

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

انسیه صالح‌قمری^{۱*} و محمدعلی آموزگار^۲

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

^۱گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

^۲گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: esaleh@khu.ac.ir

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

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

Ensieh Salehghamari^{1*} & Mohammad Ali Amoozegar²

Received 01.03.2016/ Accepted 12.12.2016 /Published 18.03.2017

¹Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Science, University of Kharazmi, Tehran, Iran

²Department of Microbiology, School of Biology, University College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

Correspondent author: esaleh@khu.ac.ir

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

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

مقدمه

برای صنایع سخت که در آنها غلظت‌های بالای نمکی به غیرفعال شدن آنزیم‌ها منجر می‌شود، گزینه مناسبی باشند (Mohaparta et al., 1998; Gutiérrez-Arnillas et al., 2016). باکتری‌های نمک‌دوست نسبی گروهی از باکتری‌های نمک‌دوست هستند که در غلظت (w/v) ۵-۱۵ درصد کلرید سدیم قادر به رشدند (Babavalian et al., 2013). نمک‌دوست‌های نسبی شامل جنس‌هایی همچون *Halomonas*، *Salinibacter* و *Salini-vibrio* هستند که اخیراً در زمینه‌های فیزیولوژی، اکولوژی و ژنتیکی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Ventosa et al., 1998; Kumar et al., 2012). باوجود تولید آنزیم‌های مقاوم به

آنزیم لیپاز باکتریایی یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های هیدرولیتیک است و به‌طور گسترده‌ای از نظر آنزیم‌شناسی بررسی شده است. آنزیم‌های لیپولیتیک، که به‌طور عمده لیپازها و استرازها هستند، در صنایع غذایی، شوینده‌ها، صنایع لبنی، چرم‌سازی، داروسازی و شیمیایی به‌طور وسیعی کاربرد دارند (Gupta et al., 2002; Jaeger et al., 1999). یکی از مهم‌ترین منابع آنزیم‌های لیپاز باکتری‌ها هستند. در این میان جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک به یافتن آنزیم‌های مقاوم به غلظت‌های بالای نمک منجر می‌شود. این آنزیم‌ها می‌توانند

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

مواد و روش‌ها

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

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

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

تولید آنزیم لیپاز

آماده‌سازی تلقیح

پیش‌کشت باکتری در محیط BHI آگار، ۳۴ درجه سانتی-گراد، pH ۷/۲-۷/۴ و دور شیکر ۱۰۰rpm با درصد حجمی ۱ درصد از محلول ۵ مک فارلند کشت داده شد. محیط کشت تولید با کشت حدوداً ۶ ساعته ($A_{600nm} = 0.6$) از محیط پیش‌کشت به اندازه ۱ (v/v) درصد تلقیح شد.

محیط کشت تولید لیپاز

ترکیبات محیط تولید نیمه‌صنعتی لیپاز شامل (gr/l): ۲ پپتون، ۱/۵ پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات، ۰/۵۵ دی‌پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات، ۰/۵ سولفات آمونیوم، ۰/۰۵ سولفات منیزیم، ۰/۰۱ کلرید کلسیم، ۷/۲۴ کلرید سدیم، ۰/۵ عصاره مخمر و روغن زیتون (تهیه شده از شرکت سیگما) است که با ۱ درصد تلقیح از محیط پیش‌کشت به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس، محیط کشت در ۱۰۰۰g برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوسپانسیون رویی جهت سنجش لیپاز تحت بررسی قرار گرفت (Dalmau *et al.*, 2000).

بهینه‌سازی آنزیم و طراحی آزمایش

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

سنجش فعالیت آنزیم لیپاز

فعالیت هیدرولیتیک آنزیم در واکنشی شامل ۲/۳۲۵ ml از بافر بورات سدیم ۱۰۰ mM، pH ۷/۵ و ۲۵ μ l محلول *p*-NPB در ۲- پروپانول و ۰/۱ ml سوسپانسیون حاوی آنزیم لیپاز اندازه‌گیری شد. غلظت نهایی مواد به صورت ذیل بود: پیش‌ماده ۰/۱ mM، محلول آلی (v/v) ۱ درصد واکنش در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام گرفت. تغییرات جذب در ۴۱۰ nm اندازه‌گیری شد. این روش در برنامه Kinetic دستگاه اسپکتروسکوپی انجام شد و با داشتن ضریب جذب مولی (E) پارانیتروفنول ($18106 \text{ cm}^2/\text{mol}$) و مسیر عبور نور در کووت، غلظت پارا-

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

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

عامل	سطح ۱	سطح ۲
A	pH	۸
B	روغن زیتون	٪ ۱ (w/v)
C	دما	۳۵ درجه سانتی گراد
D	دور شیکر	۱۵۰ rpm
E	نمک	NaCl ۱ M

نیتروفنول تولید شده به دست آمد. یک واحد آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که $1 \mu\text{mol}$ پارانیتروفنول را در دقیقه تحت شرایط مشخص شده، آزاد نماید (Surinenite et al., 2002). نتایج به دست آمده برای سنجش فعالیت آنزیم لیپاز با واحد فعالیت آنزیم به ازاء کل پروتئین اندازه گیری شده (U/mg) بیان شده است.

نتایج

در این پژوهش از روش آماری تاگوچی به منزله یکی از پرکاربردترین روش‌های بهینه‌سازی برای تولید آنزیم لیپاز در باکتری نمک‌دوست نسبی *salinivibrio* sp. SA2 استفاده شد. با بررسی فاکتورهای مؤثر بر تولید آنزیم لیپاز در سویه SA-2، مشخص شد که پنج فاکتور نسبت به بقیه بیشترین تأثیر را دارند (Amoozgar et al., 2008). این پنج فاکتور شامل غلظت روغن زیتون، غلظت و نوع نمک (کلرید سدیم و کلرید پتاسیم)، pH، دما و دور شیکر بودند که در این آزمایش در دو سطح بررسی شدند. نتایج به دست آمده در جدول ۱ آمده است. اثر متقابل جفت متغیرهای مختلف بر میزان تولید آنزیم لیپاز، تعیین سهم نسبی هر فاکتور در فرآیند بهینه‌سازی به وسیله روش تحلیل واریانس، تعیین شرایط بهینه و در نهایت سنجش میزان تولید آنزیم در شرایط بهینه تحت بررسی قرار گرفت. جهت بررسی دوسطحی این فاکتورها و نیز مطالعه وجود میان‌کنش بین هر پنج فاکتور با یکدیگر از آرایه‌های متعامد L_{16} استفاده شد. ۱۶ آزمایش انجام شده به همراه فعالیت آنزیم در هر آزمایش در سوییچ مورد نظر در جدول ۲ آمده است. پس از انجام آزمایشات و به دست آمدن

فعالیت ویژه آنزیم، اثر اصلی هر فاکتور بدون در نظر گرفتن میان‌کنش بین آنها محاسبه شد (جدول ۳). با توجه به نتایج به دست آمده بیشترین تولید آنزیم لیپاز در pH ۸، دمای 35°C ، دور شیکر ۱۵۰ rpm، غلظت روغن زیتون ۲ درصد و نمک کلرید سدیم ۱ M به دست آمد. براساس این داده‌ها سه فاکتور pH، دور شیکر و نوع نمک تأثیر بیشتری در مقایسه با دو فاکتور دیگر در تولید آنزیم داشتند.

محاسبه میان‌کنش‌ها

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

تحلیل واریانس (ANOVA)

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

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

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

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

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

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

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

جدول ۴- ارزیابی اثر میان‌کنش بین جفت فاکتورهای آزمایش بر تولید آنزیم لیپاز در *Salinivibrio* sp. SA2**Table 4.** Evaluation of factor interaction affecting lipase production by *Salinivibrio* sp. SA2.

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

جدول ۵- تحلیل واریانس فاکتورها و میان‌کنش میان آنها در تولید آنزیم لیپاز در باکتری *Salinivibrio* sp. SA2**Table 5.** ANOVA and interactions of factors in lipid production by *Salinivibrio* sp. SA2.

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

بحث

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

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

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

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

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

سپاسگزاری

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

REFERENCES

- Amoozegar, M.A., Salehghamari, E., Khajeh, K., Kabiri, M. and Naddaf, S. 2008. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. – J. Basic Microb. 48: 160-167.
- Babavalian, H., Amoozegar, M.A., Pourbabaee, A.A., Moghaddam, M.M., and Shakeri, F. 2013. Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. – Microbiol. 82: 466-474.
- Dalmau, E., Montesinos J.L., Lotti M. and Casas C. 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. – Enz. Microbiol. Technol. 26: 657-663.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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