

جداسازی و شناسایی مخمرهای لیپولیتیک از کنجاله کنجد استان یزد و بررسی پتانسیل تولید لیپاز در آنها

وجیهه زارع باقی آباد^۱، فریده طباطبایی یزدی^{۲*}، سید علی مرتضوی^۳، مهدی وریدی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۸)

چکیده

امروزه مطالعات زیادی برای شناسایی میکروارگانیسم‌های لیپولیتیک به علت نقش مهم آنها در تولید لیپازهای میکروبی، در حال انجام است. کنجاله‌های روغنی یکی از محل‌های مناسب برای دستیابی به این نوع میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. مخمرها در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌ها در این زمینه از اهمیت بیشتری برخوردارند. ما در این پژوهش ۲۷ نوع قارچ از کنجاله کنجد استان یزد جدا نمودیم. پس از بررسی مشخصات ماکرو و میکرومرفولوژیکی آنها معلوم شد، ۱۶ نوع از آنها از گروه مخمرها بودند. مخمرهای لیپولیتیک با استفاده از محیط‌کشت توئین ۸۰ آگار غربال‌گری شده و پس از مشاهدات مرفولوژی کلنی و سلولی و همچنین بررسی واکنش تخمیر و استفاده از منابع کربن و نیتروژن تا حد جنس و گونه شناسایی شدند که شامل این ۴ مخمر *Sporidiobolus pararoseus*، *Sporobolomyces salmonicolor*، *Cryptococcus albidus* و *Yarrowia lipolytica* بودند. نسبت قطر هاله به قطر چاهک ایجاد شده را اندازه‌گیری شد، که دامنه‌ای بین ۲/۷۱۴ - ۲/۳۱۴ داشت. مخمر *S. pararoseus* بیشترین نسبت قطر هاله به قطر چاهک (۲/۷۱۴) را نشان داد. فعالیت لیپاز این ۴ نوع مخمر در شرایط کشت غوطه‌وری با محیط‌کشت *Cezepek Dox Broth* در دمای ۳۰°C به مدت ۷ روز و دور ۲۰۰ rpm به روش فتومتر با استفاده از سوبسترای پارانیتروفنیل پالمیتات اندازه‌گیری شد. دامنه فعالیت لیپاز بین ۰/۸۶۶-۴/۳۳۳ واحد آنزیمی در میلی-لیتر بود، که مخمر *Cryptococcus albidus* بیشترین فعالیت لیپازی را با ۴/۳۳۳ U/ml داشت، درحالی‌که کمترین رشد بیومس را در مقایسه با سایر مخمرها از خود نشان داد (OD=۰/۵۷۷). مخمر *Yarrowia lipolytica* نیز در مرتبه دوم با فعالیت لیپازی ۳/۴۶۶ U/ml بود، که بیشترین رشد بیومس نیز با OD=۰/۸۰۶ داشت.

کلید واژه گان: کنجاله کنجد، جداسازی، مخمرهای لیپولیتیک، آنزیم لیپاز

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

لیپاز (تری گلیسرول آسیل هیدرولاز EC3.1.1.3) یک کربوکسی- استراز است که زنجیره‌های آسیل گلیسرول را هیدرولیز و سنتز می‌کند [۱، ۲ و ۳]. پتانسیل بالای لیپازهای میکروبی برای استفاده در صنایع مختلف باعث شده است تا علاقه‌مندی به تولید لیپازهای میکروبی در دهه‌های اخیر در حال افزایش باشد. این آنزیم از نظر ساختار مولکولی و ویژگی‌های کاتالستی پتانسیل بالقوه‌ای در بخش‌های مختلف صنعت از قبیل صنعت غذا، صنعت شیمی، صنعت نساجی، داروسازی، تولید مواد شوینده، تصفیه فاضلاب، تولید محصولات آرایشی، و تولید سوخت دارد [۱، ۴ و ۵].

لیپاز مخمرها اکثراً خارج سلولی و مونومریک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی بین ۶۵-۳۳ کیلودالتون هستند. فعالیت کاتالیزوری لیپاز تا حد زیادی به حالت سوبسترای مورد نظر بستگی دارد. آزمایش‌ها نشان داده‌اند که ساختار جایگاه فعال آنزیم لیپاز برای عمل هیدرولیز نیاز به حضور سوبسترا میان قطرات آب دارد. لیپاز طیف وسیعی از واکنش‌ها از قبیل هیدرولیز، استری کردن داخلی، الکلیز، اسیدولیز، استری کردن و آمینولیز را کاتالیز می‌کند [۶]. لیپازهای میکروبی در صنعت لبنیات باعث افزایش عطر و طعم در شیر، پنیر و کره، در صنعت نانوبی باغبانی باعث افزایش طعم و ماندگاری محصولات، در صنعت گوشت منجر به بهبود عطر و طعم و حذف چربی از محصولات گوشتی و در صنعت روغن منجر به هیدرولیز و استری کردن تبدیلی مطلوب می‌شوند.

مخمرهای تولید کننده لیپاز شامل جنس و گونه‌های *Candida*، *Candida antarctica*، *Candida tropicalis*، *Candida rugosa*، *Candida parapsilopsis*، *Candida cylindracea*، *Candida deformans*، *Candida curvata*، *Rhodotorula*، *Yarrowia lipolytica*، *valida*، *Pichia*، *Rhodotorula pilimornae*، *glutinis*، *Pichia sivicola*، *Pichia mexicana*، *bispora*

1. hydrolysis
2. inter-esterification
3. alcoholysis
4. acidolysis
5. esterification
6. aminolysis

Pichia burtonii، *Pichia xylosa*، *Torulasporea*، *Saccharomycopsis crataegenesis* و *globosa* و *Trichosporon asteroides* می‌باشد [۸].

موادی که در کارخانجات مواد غذایی و فعالیت‌های کشاورزی به عنوان ضایعات شمرده می‌شوند در واقع ضایعات به شمار نمی‌روند. به عبارت دیگر به آن‌ها ضایعات پنهان گفته می‌شود که می‌توانند به صورت زیستی به محصولات مفیدی از قبیل انرژی، مواد شیمیایی، غذای دام و ... تبدیل شوند [۹]. استان یزد استانی با سابقه طولانی در تولید دانه کنجد و محصولات کنجیدی به شمار می‌رود. در حال حاضر در استان یزد به طور متوسط روزانه بین ۳۰۰-۴۰۰ تن کنجد مصرف می‌شود. همچنین روزانه ۹۰ هزار تن انواع فرآورده‌های کنجیدی از جمله حلواورده، ارده، روغن کنجد و ... در ۱۶۰ واحد تولیدی استان یزد تولید می‌شود [۱۰]. از اینرو روزانه مقدار زیادی کنجاله کنجد تولید می‌شود که به‌عنوان ضایعات تلقی می‌شود. بنابراین می‌توان از آن به عنوان محصولی با ارزش‌تر که از یک سو به عنوان محیط‌کشتی ارزان و از سوی دیگر به عنوان محیطی برای شناسایی میکروارگانیسم‌های خاص و استفاده از آن‌ها بهره برد [۸].

مخمرها حدود ۳۶/۶ درصد از قارچ‌های لیپولیتیک جداسازی شده از ۳ نوع ضایعات کارخانجات صنایع غذایی را تشکیل می‌دادند. [۹]. پاسکویکوز (۲۰۰۱) ۱۵۵ گونه قارچ لیپولیتیک را از ضایعات مختلف صنعتی و کشاورزی جداسازی کرد. و فعالیت لیپاز آن‌ها را به صورت کمی و کیفی مورد بررسی قرار داد. وی گزارش کرد که قارچ‌های لیپولیتیک فراوانی در این آزمایشات شناسایی شدند که در بعضی از موارد دارای فعالیت لیپولیتیکی فوق العاده بالایی بودند، که می‌توان پس از بررسی‌های مربوط به بهینه‌سازی تولید آنزیم لیپاز در آن‌ها، از آن‌ها برای تولید لیپاز در مقیاس صنعتی استفاده نمود [۱۱].

کاربرد بالای لیپاز در مراکز صنعتی، نیاز به کشف منابع جدید تولید لیپاز با خواص کاتالیزوری مختلف را طلب می‌نماید [۸]. هدف از این پژوهش آزمایشگاهی، جداسازی و شناسایی مخمرهای لیپولیتیک بومی موجود در کنجاله کنجد استان یزد و بررسی پتانسیل تولید لیپاز آن‌ها در یک محیط‌کشت و همچنین معرفی یک میکروارگانیسم بومی با پتانسیل مناسب از نظر تولید لیپاز برای کاربرد در صنایع مختلف است.

۲- مواد و روش‌ها

تهیه کنجاله کنجد

نمونه‌برداری در آبان ماه ۱۳۹۲ از کارگاه‌های تولید روغن کنجد استان یزد انجام پذیرفت و پنج نمونه کنجاله کنجد به صورت تصادفی انتخاب شده و برای جداسازی مخمرهای لیپولیتیک استفاده شد.

جداسازی مخمرهای موجود در کنجاله کنجد

آماده سازی نمونه: جهت آماده‌سازی نمونه‌ها ابتدا ۱۰ گرم از هر نمونه کنجاله کنجد وزن شده و به ارلن حاوی ۹۰ سی سی سرم فیزیولوژی منتقل شد (رقت 10^{-1}). بدین ترتیب رقت‌های ۲-۱۰ و ۳-۱۰ نیز تهیه شدند. سپس از رقت‌های تهیه شده بر روی محیط کشت Potato Dextrose Agar کشت سطحی داده شد و پلیت‌ها در دمای 25°C به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از این مرحله پس از بررسی میکروسکوپی و میکروسکوپی ایزوله‌ها پلیت‌ها شمارش کلی کپک و مخمر شده و از مخمرها کشت خالص تهیه شد [۱۲].

غربال‌گری مخمرهای لیپولیتیک:

محیط کشت توئین ۸۰ آگار به روش بالاجی و همکاران (۲۰۱۲) تهیه شد. این محیط کشت شامل ترکیبات توئین-۸۰: ۱۰ سی سی، پپتون: ۱۰ گرم، NaCl: ۵ گرم، $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: ۰/۱ گرم، و آگار: ۲۰ گرم در هر لیتر آب مقطر و $\text{pH} = 6$ بود. همچنین معرف رودامین B (۰/۰۰۱٪) به محیط کشت اضافه شد. این محیط کشت در پتری‌دیش‌های با قطر مناسب ریخته و در آن چاهک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر ایجاد شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت محیط کشت به چاهک‌ها اضافه و پتری‌دیش‌ها در دمای 25°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. ایجاد هاله اطراف چاهک‌ها نشان دهنده فعالیت لیپولیتیکی آن‌ها بود. بنابراین قطر هاله اطراف چاهک‌ها برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. مخمرهایی که هاله واضح و مشخصی در این محیط ایجاد کردند به عنوان مخمرهای لیپولیتیک انتخاب شدند [۱۳]. مخمرهای لیپولیتیک با استفاده از مشاهدات مرفولوژیکی کلنی و سلولی و همچنین تخمیر قند و استفاده از منابع کربن و نیتروژن تا حد جنس و گونه بر اساس سیستم شناسایی Kreger-van

Rij شناسایی شدند [۱۱]. به دنبال این مرحله مخمرهای لیپولیتیک

برای بررسی پتانسیل تولید لیپاز مورد آزمایش قرار گرفتند.

آماده‌سازی سوپرناتانت محیط کشت: مخمرها به‌طور

مجزا به محیط کشت Cezapek Dox Broth ساخت شرکت مرک آلمان حاوی ۱٪ (w/v) روغن کنجد (ترکیبات محیط کشت CDB شامل NaNO_3 : ۲ گرم، $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$: ۱ گرم، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: ۰/۵ گرم، KCl: ۰/۵ گرم، FeSO_4 : ۰/۰۱ گرم در هر لیتر آب و pH برابر با ۷ تنظیم شد) تلقیح شد و محیط‌های کشت در دمای 25°C به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شد. سپس برای تهیه سوپرناتانت محیط کشت، محیط کشت‌ها در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و از فیلتر کاغذی واتمن شماره ۱ عبور داده شدند. مایع عبوری به‌عنوان سوپرناتانت محیط کشت استفاده شد [۱۳].

بررسی امکان تولید آنزیم لیپاز در مخمرهای

لیپولیتیک جداسازی شده از کنجاله کنجد

مخمرهای لیپولیتیک جداسازی شده از کنجاله کنجد در محیط-کشت Cezapek Dox Broth به همراه ۱٪ (w/v) روغن کنجد تلقیح شدند و تحت شرایط دمای 25°C و دور ۲۰۰ rpm به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند.

اندازه‌گیری کمی فعالیت لیپاز به روش رنگ-

سنجی

در این روش از پارانیتروفنیل پالمیتات (pNPP) به‌عنوان سوبسترای آنزیم لیپاز برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی استفاده شد. که محصول نهایی هیدرولیز این سوبسترا، اسیدچرب و پارانیتروفنول (pNP) است. پارانیتروفنول رنگ زردی ایجاد می‌نماید که در طول موج ۴۱۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر قابل اندازه‌گیری است.

محلول سوبسترا با اضافه کردن محلول A (شامل محلولی با غلظت ۱۶/۵ mM از پارا نیترو فنیل پالمیتات ساخت شرکت سیگما در ۱۰ میلی لیتر ایزوپروپانول) به محلول B (شامل ۵۰ mM بفر تریس HCl با pH برابر ۸ محتوی، ۰/۴٪ تریتون $\text{X}=100$ و ۰/۱٪ صمغ عربی) به نسبت ۱ به ۹ آماده گردید. محلول آنزیم نیز بعد سانتریفیوژ محیط کشت و جداکردن ذرات و

در این پژوهش مخمرهای ایزوله شده از کنجاله کنجد که دارای فعالیت لیپولیتیکی بودند، غربال‌گری شدند. ۲۷ نوع میکروارگانیزم از ۵ نمونه کنجاله کنجد تهیه شده، جداسازی شد. که پس از بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها، از این تعداد ۱۱ گونه مربوط به کپک‌ها و ۱۶ گونه مربوط به مخمرها بودند. در بررسی‌های بیوشیمیایی مشخص شد که ۴ گونه مخمر از مخمرهای ایزوله شده از کنجاله کنجد، دارای فعالیت لیپولیتیکی بودند. مخمرهای تولیدکننده لیپاز بعد از غربال‌گری بر روی محیط‌کشت انتخابی توئین ۸۰ آگار با تشکیل هاله واضح در اطراف چاهک‌ها به‌علت هیدرولیز توئین ۸۰ توسط آنزیم لیپاز تولید شده و تشکیل کمپلکس اسید چرب آزاد شده با معرف رنگی و نمایان شدن رنگ نارنجی فلورسانس، با توجه به مشخصات میکرو و مرفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی در حد جنس و گونه به شرح زیر *Sporidiobolus pararoseus*، *Cryptococcus*، *Sporobolomyces salmonicolor* و *Yarrowia lipolytica* شناسایی شدند. جدول ۱ شمارش کلی کپک و مخمر در هر نمونه، تعداد مخمر جداسازی شده از هر نمونه و تعداد مخمر لیپولیتیک جدا شده از کنجاله کنجد را نشان می‌دهد. همچنین جدول ۲، pH پنج کنجاله کنجد انتخاب شده را نشان می‌دهد.

جدول ۲ pH کنجاله های کنجد نمونه برداری شده

شماره نمونه کنجاله کنجد	pH
A	۶/۸۱۵ ± ۰/۰۷۷۷۸ a
B	۶/۵۸۵ ± ۰/۰۷۷۷۸ a
C	۵/۷۴۵ ± ۰/۰۹۱۹۲ b
D	۶/۶۶۵ ± ۰/۰۷۷۷۸ a
E	۵/۹۰۵ ± ۰/۱۶۲۶۳ b

سلول‌ها با استفاده از فیلتر کاغذی واتمن شماره ۱ تهیه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم به ۹۰۰ میکرولیتر از محلول سویسترا اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C، جذب پارانیتروفنول در طول موج ۴۱۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر UV/Vis مدل Lightwave S2000 خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم برابر است با مقداری از آنزیم که یک میکرومول پارانیتروفنول را از سویسترا در هر دقیقه آزاد کرده است [۱۳].

طرح آماری

در این پژوهش آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت و از طرح آماری کاملاً تصادفی استفاده شد. داده‌ها به‌وسیله نرم افزار SPSS16.0 مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. همچنین مقایسه نتایج با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی مخمرهای لیپولیتیک:

جدول ۱ شمارش کلی کپک و مخمر در هر نمونه و تعداد کل مخمر و

تعداد مخمر لیپولیتیک جداسازی شده از هر نمونه

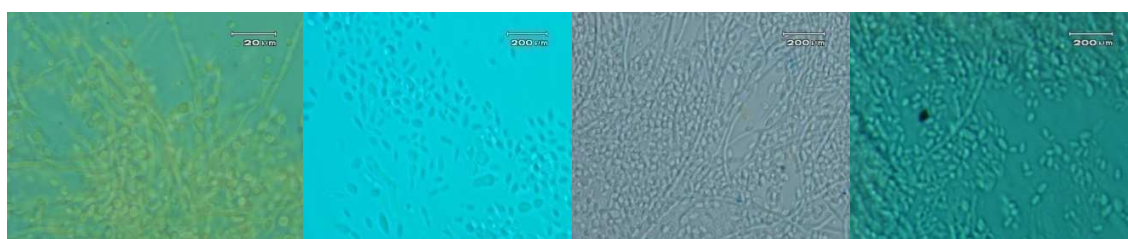
شماره نمونه کنجاله کنجد	شمارش کلی (cfu/gram)	تعداد مخمر انتخاب شده از هر نمونه	تعداد مخمر لیپولیتیک جدا شده	کد مخمر اختصاص داده شده
A	۲۹۰	۳	۱	A ₁
B	۲۲۰	۵	۲	B ₁ , B ₂
C	۳۳۰	۲	۰	
D	۱۴۱۰	۲	۱	D ₁
E	۱۰۰	۴	۰	

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود از کنجاله‌های کنجد
 مخمر لیپولیتیک جداسازی نشد. جدول ۳ مشخصات و
 ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی مخمرهای لیپولیتیک
 جدا شده از کنجاله کنجد را نشان می‌دهد. شکل ۱ و شکل ۲
 عکس میکروسکوپی و ماکروسکوپی از مخمرهای لیپولیتیک
 ایزوله شده را نشان می‌دهند.

جدول ۳ مشخصات مربوط به مخمرهای لیپولیتیک جدا شده از کنجاله کنجد

منبع	شناسایی احتمالی	مشخصات میکروسکوپی (شکل سلول)	ظاهر کلنی روی آگار (رنگ و بافت)	کد مخمر
[۱۴]	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	بیضی، کوچک و تشکیل میسلیم ضخیم بعد از سه روز	کرم، گرد با حاشیه شعاعی و شاخه‌ای و برجسته	A ₁
[۱۴]	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	دایره‌ای، کوچک تا متوسط و تشکیل میسلیم باریک بعد از سه روز	کرم، گرد با حاشیه شعاعی و شاخه‌ای و برجسته	B ₁
[۱۱]	<i>Cryptococcus albidus</i>	بیضی و بزرگ و بدون تشکیل میسلیم	کرم، گرد با حاشیه برجسته و موج‌دار و محدب	B ₂
[۱۵]	<i>Yarrowia lipolytica</i>	بیضی، بزرگ و تشکیل میسلیم کاذب بعد از سه روز	سفید تا شیری، بافت: کره‌ای، با الگوی لبه کریستالی، برجسته و حاشیه موج‌دار	D ₁



شکل ۱ عکس میکروسکوپی از مخمرهای لیپولیتیک جداسازی شده به ترتیب از چپ به راست: A₁، B₁، B₂، D₁ (توسط میکروسکوپ نوری مدل OLYMPUS BX41 با بزرگنمایی ۱۰۰)



شکل ۲ کلنی مخمرهای لیپولیتیک جداسازی شده به ترتیب از چپ به راست: A₁، B₁، B₂، D₁

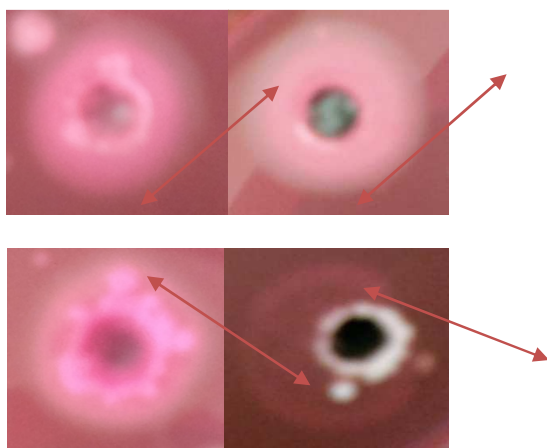
جدول ۴ نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده تخمیر قند و استفاده از منابع کربن و نیتروژن توسط مخمرهای لیپولیتیک غربال‌گری شده

<i>Yarrow lipolytica</i>			<i>Cyctococcus albidus</i>			<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>			<i>Sporidiobolus pararoseus</i>			قند
مرجع	مصرف	تخمیر	مرجع	مصرف	تخمیر	مرجع	مصرف	تخمیر	مرجع	مصرف	تخمیر	
+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	گلوکز
v	+	-	v	w	-	v	v	-	+	v	-	گالاکتوز
-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	ساکاروز
-	-	-	+	+	-	v	+	-	+	+	-	مالتوز
-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	w	-	لاکتوز
-	w	-	+	+	-	v	x	-	+	+	-	رافینوز
-	+	-	x	+	-	+	+	-	+	+	-	تری‌هالوز
-	-	-	v	-	-	v	-	-	v	-	-	نشاسته
-	-	-	v	w	-	-	-	-	-	-	-	ملی بیوز
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	متانول
+	x	-	x	w	-	+	x	-	+	x	-	اتانول
+	+	-	v	+	-	v	w	-	+	+	-	گلیسرول
+	x	-	v	w	-	-	-	-	-	-	-	اریترول
-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	نیترات
+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	اوره آز

v: متغیر، w: ضعیف، x: مثبت یا ضعیف، +: مثبت، -: منفی

در جدول ۵ نسبت قطر هاله به قطر چاهک ایجاد شده در محیط-کشت توئین ۸۰ آگار آورده شده است. همانطور که مشاهده می-شود دامنه نسبت قطر هاله به قطر چاهک ایجاد شده بین ۲/۳۱۲۵±۰/۰۸۸۳۹ - ۲/۷۱۴۰±۰/۲۰۲۲۳ می‌باشد. هرچند اختلاف معنی‌داری (در سطح ۹۵ درصد) در نتایج مشاهده نشد ولی با این حال مخمر *Sporobolomyces salmonicolor* و *Sporidiobolus pararoseus* (۲/۷۱۴۰±۰/۲۰۲۲۳) و *Sporidiobolus pararoseus* (۲/۵۶۲۵±۰/۶۱۸۷۲) بیشترین قطر هاله را ایجاد کردند. و سپس به ترتیب *Yarrow lipolytica* با نسبت قطر هاله به قطر چاهک ۲/۴۹۹۹±۰/۲۲۶۹۸ و در نهایت *Cryptococcus albidus* با نسبت قطر هاله به قطر چاهک ۲/۳۱۲۵±۰/۰۸۸۳۹ قرار داشتند. در این شرایط هرچه هاله واضح‌تر و همچنین بزرگتر باشد، نشان‌دهنده فعالیت لیپولیتیکی بیشتر میکروارگانیسم مورد نظر است [۱۶].

در جدول ۵ نسبت قطر هاله به قطر چاهک ایجاد شده در محیط-کشت توئین ۸۰ آگار آورده شده است. همانطور که مشاهده می-شود دامنه نسبت قطر هاله به قطر چاهک ایجاد شده بین ۲/۳۱۲۵±۰/۰۸۸۳۹ - ۲/۷۱۴۰±۰/۲۰۲۲۳ می‌باشد. هرچند اختلاف معنی‌داری (در سطح ۹۵ درصد) در نتایج مشاهده نشد ولی با این حال مخمر *Sporobolomyces salmonicolor* و *Sporidiobolus pararoseus* (۲/۷۱۴۰±۰/۲۰۲۲۳) و *Sporidiobolus pararoseus* (۲/۵۶۲۵±۰/۶۱۸۷۲) بیشترین قطر هاله را ایجاد کردند. و سپس به ترتیب *Yarrow lipolytica* با نسبت قطر هاله به قطر چاهک ۲/۴۹۹۹±۰/۲۲۶۹۸ و در نهایت *Cryptococcus albidus* با نسبت قطر هاله به قطر چاهک ۲/۳۱۲۵±۰/۰۸۸۳۹ قرار داشتند. در این شرایط هرچه هاله واضح‌تر و همچنین بزرگتر باشد، نشان‌دهنده فعالیت لیپولیتیکی بیشتر میکروارگانیسم مورد نظر است [۱۶].



جدول ۵ نسبت قطر هاله به قطر چاهک ایجاد شده در محیط‌کشت توئین ۸۰ آگار برای هر مخمر لیپولیتیک

مخمر	نسبت قطر هاله به قطر چاهک
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	۲/۵۶۲۵ ± ۰/۶۱۸۷۲ ^a
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	۲/۷۱۴۰ ± ۰/۲۰۲۲۳ ^a
<i>Cryptococcus albidus</i>	۲/۳۱۲۵ ± ۰/۰۸۸۳۹ ^a
<i>Yarrow lipolytica</i>	۲/۴۹۹۹ ± ۰/۲۲۶۹۸ ^a

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

شکل ۳ ایجاد هاله در اطراف چاهک‌ها به ترتیب از چپ به

راست مخمرهای D_1 ، B_2 ، B_1 ، A_1

نتایج نشان می‌دهد که تعداد مخمرهای لیپولیتیک جدا شده از کنجاله‌های مختلف روغنی متفاوت است و به نوع محیط کشت و سوبسترای مورد استفاده بستگی زیادی دارد. تعداد کم مخمر جدا شده از کنجاله کنجد می‌تواند به علت تیمارهای حرارتی که در طول فرایند روغن‌گیری صورت می‌پذیرد، مربوط شود. همچنین نبود مخمر لیپولیتیک در کنجاله‌های C و E (جدول ۱ و ۲) می‌تواند به علت pH پایین‌تر آن‌ها در مقایسه با سایر کنجاله‌ها باشد [۹].

بررسی امکان تولید آنزیم لیپاز در مخمرهای

لیپولیتیک جداسازی شده از کنجاله کنجد

اندازه‌گیری فعالیت لیپاز به روش فتومتریک یک روش کمی است که با استفاده از سوبسترای پارانیتروفنیل پالمیتات انجام می‌گیرد. جدول ۶ و شکل ۴ فعالیت لیپاز و رشد بیومس مخمرهای لیپولیتیک جدا شده در یک کشت غوطه‌وری در دمای ۳۰°C به مدت ۷ روز را نشان می‌دهند. دامنه فعالیت لیپاز بین ۰/۲۷۲۹۴ ± ۰/۸۶۶۰ - ۰/۲۶۵۸۷ ± ۰/۳۳۳۰ بود. بیشترین فعالیت لیپاز مربوط به *Cryptococcus albidus* با فعالیت لیپازی ۰/۳۳۳۰ ± ۰/۲۶۵۸۷ U/ml و سپس به ترتیب *Yarrow lipolytica* با فعالیت لیپازی ۰/۱۸۸۰۹ ± ۰/۴۶۶۰ U/ml، *Sporidiobolus pararoseus* با فعالیت لیپازی ۰/۲۹۵۵۷ ± ۰/۳۳۳۰ و *Sporobolomyces salmonicolor* با فعالیت لیپازی ۰/۲۷۲۹۴ ± ۰/۸۶۶۰ است. نتایج آنالیز آماری حاکی از این بود که فعالیت لیپازی این ۴ مخمر به روش کمی و همچنین رشد تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد با یکدیگر داشتند.

جداسازی میکروارگانیزم‌های لیپولیتیک از ضایعات مختلفی از قبیل کنجاله سویا، کنجاله زیتون، کنجاله روغن دانه‌های آفتابگردان، کلزا، نارگیل، پالم و همچنین ضایعات آجیل و ... توسط محققان زیادی انجام پذیرفته است [۹، ۱۷، ۱۴، ۱۳ و ۱۸]. چهار مخمر لیپولیتیک جدا شده از کنجاله کنجد استان یزد با بسیاری از تحقیقات صورت پذیرفته، مطابقت داشت.

مخمر *Sporidiobolus pararoseus* توسط سمائیتو و همکاران در سال ۲۰۱۲ از ضایعات کارخانجات مختلف جداسازی شد [۱۹]. همچنین بوسامارا و همکاران (۲۰۱۰) از برگ گیاه چای رز^۷ این گونه مخمر را به همراه چندین گونه دیگر از قبیل *Pseudozyma hubeiensis* و *Debaryomyces occidentalislike* جداسازی کردند [۲۰].

بوسامارا و همکاران همچنین از برگ گیاه چای رز، مخمر *Sporobolomyces salmonicolor* را جداسازی نمودند [۲۰]. در میان مخمرهای جداسازی شده توسط ثابت و همکاران (۲۰۱۲) از فاضلاب کنجاله روغن آفتابگردان در هند مخمر *Sporobolomyces salmonicolor* بیشترین فعالیت لیپولیتیکی را نشان داد [۱۴].

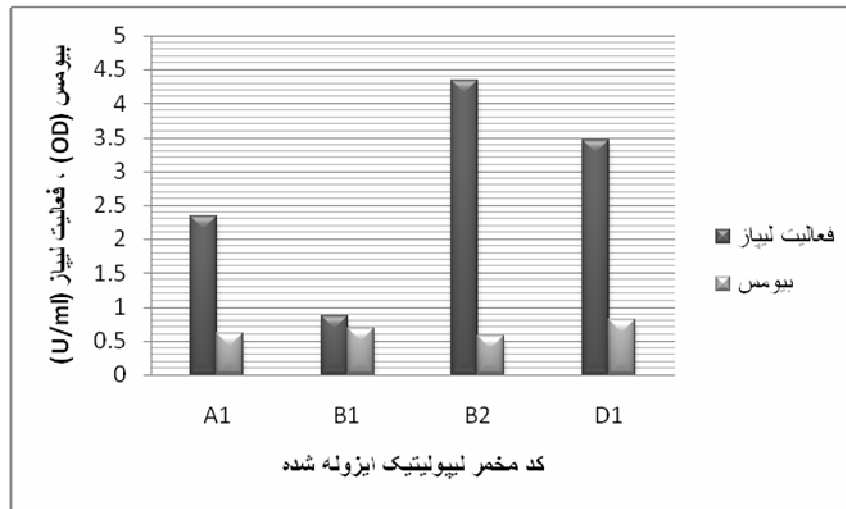
مخمر *Cryptococcus albidus* توسط تیواری و همکاران در سال ۲۰۱۱ از نمونه‌های مختلف غنی از روغن ذخیره شده در سوله انبار در هند جداسازی شد [۲۱]. همچنین گونه دیگر این جنس *cryptococcus kutzing* نیز از انواع ضایعات کارخانجات صنعتی، داروسازی و غذایی به همراه *Pichia hansen Zygosacharomyces barker* و *Candida berkhout* توسط پاسکویکوز در سال ۲۰۰۱ جداسازی شد [۱۱]. مخمر *Yarrow lipolytica* نیز توسط پاسکویکوز از انواع ضایعات کارخانجات صنعتی، داروسازی و غذایی جداسازی و غربال‌گری شد [۱۱].

7. Hibiscus rosa-sinensis

جدول ۶ فعالیت لیپاز و رشد بیومس مخمرهای لیپولیتیک جدا شده در یک کشت غوطه‌وری در دمای ۳۰°C به مدت ۷ روز

مخمر	فعالیت لیپاز U/ml	رشد (جذب در ۶۰۰nm)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	۲/۳۳۳۰±۰/۲۹۵۵۷a	۰/۶۰۲۰±۰/۰۰۰۰۰a
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	۰/۸۶۶۰±۰/۲۷۲۹۴b	۰/۶۸۳۰±۰/۰۰۴۲۴b
<i>Cryptococcus albidus</i>	۴/۳۳۳۰±۰/۲۶۵۸۷c	۰/۵۷۷۰±۰/۰۰۹۸۹c
<i>Yarrow lipolytica</i>	۳/۴۶۶۰±۰/۱۸۸۰۹d	۰/۸۰۶۰±۰/۰۰۷۰۷d

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۴ فعالیت لیپاز و رشد بیومس مخمرهای لیپولیتیک جدا شده در یک کشت غوطه‌وری در دمای ۳۰°C به مدت ۷ روز

نیز از این سوبسترا برای تعیین فعالیت واقعی لیپاز تولید شده توسط مخمرها استفاده شد. به هر حال در میان روش‌های موجود برای اندازه‌گیری فعالیت لیپاز این روش یک روش رایج و معتبری گزارش شده است [۱۶]. با توجه به آنچه ذکر شد و نتایج به دست آمده، مخمر *Cryptococcus albidus* در این میان فعالیت لیپولیتیکی بیشتری را نشان داد.

جدول ۵ نشان می‌دهد هرچند *Cryptococcus albidus* بیشترین فعالیت لیپاز را نشان داده است ولی دارای کمترین رشد بیومس می‌باشد. در مقابل مخمر *Yarrow lipolytica* هم رشد بیومس و هم فعالیت لیپازی خوبی را از خود نشان داد. این می‌تواند نشان دهنده این موضوع باشد که آنزیم لیپازی که توسط مخمر *C. albidus* در یک حجم معین نسبت به سایر مخمرها تولید شد، کمتر است (به علت رشد کمتر مخمر) ولی فعالیت آن نسبت به سایر آنزیم‌های لیپاز تولید شده در حجم معین بیشتر است. این نتایج نیز با نتایج ثابت و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت

لیپازها عموماً آنزیم‌های القاشونده هستند و برای تولید آنزیم لیپاز حضور ماده القاکننده مانند روغن‌ها ضروری است [۲۰]. در اندازه‌گیری کیفی فعالیت لیپاز، متابولیت‌های اسیدی و استرآزهای تولید شده توسط آن‌ها، کاهش pH و در نتیجه تغییر رنگ معرف می‌تواند به نتایج مثبت کاذبی منجر شود. به همین دلیل اندازه‌گیری کیفی به تنهایی برای نشان دادن فعالیت لیپولیتیکی یک میکروارگانیسم کافی نمی‌باشد. و تنها برای غربال‌گری اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین محققان فعالیت لیپازی مخمرهای لیپولیتیک مثبت به دست آمده از اندازه‌گیری کیفی را در ادامه با استفاده از روش‌های کمی اندازه‌گیری می‌کنند، تا به نتایج دقیق‌تری دست یابند [۲۲].

در این میان لیپازها به طور محسوسی علاقه دارند تا آلکیل‌های بلند زنجیر را هیدرولیز کنند. اخیراً محققان پیشنهاد می‌کنند که از سوبستراهای سنتزی بلند زنجیر مانند پارانیتروفنیل پالمیتات برای اندازه‌گیری فعالیت حقیقی لیپاز استفاده شود [۲۰]. در این تحقیق

باشد [۲۳]. همچنین این نکته نیز قابل ذکر است که فرایند متابولیسم میکروبی و مقدار فعالیت کاتالیزوری آنزیم تولید شده به ترکیبات محیط کشت و شرایط رشد مخمر بستگی دارد [۱۱].

۴- نتیجه گیری

کنجاله کنجد محیط مناسبی برای جداسازی مخمرهای لیپولیتیک است. همچنین مخمرهای لیپولیتیک بسته به نوع آنزیم لیپازی که تولید می‌کنند می‌توانند فعالیت لیپازی مختلفی در برابر سوبستراهای مختلف داشته باشند. در این پژوهش تنها به بررسی پتانسیل تولید لیپاز این مخمرها اکتفا گردید. که ایزوله‌های *Cryptococcus albidus* و *Yarrow lipolytica* بیشترین فعالیت لیپاز را نشان دادند. هرچند *C. albidus* دارای بیشترین فعالیت لیپازی بود ولی رشد کمی را نشان داد. صنعت به میکروارگانیزم‌هایی نیاز دارد که به همراه فعالیت لیپازی بالا، رشد بیوس با لایی را نیز داشته باشند. مخمر *Yarrow lipolytica* در این زمینه نتایج رضایت‌بخشی را نشان داد. امید است در پژوهش‌های آتی بر روی بهینه‌سازی پارامترهای محیطی تاثیرگذار از قبیل pH، دما، دور هم‌زن، شدت هوادهمی و ... در تولید آنزیم لیپاز توسط این مخمر تمرکز کرده و حتی خلص‌سازی آنزیم تولید شده و بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی لیپاز تولید شده در ادامه بررسی گردد.

۵- قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به‌عنوان کمک‌های مادی و معنوی صورت گرفته در راستای انجام طرح پژوهشی پایان‌نامه با کد ۳/۲۹۵۹۱ و همچنین از سرکار خانم مهندس افشاریان و آقای مهندس بهروز علیزاده بهبهانی که در انجام آزمایش‌ها ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

۶- منابع

[1] Qamsari, Mobarak.E., Kermanshahi, R. kasra, Moosavi nejad, Zahra., 2011, Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*

داشت. ثابت و همکاران ۲۶ گونه مخمر لیپولیتیک از کنجاله روغن‌های مختلف جداسازی کردند. در میان مخمرهای لیپولیتیک جداسازی شده گونه جدید *Sporobolomyces salmonicolor* دارای بیشترین فعالیت لیپازی با $8/2 U/ml$ بود. نتایج حاصله گزارش شده توسط آن‌ها نشان داد که فعالیت لیپاز در حالت اندازه‌گیری کیفی که همان بیشترین نسبت قطر هاله به چاهک می‌باشد، در گونه‌های مختلف لیپولیتیک جداسازی شده با فعالیت لیپازی به صورت کمی در شرایط کشت غوطه‌وری باهم متفاوت بود [۱۴].

در پژوهشی که توسط پلووا و همکاران صورت پذیرفت، فعالیت آنزیم لیپاز تولید شده توسط میکروارگانیزم‌های مختلف از قبیل باکتری، مخمر و قارچ‌ها را با استفاده از سوبستراهای مختلف از قبیل توئین ۸۰، پارا نیتروفنیل استات، پارا نیتروفنیل بورات، تری‌بوتیرین، تری‌اولئین و روغن زیتون مقایسه شد. نتایج حاکی از آن بود که فعالیت لیپاز تولید شده توسط یک گونه با استفاده از سوبستراهای مختلف، به گونه‌ی قابل توجهی متفاوت است [۲۳]. تان و لئونگ نیز که از سوبستراهای پارا نیتروفنیل‌کاپریلات، مریستات و پالمیتات برای جداسازی قارچ‌های لیپولیتیک سه نوع ضایعات مختلف صنایع غذایی استفاده نمودند، نتایج مشابهی را گزارش کردند. بر طبق گزارش آن‌ها در هر سه سوبسترا فعالیت لیپاز تولید شده توسط قارچ‌ها مثبت گزارش شد. ولی فعالیت لیپاز در دو سوبسترای p نیتروفنیل‌کاپریلات و مریستات بیشتر نمایان شده بود [۹].

بوسامارا و همکاران در سال ۲۰۱۰ دو سوبسترای ارزان قیمت روغن سویا و چربی گاو، برای استفاده به عنوان محرک تولید لیپاز از مخمرهای جداسازی شده از برگ گیاه چای رز را مورد مقایسه قرار دادند. مخمر *Debaryomyces occidentalis-like* در محیط کشت حاوی روغن سویا، و مخمر *Cryptococcus sp. HB87* 2 در محیط کشت حاوی چربی گاو به عنوان محرک، بیشترین فعالیت لیپازی را از خود نشان دادند [۲۰].

این نتایج به‌عنوان توانایی متفاوت مخمرها در هیدرولیز سوبستراهای مختلف استفاده شده در دو روش است. به گونه‌ای که بسته به سوبسترای استفاده شده به‌عنوان محرک تولید لیپاز در محیط کشت، مقدار آنزیم تولید شده و همچنین توانایی آنزیم تولید شده در هیدرولیز سوبسترای مورد نظر متفاوت می‌-

- [12] Haliru, Musa, Bukola, Christianah, Adebayo-Tayo, 2012, Screening of microorganisms isolated from different environmental samples for extracellular lipase production. Assumption University Journal of Technology. 15(3): 179-186
- [13] Balaji, Venkatesagowda, Ebenezer, Ponugupaty, Aneli, M. Barbosa, Robert F. H. Dekker, 2012, Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. World Journal Microbiol Biotechnol, 28:71-80
- [14] Thabet, Habib. M., Pasha, Chand, Ahmad, Md. Maqsood, Linga, Venkateswar. R., 2012, Isolation of Novel Lipases Producing *Sporobolomyces salmonicolor* OVS8 from oil mill spillage and enhancement of lipase production. Jordan Journal of Biological Sciences. 5(4): 301 – 306
- [15] Davin, Sharon., 2003, Identification and characterization of *Yarrowia lipolytica* RP2 growing on tallow. BSc Thesis, School of Biotechnology, Dublin City University
- [16] Hasan, Fariha., Ali Shah, Aamer., Hameed, Abdul., 2009, Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. Biotechnology Advances. 27 :782-798
- [17] Adinarayana, K., Ragu., B.K.S.N., Zargar, M.I., Devi, R.B., Lakshmi, P.J., Ellaiah, P., 2004. Optimization of process parameters for production of lipase in solid state fermentation by newly isolation *Aspergillus* species . Indian Journal of Biotechnology. 3: 65-69
- [18] Praveen Kumar, A., Jaya Kumar, K., Narasimah, G., 2012. Isolation of lipase producing fungi from groundnut oil mill effluent soil site at Nandyal. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 3(4): 275-280
- [19] Smaniotto, Alessandra., Skovronski, Aline., Rigo, Elisandra., Tsai, Siu. Mui., Durrer, Ademir., Foltran, Lillian. Liva., Luccio, Marco. Di., Oliveira, J. Vladimir., Oliveira, Debora. Di., Treiche, Helen., 2012. Synthetic lipase: production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by Submerged Fermentation. Brazilian Journal of Microbiology. 6(2):1490-1498
- KMI10*. Iranian journal of microbiology. 3(2). 92-98
- [2] Sumanjelin, Bale., Ramachandra, Rao., Satish Babu, Ratakonda., 2013, Isolation, characterization of lipase producing bacteria from crude rice bran oil and optimization studies by response surface methodology (RSM). Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. An International Peer Review E-3 Journal of Sciences. 3(1): 289-296
- [3] Ramachandran, Sumitra., Singh, S. K., Larroche, Ch., Soccol, C.R., Pandey, Ashok., 2007, Oil cakes and their biotechnological applications—A review. Bioresource Technology. 98: 2000-2009
- [4] Zouaoui, Benattuche., Bouziane, Abbouni., 2011, Isolation, Optimisation and purification of lipase production by *Pseudomonas Aeruginosa*. Journal Biotechnol Biomaterial. 7(1): 345-351
- [5] Kumar, Mukesh., Rejitha. S., Devika, M., Balakumaran, A., Immaculate, N. R., and Kalaichelvan, P., 2012, Production, optimization and purification of lipase from *Bacillus sp. MPTK 912* isolated from oil mill effluent. Pelagia Research, Library, Advances in Applied Science Research, 3 (2):930-938
- [6] Vakhlu, Jyoti, Kour, Avneet, 2006, Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic Journal of Biotechnology. 9(1) :214 - 223
- [7] Aravindan, Rajendran., Anbumathi, Palanisamy., Viruthagiri, Thangavelu., 2007. Lipase applications in food industry. Indian Journal of Biotechnology. 6: 141-158
- [8] Thakur, sumita., 2012, Lipases, its sources, properties and applications: A Review. International Journal of Scientific & Engineering Research. 3(7):147-154
- [9] Tan, T.K., Leong, W.F., 1986, Screening for extracellular enzymes of fungi from manufacturing wastes. Mircen Journal. 2: 445-452
- [10] Yazd agriculture jahad organization. Statistical information. yazd.agri-jahad.ir, visited:2014/2/04
- [11] Paskevicius, Adomas., 2001, Lipase activity of yeasts and yeast-like fungi functioning under natural conditions. Biologija Journal, 4:166-170

- [22]Gupta,Rani., Rathi,Pooja., Gupta, Namita., Bradoo,Sapna., 2003, Lipase assays for conventional and molecular screening:an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 37:63–71
- [23]Plou, Francisco.J., Ferrer, Manuel., Nuero, Oscar.M., Calvo, Maria.V., Alcalde, Miguel., Reyes, Fuensanta., Ballesteros, Antonio., 1998, Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnology Techniques*12(3): 183–186
- [20]Bussamara,Roberta., Fuentefria, Agexander. Meneghello., Oliveira,Eder. Silva.De., Broetto.Leonardo., Simcikova. Michaela., Valente,Patricia., Schrank.Augusto .,Vainstein.Marilene. Henning., 2010. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*.101: 268–275
- [21]Tiwari,Prakash., Upadhyay.Mukesh.K., Silawat.Nipun., and Verma. H. N., 2011. Optimization and characterization of a thermo tolerant lipase from *Cryptococcus albidus*. *Der Pharma Chemica*, 3 (4):501-508

Isolation and identification of lipolytic yeasts from sesame meal of Yazd province and determination the potential of lipase production by them

Zare Baghi Abad, V. ¹, Tabatabai Yazdi, F. ^{2*}, Mortazavi, S. A. ³, Varidi, M. ⁴

1. M Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Associate Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
4. Assistant Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 93/2/23 Accepted: 93/7/8)

Today, many studies are doing to identify the lipolytic microorganisms because of the important role of them in the production of microbial lipases. Oilseed meals are a good place to achieve these microorganisms. In this field, yeasts are more important in comparison with other microorganisms. In this study, we isolated 27 types of fungi from Yazd sesame meal. After the evaluation of macro and micro morphological features, it was identified that 16 of them were from yeast group. Lipolytic yeasts were screened using Tween 80 agar medium and were identified to genus and species by colony and cell morphology observations and evaluation of fermentation reactions and the use of carbon and nitrogen sources. 4 lipolytic screened yeasts were included *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Cryptococcus albidus* and *Yarrowia lipolytica*. The ratio of areola diameter to the well diameter was between 2.314 – 2.714. *S. pararoseus* showed the maximum ratio of areola to well diameter (2.714). Lipase activity of these four types of yeasts was measured in submerged cultures with Cezepek Dox medium for 7 days at 30 °C and 200 rpm by using of photometry method and p-nitrophenyl palmitate substrate. Lipase activity range was between 0.866 – 4.333 U/ml, and *Cryptococcus albidus* had the highest lipase activity 4.333 U / ml, while it showed the least biomass growth among other yeasts (OD= 0.577). *Yarrowia lipolytica* showed lipase activity of 3.466 U/ml and also, the highest biomass growth OD =0.806.

Keywords: Sesame meal, Isolated, Lipolytic yeasts, Lipase enzyme

* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir