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
٤- 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 به‌علت 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 پژوهش۲۷ نوع قارچ از کنجاله کنجد استان یزد جدا نمودیم. پس از بررسی مشخصات ماکرو و میکرومرفولوژیکی آن‌ها معلوم شد، ١٦ نوع از آن‌ها از گروه مخمرها بودند. مخمرهای لیپولیتیک با استفاده از محیط‌کشت توئین۸۰ 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 ٤ 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 ٢/٧١٤ - ٢/٣١٤ داشت. مخمر *S. pararoseus* بیشترین نسبت قطر هاله به قطر چاهک (٢/٧١٤) را نشان داد. فعالیت لیپاز این ٤ نوع مخمر در شرایط کشت‌غوطه‌وری با محیط‌کشت Cezepek Dox Broth در دمای ۳۰°C به مدت۷ روز و دور۲۰۰rpm به روش فتومتری با استفاده از سوبسترای پارانیتروفنیل پالمیتات اندازه‌گیری شد. دامنه فعالیت لیپاز بین ٤/٣٣٣-٠/٨٦٦ واحد آنزیمی در میلی-لیتر بود، که مخمر *Cryptococcus albidus* بیشترین فعالیت لیپازی را با U/ml ٤/٣٣٣ داشت، درحالی‌که کمترین رشد بیومس را در مقایسه با سایر مخمرها از خود نشان داد(OD=٠/٥٧٧). مخمر *Yarrowia lipolytica* نیز در مرتبه دوم با فعالیت لیپازیU/ml ٣/٤٦٦ بود، که بیشترین رشد بیومس نیز باOD=٠/٨٠٦ داشت.

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

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]

۱- مقدمه

لیپاز (تری‌گلیسرول‌آسیل‌هیدرولاز EC3.1.1.3) یک کربوکسی-استرآز است که زنجیره‌های آسیل گلیسرول را هیدرولیز و سنتز می‌کند [۱، ۲و 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 کاتالیستی 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 ، ٤ و ٥].

لیپاز مخمرها اکثراً خارج سلولی و مونومریک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی بین ٦٥-۳۳ 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[1]، استری کردن داخلی[2]، الکلیز[3]، اسیدولیز[4]، استری کردن[5] و آمینولیز[6] را کاتالیز می‌کند[٦]. لیپازهای میکروبی در صنعت لبنیات باعث افزایش عطروطعم در شیر، پنیر و کره، در صنعت نانوایی 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 تبادلی مطلوب می‌شوند.

مخمرهای تولید کننده لیپاز شامل جنس و گونه‌های *Candida rugosa*، *Candida tropicalis*، *Candida antarctica*، *Candida cylindracea*، *Candida parapsilopsis*، *Candida deformans*، *Candida curvata*، *Candida valida*، *Yarrowia lipolytica*، *Rhodotorula glutinis*، *Rhodotorula pilimornae*، *Pichia bispora*، *Pichia mexicana*، *Pichia sivicola*، *Pichia burtonii*، *Pichia xylosa*، *Saccharomycopsis crataegenesis*، *Torulaspora globosa* و *Trichosporon asteroids* می‌باشد[۸].

موادی که در کارخانجات مواد غذایی و فعالیت‌های کشاورزی به عنوان ضایعات شمرده می‌شوند در واقع ضایعات به شمار نمی-روند. به عبارت دیگر به آن ها 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 کنجدی به شمار می‌رود. در حال حاضر در استان یزد به طور متوسط روزانه بین ۳۰۰-٤۰۰ تن کنجد مصرف می‌شود. همچنین روزانه ۹۰ هزار تن انواع فرآورده‌های کنجدی از جمله حلوارده، ارده، روغن کنجد و .... در ١٦٠ واحد تولیدی استان یزد تولید می-شود[١٠]. از اینرو روزانه مقدار زیادی کنجاله کنجد تولید می-شود 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 ٣٦/٦ درصد از قارچ‌های لیپولیتیک جداسازی شده از ۳نوع ضایعات کارخانجات صنایع غذایی را تشکیل می-دادند.[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 آن‌هادر یک محیط‌کشت و همچنین معرفی یک میکروارگانیسم بومی با پتانسیل مناسب از نظر تولید لیپاز برای کاربرد در صنایع مختلف است.

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]

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 به‌صورت 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- ۱۰و ۳- ۱۰ نیز تهیه شدند. سپس از رقت‌های تهیه شده بر روی محیط کشت PotatoDextrose Agar کشت سطحی داده شد و پلیت‌ها در دمای°C ۲۵ به مدت ۷ روز گرمخانه-گذاری شدند. بعد از این مرحله پس از بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی ایزوله‌ها پلیت‌ها شمارش کلی کپک و مخمر شده و از مخمرها کشت خالص تهیه شد[۱۲].

غربال‌گری مخمرهای لیپولیتیک:

محیط‌کشت 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، $CaCl_2.2H2O$:۰/۱ گرم، و آگار :۲۰ گرم در هر لیتر آب مقطر وpH= ٦ بود. همچنین معرف رودامین B (۰/۰۰۱ ٪) به محیط‌کشت اضافه شد. این محیط‌کشت در پتری‌دیش‌های با قطر مناسب ریخته و در آن چاهک‌هایی با قطر ٦ میلی‌متر ایجاد شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت محیط‌کشت به چاهک‌ها اضافه و پتری‌دیش‌ها در دمای°C ۲۵ به مدت ٢٤ 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]. به‌دنبال این مرحله مخمرهای لیپولیتیک برای بررسی پتانسیل تولید لیپاز مورد آزمایش قرار گرفتند.

آماده‌سازی سوپرناتانت محیط‌کشت: مخمرها به‌طور مجزا به محیط‌کشت Cezapek Dox Broth ساخت شرکت مرک آلمان حاوی ۱٪(w/v)روغن کنجد (ترکیبات محیط‌کشت CDB شامل $NaNO_3$: ۲ گرم، $K_2H_2PO_4$: ۱ گرم، $MgSo_4.7H_2O$: 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°C ۲۵ به‌مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شد. سپس برای تهیه سوپرناتانت محیط‌کشت، محیط‌کشت‌ها در دورrpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ و از فیلتر کاغذی واتمن شماره ۱ عبور داده شدند. مایع عبوری به‌عنوان سوپرناتانت محیط‌کشت 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 °c۲۵ و دور rpm۲۰۰ به‌مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند.

اندازه گیری 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 می-نماید که در طول موج ٤١٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر قابل اندازه‌گیری است.

محلول سوبسترا با اضافه کردن محلول A (شامل محلولی با غلظت mM ١٦/٥ از پارا نیتروفنیل پالمیتات ساخت شرکت سیگما در ۱۰ میلی لیتر ایزوپروپانول) به محلول B(شامل mM ۵۰ بافر تریس HCl با pH برابر ۸ محتوی، ٠/٤٪ تریتون X=100 و ۰/۱٪ صمغ عربی) به‌نسبت ۱ به ۹ آماده گردید. محلول آنزیم نیز بعد سانتریفیوژ محیط‌کشت و جداکردن ذرات و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]

سلول‌ها با استفاده از فیلتر کاغذی واتمن شماره ۱ تهیه گردید. سپس ۱۰۰میکرولیتر از محلول آنزیم به ۹۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ °c ،جذب پارانیتروفنول در طول موج ٤١٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر UV/Vis مدلLightwave S2000 خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم برابر است با مقداری از آنزیم که یک میکرومول پارا نیتروفنول را از سوبسترا در هر دقیقه آزاد کرده است[۱۳].

طرح آماری

در این پژوهش آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت و از طرح آماری کاملا 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:

در این پژوهش مخمرهای ایزوله شده از کنجاله کنجد که دارای فعالیت لیپولیتیکی بودند، غربال‌گری شدند. ۲۷ نوع میکروارگانیسم 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 ١٦ گونه مربوط به مخمرها بودند. در بررسی‌های بیوشیمیایی مشخص شد که ٤ 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*، *Sporobolomyces salmonicolor*، *Cryptococcus albidus* و *Yarrowia lipolytica* شناسایی شدند. جدول۱ شمارش کلی کپک و مخمر در هر نمونه، تعداد مخمر جداسازی شده از هر نمونه و تعداد مخمر لیپولیتیک جداشده از کنجاله کنجد را نشان می‌دهد. همچنین جدول ۲، pH پنج کنجاله کنجد انتخاب شده را نشان می‌دهد.

جدول ۱ شمارش کلی کپک و مخمر در هر نمونه و تعداد کل مخمر و تعداد مخمر لیپولیتیک جداسازی‌شده 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	١٤١٠	۲	۱	D_1
E	۱۰۰	٤	۰	

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۲ pH کنجاله های کنجد نمونه‌برداری شده

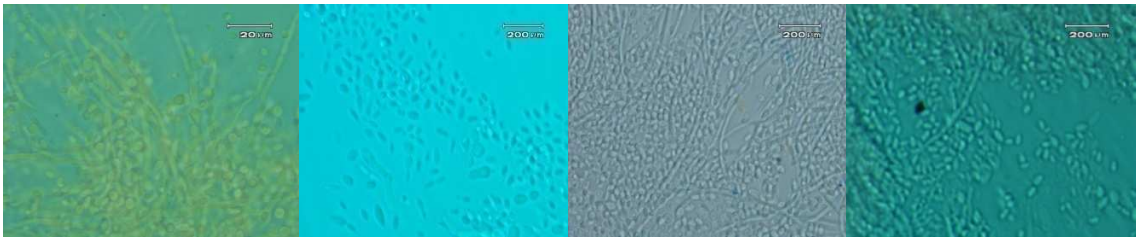
شماره نمونه کنجاله کنجد	pH
A	٦/٨١٥ ±۰/۰۷۷۷۸ a
B	٦/٥٨٥ ±۰/۰۷۷۷۸a
C	٥/٧٤٥ ±۰/۰۹۱۹۲ b
D	٦/٦٦٥ ±۰/۰۷۷۷۸a
E	٥/٩۰٥ ±۰/١٦٢٦٣b

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]

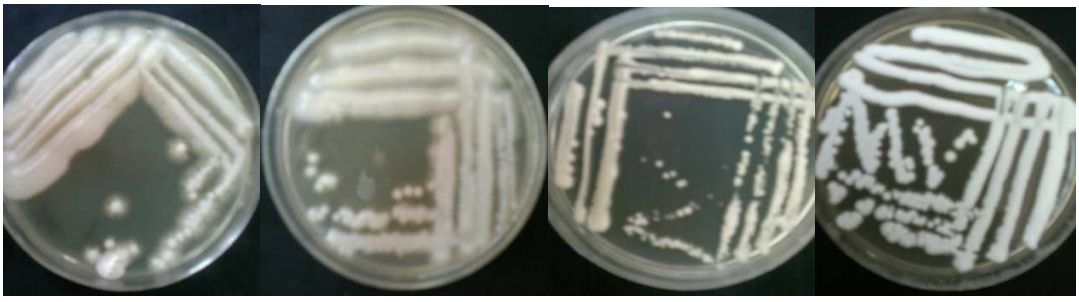
همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود از کنجاله‌های کنجد D وC مخمر لیپولیتیکی جداسازی نشد. جدول ۳ مشخصات و ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی مخمرهای لیپولیتیک جداشده از کنجاله کنجد را نشان می‌دهد. شکل ۱ و شکل ۲ عکس میکروسکوپی و ماکروسکوپی از مخمرهای لیپولیتیک ایزوله شده را نشان می‌دهند.

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

کد مخمر	ظاهر کلنی روی آگار (رنگ و بافت)	مشخصات میکروسکوپی (شکل سلول)	شناسایی احتمالی	منبع
A_1	کرم، گرد با حاشیه شعاعی و شاخه‌ای و برجسته	بیضی ،کوچک و تشکیل میسلیوم ضخیم بعد از سه روز	*Sporidiobolus pararoseus*	[۱٤]
B_1	کرم، گرد با حاشیه شعاعی و شاخه‌ای و برجسته	دایره‌ای، کوچک تا متوسط و تشکیل میسلیوم باریک بعد از سه روز	*Sporobolomyces salmonicolor*	[۱٤]
B_2	کرم، گرد با حاشیه برجسته و موج‌دار و محدب	بیضی و بزرگ و بدون تشکیل میسلیوم	*Cryptococcus albidus*	[۱۱]
D_1	سفید تا شیری، بافت: کره‌ای، با الگوی لبه کریستالی، برجسته و حاشیه موج‌دار	بیضی، بزرگ و تشکیل میسلیوم کاذب بعد از سه روز	*Yarrowia lipolytica*	[۱۵]



شکل ۱ عکس میکروسکوپی از مخمرهای لیپولیتیک جداسازی شده به‌ترتیب از چپ به راست: A_1، B_1 ، B_2 ، D_1 (توسط میکروسکوپ نوری مدل OLYMPUS BX41 با بزرگنمایی ۱۰۰)



شکل ۲ کلنی مخمرهای لیپولیتیک جداسازی شده به‌ترتیب از چپ به راست: A_1، B_1 ، B_2 ، D_1

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]

جدول ٤ نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده تخمیر قند و استفاده از منابع کربن و نیتروژن توسط مخمرهای لیپولیتیک غربال‌گری شده

قند	*Sporidiobolus pararoseus*			*Sporobolomyces salmonicolor*			*Cyptococcus albidus*			*Yarrow lipolytica*		
	تخمیر	مصرف	مرجع	تخمیر	مصرف	مرجع	تخمیر	مصرف	مرجع	تخمیر	مصرف	مرجع
گلوکز	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	+	+
گالاکتوز	–	v	+	–	v	v	–	w	v	–	+	v
ساکاروز	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	-	–
مالتوز	–	+	+	–	+	v	–	+	+	–	–	–
لاکتوز	–	w	–	–	–	–	–	–	v	–	–	–
رافینوز	–	+	+	–	×	v	–	+	+	–	w	–
تری‌هالوز	–	+	+	–	+	+	–	+	×		+	–
نشاسته	–		v		–	v		–	v		–	–
ملی بیوز	–		–		–	-		w	v		–	–
متانول	–		–		–	-		–	–		–	–
اتانول	×		+		×	+		w	×		×	+
گلیسرول	+		+		w	v		+	v		+	+
اریترول	–		–		–	–		w	v		×	+
نیترات	–		-		+	+		+	+		–	–
اوره آز	+		+		+	+		+	+		+	+

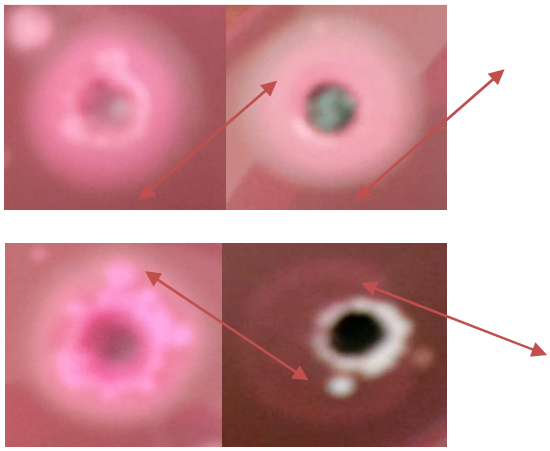
v: متغیر، w: ضعیف، ×: مثبت یا ضعیف، +: مثبت، – : منفی

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 – ۲/۷۱٤۰±۰/۲۰۲۲۳ می‌باشد. هرچند اختلاف معنی‌داری (در سطح۹۵ درصد) در نتایج مشاهده نشد ولی با این حال مخمر *Sporobolomyces salmonicolor* (۲/۷۱٤۰±۰/۲۰۲۲۳) و *Sporidiobolus pararoseus* (۲/۵٦۲۵ ±۰/٦۱۸۷۲) بیشترین قطر هاله را ایجاد کردند. و سپس به ترتیب *Yarrow lipolytica* با نسبت قطر هاله به قطر چاهک ۲/٤۹۹۹±۰/۲۲٦۹۸ و در نهایت *Cryptococcus albidus* با نسبت قطر هاله به قطر چاهک۲/۳۱۲۵±۰/۰۸۸۳۹ قرار داشتند. در این شرایط هرچه هاله واضح‌تر و همچنین بزرگتر باشد، نشان‌دهنده فعالیت لیپولیتیکی بیشتر میکروارگانیسم مورد نظر است[۱٦].

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
Sporidiobolus pararoseus	۲/۵٦۲۵ ±۰/٦۱۸۷۲[a]
Sporobolomyces salmonicolor	۲/۷۱٤۰ ±۰/۲۰۲۲۳[a]
Cryptococcus albidus	۲/۳۱۲۵ ±۰/۰۸۸۳۹[a]
Yarrow lipolytica	۲/٤۱۰۵ ±۰/۲۲٦۹۸[a]

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۳ ایجاد هاله در اطراف چاهک ها به ترتیب از چپ به راست مخمرهای A_1، B_1، B_2، D_1

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]

جداسازی میکروارگانیسم‌های 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 ، ۱٤ ، 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 سمانیتو و همکاران در سال۲۰۱۲ 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*، *Debaryomyces occidentalislike* و *Cryptococcus sp.* 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 تابت و همکاران (۲۰۱۲) از فاضلاب کنجاله روغن آفتابگردان در هند مخمر *Sporobolomyces salmonicolor* بیشترین فعالیت لیپولیتیکی را نشان داد[۱٤].

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 *Zygosacharomyces barker*، *Pichia hansen* 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].

نتایج نشان می‌دهد که تعداد مخمرهای لیپولیتیک جداشده از کنجاله‌های مختلف روغنی متفاوت است و به نوع محیط‌کشت و سوبسترای مورد استفاده بستگی زیادی دارد. تعداد کم مخمر جداشده از کنجاله کنجد می‌تواند به‌علت 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 به‌علت 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 فتومتری یک روش کمی است که با استفاده از سوبسترای پارا نیتروفنیل پالمیتات انجام می‌گیرد. جدول ٦ و شکل ٤ فعالیت لیپاز و رشد بیومس مخمرهای لیپولیتیک جداشده در یک کشت غوطه‌وری در دمای ۳۰°C به مدت ۷ روز را نشان می‌دهند. دامنه فعالیت لیپاز بین ٤/۳۳۳۰±۰/۲٦٥۸۷ –۰/۸٦٦۰±۰/۲۷۲۹٤ بود. بیشترین فعالیت لیپاز مربوط به *Cryptococcus albidus* با فعالیت لیپازی ٤/۳۳۳۰±۰/۲٦٥۸۷ U/ml و سپس به‌ترتیب *Yarrow lipolytica* با فعالیت لیپازی ۳/٤٦٦۰±۰/۱۸۸۰۹ U/ml ، *Sporidiobolus pararoseus* با فعالیت لیپازی۲/۳۳۳۰±۰/۲۹٥٥۷ U/ml و *Sporobolomyces salmonicolor* با فعالیت لیپازی ۰/۸٦٦۰±۰/۲۷۲۹٤ U/ml است. نتایج آنالیز آماری حاکی از این بود که فعالیت لیپازی این ٤ مخمر به روش کمی و همچنین رشد تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد با یکدیگر داشتند.

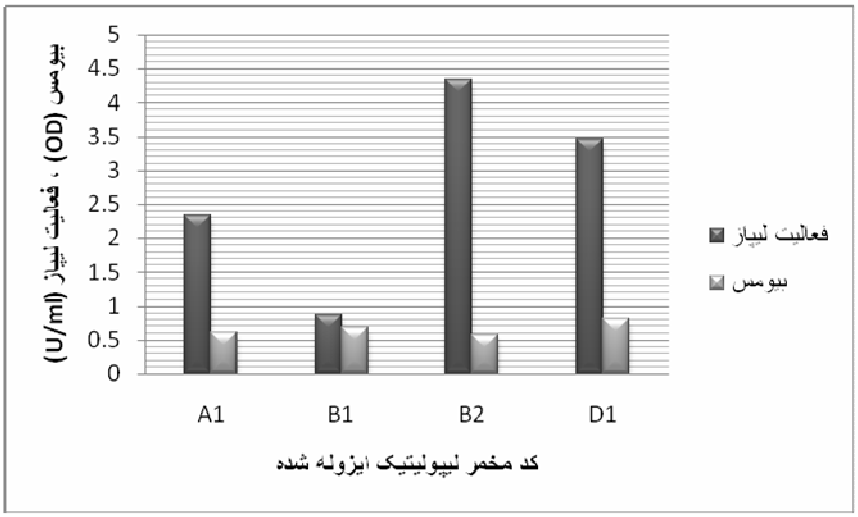
7. Hibiscus rosa-sinensis

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]

جدول ٦ فعالیت لیپاز و رشد بیومس مخمرهای لیپولیتیک جداشده در یک کشت غوطه‌وری در دمای ۳۰°C به مدت ۷ روز

مخمر	فعالیت لیپاز U/ml	رشد(جذب در ٦٠٠nm)
Sporidiobolus pararoseus	۲/۳۳۳۰±۰/۲۹۵۵۷a	۰/٦۰۲۰±۰/۰۰۰۰۰a
Sporobolomyces salmonicolor	۰/۸٦٦۰±۰/۲۷۲۹٤b	۰/٦۸۳۰±۰/۰۰٤۲٤b
Cryptococcus albidus	٤/۳۳۳۰±۰/۲٦۵۸۷c	۰/۵۷۷۰±۰/۰۰۹۸۹c
Yarrow lipolytica	۳/٤٦٦۰±۰/۱۸۸۰۹d	۰/۸۰٦۰±۰/۰۰۷۰۷d

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ٤ فعالیت لیپاز و رشد بیومس مخمرهای لیپولیتیک جداشده در یک کشت غوطه‌وری در دمای ۳۰°C به مدت ۷ روز

لیپازها عموما 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. به‌همین دلیل اندازه‌گیری کیفی به‌تنهایی 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 دقیق-تری 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 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[١٦].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 می-تواند نشان دهنده این موضوع باشد که آنزیم لیپازی که توسط مخمر *C. albidus* در یک حجم معین نسبت به‌سایر مخمرها تولید شد، کمتر است(به‌علت رشد کمتر مخمر) ولی فعالیت آن نسبت به‌سایر آنزیم‌های لیپاز تولید شده در حجم معین بیشتر است. این نتایج نیز با نتایج تابت و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]

داشت. تابت 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 ۸/۲U/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 به‌صورت کمی در شرایط کشت غوطه‌وری باهم متفاوت بود[۱٤].

در پژوهشی که توسط پلووا و همکاران صورت پذیرفت، فعالیت آنزیم لیپاز تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های 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 قارچ های 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 سوبستریp نیتروفنیل‌کاپریلات و مریستات بیشتر نمایان شده بود.[۹].

بوساماراو همکاران در سال ۲۰۱۰ دو سوبسترای ارزان قیمت روغن سویا و چربی گاو، برای استفاده به عنوان محرک تولید لیپاز از مخمرهای جداشده از برگ گیاه چای رز را مورد مقایسه قراردادند. 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 به‌علت 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 محیط‌کشت، مقدار آنزیم تولید شده و همچنین توانایی آنزیم تولید شده در هیدرولیز سوبسترای مورد نظر متفاوت می‌باشد[۲۳]. همچنین این نکته نیز قابل ذکر است که فرایند متابولیکی میکروبی و مقدار فعالیت کاتالیزوری آنزیم تولید شده به ترکیبات محیط کشت و شرایط رشد مخمر بستگی دارد[۱۱].

٤- نتیجه‌گیری

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 میکروارگانیسم‌هایی نیاز دارد که به‌همراه فعالیت لیپازی بالا، رشد بیومس بالایی 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 هوادهی و ... در تولید آنزیم لیپاز توسط این مخمر تمرکز کرده و حتی خالص‌سازی آنزیم تولید شده و بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی لیپاز تولید شده در ادامه بررسی گردد.

٥- قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به‌علت 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 آزمایش ها ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

٦- منابع

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]

KM110.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, Ooptimisation 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]Paskevicus,Adomas., 2001, Lipase activity of yeats and yeast-Llike fungi functioning under natural conditions. Biologija Journal,4:166-170

[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 *Sporidioboluus pararoseus* strain by Submeaged Fermentation. Brazilian Journal of Microbiology. 6(2):1490-1498

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]

[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

[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 Techniques12(3): 183–186

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-01]