، بین فاکتورهای دما و دور شیکر و غلظت روغن و نمک نیز میان‌کنش درخور توجهی وجود دارد.

### تحلیل واریانس (ANOVA)

در جدول ۵، تحلیل واریانس نتایج حاصل از تولید آنزیم لیپاز با ۹۵ درصد اطمینان در قالب جدول ANOVA ارائه شده است. سپس، واریانس خطا با استفاده از روش آماری Pooling انجام گرفت و درجهٔ معنی‌دار بودن داده‌های به‌دست‌آمده محاسبه شد. بر این اساس، فاکتور میان‌کنش بین نوع نمک و pH که دارای کمترین تأثیر بود حذف شد و مجموع مربعات به‌دست‌آمده، 'SS

[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.3.3 ]

[ DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.288 ]

**جدول ۲**- آرایه‌های متعامد $L_{16}$ برای بهینه‌سازی فرایند تولید لیپاز در *Salinivibrio* sp. SA2 به روش تاگوچی.

**Table 2.** $L_{16}$ orthogonal array to optimize lipase production in *Salinivibrio* sp. SA2 using Taguchi method.

| شماره آزمایش | نمک (M) | دور شیکر (rpm) | دما (°C) | روغن زیتون (٪w/v) | pH | فعالیت (U/mg) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | کلرید پتاسیم ۰/۱ | ۱۰۰ | ۲۵ | ۱ | ۷ | ۶۷/۶۴ |
| ۲ | کلرید سدیم ۱ | ۱۵۰ | ۲۵ | ۱ | ۷ | ۶۰/۴۶ |
| ۳ | کلرید سدیم ۱ | ۱۰۰ | ۳۵ | ۱ | ۷ | ۶۵/۳۱ |
| ۴ | کلرید پتاسیم ۰/۱ | ۱۵۰ | ۳۵ | ۱ | ۷ | ۲۷/۵۴ |
| ۵ | کلرید سدیم ۱ | ۱۰۰ | ۲۵ | ۲ | ۷ | ۷۷/۵ |
| ۶ | کلرید پتاسیم ۰/۱ | ۱۵۰ | ۲۵ | ۲ | ۷ | ۶۳/۸ |
| ۷ | کلرید پتاسیم ۰/۱ | ۱۰۰ | ۳۵ | ۲ | ۷ | ۵۴/۱ |
| ۸ | کلرید سدیم ۱ | ۱۵۰ | ۳۵ | ۲ | ۷ | ۶۲/۹ |
| ۹ | کلرید سدیم ۱ | ۱۰۰ | ۲۵ | ۱ | ۸ | ۴۹/۱ |
| ۱۰ | کلرید پتاسیم ۰/۱ | ۱۵۰ | ۲۵ | ۱ | ۸ | ۵۵/۷۵ |
| ۱۱ | کلرید پتاسیم ۰/۱ | ۱۰۰ | ۳۵ | ۱ | ۸ | ۱۲۰/۴ |
| ۱۲ | کلرید سدیم ۱ | ۱۵۰ | ۳۵ | ۱ | ۸ | ۷۵/۸۸ |
| ۱۳ | کلرید پتاسیم ۰/۱ | ۱۰۰ | ۲۵ | ۲ | ۸ | ۵۴/۵۳ |
| ۱۴ | کلرید سدیم ۱ | ۱۵۰ | ۲۵ | ۲ | ۸ | ۹۱/۸۸ |
| ۱۵ | کلرید سدیم ۱ | ۱۰۰ | ۳۵ | ۲ | ۸ | ۱۲۲ |
| ۱۶ | کلرید پتاسیم ۰/۱ | ۱۵۰ | ۳۵ | ۲ | ۸ | ۵۰/۷۵ |

**جدول ۳**- مقایسهٔ اثر اصلی پنج فاکتور بررسی‌شده در دو سطح بر تولید آنزیم لیپاز براساس میزان S/N تعیین شده برای هر فاکتور در *Salinivibrio* sp. SA2.

**Table 3.** Comparison of five factors at two levels affected on lipase production by *Salinivibrio* sp. SA2, based on the S/N for each factor.

| فاکتور | میزان S/N اصلی | | مقدار بهینه |
|---|---|---|---|
| | سطح ۱ | سطح ۲ | |
| pH | ۵۹/۸۶ | ۷۷/۵۴ | ۸ |
| روغن زیتون | ۶۵/۲۶ | ۷۲/۱۳ | ۲ ٪ |
| دما | ۶۵/۰۸ | ۷۲/۳۱ | ۳۵ °C |
| دور شیکر | ۷۶/۳۳ | ۶۱/۰۷ | ۱۰۰ rpm |
| نمک | ۶۱/۸ | ۷۵/۶ | کلرید سدیم ۱ M |

[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.3.3 ]

[ DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.288 ]

**جدول ٤**- ارزیابی اثر میان‌کنش بین جفت فاکتورهای آزمایش بر تولید آنزیم لیپاز در *Salinivibrio* sp. SA2.

**Table 4.** Evaluation of factor interaction affecting lipase production by *Salinivibrio* sp. SA2.

| فاکتورها | شاخص شدت میانکنش (SI) | سطح مطلوب فاکتور (opt) |
|---|---|---|
| pH × دما | ۸۴/۱ | (۲و۲) |
| دور شیکر × دما | ۷۹/۶ | (۱و۲) |
| روغن زیتون × نوع نمک | ۷۸/۱ | (۲و۲) |
| دور شیکر × نوع نمک | ۵۰/۵۸ | (۲و۲) |
| دما روغن × زیتون | ۳۷/۸ | (۱و۲) |
| روغن زیتون × دور شیکر | ۱۶/۶ | (۱و۲) |
| نوع نمک × دما | ۱۴/۷ | (۲و۱) |
| pH × دور شیکر | ۹/۲ | (۲و۲) |
| روغن زیتون × pH | ۱/۹ | (۲و۲) |
| نوع نمک × pH | ۰/۱ | (۲و۲) |

**جدول ٥**- تحلیل واریانس فاکتورها و میان‌کنش میان آنها در تولید آنزیم لیپاز در باکتری *Salinivibrio* sp. SA2.

**Table 5.** ANOVA and interactions of factors in lipid production by *Salinivibrio* sp. SA2.

| فاکتور | نسبت F | مجموع مربعات (SS) | مجموع خالص مربعات (SS') | درصد تأثیر عامل (٪) |
|---|---|---|---|---|
| pH | ۱۰۶۴/۸۳۳ | ۱۲۴۳/۶۱۸ | ۱۲۴۲/۴۵ | ۱۳/۳۶ |
| روغن زیتون | ۱۶۴/۰۱ | ۱۹۱/۵۵ | ۱۹۰/۳۸ | ۲/۰۵ |
| دما | ۱۸۱/۵۱ | ۲۱۱/۹۹ | ۲۱۰/۸۲ | ۲/۲۷ |
| دور شیکر | ۷۹۱/۸۳ | ۹۲۴/۷۸ | ۹۲۳/۶۱ | ۹/۹۳ |
| نمک | ۶۵۳/۴۳ | ۷۶۳/۱۴ | ۷۶۱/۹۷ | ۸/۱۹۱ |
| روغن زیتون × pH | ۲۰/۰۱۷ | ۲۳/۳۸ | ۲۲/۲۱ | ۰/۲۳۹ |
| pH × دما | ۱۶۸۳/۰۱۱ | ۱۹۶۵/۵۸۸ | ۱۹۶۴/۴۲ | ۲۱/۱۱۷ |
| pH × دور شیکر | ۲۵/۷۶ | ۳۰/۰۸۸ | ۲۸/۹۲ | ۰/۳۱۱ |
| نوع نمک × pH | - | ۱/۱۶۸ | - | - |
| روغن زیتون × دما | ۱۵۷/۰۱۱ | ۱۸۳/۳۷ | ۱۸۲/۲۰۵ | ۱/۹۶ |
| روغن زیتون × دور شیکر | ۱۰۳/۸ | ۱۲۱/۲۳ | ۱۲۰/۰۶ | ۱/۲۹ |
| روغن زیتون × نوع نمک | ۱۲۳۱/۵۳۴ | ۱۴۳۸/۳۰۸ | ۱۴۳۷/۱۴ | ۱۵/۴۵ |
| دور شیکر × دما | ۱۵۰۸/۲۴۴ | ۱۷۶۱/۴۷۸ | ۱۷۶۰/۳۱ | ۱۸/۹۲۳ |
| نوع نمک × دما | ۶۹/۵۸۵ | ۸۱/۲۶۸ | ۸۰/۱ | ۰/۸۶۱ |
| دور شیکر × نوع نمک | ۳۰۹/۵۸۸۱ | ۳۶۱/۵۶۸ | ۳۶۰/۴ | ۳/۸۷۴ |

(مجموع مربعات با درنظرگرفتن خطا)، F (میزان اهمیت فاکتور مورد نظر)، و P (درصد تأثیرفاکتورها) محاسبه شد (جدول ۵). فاکتورهای میان‌کنش pH و دما، دما و دور شیکر، غلظت نمک و روغن، فاکتور pH، دور شیکر و غلظت نمک به‌ترتیب دارای بیشترین اهمیت در تولید آنزیم لیپاز در *Salinivibrio* sp SA-2 هستند.

## بحث

تا اواسط دهۀ ۶۰ میلادی، کار پژوهشی نسبتاً کمی بر روی نمک‌دوست‌ها انجام گرفته است. اما امروزه مطالعه درباب این میکروارگانیسم‌ها در جنبه‌های مختلف فیزیولوژی، اکولوژی، ژنتیک و بیوتکنولوژی توسعه یافته است. سازگاری و بقای میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست نسبی در محیط‌های با گسترۀ

[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-10-12 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.3.3 ]
[ DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.288 ]

نمکی(w/v) ٪۲۵-۰/۵ باعث می‌شود که پتانسیل خوبی جهت استفاده در صنعت داشته باشند. لیپاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های باکتریایی است که در صنایع مختلفی کاربرد دارد (de Lourdes Moreno *et al.*, 2013). در این مقاله به بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر روی تولید آنزیم لیپاز و بهینه‌سازی آن به روش تاگوچی در سویهٔ *Salinivibrio* sp SA-2 پرداخته شد. روش آماری تاگوچی از پرکاربردترین روش‌های طراحی آزمایش است. در این روش تعدادی از ترکیب‌های ممکن بین فاکتورها انتخاب شده و سپس با ارزیابی آماری نتایج، بهترین شرایط، که ممکن است در بین حالت‌های پیشنهادشدهٔ اولیه نیز وجود نداشته باشد، به‌منزلهٔ شرایط بهینه معرفی می‌شود. از دیگر مزیت‌های روش تاگوچی بررسی تأثیر میان‌کنش بین فاکتورها و نیز کاهش تعداد آزمایش‌ها در مقیاس صنعتی و آزمایشگاهی است (Lanka & Latha 2015).

در این پژوهش بهینه‌سازی تولید آنزیم لیپاز در باکتری نمک-دوست *Salinivibrio* sp SA-2 جداشده از رودخانهٔ گرمسار به روش آماری تاگوچی انجام گرفت. تأثیر پنج فاکتور pH، دما، دور شیکر، غلظت روغن زیتون، و نوع نمک در دو سطح بر تولید آنزیم لیپاز تحت بررسی قرار گرفت که شرایط بهینهٔ تولید به‌ترتیب ۸، ۳۵°C، ۱۰۰ rpm، ۲ درصد و کلرید سدیم ۱ M به‌دست آمد. گزارش‌های زیادی مبنی بر استفاده از روش تاگوچی برای بهینه-سازی فاکتورهای متنوع بررسی شده در این آزمایش در تولید آنزیم لیپاز باکتریایی موجود نیست. گرچه در گزارش Fabiszewska (2015) نسبت بهینهٔ روغن زیتون در تولید آنزیم لیپاز در قارچ *Yarrowia lipolytica* نیز دو درصد محاسبه شد. علاوه براین در آزمایشی که Amoozegar و همکاران (2008) انجام دادند، اثر چهار فاکتور pH، دما، دور شیکر و غلظت روغن زیتون در تولید لیپاز روی همین باکتری به روش One factor بررسی شد. براساس نتایج به‌دست آمده، شرایط بهینهٔ pH ۸، دمای ۳۵°C، دور شیکر ۱۵۰ rpm، و روغن زیتون ۲ درصد به‌دست آمد. همان‌طور که اشاره شد، دور شیکر بهینه در روش تاگوچی ۱۰۰ rpm به‌دست آمد. علت این تفاوت همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، بررسی هم‌زمان فاکتورها در روش مذکور، محاسبات آماری و نیز بررسی میان‌کنش بین فاکتورها است که بنابرآن مقداری متفاوت برای این فاکتور مشخص شده است.

با توجه به نتایج حاصل از تحلیل واریانس سه فاکتور pH، هوادهی و نمک بیشترین اثر اصلی را در مقایسه با دیگر فاکتورها بر تولید آنزیم لیپاز داشتند. همچنین، بین فاکتورهای "pH و دما"، "دما و هوادهی" و" روغن و نمک" میان‌کنش زیادی وجود داشت. وجود میان‌کنش بین این جفت فاکتورها بیانگر این مطلب است که اثرگذاری هر دو فاکتور بر فعالیت محاسبه شده برای آنزیم لیپاز در محیط کشت به یکدیگر وابسته است و در صورت ایجاد هر تغییری در یکی از دو فاکتور بهینه‌سازی فاکتور دیگر مجدداً بایستی انجام شود. با توجه به نتایج تحلیل واریانس و فاکتور F (میزان اهمیت فاکتور مورد نظر)، فاکتورهای pH، هوادهی و نمک، همچنین، میان‌کنش pH و دما و دما و هوادهی بیشترین اثر را بر بازده آنزیم نشان دادند، که در مطالعات بعدی می‌توانند بیشتر مورد بررسی قرار بگیرند. بنابراین در این گزارش با انجام معدود آزمایش‌های پیشنهادی روش آماری تاگوچی، شرایط بهینه برای تولید آنزیم لیپاز به‌دست آمد. در نتیجه با استفاده از این روش می‌توان از هزینه‌های سنگین بهینه‌سازی محصولات صنعتی جلوگیری کرده و به انجام تعداد کمتری آزمایش و در عین حال کسب نتایج بهتر دست پیدا نمود.

## سپاسگزاری

با سپاس از دکتر امیر صالحی نجف آبادی که در طراحی آزمایش به نگارندگان کمک نمودند. همچنین هزینه‌های این پژوهش توسط دانشگاه تهران تأمین شد.

## REFERENCES

**Amoozegar, M.A., Salehghamari, E., Khajeh, K., Kabiri, M. and Naddaf, S.** 2008. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. – J. Basic Microb. 48: 160-167.

**Babavalian, H., Amoozegar, M.A., Pourbabaee, A.A., Moghaddam, M.M., and Shakeri, F.** 2013. Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. – Microbiol. 82: 466-474.

**Dalmau, E., Montesinos J.L., Lotti M. and Casas C.** 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. – Enz. Microbiol. Technol. 26: 657-663.

[ Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.4.3.3 ]

[ DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.288 ]

**de Lourdes Moreno, M., Pérez, D., García, M. T., and Mellado, E.** 2013. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. – Life. 3: 38-51.

**Esteban-Torres, M., Mancheño, J.M., de las Rivas, B., and Munoz, R.** 2015. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria Lactobacillus plantarum useful in food fermentations. – LWT-Food Sci. Technol. 60: 246-252.

**Fabiszewska, A.U., Kotyrba, D., and Nowak, D.** 2015. Assortment of carbon sources in medium for Yarrowia lipolytica lipase production: A statistical approach. – Ann. Microb. 65: 1495-1503.

**Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P.** 2002. Bacterial alkalin proteases: Molecular approaches and industrial applications. – Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 15-32.

**Gutiérrez-Arnillas, E., Rodríguez, A., Sanromán, M.A., and Deive, F.J.** 2016. New sources of halophilic lipases: isolation of bacteria from Spanish and Turkish saltworks. – Biochem. Eng. J. 109: 170-177.

**Jaerger, K.E., Dijkstra, B.W. and Reetz, M.T.** 1999 Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. – Ann. Rev. Microbiol. 53: 315-351.

**Kamekura, M.A and Kushner, D.J.** 1984. Effect of chloride and glutamate on in vitro protein synthesis by the moderate halophile *Vi-brio costicola.* – J. Bacteriol. 160: 385-390.

**Kim, S.S, Kim, E.K. and Rhee, J.S.** 1996. Effects of growth rate on production of *P. fluorescens* lipase during the fed-batch cultivation of *E. coli*. – Biotechnol. Prog. 12: 718-722.

**Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., Singh, S.P., and Khare, S.K.** 2012. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. – Braz. J. Microb. 43: 1595-1603.

**Lanka, S., and Latha, J.** 2015. Taguchi design of experiments for the optimization of lipase production by *Emericella Nidulans* DAOM 222012 isolated from palm oil mill effluent (Pome) dump sites. – Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol. 6: 64-71.

**Schreck, S.D., and Grunden, A.M.** 2014. Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. – Appl. Microb. Biotech. 98: 1011-1021.

**Surinenite, B., Bendikiene, V. and Juodka, B.** 2002. Characterization and physicochemical properties of a lipase from *Pseoudomonas mendosina* 3121-1. –Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 47-55.

**Ventosa, A. and Nietoj, J.** 1995. Biotechnological applications of halophilic microorganisms. – World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 85-94.

**Ventosa. A., Nietoj, J. and Oren, A.** 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. – Microbiol. Mol. Bio. Rev. 62: 504-544.

*****

**Salehghamari, E. and Amoozegar, M.A.** 2017. Optimization of lipase production in *Salinivibrio* sp. SA2 by Taguchi design. – Nova Biol. Rep. 3: 288-294.

**صالح‌قمری، ا. و آموزگار، م.ع.** ۱۳۹۵. بهینه‌سازی تولید آنزیم لیپاز در *Salinivibrio* sp. SA2 با طراحی تاگوچی.– یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۲۹۴-۲۸۸.