

جداسازی آنزیم لیپاز از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* HR59 حاصل از عفونت‌های

## سوختگی و بهینه‌سازی محیط کشت آن با استفاده از روش Box-Behnken

نجمه هادی زاده شیرازی<sup>۱</sup>، بیژن رنجبر\*<sup>۱</sup> و خسرو خواجه<sup>۲</sup><sup>۱</sup>تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک<sup>۲</sup>تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۸

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۲۲

## چکیده

با توجه به کاربرد فراوان آنزیم‌های لیپولیتیک بخصوص لیپاز باکتریایی در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی از یک طرف و قیمت بالای آن از طرف دیگر، جهت رفع مشکل تولید آنزیم لیپاز باکتریایی، تولید این آنزیم از یک منبع در دسترس و ارزان قیمت مورد بررسی قرار گرفته است. برای این منظور سوش جدید *Pseudomonas aeruginosa* HR59 از عفونت سوختگی جداسازی و شرایط کشت آن با استفاده از روش سطح پاسخ برای چهار فاکتور غلظت کلسیم، غلظت توئین-۸۰، غلظت روغن زیتون و زمان آنکوباسیون بهینه‌سازی شده است. نتایج حاصل از این روش آماری نشان داده است که زمان آنکوباسیون بیشترین تأثیر و غلظت روغن زیتون کمترین تأثیر مثبت را بر ترشح آنزیم دارند. در نتیجه اعمال شرایط بهینه شده در محیط کشت باکتری (۳ میلی مولار کلسیم، ۱.۵ V/V، روغن زیتون، ۰.۴ V/V، توئین-۸۰ و ۷۲ ساعت آنکوباسیون)، ترشح آنزیم به حداکثر مقدار خود می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: لیپاز باکتریایی، عفونت سوختگی، بهینه‌سازی محیط کشت، روش آماری سطح پاسخ، Box- Behnken Design (BBD)

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۲۸۸۲۰۰۵، پست الکترونیکی: ranjbarb@modares.ac.ir

## مقدمه

(۳۳). بسیاری از ارگانیزمها 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 آنزیمی به کوفاکتور نیازی ندارند، (۳) محدوده وسیعی از سوبستراها را پوشش می‌دهند و (۴) انتخابگری فضایی (Enantio selectivity) خوبی دارند (۲۲). صنایع مختلفی قابلیت استفاده از لیپازهای باکتریایی را دارند که از آن جمله می‌توان به صنایع تولید لوازم آرایشی، تولید دارو، مواد غذایی و نیز شوینده‌ها اشاره کرد (۱۸، ۱۹، ۳۲، ۳۴). با توجه به اهمیت فراوانی که این نوع آنزیم در صنایع

آنزیم لیپاز یکی از انواع آنزیمهای محلول در آب است که هیدرولیز پیوندهای استری را در سوبستراهای لیپیدی انجام می‌دهد (۲۰). این آنزیمها قادرند پیوندهای استری موجود در تری اسیل گلیسرولها را شکسته و آنها را به اسیدهای چرب و گلیسرول تبدیل می‌کند به همین دلیل آنها را نوعی استراز می‌دانند. تنها تفاوت آنها با استرازها آن است که لیپازها قادرند سوبستراهای بلند زنجیر را نیز هیدرولیز نمایند. از لحاظ عملکردی آنزیمهای لیپاز سوبستراهای متنوعی داشته و به علاوه انتخابگری فضایی خوبی را از خود نشان می‌دهند (۲۵، ۲۴، ۲۲، ۲۱، ۲۰، ۳۹).

روش سطح پاسخ یا RSM (Response Surface Methodology) استفاده می‌شود. با استفاده از این روش تعداد کمتری آزمایش مورد نیاز بوده و برای سیستم‌های چند فاکتوری نیز مفید است. در این روش رابطه میان فاکتورهای گوناگون نیز در نظر گرفته می‌شود (۷). در این حالت، اثرات خطی و یا درجه دوم متغیرهای مورد آزمایش، نمودارهای کانتور یا نقشه‌های توپوگرافی و مدل مناسب را خواهند ساخت. به این ترتیب تعیین مقادیر مناسب از هر متغیر و نیز درجه اهمیت هر کدام از آنها به سادگی قابل تعیین و پیش‌بینی است (۸).

RSM خود انواع گوناگونی دارد و به صورتهای مختلفی می‌توان از این روش آماری استفاده کرد. یکی از انواع آن، روش Box-Behnken (BBD) است که یک طراحی درجه دو بر اساس طراحی فاکتوریل ناقص سه سطحی است (۵). این روش می‌تواند مقدار پارامترها را در یک مدل درجه دوم تخمین زده، طرحیهای مورد نیاز را ساخته و مقدار پارامتر عدم تطابق را محاسبه کند (۱۲). مقایسه بین طراحی‌های BBD و سایر طراحیهای سطح پاسخ (طراحی مرکب مرکزی و یا فاکتوریل کامل) نشان می‌دهد که BBD از هر دو روش طراحی مرکب مرکزی و فاکتوریل کامل بسیار کارآمدتر است (۱۲).

از آنجاییکه عفونتهای سوختگی، منبعی غیرمعمول و در عین حال ارزان قیمت برای تولید لیپاز باکتریایی است، در این تحقیق به منظور تولید آنزیم از باکتریهای بیمارستانی و نزدیک شدن به ترکیب مناسبی برای محیط کشت اصلی باکتری از روش طراحی Box-Behnken استفاده گردید. این روشهای آماری می‌توانند جزء مراحل اولیه هر تحقیق باشد. هدف آنها تمرکز روی متغیرهای مهم و یافتن مؤثرترین متغیرها در تحقیق می‌باشد.

#### مواد و روشها

گوناگون دارد تولید آن ضروری و مهم است اما به صورت طبیعی باکتری توانایی اندکی برای تولید آنزیم دارد از این رو باید با استفاده از روشهایی مانند تغییر در حلالها، مهندسی پروتئین و یا روشهای مولکولی توانایی تولید این آنزیم را افزایش داد (۲۳،۳۵). علاوه بر این 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، یونها فلزی و میزان هوادهی قرار می‌گیرند (۶،۲۰،۲۷). در میان این فاکتورها، وجود منابع کربنی، و نیز القاء کننده‌های روغنی از اهمیت بیشتری برخوردارند (۳۱). آنزیمهای لیپاز باکتریایی به خوبی در حضور منابع روغنی نظیر روغن، نوئین، نمکهای صفاوی و گلیسرول از باکتری ترشح می‌شوند (۴،۱۱،۱۳،۳۷). از نظر باکتری‌شناسی، لیپاز در فاز لگاریتمی از مراحل رشد باکتری ترشح می‌شود به همین دلیل دوره زمانی ترشح آن بین چند ساعت تا چند روز متغیر است (۱۶). با توجه به مطالب فوق، ساختار محیط کشت می‌تواند 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 می‌رسد 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 می‌باشد (۲۶). روش عمومی برای طراحی یک محیط کشت بهینه، تغییر غلظت اجزاء تشکیل دهنده آن به صورت مجزا یا روش یک عامل در یک زمان است. با این روش تنها می‌توان غلظت مناسب برای هر فاکتور را به صورت مجزا به دست آورد اما این حقیقت که عوامل محیطی گوناگون می‌توانند در ترکیب با یکدیگر اثرات یکدیگر را تشدید و یا خنثی کنند در نظر گرفته نمی‌شود (۳۷). امروزه برای رفع این مشکل از روشهای آماری و مهندسی محیط کشت مانند

می یابد (۳۹ و ۱۰). توالی های بین المللی مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از:

Universal forward primer: (5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG\_3')

Universal reverse primer: (5'-GGC/T TAC CTTGTT ACG ACT T\_3')

تولی تکثیر یافته با کمک کیت تخلیص DNA فرمتاز خالص سازی و توالی آن توسط SEQ-LAB (آلمان) بر روی هر دو رشته توالی، تعیین شده است. رابطه فیلوژنیک این سوش جدید بر این حقیقت تأکید دارد که این باکتری از خانواده *Pseudomonas aeruginosa* می باشد  
 HR59 16S توالی (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank)  
 rDNA در Gen Bank با شماره بازیابی HQ424906 قابل دسترسی است.

**تخلیص جزئی:** باکتری HR59 در محیط کشت اصلی، در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و هوادهی RPM ۱۸۰ کشت داده شد. محیط کشت خام پس از سانتریفیوژ، با سولفات آمونیوم (۶۰ درصد اشباع) رسوب دهی شده است و رسوب حاصل در حداقل بافر ۲۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک (pH ۸/۰) حل و با همین بافر نیز دیالیز شده است. تمام مراحل فوق در دمای ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفته است.

**سنجش فعالیت آنزیم:** پارانیتروفنل پالمیتات (PNPP) (محلول در ایزوپروپانول) سوسترای مناسبی برای تعیین فعالیت آنزیم لپاز در محلول سنجش فعالیت ( Assay solution ) می باشد (۴۰). فعالیت آنزیم موجب افزایش جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر ( زرد رنگ) می شود که به دلیل آزاد سازی پارانیتروفنل در نتیجه فعالیت آنزیم است. محلول سنجش فعالیت شامل ۲۰ میلی مولار بافر تریس - اسید کلریدریک، ۱۰ درصد تریتون X-100 و ۲۰ میلی مولار PNPP است. برای آغاز واکنش، ۲۰ میکرولیتر لپاز ناخالص به محلول سنجش با حجم نهایی یک میلی

**مواد و باکتری مورد استفاده:** باکتری *Pseudomonas aeruginosa* مورد استفاده در این تحقیق از آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شده است. نوترینت بروث به عنوان پایه محیط کشت از شرکت Liofilchem (ایتالیا) و سایر مواد مورد نیاز شامل رودامین B ، تریتون X-100، پارانیتروفنل پالمیتات (PNPP)، سولفات آمونیوم و توین-۸۰ از کمپانی مرک (آلمان) خریداری شده است. بافر استفاده شده برای اندازه گیری فعالیت آنزیم و خالص سازی جزئی آنزیم ۲۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک (pH ۸/۶) است.

**شناسایی باکتری مولد لپاز:** مشاهده فلورسانس نارنجی از کلنیهای ترشح کننده لپاز در محیط کشت حاوی رودامین B و روغن زیتون به عنوان سوستر، روش تشخیصی مناسبی برای شناسایی لپاز باکتریایی است (۳۰). برای این منظور، ۱ درصد حجمی/حجمی رودامین B و ۲/۵ درصد حجمی/حجمی روغن زیتون به محیط کشت اصلی (۸ گرم/لیتر نوترینت براث، ۴ گرم/لیتر کلرید سدیم و ۱۰ گرم/لیتر آگار) اضافه شده است. در نتیجه ترشح آنزیم از باکتری و فعالیت آن در محیط کشت، روغن زیتون به واحدهای کوچکتر تجزیه شده و اسید چرب حاصل از این فعالیت به رودامین B متصل خواهد شد. پس از ۱۷ ساعت، کمپلکس حاصل، در برخورد با پرتوهای فرابنفش ( با طول موج ۳۵۰ نانومتر) از خود فلورسانس نارنجی نشان خواهد داد (۳۸). در این مطالعه از این پدیده برای شناسایی باکتریهای مولد لپاز استفاده شده است.

**تعیین سوش باکتری:** رابطه فیلوژنیک، بر اساس مطالعه توالی rDNA 16S انجام شده است (۲). برای تهیه DNA ژنومی باکتری HR59 *Pseudomonas aeruginosa* از کیت استخراج DNA کیاژن (آمریکا) استفاده شده است. در این روش با استفاده از توالیهای بین المللی مناسب برای *Pseudomonas aeruginosa* تنها ژن rDNA 16S تکثیر

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4$$

معادله (۱)

که در آن  $Y$  پاسخ پیشگویی شده،  $\beta_0$  ثابت مدل،  $X_1, X_2, X_3$

و  $X_4$  متغیرهای مستقل،  $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$  ضرایب خطی و  $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$  ضرایب درجه دو هستند.

برای آنالیز رگرسیون و ترسیم نمودارها از نرم افزار Design-Expert Software (V. 8.0.4 Trail, 2010) استفاده شده است. مقدار و غلظت بهینه متغیرهای فوق با کمک بررسی نمودارهای کانتور تعیین شده است. آنالیز آماری مدل به شکل آنالیز واریانس داده ها (ANOVA) نشان داده شده است.

جدول ۱- جدول سطوح و کد انتخابی مربوط به کلسیم، روغن زیتون، توئین-۸۰ و زمان آنکوباسیون استفاده شده برای طراحی آزمایش

Box-Behnken

فاکتورهای مستقل	فاکتور	واحد	سطوح کد گذاری شده		
			-۱	۰	۱
کلسیم	$X_1$	mM	۱/۵	۲/۲۵	۳
روغن زیتون	$X_2$	% V/V	۱/۲۵	۱/۸۷	۲/۵
Tween-80	$X_3$	% V/V	۰/۲	۰/۳	۰/۴
زمان آنکوباسیون	$X_4$	h	۲۴	۴۸	۷۲

### بحث و نتیجه گیری

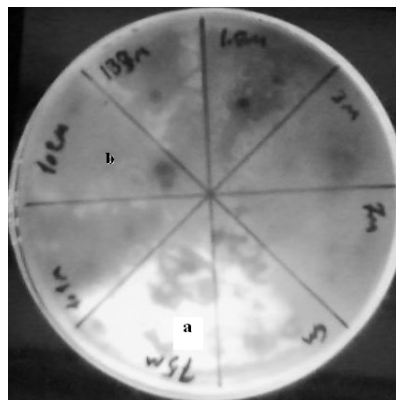
شناسایی باکتری مولد لیپاز: همان طور که قبلاً گفته شد، در نتیجه فعالیت آنزیم در پلیتهای رودامین B دار، فلورسانس نارنجی در اطراف کلن‌ها دیده می‌شود (۳۸). بنابراین در اولین مرحله، ۹۱ نمونه باکتری سودوموناس آئروژینوزا از عفونت‌های سوختگی جدا شده که در میان این نمونه‌ها ۴۸ نمونه فعالیت لیپازی را از خود نشان می‌دادند (تصویر ۱).

لیتر اضافه شده و در دمای اطاق تغییرات جذب آن در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شده است. مقدار آنزیمی که در یک دقیقه یک میکرومول PNP (پارا نیترو فنل) تولید کند دارای یک واحد فعالیت آنزیمی است.

طراحی آزمایش و بهینه‌سازی: روش سطح پاسخ شامل مجموعه‌ای از آزمایش‌ها است که رابطه میان فاکتورهای مورد آزمایش را ارزیابی کرده و پاسخ حاصل را اندازه‌گیری می‌کند (۴۱). مطالعات نشان داده است که عوامل گوناگونی می‌تواند بر رشد باکتری و ترشح آنزیم مؤثر باشد که از آن جمله می‌توان به وجود القاء کننده‌هایی مانند سورفکتانتها، سوبستراهای بلند زنجیر و یونهای فلزی اشاره نمود (۱۴). قبلاً با استفاده از روش تک متغیر مقدار و غلظت مؤثر عوامل گوناگون برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* HR59 اندازه‌گیری شده است. در میان فاکتورهای مختلف گلیسرول، روغن زیتون، روغن افتابگردان، توئین-۸۰، منیزیم، کلسیم و زمانهای آنکوباسیون مختلف، چهار فاکتور یون کلسیم، روغن زیتون، توئین-۸۰ و زمان آنکوباسیون بیشتر از سایرین بر ترشح آنزیم مؤثر بوده‌اند. در مرحله بعد از روش Box-Behnken برای مطالعه اثر چهار جزء مؤثر در محیط کشت استفاده شده است. آزمایش‌ها در ارلنهای ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ سی سی محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با هوادهی RPM ۱۸۰ کشت داده شده‌اند. طراحی فاکتوریل ۳-سطح-۴ فاکتور Box-Behnken با ۵ تکرار در نقطه مرکزی برای تعیین پاسخ سطح درجه دو مورد استفاده قرار گرفته است. آنالیز رگرسیون برای ارزیابی دقت و صحت نتایج حاصل انجام شده است. برای این منظور، فعالیت آنزیم به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ (Y) در نظر گرفته شده است. بر اساس نتایج این روش، یک مدل چندجمله‌ای درجه دوم برای پیشگویی پاسخ در نظر گرفته شده است. مدل پیشنهادی برای هر پاسخ (Y) به صورت معادله ۱ بوده است:

مولکولهای RNA ریبوزومی نقش به‌سزایی در تولید و سنتز پروتئینهای باکتری داشته و در تمام ارگانیزمهای زنده حفظ شده‌اند و توالی آنها برای طبقه‌بندی فیلوژنیک باکتریها به خوبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به همین منظور قطعه 16S rDNA باکتری تکثیر یافته و توالی آن تعیین شده است. طول این قطعه تکثیر یافته ۱۳۷۴ جفت باز است. توالیهای 16S rDNA برای جنس سودوموناس با کمک سایت اینترنتی NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) تهیه شده و با نرم افزار Clustal W (version 1.82) با یکدیگر مقایسه شده‌اند. درخت فیلوژنیک با استفاده از روش نزدیکترین همسایگی رسم شده است. مقایسه چندگانه توالیها و نیز درخت فیلوژنیک نشان داده است که سوش HR59 به جنس سودوموناس تعلق داشته و ۹۹٪ تشابه توالی با 16S rDNA سودوموناس آئروژینوزا دارد (تصویر ۲).

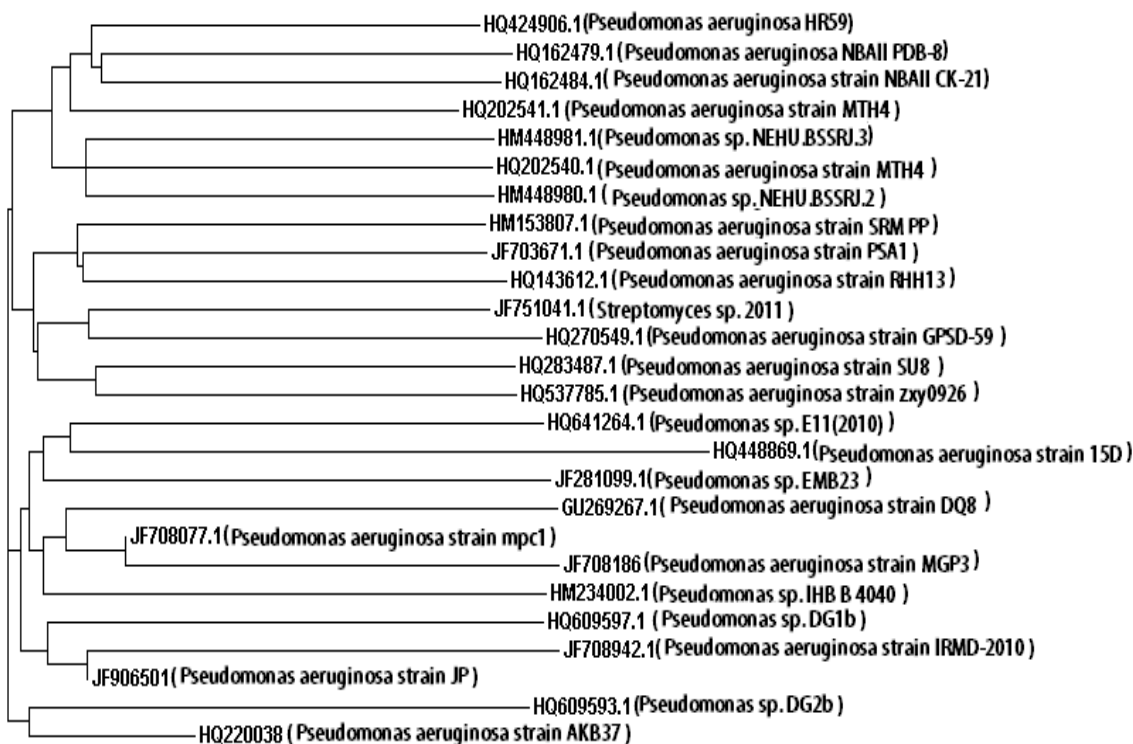


تصویر ۱- (a) نشر نور فلورسانس در نتیجه فعالیت لیپازی توسط باکتری. (b) نمونه بدون فعالیت لیپازی

برای ادامه تحقیق، یک نمونه که فعالیت لیپازی بهتری از خود نشان می‌داد، انتخاب شده است.

#### شناسایی سوش *Pseudomonas aeruginosa* HR59 :

سوش جداسازی شده HR59 یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل و هوازی است. بر اساس روشهای باکتری‌شناسی (۱۵)، این سوش به جنس سودوموناس متعلق است.



تصویر ۲- رسم درخت فیلوژنتیکی توالی ریبوزومی 16srDNA باکتری *Pseudomonas aeruginosa* HR59 با استفاده از نرم افزار ClustalW

**طراحی و انطباق مدل (fitting the model):** نتایج اولیه در این تحقیق نشان داده است که توئین- ۸۰، روغن زیتون، یون کلسیم و زمان انکوباسیون ترشح انزیم را افزایش می‌دهد. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، مقدار این فاکتورها به صورت سه کد -۱، ۰ و ۱ و جدول ۲- جدول طراحی Box-Behnken همراه با پاسخهای اندازه‌گیری شده و پیشگویی شده. در این طراحی، فعالیت انزیم به عنوان پاسخ در نظر گرفته شده است.

Run	Factor X <sub>1</sub>	Factor X <sub>2</sub>	Factor X <sub>3</sub>	Factor X <sub>4</sub>	پاسخ حقیقی A (U/ml)	A پاسخ پیشگویی شده (U/ml)
۱	-۱	۰	۰	۱	۱۷/۶	۱۷/۶
۲	۰	۰	۰	۰	۱۰/۱	۹/۷
۳	۰	۰	۰	۰	۱۰	۹/۷
۴	۱	۱	۰	۰	۱۱/۵	۱۱/۱
۵	۱	۰	۰	۱	۲۵/۶	۲۵/۵
۶	۱	۱	۱	۰	۱۰/۲	۹/۷
۷	۱	۰	-۱	۰	۱۲/۱	۱۲/۷
۸	-۱	۰	-۱	۰	۵/۲	۵/۱
۹	۱	۰	۱	۰	۱۷/۳	۱۸/۱
۱۰	۱	-۱	۰	۰	۱۹/۲	۱۸/۲
۱۱	۰	-۱	۱	۰	۱۴/۷	۱۴/۸
۱۲	۰	-۱	۰	-۱	۳/۷	۳/۸
۱۳	۰	-۱	۰	۱	۲۶/۱	۲۶/۸
۱۴	۱	۰	۰	-۱	۱۱/۲	۱۰/۹
۱۵	۰	۱	۰	-۱	۹/۵	۹/۶
۱۶	۰	۱	۰	۱	۱۳/۷	۱۴/۳
۱۷	۰	۰	۱	۱	۲۶/۳	۲۵/۴
۱۸	۰	۱	۱	۰	۱۳/۲	۱۲/۸
۱۹	-۱	۰	۱	۰	۱۱/۳	۱۱/۴
۲۰	۰	۰	۰	۰	۷/۴	۹/۷
۲۱	۱	-۱	۰	۰	۷/۴	۷/۷
۲۲	۰	۰	-۱	۱	۱۷/۹	۱۷/۳
۲۳	۰	۰	-۱	-۱	۵/۶	۵/۷
۲۴	۰	-۱	-۱	۰	۱۰/۲	۱۰
۲۵	-۱	۰	۰	-۱	۴/۸	۴/۵
۲۶	۰	۰	۰	۰	۸/۴	۹/۷
۲۷	۰	۰	۱	-۱	۹/۴	۹/۳
۲۸	۰	۱	-۱	۰	۶/۱	۵/۶
۲۹	۱	-۱	۰	۰	۷/۶	۷/۳

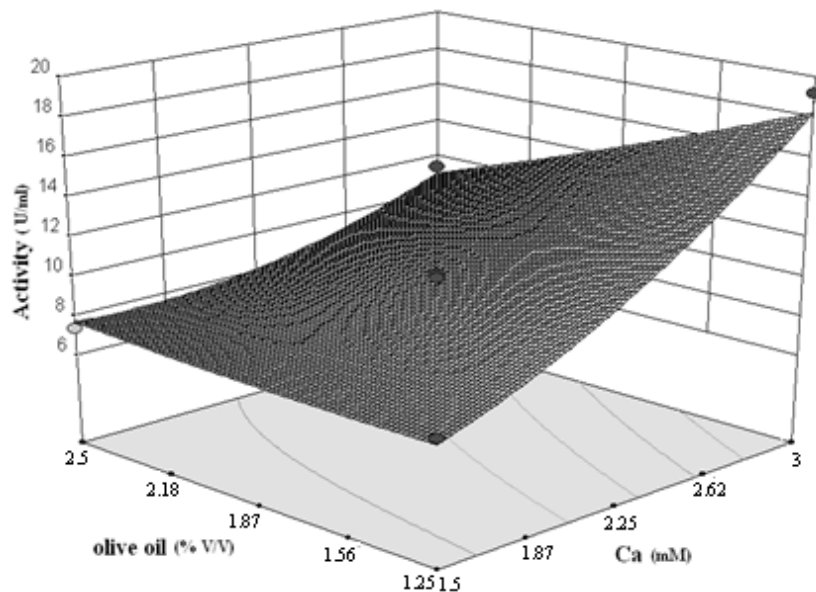
مدل، ۱۴۲/۹۵ بوده که نشان می‌دهد مدل کاملاً معنی‌دار است. در این حالت تنها ۰/۰۱ درصد احتمال خطا برای مدل وجود خواهد داشت. در این معادله، پارامترهای خطی شامل غلظت یون کلسیم ( $X_1$ )، غلظت روغن زیتون ( $X_2$ )، غلظت توئین-۸۰ ( $X_3$ ) و زمان انکوباسیون ( $X_4$ ) و پارامترهای درجه دو  $X_1^2$ ،  $X_3^2$  و  $X_4^2$  به همراه پارامترهای میانکنش غلظتهای کلسیم و روغن زیتون ( $X_1X_2$ )، غلظت روغن زیتون و زمان انکوباسیون ( $X_2X_4$ ) و غلظت توئین-۸۰ و زمان انکوباسیون ( $X_3X_4$ )، پارامترهای شاخص مدل هستند. نتایج نشان داده است که هر چهار فاکتور مستقل اثرات چشمگیری بر میزان فعالیت آنزیم دارند. محاسبه عدم تطابق، می‌تواند دلیل خوبی برای صحت داده‌های مدل باشد. در واقع معنی‌دار نبودن این پارامتر مطلوب است و به این معنی است که مدل می‌تواند به خوبی فعالیت آنزیم را در شرایط گوناگون ترکیب چهار فاکتور مستقل فوق، پیشگویی کند. مقدار این پارامتر برای رگرسیون معادله ۲، معنی‌دار نیست ( $P = 0.6077$ ). در بررسی مدل این سؤال مطرح می‌شود که تا چه اندازه تغییر در پاسخ قابل توجه بوده و در نتیجه پارامترهای آزمایشگاهی و میان‌کنش آنها است؟ برای پاسخ به این سؤال بایستی مقدار R-squared را اندازه‌گیری کرد. مقدار این پارامتر برای تولید لیپاز، ۰/۹۹۳۱ است که نشانگر دقت مدل است. هرچه مقدار R-squared به ۱ نزدیکتر باشد، ارتباط بهتری بین نتایج آزمایشگاهی و محاسبه شده وجود دارد. در نهایت Adequate precision نسبت سیگنال به نویز را اندازه‌گیری می‌کند. نسبت بیشتر از ۴ قابل قبول است. برای این مدل، نسبت سیگنال به نویز ۴۳/۷۱۹ بوده است که نشان‌دهنده بالا بودن مقدار سیگنال نسبت به نویز می‌باشد.

با توجه به جدول ۲، روش Box-Behnken مجموعه‌ای از ۲۹ آزمایش را طراحی می‌کند که دارای ۵ تکرار در نقطه مرکزی است. مدل حاصل با معادله ۲ نشان داده می‌شود که در آن فعالیت لیپاز (Y) به عنوان تابعی از مقدار متغیرهای مستقل است:

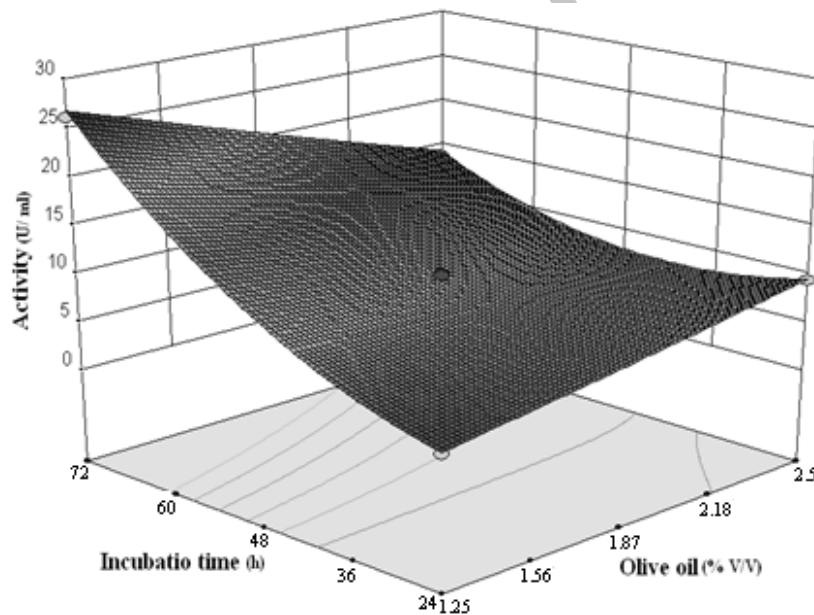
معادله (۲)

$$\text{Activity (U/ml)} = +9.76 + 3.58 X_1 - 1.68 X_2 + 2.93 X_3 + 6.92 X_4 - 1.88 X_1 X_2 - 0.22 X_1 X_3 + 0.40 X_1 X_4 + 0.65 X_2 X_3 - 4.55 X_2 X_4 + 1.15 X_3 X_4 + 1.17 X_1^2 + 0.18 X_2^2 + 0.98 X_3^2 + 3.74 X_4^2$$

همانطور که در معادله ۲ دیده می‌شود، ضریب سه فاکتور کلسیم، توئین-۸۰ و زمان انکوباسیون مثبت بوده در حالی که ضریب فاکتور روغن زیتون منفی می‌باشد. اثر منفی روغن زیتون بر تابع پاسخ نشانگر آن است که مقادیر بالاتر این پارامتر منجر به تولید کمتر لیپاز می‌شود. در میان این سه پارامتر، زمان انکوباسیون دارای بیشترین تأثیر می‌باشد که ضریب خطی آن (۶,۹۲) گویای این حقیقت است. پس از آن غلظت یون کلسیم با ضریب ۳,۵۸ و توئین-۸۰ با ضریب ۲,۹۳ به ترتیب بیشترین تأثیر را بر تولید و ترشح آنزیم دارند. پیش از این «Kumari و همکارانش (۲۰۰۹)» (۲۹) و «Gupta و همکارانش (۲۰۰۷)» (۱۷) نیز گزارش کرده‌اند که زمان انکوباسیون مؤثرترین فاکتور در ترشح لیپاز است. ارزیابی آماری معادله (۲) با انجام F-test و آنالیز وریانس (ANOVA) مدل درجه دوم پاسخ سطح صورت گرفته و نتیجه آن در جدول ۳ آورده شده است. داده‌های ANOVA دقت این مدل درجه دوم را تأیید می‌کند. پارامتر F معیاری از انحراف دیتاها از مقدار میانگین است. به طور کلی برای مدلی که نتایج آزمایش را با موفقیت پیشگویی می‌کند، مقدار F معمولاً بسیار بالا است (۹,۲۵). مقدار پارامتر  $\text{Prob} > F$  کمتر از ۰/۰۵۰۰ نیز به معنی معنی‌دار بودن مدل است. F-value برای این



تصویر ۳- اثر غلظت یون کلسیم ( میلی مولار) و غلظت روغن زیتون (V/V درصد) بر فعالیت لیپاز. در این نمودار غلظت توئین و زمان آنکوباسیون ثابت در نظر گرفته شده است.



تصویر ۴- اثر زمان آنکوباسیون و غلظت روغن زیتون بر فعالیت لیپاز. در این نمودار، دو پارامتر غلظت توئین - ۸۰ و کلسیم ثابت نگه داشته شده است.

جدول ۳- آنالیز واریانس (ANOVA) مدل چند جمله ای درجه دو فعالیت لیپاز به عنوان تابعی از مقدار اجزاء مختلف محیط کشت.

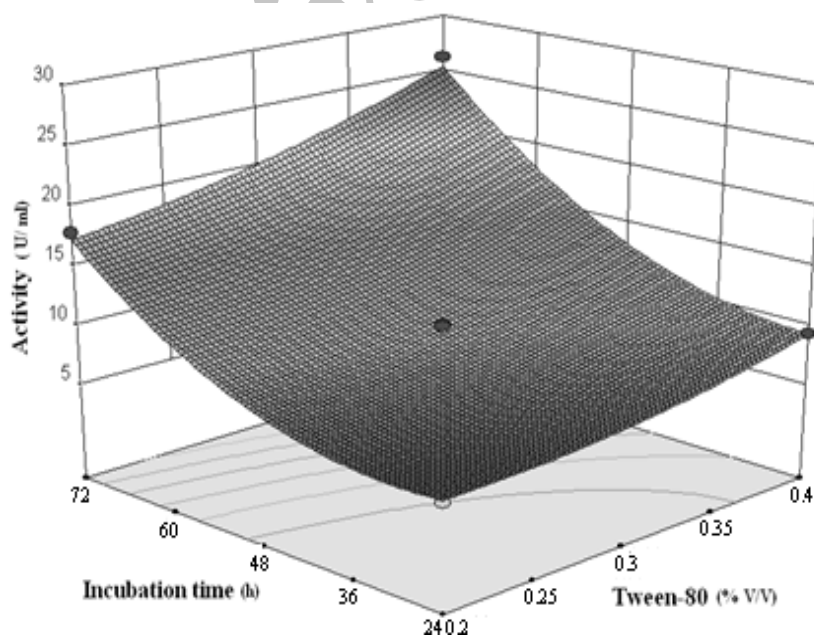
Source	Sum of squares	DF	Mean squares	F-value	Probability (p) > F
Model	1159.40	14	82.81	16.17	< 0.0001
Residual	71.71	14	5.12	-	-
Lake of fit	71.71	10	7.17	0.88	0.6077



Pure error	0	4	0	-	-
Corrected total	1231.11	28	-	-	-
$R^2 = 0.9931$		$R^2_{Adj} = 0.9861$		$R^2_{Pred} = 0.9691$	
Adeq Precision = 43.719					

تأثیر میان‌کنش غلظت‌های روغن زیتون و کلسیم بر فعالیت آنزیم در تصویر ۳ نشان داده شده است. با توجه به این تصویر، افزایش غلظت کلسیم تولید آنزیم را افزایش داده درحالی‌که افزایش غلظت روغن زیتون نه تنها اثر چندانی بر فعالیت آنزیم ندارد بلکه در حتی در غلظت‌های بالاتر همراه با کلسیم اثر بازدارنده بر فعالیت آنزیم داشته است. این نتیجه را می‌توان در تصویر ۴ نیز مشاهده کرد. در این نمودار نیز افزایش غلظت روغن زیتون اثر مثبتی بر فعالیت آنزیم نداشته و زمان انکوباسیون در غلظت‌های پایین روغن زیتون بیشتر بر فعالیت آنزیم موثر است. به این ترتیب برای تولید حداکثر مقدار لپاز، باید غلظت روغن زیتون در حداقل مقدار خود (۱/۵ V/V درصد) نگه داشته شود.

**آنالیز نتایج سطح پاسخ:** اثرات چهار فاکتور فوق بر فعالیت لپاز در قالب طرح‌های گرافیکی سطح پاسخ و نمودار کانتور در تصاویر ۳-۵ نشان داده شده است. در هر کدام از این تصاویر، نمودارهای سطح پاسخ به عنوان تابعی از دو پارامتر رسم شده و دو پارامتر دیگر ثابت در نظر گرفته شده است. با بررسی شکل نمودارهای سطح پاسخ (بیضی یا دایره‌ای) می‌توان تشخیص داد که رابطه بین پارامترها معنی‌دار است یا خیر (۳۶). نمودار کانتور بین روغن زیتون و کلسیم و همچنین زمان انکوباسیون و توئین-۸۰ بیضی شکل است و به عبارت دیگر میان‌کنش این پارامترها می‌تواند تأثیرات قابل توجهی بر فعالیت آنزیم داشته باشد.



تصویر ۵- اثر زمان انکوباسیون و توئین-۸۰ بر فعالیت آنزیم. در این نمودار غلظت کلسیم و روغن زیتون ثابت نگه داشته شده است.

**تایید تجربی مدل:** برای تأیید نتایج فوق، باکتری *Pseudomonas aeruginosa* HR59 در شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط مدل، (۳ میلی مولار کلسیم، ۱/۵V/V درصد روغن زیتون، ۰/۴ V/V درصد توئین-۸۰ و ۷۲ ساعت آنکوباسیون) کشت داده شده و فعالیت آنزیم حاصل از آن اندازه‌گیری شده است. در این شرایط فعالیت آنزیم ۳۵/۷ U/ml اندازه‌گیری شده که به مقدار پیشگویی شده بسیار نزدیک است (۳۸/۰۴ U/ml) (جدول ۴). به این ترتیب مدل به خوبی می‌تواند نتایج آزمایشها را پیشگویی کرده و محیط کشت باکتری مذکور را بهینه‌سازی کند.

توئین-۸۰ به دلیل طبیعت چربی دوستی خود، القاء کننده مناسبی برای تولید لیپاز است. این القاء کننده نه تنها یک تولید آنزیم لیپاز است بلکه در ترشح آن نیز از غشاء سلول دخالت می‌کند (۱). نتایج نشان داده‌اند که در غلظتهای ثابت روغن زیتون و کلسیم، هر دو فاکتور زمان آنکوباسیون و توئین-۸۰ اثر مثبتی بر تولید آنزیم دارند (تصویر ۵). تصاویر ۴ و ۵ بر نقش کلیدی زمان آنکوباسیون در ترشح آنزیم تأکید می‌کند. این نتیجه با معادله ۲ همخوانی دارد.

جدول ۴- ارزیابی تجربی مدل. تمام فاکتور ها در شرایط بهینه در نظر گرفته شده‌اند.

پارامترهای مستقل	مقدار بهینه	فعالیت محاسبه شده	فعالیت اندازه‌گیری شده
Ca <sup>++</sup> concentration	۳ mM	۳۸/۰۴	۳۵/۷
Olive oil	۱/۵ % V/V		
Tween-۸۰	۰/۴ % V/V		
Incubation time	۷۲ h		

## نتیجه‌گیری

در تولید آنزیم دارد و تولید لیپاز به صورت ویژه ای به زمان آنکوباسیون وابسته است.  $R^2$  محاسبه شده برای این مدل (۰/۹۹۳۱) نشان دهنده آن است که نتایج آزمایشگاهی با داده‌های محاسباتی انطباق دارد. به این ترتیب محیط کشت بهینه برای تولید آنزیم توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* HR59 باید علاوه بر محیط اصلی، حاوی ۳ میلی مولار کلسیم، ۱/۵ V/V درصد روغن زیتون، ۰/۴V/V درصد توئین-۸۰ بوده و ۷۲ ساعت آنکوبه شود. در این شرایط ماکزیمم فعالیت آنزیم (۳۵,۷ U/ml) حاصل خواهد شد.

## تقدیر و تشکر

این مقاله به مرحوم آقای دکتر مرتضی ستاری تقدیم می‌شود.

در این تحقیق تلاش بر آن بوده است تا منبع مقرون به صرفه‌ای برای تولید آنزیم لیپاز باکتریایی معرفی و شرایط تولید آن بهینه‌سازی شود. از این رو باکتری *Pseudomonas aeruginosa* HR59 از عفونتهای سوختگی جداسازی شده و با تغییر شرایط کشت آن، تولید و ترشح آنزیم لیپاز بهبود یافته است. روش آماری سطح پاسخ روشی مطمئن در یافتن سریع و کم هزینه بهترین شرایط کشت باکتری است. با استفاده از این روش، اثر چهار پارامتر غلظت روغن زیتون، غلظت توئین-۸۰، غلظت کلسیم و زمان آنکوباسیون بر فعالیت و تولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاکی از آن است که کلسیم، توئین-۸۰ و زمان آنکوباسیون نقش بسیار مهمی

## منابع

- 1- Acikel, U., Ersana, M., Sag Acikel, Y. 2010. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. *Food.bioprod. process.* 88 ,31–39
- 2- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Lett. App. Microbiol.* 13, 202–206.
- 3- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C., Verger, R. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 133–153.
- 4- Bradoo, S., Saxena, R.K., Gupta, R. 1999. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 87–91.
- 5- Box, G.E.P. 1960. Behnken, D.W., Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics.* 2, 195.
- 6- Brune, A.K., Gotz, F. 1992. Degradation of lipids by bacterial lipases. In: Winkelmann G (ED.), *Microbial degradation of natural products*, Wiley–VCH, Weinheim, pp. 243–266.
- 7- Chang, Y.C., Lee C.L., Pan T.M. 2006. Statistical optimization of media components for the production of *Antrodia cinnamomea* AC0623 in submerged cultures. *App. Microbiol. Biotechnol.* 72, 654–661.
- 8- Chakravarti, R., Sahai, V. 2002. Optimization of compactin production in chemically defined production medium by *Penicillium citrinum* using statistical methods. *Process Biochemistry.* 38, 481–486.
- 9- Gupta, J.K., Soni, S.K. 2000. Industrial uses of enzymes. *J. Punjab. Acad. Sci.* 2, 75–80
- 10- Desantis, T.Z., Dubosarkiy, I., Murray, S.R., Andersen, G.L. 2003. Comprehensive aligned sequence construction for automated design of effective probes using 16S rDNA. *Bioinformatics.* 19, 1461–1468.
- 11- Dharmsthit, S., Pratuangdejkul, J., Theeragool, G.T., Luchai, S. 1998. Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 139–145.
- 12- Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., *et al.* 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta.* 597, 179–186.
- 13- Ghosh P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., *et al.* 1996. *Microbial lipases: production and applications.* *Sci. Prog.* 79, 119–157.
- 14- Gilbert, E.J., Drozd, J.W., Jones, C.W. 1991. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2215–2221.
- 15- Guerrero, R. 2001. *Bergey's Manual and the classification of prokaryotes.* *Int. Microbiol.* 4, 103–109.
- 16- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, R. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 763–781.
- 17- Gupta, N., Sahai, V., Gupta, R. 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochem.* 42, 518–526
- 18- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D. 2004. Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118, 155–170.
- 19- 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.
- 20- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., *et al.* 1994. Bacterial lipases. *FEMS. Microbiol. Rev.* 15, 29–63.
- 21- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315–351.
- 22- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends. Biotechnol.* 16, 396–403.
- 23- Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A., Reetz, M.T. 2001. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 519–530.
- 24- Jaeger, K.E., Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 390–397.

- 25- Kazlauskas, R.J., Bornscheuer, U. 1998. Biotransformations with lipases, In: Rehm HJ, Reeds G (ED.), *Biotechnology*, Wiley-VCH, New York, pp. 37-192.
- 26- Kennedy, M., Krouse, D. 1999. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 456-475.
- 27- Kim, S.S., Kim, E.K., Rhee, J.S. 1996. Effects of growth rate on the production of *Pseudomonas fluorescens* lipase during the fedbatch cultivation of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 12, 718-722.
- 28- Krishna, S.H., Manohar, B., Divakar, S., Prapulla, S.G., *et al.* 2000. *Enzy. Microbiol Technol.* 26, 131.
- 29- Kumari, A., Mahapatra, P., Banerjee, R. 2009. Statistical Optimization of Culture Conditions by Response Surface Methodology for Synthesis of Lipase with *Enterobacter aerogenes*. *Brazilian. Arch. Biol. Technol.* 52, 1349-1356.
- 30- Kouker, G., Jaeger, K.E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *App. Enviro. Microbiol.* 53, 211-213
- 31- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J.L., Brocca, S., *et al.* 1998. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chem. Phys. Lipids.* 93, 143-148.
- 32- Nakajima, M., Snape, J., Khare, S.K. 2000. Method in non-aqueous enzymology, In: Gupta MN (ED.), *Basel, Birkhauser Verlag*, p. 52-69.
- 33- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., *et al.* 1999. The role of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29, 119-131.
- 34- 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>.
- 35- Reetz, MT., Jaeger, K.E. 1999. Superior biocatalysts by directed evolution. *Topics. Curr. Chem.* 200, 31-57.
- 36- Rajendran, A., Thangavelu, V. 2007. Sequential optimization of culture medium composition for extracellular lipase production by *Bacillus sphaericus* using statistical methods. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 460-470.
- 37- Rathi, P., Saxena, R.K., Gupta, R. 2001. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process. Biochem.* 37, 187-192.
- 38- Sandoval, G., Marty, A. 2007. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enz. Microbio. Technol.* 40, 390-393.
- 39- Weisburg, W.G., Barns, D.A., Pelletier, D.J., Lane, J. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Bacteriol.* 173, 697-703.
- 40- Winkler, U.K., Stuckmann, M., Glycogen. 1979. Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 138, 663-670.
- 41- Zou, X., Chen, C.F., Hang, H.F., Chu, J., *et al.* 2010. Response surface methodology for optimization of the erythromycin production by Fed-Batch Fermentation using an inexpensive biological nitrogen source. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 24, 95-100.

## Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* HR59 lipase from burn infection and optimization of medium by use of Box-Behnken Design (BBD)

Hadizadeh Shirazy N.<sup>1</sup>, Ranjbar B.<sup>1</sup> and KHajeh Kh.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biophysics Dept., Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

<sup>2</sup>Biochemistry Dept., Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

### Abstract

By attention to this fact that bacterial lipase has important role in different industries, in present investigation potential of *Pseudomonas aeruginosa* from burn infection for lipase secretion was studied. Optimization procedure using response surface methodology (RSM) based on Box-Behnken Design (BBD) with four factors ( $\text{Ca}^{2+}$  ion, olive oil and tween-80 concentration and incubation time) was used in order to investigate the effect of these parameters on the production of lipase from newly isolated bacterium; *Pseudomonas aeruginosa* HR59. According to the results of RSM, concentrations of  $\text{Ca}^{+2}$ , tween-80 and incubation time were very important role on enzyme production. As a result of this optimization, maximum lipase activity was achievable at  $\text{Ca}^{+2}$  (3 mM), olive oil (1.5 % V/V), tween-80 (0.4 %V/V) and incubation time (72 h).

**Keywords:** Optimization, lipase, Box- Behnken Design (BBD), RSM