بررسی بازدهی تولید آنزیم لیپاز مخمر *Yarrowia lipolytica* DSM3286 تحت تیمارهای مختلف نیتروژنی و زمان تخمیر

وجیهه زارع باقی آباد[1]، فریده طباطبایی یزدی[2*]، سید علی مرتضوی[3]، مهدی وریدی[4]

١- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٢- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٣- 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: ٩٣/٦/١٤ تاریخ پذیرش: ٩٣/٩/٢٦)

Archive of SID

چکیده

مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* مخمر غیرمتعارفی است که توانایی تولید متابولیت‌های مهمی از جمله آنزیم لیپاز را دارد. آنزیم لیپاز میکروبی کاربرد بسیاری در صنایع مختلف از جمله تولید مواد شوینده، صنایع غذایی، داروسازی، سوخت و ... را دارد. در این پژوهش بازدهی تولید آنزیم لیپاز توسط این مخمر و میزان بیومس تولید شده، تحت تیمارهای مختلف منابع نیتروژنی در محیط کشت Czapek Dox Broth و زمان تخمیر بررسی شد. تیمارهای انتخابی منابع نیتروژنی شامل ١٠٠٪ محیط کشت CDB، ٥٠٪ محیط کشت CDB به همراه ٥٠٪ محلول٪٣/٦ عصاره کنجاله کنجد، ٥٠٪ محیط کشت CDB به همراه ٥٠٪ محلول ٪٣/٦ کنجاله کنجد در آب مقطر، ٥٠٪ محیط کشتCDB به همراه ٥٠٪ محلول ٪٣/٦ عصاره مخمر در آب مقطر و ٥٠٪ محیط کشت CDB به همراه ٥٠٪ محلول ٪٣/٦ پپتون در آب مقطر بود. سطوح زمان تخمیر ٣، ٤ و ٥ روز در نظر گرفته شد. در میان تیمارهای مورد بررسی، تیمار ٥٠ درصد محلول ٣/٦ درصد عصاره کنجاله کنجد در محیط کشت CDB در چهارمین روز گرمخانه‌گذاری در دمای ٣٠°C و سرعت همزدن ١٢٠ rpm بیشترین فعالیت لیپازی (٠/٥٦٢٤١ ± ٩١/٥٩٠٠ واحد آنزیمی) را نشان داد. همچنین تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده در این آزمایش نشان داد که استفاده از عصاره کنجاله کنجد در مقایسه با عصاره مخمر و پپتون در محیط کشت، در این گونه مخمر فعالیت لیپازی را به صورت معنی‌داری در سطح ٥ درصد افزایش می‌دهد.

کلید واژگان: *یاروویا لیپولیتیکا*، منابع نیتروژن ،آنزیم لیپاز، کنجاله کنجد

*مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

www.SID.ir

۱- مقدمه

مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* به‌شدت هوازی است و قادر به تولید متابولیت‌های مهم از جمله لیپازهای میکروبی می‌باشد. از اینرو به مخمری مهم در مطالعات بیولوژی مولکولی و ژنتیک تبدیل شده-است. این مخمر توانایی رشد در پساب کنجاله روغن زیتون و همچنین ترکیبات آلی تجزیه شده از جمله هیدروکربن‌های آلیفاتیک[1] و آروماتیک[2] را دارد [۱]. لیپاز(تری‌گلیسرول‌آسیل-هیدرولاز EC 3.1.1.3) یک کربوکسی‌استرآز است که زنجیره-های آسیل گلیسرول را هیدرولیز و سنتز می‌کند [۲]. لیپازها گروه مهمی از کاتالیزورهای زیستی هستند که می‌توانند واکنش‌ها را در هر دو محیط آبی و غیر آبی کاتالیز کنند. آن‌ها می‌توانند در حضور آب تری‌آسیل‌گلیسرول را به اسیدهای چرب و گلیسرول هیدرولیز کند. البته در حضور مقادیر کم آب و اغلب در حضور حلال‌های آلی این واکنش می‌تواند به‌طور بالعکس رخ دهد، در این حالت لیپاز می‌تواند در حضور اسیدهای چرب و گلیسرول، واکنش سنتز تری‌آسیل گلیسرول را کاتالیز کند [۳].

در سال ۱۹۴۸ ترشح آنزیم لیپاز توسط این مخمر به سه صورت درون‌سلولی، متصل به دیواره و خارج از سلولی گزارش گردید [۱]. رشد و ترشح این آنزیم به‌میزان زیادی تحت تاثیر شرایط هوادهی و میزان اکسیژن موجود در محیط کشت است. بهره‌وری تولید لیپاز هنگامی که سرعت انتقال اکسیژن و فشار در حال افزایش است، افزایش می‌یابد. علاوه براین *یاروویا لیپولیتیکا* تحت شرایط محدودیت مواد غذایی قادر به تولید اسید سیتریک و مواد معطر از انواع منابع کربنی از جمله قندها، آلکان‌ها، روغن-های گیاهی، نشاسته هیدرولیز شده، اتانول و گلیسرول است. ثابت شده است که مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* می‌تواند بر روی ضایعات مختلف رشد نموده و محصولات با ارزش مانند لیپاز و اسید سیتریک تولید کند [۱]. آنزیم لیپاز تولیدی این مخمرتوسط سازمان غذا و داروی آمریکا ایمن[3] شناخته شده‌است [۱].

اگرچه تصفیه و تیمار ضایعات صنایع کشاورزی و مواد غذایی دشوار است با این حال می‌توان از این مواد برای کاربردهای بیوتکنولوژی به ویژه برای سنتز متابولیت‌های با ارزش بالا مانند پروتئین تک سلولی، چربی تک سلولی، اسیدهای آلی، بیوسورفاکتانت و آنزیم‌ها استفاده کرد.از این سوبستراها می‌توان برای فرایندهای تخمیر با هدف کاهش هزینه‌ی تولید آنزیم، برای تولید آنزیمی صنعتی که قابلیت رقابت با آنزیم‌های تجاری را داشته باشد، استفاده نمود[٤].

بازدهی تولید لیپاز به شدت تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی قرار می‌گیرد که تغییرات منابع کربن و نیتروژن از مهمترین آن‌ها می باشند. مطالعات نشان داده است که پپتون یک منبع نیتروژن بسیار بهتر از اوره و سولفات آمونیوم برای تولید لیپاز است[۱].

هدف این پژوهش بررسی تاثیر پودر کنجاله کنجد و عصاره حاصله در مقایسه با عصاره مخمر و پپتون به عنوان منابع نیتروژنی و زمان گرمخانه‌گذاری بر بازده تولید آنزیم لیپاز توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* در سیستم کشت غوطه‌وری[4] می‌باشد.

۲- مواد و روش

۲-۱- مواد

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل محیط کشت Malt Extract Agar از شرکت مرک آلمان، محیط کشت Czapek Dox Broth از شرکت سیگما، عصاره مخمر و پپتون از شرکت مرک آلمان، صمغ عربی، پارانیتروفنیل پالمیتات، ایزوپروپانول و تریتون X100 از شرکت سیگما، بافر تریس HCl با pH= ۸ و سدیم کلراید از شرکت مرک آلمان بود.

۲-۲- کنجاله کنجد

نمونه‌برداری از کارگاه‌های تولید روغن کنجد در استان یزد و به روش کاملاً تصادفی خوشه‌ای انجام پذیرفت. پنج نمونه کنجاله کنجد انتخاب، و برای تهیه پودر و عصاره کنجاله کنجد از آن‌ها استفاده شد[۵].

۲-۳- آزمون‌های شیمیایی مربوط به کنجاله کنجد

آزمون اندازه‌گیری پروتئین خام، روغن خام، فیبر خام، رطوبت و خاکستر به روش استاندارد ملی ایران به تربیت به شماره

1. Aliphatic
2. Aromatic
3. Gras(safe)

4. Submerge culture

Archive of SID
www.SID.ir

استانداردهای ٣٢٣، ٧٥٩٣، ٣٧١٧، ٨٠٣٤ و ٢٧٠٦ صورت پذیرفت [٦- ١٠].

٢-٤- آزمون‌های شیمیایی مربوط به عصاره کنجاله کنجد

آزمون اندازه‌گیری پروتئین خام، روغن خام، فیبر خام، رطوبت و خاکستر به روش استاندارد ملی ایران به تربیت به شماره استانداردهای ٣٢٣، ١١٣٣٠، ٣٧١٧، ٨٠٣٤ و ٢٧٠٦ صورت پذیرفت [٦، ١١، ٨، ٩ و ١٠].

٢-٥- ریزسازواره مورد استفاده

از سویه مخمر *Yarrowia lipolytica* DSM3286 از کلکسیون میکروبی DSMZ آلمان در این پژوهش استفاده گردید. از محیط کشت Malt Extract Agar (شامل ترکیبات ٢٠ گرم عصاره مالت به همراه ٢٠ گرم آگار در ١ لیتر آب مقطر) برای کشت این مخمر در دمای ٢٩ °C به مدت ٣-٢ روزه استفاده گردید و در دمای نگهداری ٤ °C نگهداری شد(١٢).

٢-٦- آماده‌سازی محیط کشت تلقیح

ابتدا مخمر در محیط کشت حاوی ترکیبات پپتون ٥ گرم، عصاره مخمر ٣ گرم و سدیم کلرید ٣ گرم در هر لیتر آب مقطر به‌همراه ١٪ روغن کنجد در دمای ٣٠ °C در دور ٢٠٠ rpm و ٢٤ ساعت کشت داده شد [١٣].

٢-٧- آماده‌سازی محیط کشت غوطه‌وری

بدین منظور ابتدا محیط کشت Czapek Dox Broth (ترکیبات شامل: $NaNO_3$: ٢ گرم، K_2H2PO_4: ١ گرم، $MgSo_4.7H_2O$: ٠/٥ گرم، KCl :٠/٥ گرم، $FeSO_4$:٠/٠١ گرم در هر لیتر آب مقطر) تهیه شد و سپس محلول ٣/٦ ٪ از کنجاله کنجد، عصاره مخمر و پپتون با آب مقطر به طور جداگانه تهیه شد. ٥ تیمار انتخاب شده به شرح زیر می باشد:

تیمار ١: ١٠٠٪ محیط کشت CDB

تیمار ٢: ٥٠٪ محیط کشت CDB به همراه ٥٠٪ محلول ٣/٦٪ عصاره کنجاله کنجد

تیمار ٣: ٥٠٪ محیط کشت CDB به همراه ٥٠٪ محلول ٣/٦٪ کنجاله کنجد در آب مقطر

تیمار٤: ٥٠٪ محیط کشت CDB به همراه ٥٠٪ محلول ٣/٦٪ عصاره مخمر در آب مقطر

تیمار ٥: ٥٠٪ محیط کشت CDB به همراه ٥٠٪ محلول ٣/٦٪ پپتون در آب مقطر [١٤].

به همه تیمار ها ١٪ روغن کنجاله کنجد به عنوان محرک و منبع کربن اضافه شد [١٤].

٢-٧-١- تهیه پودر کنجاله کنجد

بدین منظور کنجاله‌های کنجد کاملا با یکدیگر مخلوط و در آسیاب خرد شدند. سپس پودر به دست آمده، از الک با اندازه مش ٠/٢ میلی‌متر گذرانده شد.

٢-٧-٢- تهیه عصاره کنجاله کنجد

برای تهیه این عصاره ابتدا ٥ نمونه کنجاله تهیه شده با نسبت‌های یکسان باهم کاملا مخلوط و همگن شدند. سپس کنجاله کنجد تهیه شده به نسبت ١ به ١٥ با آب مخلوط و در ارلن‌مایرهای ٢٥٠ میلی‌لیتری ریخته شد. با استفاده از حمام آبی اولتراسوند (UP200H , Dr.Hielscher) در دمای اتاق به مدت ٢٠ دقیقه با توان ١٠٠ و ٢٠ کیلوهرتز تحت امواج فراصوت قرار گرفتند. بعد از اتمام این مرحله عصاره‌ها از فیلتر کاغذی عبور داده شدند و با دورrpm ٥٠٠٠ به مدت ٥ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا ذرات باقیمانده ته‌نشین شوند و سپس دوباره سوپرناتانت از فیلتر کاغذی گذرانده شد. مایه عبوری به عنوان عصاره در نظر گرفته شد [١٥ و ١٦].

٢-٨- سیستم کشت غوطه‌وری

برای بررسی تاثیر منابع نیتروژنی ٢ میلی‌لیتر از محیط کشت تلقیح به محیط‌های کشت غوطه‌وری اضافه گردید و محیط‌ها در دمای ٣٠°C و سرعت به هم‌زدن ١٢٠ rpm، به مدت ٥ روز گرمخانه-گذاری شدند. برای بررسی اثر زمان بر روی بازدهی تولید و فعالیت لیپاز و رشد سلولی در روزهای سوم، چهارم و پنجم گرمخانه‌گذاری، فعالیت لیپاز و رشد سلولی اندازه‌گیری شد[١٤].

٢-٩- تهیه سوپرناتانت محیط کشت

برای تهیه سوپرناتانت محیط‌کشت، محیط‌کشت‌ها در دورrpm ١٠٠٠٠ سانتریفوژ و از فیلتر کاغذی وات‌من شماره ١ عبور داده شدند. مایع عبوری به‌عنوان سوپرناتانت محیط‌کشت استفاده شد [١٤].

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۱۱- اندازه‌گیری کمی فعالیت لیپاز به روش رنگ‌سنجی

در این روش از پارانیتروفنیل پالمیتات (pNPP) به‌عنوان سوبسترای آنزیم لیپاز برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی به‌کار رفت که محصول نهایی این آنزیم، اسیدچرب و پارانیتروفنل(pNP) است. پارانیتروفنل رنگ زردی ایجاد می‌نماید که در طول ٤١٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر قابل اندازه‌گیری است.

محلول سوبسترا با اضافه کردن محلول A (شامل محلولی با غلظت ١٦/٥ mM از پارا نیتروفنیل پالمیتات در ١٠ میلی لیتر ایزوپروپانول) به محلول B (شامل ٥٠ mM بافر تریس HCl با pH = ٨ (٠/٤٪ تریتون X=100 و ٠/١٪ صمغ عربی) به نسبت ١ به ٩ آماده گردید. محلول آنزیم نیز بعد سانتریفیوژ محیط کشت و جدا کردن ذرات و سلول‌ها با استفاده از فیلتر کاغذی واتمن شماره ١ تهیه گردید.

سپس ١٠٠ میکرولیتر از محلول آنزیم به ٩٠٠ میکرولیتر از محلول سوبسترا اضافه گردید و پس از ١٥ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای ٣٧ °C ،جذب پارانیتروفنول در طول موج ٤١٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر(UV/Vis مدل Lightwave S2000) خوانده شد و واحد آنزیم به صورت یک واحد فعالیت آنزیم برابر است با مقداری از آنزیم که یک میکرومول پارا نیتروفنول را از سوبسترا در هر دقیقه آزاد کرده است، گزارش گردید. نمودار استاندارد با استفاده از محلول ٠، ٢٠، ٤٠، ٦٠، ٨٠ و ١٠٠ میکرومولار پارانیتروفنل در ایزوپروپانول و جذب نوری آن در ٤١٠ نانومتر تهیه شد[١٤].

۲-۱۲- اندازه‌گیری بیومس

بعداز فیلتراسیون محیط کشت براث بر روی فیلتری که قبلا به وزن ثابت رسیده بود (فیلتر کاغذی استفاده شده برای تهیه سوپرناتانت محیط کشت در اندازه‌گیری فعالیت لیپاز)، ابتدا فیلتر، با آب مقطر شسته شد و سپس در دمای ١١٠-١٠٥ °C در آون تازمانیکه به وزن ثابت برسد، خشک شد. وزن بیومس برحسب وزن خشک سلول (گرم) بر ١٠٠ میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه شد [١٧].

۲-۱۳- طرح آماری:

برای بررسی تاثیر منابع نیتروژنی ذکر شده و روزهای مختلف تخمیر، بر تولید و فعالیت آنزیم لیپاز و رشد سلولی از آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و نرم افزار SPSS16.0 استفاده شد. مقایسه میانگین نتایج با استفاده از آزمون دانکن در سطح ٥ درصد صورت پذیرفت.

۳- بحث و نتایج

۳-۱- آزمون‌های شیمیایی کنجاله کنجد و عصاره حاصله از آن

نتایج آنالیزهای شیمیایی کنجاله کنجد و عصاره کنجاله کنجد در جدول ١ آورده شده است.

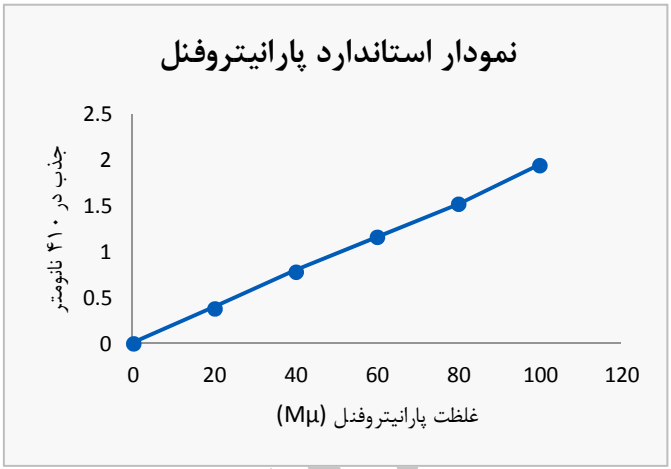
جدول ١ آنالیزهای شیمیایی کنجاله کنجد و عصاره کنجاله کنجد(اعداد بر حسب درصد می باشند)

نوع نمونه	پروتئین خام	روغن خام	فیبر خام	ماده خشک	خاکستر
کنجاله کنجد	٣٦/٥±٠/٧٢	١٩/٠٩±٠/٨٩	٨/٦±٠/٨١	٩٢/٥±٠/٥٦	٩/٧±٠/١٨
عصاره کنجاله کنجد	٥/٥±٠/٣٤	٢/٥٥±٠/٢١	١/٨٩±٠/٢٨	١٨/٦٤±٠/١٨	٢/٩٨±٠/١٢

۳-۲- اثر تیمارها بر بازدهی تولید آنزیم لیپاز و رشد سلولی توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا*

عملکرد *یاروویا لیپولیتیکا* روی ٥ منبع مختلف نیتروژن برای تولید آنزیم لیپاز بررسی شد. وزن خشک بیومس بر حسب گرم در ١٠٠ میلی‌لیتر (X) و فعالیت آنزیمی لیپاز (L) بر حسب واحد آنزیمی در میلی‌لیتر (U/ml) با روش رنگ‌سنجی پارانیتروفنیل پالمیتات در سومین، چهارمین و پنجمین روز کشت انجام شد. نتایج حاصله در جدول ٢ و ٣ مشاهده می‌شود. در شکل ١ منحنی استاندارد جذب پارانیتروفنل در ٤١٠ نانومتر نشان داده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ١ منحنی استاندارد جذب پارانیتروفنل در طول موج ٤١٠نانومتر

تایج آنالیز آماری فعالیت لیپاز بین روزهای مختلف تخمیر در یک تیمار نشان دادند، اختلاف آماری معنی‌داری بین روزهای مختلف تخمیر در سطح ٥٪ وجود دارد. از مقایسه تولید و فعالیت لیپاز در روزهای مختلف مشاهده شد بیشترین فعالیت لیپاز در روز چهارم تخمیر(٥٣/١٣٤ U/ml) می‌باشد. همچنین نتایج آنالیز آماری فعالیت لیپاز بین تیمارهای مختلف نیتروژنی نشان دادند، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ٥٪ با یکدیگر دارند. به گونه‌ای که بیشترین فعالیت لیپاز در میان تیمارهای نیتروژنی مربوط به تیمار ٢ با فعالیت لیپازی ٥٩/٤٢٥ U/ml بود. این نکته نیز قابل ذکر است که بیشترین فعالیت لیپاز در تیمار ٢ در روز چهارم با فعالیت لیپازی ٩١/٥٩٠٠ ± ٠/٥٦٢٤١ U/ml مشاهده شد.

جدول ٢ فعالیت لیپاز تولید شده توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* در شرایط کشت غوطه‌وری در تیمارها و روزهای مختلف

تیمار	فعالیت لیپاز بعداز ٣ روز گرمخانه گذاری(U/ml)	فعالیت لیپاز بعداز ٤ روز گرمخانه گذاری(U/ml)	فعالیت لیپاز بعد ٥ روز گرمخانه گذاری (U/ml)
١٠٠٪ محیط کشت CDB	٣٥/٥٦٦٧ ± ٠/ ٥٧٠٠٣	٥٠/٣٥٠٠ ± ٠/٣٥٠٠٠	٥٦/٨٩٦٧ ± ٠/٧١٠٦٦
٥٠٪ محیط کشت CDB به همراه ٥٠٪ محلول ٣/٦٪ عصاره کنجاله کنجد	٥٩/٨٠٠٠ ± ٠/٨٠٠٠٠	٩١/٥٩٠٠ ± ٠/٥٦٢٤١	٢٥/٨٢٣٣ ± ٠/٨١٠٣٣
٥٠٪ محیط کشتCDB به همراه ٥٠٪ محلول ٣/٦٪ کنجاله کنجد در آب مقطر	٣٦/٧٧٦٧ ± ٠/٧٥١٤٢	٣٠/١٧٠٠ ± ٠/١٧٠٠٠	٢٥/٣١٠٠ ± ٠/٣١٠٠٠
٥٠٪ محیط کشت CDB به همراه ٥٠٪ محلول ٣/٦٪ عصاره مخمر در آب مقطر	٣٢/٣٦٣٣ ± ٠/٣٦٠٠٥	٦٧/٥٢٠٠ ± ٠/٠١٠٠٠	٣٤/٤٦٠٠ ± ٠/٠١٠٠٠
٥٠٪ محیط کشت CDB به همراه ٥٠٪ محلول ٣/٦٪ پپتون در آب مقطر	٦٤/٧٧٣٣ ± ٠/٧٥٥٦٧	٢٥/٣٥٣٣ ± ٠/٣٦٠١٩	٢٨/٥٥٠٠ ± ٠/٦١٩٩٢

نتایج آنالیز آماری رشد سلولی بین روزهای مختلف تخمیر در یک تیمار نشان دادند، اختلاف آماری معنی‌داری بین روزهای مختلف تخمیر در سطح ٥٪ وجود دارد. از مقایسه بیومس تولید شده در روزهای مختلف مشاهده شد بیشترین رشد سلولی در روز پنجم تخمیر(١/٦٠٠ گرم بر میلی‌لیتر محیط کشت) می‌باشد. همچنین نتایج آنالیز آماری رشد سلولی بین تیمارهای مختلف نیتروژنی نشان دادند، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ٥٪ با یکدیگر دارند. به گونه‌ای که بیشترین رشد سلولی در میان تیمارهای نیتروژنی مربوط به تیمار ٣ و ١ با وزن خشک سلولی١/٧٤٣ و ١/٦٩٨ گرم بر ١٠٠ میلی‌لیتر محیط کشت به ترتیب، بود. این نکته نیز قابل ذکر است که بیشترین رشد سلولی در تیمار ٣ در روز پنجم تخمیر با وزن خشک ١/٨٧١ گرم بر ١٠٠ میلی‌لیتر محیط کشت، مشاهده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳ وزن بیومس مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* در شرایط کشت غوطه‌وری در تیمارها و روزهای مختلف

تیمار	وزن بیومس بعداز ۳ روز گرمخانه‌گذاری (گرم بر ۱۰۰میلی لیتر)	وزن بیومس بعداز ٤ روز گرمخانه‌گذاری (گرم بر ۱۰۰میلی لیتر)	وزن بیومس بعد ۵ روز گرمخانه‌گذاری (گرم بر ۱۰۰میلی لیتر)
۱۰۰٪ محیط کشت CDB	۱/٤٤٦۷ ± ۰/۰۵۱۳۲	۱/۷۵۳۳ ± ۰/۵۵۰۸	۱/۸۵۰۰ ± ۰/۵۰۰۰
۵۰٪ محیط کشت CDB به همراه ۵۰٪ محلول ۳/٦٪ عصاره کنجاله کنجد	۱/۱٤٦۷ ± ۰/۱۵۰۱۱	۱/۲٦۰۰ ± ۰/٦۰۰۰	۱/۲۹۰۰ ± ۰/۱۱۷۸۸
۵۰٪ محیط کشتCDB به همراه ۵۰٪ محلول ۳/٦٪ کنجاله کنجد در آب مقطر	۱/٤٦۱ ± ۰/۰٦۱۳۲	۱/۸٤۲۱ ± ۰/۰٤۰۲۵	۱/۸۷۱٤ ± ۰/۰۲۲٤۰
۵۰٪ محیط کشتCDB به همراه ۵۰٪ محلول ۳/٦٪ عصاره مخمر در آب مقطر	۱/۰۱۹۰ ± ۰/۱۰۰۰۰	۱/٤۵۰۵ ± ۰/۰۵۱۵۰	۱/۵۰۳۹ ± ۰/۰۳۲۱۱
۵۰٪ محیط کشتCDB به همراه ۵۰٪ محلول ۳/٦٪ پپتون در آب مقطر	۱/۱۹۱۱ ± ۰/۰٦۱٤۲	۱/۳٤۱۷ ± ۰/۰٤۳۱۰	۱/۳۲۳۳ ± ۰/۰۲۱۸٦

نتایج تجزیه و تحلیل آماری فعالیت لیپاز تولید شده و رشد سلولی در تیمارهای مختلف نیتروژنی در جدول ٤ آورده شده است.

جدول ٤ نتایج تجزیه و تحلیل آماری فعالیت لیپاز تولید شده و رشد سلولی در تیمارهای نیتروژنی

منابع نیتروژنی (شماره تیمار)	۱	۲	۳	٤	۵
فعالیت لیپاز(U/ml)	٤۷/۷٤۱۷±۹/٦٤۷A	۵۹/٤۲۵۰±۲۹/۳۸٤B	۳۰/۹٦۱۷±۵/۲٦٦C	٤٤/۸٤۰۰±۱۷/۵۸۵D	۳۹/۸۵٦۷±۱۹/٦۹۵E
رشد سلولی(g/100ml)	۱/٦۹۸۳±۰/۲۰۸a	۱/۲٦۸۳±۰/٦۵۸b	۱/۷٤۳۳±۰/۱۹۷c	۱/۳۰۸۳±۰/۲۸۰d	۱/۳٤۳۳ ±۰/۱۰٦e

حروف کوچک و بزرگ به ترتیب نشان‌دهنده معناداری در سطح ۵ درصد بین تیمارهای نیتروژنی در پاسخ‌های رشد سلولی و فعالیت لیپاز می‌باشند.

نتایج تجزیه و تحلیل جداول ۲ و ۳ در جداول ۵، ٦ و ۷ آورده شده است. در این جداول نسبت بازده خشک به سوبسترا بر حسب گرم بر گرم، بازده تولید لیپاز به سوبسترا بر حسب واحد آنزیمی بر گرم، محصول‌دهی یا میزان تولید لیپاز بر حسب واحد آنزیمی در زمان تخمیر، سرعت ویژه تولید لیپاز بر حسب واحد آنزیمی بر وزن خشک در زمان تخمیر آورده شده است.

جدول۵ تجزیه و تحلیل اثر منابع مختلف نیتروژن بر روی تولید لیپاز توسط *یاروویا لیپولیتیکا* در روز سوم گرمخانه‌گذاری

منبع نیتروژن	$Y_{X/S}$	$Y_{L/S}$	P_L	q_L
سولفات آمونیوم	۰/٤۰۱۸	۹/۸۷	۱۱/۸۵	۸/۱۹
عصاره کنجاله کنجد	۰/۳۱	۱٦/٦۱	۱۹/۹۳	۱۷/۳۸
کنجاله کنجد	۰/٤۰۵۸	۱۰/۲۱	۱۲/۲۵	۸/۳۸
عصاره مخمر	۰/۲۸	۸/۹۸	۱۰/۷۸	۱۰/۵۷
پپتون	۰/۳۳	۱۷/۹۹	۲۱/۵۹	۱۸/۱۲

$Y_{X/S}$: بازده وزن خشک بر روی سوبسترا بر حسب گرم بر گرم(g/g) ، $Y_{L/S}$: بازده تولید لیپاز بر روی سوبسترا بر حسب واحد آنزیمی بر گرم(U/g) ، P_L: میزان تولید لیپاز بر حسب واحد آنزیمی در زمان تخمیر(U/h) ، q_L: سرعت ویژه تولید لیپاز برحسب واحد آنزیمی بر وزن خشک در زمان تخمیر (U/gh)

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ٦ تجزیه و تحلیل اثر منابع مختلف نیتروژن بر روی تولید لیپاز توسط *یاروویا لیپولیتیکا* در روز چهارم گرمخانه‌گذاری

منبع نیتروژن	$Y_{X/S}$	$Y_{L/S}$	P_L	q_L
سولفات آمونیوم	٠/٤٨	١٣/٩٨	١٢/٥٨	٧/١٧
عصاره کنجاله کنجد	٠/٣٥	٢٥/٤٤	٢٢/٨٩	١٨/١٦
کنجاله کنجد	٠/٥١	٨/٣٨	٧/٥٤	٤/٠٩
عصاره مخمر	٠/٤٠	١٨/٧٥	١٦/٨٨	١١/٦٣
پپتون	٠/٣٧	٧/٠٤	٦/٣٣	٤/٧١

$Y_{X/S}$: بازده وزن خشک بر روی سوبسترا بر حسب گرم بر گرم(g/g) ، $Y_{L/S}$: بازده تولید لیپاز بر روی سوبسترا بر حسب واحد آنزیمی بر گرم(U/g) ، P_L: میزان تولید لیپاز بر حسب واحد آنزیمی در زمان تخمیر(U/h) ، q_L: سرعت ویژه تولید لیپاز برحسب واحد آنزیمی بر وزن خشک در زمان تخمیر (U/gh)

جدول ٧ تجزیه و تحلیل اثر منابع مختلف نیتروژن بر روی تولید لیپاز توسط *یاروویا لیپولیتیکا* در روز پنجم گرمخانه‌گذاری

منبع نیتروژن	$Y_{X/S}$	$Y_{L/S}$	P_L	q_L
سولفات آمونیوم	٠/٥١	١٥/٨٠	١١/٣٧	٦/١٤
عصاره کنجاله کنجد	٠/٣٥	٧/١٧	٥/١٦	٤
کنجاله کنجد	٠/٥١	٧/٠٣	٥/٠٦	٢/٧٠
عصاره مخمر	٠/٤١	٩/٥٧	٦/٨٩	٤/٥٨
پپتون	٠/٣٦	٧/٩٣	٥/٧١	٤/٣١

$Y_{X/S}$: بازده وزن خشک بر روی سوبسترا بر حسب گرم بر گرم(g/g) ، $Y_{L/S}$: بازده تولید لیپاز بر روی سوبسترا بر حسب واحد آنزیمی بر گرم(U/g) ، P_L: میزان تولید لیپاز بر حسب واحد آنزیمی در زمان تخمیر(U/h) ، q_L: سرعت ویژه تولید لیپاز برحسب واحد آنزیمی بر وزن خشک در زمان تخمیر (U/gh)

٤- بحث

در این مطالعه رشد و تولید لیپاز توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* با استفاده از منابع نیتروژنی بررسی شد. مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* نشان داد که توانایی بالایی در تولید لیپاز در محیط کشت غنی شده با عصاره کنجاله کنجد دارد. که این می‌تواند به‌علت داشتن درصدی از روغن کنجد در کنجاله کنجد و عصاره کنجاله کنجد به نسبت های١٩/٠٩و ٢/٥٥ باشد. مقدار پروتئین بالا در این عصاره به‌علت وجود پروتئین بالا در کنجاله، تاثیر امواج فراصوت و رها شده شدن مواد درون‌سلولی به‌داخل عصاره می‌باشد.(١٨) همچنین حضور آمینواسیدهای مختلف از جمله گلایسین(٥/٣ درصد پروتئین خام) و هیستیدین(٢/٩ درصد پروتئین خام) که حضور آن‌ها در تولید آنزیم لیپاز ضروری می‌باشد، در کنجاله کنجد می‌تواند مزید بر علت باشد(٢).

کمینی و همکاران(٢٠٠٠) تولید لیپاز توسط *کریپتوکوکوس*[5] را بهینه‌سازی نمودند. بهینه‌سازی شامل، بهینه‌سازی منابع نیتروژن غیرآلی (اوره و آمونیوم سولفات) و آلی (عصاره مخمر ، پپتون و شربت ذرت) بود. در میان منابع نیتروژنی عصاره مخمر بیشترین تاثیر را در تولید لیپاز نشان داد. فعالیت لیپاز در این حالت U/ml ٢٦ در ٩٦ ساعت گزارش شد. درحالیکه دیگر منابع نیتروژنی آزمایش شده تاثیر بازدارنده در تولید لیپاز نشان دادند(١٩).

نتایج به دست آمده در این پژوهش با نتایج به دست آمده توسط یانگ و همکاران(٢٠١٢) مطابقت داشت. یانگ و همکاران گزارش کردند که استفاده از همی‌سلولزهای استخراجی از تیمار اولتراسوند بر روی سوبسترای سبوس برنج، نسبت به دیگر تیمارها، در محیط کشت، تولید آنزیم گزیلاناز توسط قارچ *Aspergillus japonicas* را به طور معنی داری(در سطح ٥ درصد) افزایش داده است(١٦).

5. *Cryptococos* S2

Archive of SID
www.SID.ir

مفتاح و همکاران ۲۰۱۳ عنوان کردند که منبع نیتروژنی آلی پپتون و به دنبال آن عصاره مخمر در میان دیگر منابع نیتروژن بیشترین تاثیر را در تولید لیپاز توسط *یاورویا لیپولیتیکا* داشتند. همچنین آن-ها دوره گرمخانه‌گذاری ٦٠ ساعته را برای به‌دست آوردن بیشترین فعالیت لیپاز پیشنهاد کردند(٤). درویشی و همکاران (۱۳۹۰) عصاره مخمر را مناسب‌ترین منبع نیتروژنی برای تولید آنزیم لیپاز توسط مخمر *یاورویا لیپولیتیکا* با بیشینه تولید U/ml ۳٤/۷ ، معرفی کردند(۲۰).

تحقیقات زیادی در زمینه بهینه‌سازی محیط کشت مخمر *یاورویا لیپولیتیکا* برای تولید لیپاز انجام پذیرفته است. اما بیشتر سوبستراهای آزمایشگاهی همانند پپتون، عصاره مخمر، اوره، سولفات آمونیوم و... و یا پساب کارخانجات روغن‌گیری از دانه-های روغنی در این تحقیقات به‌عنوان منبع نیتروژنی به کار گرفته شده‌است(٤، ۲۱ و ۲۲). ما در این تحقیق تلاش نمودیم یک سوبسترای ارزان قیمت و در عین حال تاثیرگذار در تولید آنزیم لیپاز (عصاره کنجاله کنجد) را معرفی کنیم.

٥- نتیجه گیری

مخمر یاورویا لیپولیتیکا در این تحقیق نشان داد که در حضور عصاره کنجاله کنجد توانایی بالایی برای تولید آنزیم لیپاز دارد. نتایج حاصله از آزمایش‌های فوق حاکی از آن بود که در میان سوبستراهای نیتروژنی به کارگرفته شده در این آزمایش، بیشترین فعالیت لیپازی مربوط به تیمار ۵۰٪ محیط کشت CDB به همراه محلول ٪۳/٦ عصاره کنجاله کنجد با فعالیت لیپازی U/ml ٥۹/٤۲٥ و بیشترین رشد سلولی مربوط به تیمار ۵۰٪ محیط کشت CDB به‌همراه ۵۰٪ محلول ٪۳/٦ عصاره کنجاله کنجد و تیمار محیط کشت CDB با وزن خشک سلولی ۱/۷٤۳ و ۱/٦۹۸ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت به ترتیب، می‌باشد. در بین روزهای تخمیر، بیشترین فعالیت لیپاز مربوط به روز چهارم تخمیر با فعالیت لیپازی U/ml ٥۳/۱۳٤ و بیشترین رشد سلولی مربوط به روز سوم تخمیر با وزن خشک سلولی ۱/٦۰۰ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت، بود. همچنین بیشترین فعالیت لیپاز در تیمار ۵۰٪ محیط کشت CDB به همراه محلول ٪۳/٦ عصاره کنجاله کنجد و در روز چهارم تخمیر مشاهده شد(U/ml ۹۱/٥۹۰). در نهایت اینکه نتایج نشان دادند استفاده از عصاره کنجاله کنجد در تیمار ۲ به عنوان سوبسترای نیتروژنی(سوبسترای ارزان قیمت) در مخمر *یاورویا لیپولیتیکا* به طور موفقیت‌آمیز فعالیت لیپازی را در مقایسه با سایر سوبستراهای نیتروژنی، بیشتر (معنی‌داری در سطح ۵ درصد) افزایش می‌دهد. این نکته نیز قابل ذکر است که می‌توان با بهینه‌سازی منابع کربنی، و شرایط فیزیکی تاثیرگذار در تولید آنزیم لیپاز می‌توان فعالیت لیپاز را به میزان بیشتری افزایش داد و از این مخمر به‌عنوان یک میکروارگانیسم با پتانسیل مناسب تولید آنزیم لیپاز در صنایع بیوتکنولوژی و تولید متابولیت‌های میکروبی استفاده نمود.

٦- قدردانی و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به‌علت کمک‌های مادی و معنوی صورت گرفته در راستای انجام طرح پژوهشی پایان‌نامه با کد ۳/۲۹٥۹۱ تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

۷- منابع

[1] Coelho.M.A.Z., Amaral.P.F.F., Belo.I., 2010, *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotethnology.14: 930-944.

[2] Ramachandran, S., Singh ,S. K., Larroche, Ch., Soccol, C. R., and Pandey, A. 2007. Oil cakes and their biotechnological applications–a review. Bioresource Technology, 98: 2000–2009.

[3] Gupta. Rani., Rathi.pooja., Gupta.namita., bradoo. Sapna., 2003, Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. biotechnol appl biochem. 37:63-71.

[4] Moftah.omar., Grbavcic. sanja., moftah. walid., lukovic. Nevena., prodanovic. olivera., jakovetic. sonja.,knezevic jugovic.zorica., 2013, Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates. Journal of the Serbian chemical society. 78(6):781-794.

[5] Institute of Standards and Industrial Research of Iran.1382 . Oilseeds-sampling.ISIRI 7592. 1st. Revision.

Archive of SID

www.SID.ir

[6] Institute of Standards and Industrial Research of Iran.1387. Sesame seed – Specifications and test methods.ISIRI 323. 2nd. Revision.

[7] Institute of Standards and Industrial Research of Iran,1382, Oilseeds- Determination of oil content (Reference method). ISIRI 7593. 1st. Revision.

[8] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 1382. Agricultural food products determination of crude fibre content-modified scharrer method. ISIRI 3717. First Edition.

[9] Institute of Standards and Industrial Research of Iran .1386.Oilseeds – Determination of moisture and volatile matter content - Test method. ISIRI 8034. 1st.edition.

[10] Institute of Standards and Industrial Research of Iran . 1381.Cereals, pulses and by products - Determination of ash yeild by incineration. ISIRI 2706. 1st. revision.

[11] Institute of Standards and Industrial Research of Iran.1389. Milk-Determination of fat content- Gravimetric method(Reference method). ISIRI 11330. 1st . Revision.

[12]Amaral, P.F.F.,Almeida, A.P.R.,Peixoto, T.,M.Rocha-Leao,M.H.,Coutinho,J.A.P and Coelho,M. A.Z.2007.Benefical effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. World Journal of Microbiology Biotechnology. 23:339-344.

[13] Davin, Sh. 2003. Identification and characterization of *Yarrowia lipolytica* RP2 growing on tallow. BSc Thesis, School of Biotechnology.

[14] Balaji,V., Ebenezer,P., Aneli, M. B., Robert F. H. D., 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.

[15] Haydari majd, M., Mortazavi, S.A., Asili,J., bolorian,S.1391. Optimization of extraction of phenolic compounds from plant *Flomidoschema parviflora* Using ultrasound device. Journal of Herbal Medicines. 3(1):7-13.

[16] Yang. chun-yao., sheli.I-chuan., fang.j. tony., 2012, Fermentation of rice hull by *Aspergillus japonicus* under ultrasonic pretreatment. Ultrasonic sonochemistry.19:687-691.

[17] Naqvi. S. H., Khan. M.Y., Rafiq. M., Dahot.M.U., 2012, Screening of lipase producing Fungi and Catalytic Activity from Molasses Culture Medium. Sindh university research journal.44(1):105-112.

[18] Zolfaghari. B., yekdaneh.A.1389. Recent advances in the field of plant-derived compounds. Journal of Herbal Medicines.1:51-55.

[19] Kamini.N.R., Fujii.T., Kurosu.T., Iefuji.h., 2000, Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. Process biochemistry.36:317-324.

[20] Darvishi, F., nahvi, I., and zarkesh esfehani,S.H.1389. Effect of nitrogen sources on the production of enzymes and yeast *Yarrowia lipolytica*.modarrs of Biological Science and Technology. 2(1):45-53.

[21] Corzo.Gerado., Revah. Sergio., 1999, Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681.Bioresource Technology.70:173-180.

[22] Kamini. N. R., Fujii.T., Kurosu.T., and Iefuji.h. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. Process biochemistry,36: 317-324.

Archive of SID

www.SID.ir

Examination the yield of lipase enzyme produced by *Yarrowia lipolytica* DSM3286 yeast under different nitrogen treatments and fermentation time

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: 93/6/14 Accepted: 93/9/26)

Yarrowia lipolytica is unusual yeast that has the ability to produce important metabolites such as lipase enzymes. Lipase enzyme has many applications in different industries including manufacturing of detergents, food industry, pharmacy, fuel and etc. In this paper, we studied the lipase enzyme produced by the yeast under different treatments of nitrogen sources such as yeast extract, peptone, soybean meal, sesame meal and sesame meal extracts on the medium of Czapek Dox Broth. Selected treatments of nitrogen resources include treatment solution (100%), solution (50%) containing with sesame cake extract (3.6%), solution (50%) containing with sesame cake extract (3.6%) in distilled water, solution (50%) containing with yeast extract (3.6%) in distilled water and solution (50%) containing with peptone (3.6%) in distilled water on the medium (CDB). Fermentation time levels are considered 3, 4 and 5 days. Among examined treatments, Treatment solution (50%) containing with sesame cake extract (3.6%) on the medium (CDB) showed the highest lipase activity (91.5900±0.56241 and 67.5200 ± 0.01000 enzyme units, respectively) in the fourth day of incubation with stirring speed (120 rpm) and temperature (30 °C). The results show use of sesame cake extract increases lipase activity more than use of yeast extract and peptone at the level of 5%. Also, statistical analysis of resulted data showed use of sesame cake extract increases lipase activity significantly at 5% level in comparison with yeast extract and peptone.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, nitrogen source, lipase enzyme, sesame meal

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

Archive of SID

www.SID.ir