بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه مراغه

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

پایان نامه :

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست فناوری- بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان:

بررسی تولید آنزیم لیپاز توسط سویه های مخمر از پساب کارخانه روغن نباتی

استاد راهنما:

دکتر فرشاد درویشی هرزویلی

استاد مشاور:

دکتر پریسا فتحی رضایی

پژوهشگر:

برومند حسینی همه ایازی

بهمن ماه ۱۳۹۳

تقدیم به:

چشمه های جوشان محبت

جلوه های مهر و عطوفت الهی

لبخندهای پر مهر زندگیم

به روح والای مادرم

به پدرم

که در تمام مراحل زندگی به من راه و رسم درستی، صداقت و درست زیستن را آموختند.

تقدیم به برادرم:

که همواره در طول زندگی، تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات و وجودش مایه دلگرمی من بوده و هست.

تقدیر و سپاس:

معلا مقامت ز عرش برتر باد همیشه توسن اندیشه ات مظفر باد

به نکته های دلاویز و گفته های بلند صحیفه های سخن از تو علم پرور باد

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجّل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم.

اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه و از باب "من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر الله عزّ و جلّ": از برادر گرانقدرم جناب آقای سید بهمن حسینی که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت هایم گذشته و در تمام عرصه های زندگی یار و یاوری بی چشم داشت برای من بوده اند؛ از استاد با کمالات و شایسته جناب آقای دکتر فرشاد درویشی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند، و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند و با نکته های دلاویز و گفته های بلند، صحیفه های سخن را علم پرور نموده و سپیدی را بر تخته سیاه زندگیم نگاشتند؛ از استاد ارجمند سرکار خانم دکتر پریسا فتحی رضایی که زحمت مشاوره این رساله را متقبل شدند و از استاد فرزانه و دلسوز سرکار خانم دکتر راحله مجدانی که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.

باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

نام خانوادگی دانشجو: حسینی همه ایازی **نام: برومند**

استاد راهنما: دکتر فرشاد درویشی هرزویلی

استاد مشاور: دکتر پریسا فتحی رضایی

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته: زیست فناوری** **گرایش: میکروبی**

دانشگاه: مراغه **دانشکده: علوم پایه** **تاریخ دانش آموختگی: ۹۳/۱۱/۲۹** **تعداد صفحه: ۱۰۰ صفحه**

عنوان: بررسی تولید آنزیم لیپاز توسط سویه های مخمر از پساب کارخانه روغن نباتی

کلید واژه‌ها: لیپاز، مخمر، پساب، روغن نباتی، تولید، بهینه سازی

چکیده:

آنزیم لیپاز یکی از مهمترین آنزیم‌های صنعتی با فعالیت آنزیمی بالا برای آبکافت، ساخت و ترانس استریفیکاسیون دامنه‌ی وسیعی از استرها، روغن‌ها و چربی‌ها است که در صنایع مختلف از جمله شوینده‌ها، مواد آرایشی- بهداشتی، داروسازی، غذایی و تخمیری به کار می‌رود. برای مقرون به صرفه نمودن تولید لیپاز و استفاده در صنعت می‌بایست محیط کشت مناسب و ارزان قیمت طراحی گردد. هدف این تحقیق بررسی تولید میکروبی لیپاز به عنوان یک محصول با ارزش از لحاظ زیست فناوری توسط مخمر از پساب کارخانه روغن نباتی است.

ابتدا اثر روغن زیتون با خلوص متفاوت از لحاظ تجاری بر تولید لیپاز توسط سویه های مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* بررسی شد. مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* سویه FDY1390 به عنوان سویه پرتوان تولید کننده لیپاز انتخاب شد که ۳۰۰ واحد در میلی لیتر لیپاز در محیط روغن زیتون تولید کرد. پس از بهینه سازی با روش طراحی آزمایش تاگوچی، ۳۴۰ واحد در میلی لیتر لیپاز به دست آمد. تولید لیپاز با تغییر در استراتژی خوراک دهی به ۵۲۰ واحد در میلی لیتر رسید.

در ادامه پساب سبک و سنگین کارخانه روغن نباتی به عنوان منبع کربن برای تولید لیپاز به کار رفت. پساب سنگین سوبسترای خوبی همچون روغن زیتون برای تولید لیپاز تعیین شد که سویه مخمر ۱۸۴/۵ واحد در میلی لیتر لیپاز بر روی این سوبسترا تولید نمود. همچنین ۲۱۰ واحد در میلی لیتر لیپاز با تغییر در استراتژی خوراک دهی به دست آمد. پساب سنگین به عنوان منبع کربن، عصاره مخمر و تریپتون به عنوان منابع نیتروژن و pH در سطوح مختلف برای بهینه سازی تولید لیپاز توسط روش طراحی آزمایش تاگوچی مورد بررسی قرار گرفتند. سویه مخمر پس از بهینه سازی ۲۸۶ واحد در میلی لیتر لیپاز تولید کرد. در بیوراکتور سه لیتری میزان تولید لیپاز به ۳۷۳ واحد در میلی لیتر رسید. در مجموع پساب سنگین کارخانه روغن نباتی می تواند به عنوان سوبسترای تجدیدپذیر و ارزان قیمت برای تولید لیپاز و کاهش آلودگی زیست محیطی این نوع پساب به کار رود.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱ لیپاز..... ۱

۱-۲ کاربرد های لیپاز..... ۴

۱-۲-۱ لیپازها در صنایع لبنی..... ۴

۱-۲-۲ لیپازها در پاک کننده ها..... ۵

۱-۲-۳ لیپازها در شیمی روغن..... ۵

۱-۲-۴ لیپازها در سنتز تری گلیسریدها..... ۵

۱-۲-۵ لیپازها در سنتز سورفکتانت ها..... ۶

۱-۲-۶ لیپازها در ساخت محصولات آرایشی- بهداشتی..... ۶

۱-۲-۷ لیپازها در صنایع دارویی و کشاورزی..... ۷

۱-۲-۸ لیپازها در صنعت پلیمر..... ۷

۱- ۳ مخمرهای تولید کننده لیپاز..... ۷

۱-۴ مخمر *یاروویا لیپولیتیکا*..... ۸

۱-۵ مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* و تولید لیپاز..... ۱۰

۱-۶ سوبستراهای مورد استفاده در تولید لیپاز..... ۱۳

۱-۷ فرآیندهای تخمیر برای تولید لیپاز..... ۱۷

۱-۷-۱ فرآیندهای بسته..... ۱۸

۱-۷-۲ فرآیندهای بسته خوراک دهی شونده..... ۱۹

۱-۷-۳ فرآیندهای پیوسته..... ۲۰

۱-۸ بهینه سازی تولید لیپاز..... ۲۱

۱-۹ اهداف تحقیق..... ۲۵

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ مواد شیمیایی..... ۲۸

۲-۲ وسایل و دستگاه‌ها..... ۲۹

۲-۳ میکروارگانیسم های مورد استفاده و نگهداری آن ها..... ۳۰

۲-۴ پساب کارخانه روغن نباتی..... ۳۱

۲-۵ محیط‌های کشت کشت مورد استفاده..... ۳۲

۲-۵-۱ محیط کشت YPD..... ۳۲

۲-۵-۲ محیط کشت YGC..... ۳۳

۲-۵-۳ محیط کشت تری بوترین..... ۳۳

۲-۵-۴ محیط کشت تولید لیپاز ۳۴

۲-۶ سنجش میزان تولید لیپاز..... ۳۴

۲-۶-۱ سوبسترای سنجش لیپاز..... ۳۴

۲-۶-۲ محلول های مورد نیاز برای سنجش فعالیت لیپاز..... ۳۵

۲-۶-۳ روش سنجش فعالیت لیپاز..... ۳۶

۲-۷ سنجش میزان رشد..... ۳۶

۲-۸ فرآیند تخمیر بسته تولید لیپاز در ارلن..... ۳۶

۲-۹ فرآیند تخمیر بسته خوراک دهی شونده در ارلن.....۳۷

۲-۱۰ بهینه سازی تولید لیپاز.....۳۸

۲-۱۰-۱ طراحی آزمایش به روش تاگوچی.....۳۸

۲-۱۱ فرآیند تخمیر تولید لیپاز در بیوراکتور.....۴۱

۲-۱۲ جداسازی مخمر از پساب.....۴۲

۲-۱۳ روش های آماری.....۴۳

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱ اثر روغن زیتون با خلوص متفاوت بر روی تولید لیپاز *یاروویا لیپولیتیکا*.....۴۵

۳-۲ بررسی استراتژی های خوراک دهی روغن زیتون بر تولید لیپاز *یاروویا لیپولیتیکا*.....۴۹

۳-۳ بهینه سازی محیط حاوی روغن زیتون برای تولید لیپاز *یاروویا لیپولیتیکا*.....۵۲

۳-۴ بررسی پساب کارخانه روغن نباتی به عنوان منبع کربن در تولید لیپاز *یاروویا لیپولیتیکا*.....۵۶

۳-۵ بررسی استراتژی های خوراک دهی پساب سنگین کارخانه روغن نباتی بر تولید لیپاز *یاروویا لیپولیتیکا* ۵۹

۳-۶ بهینه سازی محیط حاوی پساب سنگین برای تولید لیپاز *یاروویا لیپولیتیکا*.....۶۲

۳-۷ فرآیند تخمیر تولید لیپاز از پساب سنگین کارخانه روغن نباتی در بیوراکتور.....۶۷

۳-۸ جداسازی مخمر تولید کننده لیپاز از پساب.....۷۳

نتیجه گیری کلی.....۷۷

پیشنهادات.....۷۸

منابع و ماخذ.....۷۹

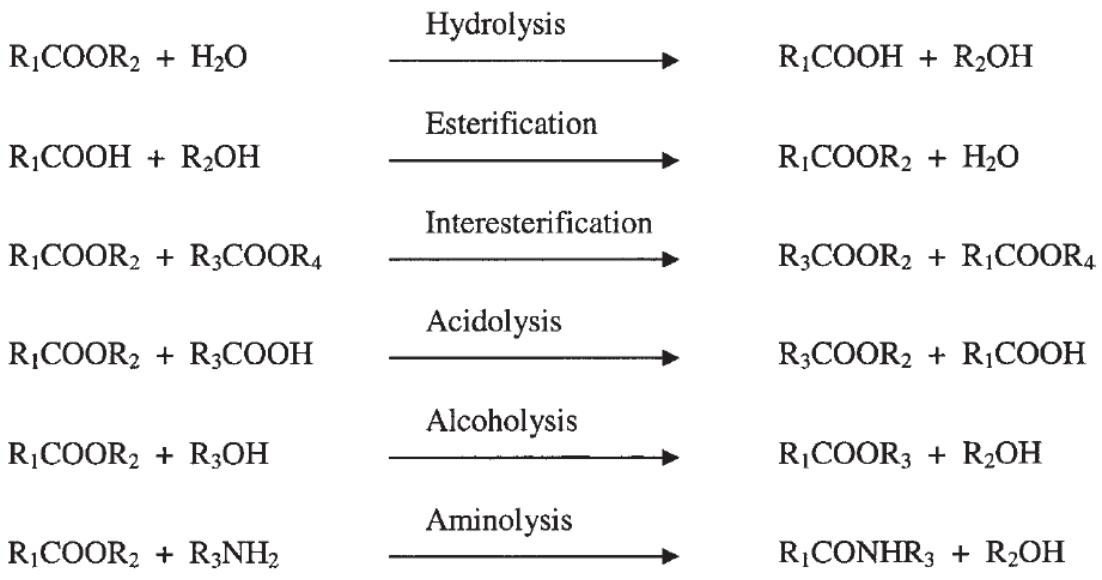
فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱ لیپاز

لیپاز (تری آسیل گلیسرول آسیل هیدرولاز EC 3.1.1.3) دسته ای از آنزیم های هیدرولاز و زیر مجموعه استراز ها است که هیدرولیز تری گلیسیریدها را به گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد در سطح مشترک بین آب و چربی کاتالیز می کند. هیدرولیز سوبستراهای بلند زنجیره در سطح مشترک آب و چربی، مهمترین تفاوت لیپاز با استراز است [۱-۳].

علاوه بر واکنش هیدرولیز، لیپاز طیف گسترده ای از واکنش های مختلف از جمله استریفیکاسیون[1]، استریفیکاسیون درونی[2]، اسیدولیز[3]، الکولیز[4] و آمینولیز[5] را کاتالیز می کند (شکل۱-۱).



شکل۱-۱: واکنش های مختلفی که توسط لیپاز انجام می شود [۴]

لیپازها هیدرولیز پیوند استری اسید چرب را در تری آسیل گلیسرول (TAG) کاتالیز می کنند و اسیدهای

1. Estrification
2. Inter-estrification
3. Acidolysis
4. Alcholysis
5. Aminolysis

چرب آزاد[1] (FFA) را رها می سازند [۵]. این واکنش برگشت پذیر است، جهت واکنش بستگی به مقدار آب موجود در واکنش دارد. لیپاز در محیط هایی با آب کم، استریفیکاسیون، ترانس استریفیکاسیون و استریفیکاسیون درونی را انجام می دهد. خصوصیات بیوشیمیایی و مولکولی تعدادی از لیپازهای بدست آمده از منابع مختلف با توجه به اختصاصیت، توالی اسید آمینه و خواص کاتالیزوری تا حد زیادی تفاوت دارند. لیپاز بر اساس مهار فعالیت آنزیمی با استفاده از تغییرات شیمیایی، در ابتدا به عنوان سرین هیدرولاز[2] طبقه بندی شد. اسید آمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم در ناحیه بسیار حفاظت شده محصور است و این تنها ویژگی مشترک بین تمام لیپازهایی است که تاکنون تعیین توالی شده اند [۶].

لیپازها برای تبدیل زیستی لیپیدها در طبیعت ضروری هستند. فعالیت کاتالیزوری لیپاز تا حد زیادی به سوبسترا بستگی دارد. شواهد تجربی نشان می دهد که فعال شدن آنزیم در حضور روغن و آب به شکل گیری جایگاه فعال از طریق ایجاد تغییر در آرایش فضایی وابسته است. مطالعات اخیر در مورد ساختار لیپاز شواهدی را برای درک فعالیت هیدرولیتیک، فعال سازی بین سطحی و انتخاب استری لیپاز فراهم آورده است. آنزیم هایی از قبیل پروتئازها و کربوهیدرازها[3] سال ها به صورت صنعتی مورد استفاده قرار گرفتند و بیشترین سهم بازار جهانی را به خود اختصاص دادند. در حالی که لیپاز در حال حاضر کمتر از ۵ درصد سهم بازار را به خود اختصاص داده است، البته لیپاز با توجه به طیف گسترده فعالیت و کاربرد در صنایع مختلف می تواند سهم بیشتری در تجارت و بازار های جهانی داشته باشد [۷].

استفاده از لیپاز تا این اواخر عمدتا به صنایع شیمی روغن[4] و لبنی محدود بود. با این حال در ربع آخر قرن بیستم شاهد استفاده بی سابقه از لیپاز در زیست فناوری، ساخت دارو، آفت کش ها، تولید پروتئین های تک

1. Free fatty acid
2. Serine hydrolase
3. Carbohydrase
4. Oleochemica

سلولی[1]، ساخت زیست حسگر[2] و تصفیه پساب هستیم [۸-۱۰].

لیپاز توسط حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم ها تولید می شود و بر این اساس به عنوان لیپاز حیوانی، گیاهی و میکروبی طبقه بندی می شوند [۷]. لیپاز میکروبی[3] به دلیل ثبات، گزینش و طیف گسترده سوبسترایی توجه صنعتی خاصی را به خود معطوف داشته است [۱۱, ۱۲]. بسیاری از میکروارگانیسم ها از جمله باکتری ها، مخمر ها و قارچ ها به عنوان تولید کنندگان بالقوه لیپاز خارج سلولی شناخته شدند [۱۳].

لیپاز پانکراسی خوک یکی از اولین لیپازهای شناخته شده است. لیپاز گیاهی به صورت تجاری استفاده نمی شود، اما لیپازهای حیوانی و میکروبی به طور گسترده استفاده می شوند. مهم ترین منابع حیوانی لیپاز، لوزالمعده گاو، گوسفند و خوک است. نقطه ضعف لیپاز پانکراسی (حیوانی) عدم کاربرد آن در فرآوری مواد غذایی گیاهی است. عصاره پانکراس خوک حاوی تریپسین[4] می باشد، که اسیدهای آمینه را تلخ مزه می کند. این عصاره ممکن است حاوی ویروس های حیوانی باقی مانده، هورمون ها و سایر مواد نامطلوب باشد [۷].

لیپاز به عنوان یک کاتالیزور زیستی پیشرو قابلیت استفاده در صنایع زیستی و فناوری چربی را دارد و در متابولیسم چربی به روش *In situ* و در صنعت به روش *Ex situ* مورد استفاده قرار گرفته است. تعداد لیپازهای در دسترس از سال ۱۹۸۰ افزایش یافته است [۱۴]. این افزایش در نتیجه دستاوردهای بزرگ ایجاد شده در کلون نمودن و بیان آنزیم از میکروارگانیسم ها و همچنین افزایش تقاضا برای این کاتالیزورهای زیستی جدید و با ویژگی های خاص از جمله اختصاصیت، ثبات، تحمل نسبت به pH و دماهای مختلف بوده است [۱۵, ۱۶].

4. Single cell protein
2. Biosensor
3. Microbial lipase
4.Trypsin

۱-۲ کاربردهای لیپاز

توانایی لیپاز در انجام تبدیلات زیستی باعث شده است که به طور فزاینده ای در صنایع غذایی، شوینده ها، آرایشی- بهداشتی و صنایع دارویی مورد توجه قرار گیرد. لیپاز به بخش جدایی ناپذیر از صنعت مواد غذایی پیشرفته تبدیل شده است و در تهیه انواع محصولات از جمله آب میوه ها، تخمیر سبزیجات و غنی سازی لبنیات استفاده می شود. همچنین در صنعت چرم سازی برای فرآوری چرم و پوست و در تصفیه پساب برای تیمار لجن فعال و دیگر مواد زائد استفاده می شود که با حذف لایه چربی اکسیژن رسانی را تسهیل می نماید [۸، ۱۷].

۱-۲-۱ لیپازها در صنایع لبنی[1]

لیپازها در صنایع لبنی به منظور هیدرولیز چربی شیر کاربرد ویژه ای در تقویت طعم پنیر، تسریع در فرآیند رسیدن پنیر و محصولات مشابه آن، لیپولیز چربی کره و خامه دارند. افزودن آنزیم لیپاز به طور اولیه اسیدهای چرب زنجیر کوتاه (C_4-C_6) را که مسئول ایجاد طعم تند و تیز می باشند و اسیدهای چرب زنجیر متوسط (C_{12}-C_{14}) که طعم صابونی ایجاد می کنند را از محصول جدا می سازند. به علاوه اسیدهای چرب آزاد در واکنش های شیمیایی ساده به عنوان آغازگر ساخت مواد طعم دهنده نظیر استو- استات، اسیدهای کتو- متیل کتون ها و استرهای معطر نقش دارند. پنیری باکیفیت خوب از لحاظ طعم را می توان بوسیله فعالیت لیپازها به صورت تک یا مخلوطی از چند لیپاز تولید کرد. تعداد زیادی از لیپازهای میکروبی در تولید پنیر استفاده می شوند که از جمله آنها می توان به لیپاز حاصل از *آسپرژیلوس نایجر*[2]، *موکور مایهی*[3] و *آسپرژیلوس اوریزه*[4] اشاره نمود. از لیپازها به طور گسترده در تولید پنیرهای تقلیدی[5] استفاده می شود (به تقلید از پنیرهای ساخته شده از شیر بز یا میش). بنابراین افزودن لیپاز به شیر گاو باعث تولید طعم مشابه طعم شیر بز یا میش می

1. Dairy industry
2. *Aspergillus niger*
3. *Mucor miehei*
4. *Aspergillus oryzae*
5. Imitation cheese

شود. این آنزیم در تولید پنیرهایی که از نظر آنزیمی اصلاح شده اند و به پنیرهای اصلاح شده آنزیمی[1] معروف هستند نیز کاربرد دارد. پنیر اصلاح شده، پنیری است که در حضور آنزیم ها در دماهای بالا برای ایجاد طعم تولید می شود. این ماده به عنوان جزء غذایی در محصولاتی نظیر سس ها، سوپ ها و اسنک ها استفاده می شود [۱۸, ۱۹].

۱-۲-۲ لیپازها در پاک کننده ها[2]

آنزیم ها در پودرهای لباسشویی مصارف تجاری بالایی دارند و امروزه مردم جهان به مصرف پودرهای لباسشویی که در دماهای پایین عمل پاک کنندگی را انجام می دهند، تمایل دارند. با دستکاری ژنتیکی، آنزیم های لیپازی تولید شده است که این نیاز را برطرف می سازد. لایپکس نوو نوردیسک لیپولاز[3]، اولترا لیپولاز[4] و لیپوپرایم لیپولاز[5] مثالهایی از این محصولات می باشند [۴] .

۱-۲-۳ لیپازها در صنعت شیمی روغن[6]

هدف از کاربرد لیپازها در صنعت شیمی روغن، حداقل رساندن تجزیه حرارتی و صرفه جویی انرژی در طی هیدرولیز، گلیسرولیز و الکولیز می باشد. امروزه واکنشهای هیدرولیز، گلیسرولیز و الکولیز به طور مستقیم بر روی سوبستراهای مخلوط بوسیله لیپاز تثبیت شده انجام می شود. در این روش لیپاز باعث هیدرولیز موفقیت آمیز چربی بدون نیاز به تجهیزات گران قیمت می شود [۲۰].

۱-۲-۴ لیپازها در سنتز تری گلیسیریدها[7]

امروزه تلاشهای زیادی در سنتز بسیاری از تری گلیسیریدها با خواص تغذیه ای یا رژیمی مشابه چربی شیر شده است. این تری گلیسیریدها و چربی های مشابه از نظر عملکردی به آسانی به وسیله لیز اسیدی اجزاء

1. Enzymatic modified cheese
2. Detergents
3. Lipex Novo Nordisk's Lipolase
4. Ultra Lipolase
5. LipoPrime Lipolase
6. Oil Chemical Industry
7. Triglycerides

روغن پالم که از لحاظ ۲- پالمیتول گلیسیرید به همراه اسیدهای چرب غیر اشباع غنی هستند بدست می آیند. این لیز اسیدی به وسیله لیپازهای اختصاصی در نواحی ۱،۳ تری گلیسیریدها برای تهیه محصولات مهم مغذی حاوی اسیدهای چرب زنجیره متوسط انجام می شوند. بهینه سازی روغن ها به منظور غنی سازی با اسیدهای چرب حاوی پیوند چندگانه غیر اشباع نظیر اسید ایکوزاپنتانوئیک[1]، اسید آراشیدونیک[2] به وسیله لیپازها انجام می شود [۲۰, ۲۱].

۱-۲-۵ لیپازها در سنتز سورفاکتانت ها[3] (فعال کننده های سطحی)

پلی گلیسرول ها و استرهای اسیدهای چرب کربوهیدرات ها به عنوان پاک کننده های صنعتی و امولسیون کننده ها در طیف وسیعی از فرمول های غذایی مانند سس، بستنی و مایونز کاربرد دارند. سنتز آنزیمی سورفکتانت ها در دمای ۸۰ -۶۰ درجه سانتیگراد به وسیله لیپازهایی با فعالیت گزینشی انجام می پذیرد. مونو و دی استرهای مونو ساکاریدی با راندمان بالا به عنوان مواد شروع کننده بدست می آیند. یکی از بیوسورفاکتانت ها از عمل ترانس استریفیکاسیون لیپاز حاصل از *آسپرژیلوس ترئوس*[4] بین روغن های طبیعی و قندهای الکلی ساخته شده است. لیپازها همچنین می توانند جایگزین فسفولیپازها در تولید ایزوفسفولیپیدها شوند [۲۲].

۱-۲-۶ لیپازها در ساخت محصولات آرایشی- بهداشتی[5]

تولید ایزوپزوپیل میریستات، ایزوپزوپیل پالمیتات و ۲- اتیل هگزیل پالمیتات به عنوان نرم کننده در محصولات آرایشی- بهداشتی نظیر کرم پوست، کرم برنزه کننده و روغن های حمام کاربرد دارند. استرهای مومی به طریق آنزیمی بوسیله لیپاز *کاندیدا سایلندراسا*[6] در بیوراکتور تولید می شوند [۲۰].

---

1. Eicosapentaenoic acid
2. Arachidonic acid
3. Surfactants
4. *Aspergillus terreus*
5. Cosmetic Products
6. *Candida cylindracea*

۱-۲-۷ لیپازها در صنایع دارویی و کشاورزی[1]

تفکیک اسیدهای ۲- هالوپروپونیک به عنوان مواد شروع کننده برای سنتز علف کش های فنوکسی پروپیونات، فرآیندی بر اساس استریفیکاسیون انتخابی است که بوسیله لیپاز لوزالمعده خوک در هگزان بی آب کاتالیز می شود. کاربرد دیگر لیپازها در تفکیک مخلوط های راسمیک، هیدرولیز الکل های اپوکسی استر می باشد. تولید متیل متوکسی فنیل گلیسیدات[2] به عنوان یک ماده حد واسط کلیدی در تولید داروهای قلبی عروقی با خلوص بالا به وسیله لیپازها امروزه تجاری شده است [۲۰].

۱-۲-۸ لیپازها در صنعت پلیمر

لیپازها کاربرد وسیعی در سنتز پلیمرهای فعال نوری دارند. خاصیت گزینش انتخابی لیپاز، کاربرد آن را در سنتز پلیمرهای فعال نوری مفید ساخته است [۲۰].

۱-۳ مخمرهای تولید کننده لیپاز

با توجه به گزارش واخلو و کر[3] گونه های اصلی مخمرهای تولید کننده لیپاز شامل *کاندیدا روگوزا*[4]، *کاندیدا تروپیکالیس*[5]، *کاندیدا آنتارکتیکا*[6]، *کاندیدا سایلینداراسا*[7]، *کاندیدا پاراپسیلوپسیس*[8]، *کاندیدا دفورمانس*[9]، *کاندیدا کرووااتا*[10]، *کاندیدا ولید*[11]، *یاروویا لیپولیتیکا*[12]، *رودوتورولا گلوتینیس*[13]، *رودوتورولا*

1. Pharmaceutical and agriculture industry
2. Methoxymethy phenyl Glysydat
3. Vakhlu and Kour
4. *Candida rugosa*
5. *Candida tropicalis*
6. *Candida antarctica*
7. *Candida cylindracea*
8. *Candida parapsilopsis*
9. *Candida deformans*
10. *Candida curvata*
11. *Candida valida*
12. *Yarrowia lipolytica*
13. *Rhodotorula glutinis*

پیلیموران[1]*، پیکیا بیسپورا*[2]*، پیکیا مکزیکانا*[3]*، پیکیا سیویکولا*[4]*، پیکیا زایلوزا*[5]*، پیکیا بورتونی*[6]*، ساکارومیسس کراتاژنسیس*[7]*، تورولاسپورا گلوبوزا*[8] *و تریکوسپورون آستروئیدس*[9] می شوند. ژن هایی رمز کننده لیپاز از گونه های *کاندیدا، ژئوتریکوم، تریکاسپورون و یاروویا لیپولیتیکا* کلون و بیان شدند [۷, ۲۳].

۱-۴ مخمر *یاروویا لیپولیتیکا*

مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* (شکل۱-۱) مخمری غیر معمول[10] می باشد. در واقع اصطلاح غیر معمول برای متمایز نمودن *یاروویا* از مخمرهایی که مطالعه آنها در فرآیندهای مختلف مرسوم و معمول است، به کار می‌رود [۲۴]. این مخمر غیر بیماریزا می باشد و توسط اداره دارو و غذا آمریکا به عنوان GRAS[11] تایید شده است [۲۵]. این مخمر در سال ۱۹۲۸ با نام *مایکوترولا لیپولیتیکا* توسط هاریسون برای اولین بار جداسازی و شناسایی شد. رده بندی تاکسونومیک آن به قرار زیر است:

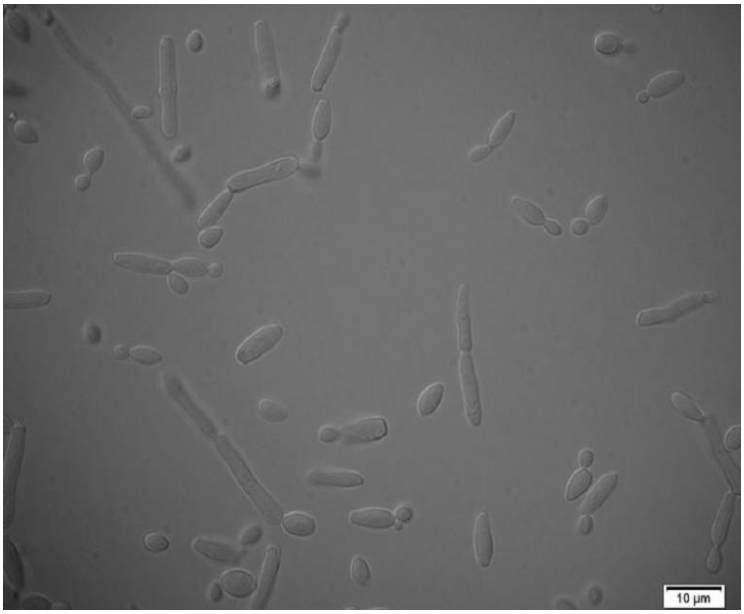
یوکاریوتا> فانجای> دیکاریا> آسکومایکوتا> ساکارومایکوتینا > ساکارومایستس>ساکارومایستالس> دیپوداسکاسه> یاروویا[12] [۲۶].

از خواستگاه های اکولوژیکی مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* می توان غذاهای چرب از قبیل مارگارین، روغن زیتون، پنیر و همچنین روغن و پس‌ماندهای گیاهی را نام برد. این مخمر به علت داشتن آنزیم های لیپاز و پروتئاز خارج سلولی از محصولات غذایی مختلفی جداسازی شده اند [۲۷, ۲۸]. سویه های *یاروویا*

1. *Rhodotorula pilimornae*
2. *Pichia bispora*
3. *Pichia mexicana*
4. *Pichia sivicola*
5. *Pichia xylosa*
6. *Pichia burtonii*
7. *Saccharomycopsis crataegenesis*
8. *Torulaspora globosa*
9. *Trichosporon asteroids*
10. non-conventional yeasts
11. generally recognized as safe [GRAS]
4. Eukaryota › Fungi › Dikarya › Ascomycota › Saccharomycotina ›Saccharomycetes › Saccharomycetales Dipodascaceae ›Yarrowia

لیپولیتیکا از خاک، فاضلاب و محیط های آلوده به ترکیبات روغنی و نفتی نیز جداسازی شدند [۲۹].

یاروویا لیپولیتیکا دارای محتوای G+C در حدود ۴۹/۶ –۵۱/۷٪ می باشد و اندازه ژنوم آن ۱۱ مگا باز است. با تفرق کروموزوم ها توسط الکتروفورز ضرباندار[1] اندازه ژنوم سویه وحشی کمی بزرگتر و در حدود۱۲/۷ مگا باز تعیین شده است [۲۴].



شکل ۱-۲: تصویر میکروسکوپ نوری مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* [۳۰]

متابولیتهایی که توسط *یاروویا لیپولیتیکا* ترشح می شوند شامل اسید های آلی نظیر سیترات، ایزوسیترات، آلفاکتوگلوتارات، اسید آمینه لایزین و همچنین آنزیم های خارج سلولی شامل آلکالین پروتئاز[2]، پروتئاز اسیدی[3]، RNase، فسفاتاز، استراز و لیپاز می شوند [۲۴].

یاروویا لیپولیتیکا می تواند هیدروکربن هایی از قبیل آلکان ها را به عنوان منبع کربن مصرف کند. این مخمر توانایی بیوسنتز اسیدهای چرب و تجزیه آنها را نیز دارا می باشد و می تواند اتانول را تا غلظت ۳ درصد به

1. Pulse field electrophoresis
2. Alkaline protease
3. Acide protease

عنوان منبع کربن مصرف کند. بیشتر سویه های *یاروویا لیپولیتیکا* بر روی استات[1] به عنوان تنها منبع کربن رشد می نمایند. استات سدیم تا غلظت ۴/ ۰ درصد برای مخمر قابل تحمل بوده و غلظت بالاتر از این رشد را کند می سازد و غلظت های بیشتر از ۱ درصد رشد را مهار می کند. *یاروویا لیپولیتیکا* برای مصرف هیدروکربن ها، اسید های چرب، الکل و استات نیازمند القای مسیر گلی اکسالات می باشد [۲۴]. سایر منابع کربنی مورد استفاده توسط *یاروویا لیپولیتیکا* گلیسرول[2]، اسید لاکتیک، اسید بوتریک، اسید پروپیونیک، اسید مالیک و اسید سوکسینیک می باشد [۳۱-۳۳]. این مخمر همچنین می تواند از ملاس، ان- استیل گلوکز آمین، پساب کارخانجات روغن پالم[3] و روغن زیتون، فاضلاب شهری، آب پنیر، لجن فاضلاب، چربی های صنعتی[4]، چربی های اشباع نشده و ... به عنوان سوبسترا استفاده کند [۲۹, ۳۴, ۳۵].

۱-۵ مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* و تولید لیپاز

چندین آنزیم توسط *یاروویا لیپولیتیکا* ترشح می شود و فعالیت های لیپازی و استرازی این آنزیم ها در چندین تحقیق تشخیص داده شده است [۳۶ , ۳۷]. ترشح لیپاز در این مخمر ابتدا در سال ۱۹۴۸ توسط پیتر و نلسون[5] گزارش شد [۳۸]. یک لیپاز خارج سلولی و دو نوع متصل به سلول معادل لیپاز I (۳۹ کیلو دالتون) و لیپاز II (۴۴ کیلو دالتون) توسط اوتا[6] و همکاران شرح داده شده است [۳۷]. آنزیم های متصل به سلول از مخمر با بازیابی کلی ۸ درصد توسط کروماتوگرافی در ستون های CM سفاروز CL-6B ، DEAE سفاروز CL-6B و سفادکس G100 خالص شده است. هر دو آنزیم برای ۲۰ دقیقه در زیر ۳۷ درجه سانتیگراد و همچنین در pH های مختلف بین ۴/۵ تا ۸ به مدت ۲۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتیگراد پایدار باقی

1 .acetate
2 .glycerol
3 .palm oil mill
4.industrial fats
5. Petersand Nelson
6.Ota

می مانند [۳۷]. لیپاز خارج سلولی به اسید اولئیک به عنوان یک فعال کننده - پایدار کننده نیاز دارد در حالی که لیپاز متصل به سلول چنین نیست و در چندین ویژگی با لیپاز خارج سلولی تفاوت دارد [۳۹]. تولید لیپاز خارج سلولی و متصل به سلول به ترکیب کربن و نیتروژن محیط کشت بستگی دارد. لیپاز خارج سلولی فقط در محیط کشت حاوی یک منبع نیتروژن آلی تولید می شود و سطوح لیپاز توسط مورفولوژی سلول تعیین می شود [۴۰]. اوتا همکارانش نشان دادند که مهندسی محیط کشت می تواند منجر به افزایش تولید آنزیم خارج سلولی شود. pH بهینه لیپاز I برای هیدرولیز روغن زیتون و هیدرولیز تریبوتیرین[1] به عنوان سوبسترا برابر ۸/۲ بود. pH بهینه لیپاز II برای هیدرولیز روغن زیتون معادل ۸، برای تریبوتیرین برابر ۷/۵ و برای تری اولئین[2] ۷ بود. لیپاز خارج سلولی تخلیص شده به اسید اولئیک به عنوان یک فعال ساز برای هیدرولیز تری گلیسریدهای خارجی نیاز دارد، اما به نظر می رسد که لیپازهای متصل به سلول چنین نیازی ندارند. توالی اسید آمینه N ترمینال لیپاز تخلیص شده خارج سلولی ۳۹ کیلو دالتونی (به نام لیپازA) توسط کانو و اوتا[3] در سال ۱۹۹۶ تعیین شد [۴۱].

مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* دارای ۱۶ پارالوگ از ژن های کد کننده لیپاز است. از بین این پارالوگ ها، ژن های*Lip2*، *Lip7* و *Lip8* تا حدودی مورد مطالعه قرار گرفته اند. از بین این ۱۶ پارالوگ تعداد اندکی بیان می شوند و لیپاز تولید شونده بستگی به نوع اسید چرب یا روغنی دارد که به عنوان منبع کربن مورد استفاده قرار می گیرد. اولین تلاش برای شناسایی و تعیین ژنتیکی لیپاز در *یاروویا لیپولیتیکا* توسط ژنتیک معکوس انجام شد. برای این امر از تکنیک دقیق تکثیر سریع انتهای ۵´ RACE – PCR cDNA به همراه پرایمرهای آنتی سنس هم ارز با توالی مرکزی حفاظت شده GHSLGG/AA استفاده شد که در بر دارنده باقیمانده کاتالیتیک سرین است. کتابخانه های cDNA *یاروویا لیپولیتیکا* در محیط القایی حاوی روغن زیتون یا اسید

1. Tributyrin
2. Triolein
3. Kuno and Ota