

Original Article



# Identification of *Aeromonas caviae* Bacterium with Lipase-Producing Capability from the Northern Persian Gulf (Optimization and Purification of the Enzyme)

Sara Taghavi<sup>1\*</sup>, Roya Zekavati<sup>2</sup>, Effat Abbasi Montazeri<sup>3</sup>, Laleh Roomiani<sup>4</sup>

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Biology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
4. Department of Fisheries, Ahv. C., Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

## Article history:

Received: 25 October 2024

Revised: 13 January 2025

Accepted: 4 February 2025

ePublished: 12 February 2025

\*Corresponding author: Sara Taghavi,  
Department of Biology, Science  
and Research Branch, Islamic Azad  
University, Tehran, Iran.

E-mail: sara.taghavi@iau.ac.ir

## Abstract

In recent years, enzymes derived from aquatic microorganisms have attracted significant attention due to their unique characteristics, including stability under diverse industrial conditions. Accordingly, this study was conducted for the first time with the aim of identifying a bacterium capable of producing the industrially important enzyme lipase and evaluating its performance in the northern Persian Gulf, specifically in the Chouebdeh Port area of Abadan. Sampling was carried out from water and sediment in this region. In the initial screening, a culture medium containing a specific substrate was used to isolate lipase-producing bacteria, followed by identification of the target strain using 16S rRNA gene sequencing. Enzyme production under different conditions, including incubation time, temperature, pH, and carbon and nitrogen sources, was optimized first using the One Factor at a Time method and subsequently by the Plackett–Burman design. Finally, enzyme purification was performed using ammonium sulfate precipitation, dialysis, and gel filtration chromatography (Sephadex G-100). The lipase-producing bacterium with significant enzymatic activity (35 U/ml/min) after optimization was identified as *Aeromonas caviae* strain Persiangulf TA14. Optimal conditions for the activity of the lipase enzyme were observed on the first day of incubation (20 hours) at 37°C, pH 7, in a culture medium containing olive oil and peptone. The most influential factors were olive oil concentration and pH, respectively. The purified enzyme exhibited high specific activity (23.88 U/mg) and a purification fold of 41.7. The results of this study demonstrated that the lipase enzyme extracted from *Aeromonas caviae* possesses considerable enzymatic activity. Therefore, due to its resistant and efficient enzymes, particularly for applications in the food and biotechnology industries, this bacterium can be considered a suitable source for industrial lipase production.

**Keywords:** *Aeromonas caviae*, lipase enzyme, Persian Gulf.

**Please cite this article as follows:** Taghavi S., Zekavati R., Abbasi Montazeri E., Roomiani L. Identification of *Aeromonas caviae* Bacterium with Lipase-Producing Capability from the Northern Persian Gulf (Optimization and Purification of the Enzyme). J Mar Bio, 2025; 16(4): 55–69. DOI:



Copyright © 2025 Journal of Marin Biology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite

مقاله اصلی

## شناسایی باکتری *Aeromonas caviae* با قابلیت تولید آنزیم لیپاز از شمال خلیج فارس (بهینه سازی و خالص سازی آنزیم)

سارا تقوی<sup>۱\*</sup>، رویا ذکاوتی<sup>۲</sup>، عفت عباسی منتظری<sup>۳</sup>، لاله رومیانی<sup>۴</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه زیست‌شناسی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۴. گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

### چکیده

امروزه آنزیم‌های مشتق از میکروارگانیسم‌های آبی به علت داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله پایداری در شرایط متنوع صنعتی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. بنابراین این مطالعه با هدف شناسایی باکتری مولد آنزیم پرکاربرد صنعتی لیپاز و بررسی کارایی آن در شمال خلیج فارس در محدوده بندر چوئیده آبادان برای اولین بار انجام شد. نمونه برداری در این منطقه از آب و رسوب انجام شد. در غربالگری اولیه، از محیط کشت با سوبسترای اختصاصی برای جداسازی باکتری‌های مولد آنزیم لیپاز انجام شد و سپس شناسایی سویه مورد نظر با استفاده از روش توالی‌یابی ژن *rRNA* ۱۶S انجام شد. تولید آنزیم در شرایط مختلف از نظر زمان انکوباسیون، دما، pH، منبع کربن و نیتروژن توسط روش یک عامل در زمان و سپس توسط روش پلاکت برمن بهینه سازی شد. در نهایت خالص سازی آنزیم به وسیله روش‌های رسوب دادن با سولفات آمونیوم، دیالیز و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (سفادکس G-100) انجام گردید. باکتری مولد آنزیم لیپاز با فعالیت قابل توجه توجه پس از بهینه سازی (۳۵ U/ml/min) به عنوان باکتری *Aeromonas caviae* سویه Persiangulf TA14 شناسایی شد. شرایط بهینه برای فعالیت آنزیم لیپاز مورد نظر در روز اول انکوباسیون (ساعت بیست) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، pH برابر ۷ و محیط کشت حاوی روغن زیتون و پپتون مشاهده شد. فاکتورهای تاثیرگذار به ترتیب میزان روغن زیتون و pH بود. آنزیم خالص شده دارای فعالیت اختصاصی بالا (۸۸/۲۳ U/mg) و مرتبه خالص سازی (۷/۴۱) بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که آنزیم لیپاز مستخرج از باکتری *Aeromonas caviae* دارای فعالیت آنزیمی قابل توجه می‌باشد. بنابراین این باکتری به علت داشتن آنزیم‌های مقاوم و کارآمد به خصوص در صنایع غذایی و بیوتکنولوژی، می‌تواند یک منبع مناسب برای تولید لیپازهای صنعتی باشد.

واژگان کلیدی: آنروموناس کاوائی، آنزیم لیپاز، خلیج فارس

### تاریخچه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۸/۴

تاریخ ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۲۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۱/۱۶

تاریخ انتشار مقاله: ۱۴۰۳/۱۱/۲۴

تمامی حقوق برای دانشگاه آزاد اهواز محفوظ است.

\* نویسنده مسئول: سارا تقوی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

ایمیل: [sara.taghavi@iau.ac.ir](mailto:sara.taghavi@iau.ac.ir)

استناد: تقوی، سارا؛ ذکاوتی، رویا؛ عباسی منتظری، عفت؛ رومیانی، لاله. شناسایی باکتری *Aeromonas caviae* با قابلیت تولید آنزیم لیپاز از شمال خلیج فارس (بهینه سازی و خالص سازی آنزیم). مجله زیست‌شناسی دریا، زمستان ۱۴۰۳؛ ۱۶(۴): ۵۵-۶۹

## مقدمه

در سال‌های اخیر، آنزیم‌های میکروبی به علت داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد، توجه بسیاری از پژوهشگران و صنایع مختلف را به خود جلب کرده‌اند. این آنزیم‌ها به عنوان کاتالیزورهای زیستی قادرند واکنش‌های شیمیایی را در دمای پایین و شرایط خفیف محیطی تسریع کنند، بدون اینکه خود مصرف شوند. تولید سریع، هزینه‌ی پایین، قابلیت اصلاح ژنتیکی، و پایداری در شرایط متنوع صنعتی از مزایای عمده آن‌ها هستند (Chandra *et al.*, 2023; Mukherjee *et al.*, 2020). از جمله این آنزیم‌ها، لیپازها، هستند که فرآیندهایی مانند هیدرولیز، استریفیکاسیون و ترانس‌استریفیکاسیون چربی‌ها را اجرا می‌کنند. لیپازها به دلیل ویژگی‌هایی مانند فعالیت در محیط‌های آبی و غیرآبی، پایداری در دما و pH گسترده، انتخاب‌گرایی بالا و عدم نیاز به هم عامل‌های کمکی برای فعالیت، به‌طور گسترده در صنایع غذا، شوینده، زیست‌دیزل، دارو، نساجی، چرم و آرایشی-بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Abdelaziz *et al.*, 2025; Khan *et al.*, 2023). میکروارگانیسم‌های دریایی، به علت زندگی در شرایط محیطی متغیر از نظر دما، فشار، شوری و pH و سازگاری با آن، منابعی بسیار ارزشمند برای استخراج آنزیم‌های مقاوم با عملکرد بالا هستند و آنزیم‌ها در شرایط صنعتی چالش برانگیز نیز عملکرد قابل توجهی ارائه می‌دهند. در نتیجه، لیپازهای مشتق از منابع دریایی کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی، شوینده، دارویی و آرایشی دارند (Abdelaziz *et al.*, 2025; Fasim *et al.*, 2021; Navvabi *et al.*, 2018). مطالعات زیادی به بررسی دقیق تولید، خالص‌سازی و ویژگی‌های بیوشیمیایی لیپازهای میکروبی اختصاص یافته‌اند. روش‌های تحقیقاتی شامل استفاده از محیط‌های تخمیری حاوی پسماندهای کشاورزی، بهینه‌سازی، خالص‌سازی توسط کروماتوگرافی و اولترافیلتراسیون، بررسی پایداری آنزیم در شرایط مختلف و در نهایت انتخاب آنزیم با کارایی بالا می‌باشد (Abdelaziz *et al.*, 2025). به دلیل مقرون به صرفه بودن از لحاظ اقتصادی، پایداری بیشتر، قابلیت کنترل و عدم نوسانات فصلی حائز اهمیت است (Mukherjee *et al.*, 2023). همچنین لیپازهای مشتق از میکروارگانیسم‌های دریایی از قابلیت پایداری در شرایط سخت، کاربردهای صنعتی گسترده و ماندگاری بالا در محیط‌های صنعتی دشوار برخوردار است (Abdelaziz *et al.*, 2025; Navvabi *et al.*, 2018). توسعه تکنیک‌های نوین متابولیسم و ژنتیکی، به بهبود عملکرد، ثبات، و انتخاب‌گرایی آنزیم‌ها کمک می‌کند، که برای تولید صنعتی بسیار کارآمد است (Abdelaziz *et al.*, 2025).

اکوسیستم خلیج فارس به دلیل داشتن ویژگی‌هایی از قبیل شوری بالا، نوسان دمایی شدید و بار آلودگی‌های نفتی، شرایط سختی را برای زیستن میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌کند که این شرایط دشوار سبب می‌شود برخی از باکتری‌هایی که در این محیط تکامل یافته‌اند، آنزیم‌هایی مقاوم، پایدار و کارآمد تولید کنند که یکی از این آنزیم‌ها، لیپاز بوده که در فرآیندهای هیدرولیز چربی کاربرد داشته و در شرایط صنعتی چالش برانگیز عملکرد خوبی را از خود ارائه می‌دهد، بدین جهت خلیج فارس به منبعی ارزشمند برای کشف باکتری‌های توانمند تبدیل شده است (Ardakani *et al.*, 2012). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که باکتری‌هایی از جنس *Pseudoalteromonas*، *Aeromonas* و دیگر باکتری‌ها، از آب و رسوبات خلیج فارس جداسازی شدند که قادر بودند آنزیم‌هایی از قبیل لیپاز، آمیلاز و پروتئاز تولید کنند (Ardakani *et al.*, 2012; Miyagi *et al.*, 2016). این یافته‌ها نشان‌دهنده پتانسیل بالای خلیج فارس به‌عنوان اکوسیستمی قوی برای یافتن باکتری‌های میکروبی است که قادر به تولید آنزیم‌های مقاوم و صنعتی (مانند لیپاز) هستند. این می‌تواند زمینه‌ساز توسعه کاربردهایی در صنعت زیست‌دیزل، صنایع غذایی، دارویی، بیوتکنولوژی و تصفیه زیستی باشد. بنابراین این مطالعه با هدف شناسایی باکتری‌های مولد آنزیم لیپاز در محدوده شمالی خلیج فارس در بندر چوئیده آبادان برای اولین بار انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری و جداسازی باکتری‌های دریایی

نمونه برداری از آب و رسوبات در استان خوزستان در محدوده بندر چوئیده آبادان آغاز شد و سپس در حاشیه شمالی خلیج فارس ادامه یافت و از ۱۰ ایستگاه مختلف نمونه برداری صورت گرفت. نمونه‌گیری از آب از عمق ۵۰ سانتیمتری و در فاصله ۱۵۰ الی ۲۰۰ متری از ساحل با استفاده از ظروف شیشه‌ای درب دار پلاستیکی در حجم ۵۰۰ میلی لیتر انجام شد. جهت نمونه برداری رسوبات دریایی از عمق ۲ تا ۱۰ متری از یک دستگاه

نمونه بردار رسوبات سطحی استفاده گردید و بلافاصله محتویات رسوب داخل گرب به درون کیسه های پلاستیکی استریل منتقل شد. پس از اتمام عملیات نمونه برداری، نمونه ها همراه با یخ به سرعت به آزمایشگاه انتقال داده شده و تا زمان انجام آزمایش در این دما نگهداری شدند و در مدت حداکثر ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

برای جداسازی باکتری ها از نمونه های جمع آوری شده از محیط کشت مارین آگار حاوی آمفوتریسین B (به میزان ۵ میلی گرم در لیتر) جهت جلوگیری از آلودگی یوکاریوتی استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه غنی سازی شده در محیط کشت مارین آگار به صورت گسترده کشت داده شد. سپس پلیت ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ روز قرار داده شدند (Darabpour et al., 2011). کلنی های توسعه یافته با استفاده از کشت مجدد در محیط کشت مارین آگار خالص شدند. در نهایت کلنی های باکتریایی با خصوصیات مشخصی مانند رنگدانه، اندازه، کدورت، ارتفاع، حاشیه و ظاهر سطح برای مطالعه بیشتر انتخاب شدند.

### جداسازی باکتری های مولد آنزیم لیپاز

برای بررسی توانایی باکتری در تولید آنزیم لیپاز از محیط کشت شامل ترکیبات پیتون (۱۰ گرم بر لیتر)، توئین (۱۰ میلی لیتر بر لیتر)، کلرید کلسیم یک آبه (۰/۱ گرم بر لیتر)، آگار (۱۵ گرم بر لیتر) استفاده شد. نمونه های مورد نظر در پلیت های حاوی محیط کشت مورد نظر به صورت خطی یا نقطه ای کشت داده و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سویه ها با حداکثر هاله ی شفاف برای مطالعات بیشتر انتخاب گردیدند. (Sivasubramani et al., 2013).

### بهینه سازی شرایط رشد باکتری مولد آنزیم لیپاز

پس از بررسی منحنی رشد، شرایط رشد در دماهای مختلف (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد)، غلظت نمک مختلف (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد) و pH مختلف (۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵ و ۹) برای باکتری های مولد لیپاز بهینه سازی شد. رشد باکتری به مدت ۴۸ ساعت با خواندن جذب در ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.

### سنجش فعالیت آنزیم لیپاز

برای سنجش فعالیت آنزیم لیپاز، از محیط تخمیر حاوی ترکیباتی شامل پیتون (۵ گرم در لیتر)،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (۲/۵ گرم در لیتر)، گلوکز (۱ گرم در لیتر)، کلرید پتاسیم (۰/۵ گرم در لیتر)، سولفات منیزیم (۰/۵ گرم در لیتر)، کلرید کلسیم (۰/۵ گرم در لیتر) و روغن زیتون: (۱۵ میلی لیتر) استفاده شد. سپس محیط در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. پس از اتوکلاو، کشت های باکتریایی جدا شده در محیط های تخمیر با حجم ۲۵۰ میلی لیتر تلقیح شدند. فلاسک ها با کشت تازه از باکتری مورد نظر به میزان ۱۰ درصد تلقیح شدند و در دمای بهینه رشد و در انکوباتور شیکردار (۲۲۰ دور در دقیقه) به مدت ۴ روز انکوبه شدند (Jaiswal et al., 2017a). پس از مدت زمان انکوباسیون، در فواصل ۲۴ ساعته محیط تخمیری به لوله های فالتکونی انتقال داده شد. سانتریفیوژ لوله ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. سپس مایع رویی به عنوان آنزیم خام مورد استفاده قرار گرفت و به لوله ی فالتکون جدید انتقال داده شد.

برای ارزیابی فعالیت آنزیم لیپاز از روش تیتراسیون آنزیم خام در برابر NaOH ۰/۰۵ مولار استفاده شد. مقدار NaOH استفاده شده نشان دهنده مقدار اسید موجود در محلول است که ارتباط مستقیمی با مقدار لیپاز تولید شده دارد. واکنش با تغییرات جزئی در مقدار ترکیبات مخلوط انجام شد. یک واحد لیپاز به عنوان مقدار آنزیمی که یک میکرومول اسید چرب در هر میلی لیتر در هر دقیقه تحت شرایط سنجش استاندارد آزاد می کند، تعریف شده است (Jaiswal et al., 2017a). مراحل کار به صورت زیر انجام شد:

در ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون رویی (آنزیم خام) به همراه ۹۰۰ میکرولیتر امولسیون روغنی (۷۵ میلی لیتر صمغ عربی ۷ درصد و ۲۵ میلی لیتر روغن زیتون) به لوله ی آزمایش اضافه شد. پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۳ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون بلافاصله ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد برای توقف واکنش به آن اضافه شد. در مرحله ی بعد ۳ قطره معرف فنل فتالین برای مشاهده تغییر رنگ مخلوط آنزیمی از بی رنگ به صورتی در هنگام تیتراسیون اضافه شد. سپس لوله ی آزمایش در زیر دهانه ی بورت محتوی NaOH ۰/۰۵ نرمال قرار داده

شد تا سود قطره قطره و به آرامی به درون لوله ی آزمایش ریخته شود و به طور همزمان لوله آزمایش برای یکنواخت شدن محتویات هم زده می شود. اینکار تا آنجا ادامه یافت که رنگ محلول درون لوله صورتی شود و با هم زدن بیشتر بی رنگ نشود. مقدار سود مصرف شده در این مرحله برای محاسبه فعالیت آنزیم یادداشت شد. برای تهیه ی شاهد ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم خام با ۱۰۰ میکرولیتر اتانول و چند قطره معرف فلن فتالین در لوله ی آزمایش مخلوط شد. سپس ۹۰۰ میکرولیتر امولسیون روغنی به آن اضافه شد و بالا فاصله تیتراسیون با NaOH ۰/۰۵ نرمال انجام شد. میزان NaOH استفاده شده، میزان اسید چرب در محلول را نشان داد که به طور مستقیم با میزان لیپاز تولید شده متناسب بود. یک واحد لیپاز، به میزان آنزیمی اطلاق می شود که یک  $\mu\text{mol}$  اسید چرب در هر میلی لیتر تحت شرایط استاندارد آزاد می کند. مقدار اسید چرب بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

فعالیت آنزیم لیپاز (میکرومول اسید چرب/میلی لیتر/دقیقه)=

$$\frac{[\text{مقدار سود مصرف شده نمونه (ml)} - \text{مقدار سود مصرف شده شاهد (ml)}] \times \text{نرمالیه سود} \times ۱۰۰۰}{\text{حجم آنزیم (ml)} \times \text{زمان (دقیقه)}}$$

### شناسایی باکتری مولد آنزیم لیپاز

شناسایی گونه های باکتری با پتانسیل تولید آنزیم لیپاز براساس روش های توصیف شده در کتاب باکتریولوژی سیستماتیک برجی انجام شد. مورفولوژی کلنی باکتری با توجه به رنگ، اندازه، شکل و رنگدانه ثبت شد. رنگ آمیزی گرم و رنگ آمیزی اسپور انجام شد و آنالیز میکروسکوپی انجام شد. شناسایی بیوشیمیایی بر اساس آزمون کاتالاز، آزمون اکسیداز، آزمون اوره آز، آزمون سیمون سیترا، آزمون MR-VP و ... انجام شد (Gaur et al., 2012).

باکتری هایی که توانایی تولید ماده ضد میکروبی را داشتند به وسیله تکنیک مولکولی rRNA sequencing PCR ۱۶S شناسایی شدند (Khan et al., 2019). پس از تایید تکثیر ژنها، محصولات حاصل از PCR با دو پرایمر پیشرو و معکوس برای تعیین توالی به شرکت کره جنوبی فرستاده شدند. توالی به دست آمده با جستجو در سایت NCBI با نتایج موجود در بانک ژن مقایسه شد. در نهایت درخت فیلوژنتیک با استفاده از الگوریتم neighbor-joining با استفاده از نرم افزار MEGA ۵ رسم شد.

### بهینه سازی تولید آنزیم

بهینه سازی تولید آنزیم با تغییر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی محیط تخمیر (محیط تولید) به روش یک فاکتور در زمان انجام شد به طوری که در هر مرحله تمامی فاکتورها ثابت و فقط یک فاکتور متغیر بود (Jaiswal et al., 2017b). برای افزایش تولید و بهره وری آنزیم، پارامترهای مختلف مانند زمان انکوباسیون (به مدت ۴ روز متوالی)، دما (۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۰، ۴۵ درجه سانتیگراد)، pH (۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰)، منبع کربن (توتین ۲۰، توتین ۸۰، روغن زیتون و روغن کنجد) و منبع نیتروژن (کازئین، تریپتون، پیتون و عصاره مخمر) مورد مطالعه قرار گرفت. منابع کربنی و نیتروژنی در حجم ۲ درصد (حجمی / وزنی) استفاده شد. سپس بهترین منبع کربن و نیتروژن انتخاب شد و در غلظت های مختلف ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۵ درصد (حجمی / وزنی) تهیه شدند تا بهترین درصد برای تولید و فعالیت آنزیم انتخاب شود. تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام شده است. به منظور بررسی اثر معنادار عامل مورد مطالعه، از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS در سطح معناداری  $P < ۰/۰۵$   $value <$  استفاده شد.

پس از آن بر اساس نتایج حاصل از روش بهینه سازی یک فاکتور در زمان، از روش پلاکت برمن برای بهینه سازی تولید آنزیم استفاده شد به طوریکه در هر مرحله چند فاکتور متغیر می باشند. به منظور بررسی فاکتورهای موثر بر تولید آنزیم، ۴ متغیر (دما، pH، منبع کربن و نیتروژن) هر کدام در دو سطح تغییر بالا و پایین (+۱ و -۱) برای طراحی آزمایش ها به وسیله نرم افزار Minitab 17 مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). آنالیز واریانس (ANOVA) نتایج آزمایش به وسیله نرم افزار Minitab انجام و نمودارهای اثرات (نمودار Normal plot و Pareto) رسم

شدند. نمودارهای فاکتوریال (نمودار اثرات اصلی و نمودار میانکشی‌ها) براساس میانگین پاسخ‌ها در هر سطح از هر فاکتور رسم گردید ( $P$  value  $< 0.05$ ).

جدول ۱: آزمایش‌های طراحی شده به روش پلاکت برمن

| آزمایش | دما (درجه سانتیگراد) | pH | غلظت منبع کربن انتخاب شده | غلظت نیترژن انتخاب شده |
|--------|----------------------|----|---------------------------|------------------------|
| ۱      | -۱                   | +۱ | -۱                        | D                      |
| ۲      | -۱                   | +۱ | +۱                        | -۱                     |
| ۳      | +۱                   | +۱ | +۱                        | +۱                     |
| ۴      | -۱                   | -۱ | +۱                        | -۱                     |
| ۵      | +۱                   | +۱ | -۱                        | +۱                     |
| ۶      | +۱                   | -۱ | +۱                        | -۱                     |
| ۷      | +۱                   | -۱ | -۱                        | +۱                     |
| ۸      | -۱                   | -۱ | -۱                        | -۱                     |
| ۹      | -۱                   | +۱ | -۱                        | +۱                     |
| ۱۰     | +۱                   | -۱ | -۱                        | -۱                     |
| ۱۱     | -۱                   | -۱ | +۱                        | +۱                     |
| ۱۲     | +۱                   | +۱ | -۱                        | -۱                     |

### خالص سازی آنزیم

برای خالص سازی آنزیم، در ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت پایه، به ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت اختصاصی تولیدی افزوده شد. سپس به مدت ۳۶-۴۸ ساعت در دمای بهینه با تلاطم ۱۲۰ دور در دقیقه انکوبه شد. در نهایت خالص سازی توسط روش رسوب دهی با سولفات آمونیوم تا غلظت ۸۵ درصد، دیالیز و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (سفادکس G100) انجام شد (Ahmed et al., 2020; Nouadri et al., 2010). در ابتدا محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد تا باکتری‌های موجود در محیط کشت جدا شوند و محیط کشت کاملاً شفاف شود. مایع رویی جدا شده حاوی عصاره آنزیمی، با استفاده از سولفات آمونیوم از غلظت صفر درصد تا ۸۵ درصد رسانده شد. این روش وابسته به دما است و مراحل کار در یک طرف حاوی یخ بر روی همزن مغناطیسی انجام شد. پس از حل شدن کامل نمک، پس از ۶ ساعت این محلول در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (یا به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد با تلاطم ملایم قرار داده شد). رسوب حاصل که حاوی تمام پروتئین‌های موجود در محیط کشت بود در حداقل میزان بافر سدیم فسفات ۲۰ میلی مولار (۷/۵ pH = حل شد (Ahmed et al., 2020).

در این تحقیق کیسه دیالیز از جنس سلولز با قطر منافذ ۱۰ هزار دالتون استفاده شد. کیسه ی دیالیز در آب مقطر به مدت چند دقیقه جوشانده شد. بافر حاوی پروتئین داخل کیسه دیالیز با اندازه قطر منافذ ۱۰ کیلو دالتون ریخته شد. کیسه دیالیز درون بافر سدیم فسفات ۲۰ میلی مولار (۷/۵ pH = در ۱۰ برابر حجم خود درون یک ارلن قرار داده شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در همان بافر در دمای ۴ درجه سانتیگراد دیالیز گردید. در این مدت زمان، ۲ الی ۳ بار، بافر کیسه دیالیز تعویض گردید. به علت اسموزیز، ناخالصی‌ها حذف شد (Nouadri et al., 2010).

به منظور جداسازی پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی، ستون کروماتوگرافی صافی با قطر ۱/۵ سانتیمتر و ارتفاع ۲۰ سانتیمتر با حجم کلی ۳۵ میلی لیتر با استفاده از دانه‌های بید سفادکس G-100 بارگذاری گردید. برای به تعادل رساندن ماتریکس (بستر جامد)، بافر فسفات مورد استفاده قرار گرفت. دو میلی لیتر از نمونه حاوی آنزیم روی ستون برده شد و ستون بلافاصله با بافر فسفات شسته شد. هر فرکشن به حجم دو میلی لیتر از انتهای ستون در لوله‌های آزمایش جمع آوری گردید و اینکار تا جایی ادامه پیدا کرد که غلظت پروتئین در فرکشن‌های خروجی از ستون به صفر رسید. غلظت پروتئین موجود در هر فرکشن، پس از تغلیظ توسط ستریکون، به یک پنجم حجم اولیه تقلیل یافت. سپس جذب آن در ۲۸۰ نانومتر

خوانده شد (Nouadri et al., 2010). فعالیت آنزیمی فرکشنهای حاوی پروتئین، جهت شناسایی فرکشنهایی با فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت و در صورت داشتن فعالیت آنزیمی، میزان پروتئین بر اساس روش برادفورد تخمین زده شد (Bradford, 1976).

## نتایج

در این مطالعه از ۲۳ باکتری جداسازی شده، نمونه شماره ۱۴ با لیپازی قابل توجه شناسایی شد. در فعالیت لیپازی، اسید چرب آزاد شده از هیدرولیز توئین ۸۰، همراه با کلرید کلسیم برای تولید اولئات کلسیم نامحلول، به صورت یک رسوب سفید رنگ در اطراف کلنی باکتری ظاهر شد (شکل ۱).



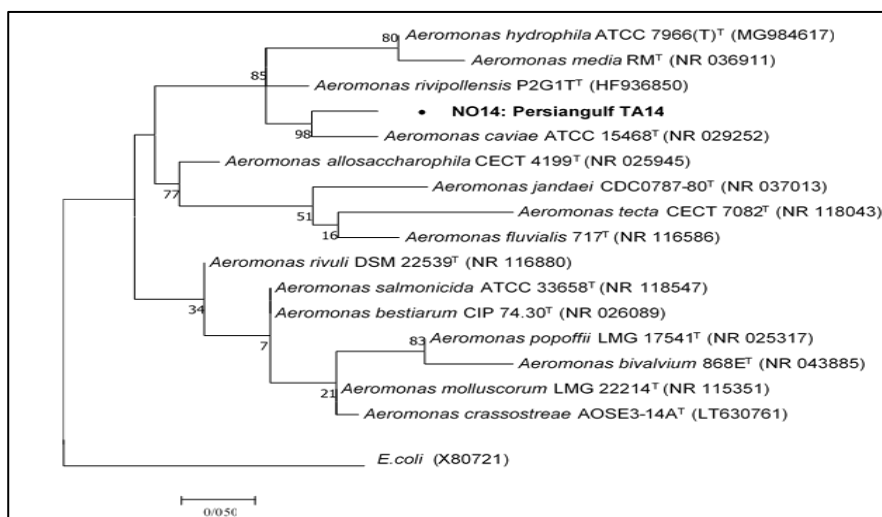
شکل ۱: فعالیت لیپازی نمونه شماره ۱۴

برخی از خصوصیات ظاهری، آنزیمی و بیوشیمیایی نمونه مورد نظر در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: خصوصیات ظاهری، آنزیمی و بیوشیمیایی نمونه های مولد آمیلاز، پروتئاز و لیپاز

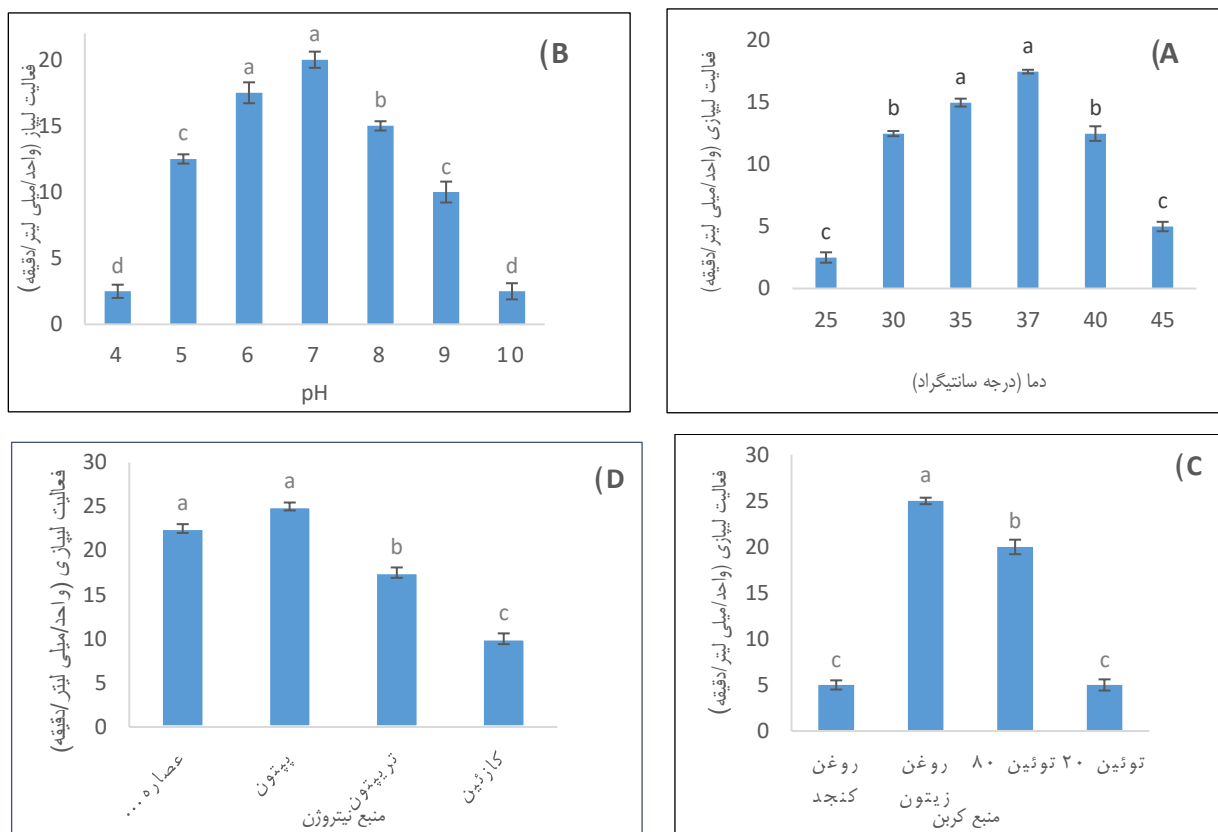
| خصوصیات               | نمونه شماره ۱۴ | خصوصیات        | نمونه شماره ۱۴ |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| رنگ آمیزی گرم         | گرم منفی       | احیا نیترات    | -              |
| شکل میکروسکوپی        | میله ای        | حرکت           | +              |
| رنگ کلنی              | سفید           | اندول          | +              |
| ساختار اسپور          | -              | سولفید هیدروژن | -              |
| رشد روی مک کانگی آگار | +              | سیترات         | +              |
| رشد روی بلاد آگار     | +              | TSI            | قلیایی/قلیایی  |
| اکسیداز               | +              | MR             | -              |
| کاتالاز               | +              | VP             | -              |

محصول PCR نمونه شماره ۱۴ توسط شرکت کره جنوبی تعیین توالی شد. بلاست توالی سویه ی مورد نظر بر اساس توالی های ژن 16S rRNA، رابطه نمونه شماره ۱۴ را با نزدیکترین سویه استاندارد به نام *Aeromonas caviae* ATCC 15468<sup>T</sup> نشان داد. نمونه شماره ۱۴ به عنوان سویه ی جدید به نام Persiangulf TA14 نامگذاری شد و توالی آن در NCBI با شماره دسترسی OK560304 ثبت شد. درخت فیلوژنتیک باکتری مورد نظر در شکل ۲ نشان داده شده است.



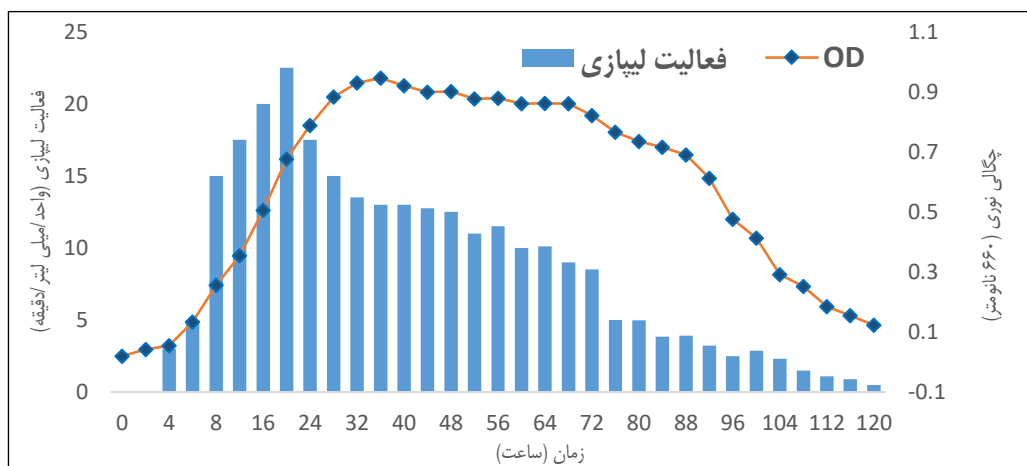
شکل ۲: درخت فیلوژنتیک Neighbor joining، بر اساس توالی‌های ژن rRNA ۱۶S، رابطه نمونه شماره ۱۴ را با باکتری استاندارد *آئروموناس کاویی* سویه ATCC 15468<sup>T</sup> نشان داد

بهینه سازی شرایط تولید و فعالیت آنزیم نشان داد که از نظر آماری اختلاف معناداری در بین فعالیت آنزیم لیپاز و روز انکوباسیون برای باکتری TA14 وجود دارد ( $P = 0.02$ ). بیشترین فعالیت لیپازی باکتری TA14 در روز اول مشاهده شد. فعالیت بهینه لیپاز باکتری TA14 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (فعالیت لیپاز ۱۷/۵ واحد/میلی لیتر/دقیقه و میزان پروتئین ۱/۵۸ میلی گرم/میلی لیتر) مشاهده شد. فعالیت آنزیم در دماهای بالاتر و زیر ۳۷ درجه سانتیگراد به شدت کاهش یافت. محاسبات آماری نشان داد که فعالیت آنزیم باکتری وابسته به عامل دما می باشد ( $P = 0.008$ ) (شکل ۳A). pH بهینه فعالیت لیپاز باکتری TA14 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH برابر با ۷ مشاهده شد (فعالیت لیپازی: ۲۰ واحد/میلی لیتر/دقیقه). باکتری در محیط کشت با محدوده pH حدود ۵-۱۰ قادر به رشد بود و خارج از این محدوده قادر به رشد نبود. محاسبات آماری نشان داد که فعالیت آنزیم باکتری وابسته به عامل pH می باشد ( $P = 0.04$ ) (شکل ۳B). بیشترین فعالیت لیپاز (۲۵ واحد/میلی لیتر/دقیقه) باکتری TA14 در حضور روغن زیتون و کمترین فعالیت در حضور توئین ۲۰ و روغن کنجد (فعالیت: ۵ واحد/میلی لیتر/دقیقه) مشاهده شد محاسبات آماری نشان داد که فعالیت آنزیم باکتری وابسته به عامل منبع کربنی می باشد ( $P = 0.04$ ) (شکل ۳C). در باکتری TA14، بیشترین فعالیت لیپاز (۳۰ واحد/میلی لیتر/دقیقه) در حضور پپتون و کمترین فعالیت (۱۰ واحد/میلی لیتر/دقیقه) در حضور کازئین مشاهده شد. محاسبات آماری نشان داد فعالیت آنزیم باکتری وابسته به عامل منبع نیتروژنی می باشد ( $P = 0.02$ ) (شکل ۳D).



**شکل ۳: تأثیر دما (A)، pH (B)، منابع کربن (C) و نیتروژن (D) بر روی تولید و فعالیت آنزیمی باکتری *Aeromonas caviae*. ستون‌هایی که با حروف متفاوت مشخص شده‌اند از نظر آماری تفاوت معناداری دارند ( $P \text{ value} < 0.05$ )**

منحنی رشد برای باکتری رسم شد تا زمان دقیق بیشترین فعالیت لیپاز مشخص شود. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود بیشترین میزان فعالیت لیپاز در فاز لگاریتمی و در ساعت بیست مشاهده شد. در این مطالعه بهترین منبع کربن و نیتروژن برای فعالیت آنزیم لیپاز توسط سویه TA14، روغن زیتون و پپتون بود. میزان تأثیر غلظت‌های مختلف روغن زیتون و پپتون بر فعالیت آنزیم لیپاز به عنوان القاگر بررسی شد. با سه بار تکرار آزمایش غلظت مناسب برای فعالیت آنزیم ۲/۵ درصد روغن زیتون و ۲ درصد پپتون در نظر گرفته شد. ۴ متغیر در ۲ سطح با طراحی ۱۲ آزمایش مورد مطالعه قرار گرفتند (جدول ۳). پاسخ‌های آزمایش (فعالیت آنزیم) با سه بار تکرار در نرم افزار وارد و آنالیز شدند.



شکل ۴: بررسی منحنی رشد و فعالیت لیپازی باکتری *آئروموناس کالوایی*

جدول ۳: متغیرهای مورد استفاده برای طراحی آزمایش پلاکت برمن و سطوح آن‌ها (تولید آنزیم لیپاز)

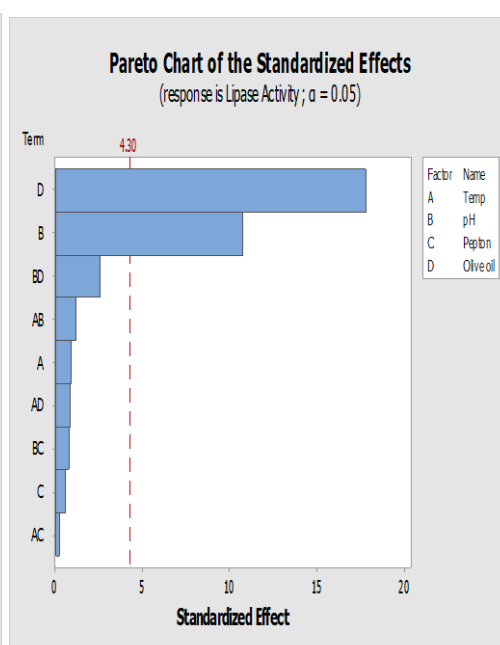
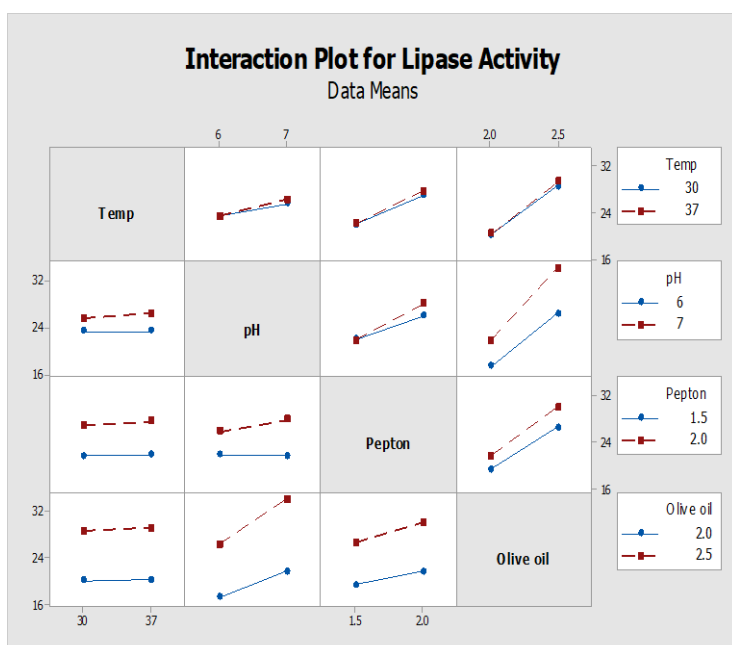
| شماره | متغیر                | سطح بالا (+۱) | سطح پایین (-) |
|-------|----------------------|---------------|---------------|
| A     | دما (درجه سانتیگراد) | ۳۷            | ۳۰            |
| B     | pH                   | ۷             | ۶             |
| C     | غلظت پپتون           | ۲             | ۱/۵           |
| D     | غلظت روغن زیتون      | ۲/۵           | ۲             |

بررسی نتایج حاصل از انجام آزمایش‌ها طراحی شده به روش پلاکت برمن نشان داد که از میان فاکتورهای انتخاب شده کدامیک دارای بیشترین تاثیر در محیط کشت تولید پایه بر میزان فعالیت آنزیم می باشد. بالاترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به آزمون ۲ و ۴ می باشد که در آزمایش شماره ۲ برابر مقدار ۳۵ واحد/میلی لیتر/دقیقه است (جدول ۴). هر کدام از فاکتورها در سطوح به کار رفته، تاثیرات متفاوتی بر روی فعالیت لیپاز داشتند. تاثیرگذارترین فاکتورهای محیط کشت بر فعالیت آنزیم، به ترتیب میزان روغن زیتون و pH بودند که در سطوح بالای به کار رفته (+۱) باعث تولید بیشتر شدند و مقدار آن‌ها بسیار مهم می باشد. اثرات اصلی و مستقل فاکتورها و تاثیر متقابل فاکتورها بر فعالیت براساس میانگین پاسخ‌ها در شکل ۵ نشان داده شده است. در نمودار تاثیر متقابل، شیب خط تعیین کننده میزان برهمکنش فاکتورها می باشد. اگر دو خط موازی باشند یعنی تاثیر متقابل و یا برهمکنش دو فاکتور معنی دار نیست و هریک از فاکتورها به طور مستقل بر تولید موثر هستند ولی اگر دو خط شیب متفاوت داشته باشند یعنی برهمکنش دو فاکتور معنی دار است و با تغییر سطح فاکتور اول میزان پاسخ به سطح فاکتور دوم بستگی دارد.

نتایج حاصل از خالص سازی لیپاز تولید شده توسط باکتری *آئروموناس کالوایی* در جدول ۵ نشان داده شده است. در مرحله رسوب دهی فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز (۲۲/۹۱ واحد بر میلی گرم پروتئین) نسبت به مرحله قبل (آنزیم خام) افزایش یافت و پس از مرحله دیالیز مجدداً فعالیت اختصاصی آنزیم افزایش یافت (۳۸/۱۹ واحد بر میلی گرم پروتئین). در مرحله کروماتوگرافی، فرکشن شماره ۴۱ تا ۵۱ دارای فعالیت لیپازی بودند (شکل شماره ۶). آنزیم خالص شده دارای فعالیت اختصاصی بالا (۸۸/۲۳ واحد/میلی گرم) و مرتبه خالص سازی (۷/۴۱) بود و با فعالیت اختصاصی لیپاز (Biosynth-EE179250) تهیه شده مقایسه شد (۶۵ واحد/میلی گرم).

جدول ۴: نتایج حاصل از آزمایش‌های طراحی شده به روش پلاکت برمن

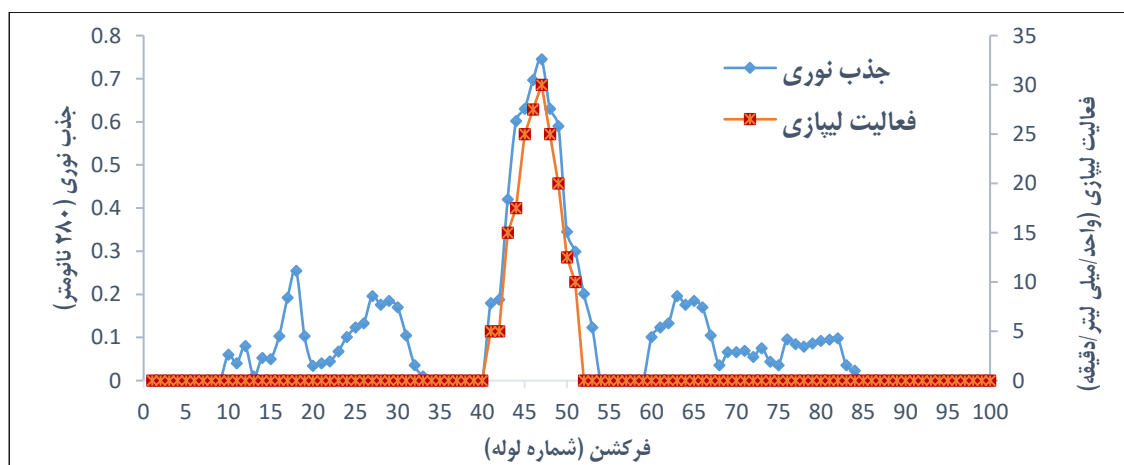
| آزمایش | دما<br>(درجه سانتیگراد) | pH | غلظت پپتون<br>(درصد حجمی / وزنی) | غلظت روغن زیتون<br>(درصد حجمی / وزنی) | میانگین فعالیت لیپاز<br>(واحد/میلی لیتر/دقیقه) |
|--------|-------------------------|----|----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------|
| ۱      | ۳۰                      | ۷  | ۱/۵                              | ۲                                     | ۲۱                                             |
| ۲      | ۳۷                      | ۷  | ۲                                | ۲/۵                                   | ۳۵                                             |
| ۳      | ۳۰                      | ۶  | ۱/۵                              | ۲/۵                                   | ۲۷                                             |
| ۴      | ۳۰                      | ۷  | ۲                                | ۲/۵                                   | ۳۳/۵                                           |
| ۵      | ۳۷                      | ۷  | ۲                                | ۲                                     | ۲۱/۵                                           |
| ۶      | ۳۷                      | ۶  | ۱/۵                              | ۲/۵                                   | ۲۶/۵                                           |
| ۷      | ۳۷                      | ۶  | ۲                                | ۲/۵                                   | ۲۶/۵                                           |
| ۸      | ۳۰                      | ۶  | ۱/۵                              | ۲                                     | ۱۷/۵                                           |
| ۹      | ۳۰                      | ۷  | ۲                                | ۲                                     | ۲۲                                             |
| ۱۰     | ۳۷                      | ۶  | ۱/۵                              | ۲                                     | ۱۷                                             |
| ۱۱     | ۳۰                      | ۶  | ۲                                | ۲/۵                                   | ۲۲/۵                                           |
| ۱۲     | ۴۰                      | ۷  | ۱/۵                              | ۲                                     | ۲۲/۵                                           |



شکل ۵: در نمودار Pareto، گذارترین فاکتورها بر تولید لیپاز. هر فاکتوری که اثر استاندارد آن از خط مرجع کشیده تر باشد (p-value آن کمتر از ۰/۰۵ باشد) تاثیر آن در سطح معنی داری از ۰/۰۵ قرار دارد. در نمودار Intraction Plot، تاثیر متقابل فاکتورها بر فعالیت لیپاز براساس میانگین پاسخ‌ها نشان داده شده است.

جدول ۵: خلاصه ای از روش های خالص سازی آنزیم لیپاز تولید شده از باکتری *آئروموناس کاوایی*

| مرحله خالص سازی                | حجم (میلی لیتر) | فعالیت آنزیمی (واحد/میلی لیتر/دقیقه) | کل فعالیت آنزیمی (واحد/دقیقه) | میزان پروتئین (میلی گرم/میلی لیتر) | کل میزان پروتئین (میلی گرم) | فعالیت اختصاصی (واحد/میلی گرم) | مرتبه خالص سازی |
|--------------------------------|-----------------|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------|
| مایع رویی محیط کشت (آنزیم خام) | ۵۰۰             | ۲۵                                   | ۱۲۵۰۰                         | ۲/۱                                | ۱۰۵۰                        | ۱۱/۹۰                          | ۱               |
| رسوب دهی با سولفات آمونیوم ۸۰٪ | ۳۰              | ۲۷/۵                                 | ۸/۲۵                          | ۱/۲                                | ۳۶                          | ۲۲/۹۱                          | ۱/۹۲            |
| دیالیز                         | ۳۰              | ۲۷/۵                                 | ۸۲۵                           | ۰/۷۲                               | ۲۱/۶                        | ۳۸/۱۹                          | ۳/۲۰            |
| کروماتوگرافی سفادکس G-100      | ۲               | ۳۰                                   | ۶۰                            | ۰/۳۴                               | ۰/۶۸                        | ۸۸/۲۳                          | ۷/۴۱            |



شکل ۶: کروماتوگرام آنزیم لیپاز خالص تولید شده توسط باکتری *آئروموناس کاوایی*

## بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، بیشترین فعالیت لیپاز توسط *Aeromonas caviae* سویه Persiangulf TA14، در روز اول انکوباسیون، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، pH برابر ۷ و در حضور روغن زیتون (۲/۵ درصد حجمی / وزنی) و پپتون (۲ درصد حجمی / وزنی) مشاهده شد. برخلاف مطالعه حاضر، تولید بهینه لیپاز توسط باکتری *Aeromonas caviae* سویه LipT51، در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و pH برابر ۹ گزارش شده است (Gurkok & Ozdal, 2021)، در صورتیکه دما و pH بهینه برای تولید لیپاز توسط *Aeromonas caviae* سویه AU04، دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و pH برابر ۷ بود (Velu et al., 2012). مشابه نتایج مطالعه حاضر، بهترین منبع کربن برای فعالیت آنزیم لیپاز، روغن زیتون می باشد اما بهترین منبع نیتروژن برای فعالیت آنزیم لیپاز را عصاره مخمر گزارش کردند (Ilesanmi et al., 2020). برخلاف نتایج این پژوهش، Kowsalya و همکاران در سال ۲۰۲۴، گزارش کردند که باکتری *Aeromonas media* VBC8 بیشترین فعالیت لیپازی را در حضور روغن کبد ماهی نشان داده است. Sipiczki و همکاران در ۲۰۲۵، گزارش کردند که باکتری *Yarrowia lipolytica* پس از ۳ روز تخمیر به بالاترین فعالیت لیپاز رسیده است و تریتون ۱۰۰ X و تئوین ۸۰ بیشترین تاثیر را در تولید لیپاز داشته اند.

Kandasamy و همکاران در سال ۲۰۲۳، سه سویه *Bacillus pumilus* V1، *Bacillus pumilus* V7 و *Bacillus subtilis* V8 را شناسایی کردند و بیشترین میزان تولید و فعالیت لیپاز را در شرایط بهینه رشد شامل pH برابر ، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، فروکتوز و عصاره مخمر به عنوان منبع کربن و نیتروژن گزارش کردند. Kaur و Gupta در سال ۲۰۲۵، بهینه سازی تولید لیپاز را در باکتری *Pseudomonas aeruginosa* SDK-6 توسط روش یک عامل در زمان انجام دادند و گزارش کردند روغن کرچک، عصاره مخمر و نیترات آمونیوم مهم‌ترین اجزای محیط کشت هستند که بر تولید لیپاز تأثیر می‌گذارند. بهینه‌سازی بیشتر از طریق روش سطح پاسخ (RSM) منجر به فعالیت بیشتر لیپاز در حضور ۰/۵ درصد (حجمی/حجمی) روغن کرچک، ۰/۲ درصد (وزنی/حجمی) عصاره مخمر و ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) نیترات آمونیوم شد. دما و pH بهینه برای فعالیت لیپاز به ترتیب ۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ بود. آنزیم بیشتر فعالیت اولیه خود را تا ۳۲ ساعت پس از انکوباسیون در دمای بالای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حفظ کرد. Ahmed و همکاران در سال ۲۰۲۵، بیشترین فعالیت لیپاز را در *Monascus pilosus* را در pH برابر ۳ و پس از پنج روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گزارش کردند.

بررسی اثر pH و دما بر روی فعالیت آنزیم لیپاز استخراج شده از باکتری *Aeromonas hydrophila* (نمونه بالینی) نشان داد که pH بهینه ۷/۵ و دمای مطلوب ۳۷ درجه سانتی‌گراد است و زمانی که مقادیر pH و دما بالاتر یا کمتر از این مقادیر باشد، این فعالیت کاهش می‌یابد (Hassan, 2012). گونه های *Aeromonas* جدا شده از لجن دریایی در تایلند، یک لیپاز ترموفیل خارج سلولی تولید کرد که حداکثر فعالیت لیپاز پس از ۱۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و pH برابر ۸ و روغن زیتون به عنوان منبع کربن به دست آمد. این آنزیم با ته نشینی متوالی سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی ستونی با نفوذ ژل و اولترافیلتراسیون با موفقیت ۳۰ برابر خالص شد (Charoenpanich et al., 2011).

Salihu و همکاران در سال ۲۰۱۲، گزارش کردند که حجم تلقیح اثر متناسب بر فعالیت لیپاز دارد. طبق مطالعات گزارش شده، عصاره مخمر و توین ۴۰ باعث افزایش تولید لیپاز توسط *Pseudomonas stutzeri* شد و عوامل محیطی مانند اندازه تلقیح، دما، آشفستگی و pH نیز اثر مثبتی بر تولید لیپاز نشان دادند (Thakur et al., 2014). باکتری نمکدوست *Marinobacter lipolyticus* با فعالیت لیپازی جدا شده از نواحی جنوب اسپانیا دارای شرایط بهینه ۷/۵ درصد نمک، دمای ۳۷ درجه و pH برابر با ۷/۵ بود (Martin et al., 2003). باکتری نمکدوست *Salicola* با توانایی تولید آنزیم لیپاز و پروتئاز جدا شده از نواحی نمکی در اسپانیا، فعالیت بهینه را در غلظت نمک ۲۰-۸۵، pH برابر ۸ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد از خود نشان داد (de Lourdes et al., 2009). گونه های *Pseudomonas* تولید کننده لیپاز جدا شده از نمونه های فاضلاب در پاکستان، حداکثر فعالیت را در pH برابر ۷ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون و ۳۷ درجه سانتیگراد نشان دادند (Saadatullah et al., 2018).

در این پژوهش فعالیت کلی آنزیم باکتری *Aeromonas caviae* پس از خالص سازی، معادل ۳۰ واحد/ میلی‌لیتر/دقیقه و فعالیت اختصاصی آن ۸۸/۲۳ واحد/ میلی‌گرم گزارش شد که در مقایسه با فعالیت اختصاصی لیپاز Biosynth-EE179250 تهیه شده (۶۵ واحد/میلی گرم) در آزمایشگاه بالاتر بود. فعالیت اختصاصی بالای آنزیم نشان‌دهنده خلوص بالای آنزیم و قابلیت بالای آن در فرایندهای کاتالیزوری در هیدرولیز لیپیدها است و می‌تواند در کاربردهای صنعتی نظیر تولید بیودیزل، فرآوری مواد غذایی و سنتز ترکیبات چربی‌دوست مفید باشد. فعالیت اختصاصی لیپاز خالص‌شده از سویه *A. caviae* LipT51، ۳۴/۲ واحد/میلی گرم گزارش شده است. این مقدار فعالیت اختصاصی در مقایسه با نتایج حاضر، تفاوت قابل توجهی را نشان می‌دهد. نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده فعالیت اختصاصی تقریباً دو برابر بالاتر است که نشان می‌دهد فعالیت آنزیم در نمونه حاضر به‌طور قابل توجهی بیشتر است. این تفاوت می‌تواند ناشی از شرایط بهینه کشت، روش خالص سازی یا ویژگی‌های ژنتیکی سویه باشد (Gurkok & Ozdal, 2021). همچنین، در مطالعه‌ای دیگر، فعالیت اختصاصی لیپاز از *A. caviae* AU04 معادل ۳/۲ واحد/میلی گرم گزارش شده است (Velu et al., 2012) که این مقدار نیز کمتر از فعالیت اختصاصی گزارش شده در این پژوهش است. مقایسه با مطالعات پیشین نشان می‌دهد که فعالیت لیپاز *Aeromonas* متنوع است و بسته به شرایط کشت و روش خالص سازی تغییر می‌کند و این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت ژنتیکی میان سویه‌ها و یا روش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنزیم باشد. علاوه بر آن فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز

در باکتری *Aeromonas taiwanensis* جدا شده از شمال خلیج فارس حدود ۲۹/۳۰ واحد/میلی گرم گزارش شده است که نسبت به مطالعه حاضر پایین تر بود (Taghavi et al., 2022).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که آنزیم لیپاز مستخرج از باکتری *Aeromonas caviae* دارای فعالیت آنزیمی قابل توجه می باشد. با توجه به افزایش تقاضا برای آنزیم هایی با فعالیت و پایداری بالا در صنایع مختلف، این باکتری می تواند یک منبع مناسب برای تولید لیپازهای صنعتی با انجام مطالعات بیشتر باشد.

## References

1. Abdelaziz, A. A., Abo-Kamar, A. M., Elkotb, E. S., & Al-Madboly, L. A., 2025. Microbial lipases: advances in production, purification, biochemical characterization, and multifaceted applications in industry and medicine. *Microbial Cell Factories*, 24(1), 40.
2. Ahmed, M. M., Hammad, S. F., & Abdel-Mawgood, A. L., 2025. Optimization, characterization, and molecular modelling of an acid and organic solvent-tolerant lipase isolated from *Monascus pilosus* as a potential detergent additive. *International Journal of Biological Macromolecules*, 317(1), 144883.
3. Ahmed, N. E., El Shamy, A. R., & Awad, H. M., 2020. Optimization and immobilization of amylase produced by *Aspergillus terreus* using pomegranate peel waste. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 109.
4. Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I. J., 2023. The recent advances in the utility of microbial lipases: A review. *Microorganisms*, 11(2), 510.
5. Ardakani, M. R., Poshtkouhian, A., Amoozegar, M. A., & Zolgharnein, H., 2012. Isolation of moderately halophilic *Pseudoalteromonas* producing extracellular hydrolytic enzymes from Persian Gulf. *Indian journal of microbiology*, 52(1), 94-98.
6. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
7. Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K., 2020. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial cell factories*, 19(1), 169.
8. Charoenpanich, J., Suktanarag, S., & Toobbucha, N. J., 2011. Production of a thermostable lipase by *Aeromonas* sp. EBB-1 isolated from marine sludge in Angsila, Thailand. *Science Asia*, 37(2), 105-114.
9. Darabpour, E., Ardakani, M. R., Motamedi, H., & Ronagh, M. T., 2011. Isolation of a broad spectrum antibiotic producer bacterium, *Pseudoalteromonas piscicida* PG-02, from the Persian Gulf. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 6(2), 74-83.
10. de Lourdes Moreno, M., García, M. T., Ventosa, A., & Mellado, E., 2009. Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase-and protease-producing extreme halophile. *FEMS microbiology ecology*, 68(1), 59-71.
11. Fasim, A., More, V. S., & More, S. S., 2021. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current opinion in biotechnology*, 69, 68-76.
12. Gaur, D., Jain, P. K., & Bajpai, V., 2012. Production of Extracellular  $\alpha$ -Amylase by thermophilic *Bacillus* sp. Isolated from Arid and Semi-arid region of Rajasthan, India. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(5), 675-684.
13. Gurkok, S., & Ozdal, M., 2021. Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry. *Protein expression and purification*, 180, 105819.
14. Hassan, L. G., 2012. Partial Purification and Characterization of Lipase Produced by *Aeromonas hydrophila* Isolated from Fecal of Patients Suffering from Diarrhea. (1).

15. Ilesanmi, O. I., Adekunle, A. E., Omolaiye, J. A., Olorode, E. M., & Ogunkanmi, A. L., 2020. Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. Scientific African, 8, e00279.
16. Jaiswal, A., Preet, M., & Tripti, B., 2017. Production and optimization of lipase enzyme from mesophiles and thermophiles. Journal of Microbial and Biochemical Technology, 9(3), 126-131.
17. Kandasamy, S., Vijayalakshmi, V. S., Salmen, S. H., Alfarraj, S., Wainwright, M., & Natarajan, D., 2023. Screening, characterization, and optimization of lipase enzyme producing bacteria isolated from dairy effluents contaminated muddy soil. Applied Nanoscience, 13(2), 1443-1451.
18. Kaur, D., & Gupta, S., 2025. Enhanced recombinant lipase production in *Pseudomonas aeruginosa* SDK-6: medium optimization using OFAT and RSM with purification and stability studies. Folia Microbiologica, 1-13.
19. Khan, I. A., Jahan, P., Hasan, Q., & Rao, P., 2019. Genetic confirmation of T2DM meta-analysis variants studied in gestational diabetes mellitus in an Indian population. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, 13(1), 688-694.
20. Kowsalya, R., Saravanan, K., Selvam, K., Senthilkumar, B., & Senbagam, D., 2024. Enhanced lipase production and characterization from *Aeromonas media* VBC8: Applications in biodegradation of lubricating oil waste. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 62, 103423.
21. Martin, S., Márquez, M., Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Arahal, D., & Ventosa, A., 2003. *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. Journal of Medical Microbiology, 53(5), 1383-1387.
22. Miyagi, K., Hirai, I., & Sano, K., 2016. Distribution of *Aeromonas* species in environmental water used in daily life in Okinawa Prefecture, Japan. Environmental health and preventive medicine, 21(5), 287-294.
23. Mukherjee, P., Mondal, I., Dey, D., Dan, E., Khatun, F., & Tewari, S., 2023. An overview on microbial enzymes and their industrial applications. J. Surv. Fish. Sci, 10, 6154-6160.
24. Navvabi, A., Razzaghi, M., Fernandes, P., Karami, L., & Homaei, A., 2018. Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. Process biochemistry, 70, 61-70.
25. Nouadri, T., Meraihi, Z., Shahrazed, D.D., & Leila, B., 2010. Purification and characterization of the  $\alpha$ -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. Afr. J. Biochem. Res, 4(6), 155-162.
26. Saadatullah, M. I., Jan, M., Waheedullah, M. N., & Rehman, Z., 2018. Isolation, identification and characterization of a lipase producing *Pseudomonas*. J. Biomat, 2, 51-57.
27. Salihu, A., Alam, M. Z., AbdulKarim, M. I., & Salleh, H. M., 2012. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. Resources, Conservation and Recycling, 58, 36-44.
28. Sipiczki, G., Mosonyi, S., Bartha, Á. A., Brezovcsik, G., Nguyen, Q. D., & Bujna, E., 2025. Optimization of fermentation conditions for enhancement of lipase production by *Yarrowia* isolates. Progress in Agricultural Engineering Sciences (published online ahead of print 2025).
29. Sivasubramani, K., Singh, J., Jayalakshmi, S., Kumar, S., & Selvi, C., 2013. Production and optimization of lipase from marine derived bacteria. J. ICMAS, 4-126.
30. Taghavi, S., Zekavati, R., Abbasi Montazeri, E., Roomiani, L., & Saffarian, P., 2022. Optimization and partial purification of protease, lipase and amylase enzymes from the newly identified strain of *Aeromonas taiwanensis* strain Persiangulf ST16 in the northern Persian Gulf. Wetland Ecobiology, 14(3), 37-52.

31. Thakur, V., Tewari, R., & Sharma, R., 2014. Evaluation of production parameters for maximum lipase production by *P. stutzeri* MTCC 5618 and scale-up in bioreactor. Chinese Journal of Biology, 2014(1), 208462.
32. Velu, N., Divakar, K., Nandhinidevi, G., & Gautam, P., 2012. Lipase from *Aeromonas caviae* AU04: Isolation, purification and protein aggregation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 1(1), 45-50.