بهینه سازی تولید آنزیم لیپاز در سویه بومی هالوارکئا نمک دوست جدا شده از خاک جنوب ایران

حسین وحیدی نژاد۱، احمدعلی پوربابایی *۲، محمد حسین رضویان ۳

۱ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران،

۲ * عضو هیات علمی گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران،

۳ عضو هیات علمی گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران،

چکیده

متابولیت ها و آنزیم های ارکئا به دلیل ماهیت اکسترموفیلی و دوام و فعالیت مناسب انها در شرایط سخت صنعتی کاربرد وسیعی در صنایع مختلف دارند. با توجه به اهمیت انزیم های لیپولیتیک تحمل کننده شرایط شور و قلیائی در صنایع غذایی, دارویی و بهداشتی، این مطالعه انجام شده است. بنابراین هدف از این تحقیق, بررسی تاثیر نوع و درصد سوبسترا ، درصد نمک , pH , دما و زمان انکوباسیون بر رشد سویه آرکئا و همچنین بر روی تولید آنزیم لیپاز بوده است . بهینه شرایط برای رشد سویه و تولید آنزیم لیپاز با روش تاگوچی بترتیب در pH=۸ و ۸, درصد سوبسترا ۰,۵ ٪ و ۱,۵ ٪، زمان ۶ روز و ۷ روز ، درصد نمک ۱۹ و ۲۵٪، دمای $45^{o}c$ و $35^{o}c$ در حضور روغن توئین و روغن بادام شیرین بعنوان تنها منبع کربن بدست آمد. با توجه به نتایج فوق می توان از این سویه در صنایع دباغی و استحصال روغن استفاده کرد.

کلمات کلیدی : لیپاز، هالو ارکئا، تاگوچی، بهینه سازی

*نویسنده مسئول,تلفن:09122857394 ,پست الکترونیکیahmadali:pb@gmail.com

مقدمه

انزیم ها به عنوان یکی از مهمترین مولکول های موجود در طبیعت می باشند که به علت توانایی در تغییر تبدیل های شیمیایی در محیط بدون سلول موجب کاربرد فزاینده انها در فرایندهای صنعتی شده است. .مسلما با افزایش کاربرد روش های بیوتکنولوژی برای بدست اوردن انزیم هایی با طیف اثر کافی و مناسب و دارای پایداری در شرایط محیطی , میتوان پذیرفت که در اینده تکنولوژی تولید و کاربرد انزیمها در اقتصاد جهانی و حل بسیاری از مشکلات محیط زیست سهم بزرگی خواهد داشت. آنزیم لیپاز(تری آسیل گلیسرول آسیل هیدرولازها (EC 3.1.1.3)) یکی از انواع آنزیمهای محلول در آب است که هیدرولیز پیوندهای استری را در سوبستراهای لیپیدی انجام می دهد.به همین دلیل انها را نوعی استراز میدانند.تنها تفاوت انها با استرازها ان است که لیپازها

قادرند سوبستراهای بلند زنجیر را نیز هیدرولیز نمایند.از لحاظ عملکردی انزیمهای لیپاز سوبستراهای متنوعی داشته و بعلاوه انتخابگری فضایی خوبی را از خود نشان میدهند. (۶)

بسیاری از ارگانیسمها قادر به ترشح لیپازند اما در میان آنها باکتریها اهمیت بیشتری دارند چرا که:

۱ - لیپازهای باکتریایی در حلالهای آلی پایدارند، ۲- برای انجام فعالیت به کوفاکتور نیازی ندارند، ۳- محدوده وسیعی از سوبستراها را پوشش می دهند.

۴- انتخابگری فضایی (Enantio selectivity) خوبی دارند (۱۲)

صنایع مختلفی قابلیت استفاده از لیپاز های باکتریایی را دارند که از آن جمله می توان به صنایع تولید لوازم آرایشی، تولید دارو، مواد غذایی و نیز شوینده ها اشاره کرد.(۲۱, ۹،۱۱،۲۰)

لیپازهای باکتریایی اغلب آنزیمهایی ترشحی و خارج سلولی اند و به همین جهت به شدت تحت تأثیر شرایط محیط و مواد موجود در آن مانند دما ،pH ،میزان نیتروژن، منابع کربنی، وجود انواع لیپیدها و میزان هوادهی قرارمیگیرند و در میان این فاکتورها، وجود منابع کربنی، و نیز القاء کننده های روغنی از اهمیت بیشتری برخوردارند به طوری که لیپازهای باکتریایی به خوبی در حضور منابع روغنی نظیر روغن، توئین، نمکهای صفراوی و گلیسرول از باکتری ترشح می شوند.

با توجه به مطالب فوق، ساختار محیط کشت می تواند میزان ترشح آنزیم و در نتیجه تولید آن را تحت تأثیر قرار داده و در یک شرایط بهینه آن را افزایش دهد به همین دلیل به نظر می رسد که طراحی یک محیط کشت بهینه برای رسیدن به هدف تولید حداکثر آنزیم ضروری است . طراحی محیط کشت در آزمایشگاهها اغلب فرآیندی وقت گیر و پرهزینه است که نیازمند انجام آزمایشهای متعدد نیز می باشد.

در این پژوهش با توجه به اهمیت لیپاز و ویژگیهای منحصر به فرد این سویه نمک دوست بومی به بررسی فعالیت های سینتیکی ان پرداخته و اثر فاکتورهای مختلف بهینه سازی را بر رشد سویه و تولیدانزیم بررسی نموده ایم.

روشهای طراحی آماری آزمایشها برای بررسی و تعیین تاثیر عوامل موثر بر افزایش محصولات میباشد.از جمله این روشها, روش های ارائه شده توسط پرفسور تاگوچی میباشد . روشی سودمند برای غربال گری مواد غذایی و شرایطی است که بیشترین تأثیر را بر روی میزان رشد میکروارگانیسمها دارد و به شناخت روابط متقابل عوامل مورد بررسی در سطوح مختلف کمک می کند. انجام این روش با استفاده از برنامه های کامپیوتری بسیار معمول میباشد. برخی از نرم افزارهای آماری مانند Minitab علاوه بر انجام محاسبات آماری ساده و پیچیده حاوی زیر برنامه های طراحی آماری آزمایشها نظیر: Experiments Design Of وDOE نیز میباشند.و در مطالعهٔ حاضر،از این روش برای بهینه سازی شرایط برای رسیدن به بیشترین دانسیتهٔ سلولی و تولید لیپاز استفاده شده است.(۲۵،۱۸)

مواد و روشها

محیط کشت نگهداری

Bacterioruberin Production Medium (B. P. M)

محیط کشت نگهداری و رشد هالوفیل ، محیط پیچیده متشکل از تر کیبات زیر بود (گرم در۱۰۰میلی لیتر):

Casein pepton ,0. 5 - Yeast extract ,0. 2 - Glucose ,0. 1 - Agar,2– Distilled Water, 100ml

به همراه نمک تبخیری (solar salt) که شامل:

(NaCl,16 – MgSO4. 7H2O,1. 9 - MgCl2. 2H2O,1. 4 - CaCl2.2H2O, 0.7 – kcL,0. 4 - NaHCO3,0. 01- NaBr,0/005)

میباشد . محیط قبل از اتوکلاو کردن توسط بافر تریس بیس ۱ مولار حدود ۷/۴-۷/۲ تنظیم شد.

بررسی فعالیت لیپاز در سویه

سویه با روش سنجش انزیمی باکتری به روش پلیت از نظر تولید انزیم لیپاز بررسی می گردد.(۱) . سویه مورد نظر را پس از کشت در محیط اختصاصی بر روی پلیتهای حاوی :

Peptone , 10 g/l- Tween 80, 10 g/l NaCl (solarsalt) - yeast extract 2 g/l-Distilled water, 1000ml - pH, 7.2

کشت داده و پس از گرماگذاری ۴۸ ساعته دردمای ۳۷درجه , چنانچه در اطراف کلنی سویه هاله و ذرات کوچک صابونی مشاهده گردد ، وجود آنزیم لیپاز برای این تست مثبت تلقی می شود.

سنجش کمی لیپاز با روش رنگ سنجی و سوبسترای پارا نیتروفنیل پالمیتات

ترکیب۹۰ ماکرولیتر محلول الف و ۸۱۰ ماکرولیتر محلول ب و۱۰۰ ماکرولیتر از نمونه به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون می گردد. سپس با طول موج ۴۱۰ نانومتر که بهترین طول موج برای جذب این ماده رنگی میباشد قرائت نوری صورت میگیرد .(۵)

محلول الف (سوبسترای رنگی) :۳۰ میلی گرم پارانیتروفنیل پالمیتات + ۱۰ میلی لیتر ایزو پروپانول

محلول ب(محلول سوبسترا) : ۱ میلی لیتر محلول ۱ + ۹ میلی لیتر بافر تریس Hcl با PH :۸ + ۱۰ میلی گرم صمغ عربی + ۰،۴ درصد تریتون X-100

نمونه : سوپرناتانت حاصل از سانتریفوژ محیط کشت براث دو یا سه روزه سویه به مدت ۱۵ دقیقه و دور ۱۳۰۰۰

رسم منحنی استاندارد فعالیت لیپاز

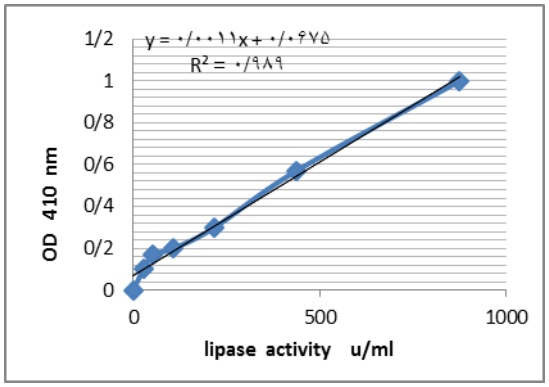
جهت تخمین فعالیت و میزان لیپاز تولیدی موجود در سوپرناتانت از منحنی رسم شده کالیبراسیون لیپاز استاندارد کاندیدا روگوسا استفاده شد.

لیپاز خریداری شده از شرکت sigma که دارای فعالیت انزیمی ۷۰۰ u/mg میباشد به صورت رقتهای متوالی: ۱,۲۵ - ۰,۶۲ -۰,۳۱ - ۰,۱۵ – ۰,۰۷۸ و ۰,۰۳۹ میلی گرم بر میلی لیتر در ۱۰ میکروتیوپ تهیه شد. با روش ذکر شده برای سنجش لیپاز مقادیر جذب دستگاه یادداشت

نوع	زمان	درصد	pH	نمک	دما	سطوح
سوبسترا		سوبسترا				
توئین	۷۲	۰,۵	۵	۱۳	۳۰	۱
زیتون	۹۶	۱	۶	۱۶	۳۵	۲
بادام	۱۲۰	۱,۵	۷	۱۹	۴۰	۳
شیرین						
نارگیل	۱۴۴	۲	۸	۲۲	۴۵	۴
کرچک	۱۶۸	۲,۵	۹	۲۵	۵۰	۵

شد و منحنی کالیبراسیون برای لیپاز استاندارتوسط نرم افزار Excle رسم گردید.. و با استفاده از این منحنی و معادله خط ارائه شده توسط نرم افزار مقادیر وزنی و فعالیت نسبی لیپاز مجهول بررسی شد.

منحنی استاندارد لیپاز کاندیدا روگوسا طبق نتایج حاصله بدین شکل رسم گردید(نمودار۱)



نمودار۱) نمودار استاندارد لیپازمعلوم (لیپازکاندیدا روگوسا با فعالیت ۷۰۰ u/mg)

بهینه سازی با روش تاگوچی(تغیر چند فاکتور در زمان)

۱-طراحی آزمایش

در این مرحله ابتدا پارامترهای مورد مطالعه و سطوح تغییرات آنها براساس نظر کارشناسانه انتخاب میشود. بعداز انتخاب ستونها شرایط هر آزمایش تعیین میشود. و سپس ترتیب انجام آزمایشات و تعداد تکرار آنها مشخص میشود .در میان عوامل مؤثر در رشد سویه، شش عامل مورد بررسی قرار گرفت که برای هر عامل پنج سطح (جدول ۱) در نظر گرفته شد .(۳).

جدول ۱- فاکتورها وسطوح مورد استفاده در طراحی آزمایشها با روش تاگوچی

برای طراحی و اجرای آزمایشها جدول آرایه های متعامدی برای۶ عامل در ۵ سطح با استفاده از نرم افزار Minitab تهیه شد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جدول طراحی شده(جدول ۲) برای وضعیت های مختلف آزمایشی قابل استفاده است و شامل ۶ ستون و ۲۵ ردیف است .هر ستون به یک عامل و هرردیف به یک آزمایش تعلق دارد .ترتیب انجام آزمایشها بر اساس اصول آماری باید تصادفی باشد.(۱۷).

جدول۲- بیست وپنج ازمایش پیشنهاد شده توسط نرم افزار تاگوچی و عوامل و سطوح انتخابی

۲- انجام آزمایشها

آزمایشات انجام و پاسخ سیستم اندازه گیری میشود. با توجه به جدول آرایه های متعامد در ۶ عامل و ۵ سطح و همچنین عوامل و سطوحی که در نظر گرفته شد، آزمایشها مطابق جدول۲ انجام شد.

۱ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی تازه تهیه شده در اب نمک ۱۶ درصد دارای جذب ۱ به ارلن هایی که حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط پیشنهادی نرم افزار میباشند اضافه گردید. و گرماگذاری مطابق با زمان درخواستی نرم افزار برای هر ازمایش انجام شد (۱۴) .

۳-تحلیل نتایج

در این مرحله تاثیر فاکتورها به طور جداگانه و همچنین تاثیرات متقابل (اندرکنش) شناخته میشوند. باید به این نکته توجه نمود که در ازمایشهای بهینه سازی و کنترل نتایج فقط سطوح فاکتورها تغییر میکند و تغییر تاثیر

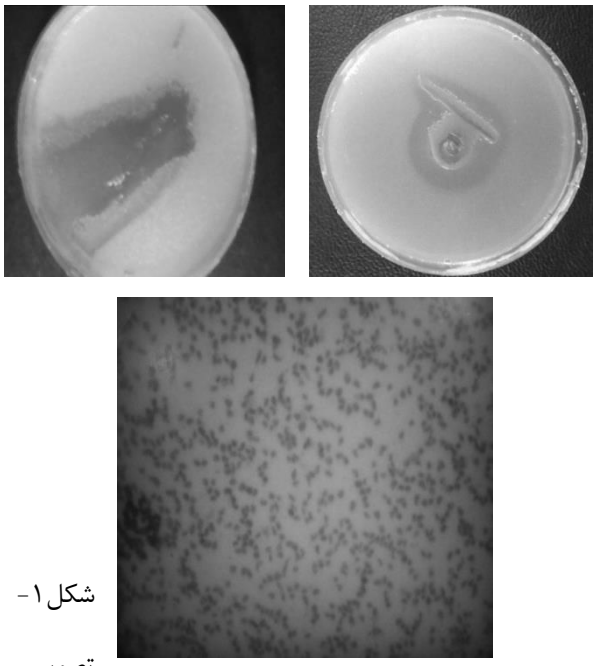
	نوع روغن	زمان	درصد سوبسترا	pH	نمک	دما
1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	1
3	3	3	3	3	3	1
4	4	4	4	4	4	1
5	5	5	5	5	5	1
6	5	4	3	2	1	2
7	1	5	4	3	2	2
8	2	1	5	4	3	2
9	3	2	1	5	4	2
10	4	3	2	1	5	2
11	4	5	2	3	1	3
12	5	3	1	4	2	3
13	1	4	2	5	3	3
14	2	5	3	1	4	3
15	3	1	4	2	5	3
16	3	5	2	4	1	4
17	4	1	4	2	5	4
18	4	2	5	3	1	4
19	5	3	1	4	2	4
20	1	4	2	5	3	4
21	2	5	3	1	4	4
22	2	3	5	4	1	5
23	3	4	1	5	2	5
24	4	5	2	1	3	5
25	5	1	3	2	4	5

متقابل ممکن نیست. بخش دیگر تحلیل نتایج، محاسبه اهمیت و تاثیر نسبی (به صورت درصد) فاکتورها میباشد. و بخش نهائی تحلیل نتایج، انجام تست ها در شرایط بهینه میباشد.

۴-اعتبار بخشی به آزمایشات

در این مرحله آزمایشات تکمیلی برای اعتبار بخشی به یافته ها و تکرار آزمایشات برای تایید نتایج صورت میگیرد برای تعیین درستی نتایج نهایی,ازمونی با توجه به شرایط اپتیمم به دست امده انجام شد (verification test) و از محیط پایه رشد وتولید لیپاز به عنوان کنترل استفاده شد و با نمونه گیری از محیط کشت باکتریایی در طی ۷ روز منحنی رشد باکتری و تولید لیپاز که بیانگر کارایی ازمایش است رسم گردید. و با مقدار پیش بینی شده مورد مقایسه قرار گرفت .

صفات	نتایج
پیگمان	نارنجی
شکل کلنی	محدب کناره صاف
مورفولوژی	کوکسی زنجیره ای
واکنش گرم	مثبت
کاتالاز	مثبت
اکسیداز	مثبت
رشد در نمک	۳۰-۸ درصد
سیمون سیترات	منفی
احیای نیترات	منفی
حساسیت به ریفامپین	مقاوم



شکل ۱- تصویر سویه با رنگ امیزی مخصوص Dassualt **شناسایی آرکی باکتر**Pt (persion type)(۲)

جدول۳- مشخصات مورفولوژی و بیوشیمی سویه

نتایج و بحث

سویه با روش رنگ امیزی اختصاصی(Dassualt) رنگ امیزی شده ودر زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید (۸)

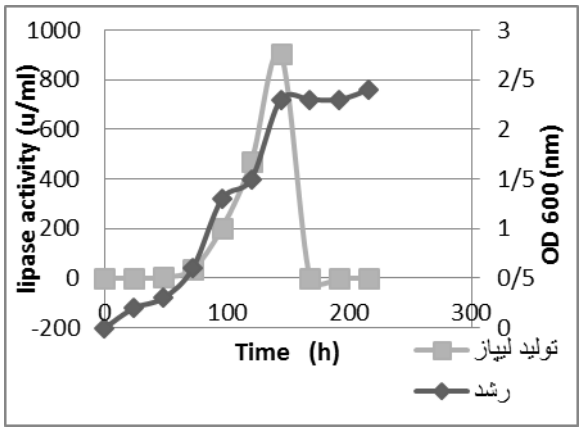
تست تولید انزیم توسط سویه

رشد در پلیت اختصاصی که طبق روش کار معرفی شد صورت گرفت . در کلیه تستهای تولیدی انزیم ودر تمامی تکرارها هاله مشخصی که نشان از تولید لیپاز توسط سویه و هیدرولیز لیپید موجود در محیط کشت میباشد ایجاد گردید.

شکل۲- هاله ناشی از تجزیه توئین توسط لیپاز در محیط تولید لیپاز B.P.M حاوی توئین

تاثیر فاکتور زمان بر رشد سویه و تولید لیپاز

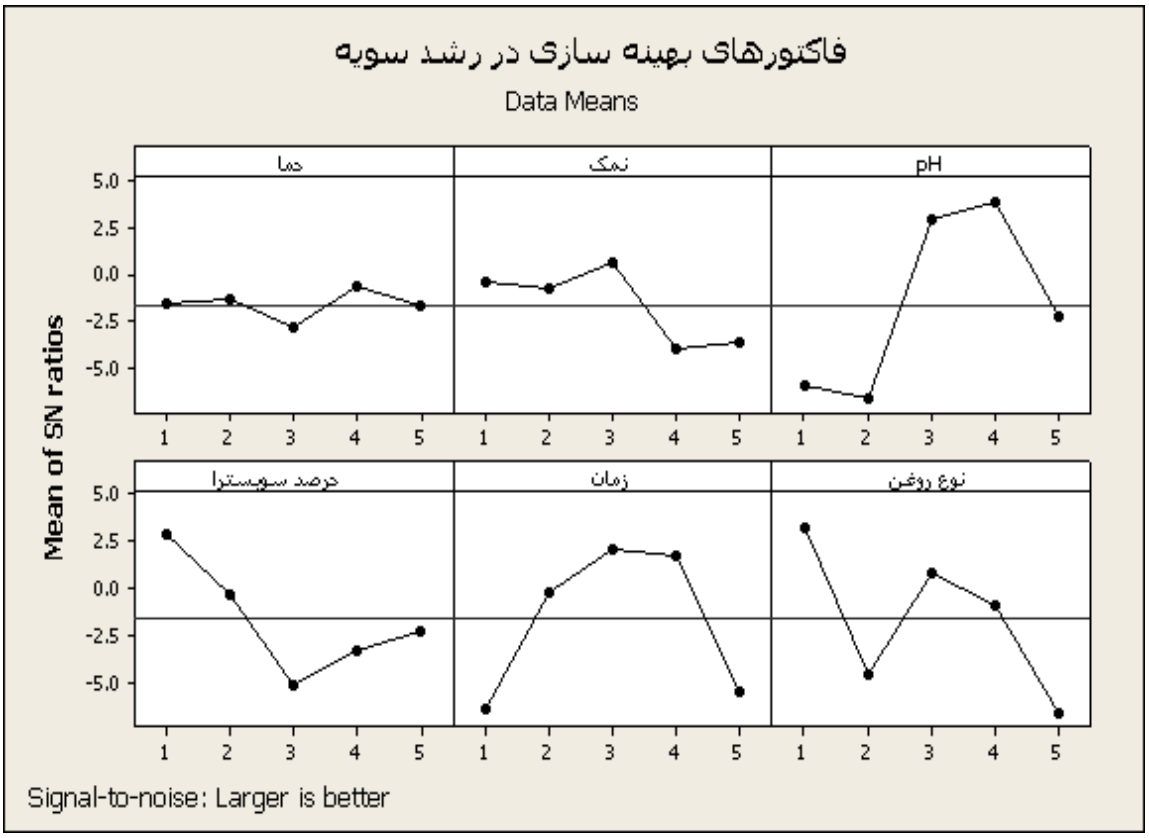
نتایج حاصل از رشد و تولید لیپاز در طی ۱۰ روز با استفاده از روش بهینه سازی کلاسیک(ثابت نگه داشتن همه فاکتورها و تغیر یک فاکتور) , طبق نمودار دو چنین نشان میدهد که سویه تا ساعت ۲۱۶ رشد فزاینده ای را نشان میدهد و بعد از ان رشد ثابت باقی می ماند. و تولید لیپاز سویه طبق مندرجات نمودار چنان مینماید که در روز هفتم به ماکسیمم مقدار خود رسیده و بعد از ان روند نزولی را طی کرده و از روز هشتم به بعد کاملا مقدار لیپاز صفر گزارش می گردد. . مطابق با تولیدات لیپاز در سویه های هالوفیل *Marinobacter lipolyticus*, *Salinivibrio* sp. strain SA-2 and *Thalassobacillus* sp. strain DF-E4 (7-16-15)



نمودار۲- رشد و تولید لیپاز سویه P.T در محیط کشت (B.P.M) پس از ۱۰ روز

تاگوچی در فاکتورهای رشدی سویه ازمایشات تاگوچی مطابق با ۲۵ الگوی ارائه شده نرم افزار مینی تب صورت گرفت و ارلن ها در هر الگو مورد بررسی قرار گرفتند .نتایج حاصله از ۲۵ ازمایش به نرم افزار داده شده و مورد تجزیه و تحلیل اماری قرار میگیرد .نمودار SNR (Signal to noise ratios)رسم شده(نمودار ۳) و چنین مورد تحلیل قرار میگیرد. محور طول مربوط به ۵ سطح ازمایش می باشد .و محور عرض مربوط به اعداد SNR . هراندازه مقدار SNR بالاتر باشد به هدف نزدیکتر میباشیم.

مطابق انالیز صورت گرفته , فاکتور دما و سپس درصد نمک کمترین میزان تاثیر را بر روند بهینه سازی داشته .و سایر فاکتور ها به نسبت دارای اثر گذاری بیشتری در این روند می باشند به طوری که فاکتور pH در سطح ۴,درصد سوبسترا در سطح ۱ ,زمان در سطح ۳و۴ و نوع روغن در سطح ۱ بالاترین رشد سویه را حاصل مینمایند.



نمودار۳) گراف رسم شده فاکتورهای بهینه رشد سویه توسط نرم افزار تاگوچی

جدول ۴- انالیزهای تاگوچی برای فاکتورهای رشد

Response Table for Signal to Noise Ratios Larger is better

Level	دما	نمک	pH	سوبسترا	زمان	روغن
1	-1.5918	-0.3532	-5.9794	2.9363	-6.3670	3.2861
2	-1.3460	-0.7218	-6.7111	-0.3195	-0.1358	-4.6097
3	-2.8445	0.6526	2.9959	-5.1697	2.1862	0.8165
4	-0.6097	-3.9588	3.9244	-3.2544	1.7545	-0.8607
5	-1.6772	-3.6879	-2.2989	-2.2617	-5.5070	-6.7012
Delta	2.2348	4.6114	10.6356	8.1060	8.5532	9.9873
Rank	6	5	1	4	3	2

مطابق انالیز ارائه شده توسط نرم افزار ترتیب اهمیت فاکتورها در رشد سویه به ترتیب زیر میباشد:

pH –نوع روغن –زمان-درصد سوبسترا –نمک ودر درجه کم اهمیت تر دما قرار دارد. فاکتورpH با میانگین تاثیر ۱۰,۶۳۵۶ ,دارای بالاترین تاثیر گذاری بر روند رشدی سویه

می باشد و از اهمیت بالاتری برخوردار میباشد.اگر تمامی فاکتور ها در سطح یک قرار بگیرند نوع روغن با تاثیر۳/۲۸۶۱ بالاترین اثر گذاری را بر رشد خواهد داشت.

تاگوچی در فاکتورهای تولید لیپاز

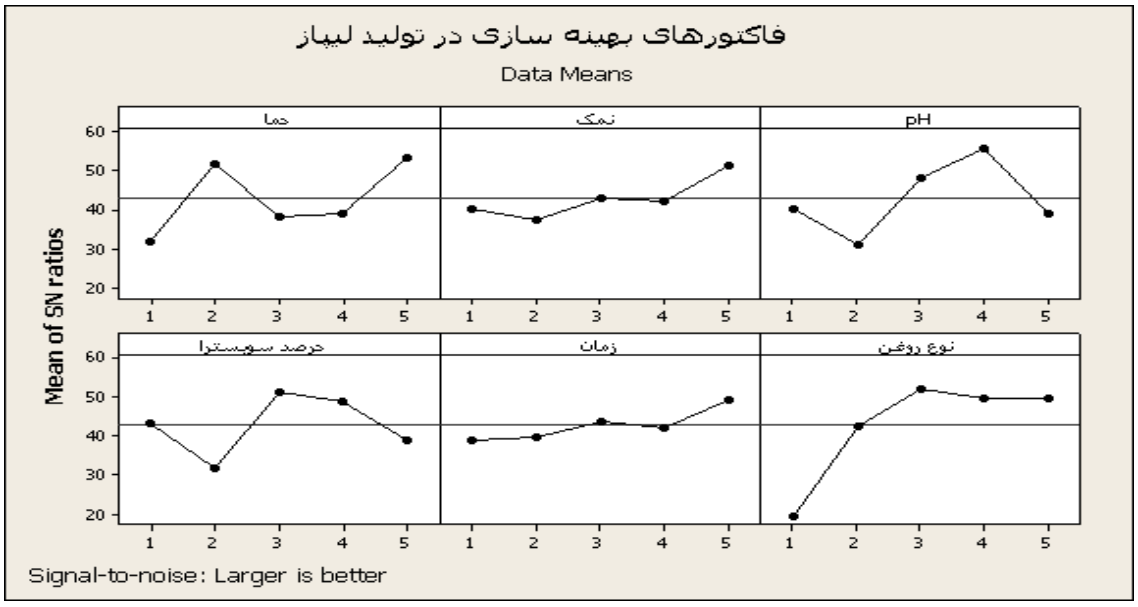
پس از بررسی ازمایشهای تولیدی لیپاز سویه در هر ارلن ، نتایج ازمایش ها در نرم افزار وارد شده و انالیز های تاگوچی مقادیر بهینه را نمایش میدهند. دو فاکتور نمک و زمان کمترین اثرگذاری را بر روند رو به افزایش تولید لیپاز دارند.و در سطح ۵ این دو فاکتور دارای بالاترین تاثیر بر تولید میباشند. فاکتور pH در سطح ۴,درصد سوبسترا در سطح ۳ ,دما در سطح ۲ و نوع روغن در سطح ۳ بالاترین رشد سویه را بدست میدهند.

نمودار۴- گراف رسم شده فاکتورهای بهینه تولید لیپازتوسط نرم افزار تاگوچی

جدول۵) انالیزهای تاگوچی برای فاکتورهای تولید لیپاز

Response Table for Signal to Noise Ratios Larger is better

Level	دما	نمک	pH	سوبسترا	زمان	روغن
1	31.85	40.30	40.07	43.27	38.86	19.59
2	51.71	37.17	30.90	31.64	39.72	42.67
3	38.28	42.99	47.93	51.16	43.65	52.08
4	38.77	42.18	55.89	49.02	42.29	49.75
5	53.33	51.29	39.15	38.86	49.43	49.85
Delta	21.48	14.12	24.99	19.52	10.57	32.49
Rank	3	5	2	4	6	1



فاکتورهای درصد روغن- PH –دما –درصد سوبسترا – درصد نمک و زمان به ترتیب دارای بیشترین تاثیر گذاری بر روند بهینه سازی تولیدات لیپاز سویه را دارا میباشند. فاکتور درصد روغن با میانگین تاثیر گذاری ۳۲/۴۹ بالاترین درجه تاثیر گذاری را در تولیدات دارد.

آزمایشات تکمیلی برای اعتبار بخشی به یافته ها برای تایید نتایج صورت گرفت و برای تعیین صحت نتایج نهایی,ازمونی با توجه به شرایط اپتیمم به دست امده انجام شد . و از محیط پایه رشد وتولید لیپاز به عنوان کنترل استفاده شد و با مقدار پیش بینی شده مورد مقایسه قرار گرفت .نتایج ازمایشگاهی حاصل و جواب حدسی نرم افزار فاصله اندکی داشته و این نشان از صحت سطوح بهینه ارائه شده میباشد.

ODرشد حدس زده شده توسط نرم افزار ۳,۴۲ و نتیجه بدست امده در ازمایشگاه ۳,۱ وتولید لیپاز تعین شده توسط تاگوچی u/ml ۷۵۳ و نتیجه حاصله در ازمایشگاه برابرu/ml ۶۹۹ میباشد.

در این پژوهش با توجه به بهینه سازی فاکتورهای موثر توانستیم رشد را در سویه ۱۰۰ ٪ و تولید لیپاز را ۳۵٪ افزایش دهیم . روش تاگوچی با در نظر گرفتن کلیه فاکتورها در یک زمان و انالیز یکباره انها , علاوه بر صرفه در وقت و هزینه های ناشی از ان , نتایج صحیح تر و نزدیکتر به واقعی و نسبتا مشابه با جواب ازمایشات به روش کلاسیک برای ما حاصل می اورد.

شرایط بهینه تولید آنزیم لیپاز با روش تاگوچی بترتیب در$pH=8$, درصد سوبسترا ۱,۵ ٪، زمان ۷ روز ، درصد نمک ۲۵٪، دمای $35^{o}c$ در حضور روغن توئین و روغن بادام شیرین بعنوان منبع کربن مشاهده گردید. در مطالعات مشابه انجام شده Kumari و همکاران در سال ۲۰۰۹ به اپتیمم سازی شرایط محیط کشت برای تولید لیپاز بیشتر توسط انتروباکتر ائروژینوزا پرداختند .و فاکتورهای : دما , درصد روغن ,درصد تلقیح ,pH و مدت زمان انکوبه سازی را بترتیب $pH\ 7$ - ٪۷ -٪۳ -۳۴ $^{\circ}C$ و ۶۰ ساعت یافتند. (۱۳) Mrugesh و همکارانش بیشینه لیپاز تولیدی سویه *Halomonas salina* مورد تحقیق خود را در فاکتورهای دما , درصد روغن , pH,درصد نمک و زمان انکوبه سازی بترتیب ۳۵ $^{\circ}C$ - ۱٪ - $pH\ 8$ -۱۰٪و ۲۸۸ ساعت بدست اوردند.(۱۹)

Werasit نیز نتایج بهینه سازی خود را برای تولید لیپاز بیشتر در هالوفیل *Staphylococcus warneri*, – $pH\ 7$ دمای ۴۰$^{\circ}C$ و زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت اعلام نمود .(۲۳)

Xin Li هم برای سویه هالوفیلیک *Chromohalobacter* sp دمای ۶۰ °c -pH۹ ونمک ۱۲,۵ ٪ اعلام نمود. (۲۴)

در کلیه مطالعات صورت گرفته, مشابهه با این تحقیق مشاهده میگردد که تولید لیپاز در ابتدای فاز سکون در بیشینه مقدار خود میباشد.

خانم محمدی و همکارانشان در سال ۱۳۹۳ با بهینه سازی شرایط سویه P.T مورد استفاده در این پژوهش توانستند میزان رشد و تولید پیگمان کاراتنوئید را در این سویه افزایش بخشند. و بالاترین میزان رشد سویه را در شرایط: دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ,pH ۸ , نمک NaCl ۱۶٪ ,منبع کربنی لاکتوز ,منبع نیتروژنی عصاره گوشت و به صورت ترکیبی عصاره مخمر با کازئین پپتون در حضور کلرید کادمیم نشان دهند.(۴) که نتایج حاصله از این پژوهش نیز در مورد فاکتورهای مشابه کار شده در رشد سویه از قبیل درصد نمک ,pH و دما با اندک اختلاف مشابه میباشند.

آنزیم لیپاز که تری گلیسرید را به اسید های چرب و گلیسرول هیدرولیز می کند .تولید بهینه آن ارتباط زیادی به میزان در دسترس بودن تری گلیسرید ها دارد .آنزیم لیپاز که توسط برخی از باکتری ها تولید می شود از نظر صنعتی از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا قابلیت هیدرولیز تری گلیسرید را در شرایط خاص صنعتی همچون: دمای بالا و شرایط قلیایی دارا میباشد.(۲۲) و لیپاز ارکی نمک دوست نیز علاوه بر شرایط سایر سویه های میکروبی رشد در درصد نمک بالا و عدم بیماریزایی را نیز دارا میباشد که این خود مزیتی برای استفاده از این سویه در صنعت می باشد.

در این پژوهش شرایط بهینه تولید انزیم لیپاز در سویه بومی هالوارکئا امیلولیتیکا در محیط حاوی منابع کربنی روغنی ارزان قیمت بدون استفاده از گلوکز بدست امد که مقدمه ای برای تولید آنزیم لیپاز در مقیاس صنعتی می باشد.

منابع

۱- باباولیان, ح اموزگار.م,پوربابایی ا.,۱۳۸۶. "تنوع زیستی باکتری های نمک دوست نسبی تولید کننده انزیمهای هیدرولیتیک دریاچه نمک اران و بیدگل." رساله کارشناسی ارشد دانشگاه ازاد اسلامی قم,دانشکده علوم,گروه میکروبیولوژی.

۲- توکلی,س, پوربابایی ,۱۳۸۸ا "بررسی توانمندی تولید رنگدانه های کاروتنوئیدی باکتری های نمک دوست جدا شده از محیط شور." رساله کارشناسی ارشد.

۳- مروج, ر. م. اذین (۱۳۹۱). "بررسی و بهینه سازی تولید آنزیمهای آمیلولیتیک توسط قارچ Trichoderma longibrachiatum با استفاده از روش آماری تاگوچی."

۴- محمدی.م ,پوربابایی.ا (۱۳۹۳) " بهینه سازی شرایط محیط کشت در تولید پیگمان کاراتنوئید توسط ارکیاهای هالوفیل بومی(هالوارکالیپولتیکال) " رساله کارشناسی ارشد دانشگاه ازاد سلامی,دانشکده علوم,گروه میکروبیولوژی.

۵- واصفی, م. و پوربابایی.ا (۱۳۸۶). "جداسازی مخمرهای هالوفیل از محیطهای شور و بررسی فعالیت سینتیکی انزیم های امیلاز و لیپاز." رساله کارشناسی ارشد.

۶- هادی زاده شیرازی , ن.. رنجبر,ب "جداسازی آنزیم لیپاز از باکتری Pseudomonas aeruginosa HR59 حاصل از عفونتهای سوختگی و بهینه سازی محیط کشت آن با استفاده از روش Box-Behnken."

7- Amoozegar MA, Salehghamari E, Khajeh K, Kabiri M, Naddaf S (2008). Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. J. Basic. Microbiol., 48(3): 160-167.

8- Dussault, H. (1955). "An improved technique for staining red halophilic bacteria." Journal of bacteriology **70**(4): 484.

9- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D. 2004.Lipases and their industrial applications: an overview. Appl. Biochem. Biotechnol. 118,
155–170.

10- Houde, A., et al. (2004). "Lipases and their industrial applications." Applied biochemistry and biotechnology **118**(1-3): 155-170.

11 - Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., *et al*. 1998. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures. Extremophiles. 2, 185–190.

12- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. 1998.Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends. Biotechnol . 16, 396–403.

13- Kumari, A., et al. (2009). "Statistical optimization of culture conditions by response surface methodology for synthesis of lipase with Enterobacter aerogenes." Brazilian Archives of Biology and Technology **52**(6): 1349-1356.

14- Khaw, J. F., et al. (1995). "Optimal design of neural networks using the Taguchi method." Neurocomputing **7**(3): 225-245.

15- Lv XY, Guo LZ, Song L, Fu Q, Zhao K, Li AX, Luo XL, Lu WD (2010). Purification and characterization of a novel extracellular carboxylesterase from the moderately halophilic bacterium *Thalassobacillus* sp. strain DF-E4. Ann. Microbiol., 61: 281-290.

16- Martin S, Marquez M, Sánchez-Porro C, Mellado E, Arahal D, Ventosa A (2003). *Marinobacter lipolyticus* sp. nov, novel moderate halophile with lipolytic activity. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol., 53: 1383-1387.

17- M.Dufour, C. B., G.Labonte (1993). "Application of Taguchi's Technique." Total Quality Research and Development, Quebec.

18- Montgomer, D. C. (1991). "Design and Analysis of Experiments".

19- Mrugesh K, Neepa P and Archana R.*(2012)* Effect of Medium and Environmental Parameters on Lipase Production from *Halomonas salina* Ku-10 / *Journal of Pharmacy Research 2012,5(7),3844-3847*

20- Nakajima, M., Snape, J., Khare, S.K. 2000. Method in non-aqueous enzymology, In: Gupta MN (ED.),Basel, Birkhauser Verlag. p. 52–69.

21- Rajan, M. 2004. Global market for industrial enzymes to reach $2.4 million by 2009 Business Communications Company, Inc. RC-147U Enzymes for Industrial Applications http://www.bccresearch.com/editors/RC- 147U.html.

22- Whitaker, J. R., et al. (2003). Handbook of food enzymology, Marcel Dekker.

23- Werasit K, Anan B,(2007Screening of Halophilic Lipase-Producing Bacteria and Characterization of Enzyme for Fish Sauce Quality Improvement) ,Kasetsart J. (Nat. Sci.) 41 : 576 - 585

24 - Xin Li and Hui-Ying Yu (2012) Characterization of a novel extracellular lipase from a halophilic isolate, *Chromohalobacter* sp. LY7-8
African Journal of Microbiology Research Vol. 6(14), pp. 3516-3522

25- Yeow Nam Ng, D. B., Khanh Luu (1995). "Taguchi methods." University Handout Notes for Computer Aided Engineering.

Optimization of lipase Enzyme production in the native strain Halophile Haloarchaea Isolated from Iran southern soil

Abstract

Archaea metabolites and enzymes widely used in various industries ,Because of the extremophiles nature and solidity And appropriate activities in the Hard industrial conditions. This study has been conducted According to the importance of lipolytic enzymes tolerance saline and alkaline conditions In the food, pharmaceutical and health Industry .Therefore Survey Influence Type and percent of substrate, percent of salt, pH, temperature and incubation time on the growth of Arkia strain Also Lipase Enzyme production was The aim of this study. Optimal conditions for strain growth and lipase enzyme production with a Taguchi method was concluded Respectively in the pH8 and 8, substrate 0.5 % & 1.5% ,time 6 and 7 day , salt 19% & 25% , temperature 45 ºC & 35 ºC in the presence of tween oil and sweet Almond oil as the sole carbon source. According to above results ,can use this strain in the tanning industry and extraction of oil.

Keywords: lipase ,*Haloarchaea* ,Taguchi, Optimization

*Author ,Phone:09122857394 ,E-mail: ahmadali pb@gmail.com