Archive of SID

فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۳، تابستان ۱۳۸۸

بهینه سازی تولید لیپاز توسط سویه های باسیلوس جدا شده از لجن فعال

فرزانه حسینی[1*] و رویا رضوی پور[2]

۱ - استادیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال(نویسنده مسئول) ۲ - کارشناس ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

آنزیم لیپاز، 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 لیپازی که توسط باکتری های ترموفیل و آلکالوفیل تولید می شود از نظر صنعتی از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا قابلیت هیدرولیز تری گلیسرید را در دمای بالا و شرایط قلیایی دارد. در این بررسی سویه باکتریایی مولد لیپاز از کشت لجن فعال فاضلاب شهری جداسازی و شناسایی گردید. سویه باکتریایی جدا شده در حضور اسید های چرب بعنوان تنها منبع کربن قادر به رشد بوده است. سپس تاثیر منابع مختلف کربن (روغن زیتون، روغن آفتاب گردان و روغن نارگیل) و نیتروژن آلی و معدنی (پپتون، عصاره مخمر، اوره، آسپارژین، نیترات آمونیوم و سولفات آمونیوم) بر روی تولید بهینه آنزیم لیپاز مورد ارزیابی قرار گرفت. بهترین فعالیت آنزیم لیپاز در حضور منبع کربن روغن زیتون و منابع نیتروژنی پپتون و عصاره مخمر در شرایط pH =۸/۵ و دما ی ۵۵ درجه سانتیگراد مشاهده گردید. جهت تخلیص آنزیم خام موجود در محیط کشت از روش های رسوب گذاری پروتئین توسط سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض یونی ستفاده شد. طی این مراحل محصول نهایی حدود ۳۰ برابر تخلیص گردید. وزن مولکولی محصول نهایی حدود ۳۱ کیلودالتون بصورت یک باند منفرد برروی ژل سدیم دودسیل سولفات – پلی اکریلامید ۱۰٪ دیده شد. محصول نهایی با فعالیت آنزیمی ۰/۵۸U/ml مشخص شد. این بررسی تولید آنزیم لیپاز باکتریایی از منابع قابل دسترس مانند لجن، با استفاده از روش های تخلیص و مقرون بصرفه را با میزان فعالیت مناسب نشان داد. این محصول می تواند بخوبی در خدمت صنایع مختلف کاربردی قرار بگیرد.

واژگان کلیدی: لیپاز، بهینه سازی، تخلیص، تولید.

مقدمه

امروزه لیپاز ها جایگاه مهمی در بین بیوکاتالیست ها دارند. قابلیت هیدرولیز تری گلیسرید ها به آن ها این امکان را داده است که در طیف وسیعی از سوبستراها مورد استفاده قرار گیرند. سوبسترای اصلی آنزیم لیپاز تری اسیل وگلیسرول های کم محلول در آب است. تحت شرایط طبیعی آنها پیوند های استری ما بین یک فاز سوبسترای غیرمحلول و فاز مایع را هیدرولیز می کنند. در غیاب آب، واکنش منجر به استریفیکاسیون و تشکیل گلیسریدها از اسیدهای چرب و گلیسرول می‌شود. لیپاز ها بطور اختصاصی به موقعیت ۱ یا ۳ کربن در گلیسرول حمله می کنند (۱). آنزیم لیپاز بطور وسیعی در طبیعت وجود دارد و در اغلب گونه های حیوانی، گیاهی، باکتریها، مخمرها و قارچ ها یافت می شود. آنزیم های بدست آمده

www.SID.ir

Archive of SID

از منبع باکتریایی بیشتر مورد توجه محققان بوده است زیرا کشت، غربالگری و مهندسی ژنتیک باکتری های مولد آسان تر از سایر موجودات می باشد. آنزیم خارج سلولی لیپاز توسط برخی از باکتریها بصورت گلیکوپروتئین و در برخی دیگر بصورت لیپوپروتئین تولید می شود (۲). تعداد کمی از لیپاز های باکتریایی نسبت به دمای بالا مقاومت دارند. در بین باکتری ها سویه های *Achromobacter* sp.، *Alcaligenes* sp.، *Arthrobacter* sp. و *Pseudomonas* sp. *Staphylococcus sp*. *Chromobacterium* sp. قادر به تولید لیپاز می باشند (۱). عوامل محیطی متعددی مانند دما، pH، حضور منابع کربن، نیتروژن و لیپید، دور همزن و میزان اکسیژن محلول در تولید لیپاز موثر شناخته شده اند. علاوه بر این حضور اسید های چرب آزاد، استر هایی با قابلیت هیدرولیز، نمک های صفراوی و گلیسرول از عوامل محرک تولید آنزیم می باشند(۳). قابلیت بیوکاتالیستی لیپاز های میکروبی در هر دو محیط آبی و غیر آبی و هم چنین مقاومت مناسب آن در محیط های قلیایی و دمای بالا منجر به کاربرد وسیع آن در صنایع تولیدی شوینده ها، مواد غذایی، داروسازی، چرم سازی، لبنیات، بیوفسیل و سنتز انواع ترکیبات چرب شده است (۴).

در این بررسی سویه باکتریایی وحشی مولد لیپاز از کشت لجن فعال جدا شد و پس از تعیین هویت، بهینه سازی شرایط تولید آن، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جداسازی باکتری های تولید کننده لیپاز از کشت لجن فعال:

سویه باکتریایی رشد یافته بر روی محیط Tween Agar حاوی اسید های چرب بعنوان تنها منبع کربن بترتیب در pH های ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵ و ۹ و دماهای ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، و ۵۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. بعد از غنی سازی و تهیه کشت خالص شرایط بهینه از نظر pH و دما تعیین گردید. برای تعیین هویت سویه های جداشده از آزمون های بیوشیمیایی سیستم باکتریولوژی Bergey استفاده شد (۵). از کشت خالص سویه ی جدا شده در ارلن مایر ml ۲۵۰ محتوی ml ۵۰ محیط کشت حاوی پپتون (۰/۵٪)، عصاره مخمر (۰/۵٪)، ($CaCl_2$ (۰/۰۰۵ ٪، روغن زیتون (۱٪) تلقیح گردید و در شرایط بهینه رشد یعنی pH= ۸/۵ ، دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و دور همزن rpm ۱۷۰ بمدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری انجام شد.

بررسی تاثیر منابع کربن مختلف از طریق جایگزینی روغن نارگیل، روغن خردل و روغن آفتاب گردان به جای روغن زیتون در محیط کشت پایه:

از منابع ازت آلی (عصاره مخمر، پپتون و اوره) و منابع ازت معدنی (نیترات آمونیوم، سولفات آمونیوم وآسپارژین) بصورت مجزا در مراحل جداگانه در محیط کشت به میزان (W/V) ۰/۵٪ استفاده گردید.

ارزیابی آنزیم:

ارزیابی تولید آنزیم با استفاده از روش امولسیون روغن زیتون انجام پذیرفت (۶). یک واحد فعالیت آنزیم لیپاز (U) مقدار آنزیمی است که یک میکرومول از اسید های چرب را در هر دقیقه تحت شرایط استاندارد آزمون، آزاد کند. روغن زیتون و محلول ۴٪ پلی وینیل الکل به نسبت ۱ به ۴ در شرایط rpm ۲۰۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند. به ml ۴ از امولسیون روغن، ml۵ بافر اسید استیک M ۰/۰۵۰ و ml ۱ نمونه آنزیم افزوده و در دمای ۴۰ درجه بمدت ۱۵ دقیقه گرمخانه گذاری شد. بعد از این مدت ml ۱۵ اتانل ۹۵٪ افزوده و میزان رهایی اسید های چرب با NaOH۰/۰۵ M تیتر گردید. نمونه آنزیم غیرفعال شده با حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد در ۱۵ دقیقه بعنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت (۶).

تخلیص آنزیم:

برای رسوب گذاری سولفات آمونیوم به میزان ۵۳ گرم به ازای هر میلی لیتر محیط، به نمونه افزوده شد. رسوب حاصله از طریق سانتریفوژ (g ۱۷۰۰۰ بمدت ۳۰ دقیقه) جمع آوری گردید و نمونه در مقابل بافر تریس _HCL ۰/۱ مولار بمدت یک شب دیالیز شد. مایع فیلتر شده از ستون سفارز-DEAE (طول ۱۴ و قطر ۲/۶ سانتیمتر) عبور داده شد. برای شستشوی ستون از بافر x ۱ تریس استفاده شد. در هر یک از مراحل تخلیص میزان فعالیت آنزیم ارزیابی گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین وزن مولکولی و درجه خلوص نمونه:

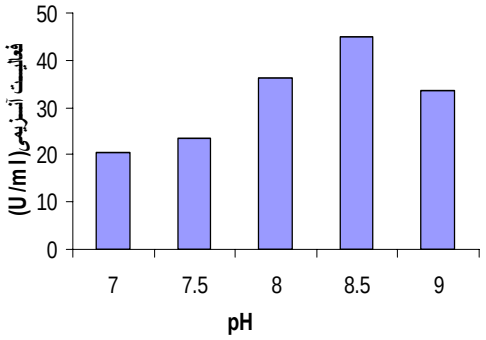
برای این منظور از روش الکتروفورز بر روی ژل سدیم دودسیل سولفات – پلی اکریلامید ۱۰٪ استفاده شد.

جدول ۱. تاثیر منابع کربن بر روی میزان فعالیت آنزیم لیپاز در محیط کشت باسیلوس کواگولانس

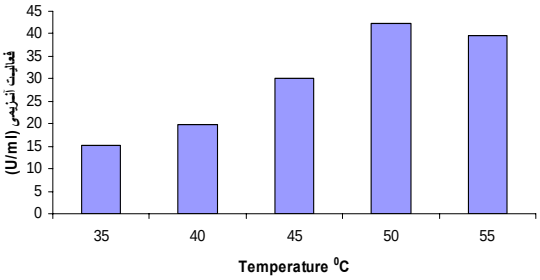
منابع کربن	فعالیت لیپاز(U/ml)
روغن زیتون	۰/۲۶
روغن نارگیل	۰/۱۵
روغن آفتاب گردان	۰/۱۸

جدول ۲. تاثیر منابع نیتروژنی بر روی میزان فعالیت آنزیم لیپاز در محیط کشت باسیلوس کو اگیولانس

منابع نیتروژن	فعالیت لیپاز(U/ml)
عصاره مخمر	۰/۲۱
پپتون	۰
اوره	۰/۰۹
نیترات آمونیوم	۰/۲۱
سولفات آمونیوم	۰/۳۸
عصاره مخمر و پپتون	۰/۵۸
آسپارژین	۰/۱۲



شکل۱. میزان pH بهینه و فعالیت آنزیمی نمونه خام که در بافر ۵۰°C درجه اندازه گیری شده است.



شکل ۲. میزان دمای بهینه و فعالیت آنزیمی نمونه خام که در بافر pH= ۸/۵ اندازه گیری شده است.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از این بررسی نشان دادند که سویه ی باکتریایی تولید کننده لیپاز جدا شده از کشت لجن فعال متعلق به *Bacillus coagulance* بوده است. این سویه در محیط کشت حاوی روغن زیتون به عنوان تنها منبع کربن در شرایط pH= ۸/۵ و دمای ۵۰ درجه بخوبی رشد نمود (شکل های ۱و ۲). اولین لیپاز های آنزیم های خارج سلولی مقاوم به دما از باسیلوس کواگولانس گزارش شده است (۷). گزارشات محققان از لیپاز های مقاوم به حرارت حاکی از فعالیت آنها در pH ۹ الی ۱۰ را دارد (۳ و ۲).

جدول ۳. مراحل تخلیص لیپاز باسیلوس کواگولانس

مراحل تخلیص	فعالیت کل(U)	پروتئین کل(mg)	فعالیت ویژه (U/mg)	میزان تخلیص(٪)
لیپاز خام	۳۲/۱۸	۲۶۵	۰/۱۲۲	۱
ترسیب با سولفات آمونیوم	۱۴/۳	۵/۲۰	۲/۷۵	۱۱
دیالیز با بافر تریس	۱۲/۱۱	۰/۳۴	۳/۵۶	۲۶
کروماتوگرافی تعویض یونی	۰/۹۶	۰/۱۶۴	۵/۸۵	۳۰

با استفاده از منبع کربن لیپیدی مانند روغن ها، اسید های چرب یا Tween ها در حضور منبع نیتروژن آلی و یا معدنی، لیپاز تولید می شود. Thomas و همکارانش در سال ۲۰۰۳ روغن زیتون را بهترین منبع کربن برای تولید لیپاز از سویه های *Bacillus mycoides* در دمای ۲۸ درجه معرفی نمودند (۸). Satyendra Kumar و همکارانش در سال ۲۰۰۵ از *Bacillus coagulance* در pH ۸ آنزیم لیپاز را تخلیص نمودند. طبق گزارشات بهترین نتیجه از منابع کربن روغن زیتون و روغن خردل بدست آمد (۷). طبق گزارشات Abdel- Naby در سال ۱۹۹۷ منبع نیتروژن غیر آلی موثر تر از منبع آلی آن نمی باشد.

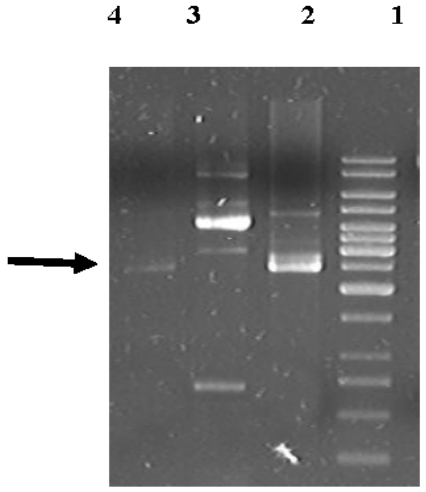
این محققان با ترکیب پپتون و سولفات آمونیوم آنزیمی با فعالیت بالاتر تهیه کردند (۹). Sangeetha و همکارانش در سال ۲۰۰۷ از فاضلاب صنعتی سویه *Bacillus pumilus* را جدا نمودند و آنزیم لیپاز مزوفیل را با فعالیت U/ml ۵۲ در pH=۹ بدست آوردند. این محققان از tween، پپتون، کازئین و ژلاتین بعنوان منابع کربن و نیتروژن در محیط کشت استفاده نمودند

www.SID.ir

Archive of SID

(۱۰). Limon Bora در سال ۲۰۰۷ بعد از ۲۰ ساعت گرمخانه گذاری سویه های باسیلوس در محیط حاوی عصاره Beef، آنزیمی با فعالیت U/ml ۶/۹ بدست آورد (۱۱). در این بررسی بیشترین فعالیت آنزیم در حضور روغن زیتون بعنوان منبع کربن مشاهده گردید (جدول۱). نتایج حاکی از دو برابر افزایش فعالیت محصول با این منبع کربنی می باشد. در بین منابع نیتروژن آلی بیشترین فعالیت آنزیم معادل U/ml ۰/۵۸ در محیط کشت حاوی پپتون و عصاره مخمر دیده شد (جدول۲). طبق گزارشات محققان نیز پپتون و عصاره مخمر بهترین انتخاب بعنوان منبع نیتروژن برای تولید لیپاز می باشند (۱۲). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که محصول پروتئینی بعد از عبور کروماتوگرافی تعویض یونی حدود ۳۰ برابر خالص تر شده است (جدول۳). برخلاف باسیلوس های مزوفیلیک که لیپاز با وزن مولکولی بالا حدود KDa ۱۱۲ تولید می کنند (۱۳)، وزن مولکولی محصول پروتئینی تخلیص شده در این بررسی حدود ۳۱ کیلو دالتون بدست آمد که در حدود لیپاز باکتری های *S. hyicus* و *S.aureus* با وزن مولکولی حدود ۳۴-۴۶ کیلودالتون می باشد (۱۴). مشاهدات این بررسی با نتایج Satyendra Kumar مطابقت دارد. وی و همکارانش آنزیمی با ۴۰ برابرخلوص و وزن مولکولی ۳۱ کیلودالتون بدست آوردند (۷).

آنزیم لیپاز ترموفیل و آلکالی فیل که از منبع باکتریایی و قابل دسترس مانند لجن فعال فاضلاب خانگی تهیه می شود می تواند برای کاربرد های صنعتی و غذایی بخوبی مورد استفاده قرار بگیرد. هم چنین در این بررسی مراحل بکار رفته برای تخلیص آنزیم در مقایسه با گزارشات سایر محققان کوتاه و مقرون بصرفه بوده است (۱۶،۱۵). از این آنزیم می توان در واکنش های استریفیکاسیون و ترانس استریفیکاسیون برای سنتز برخی استرهای تیمارهای صنعتی غنی از چربی استفاده نمود.



شکل۳. الکتروفورز آنزیم لیپاز خالص بر روی ژل۱۰٪ SDS_PAGE طی مراحل تخلیص، خط۱: مارکر پروتئینی به ترتیب با وزن مولکولی ۲۰۰، ۱۰۰، ۸۵، ۶۵، ۵۵، ۴۵،۳۵، ۳۱، ۲۵، ۲۰، ۱۵ و ۵ خط۲ : نمونه خام، خط۳: نمونه بعد از رسوب گذاری با سولفات آمونیوم، خط ۴: باند ۳۱ کیلو دالتون متعلق به پروتئین لیپاز از سویه ی باسیلوس کواگولانس که با فلش مشخص شده است.

تشکر و قدر دانی

بدین وسیله از تلاش های همکار بسیار محترم سرکار خانم مهندس هادوی که در جهت فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی کمک و همراهی فرمودند کمال تشکر و قدردانی را می نماییم.

منابع:

1- Jaeger K.E; Eggert T, (2002). Lipases for biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. **13:** 390-397.
2- Kim M.H; Kim H.K; Lee J.K, (2000). Thermostable lipases of *Bacillus stearothermophilus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **64:** 280-286.
3- Axena S.R.K;GhoshP.K;Gupta Rani; Sheba Davidson W;Bradoo S; Gulati R,(1999). Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. Ci. Sci. **77:** 101-105.
4- Mustranta A; Forssell P; Poutanen K, (1995). Comparison of lipases and phospholipases in the hydrolysis of phospholipids. Process Biochem. **30**:393–401.
5- Bergy; Noel.R.Krig; John.G.Holt, (2004). Systematic bacteriology. Lippincott William and Wilkins, Baltimore, USA. Vol.1-4.
6- Yang J.G, (2006). Degumming of Vegetable Oil by a New Microbial Lipase. Food Technol. Biotechnol. **44** (1): 101–104.

www.SID.ir

Archive of SID

7- Satyendra Kumar; Khyodano Kikon; Ashutosh Upadhyay; Shamsher S.Kanwar; Reena Gupta, (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic Bacillus coagulans BTS-3. Protein Exp. Purification. **41**: 38–44.

8- Thomas Achamma; Mathew Manoj; Valsa A.K; Mohan S; Manjula R, (2003). Optimisation of growth conditions for the production of extracellular lipase by *Bacillus mycoides*. Ind.J. microbiol. **43**: 67 – 69.

9- Abdel-Naby; Ismail, A.M.S; Ahmed S; Abdel Fattah F, (1997). Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. Biores tech. **64:** 205-210.

10- Sangeetha R; Phil M, (2008). Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated .The Internet Journal of Microbiology. **5** (2):215-222.

11- Limpon Bora M; Kalita C, (2007). Production and Optimization of Thermostable lipase from a Thermophilic Bacillus sp LBN 4. The Internet Journal of Microbiology. **4**: 304-320.

12- Banerjee U.C; Rajesh kumar Sani; Wamik Azmi; Raman Soni, (1999). Thermostable alkaline protease from Bacillus brevis and its characterization as a laundry detergent additive.Proc. Biochem. **35:** 213-219.

13- Mohammed A.Eltaweel; Raja Noor Abdul Rahman; Abu Baker Salleh; Ahiran Basri, (2005). An organic solvent-stable lipase from Bacillus sp. strain 42. Annal. Microbial. **55:** 187-192.

14- Winter B.H; Titze K; Marschner V, (1998). Application of phospholipases in the edible oil industry.Fett. Lipid. **100:** 152–156.

15- Patel R; Mital Dodia; Satya P, (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic Bacillus sp.: Production and optimization. Proc. Biochem. **40:** 3569-3575.

16- Benjamin S; Ashok Pandey, (1995). Optimization of liquid media for lipase production by Candida rugosa. Bioresource technol. **55:** 167-170.

www.SID.ir