

## جداسازی باکتری های تولید کننده آنزیم لیپاز از چربی شیر گاو و بهینه سازی اثر متغیرهای تاثیر گذار بر تولید آنزیم لیپاز در تخمیر غوطه وری

فریده طباطبایی یزدی<sup>۱\*</sup>، سید علی مرتضوی<sup>۱</sup>، سمیرا مرادی<sup>۲</sup>، علیرضا وسیعی<sup>۳</sup>، بهروز عزیزاده بهبهانی<sup>۳</sup>

۱- استاد و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۳- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱)

### چکیده

۲۵ سویه باکتری لیپولیتیک از نمونه چربی شیر جداسازی شد. بهترین سویه براساس اینکه تولید لیپاز آن با مقدار  $177 \text{ U/mL}$  نسبت به سویه های دیگر بیشتر است برای شناسایی و مطالعات بعدی انتخاب گردید. این سویه از طریق روش توالی یابی ژن  $16 \text{ SrRNA}$  بیشترین شباهت به سویه *باسیلوس سوبتیلیس* شناسایی شد. به منظور تولید آنزیم لیپاز با صرفه اقتصادی بهینه سازی با استفاده از روش سطح پاسخ صورت پذیرفت. غربال سازی ترکیبات محیط کشت و عوامل تاثیر گذار بر تخمیر از طریق روش آماری پلاکت برمن انجام گردید. در این تخمیر یازده فاکتور (روغن زیتون، عصاره مخمر، پپتون، منیزیم کلرید، گلوکز، شربت ذرت، ملاس، روغن کنجد، روغن سیاه دانه، سرعت چرخش و روغن آفتابگردان) غربال سازی شد و سپس بهینه سازی انجام شد. پس از بهینه سازی، نقطه بهینه محیط کشت شامل  $25\%$  روغن کنجد،  $25\%$  روغن زیتون،  $20 \text{ mM}$  منیزیم کلرید و  $1\%$  عصاره مخمر ( $160 \text{ rpm}$ ،  $6.7 \text{ pH}$ ،  $37$  درجه سانتیگراد به مدت  $24$  ساعت) شد و فعالیت آنزیمی  $574 \text{ U/mL}$  گزارش شد. پارامترهای کینتیکی  $V_{\text{max}}$  و  $K_m$  آنزیم لیپاز خام به ترتیب برابر با  $0.667 \text{ mM/min.mL}$  و  $1/62 \text{ mM}$  از طریق نمودار معادله میکائلیس-منتن محاسبه شد.

کلید واژگان: چربی شیر، لیپولیتیک، *باسیلوس سوبتیلیس*، روش سطح پاسخ

## ۱- مقدمه

لیپاز آنزیمی است که توانایی هیدرولیز استرها را دارد و نقش اختصاصی تبدیل تری گلیسرید به گلیسرول و اسید چرب را ایفا می کند، که به این عمل لیپولیز می گویند. لیپازها را می توان زیر مجموعه ای از استرازاها دانست. لیپازها نوعی گلیکوپروتئین هستند که در بدن اغلب جانداران یافت می شوند. این آنزیم های محلول در آب در متابولیسم تری گلیسریدها نقش دارند و موجب گوارش آن ها در بدن می شوند. لیپازها بعنوان مواد کاتالستی مورد توجه قرار می گیرند که سرعت واکنش را افزایش می دهند [۱]. لیپاز در میان پراستفاده ترین گروه آنزیم ها در کاربردهای بیوتکنولوژی و شیمی آلی است [۲].

تکنیک های مختلف تخمیری جهت تولید مناسب و بازده بالا محصول در صنعت استفاده می شود، تخمیر حالت جامد و تخمیر غوطه وری دو روش متداول و مرسوم برای تولید آنزیم است که با استفاده از ارلن مایر یا تخمیر در بیوراکتور انجام می شود [۳]. میکروارگانیسم شامل باکتری ها گرم مثبت، قارچ ها، مخمرها و اکتینومیست ها به عنوان منابع لیپاز خارج سلولی به دلیل سهولت بازیافت آنزیم از محیط کشت شناخته شده اند گونه های *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Acromobacter* و *Rhizopus*, *Pseudomonas*, *Candida*

*Geotrichum* به عنوان گونه های تجاری مهم شناخته می شوند [۴]. سوزوکی<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۱) باکتری لیپولیتیک *اسیتوباکتر* را از خاک، الوسان<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۰۹) یازده سویه باکتری ترموفیلیک، ورما<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۱) باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*<sup>۴</sup> تولید کننده لیپاز را از ضایعات آبی فرایند روغن، بوعزیز<sup>۵</sup> و همکاران (۲۰۱۱) سویه جدید *استافیلوکوکوس زاپلوسوس*<sup>۶</sup> و جوزف و همکاران (۲۰۱۲) باکتری سایکروفیلیک تولید کننده آنزیم لیپاز فعال در سرما

میکروباکتریوم لوتولوم<sup>۷</sup> از نمونه های خاک مناطق سرد جداسازی کردند [۵، ۶، ۷ و ۸] میکروارگانیسم های دارای پتانسیل تولید لیپاز را در زیستگاههای مختلف مانند ضایعات روغن های گیاهی، صنایع لبنی، خاک های آلوده به روغن، دانه ها و محصولات جانبی حاصل از تولید مواد غذایی مختلف می توان یافت [۹]. این مسئله را اثبات می کند که ترکیبات و مواد مختلف موجود در محیط زیست نظیر آب، خاک، گیاهان، دانه های روغنی، میوه ها، ضایعات مواد غذایی و غیره دارای پتانسیل زیادی برای جداسازی میکروارگانیسم های تولید کننده آنزیم لیپاز هستند [۱۰]. از چربی شیر گاو برای جداسازی باکتری های تولید کننده لیپاز استفاده شده است، زیرا چربی و روغن به عنوان عامل القاگر برای تولید آنزیم لیپاز عمل می کند و حضور این عامل در حضور دیگر مواد مورد نیاز جهت رشد در شیر به عنوان عاملی تاثیرگذار بر حضور باکتری های تولید کننده این آنزیم است. شرایط مختلف شامل نسبت غلظت کربن به نیتروژن، pH، هوادهی، یون های فلزی و دمای محیط کشت مهمترین پارامترهای تاثیر گذار بر تولید آنزیم هستند [۶، ۸].

هدف از این مطالعه جداسازی باکتری های تولید کننده آنزیم لیپاز از نمونه های مختلف چربی شیر بود، پس از جداسازی جهت تولید بالای لیپاز خارج سلولی در شرایط تخمیر غوطه وری تاثیر عوامل مختلف محیط کشت با بهینه سازی مورد بررسی قرار گرفت. در این نوع تخمیر از روغن زیتون و روغن کنجد به عنوان القاگر، منیزیم کلرید و عصاره مخمر استفاده شد. با استفاده از روش بهینه سازی سطح پاسخ نوع و غلظت بهینه ترکیبات و پارامترهای موثر بر کشت برای افزایش تولید آنزیم لیپاز بهینه سازی شد. بهینه سازی اشاره به بهبود عملکرد سیستم یا یک محصول به منظور به دست آوردن حداکثر بهره دارد. به طور معمول بهینه سازی، به عنوان ابزاری برای کشف شرایطی که در آن پاسخ به بهترین شکل ممکن است می باشد. به طور سنتی بهینه سازی از طریق نظارت بر تاثیر یک عامل در یک زمان در آزمایش های تجربی انجام شده

1. Suzuki
2. Olusesan
3. Verma
4. *Pseudomonas aeruginosa*
5. Bouaziz
6. *Staphylococcus xylosus*

7. *Microbacterium luteolum*

است. در میان روش های چند متغیره مناسب ترین روش بهینه سازی روش سطح پاسخ می باشد. در این مطالعه طرح آزمایشی مورد استفاده در نرم افزار رویه-پاسخ، طرح مرکب مرکزی می باشد [۱۳].

## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- مواد

مواد شیمیایی شامل تریتون ایکس ۱۰۰، تریس HCL، ایزوپروپانول، صمغ عربی، رد امین B، پپتون، عصاره مخمر، نوترینت براث، کلسیم کلرید، منیزیم کلرید ۶ آبه، منگنز کلرید ۴ آبه، مس کلرید، پتاسیم کلرید، سدیم کلرید و آهن [۳] کلرید از شرکت مرک آلمان تهیه شد. گلوکز، ساکارز، گالاکتوز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، سوربیتول، رافینوز، ملی بیوز و مانیتول از شرکت سیگما آلد ریچ کشور کانادا تهیه شدند. سایر مواد مورد استفاده دارای درجه آزمایشگاهی بودند.

### ۲-۲- روش جداسازی باکتری های تولید کننده آنزیم لیپاز

بعد از آماده سازی نمونه جهت کشت ابتدا یک غنی سازی اولیه در جهت افزایش تعداد میکروارگانیسم انجام شد. در یک ارلن مایر ۱۰۰ میلی لیتری مقدار ۵۰ میلی از محیط کشت حاوی ۸ g/L نوترینت براث و ۳ g/L سدیم کلرید<sup>۹</sup> (pH) برابر با ۶/۷ (۶/۷) آماده سازی گردید محیط کشت در دمای ۳۷°C و (۱۶۰ rpm) مقدار ۵۰ میلی از محیط کشت حاوی ۸g/L نوترینت براث و ۳ g/L سدیم کلرید<sup>۹</sup> (pH) برابر با ۶/۷ آماده سازی گردید محیط کشت در دمای ۳۷°C و سرعت چرخش ۱۶۰rpm به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکر دار گرمخانه گذاری گردید.

از محیط کشت افتراقی به منظور ایجاد محیط مناسب جهت رشد باکتری هایی با خاصیت تولید لیپاز خارج سلولی استفاده

شد. شرایط کشت بدین صورت بود که در یک ارلن مایر ۱۰۰ میلی لیتری مقدار ۵۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی حاوی ۸g/L نوترینت براث، ۳ g/L سدیم کلرید و ۲۵ g/L امولسیون روغن زیتون (pH برابر ۶/۵) آماده گردید مقدار ۲/۵ میلی لیتر از پری کالچر (۵٪) وارد محیط کشت اصلی گردید. برای هر نمونه ۳ محیط کشت آماده کرده و در دماهای ۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در ۱۶۰ rpm گرمخانه گذاری شد. به منظور شناسایی باکتری های تولید کننده آنزیم لیپاز براساس تغییراتی که بر ظاهر محیط کشت ایجاد می کنند، از محیط کشت حاوی ۱۰g/L عصاره مخمر، ۳g/L کلرید سدیم، ۲۵g/L روغن زیتون امولسیون شده و ۰/۰۰۱ g/L رودامین B، آگار ۲۵ g/L در pH ۷ استفاده شد. که در اطراف کلنی های تولید کننده آنزیم لیپاز در این محیط کشت در زیر تابش نور لامپ UV هاله نارنجی ایجاد می شود [۷]. چندین مرحله تا خالص سازی کامل بر روی همین محیط کشت رد امین B آگار کشت خطی داده شد و کلنی تک و خالص جدا شد.

### ۲-۳- شناسایی سویه جداسازی شده از طریق روش 16S rRNA

مرحله اول شناسایی استخراج DNA می باشد که از روش استخراج حرارتی استفاده گردید. مرحله بعدی انجام واکنش Polymerase Chain Reaction (PCR) است.. توالی -یابی و شناسایی ایزوله ها به روش مولکولی، با استفاده از تکثیر ژن 16S rRNA، انجام شد. پرایمرهای عمومی ذیل برای تکثیر ژن استفاده شد:

پرایمر Forward: 27F با توالی (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')  
پرایمر Reverse: 1492R با توالی (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')

توالی یابی به وسیله Cycle extension در یک دستگاه توالی کننده ABI 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) و با استفاده از

پرایمر پیشرو، 27FYM، انجام شد [۱۴].

## ۲-۴- نحوه آماده سازی امولسیون روغن زیتون

برای تهیه امولسیون روغن زیتون از صمغ عربی به عنوان پایدار کننده برای دست یافتن به یک امولسیون مناسب با پایداری کافی استفاده شد. برای تهیه امولسیون با صمغ عربی ابتدا آب را تا درجه حرارت ۴۵ درجه سانتیگراد حرارت داده شد سپس مقدار صمغ مورد نظر اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت محلول صمغ را بروی همزن مغناطیسی قرار داده در حین همزدن محلول روغن زیتون را به صورت قطرات ریز به ترکیب اضافه گردید. سپس با استفاده از دستگاه التراتراکس (۲ دقیقه ۵۰۰۰ rpm و ۳ دقیقه ۸ rpm) ترکیب صمغ و روغن زیتون هموژنیزه گردید [۱۵].

## ۲-۵- اندازه گیری فعالیت آنزیم لیپاز

سوسپانسیون میکروبی حاصل از کشت را سانتریفوژ کرده (سرعت ۶۰۰۰ rpm، دمای ۳۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه). سپس عصاره آنزیمی با فیلتر سرنگی ۰/۲ بدست آمد. برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی از سوسترای پلی نیتروفنیل پالمیتات استفاده شد. [۱۶]. فعالیت آنزیمی (U) مقدار آنزیمی که یک میکرومول پلی نیترو فنل را در دقیقه در شرایط آزمایش آزاد می کند.

## ۲-۶- تعیین پارامترهای کینتیکی

سوسترای پلی نیتروفنیل پالمیتات در غلظت های ۰/۵ تا ۱ mM/ml در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتیگراد و pH ۷ برای تعیین پارامترهای کینتیکی سرعت واکنش حداکثر mM/min (Vmax) و ثابت میکائیلیس متن mM (Km) برای آنزیم لیپاز خام به کار برده شده است. یک واحد فعالیت آنزیمی (U) به عنوان مقدار

آنزیمی است که یک میکرومول اسید چرب را در دقیقه از هیدرولیز پلی نیتروفنیل پالمیتات در شرایط واکنش آزاد می کند. پارامترهای کینتیکی از نمودار معادله Lineweaver-burk تخمین زده شد [۱۷].

## ۲-۷- غربال گری فاکتورها با طرح آزمایش

## PB

برای غربال سازی اولیه ترکیبات محیط کشت و عوامل کشت از طرح PB استفاده کردیم. با استفاده از نرم افزار Design-Expert 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) در تخمیر حالت غوطه وری جدول ۱ یازده فاکتور (روغن زیتون، عصاره مخمر، پپتون، منیزیم کلرید، گلوکوز، شربت ذرت، ملاس، روغن کنجد، روغن سیاه دانه، سرعت چرخش و روغن آفتابگردان) غربال سازی شد. تمام آزمایشات در دمای ۳۰°C انجام گردید.

**Table 1** Experimental variables in two levels for production of lipase enzyme by *Bacillus subtilis* in submerge fermentation

variables	Unit	Symbol	Low level	High level
Sesame oil	%	A	5	25
Black seed oil	%	B	5	25
Glucose	%	C	5	25
Yeast extract	g/l	D	5	15
Peptone	g/l	E	5	12
Olive oil	g/l	F	5	25
MgCl <sub>2</sub>	mM	G	15	35
Molasses	g/l	H	5	12
Sunflower oil	%	J	5	25
Agitation rate	rpm	K	140	190
Corn syrup	g/l	L	5	25

## ۸-۲- بهینه سازی با استفاده از روش سطح

## پاسخ

بعد از غربال سازی اولیه بر طبق نتایج بدست آمده متغیرهای که تاثیر بیشتری داشته را انتخاب کرده و طرح مربع مرکزی برای هر دو حالت در جهت بهینه سازی سطوح تولید آنزیم لیپاز مورد استفاده قرار گرفت. روش سطح پاسخ معمولا برای بررسی اثر ترکیبی چندین متغیر به منظور یافتن شرایط بهینه برای یک شرایط چند متغیره به کار می رود. براساس غربال سازی صورت گرفته چهار متغیر روغن کنجد (A)، روغن زیتون (B)، منیزیم کلرید (C) و عصاره مخمر (D) به عنوان متغیرهای مستقل و مقدار فعالیت آنزیم متغیر پاسخ (R) وابسته مورد بررسی قرار گرفتند (۱۶۰rpm، ۶/۵pH، ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت).

شرایط بهینه سازی در مواد رو روش های باید ذکر شود

## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- جداسازی باکتری

براساس آزمایشات صورت گرفته و کشت های متوالی ۲۵ سویه باکتری خالص سازی شدند. این ۲۵ سویه بر محیط کشتی که دارای ماده ی رنگی رد امین B است جداسازی شدند. این ماده رنگی دارای خاصیت فلورسنت است بدین صورت که با تابش نور UV بر روی این محیط کشت با فعالیت لیپازی باکتری روی ترکیب روغنی محیط کشت (روغن زیتون) اسیدهای چرب، مونو و دی گلیسریدها تولید شده با این ماده رنگی دی مر تشکیل داده و در نتیجه تابش نور UV هاله نارنجی اطراف کلنی رویت می شود [۱۸]. جنتی و زیومک (۱۹۹۴) روشی را برای سنجش فعالیت لیپاز براساس

برهم کنش رودامین B با اسیدهای چرب آزاد شده ناشی هیدرولیز تری گلیسریدها گزارش کردند. روش بررسی رودامین- تری گلیسرید- آگاروز<sup>۱۱</sup> انعطاف پذیری زیادی در انتخاب سوبسترا دارد و تعداد زیادی نمونه را می توان همزمان مورد سنجش قرار داد که سنجش فعالیت لیپاز در ستون جداسازی در طی تصفیه را فراهم می سازد [۱۹].

فعالیت لیپاز این باکتری ها با روش اسپکتروفتومتری براساس خاصیت تجزیه پلی نیتروفنیل پالمیتات به عنوان سوبسترا اندازه گیری شد. براساس نتایج بدست آمده شکل ۱، سویه (FM11) بیشترین فعالیت لیپازی از خود نشان داد (U/ml) ۱۷۷/۳±۲۰ که جهت مطالعات بعدی انتخاب شدند. سویه ای که بیشترین فعالیت را از خود نشان داد مورد بررسی بیشتر قرار گرفت. شناسایی باکتری لیپولیتیک با روش توالی یابی و تکثیر ژن rRNA ۱۶S انجام شد. توالی بدست آمده با توالی بانک ژن با استفاده از برنامه BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> مقایسه

شد (۱۸). نتایج نشان داد که سویه جدا شده شباهت بسیاری با سویه باسیلوس سوبتیلیس دارد. این باکتری گرم مثبت، میله ای، غیر متحرک می باشد. همچنین قادر به رشد تا غلظت ۵٪ نمک طعام و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد می باشد (جدول ۲). تولید لیپاز از سویه های مختلف باسیلوس در مقالات مختلف گزارش شده است. سویه های باسیلوس سوبتیلیس [۱۶۸] [۱۹]، باسیلوس سوبتیلیس [۲۰]، باسیلوس استاروتر موفیلوس [۲۱]، باسیلوس کوآگولانس [۲۲] و باسیلوس اسفریکوس [۲۳] جداسازی شده اند. گایاتری<sup>۱۱</sup> و همکاران (۲۰۱۳) سویه های باسیلوس تولید کننده لیپاز خارج سلولی را از خاک آسیاب روغن نارگیل<sup>۱۲</sup> در سالم<sup>۱۳</sup> جداسازی کردند [۲۴].

11. Gayathri  
12. Coconut oil mill soil  
13. Salem

غربال گری به منظور کاهش پارامتر های اصلی طراحی یا فاکتور ها از طریق شناسایی فاکتور های کلیدی که در کیفیت محصول یا عملکرد فرایند موثر هستند، انجام می شود. این کاهش فاکتور ها منجر به بهبود فرایند با تعداد کمی از پارامترها می شود. در واقع برای حذف فاکتورهای غیر مهم، قبل از تلف کردن زمان و هزینه، آزمایش غربال گری باید انجام گیرد. آزمایش های غربال گری معمولاً در مراحل اولیه طرح وقتی که احتمال می دهیم عوامل زیادی در پاسخ بی اثر یا کم اثر هستند، انجام می گیرند. هدف اصلی در آزمایش های غربال گری شناسایی مهم ترین عوامل مؤثر روی پاسخ نهایی از بین تمامی عوامل موجود است. در این جا تخمین برهم کنش ها ممکن نیست و اگر لازم باشد که بین اثر فاکتورها و برهم کنش ها تفاوت قائل شویم باید یک طراحی فاکتوریلی انجام گیرد [۲۷].

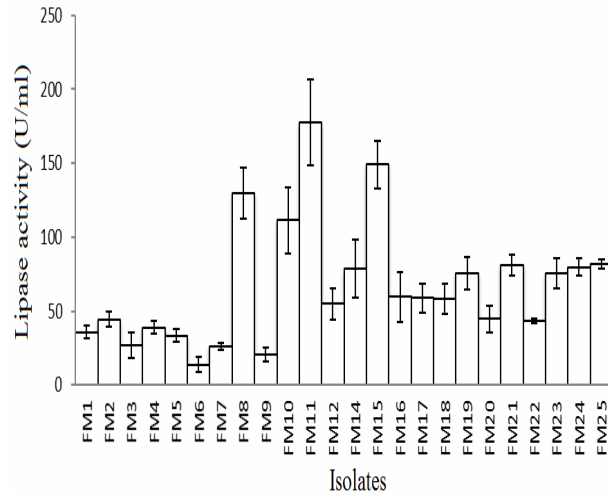


Fig 1 Comparison of The lipase activities of bacterial isolates

### ۲-۳- غربال سازی از طریق PB در حالت

#### تخمیر جامد و غوطه وری

Table 2 Morphological and biochemical characterization of potential lipolytic bacterial isolate

Characteristic	result
Configuration, Gram's reaction and shape, Motility	Gram positive, short rods non-motile
Growth on:	
citrate, H2S production, catalase	Positive
Voges-proskauer,	
Indole, urea hydrolysis, oxidase, Nitrate reduction	Negative
Tolerance to NaCl (% w/v)	0-5%
(Temperature range °C)	15-45
Acid production from:	
L-Arabinose, Cellobiose, Raffinose	Negative
Gentiobiose, D-Glucose, Inositol, Inulin, Lactose, D-Lyxose, Maltose, D-Mannose, Melezitose, Melibiose, L-Rhamnose, Sucrose, D-Tagatose, Trehalose, D-Xylose	positive

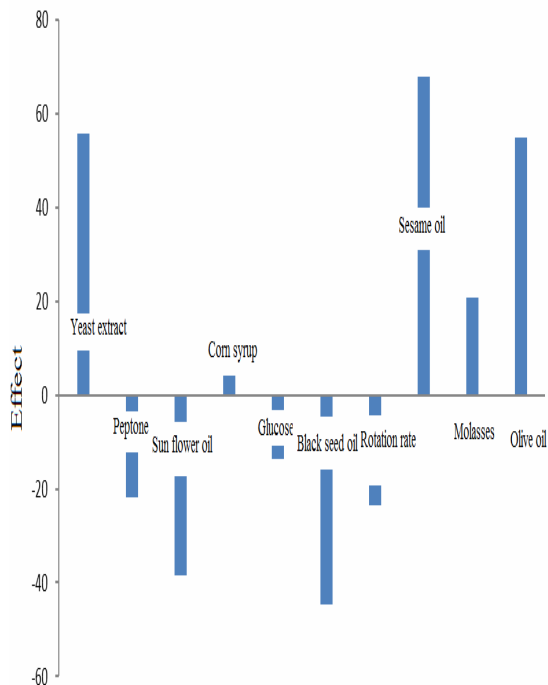
عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن تاثیر بسیار معنی داری داشته اما پیتون و شربت ذرت تاثیر کمتری نشان داده اند. صالح و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که منابع نیتروژن آلی، تریپتون و شربت ذرت بر روی تولید لیپاز توسط *رایزوپوس اوریزا* تاثیر ندارند. روغن ها به عنوان القاءگر در تولید آنزیم لیپاز عمل می کنند و حضور آنها در محیط کشت کاملا ضروری است [۲۶]. کومار و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که تولید لیپاز به وسیله *باسیلوس کوآگولانس* با استفاده از عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن را گزارش کردند [۲۷]. ورما و همکاران (۲۰۱۲) در محیط کشت *سودوموناس آئروجینوزا* برای تولید آنزیم لیپاز از منابع مختلف نیتروژنی استفاده کردند که بهترین فعالیت را هنگامی که از عصاره مخمر استفاده شد بدست آمده و بدترین نتیجه در هنگام استفاده از پیتون بدست آمده است [۲۸].

آنزیم لیپاز در سطح مشترک آب و روغن عمل می کند هر چه سطح تمام بین روغن و آب افزایش یابد سبب افزایش دسترسی میکروارگانیسم برای جذب مواد مورد نیاز خود می شود. پس باید به طریقی با ایجاد امولسیون مناسب و پایدار این سطح تماس را افزایش داد. بدین منظور از صمغ عربی به عنوان امولسیون کننده و پایدار کننده قوی استفاده شده است و همچنین از روغن زیتون استفاده گردید [۱۶]. افزایش فعالیت آنزیم در حضور روغن زیتون که به عنوان القاء کننده در محیط کشت عمل می کند را می توان به مقدار بالای اسیدهای چرب بلند زنجیر و غیر اشباع مانند اولئیک اسید نسبت داد. این حقیقت در مطالعات صورت گرفته در مورد تولید لیپاز از *امیکولانوپسیس مدیترانه‌ای* و میکروباکتریوم *لوتئوم* اثبات شده است [۲۹، ۳۰]. نیتروژن و کربن سوبستراهای اصلی برای رشد باکتری هستند که معمولا از منابع طبیعی فراهم می شوند [۳۱]، که نشان می دهد میکروارگانیسم های که بازده بالاتری از لیپاز را نشان می دهند که در محیط تخمیری آنها منبع نیتروژن آلی همرا با روغن زیتون به عنوان منبع کربن در غلظت بهینه استفاده شده است [۳۲] در پژوهش های دیگر صورت گرفته از عصاره مخمر به

۱۲ آزمایش براساس طرح غربال سازی PB (جدول ۳) (در شرایط تخمیر در دمای ۳۰°C به مدت ۴۸ ساعت و pH اولیه ۶/۱) برای انتخاب متغیرهای موثر بر تولید آنزیم لیپاز در میان ۱۱ فاکتور انتخابی موثر بر فرایند انجام شد. در تخمیر حالت غوطه وری با توجه به نتایج بدست آمده منحنی تاثیر متغیرها (شکل ۲) عواملی که تاثیر مثبت، منفی داشته را نشان داد. روغن کنجد، عصاره مخمر، روغن زیتون و منیزیم کلرید به ترتیب موثرترین متغیرها بودند. متغیرهای روغن سیاه دانه، روغن آفتابگردان، سرعت چرخش، پیتون و گلوکز تاثیر منفی داشتند. ملاس، و شربت ذرت هم تاثیر مثبت داشتند اما کمتر از متغیرهای دیگر بود. روغن کنجد به گروه اسیدهای اولئیک - لینولئیک متعلق است. این روغن کمتر از ۱۵ درصد اسید چرب اشباع دارد که بیشترین آن پالمیتیک و استئاریک و بیش از ۸۵ درصد مجموع اسیدهای چرب آن غیراشباع است. اسید اولئیک و اسید لینولئیک بیش از ۸۰ درصد کل اسیدهای چرب روغن کنجد را تشکیل می دهند. همچنین اسید اولئیک اسید چرب شاخص روغن زیتون است. ویژه گزینی سوبسترا بستگی به ساختار شیمیایی ملکول سوبسترا و خصوصیات فیزیکی امولسیون دارد [۲۵] در نتیجه این نتیجه نشان دهنده ویژگی این باکتری نسبت به اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر دارد. در روغن سیاه دانه اسید لینولئیک اسید چرب این روغن است که در این مطالعه نشان می دهد این اسید چرب تاثیر بازدارندگی بر روی تولید لیپاز بر روی این سویه دارد. بو عزیز و همکاران (۲۰۱۱) در محیط کشت سویه *استافیلوکوکوس زايلوسوس* از امولسیون روغن زیتون استفاده کردند که فعالیت آنزیمی را تسریع کرده است. افزایش فعالیت آنزیم در حضور روغن زیتون که به عنوان القاء کننده در محیط کشت عمل می کند را می توان به مقدار بالای اسیدهای چرب بلند زنجیر و غیر اشباع مانند اولئیک اسید نسبت داد [۷]. منبع نیترون مناسب برای رشد و تولید متابولیت همان طوری که گفته شده بسیار ضروری است. در آزمایش صورت گرفته

برشی منجر به تاثیر منفی بر روی رشد سلولی و فعالیت آنزیم می گردد [۳۷].

مواد معدنی نقش معنی داری در تولید لیپاز دارد. آنها به عنوان کوفاکتور در مسیرهای بیوسنتز آنزیم می توانند تولید متابولیت های باارزشی را بهبود دهند. برای سویه اسپیتوباکتر کالکواستیکوس *BD 413*، اسپرژیلوس نایجر و سودوموناس سودوآلکالیژنس *F-III* به طور معنی داری یون منیزیم باعث تشدید تولید آنزیم لیپاز شده است [۳۲، ۳۸].



**Fig 2** Estimated effects of ten variables via Plackett–Burman design on lipase activity of *Bacillus subtilis* strain.

### ۳-۳- بهینه سازی با استفاده از روش سطح

#### پاسخ

در این طرح چهار متغیر روغن کنجد (A)، روغن زیتون (B)، منیزیم کلرید (C) و عصاره مخمر (D) به عنوان متغیرهای مستقل و مقدار فعالیت آنزیم متغیر پاسخ (R) وابسته مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۴).

عنوان منبع نیتروژن و روغن زیتون به عنوان منبع کربن برای تولید لیپاز از باسیلوس *FH5* استفاده شده است [۳۳]. راماکریشان<sup>۱۴</sup> و بنرجی<sup>۱۵</sup> (۱۹۵۲) از کنجاله کنجدی که حاوی ۱۰٪ روغن کنجد بود در محیط کشت پنی سیلیوم کریزوزنم استفاده کردند که آنزیم فعالیت قابل توجهی را در حضور این سوبسترای جامد نشان داد [۳۴]. ارتوگرو و همکاران (۲۰۰۷) از سویه باسیلوس در بستر جامد ضایعات آسیاب زیتون به فعالیت ۱۶۸ U/ml دست یافت [۴]. کانتسینی و همکاران (۲۰۰۹) تاثیر ۲۰ ترکیب محیطی برای تولید لیپاز توسط اسپرژیلوس نایجر را مورد بررسی قرار داد. با استفاده از طرح PB غربال سازی اولیه انجام گرفته و شش ترکیب (گلوکز، عصاره مخمر، پپتون، آمونیوم بی فسفات، آمونیوم فسفات و محتوای آب) بهینه سازی کردند که بازده فعالیت به U/mL ۳۳/۰۳ رسید [۳۵]. بورکرت<sup>۱۶</sup> و همکاران (۲۰۰۴) از روش سطح پاسخ برای مطالعه تاثیر منابع کربن (روغن سویا، روغن زیتون و گلوکز) و غلظت منابع نیتروژن (شربت ذرت<sup>۱۷</sup> و آمونیوم نترات) در تولید لیپاز به وسیله سویه جنوتریکوم استفاده کردند. ترکیبات بهینه محیط برای تولید لیپاز شامل آمونیوم نترات ۲/۵-۲/۱٪، شربت ذرت ۱۵-۱۳٪ و روغن سویا ۰/۶٪ به عنوان منبع کربن که منجر به فعالیت لیپاز در حدود ۲۰ U/mL شده است. در هنگام استفاده از روغن زیتون به عنوان منبع کربن ترکیبات بهینه شامل نترات آمونیوم ۰/۸-۱٪، شربت ذرت ۱۵-۱۳٪ و روغن زیتون ۰/۶٪ منجر به فعالیت ۱۷ U/mL شده است [۳۶]. کومار<sup>۱۸</sup> و همکاران (۲۰۰۵) تولید لیپاز قلیایی توسط باسیلوس کوآگولانس<sup>۱۹</sup> را بررسی کردند که هنگامی که منبع کربن، منبع نیتروژن و pH اولیه محیط بهینه شدند فعالیت افزایش یافته است [۲۷]. سرعت چرخش نیز بر تولید آنزیم تاثیر منفی گذاشته است. افزایش بیشتر از حد سرعت چرخش به دلیل افزایش نیروی

14. Ramakrishan
15. Banerjee
16. Burkert
17. corn steep liquor
18. Kumar
19. *Bacillus coagulans*



**Table 3** Plackett–Burman matrixes for the evaluation of the lipase activity produced by *Bacillus subtilis* isolate

Run	Experimental variables											Lipase activity (U/ml)
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	125
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	54
3	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	122
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	36
5	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	90
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	35
7	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	101
8	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	259
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	126
10	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	22
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	46
12	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	15

**Table 4** Central composite experimental design matrixes for the evaluation of the lipase activity produced in submerge fermentation.

Run	Experiment variances (real date)				Response Lipase activity (R)
	Sesame oil % (A)	Olive oil % (B)	MgCl <sub>2</sub> (mM) (C)	Yeast extract % (D)	
1	10	1.5	20	0.5	245
2	20	1.5	20	0.5	259
3	10	3	20	0.5	276
4	20	3	20	0.5	289
5	10	1.5	30	0.5	233
6	20	1.5	30	0.5	312
7	10	3	30	0.5	261
8	20	3	30	0.5	401
9	10	1.5	20	1.5	265
10	20	1.5	20	1.5	392
11	10	3	20	1.5	212
12	20	3	20	1.5	437
13	10	1.5	30	1.5	204
14	20	1.5	30	1.5	492
115	10	3	30	1.5	371
16	20	3	30	1.5	508
17	0.5	2.25	25	1	254
18	25	2.25	25	1	574
19	15	0.75	25	1	195
20	15	3.75	25	1	376
21	15	2.25	15	1	205
22	15	2.25	35	1	323
23	15	2.25	25	0	209
24	15	2.25	25	2	327
25	15	2.25	25	1	325
26	15	2.25	25	1	323
27	15	2.25	25	1	329
28	15	2.25	25	1	321
29	15	2.25	25	1	325
30	15	2.25	25	1	328
31	15	2.25	25	1	330

نمودارهای تاثیر متغیرهای مستقل بر فعالیت آنزیم لیپاز در حالت غوطه وری در شکل ۳، آورده شده است. شکل ۳.a نمودار تاثیر متقابل روغن زیتون و روغن کنجد را بر میزان آنزیم لیپاز تولیدی را نشان می دهد. با ثابت در نظر گرفتن مقدار روغن زیتون با افزایش مقدار روغن کنجد فعالیت آنزیمی افزایش می یابد، اما با ثابت در نظر گرفتن مقدار روغن کنجد با افزایش روغن زیتون فعالیت آنزیمی افزایش محسوسی ندارد اما با افزایش هر دو متغیر فعالیت آنزیمی به مقدار بیشتری افزایش می یابد. شکل ۳.b نیز تاثیر متقابل غلظت منیزیم کلرید (mM) و روغن کنجد را بر تولید لیپاز نشان می دهد. هنگامی که مقدار روغن کنجد افزایش می یابد و مقدار منیزیم کلرید ثابت در نظر گرفته شود فعالیت آنزیمی به طور معنی داری افزایش می یابد اما در شرایط برعکس که منیزیم کلرید افزایش اما روغن کنجد ثابت است فعالیت آنزیمی افزایش معناداری ندارد. اما با اثر متقابل این دو متغیر (افزایش همزمان این متغیرها) فعالیت آنزیمی به مقدار معناداری افزایش می یابد. در شکل ۳.c نمودار تاثیر متغیرهای روغن کنجد و عصاره مخمر را نشان می دهد که مانند دو نمودار قبلی روغن کنجد نسبت به متغیر عصاره مخمر تاثیر بیشتر بر تولید آنزیم داشته و همزمان با افزایش مقدار این دو متغیر فعالیت آنزیمی به مقدار بیشتری افزایش نشان داده است. دو نمودار بعدی (d و e) به ترتیب اثر متقابل منیزیم کلرید به روغن زیتون و عصاره مخمر نشان می دهد که در هر کدام از این دو شرایط هر دو متغیر تاثیر تقریباً یکسانی بر تولید آنزیم نشان می دهند. با توجه به نتایج بدست آمده می توان نتیجه گیری کرد که روغن کنجد به دلیل نوع اسیدهای چرب شرکت کننده در ساختار شیمیایی اش باعث ویژه گزینی این باکتری نسبت به این روغن شده است.

در این مرحله آزمایش ها انجام شدند و نتایج مربوطه حاصل گردید. معادله **Error! Reference source not found.** ۱ بدست آمد. در معادله ها مقادیر  $R_1$  به عنوان فعالیت آنزیمی و متغیرهای A, B, C, D متغیرهای مستقل می باشند.

$$R_1 = 322/86 + 29/29A + 29/79B + 26/79C + 37/1D + 0/44AB + 17/56AC + 33/19AD + 15/44BC - 0/19BD + 8/19CD + 24/23A^2 - 7/89B^2 - 13/27C^2 - 11/03D^2$$

در این طرح براساس نتایج بدست آمده و نتایج حاصل از جدول ANOVA (جدول ۴) در صورتی که مقدار p کمتر از ۰/۰۰۰۱ باشد مدل معنادار است و در غیر این صورت مدل معنا دار نخواهد بود. در این آزمایش با توجه به مقادیر بدست آمده از جدول تجزیه واریانس (جدول) مدل معنادار است. همچنین مقادیر ضریب تبیین ( $R^2$  ۰/۹۳) و ضریب تبیین تعیین شده  $R_{adj}^2$  (۰/۸۷) اثبات می کند مدل معنی دار است. به عبارتی ۹۳٪ تغییرات پاسخ به تغییر متغیرهای مستقل مربوط می شود و تنها ۷٪ از تغییرات پاسخ با مدل قابل توجیه نیست. دقت کافی<sup>۲۰</sup> دامنه مقادیر پیش بینی شده در نقاط طرح با میانگین خطای پیش بینی شده است. این فاکتور نسبت سیگنال به نوفه<sup>۲۱</sup> را اندازه گیری می کند که نسبت بزرگتر از ۴ مناسب است که در این طرح مقدار این پارامتر ۱۵/۸۵ است [۱۴].

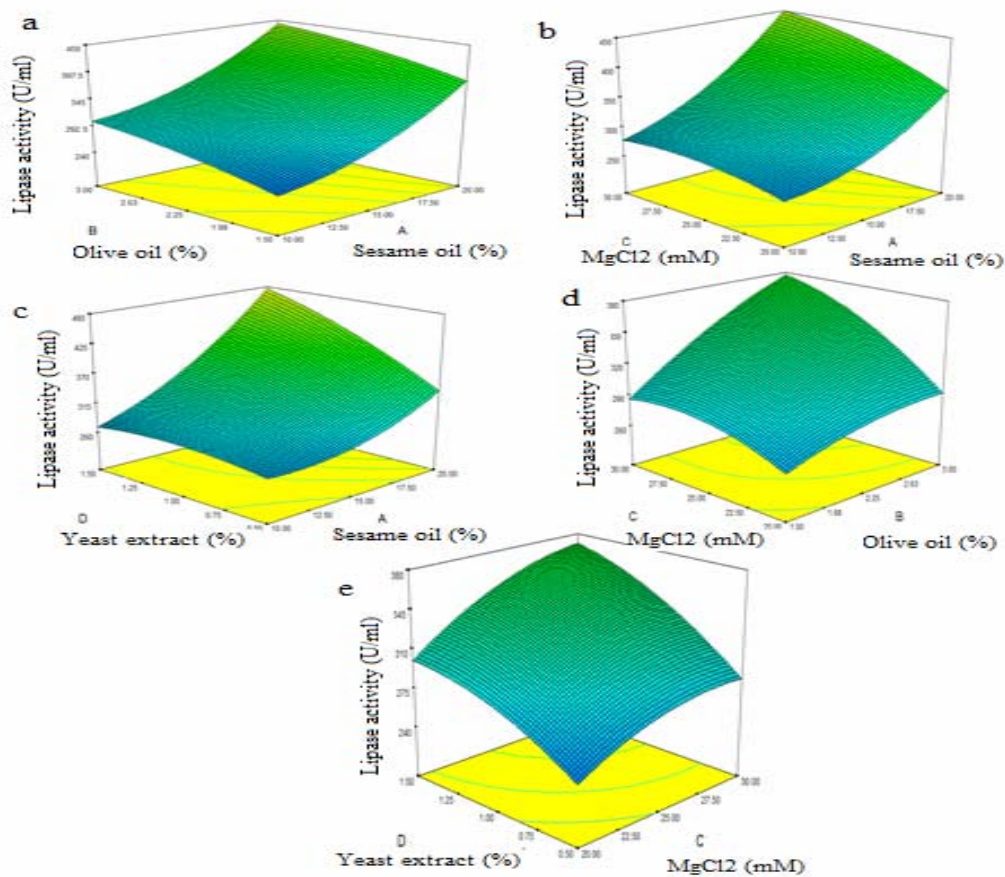
همچنین برای هر متغیر مقادیر p بزرگتر از ۰/۰۵ (در سطح ۵٪) اثبات می کند که متغیر مورد بررسی تاثیر معنی در مدل ندارد و در غیر این صورت (مقادیر کوچکتر از ۰/۰۵) تاثیر معناداری بر روی پاسخ ها دارد. پس از بدست آمدن نتایج و بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که متغیرهای مستقل (روغن کنجد، روغن زیتون، منیزیم کلرید و عصاره مخمر) و تاثیر متقابل این متغیرها (AB, AC, AD, BC, CD, D<sup>2</sup>) با توجه به بالاتر بودن مقادیر p بزرگتر از ۰/۰۵ تاثیر معناداری بر تولید لیپاز در این شرایط دارند.

20. adequate precision

21. noise

**Table 4** ANOVA of the experimental results of the optimization

Source	F value	P value
Model	16.91	0.00001>
Sesame oil (A)	112.18	0.0000>
Olive oil (B)	20.74	0.0003
MgCl <sub>2</sub> (C)	16.77	0.0008
Yeast extract (D)	31.48	0.00001>
AB	2.981 E-003	0.9571
AC	4.27	0.0553
AD	17.16	0.0008
BC	3.7	0.0720
BD	5.476 E-004	0.9816
CD	1.04	0.3221
A <sup>2</sup>	16.35	0.0009
B <sup>2</sup>	1.73	0.2065
C <sup>2</sup>	4.9	0.0417
D <sup>2</sup>	3.38	0.0847



**Fig 3** 3D surface plots showing the significant ( $p < 0.05$ ) interaction effects on the activity variation of lipase (a-e) produced by *Bacillus subtilis*.

### ۳-۴- بهینه سازی از طریق مدل برازش و رشد

#### سلولی و پارامترهای کینتیکی در نقطه بهینه

بهینه سازی اشاره به بهبود عملکرد سیستم یا یک محصول به منظور به دست آوردن حداکثر بهره دارد. به طور معمول بهینه سازی، به عنوان ابزاری برای کشف شرایطی که در آن پاسخ به بهترین شکل ممکن است می باشد. به طور سنتی بهینه سازی از طریق نظارت بر تاثیر یک عامل در یک زمان در آزمایش های تجربی انجام شده است. هدف از یافتن نقطه مطلوب در فضای طرح است. این نقطه بسته به هدف فرایند می تواند یک نقطه بیشینه، کمینه یا ناحیه ای که در آن پاسخ در سراسر دامنه متغیرها ثابت باشد. در آزمایشهای صورت گرفته در شرایط مختلف محیط کشتی حاوی ۲۵٪ روغن کنجد، ۲۵٪ روغن زیتون، ۲۵mM منیزیم کلرید و ۱٪ عصاره مخمر ( ۱۶۰rpm، ۶/۵pH، ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت) فعالیت آنزیمی ۵۷۴U/mL گزارش شد فعالیت آنزیم نسبت به حالت قبل غوطه وری قبل از انتخاب پارامترهای مناسب ۳/۲۴ برابر افزایش نشان می دهد. تایید نقطه بهینه با سه تکرار انجام شد که بهینه بودن شرایط را اثبات کرد (۱۲±۵۶۳). کینتیک رشد و فعالیت آنزیم (شکل ۵) نشان می دهد که ۴ ساعت اول کشت فعالیت آنزیم و رشد سلولی تغییر قابل توجهی ندارد و بعد از این زمان وارد فاز لگاریتمی رشد شده است. در فاز سکون (ساعت ۵۶) بیشترین فعالیت نشان داده شده است. پارامترهای کینتیکی  $V_{max}$  و  $K_m$  آنزیم لیپاز خام به ترتیب برابر با ۰/۶۶۷ mM/min.mL و ۰/۶۶۷ mM (شکل ۶) هر چه مقدار  $K_m$  کمتر باشد نشاندهنده  $affinity$  بالاتر بین آنزیم و سوبسترا است و هر چه  $V_{max}$  بیشتر نشاندهنده کارایی کاتالیتیکی بالاتر آنزیم است.

بورکرت<sup>۲۲</sup> و همکاران (۲۰۰۴) از روش سطح پاسخ برای مطالعه تاثیر منابع کربن (روغن سویا، روغن زیتون و گلوکز) و غلظت منابع نیتروژن (شربت ذرت<sup>۲۳</sup> و آمونیوم نترات) در تولید لیپاز به وسیله سویه جئوتریکوم استفاده کردند. ترکیبات بهینه محیط برای تولید لیپاز شامل آمونیوم نترات ۲/۵-۲/۱٪، شربت ذرت ۱۵-۱۳٪ و روغن سویا ۰/۶٪ به عنوان منبع کربن که منجر به فعالیت لیپاز در حدود ۲۰ U/ml شده است. در

هنگام استفاده از روغن زیتون به عنوان منبع کربن ترکیبات بهینه شامل نترات آمونیوم ۱-۰/۸٪، شربت ذرت ۱۵-۱۳٪ و روغن زیتون ۰/۶٪ منجر به فعالیت ۱۷ U/mL شده است [۳۶] کومار<sup>۲۴</sup> و همکاران (۲۰۰۵) تولید لیپاز قلیایی توسط باسیلوس کوآگولانس<sup>۲۵</sup> را بررسی کردند که هنگامی که منبع کربن، منبع نیتروژن و pH اولیه محیط بهینه شدند فعالیت افزایش یافته است. فعالیت ۱/۱۶U/mL در مدت زمان ۴۸ ساعت، دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و pH برابر ۸/۵ که در این محیط از روغن خردل به عنوان منبع کربن و ترکیب پپتون و عصاره مخمر به نسبت یک به یک استفاده شده، بدست آمده است [۲۷]. مایا<sup>۲۶</sup> و همکاران (۲۰۰۱) تولید لیپاز از سویه برزیلی فوزاریوم سولانی<sup>۲۷</sup> را بررسی کردند. تاثیر منابع کربن مختلف و عناصر کم مقدار اضافه شده به محیط با هدف تقویت تولید لیپاز را مطالعه کردند. بالاترین فعالیت ویژه لیپاز (۰/۴۵ U/mg) برای روغن کنجد گزارش کردند. هنگامی که به این محیط عناصر کم مقدار اضافه شده همراه با روغن زیتون، روغن ذرت و روغن کنجد فعالیت ویژه به ترتیب تا ۰/۸۶، ۱/۸۹ و ۱/۶۴ U/mg بعد از ۹۶ ساعت گرمخانه گذاری افزایش یافته است [۳۹].

مقدار  $V_{max}$  و  $K_m$  لیپاز سودوموناس اسپاسیا برابر با ۳۰  $\mu\text{mol}/\text{min}$  و ۱۲ mM گزارش شده است (۳۷). مقدار  $K_m$  لیپاز سویه فوزاریوم سولانی  $FSI$  ۱/۸ mM و  $V_{max}$  برابر با ۰/۴۱۶  $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$  (۳۶) همچنین مقدار  $V_{max}$  برابر با ۰/۴۱۶  $\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{min}$  و  $K_m$  برابر با ۵/۰۵ mM برای لیپاز باسیلوس FH5 را بدست آوردند [۳۱]. هنگامی که از پلی نیتروفنیل پالمیتات به عنوان سوبسترا استفاده شده است. در مقایسه با  $K_m$  گزارش شده برای باکتری های ذکر شده در بالا، مقدار این پارامتر برای سویه جدا شده کمتر است که نشاندهنده  $affinity$  یا گرایش بیشتر آنزیم تولید شده به وسیله این باکتری به مصرف سوبسترای پلی نیتروفنیل پالمیتات است همچنین مقدار  $V_{max}$  آنزیم تولیدی به وسیله *Bacillus sp.* جداسازی شده از مقدار  $V_{max}$  سویه های فوزاریوم سولانی *FSI* باسیلوس FH5 بیشتر است که نشاندهنده فعالیت کاتالیتیکی بیشتر سویه جداسازی شده نسبت به این دو

24. Kumar

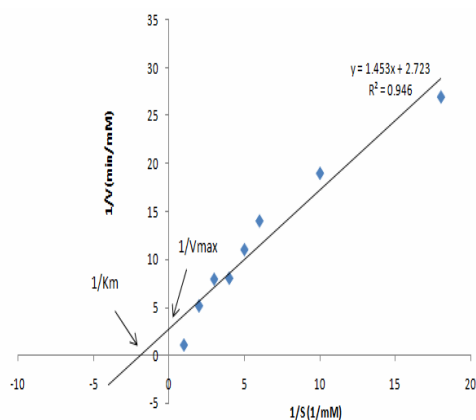
25. *Bacillus coagulans*

26. Maia

27. *Fusarium solani FSI*

22. Burkert

23. corn steep liquor

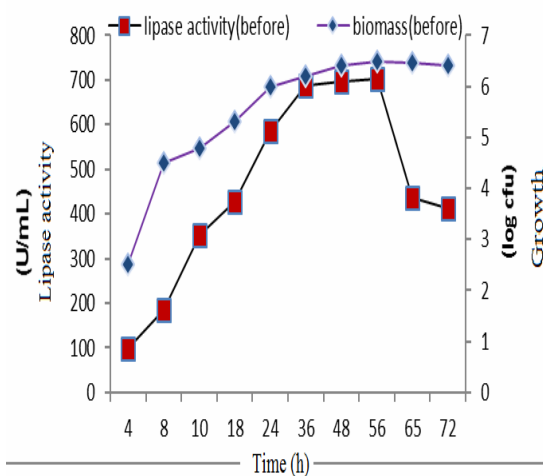


**Fig 5** The Lineweaver-Burk plot for lipase produced by *Bacillus subtilis*.

#### ۴- نتیجه گیری کلی

اگر چه آنزیم لیپاز یکی از آنزیم هایی با کاربرد صنعتی بسیار هستند اما تولید آن از نظر اقتصادی بسیار پر هزینه است. بنابراین استفاده از روشهایی که با بهینه سازی پارامترها و عوامل محیط کشت آنزیم لیپاز را با هزینه کمتر و در شرایط بهینه تولید کرد. جداسازی باکتری های تولید کننده آنزیم لیپاز از نمونه چربی شیر انجام شد. از طریق روش توالی یابی ژن 16 S rRNA باکتری جدا شده به عنوان سویه باسیلوس سوبتیلیس شناسایی گردید. فعالیت آنزیمی باکتری U/mL ۱۷۷ گزارش شد. سپس در بهینه سازی متغیرهای که از طریق غربالگری پلاکت برمن انتخاب شدند با روش سطح پاسخ در جهت تولید مقادیر بالای آنزیم لیپاز با صرفه اقتصادی صورت گرفت. متغیرهای روغن کنجد، روغن زیتون، منیزیم کلرید و عصاره مخمر بیشترین تاثیر را بر تولید آنزیم از خود نشان دادند و به عنوان ۴ متغیر برای بهینه سازی انتخاب شدند. پس از بهینه سازی محیطی با شرایط کشت ۲۵٪ روغن کنجد، ۲۵٪ روغن زیتون، ۲۵mM منیزیم کلرید و ۱٪ عصاره مخمر ( ۱۶۰rpm، ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت) فعالیت آنزیمی ۵۷۴U/mL گزارش شد. پارامترهای کیتیکی  $V_{max}$  و  $K_m$  آنزیم لیپاز خام به ترتیب برابر با ۰/۶۶mM/min.mL و ۱/۶۲ mM از طریق نمودار معادله میکائلیس-متن محاسبه شد.

سویه که در مقالات دیگر گزارش شده است نشان می دهد. که تایید می کند که انتخاب پلی نیتروفنیل پالمیتات به عنوان سوبسترا برای اندازه گیری فعالیت انتخاب مناسبی بوده و آنزیم تولیدی تمایل زیادی به فعالیت در این محیط را دارد. یولی<sup>۲۸</sup> و همکاران (۲۰۰۴) تولید لیپاز به وسیله اسیتوباکتر رادیورسیستنس<sup>۲۹</sup> با استفاده از توین ۸۰ به عنوان منبع کربن بررسی کردند. ترکیبات بهینه محیط شامل ۳ml/l توین ۸۰ و ۷/۵g/l عصاره مخمر بود [۴۱]. روچی<sup>۳۰</sup> و همکاران (۲۰۰۸) سویه مقاوم در برابر قلیا و حلال سودوموناس آئروجینوزا را برای تولید لیپاز مورد بررسی قرار دادند. لیپاز مناسب برای کاربرد در شوینده ها تولید می کند که به دلیل طبیعت قلیایی، پایداری و سازگاری در برابر اکسیدکننده ها، سورفاکتانت ها، شوینده ها و مقاومت در برابر پروتولیز است. بهینه سازی برای تولید موثر و کم هزینه لیپاز با استفاده از RSM گزارش کردند که منجر به افزایش ۵/۵۸ برابری افزایش تولید لیپاز (۴۵۸۰ IU/mL) در محیط بهینه شده است [۴۲].



**Fig 4** Growth curve and lipolytic activity of *Bacillus subtilis*; 25 g/L olive oil; 3% v/v sesame oil; 25 g/L yeast extract, nutrient broth; pH 6.5; 170 rpm; 37C), the optimized process.

28. You Li  
29. *Acinetobacter radioresistens*  
30. Ruchi

temperature. *Biochemical Engineering Journal* 54(2): 93-102.

- [8] Joseph, B., P. W. Ramteke, G. Thomas and N. Shrivastava (2007). Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2(2): 39-48.
- [9] Sharma, R., Y. Chisti and U. C. Banerjee (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances* 19(8): 627-662.
- [10] Gupta, R., N. Gupta and P. Rathi (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(6): 763-781.
- [11] Hou, C. and T. Johnston (1992). Screening of lipase activities with cultures from the agricultural research service culture collection. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69(11): 1088-1097.
- [12] Jette JF, Ziomek E. Determination of lipase activity by a rhodamine-triglyceride-agarose assay. *Analytical biochemistry* 1994; 219: 256-60.
- [13] Amiri, F., S. Mousavi, S. Yaghmaei and M. Barati (2012). Bioleaching kinetics of a spent refinery catalyst using *Aspergillus niger* at optimal conditions. *Biochemical Engineering Journal* 67: 208-217.
- [14] Alegria, A., Álvarez-Martin, P., Sacristan, N., Fernandez, E., Delgado, S., & Mayo, B. 2009. Diversity anevolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136:44-51.
- [15] Gharibzahedi, S. M. T., S. M. Mousavi, M. Hamedi and F. Khodaiyan (2013). Application of response surface modeling to optimize critical structural components of walnut-beverage emulsion with respect to analysis of the physicochemical aspects. *Food and Bioprocess Technology* 6(2): 456-469.
- [16] Winkler, U. K. and M. Stuckmann (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 138(3): 663-670.
- [17] Lineweaver, H. and D. Burk (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical*

## ۵- تقدیر و تشکر

مقاله علمی - پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۲/۳۸۵۳۶ مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

## ۶- منابع

- [1] Whitaker, J. R., A. G. Voragen and D. W. Wong (2003). *Handbook of food enzymology*.
- [2] Kempka, A. P., N. L. Lipke, T. d. L. F. Pinheiro, S. Menoncin, H. Treichel, D. M. Freire, M. Di Luccio and D. de Oliveira (2008). Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(2): 119-125.
- [3] Rigo, E., J. L. Ninow, M. Di Luccio, J. V. Oliveira, A. E. Polloni, D. Remonato, F. Arbter, R. Vardanega, D. de Oliveira and H. Treichel (2010). Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *LWT-Food Science and Technology* 43(7): 1132-1137.
- [4] Ertugrul, S., G. Donmez and S. Takaç (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials* 149(3): 720-724.
- [5] Suzuki, T., T. Nakayama, T. Kurihara, T. Nishino and N. Esaki (2001). Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. *Journal of bioscience and bioengineering* 92(2): 144-148.
- [6] Olusesan, A. T., L. K. Azura, F. Abubakar, N. S. A. Hamid, S. Radu and N. Saari (2009). Phenotypic and molecular identification of a novel thermophilic *Anoxybacillus species*: a lipase-producing bacterium isolated from a Malaysian hot spring. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(11): 1981-1988.
- [7] Bouaziz, A., H. Horchani, N. Ben Salem, Y. Gargouri and A. Sayari (2011). Expression, purification of a novel alkaline *Staphylococcus xylosus* lipase acting at high

- ethyl acetate. *Process Biochemistry* 43(10): 1054-1060.
- [28] Verma, S., J. Saxena, R. Prasanna, V. Sharma and L. Nain (2012). Medium optimization for a novel crude-oil degrading lipase from *Pseudomonas aeruginosa* SL-72 using statistical approaches for bioremediation of crude-oil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1(4): 321-329.
- [29] Joseph, B., N. Shrivastava and P. W. Ramteke (2012). Extracellular cold-active lipase of *Microbacterium luteolum* isolated from Gangotri glacier, western Himalaya: Isolation, partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 10(1): 137-144.
- [30] Dheeman, D. S., G. Henehan and J. M. Frías (2011). Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. *Bioresource technology* 102(3): 3373-3379.
- [31] Pimentel, M., N. Krieger, L. Coelho, J. Fontana, E. Melo, W. Ledingham and J. Lima Filho (1994). Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. *Applied biochemistry and biotechnology* 49(1): 59-74.
- [32] Pokorny, D., J. Friedrich and A. Cimerman (1994). Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnology letters* 16(4): 363-366.
- [33] Hasan, F., A. A. Shah and A. Hameed (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnology advances* 27(6): 782-798.
- [34] Krishnaveni, M. (2013). Characterization of lipase producing *Staphylococcus aureus* MTCC 10787 from soil sample at Salem, Tamil Nadu, India. *Journal of Pharmacy Research* 6(2): 304-308.
- [35] Contesini, F. J., V. C. F. da Silva, R. F. Maciel, R. J. de Lima, F. F. C. Barros and P. de Oliveira Carvalho (2009). Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *The Journal of Microbiology* 47(5): 563-571.
- [36] Burkert, J., F. Maugeri and M. Rodrigues (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource technology* 91(1): 77-84.
- [37] Liu, Z., Z. Chi, L. Wang and J. Li (2008). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium* *Society* 56(3): 658-666.
- [18] Stackebrandt E, Goebel B. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacterio* 1994; 144: 846-49.
- [19] Lesuisse EK. Schanck and C Colson, Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *European Journal of Biochemistry* 1993; 216(1): p. 155-160.
- [20] Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315-351.
- [21] Bradoo S, Saxena R, Gupta R. Partitioning and resolution of mixture of two lipases from *Bacillus stearothermophilus* SB-1 in aqueous two-phase system. *Process Biochemistry* 1999; 35: 57-62.
- [22] Alkan, H., Z. Baysal, F. Uyar and M. Dogru (2007). Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. *Applied biochemistry and biotechnology* 136(2): 183-192.
- [23] Tamilarasan, K., H. Temmel, S. Das, W. Al Zoughbi, S. Schauer, P. Vesely and G. Hoefler (2012). Skeletal muscle damage and impaired regeneration due to LPL-mediated lipotoxicity. *Cell death & disease* 3(7): 354.
- [24] Gayathri, V., P. Perumal, L. P. Mathew and B. Prakash (2013). Screening and Molecular Characterization of Extracellular Lipase Producing *Bacillus* Species from Coconut Oil Mill Soil. *International Journal of Science and Technology* 2(7).
- [25] Esposito, S., M. Semeriva and P. Desnuelle (1973). Effect of surface pressure on the hydrolysis of ester monolayers by pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 302(2): 293-304.
- [26] Salleh, A. B., R. Musani, M. Basri, K. Ampon, W. Yunus and C. Razak (1993). Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Canadian journal of microbiology* 39(10): 978-981.
- [27] Kumar, S. S. and R. Gupta (2008). An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl

- [40] Pencreac'h, G. and J.C. Baratti,(2001). *Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. Enzyme and microbial technology.* 28(4): p. 473-479.
- [41] Yoo, H.Y., Simkhada, J.R., Cho, S.S., Park, D.H., Kim, S.W., Seong, C.N., Yoo, J.C., 2011. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102, 6104-6111.
- [42] Ruchi, G., G. Anshu and S. Khare (2008). Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. *Bioresource technology* 99(11): 4796-4802.
- pullulans HN2. 3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal* 40(3): 445-451.
- [38] Kok, R. G., J. J. Thor, I. M. Nugteren Roodzant, M. B. Brouwer, M. R. Egmond, C. B. Nudel, B. Vosman and K. J. Hellingwerf (1995). Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Molecular microbiology* 15(5): 803-818.
- [39] Maia, M., A. Heasley, M. Camargo de Morais, E. Melo, M. Morais Jr, W. Ledingham and J. Lima Filho (2001). Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology* 76(1): 23-27.



## Isolation of lipase producing bacteria from fat milk and optimization of various parameter effect on lipase enzyme production in submerge fermentation

Tabatabaei Yazdi, F. <sup>1\*</sup>, Mortazavi, S. A. <sup>1</sup>, Moradi, S. <sup>2</sup>, Vasiee, A. R. <sup>3</sup>,  
Alizadeh Behbahani, B. <sup>3</sup>

1. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

2. Ph.D student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tehran

3. Ph.D student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 2015/10/22 Accepted: 2015/10/22)

Fat milk sample was selected to isolating lipolytic bacteria. 25 strains were isolated from fat milk. The best isolate was selected for identifying and further study according to lipase producing with amount of 177 U/ml lipase activities that was the most lipase activity among bacteria strains. This bacterium was identified as a strain of genus *Bacillus* based on morphological and biochemical characterization and 16S rRNA gene sequence. Optimization was done for economical producing of lipase by Response Surface Method. After optimization, screening of culture parameters was conducted by Placket Burman Design. The effect of olive oil, yeast extract, peptone, MgCl<sub>2</sub>, glucose, corn syrup, molase, sesame oil, black seed oil, rotation speed and sunflower oil was investigated for optimization. The optimum lipase activity (574 U/ml) was achieved at optimum levels of factors of sesame oil (25.0w/w), olive oil concentration (22.5 g/L), yeast extract (10 g/l) and MgCl<sub>2</sub> (25 mM/l) (160 rpm, pH 6.5 and 24 h) that lipase activity increased to 3.24-fold.

Kinetic parameters, Km and Vmax for the purified lipase was calculated from the Michaelis–Menten plot. The lipase showed lower Km value (1.62 mM) and high Vmax value (0.667 mM/min) than the other *Bacillus subtilis*.

**Keywords:** Fat milk, Lipolytic, *Bacillus subtilis*, Response Surface Method

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir