مجله دنیای میکروب‌ها
سال دوازدهم شماره سوم (پیاپی ۴۰) پاییز ۱۳۹۸
صفحات ۲۷۸-۲۶۷

Original Article

شناسایی مولکولی و بهینه سازی شرایط تولید آنزیم لیپاز *باسیلوس تورنجینسیس* L26

فرزانه کریمیان[۱]، محمد حسن قربانی[۲*]، سید حسین میردامادیان[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، ایران. [۲]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی، ایران. [۳]مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: لیپازها مهم‌ترین آنزیم‌های هیدرولیتیک تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های مختلف به ویژه باکتری‌ها هستند که در صنایع غذایی و دارویی کاربردهای گسترده ای دارند. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد لیپاز از منابع در دسترس به منظور استفاده در صنعت است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌های مولد آنزیم لیپاز از پساب و خاک تصفیه‌خانه حبیب‌آباد، پساب و لجن فیلتر شنی کارخانه روغن نباتی گلبهار، دنبه و کنجاله‌های کنجد صورت گرفت. به منظور سنجش میزان تولید و فعالیت آنزیم‌های لیپازی، از روماند به‌دست آمده از کشت باکتری در محیط کشت پایه لیپیدی استفاده گردید. سپس مقدار آنزیم موجود در روماند توسط سنجش کمی فعالیت آنزیمی با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری و سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل استات در دمای ۲۸ درجه سلسیوس صورت گرفت. شناسایی باکتری توسط آنالیزهای ماکروسکوپی، میکروسکوپی و مولکولی انجام شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج غربال‌گری سویه‌های جداسازی شده و همچنین ارزیابی‌های آنزیمی، سویه ۳۱ به‌عنوان سویه برتر انتخاب گردید. با استفاده از آنالیز مولکولی *16S rRNA* این جدایه به‌عنوان *باسیلوس تورنجینسیس L26* تعیین شد. بیشترین پایداری و فعالیت آنزیمی در این سویه در دمای ۴۸ درجه سلسیوس، pH ۸/۵ و به ترتیب در حضور کلرید سدیم ، کلرید کلسیم، کلرید پتاسیم ، کلرید منیزیم، سولفات روی و کلرید منگنز به دست آمد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد آنزیم لیپاز *باسیلوس تورنجینسیس* L26 در شرایط قلیایی و در حضور کاتیون های مختلف پایداری متفاوتی دارند.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های هیدرولیتیک، *باسیلوس تورنجینسیس*، سنجش فعالیت، لیپاز.

دریافت مقاله: مرداد ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۸

مقدمه

لیپازها یا تری‌آسیل‌گلیسرول‌آسیل‌هیدرولازها (EC 3.1.1.3) گروهی از آنزیم‌های محلول در آب و زیرمجموعه‌ای از کربوکسیلیک استرازها هستند که در شرایط فیزیولوژیکی مناسب، هیدرولیز پیوندهای استری تری‌گلیسیریدها را در سطح مشترک فاز آبی و چربی در فرآیند لیپولیز کاتالیز وآن ها را به گلیسرول و اسیدچرب تبدیل می‌کنند (۱ و ۲). لیپازها دارای نقش زیستی در مراحل مختلفی از متابولیسم لیپیدها شامل هضم، جذب، بازسازی مجدد چربی‌ها و همچنین متابولیسم لیپوپروتئین‌ها نیز می‌باشند (۳). این آنزیم‌ها در حلال‌های آبی بسیاری پایدار و فعال هستند و نیازی به کوفاکتور ندارند و

*) آدرس برای مکاتبه: فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی
تلفن: ۰۹۱۳۳۲۵۹۶۹۳ پست الکترونیک: ghorbani@iaufala.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

محصول جانبی نیز تولید نمی‌کنند (٤). به دلیل توانایی کاتالیز واکنش‌های متنوع و عملکرد اختصاصی شان بر اساس نوع سوبسترا و موقعیت فضایی، لیپازها در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی، شوینده‌ها، سوخت‌های زیستی و زیست پالایی کاربردهای گسترده ای پیدا کرده اند (۲).

میکروارگانیسم‌های مولد لیپاز شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و اکتینومسیت‌ها هستند که در زیستگاه‌های متنوعی مانند پساب‌های صنعتی، کارخانه‌های تولید روغن‌های گیاهی، خاک‌های آلوده به روغن، دانه‌های- روغنی و لبنیات یافت می‌شوند (۵ و ٦).

لیپازهای میکروبی به دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند دوام و پایداری در حلال‌های آلی و اختصاصیت بالا به‌طور گسترده در بیوتکنولوژی و شیمی آلی کاربرد دارند. این دسته از لیپازها جایگزینی عالی برای کاتالیزورهای شیمیایی به منظور تغییر انتخابی مولکول‌های پیچیده می‌باشند (۷). سهولت تولید و جداسازی لیپازهای خارج سلولی از محیط‌های کشت باکتریایی، قارچی و مخمری دلیل اصلی استفاده گسترده تجاری این آنزیم‌ها در صنایع مختلف است (۸).

یکی از مهم‌ترین لیپازهای میکروبی، لیپازهای باکتریایی هستند که عمدتاً به صورت ترشحی و خارج سلولی هستند. از این‌رو به شدت تحت تأثیر عواملی مانند دما، pH، میزان منابع کربن و نیتروژن، هوادهی و یون‌های فلزی قرار می‌گیرند. با توجه به کاربرد فراوان این آنزیم‌ها در صنایع، تولید و بررسی فعالیت و پایداری آن‌ها در زیست‌فناوری امری مهم و قابل‌توجه است. تحقیق حاضر با هدف دست یابی به این مهم و استفاده از آنزیم تولید شده در صنایع غذایی و تولید طعم دهنده‌های میوه‌ای انجام گردید.

مواد و روش ها

الف) نمونه‌برداری: در پژوهش حاضر، نمونه‌برداری از خاک و پساب تصفیه‌خانه فاضلاب شهری حبیب‌آباد اصفهان، پساب و لجن فیلتر شنی کارخانه روغن نباتی گلبهار اصفهان و همچنین دنبه و کنجاله‌های کنجد ترش و تندشده انجام گردید. سپس تمامی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده پس از نمونه‌برداری درون ظروف شیشه‌ای و پلاستیکی استریل با درج دما و pH محل نمونه‌برداری به آزمایشگاه انتقال داده شدند و در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند.

ب) غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌های مولد لیپاز: به‌منظور غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌های مولد لیپاز، ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های پساب و یک گرم از نمونه‌های خاک، دنبه و کنجاله‌های کنجد ترش و تندشده به‌صورت جداگانه درون ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه لیپیدی مایع حاوی ۰/۲ درصد پپتون، ۰/۱ درصد آمونیوم دی هیدروژن فسفات، ۰/۲۵ درصد کلرید سدیم، ۰/۰٤ درصد سولفات منیزیم ۷ آبه، ۰/۰٤ درصد کلرید کلسیم ۲ آبه و ۲ درصد حجمی/حجمی روغن‌زیتون با pH ۷ تلقیح گردیدند و بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از انجام چندین کشت متوالی و تهیه سری رقت از آخرین کشت‌ها، فرآیند غربال‌گری و شناسایی کیفی سویه‌های مولد لیپاز بر روی محیط‌های کشت انتخابی تریبوتیرین آگار، توئین-۸۰ آگار و اگ یولک آگار انجام گردید (۹).

ج) غربالگری کیفی باکتری‌های مولد لیپاز با استفاده از محیط کشت تریبوتیرین آگار: تریبوتیرین آگار (Bio Marck, India) محیط کشتی انتخابی جهت غربال‌گری باکتری‌های مولد لیپاز به صورت کیفی است که حاوی ۰/۵ درصد پپتید جانوری، ۰/۳ درصد عصاره مخمر، ۱/۵ درصد آگار و ۱ درصد اسید چرب تریبوتیرین (Sigma, USA) با pH ۷ می‌باشد. باکتری‌های مولد لیپاز با ترشح لیپاز باعث تجزیه تریبوتیرین می‌شدند که این امر منجر به ایجاد هاله‌ای شفاف در اطراف کلنی باکتری‌ها می‌گردید. در تحقیق انجام شده به منظور غربال‌گری کیفی باکتری‌های لیپولیتیک، از باکتری‌های خالص‌شده، کشت به صورت خطی عمودی در محیط کشت یاد شده تهیه شد و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، قطر هاله‌های لیپازی ایجاد شده بررسی و اندازه‌گیری گردید (۱۰).

د) غربالگری کیفی باکتری‌های مولد لیپاز با استفاده از محیط کشت توئین-۸۰ آگار: توئین-۸۰ آگار نیز یکی دیگر از

محیط‌های کشت انتخابی جهت بررسی و شناسایی باکتری‌های مولد لیپاز به روش کیفی می‌باشد که حاوی ۱ درصد پپتون، ۰/۵ سدیم کلرید، ۱ درصد آگار و ۱ درصد توئین ۸۰ با pH ۷ می‌باشد. باکتری‌های مولد لیپاز با تجزیه اسید چرب توئین-۸۰، به دلیل وجود کلرید کلسیم در ترکیب محیط کشت یادشده و واکنش بین یون کلسیم با اسید چرب هیدرولیز شده منجر به تشکیل اولئات کلسیم و درنتیجه ایجاد هاله‌ای گچی و سفیدرنگ در اطراف کلنی باکتری‌ها می‌گردیدند. ازاین رو به منظور غربال‌گری کیفی سویه‌های لیپولیتیک، باکتری‌های خالص شده به صورت خطی عمودی بر روی محیط کشت توئین-۸۰ آگار کشت داده شدند و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. سپس قطر هاله‌های لیپازی ایجاد شده در مدت زمان گرمخانه‌گذاری بررسی و اندازه‌گیری شد (۱۰).

ه) غربالگری کیفی باکتری‌های مولد لیپاز با استفاده از محیط کشت اگ یولک آگار: یکی دیگر از محیط‌های کشت انتخابی جهت شناسایی و غربال‌گری باکتری‌های لیپولیتیک محیط کشت اگ یولک آگار می‌باشد که از ترکیب محیط کشت نوترینت آگار (Merck, Germany) و زرده تخم‌مرغ تهیه گردید. بر اثر ترشح آنزیم و تجزیه زرده تخم‌مرغ توسط باکتری‌های مولد لیپاز هاله‌ای شفاف بر روی محیط کشت یاد شده ایجاد می‌گردید که تأییدکننده لیپولیتیک بودن سویه‌های بررسی‌شده بود. در این آزمون نیز مانند روش یاد شده در دو محیط کشت انتخابی یادشده در مراحل قبلی، باکتری‌های خالص شده کشت داده شدند و قطر هاله لیپازی آن‌ها بررسی و اندازه‌گیری گردید. سپس سویه‌های باکتریایی که بر روی هر سه محیط کشت انتخابی فوق دارای بیشترین قطر هاله لیپازی بودند بهمنظور سنجش فعالیت آنزیمی به صورت کمی انتخاب شدند.

و) سنجش میزان تولید و فعالیت آنزیم لیپاز: به‌منظور سنجش میزان تولید و فعالیت آنزیم‌های لیپازی ترشح‌شده توسط سویه‌های انتخاب‌شده از مرحله غربال‌گری، ابتدا باکتری‌های منتخب بر روی محیط کشت BHI براث (Merck, Germany) کشت داده شدند و سپس از هرکدام یک سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند تهیه شد و یک میلی‌لیتر از آن درون ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه لیپیدی مایع با pH ۷ تلقیح گردید و درون شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. در مدت زمان گرمخانه‌گذاری و با فواصل زمانی مشخص، مقداری از محیط کشت برداشته شد و پس از سانتریفیوژ (Sigma, USA) با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس و به مدت ۱۰ دقیقه، روماند به‌عنوان منبع دارای لیپاز خارج سلولی جداسازی گردید و به‌صورت کمی سنجش آنزیمی انجام شد (۱۱). سنجش کمی فعالیت آنزیمی با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری و سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل استات (Sigma, USA) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انجام گردید. بدین منظور ابتدا محلول‌های الف و ب آماده شدند. محلول الف از اضافه شدن ۰/۰۳ گرم پودر پارانیتروفنیل استات درون ۱۰ میلی‌لیتر ۲-پروپانول (Merck, Germany) و محلول ب از افزودن ۱ میلی‌لیتر محلول الف درون ۹ میلی‌لیتر بافر تریس هیدروکلرید ۰/۰۵ مولار (pH ۷) تهیه گردید. پس از تهیه محلول الف و ب، ۱۰۰ میکرولیتر روماند آنزیمی به ۹۰ میکرولیتر محلول الف و ۸۱۰ میکرولیتر محلول ب اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری، جذب نمونه‌ها در ٤۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. یک واحد فعالیت آنزیمی (IU) مقدار آنزیمی است که بتواند یک میکرولیتر پارانیتروفنول را در دقیقه در شرایط آزمون آزاد نماید (۱۲).

ز) شناسایی سویه باکتریایی منتخب مولد لیپاز: ابتدا سویه منتخب از نظر خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی بررسی گردید و سپس شناسایی مولکولی این باکتری به‌منظور تعیین جنس و گونه آن با استفاده از تکنیک کلنی-PCR و تعیین توالی ژن *16S rRNA* توسط پرایمرهای عمومی رفت 5’-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3’ و برگشت 5’-AGGAGGTGATCCAACCGCA -3’ انجام شد (۱۳). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از ۲ میکرولیتر DNA الگو (۱۰ mM)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۵۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر dNTP (10 mM)، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR

(×10)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵ u/ml) و ۱۶/۳ میکرولیتر آب مقطر (Sina Gene, Iran) دیونیزه تهیه گردید (۱٤). سپس چرخه‌های حرارتی واکنش به شرح زیر انجام شد: ۱) دمای واسرشت شدن ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ٤۵ ثانیه ۲) ۳۵ سیکل اتصال در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ٤۵ ثانیه ۳) دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس، ۹۰ ثانیه ٤) تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه. محصول تولیدشده پس از الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵ درصد و خالص‌سازی، تعیین توالی شد (۱۵). سپس توالی به دست آمده با استفاده از الگوریتم BLAST با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم Gene Bank مقایسه شد و رابطه فیلوژنیک سویه‌های جداسازی شده مورد بررسی قرار گرفت و درخت فیلوژنی سویه‌های مورد نظر با استفاده از توالی‌های حاصل از جست و جو در پایگاه اطلاعاتی ترسیم گردید.

ح) بررسی اثر دما بر روی فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز: به‌منظور بررسی اثر دماهای مختلف بر روی فعالیت و پایداری آنزیم، ٦۰۰ میکرولیتر روماند آنزیمی با ۱۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس هیدروکلرید ۰۳/۰ مولار (pH ۷) و ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل استات محلول در استون خالص با غلظت ۰/۰۲ مولار مخلوط گردید و به مدت یک ساعت در دماهای ۲۸، ۳۸، ٤۸ و ٦۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس جذب نوری در ٤۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید و فعالیت آنزیمی با استفاده از ضریب تاریکی پارانیتروفنول محاسبه گردید (۱۱).

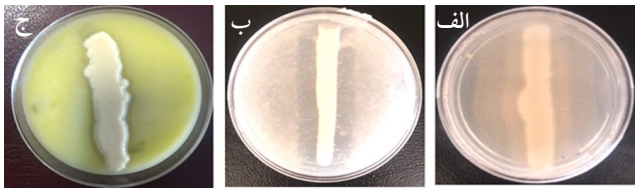
ط) بررسی اثر pH بر روی فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز: به‌منظور بررسی اثر pHهای مختلف بر روی فعالیت و پایداری آنزیم، ٦۰۰ میکرولیتر روماند آنزیمی با ۱۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس هیدروکلرید ۰/۰۳ مولار با pHهای ۵، ۷، ۸/۵ و ۱۰/۵ و ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل استات محلول در استون خالص با غلظت ۰/۰۲ مولار مخلوط گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس جذب نوری در ٤۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید و فعالیت آنزیمی با استفاده از ضریب تاریکی پارانیتروفنول محاسبه گردید (۱۱).

ی) بررسی اثر کاتیون‌های فلزی مختلف بر روی فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز: برای بررسی اثر کاتیون‌های فلزی مختلف بر روی پایداری و فعالیت آنزیم لیپاز، ٦۰۰ میکرولیتر روماند آنزیمی با ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل استات محلول در استون خالص با غلظت ۰/۰۲ مولار و ۱۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس هیدروکلرید ۰/۰۳ مولار (pH ۷) حاوی نمک‌های فلزی مختلف (کلرید سدیم ، کلرید کلسیم، کلرید پتاسیم، کلرید منیزیم، کلرید منگنز و سولفات روی) با غلظت ۰/۰۰۱ مولار مخلوط گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس جذب نوری در ٤۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید و فعالیت آنزیمی با استفاده از ضریب تاریکی پارانیتروفنول محاسبه گردید (۱۱).

ک) آنالیز آماری: به منظور بررسی وجود و یا عدم وجود اختلاف معنادار بین میانگین نتایج به دست آمده در آزمون های انجام‌شده بر روی پایداری و فعالیت آنزیم لیپاز مورد نظر، از آزمون آماری کراسکال والیس در سطح معنی‌دار $p\leq$۰/۰۵ استفاده گردید. سپس به‌منظور مقایسه بین میانگین نتایج حاصله در هر آزمایش، از آزمون تعقیبی من‌ویتنی با تعدیل بونفرونی استفاده شد. برای اطمینان از درستی نتایج، تمامی آزمون ها با ۳ بار تکرار انجام گردیدند. سپس آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام و نمودارهای مربوطه با Excel ترسیم شدند.

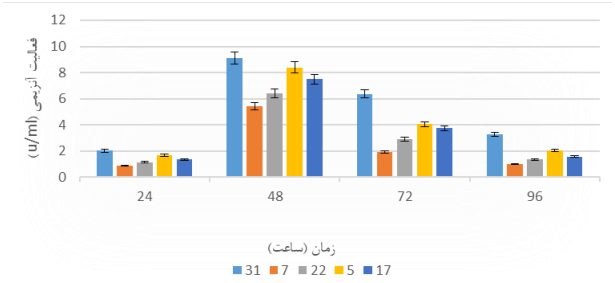
یافته‌ها

الف) جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های مولد لیپاز: به‌منظور جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های لیپولیتیک از باکتری‌های غیرلیپولیتیک و با توجه به تفاوت جایگاه فعال و در نتیجه تفاوت نوع لیپید مصرفی توسط آنزیم‌های لیپاز مختلف،از سه محیط کشت انتخابی اگ یولک آگار، تریبوتیرین آگار و توئین-۸۰ آگار استفاده شد. از بین ۷۸ سویه مورد بررسی، ۲۲ سویه باکتریایی توانستند بر روی یک، دو و یا هر سه محیط یاد شده هاله با قطر متفاوت ایجاد نمایند. سویه‌هایی که بر روی



شکل ۱: ترشح آنزیم لیپاز توسط *باسیلوس تورنجیسیس* L26 بر روی محیط‌های کشت توئین ۸۰- آگار (الف)، تریبوتیرین آگار (ب) و اگ یولک آگار (ج) .

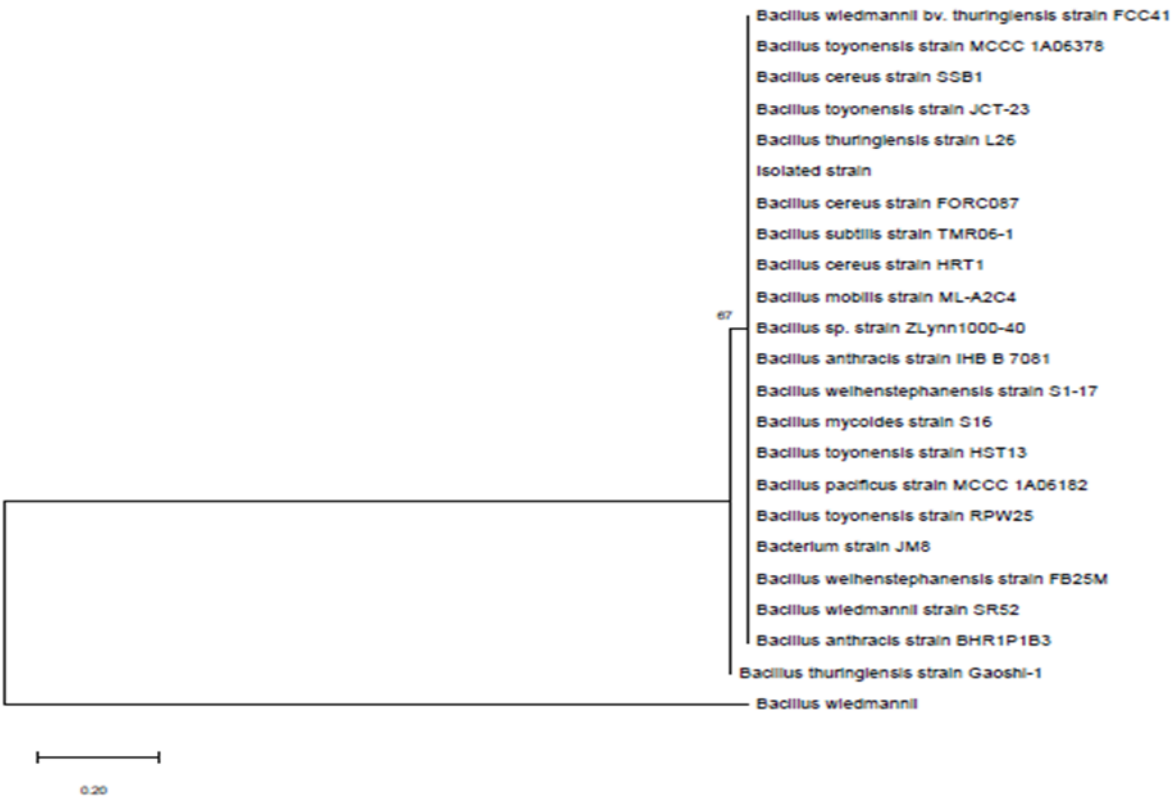
محیط‌های کشت تریبوتیرین آگار و اگ یولک آگار، هاله شفاف و بر روی محیط کشت توئین-۸۰ آگار هاله گچی تولید نمودند، به‌عنوان سویه‌های لیپولیتیک تعیین گردیدند. سپس به‌منظور مقایسه کیفی سویه‌های لیپولیتیک از نظر میزان تولید آنزیم لیپاز و انتخاب سویه‌های برتر، قطر هاله‌های لیپازی ایجادشده توسط آن‌ها بر روی محیط‌های یاد شده طی ۷۲ ساعت بررسی و اندازه‌گیری گردید و ۵ سویه‌ای که هاله‌های لیپازی وسیعتری در اطراف کلنی‌های خود داشتند، به‌عنوان سویه‌های لیپولیتیک منتخب برای مراحل بعدی آزمون انتخاب



نمودار ۱: مقایسه تولید و فعالیت آنزیم لیپاز توسط جدایه *باسیلوس تورنجینسیس* L26 (آبی کم رنگ)در محیط کشت پایه لیپیدی مایع با سایر سویه های منتخب.

شدند. شایان یادآوری است که از بین ۵ سویه باکتریایی انتخاب شده، سویه ۳۱ که سپس به عنوان *باسیلوس تورنجینسیس* L26 (*Bacillus thuringiensis* L26) شناخته شد، هاله‌های لیپاز وسیع تری داشت (شکل ۱).

ب) سنجش فعالیت آنزیمی سویه برتر مولد آنزیم لیپاز به‌صورت کمی: در این بررسی فعالیت آنزیمی ۵ سویه انتخاب‌شده که در مرحله غربال‌گری در محیط‌های کشت



شکل ۳: درخت فیلوژنیک جدایه مورد پژوهش با استفاده از روش Neighbor-joining و ضریب Boot Strap هزار.

جدول ۱: تأثیر دماهای مختلف در فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز تولید شده توسط *باسیلوس تورنجینسیس* L26.

سویه	دما (°C)	تعداد تکرار	کمترین مقدار فعالیت آنزیمی (u/ml)	بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی (u/ml)	میانگین	انحراف معیار
باسیلوس تورنجینسیس L26	۲۸^{c}	۳	۸/۴۹	۹/۹۱	۹/۱۰	۰/۷۳
	۳۸^{b}	۳	۱۰/۲۷	۱۵/۶۸	۱۲/۵۰	۲/۸۲
	۴۸^{a}	۳	۱۷/۹۲	۲۶/۷۶	۲۱/۱۴	۴/۸۸
	۶۸^{d}	۳	۲/۸۱	۳/۴۴	۳/۱۷	۰/۳۲

توئین-۸۰ آگار، تریبوتیرین آگار و اگ یولک آگار بیشترین میزان ترشح آنزیم لیپاز را داشتند از طریق سنجش آنزیمی با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری و به‌کارگیری پارانیتروفنیل استات به‌عنوان سوبسترای تخصصی در دمای ۲۸ درجه سلیسیوس در مدت ۹۶ ساعت به‌صورت کمی اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، تمامی سویه‌های باکتریایی در روز دوم و پس از گذشت ۴۸ ساعت حداکثر میزان فعالیت آنزیمی را داشتند. نمودار ۱ میزان تغییرات تولید و فعالیت آنزیم لیپاز توسط سویه‌های منتخب را در طی مدت‌زمان گرمخانه‌گذاری نشان می‌دهد که در بین آن‌ها سویه ۳۱ یا همان *باسیلوس تورنجینسیس* L26 دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بود و به عنوان سویه برتر برای ادامه بررسی‌ها انتخاب گردید.

ج) شناسایی مولکولی باکتری منتخب مولد لیپاز: به منظور شناسایی ابتدایی سویه باکتریایی منتخب رنگ‌آمیزی گرم انجام شد و مشاهده گردید سویه ۳۱ گرم مثبت و به فرم باسیل است. مقایسه توالی ژن *16S rDNA* این سویه باکتریایی با سایر سویه‌های نزدیک از نظر توالی ژن مورد نظر در NCBI بررسی گردید. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز و تطبیق فیلوژنی توالی ژن کد کننده *16S rDNA* و درخت فیلوژنی باکتری موردنظر با سویه‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم Gene Bank مشخص گردید که سویه ۳۱ با توالی باکتری *باسیلوس تورنجینسیس* L26 ۹۹٪ مشابهت دارد (شکل ۲).

د) بررسی اثر دما بر روی فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز: بررسی فعالیت آنزیم لیپاز تولیدشده توسط باکتری *باسیلوس تورنجینسیس* L26 در دماهای ۲۸،۳۸،۴۸ و ۶۸ درجه سلسیوس نشان داد بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیمی در دمای ۴۸ درجه سلسیوس بود که به‌طور متوسط در سه بار تکرار معادل (u/ml) ۴/۸۸± ۲۱/۱۴ برآورد گردید. به منظور مقایسه میزان فعالیت آنزیم لیپاز تولیدشده توسط باکتری *باسیلوس تورنجینسیس* L26 در دماهای مختلف از آزمون آماری کراسکال والیس استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده در این آزمون تفاوت معناداری بین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در چهار دمای موردبررسی وجود داشته است ($p\leq$۰/۰۵).

نتایج آزمون تعقیبی من‌ویتنی با تعدیل بونفرونی نشان داد میزان فعالیت آنزیم یاد شده در دمای ۴۸ درجه سلیسیوس به‌طور معناداری بیشتر از سه دمای ۲۸، ۳۸ و ۶۸ درجه بوده است. به‌علاوه فعالیت آنزیم در دمای ۳۸ درجه به‌طور معناداری بیشتر از دماهای ۲۸ و ۶۸ درجه و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به‌طور معناداری بیشتر از دمای ۶۸ درجه سلسیوس مشاهده گردید ($p\leq$۰/۰۵). میانگین نتایج حاصله در جدول ۱ نشان داده شده است. دماهایی که فعالیت آنزیم در آن‌ها اختلاف معنادار داشته است با حروف متفاوت متمایز شده‌اند.

جدول ۲: بررسی اثر pH های مختلف در فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز تولید شده توسط *باسیلوس تورنجینسیس* L26..

سویه	pH	تعداد تکرار	کمترین مقدار فعالیت آنزیمی (u/ml)	بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی (u/ml)	میانگین	انحراف معیار
باسیلوس تورنجینسیس L26	۵ ^{c}	۳	۴/۵۷	۵/۵۰	۵/۱۸	۰/۵۳
	۷^{b}	۳	۸/۴۹	۹/۹۱	۹/۱۰	۰/۷۳
	۸/۵^{a}	۳	۱۲/۱۶	۱۲/۶۱	۱۲/۳۴	۰/۲۴
	۱۰/۵^{d}	۳	۰/۰۳	۰/۴۱	۰/۳۵	۰/۰۵

جدول ۳: بررسی اثر گستره های مختلف pH در فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز *باسیلوس تورنجینسیس* L26.

سویه	کاتیون‌های فلزی	تعداد تکرار	کمترین مقدار فعالیت آنزیمی (u/ml)	بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی (u/ml)	میانگین	انحراف معیار
باسیلوس تورنجینسیس L26	کلرید سدیم	۳	٤/۳۲	٤/٤۳	٤/۳۹	۰/۰٦
	کلرید کلسیم	۳	۲/۸۸	۳/٦۱	۳/۱٤	۰/٤۱
	کلرید پتاسیم	۳	۲/۸۰	۲/۸۸	۲/۸۵	۰/۰٤
	کلرید منیزیم	۳	۲/٤٦	۲/٦۷	۲/۵۵	۰/۱۱
	کلرید منگنز	۳	۰/۵۹	۰/٦۷	۰/٦۲	۰/۰٤
	سولفات روی	۳	۰/۷۹	۰/۸۲	۰/۸۱	۰/۰۱

ه) بررسی اثر pH بر روی فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز: برای این منظور، فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز تولیدشده توسط *باسیلوس تورنجینسیس L26* در pHهای ۵، ۷، ۸/۵ و ۱۰/۵ بررسی گردید. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، بیش‌ترین پایداری و فعالیت آنزیمی در pH ۸/۵ و به‌طور متوسط معادل (u/ml) ۱۲/۳٤±۰/۲٤ حاصل شد. به منظور مقایسه میزان فعالیت آنزیم لیپاز *باسیلوس تورنجیسیس* L26 در گستره مختلف pH از آزمون آماری کراسکال والیس استفاده شد. بر اساس نتیجه این آزمون تفاوت معناداری بین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در چهار pH مورد بررسی مشاهده شد ($p\leq$۰/۰۵). نتایج آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی نشان داد که میزان فعالیت آنزیم در pH ۸/۵ به‌طور معناداری بیشتر از pHهای ۵، ۷ و ۱۰/۵ بوده است. به‌علاوه فعالیت آنزیم در pH ۷ به‌طور معناداری بیشتر از گستره pH ۵ و ۱۰/۵ و در pH ۵ به‌طور معناداری بیشتر از pH ۱۰/۵ بود ($p\leq$۰/۰۵). میانگین نتایج حاصله در جدول ۲ نمایش داده‌شده است. گستره های pH که فعالیت آنزیم در آن‌ها اختلاف معنادار داشت با حروف متفاوت متمایز شده‌اند.

و) بررسی اثر کاتیون‌های فلزی در فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز: در این بررسی اثر کاتیون‌های فلزی موجود در نمک‌های کلرید سدیم ، کلرید کلسیم ، کلرید پتاسیم ، کلرید منیزیم، کلریدمنگنز و سولفات روی بر فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز تولیدشده توسط *باسیلوس تورنجینسیس* L26 مورد ارزیابی قرار گرفت. بیش‌ترین فعالیت آنزیم لیپاز تولیدشده حضور کلرید سدیم و به‌طور متوسط معادل (u/ml) ٤/۳۹±۰/۰٦ و کم‌ترین فعالیت آنزیم لیپاز تولیدشده حضور کلرید منگنز و به‌طور متوسط معادل (u/ml) ۰/٦۲±۰/۰٤ محاسبه گردید. به‌منظور مقایسه میزان فعالیت آنزیم لیپاز در حضور کاتیون‌های فلزی مختلف از آزمون آماری کراسکال والیس استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده در این آزمون، تفاوت معناداری بین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در حضور شش کاتیون موردبررسی مشاهده شد ($p\leq$۰/۰۵). نتایج آزمون تعقیبی من‌ویتنی با تعدیل بونفرونی نشان داد که میزان فعالیت آنزیم در باکتری *باسیلوس تورنجینسیس* L26، در حضور کلرید سدیم به‌طور معناداری بیشتر از سایر کاتیون‌های فلزی موجود در نمک‌های بررسی است ($p\leq$۰/۰۵). پس از کلرید سدیم بیشترین فعالیت آنزیم به ترتیب در حضورکاتیون‌های موجود در کلریدکلسیم، کلرید پتاسیم، کلریدمنیزیم، سولفات روی و کلرید منگنز مشاهده شد؛ و فعالیت آنزیم بین هر دو کاتیون فلزی تفاوت معنادار داشت ($p\leq$۰/۰۵). میانگین نتایج حاصله در جدول ۳ نمایش داده شده است.

بحث

توانایی لیپازها در انجام تغییر و تبدیلات زیستی منجر به استفاده گسترده از آن‌ها در صنایع غذایی، صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی، شوینده‌ها، کاغذ سازی، صنعت چرم و نساجی شده است (۱٦). لیپازها به یک بخش جدایی ناپذیر از صنعت مدرن غذا تبدیل شده‌اند و کاربرد آن‌ها در سال‌های اخیر برای بهبودی فرآیندهای شیمیایی تولید مواد خوراکی و تهیه انواع محصولات از جمله آبمیوه‌ها، مواد غذایی پخته و سبزیجات تخمیری توسعه پیدا کرده است (۱۷و۱۸).

همچنین استفاده از لیپازها برای تبدیل مخلوط راسمیک به ترکیبات دارویی تک انانتیومری و تولید سوخت‌های زیستی از

روغن‌ها و چربی‌ها در واکنش‌های استری شدن یا ترانس استری شدن در حضور لیپاز به عنوان یک کاتالیزور زیستی و در مجاورت سوبستراهای سازنده آن‌ها به عنوان یک راهکار سازگار با محیط زیست در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۹). از سال ۱۹۸۰ تا کنون انواع لیپازهای مورداستفاده در صنعت به میزان چشم‌گیری افزایش داشته است که این روال رو به رشد نتیجه دستاوردهایی بزرگ در زمینه همسانه سازی و بیان آنزیم‌های میکروارگانیسم‌ها و افزایش تقاضا برای این کاتالیزورهای زیستی است که دارای ویژگی‌هایی خاص مانند اختصاصیت و ثبات بالا و همچنین تحمل دامنه‌ی وسیعی از تغییرات pH و دما می‌باشند. با توجه به کاربرد فراوان این آنزیم‌ها در صنایع، تولید آن‌ها در زیست فناوری امری مهم و قابل توجه است.

یکی از روش‌های یافتن سویه‌های میکروبی با ارزش صنعتی، جستجو در زیستگاه‌های طبیعی آن‌ها می‌باشد. در بسیاری از موارد، فعالیت بیوکاتالیست‌های میکروبی بومی بیشتر از سویه‌های تهیه‌شده از کلکسیون بوده است. هرچه محیط‌های جستجو وسیع‌تر باشد، امکان دستیابی به سویه‌های طبیعی بیشتر است (۲۰). در تحقیق واناتاب (Wanatab) و همکاران در سال ۲۰۱۷، جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد لیپاز از خاک و منابع طبیعی آبی (۲۱)، در پژوهش مبارک قمصری (Mobarak Ghamsari) و همکاران در سال ۲۰۱۱ جداسازی باکتری‌های مولد لیپاز از پساب کارخانه روغن گیاهی (۲۲) و در تحقیق کومار (Kumar) و همکاران در سال ۲۰۱۲ از پساب های شهری، لبنیات و بقایای گیاهی انجام گردید (۲۳).

ازاین‌رو می‌توان گفت خاک‌ها و پساب‌های آلوده به چربی و همچنین چربی‌های گیاهی و حیوانی منابعی مناسب برای جداسازی باکتری‌های لیپولیتیک می‌باشند. در این پژوهش به‌منظور جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های مولد لیپاز، نمونه‌برداری از خاک و پساب تصفیه‌خانه فاضلاب شهری حبیب‌آباد اصفهان، پساب و لجن فیلتر شنی کارخانه روغن نباتی گلبهار در استان اصفهان، دنبه و کنجاله‌های کنجد فاسد شده انجام گردید و ۷۸ سویه باکتریایی خالص‌سازی شد. سپس جهت غربال‌گری باکتری‌های لیپولیتیک از غیر لیپولیتیک و همچنین انجام مقایسه کیفی بین سویه‌های لیپولیتیک از نظر میزان ترشح آنزیم لیپاز و با توجه به تفاوت در جایگاه فعال و در نتیجه تفاوت در نوع سوبسترای لیپیدی مصرفی آنزیم‌های لیپازی، از سه محیط کشت انتخابی تریبوتیرین آگار، توئین-۸۰ آگار و اگ یولک آگار که به ترتیب دارای منابع کربن تریبوتیرین، اسید چرب بلند زنجیر توئین-۸۰ و زرده تخم مرغ استفاده شد. لیپازی‌ها بر اساس نوع سوبسترای مصرفی به سه دسته لیپازهای اختصاصی، غیر اختصاصی و جهت ویژه تقسیم می‌شوند (۲٤).

از این رو برخی از آن‌ها تمایل بیشتری به استفاده از اسیدهای چرب کوتاه زنجیری مانند تریبوتیرین و زرده تخم مرغ دارند و برخی دیگر اسیدهای چرب بلند زنجیری مانند توئین-۸۰ را ترجیح می‌دهند که این امر منجر به ایجاد هاله لیپازی بر روی یک، دو و یا هر سه محیط کشت نام برده می‌شود. از بین ۷۸ سویه خالص شده، ۲۲ سویه مختلف با ترشح آنزیم لیپاز به‌عنوان سویه‌های لیپولیتیک شناخته شدند و از طریق اندازه‌گیری قطر هاله‌های لیپازی ترشح شده مورد مقایسه قرار گرفتند که از بین آن‌ها ۵ سویه باکتریایی با ایجاد بیشترین قطر هاله لیپازی به‌عنوان سویه‌های منتخب جهت ارزیابی‌های آنزیمی برگزیده شدند. از بین ۵ سویه منتخب سویه ۱۸ دارای بیشترین قطر هاله لیپازی بر روی هر سه محیط نام برده بود. بررسی کمی فعالیت آنزیمی ۵ سویه باکتریایی منتخب با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری و به‌کارگیری سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل استات در طول موج ٤۱۰ نانومتر انجام شد. آنزیم‌های لیپازی تولیدشده توسط سویه‌های منتخب با اثر بر روی سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل استات آن را هیدرولیز و به پارانیتروفنول و استات تبدیل کردند. پارانیتروفنول دارای رنگ زرد می‌باشد. هر چه میزان پارانیتروفنول آزادشده بیشتر باشد رنگ زرد ایجادشده پررنگ‌تر خواهد بود که این امر نشان‌دهنده بالا بودن فعالیت آنزیم است. نتایج به دست آمده از سنجش کمی فعالیت آنزیم‌های لیپازی منتخب در تحقیق حاضر بیانگر بالاترین مقدار فعالیت آنزیمی در سویه ۱۸ بود و این

سویه به عنوان سویه برتر برگزیده شد. در پژوهش‌های مشابه انجام‌شده توسط مرادی (Moradi) و همکاران در سال ۱۳۹۳ فعالیت آنزیم لیپاز جداسازی شده از *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) با استفاده از پارانیتروفینیل پالمیتات به‌عنوان سوبسترای اختصاصی و با به‌کارگیری تکنینک اسپکتروفتومتری در طول موج ٤١٠ نانومتر اندازه‌گیری گردید (١٢).

تورز (Torres) و همکاران در سال ٢٠٠٩ نیز اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیپازی جداسازی شده از *باسیلوس لکینی فورمیس* (*Bacillus licheniformis*) را با استفاده از سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل استات و تکنیک اسپکتروفتومتری در طول‌موج ٤٠٠ نانومتر انجام دادند (١١). از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر روی فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز می‌توان به دما، pH و کاتیون‌های فلزی اشاره کرد؛ بنابراین در این پژوهش به‌منظور دست یابی به مناسب‌ترین شرایط به منظور افزایش پایداری و فعالیت آنزیمی بهینه‌سازی انجام گردید. بیشترین پایداری و فعالیت در دمای ٤٨ درجه سلسیوس، ٨/٥ pH و به ترتیب در حضور نمک‌های کلرید سدیم ، کلرید کلسیم ، کلرید پتاسیم ، کلرید منیزیم ، سولفات روی و کلرید منگنز به دست آمد که این امر بیانگر مقاومت نسبی آنزیم‌های یادشده به گرما و پایداری آن‌ها در شرایط قلیایی بود. همچنین آنزیم استخراج‌شده نسبت به کاتیون‌های فلزی منیزیم، منگنز و روی حساسیت بالایی نشان داد. اما در حضور یون‌های سدیم، کلسیم و پتاسیم پایداری بیشتری داشت که این امر می‌تواند نشان‌دهنده حضور این یون‌ها در جایگاه فعال آنزیم باشد. چرا که بعضی از لیپازها در حضور عوامل شلات کننده فلزات مانند EDTA فعالیت خود را ازدست می‌دهند. در بررسی تریپادی (Tripathi) و همکاران در سال ٢٠١٤، نیز بیشترین فعالیت هیدرولیتیک لیپاز استخراج‌شده از *مایکوباکتریوم* (*Mycobacterium*) در دمای ٥٠ درجه سلسیوس و ٨/٥ pH مشاهده گردید (٢٥).

پادماپاریا (Padmapriya) و همکاران در سال ٢٠١١، نیز بیشترین فعالیت آنزیم لیپاز به‌دست‌آمده از جدایه‌ای از *لاکتوباسیلوس* را در دمای ٤٠ درجه سلسیوس و ٩ pH مشاهده کرد (٢٦). شارما (Sharma) و همکاران *باسیلوس متیلوتروفیلوس* (*Bacillus methylotrophicus*) را در دمای ٥٥ درجه سلسیوس و ٧ pHمشاهده نمودند (٢٧). سپس شناسایی مولکولی سویه ١٨ با استفاده از روش PCR و تعیین توالی ژن *16S rRNA* انجام شد و سویه یاد شده به عنوان *باسیلوس تورنجینسیس* L26 که سویه‌ای جدید است برای اولین بار شناسایی و معرفی گردید. خالص‌سازی و استفاده از این آنزیم در صنایع غذایی در دست بررسی است. این نتایج قابلیت بالای آنزیم جداسازی شده در این تحقیق را به منظور استفاده در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی نشان می‌دهد .

نتیجه گیری

سویه باکتریایی *باسیلوس تورنجینسیس* L26 جداسازی شده از پساب خروجی کارخانه روغن نباتی گلبهار اصفهان به دلیل ایجاد هاله‌های لیپازی با قطر زیاد بر روی محیط‌های کشت انتخابی تریبوتیرین آگار، توئین-٨٠ آگار و اگ یولک آگار و داشتن فعالیت آنزیمی مناسب در ارزیابی‌های کمی به‌عنوان سویه لیپولیتیک برتر در تحقیق حاضر معرفی شد. سپس فعالیت و پایداری آنزیم لیپازی خارج سلولی ترشح‌شده توسط این سویه بهینه‌سازی گردید. همچنین نتایج بهینه‌سازی نشان داد که آنزیم لیپازی این سویه در شرایط قلیایی و دمایی مختلف پایداری نسبی دارد. همچنین پایداری خوبی را در حضور کاتیون‌های فلزی نشان داد. ازاین‌رو انجام آزمون های تکمیلی به منظور استفاده کاربردی از آنزیم لیپاز این جدایه پیشنهاد می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از پایان‌نامه کارشناسی رشته میکروبیولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی

واحد فلاورجان تدوین گردید. نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم دانشکده علوم زیستی به منظور حمایت های اجرایی کمال امتنان را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Sharma S, Shrestha A, Rai B. Screening, optimization and pilot scale production of enzyme lipase in a bioreactor from *Aspergillus* species. Ministry Sci Technol. 2012; 1: 1-30.

2. Stoytcheva M, Montero G, Zlatev RA, Leon J, Gochev V. Analytical methods for lipases activity determination: A review. Curr Anal Chem. 2012; 8(3): 400-407.

3. Balashev K, Jensen TR, Kjaer K, Bjornholm T. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. Biochimie. 2001; 83: 387-397.

4. Gao W, Wu K, Chen L, Fan H, Zhao Z, Gao B, Wang H, Wei D. A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters. Microb Cell Fact. 2016; 15: 41.

5. Kiran S, Arshad Z, Nosheen S, Kamal S, Gulzar T, Majeed MS, Jannat M, Rafique MA. Microbial lipases: Production and applications: A review. J Biochem. 2016; 1(2): 7-20.

6. Gandolfi R, Marinelli F, Lazzarini A, Molinari F. Cell-bound and extracellular carboxylesterases from Sterptomyces: hydrolytic and synthetic activities. J Appl Microbiol. 2000; 89(5): 870-875.

7. Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol Appl Biochem. 1999; 29: 119-131.

8. Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases. FEMS Microbiol Rev. 1994; 15: 29-63.

9. Mobarak Qamsari E, Kasra Kermanshahi R, Moosavi nejad Z. Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomnas aeruginosa* KM110. Iran J Microbiol. 2011; 3(2): 92-98.

10. Adami Ghamsari F. Isolation of lipolytic bacteria from environmental resources for biodegradation polysorbate in industrial wastewater. Bimonthly J Sabzevar Univ Med Sci. 2015; 22(4): 685-693.

11. Torres S, Baigorí MD, Swathy SL, Pandey A, Castro GR. Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. Food Res Int. 2009; 42: 454-460.

12. Moradi S, Razavi SH, Mousavi SM. Isolation of lipase producing bacteria from olive and the various parameter effect on enzyme production in solid state fermentation.2015; 46(3): 315-325. [In Persian].

13. Xavier AREO, Lima ER, Oliveira AME, Cardoso L and Santos J. Genetic diversity of *Bacillus* sp. producers of amylase isolated from the soil. Genet. Mol. Res. 2017; 16(3). 10.4238/gmr16039771

14. Badoei-Dalfard A, Karami Z, Ramezani-Pour N. Bench scale production of nicotinic acid using a

newly isolated *Stenotrophomonas maltophilia* AC- 21 producing highly-inducible and versatile nitrilase. J Mol Catal B Enzym. 2016; 133: 552-559.

15. Afrisham S, Badoei-Dalfard A, Namaki-Shoushtari A, Karami Z, Malekabadi S. Isolation and identification of Bacillus producing thermophilic alpha amylase: production optimization and investigation of the activity and stability of enzyme. Nova Biologica Reperta. 2018; 4(4): 288-298. [In Persian].

16. Sharma MR, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnol Adv. 2001; 1: 627-662.

17. Stergiou PY, Foukis A, Filippou M, Koukouritaki M, Parapouli M, Theodorou Lg. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. Biotechnol Adv. 2013; 31: 1846-1859.

18. Hasan F, Hasan AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme Microb Technol. 2006; 39: 235-251.

19. Leung DYC, WU X, Leung MKH. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. Appl Energy. 2010; 87: 1083-1095.

20. Baltz RH, Davies JE, Demain AL. Mannual of industrial microbiology and biotechnology. Third ed. Washington DC: ASM press. 2010. pp: 745.

21. Wanatab N, Ota Y, Minoda Y, Yamada K. Isolation and identification pf alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzyme. Agric Biol Chem. 2016; 41(8): 1353-1358.

22. Mobarak Qamsari E, Kasra Kermanshahi R, Moosavi nejad Z. Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomnas aeruginosa* KM110. Iran J Microbiol. 2011; 3(2): 92-98.

23. Kumar D, Kumar L, Nagar S, Raina C, Parshad R. Screening, isolation and production of lipase/ esterase producing *Baclillus* sp. Strain DVL2 and evaluation in esterification and resolution reactions. Arch Appl Sci Res. 2012; 4(4): 1763-1770.

24. Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. Appl Microbiol Biotechnol. 2004; 64: 763-781.

25. Tripathi R, Singh J, kumar Bharti R, Thakur IS. Isolation, purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production. Energy Procedia. 2014; 54: 518-529.

26. Padmapriya B, Rajeswari T, Noushida E, Sethupalan DG, Venil CK. Production of lipase enzyme from *Lactobacillus* spp. and its application in the degradation of meat. World Appl Sci J. 2011; 12(10): 1798-1802.

27. Sharma P, Sharma N, Pathania S, Handa S. Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. Genet Eng Biotechnol J. 2017; 15(2): 369-377.

Journal of Microbial World
Volume 12, No. 3, September 2019

Original Article

Molecular identification and optimization of lipase- producing strain *Bacillus thuringiensis* L26

Farzaneh Karimian[1], Mohammad Hassan Ghorbani[2], Seyed Hossein Mirdamadian[3]

[1]M.Sc. student, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Faculty of Biological Sciences, Department of Microbiology, Falavarjan, Iran.
[2]Assistant Professor, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Faculty of Biological Sciences, Department of Biochemistry, Falavarjan, Iran.
[3]Instructor, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Faculty of Biological Sciences, Department of Microbiology, Falavarjan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Lipases are important hydrolytic enzymes produced by various microorganisms such as bacteria. This enzyme is applied in various industries including food and pharmaceutical industries. This study aimed to isolate and identify lipase-producing bacteria from various sources to use in different industries.

Materials & Methods: Sampling and screening of lipase- producing bacteria were carried out from wastewater and soils of Habib-abad refinery, wastewater and slugs of Golbahar oil factory, sheep's tail fat, and sesame meal. To evaluate the enzymatic activity, bacterial isolates were cultured in lipid-based media, where the supernatant was used for the next assay. A quantitative assessment of enzymatic activity was performed using a spectrophotometer, in the presence of para-nitrophenol acetate at the temperature of 28°C. The identification of bacterial isolates was carried out by macroscopic, microscopic and molecular analysis.

Results: Screening bacterial isolates and the results of enzymatic activity assays showed strain 31 as the superior one. Molecular analysis results identified this strain as *Bacillus thuringiensis L26*. The highest enzymatic activity and stability were obtained at the temperature of 48°C, pH value of 8.5, and in the presence of sodium chloride, calcium chloride, potassium chloride, magnesium chloride, zinc sulfate, and manganese chloride, respectively.

Conclusion: Our results showed the stability of tested lipase enzymes under alkaline conditions and the presence of different cations. Therefore, further complementary tests are recommended o assess practical uses.

Keywords: Hydrolytic enzymes, *Bacillus thurigiensis*, Activity assay, Lipase.

Correspondence to: Mohammad Hassan Ghorbani

Tel: +98 9133259693

E-mail: ghorbani@iaufala.ac.ir

Journal of Microbial World 2019, 12(3): 267-278.

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.