

جداسازی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم لیپاز از زیتون و بررسی اثر پارامترهای گوناگون بر تولید آنزیم در تخمیر حالت جامد

سمیرا مرادی^۱، سیدهدادی رضوی^{۲*}، سیدمحمد موسوی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲. استاد، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳. استادیار، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس

دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۳ - تصویب: ۱۳۹۴/۳/۶

چکیده

باکتری باسیلوس هوزی، مزوفیل، و لیپولیتیک (فعالیت آنزیمی ۴۰ U/ml) از نمونه عصاره زیتون جداسازی شد. سوپه جداسازی شده براساس مشخصات مورفولوژیکی و شیمیایی و از طریق روش ملکولی توالی‌یابی ژن 16 S rRNA شناسایی شد. تأثیر سوپسترای جامد (هسته انار آسیاب‌شده، هسته انگور آسیاب‌شده، و دانه گشنیز آسیاب‌شده به‌عنوان سوپسترای جامد استفاده شدند)، اندازه ذرات سوپسترا، محتوای رطوبت، و سرعت چرخش به‌عنوان فاکتورهای تأثیرگذار بر تخمیر حالت جامد بررسی شد. فعالیت آنزیمی بهینه ۱۲۰ U/ml از محیط کشتی حاوی ۳ درصد عصاره دانه گشنیز آسیاب‌شده، ۱۰ g/l عصاره مخمر، ۲۵ g/l روغن زیتون، محتوی رطوبت ۷۰ درصد، و سرعت چرخش ۱۷۰ rpm بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری به‌دست آمد که فعالیت آنزیمی در مقایسه با حالت قبل از بهینه‌سازی ۳/۰۷ برابر افزایش یافت.

کلیدواژگان: آنزیم لیپاز، باسیلوس، تخمیر حالت جامد، 16S rRNA.

مقدمه

لیپاز آنزیمی است که توانایی هیدرولیز استرها را دارد و نقش اختصاصی تبدیل تری‌گلیسرید به گلیسرول و اسید چرب را ایفا می‌کند، که به این عمل لیپولیز می‌گویند. لیپازها را می‌توان زیرمجموعه‌ای از استرازاها دانست. آنزیم‌های لیپاز در بسیاری از گونه‌های حیوانات، گیاهان، و میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شوند. در زمان حاضر آنزیم‌های تولیدی توسط منابع میکروبی به‌دلیل مشخصات ویژه آنها مانند عمل در شرایط مداوم، پایداری در حلال‌های آلی، و ویژه‌گزینی بالا بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. لیپازها کاربرد فراوانی در بیوتکنولوژی و شیمی آلی دارند (Kempka et al., 2008). به‌دلیل سهولت بازیافت آنزیم از محیط کشت میکروارگانیسم‌هایی چون باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، و اکتینومیست‌ها به‌عنوان منابع لیپاز خارج‌سلولی شناخته شده‌اند. گونه‌های *Bacillus*، *Acromobacter*، *Rhizopus*، *Pseudomonas*، *Candida*، *Acinetobacter* و *Geotrichum* به‌عنوان گونه‌های تجاری اصلی شناخته می‌شوند (Ertugrul et al., 2007). میکروارگانیسم‌های دارای پتانسیل تولید لیپاز را در زیستگاه‌های گوناگون مانند ضایعات روغن‌های

گیاهی، صنایع لبنی، خاک‌های آلوده به روغن، دانه‌ها، و غذاهایی با کیفیت پایین می‌توان یافت (Sharma et al., 2001). این نشان می‌دهد که ترکیبات و مواد گوناگون موجود در محیط زیست همچون آب، خاک، گیاهان، دانه‌های روغنی، میوه‌ها، ضایعات مواد غذایی، و مانند اینها پتانسیل زیادی برای جداسازی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آنزیم لیپاز دارند و می‌توان از این منابع برای جداسازی استفاده کرد (Gupta et al., 2004). از ضایعات دانه زیتون برای جداسازی باکتری‌های تولیدکننده لیپاز استفاده شده است، از این نمونه ۱۷ سوپه باکتریایی جداسازی شده است. در میان این ۱۷ سوپه جداسازی‌شده باسیلوس بیشترین فعالیت (۱۵ U/ml) را از خود نشان داده است (Ertugrul et al., 2007). همچنین از روغن زیتون و آفتابگردان سوپه‌های سودوموناس، باسیلوس، و استافیلوکوکوس نیز جداسازی شده است (Haba et al., 2000). نزدیک به ۴۰ گونه از اسپرزیلوس و پنی‌سیلیوم برای تولید لیپاز روی محیط آگار و محیط مایع حاوی روغن زیتون به‌عنوان سوپسترا جداسازی شده است (Yadav et al., 1998). در طی سال‌های گذشته، روش‌های مولکولی به‌عنوان روش‌های مؤثر برای شناسایی فلور غالب در جمعیت‌های میکروبی پیچیده از قبیل فرایندهای تخمیری استفاده شده است (Deurraza et al., 2007). تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر PCR از

توالی‌یابی‌های ژن 16S rRNA (Collins et al., 1991) است. در این مطالعه از این روش برای شناسایی سویه‌ی جداشده استفاده شده است.

تخمیر حالت جامد مزایای بسیاری در بیوتکنولوژی چون تولید محصولات تخمیری بیشتر، غلظت و پایداری بالاتر محصول نهایی مانند پایداری در مقابل گرما و خصوصیات دیگر دارد. با توجه به این مزایا در دو دهه‌ی گذشته تخمیر حالت جامد در تولید آنزیم‌ها، متابولیت‌ها، و دیگر محصولات با ارزش بیش از پیش استفاده می‌شود. تخمیر با استفاده از حالت جامد (SSF) تخمیری است که روی سوبسترای جامد مرطوب در غیاب یا حضور اندک آب آزاد انجام می‌شود. این محیط کشت خصوصیتی نزدیک به محل طبیعی زندگی میکروارگانیسم‌ها را دارد بنابراین با آنها سازگار است. در این محیط می‌توان از ترکیباتی با ارزش اقتصادی پایین مانند ضایعات کشاورزی و صنعت غذا محصولی با بازده اقتصادی بالا تولید کرد که از یک سو باعث کاهش هزینه‌ی تولید می‌شود و از سوی دیگر آلودگی ناشی از واردشدن این ضایعات به طبیعت را کاهش می‌دهد.

در این مطالعه جداسازی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم لیپاز از نمونه‌ی عصاره‌ی میوه‌ی زیتون انجام شده است و در ادامه برای تولید بالای لیپاز خارج‌سلولی روش تخمیر حالت جامد استفاده شده است. در این نوع تخمیر از دانه‌های گشنیز، انار، و انگور آسیاب‌شده به‌عنوان سوبسترای جامد استفاده شده است که نقش حمایت‌گر و تأمین‌کننده‌ی مواد مغذی برای رشد میکروارگانیسم را ایفا می‌کنند. هر سه این مواد دارای مقدار شایان توجهی روغن هستند که روغن به‌عنوان القاگر یا تحریک‌کننده‌ی تولید آنزیم لیپاز توسط میکروارگانیسم‌ها اهمیت دارد و همچنین این روغن می‌تواند به‌عنوان منبع کربن نیز عمل کند. در تخمیر حالت جامد سعی بر آن است که از مواد ارزان‌قیمت در محیط کشت استفاده شود و قیمت تمام‌شده‌ی محصول کاهش یابد. هسته‌ی انار و انگور جز ضایعات کارخانجات تهیه‌ی کنسانتره و آبمیوه‌اند بنابراین با قیمت بسیار پایین در دسترس هستند و همچنین دانه‌ی گشنیز نیز با قیمت مناسب همیشه در دسترس است. با استفاده از طرح یک فاکتور در هر زمان (One factor at a time) نوع و غلظت ترکیبات و پارامترهای مؤثر بر کشت، بهینه‌سازی شد.

مواد و روش‌ها

مواد

انار و انگور از بازار محلی واقع در شهر تهران خریداری شدند و از هسته‌های آنها استفاده شد. دانه‌ی گشنیز نیز از مغازه‌ی محلی در

تهران خریداری شد. ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی این سه ماده در جدول ۱ نشان داده شده است. مواد شیمیایی شامل تریتون ایکس ۱۰۰، تریس HCl، ایزوپروپانول، صمغ عربی، ردآمین B، پپتون، عصاره‌ی مخمر، نوترینت برات، کلسیم کلرید، منیزیم کلرید ۶، آب، منگنز کلرید ۴، آب، مس کلرید، پتاسیم کلرید، سدیم کلرید، و آهن (۳) کلرید از شرکت مرک آلمان و گلوکز، ساکارز، گالاکتوز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، سوربیتول، رافینوز، ملی‌بیوز، و مانیتول از شرکت سیگما آلد ریچ کانادا تهیه شدند. سایر مواد استفاده‌شده دارای درجه‌ی آزمایشگاهی بودند.

جدول ۱. ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی سوبسترای جامد

نمونه	پروتئین (درصد)	چربی (درصد)	ماده خشک (درصد)
دانه‌ی گشنیز	۱۵/۹۹	۱۵/۵	۹۶/۱
هسته‌ی انار	۱۲/۹	۲۴/۸۵	۹۳/۲
هسته‌ی انگور	۱۲/۳۵	۲۵/۰۵	۹۴/۴

روش جداسازی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم لیپاز

نمونه‌ی زیتون از بازار محلی در تهران خریداری شد. گوشت میوه از هسته جدا و با دستگاه مخلوط‌کن کاملاً مخلوط شد و سپس با استفاده از پارچه‌ی توری عصاره جدا شد. بعد از آماده‌سازی نمونه برای کشت، ابتدا غنی‌سازی اولیه‌ی برای افزایش تعداد میکروارگانیسم انجام شد. در یک ارلن‌مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی ۸g/l نوترینت برات و ۳g/l سدیم کلرید (pH برابر با ۶/۷) آماده‌سازی شد. مقدار ۵ گرم از نمونه‌ی عصاره‌ی زیتون به محیط کشت تهیه‌شده در شرایط استریل اضافه شد، سپس محیط کشت در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتیگراد و سرعت چرخش ۱۶۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بعد از غنی‌سازی برای ایجاد محیط مناسب به‌منظور رشد باکتری مورد نظر از محیط افتراقی باکتری‌های تولیدکننده لیپاز استفاده شد. برای این منظور در یک ارلن‌مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۸g/l نوترینت برات، ۳g/l سدیم کلرید، و ۲۵g/l امولسیون روغن زیتون (pH برابر با ۶/۵) آماده شد. مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر کشت مقدماتی (۵درصد) وارد محیط کشت اصلی شد. برای هر نمونه ۳ محیط کشت آماده و در دماهای ۲۵، ۳۷، و ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در ۱۶۰ rpm گرمخانه‌گذاری شد. برای غربال‌کردن کیفی باکتری‌های تولیدکننده لیپاز از محیط کشت حاوی ۱۰g/l عصاره‌ی مخمر، ۳g/l کلریدسدیم، ۲۵g/l روغن زیتون امولسیون‌شده، و ۰/۰۰۱g/l ردآمین B، آگار ۱g/l

۳/۷۵ درصد صمغ عربی) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت محلول صمغ روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. در حین همزدن محلول روغن زیتون به صورت قطرات ریز به ترکیب اضافه شد. سپس با دستگاه التراتراکس (IKA مدل T25) (۲ دقیقه rpm ۵۰۰۰ و ۳ دقیقه rpm ۸) ترکیب صمغ و روغن زیتون هموژنیزه شد (Gharibzhahedi et al., 2013).

تعیین پارامترهای کینتیکی

سوبسترای پلی نیتروفنیل پالمیتات در غلظت های ۰/۵ mM/ml تا ۱ در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتیگراد و pH ۷ برای تعیین پارامترهای کینتیکی سرعت واکنش حداکثر (Vmax) mM/min و ثابت میکائیلیس منتن (Km) mM برای آنزیم لیپاز خام به کار برده شده است. یک واحد فعالیت آنزیمی (U) به عنوان مقدار آنزیمی است که یک میکرومول اسید چرب را در دقیقه از هیدرولیز پلی نیتروفنیل پالمیتات در شرایط واکنش آزاد می کند. پارامترهای کینتیکی از نمودار معادله Lineweaver-burk تخمین زده شد.

شناسایی سویه جداسازی شده از طریق روش 16S rRNA

مرحله اول شناسایی استخراج DNA است که از روش استخراج حرارتی استفاده شد (Alegria et al., 2009). مرحله بعدی انجام واکنش Polymerase Chain Reaction (PCR) است. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) روش آنالیز اسید نوکلئیک برای تولید مقادیر زیاد از بخش های خاص DNA یک توالی طولی و تعریف شده در مقداری اندک از یک الگوی ترکیبی است. این تکنیک به طور انتخابی یک تک مولکول از DNA یا RNA را چندین میلیون برابر در طی چند ساعت افزایش می دهد و تکثیر می کند که بر این اساس برای توالی یابی و شناسایی دقیق ایزوله ها به روش مولکولی، تکثیر ژن 16S rRNA، که بر اساس نواحی محافظت شده این ژن عمل می کند، انجام شد. برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای عمومی استفاده شد:

پرایمر Forward: 27F با توالی

(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

پرایمر Reverse: 1492R با توالی

(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')

پس از انجام تست های شیمیایی، استخراج DNA و PCR انجام پذیرفت. بعد از مشاهده الگوی باندهای مناسب و اطمینان از این موضوع که محصولات PCR آماده توالی یابی با توجه به پروفایل باندهای سویه مورد نظر (شکل ۱) است. طول قطعه مورد نظر ۱۵۰۰ جفت بازی است. همان گونه که در اشکال مشخص است، مکان قرارگیری باندها، با توجه به نردبان (خط کش)

۲۵ در pH ۷ استفاده شد که در اطراف کلنی های تولید کننده آنزیم لیپاز در این محیط کشت در زیر تابش نور لامپ UV هاله نارنجی ایجاد می شود (Kok et al., 1995). چندین مرحله تا خالص سازی کامل بر همین محیط کشت رد امین B آگار به صورت کشت خطی کشت داده شد تا کلنی تک و کاملاً خالص به دست آید.

اندازه گیری فعالیت آنزیم لیپاز

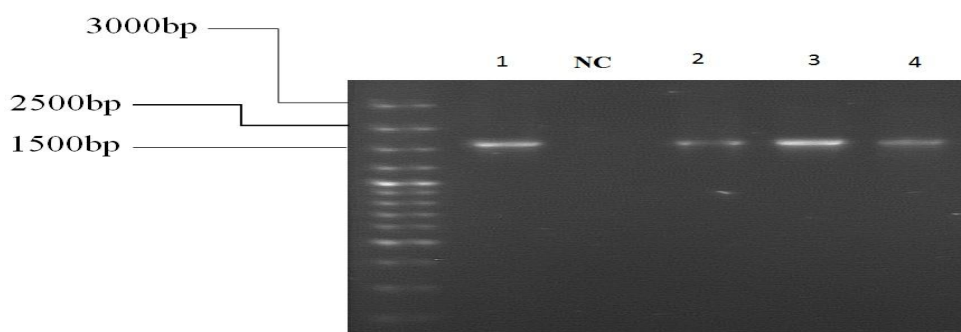
تعیین کمی فعالیت لیپازی باکتری های جداسازی شده و مقایسه این سویه ها از نظر فعالیت بدین صورت انجام شد که پس از کشت میکروارگانیسم در محیط کشت مورد نظر و گرمخانه گذاری در زمان مشخص، مقداری از این سوسپانسیون میکروبی در شرایط سرعت rpm ۶۰۰۰، دمای ۳۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه دوفاز شده، مایع رویی (سوپرناتانت) حاوی آنزیم با فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتر صاف شد و در پایان مایع شفاف فاقد کدورت که حاوی آنزیم مورد نظر است، به دست آمد. از پلی نیتروفنیل پالمیتات به عنوان سوبسترای آنزیم برای اندازه گیری فعالیت لیپاز استفاده شد. محلول سوبسترا بدین صورت آماده شد که محلول یک شامل ۳۰ میلی گرم پلی نیتروفنیل پالمیتات در ۱۰ میلی لیتر ایزوپروپانول در محلول دو که شامل ۰/۱ گرم صمغ عربی، ۰/۴ میلی لیتر تریتون ایکس ۱۰۰ در ۹۰ میلی لیتر از بافر ۵۰ میلی مولار تریس HCl است (pH ۷)، حل شد. نمونه آنزیم با سوبسترای تهیه شده به نسبت ۱ به ۹ مخلوط شد و پس از گرمخانه گذاری در طی زمان با استفاده از اسپکتروفتومتر Cecil مدل CE2502 در طول موج ۴۱۰ نانومتر جذب نمونه خوانده شد و سپس فعالیت آنزیمی با فرمولی مشخص محاسبه شد (Winkler & Stuckmann, 1979). در اینجا فعالیت آنزیم مقیاسی از آنزیم لیپاز تولیدی است. واحد فعالیت آنزیمی (U) مقدار آنزیمی است که یک میکرومول پلی نیتروفنیل را در دقیقه در شرایط آزمایش آزاد می کند. در اینجا فعالیت آنزیم مقیاسی از آنزیم لیپاز تولیدی است.

نحوه آماده سازی امولسیون روغن زیتون

برای تهیه امولسیون روغن زیتون از صمغ عربی به عنوان پایدار کننده برای دست یافتن به امولسیون مناسب با پایداری کافی استفاده شد. برای تهیه امولسیون با صمغ عربی ابتدا آب تا دمای ۴۵ درجه سانتیگراد حرارت داده شد، سپس مقدار صمغ مورد نظر (مقدار صمغ به روغن زیتون به نسبت ۱ به ۱/۵ در نظر گرفته شد. یعنی مقدار ۲/۵ درصد روغن زیتون و

میکروتیوب مربوط به نمونه کنترل منفی طی شده است، اما به دلیل نبودن رشته الگو، رشته‌ای جدید ایجاد نشده است. یک آمپلیکون یا محصول PCR انتخاب و برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. توالی‌یابی به وسیله Cycle extension در دستگاه توالی‌کننده ABI 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) و با استفاده از پرایمر پیشرو 27FYM، انجام شد.

استفاده شده دقیقاً همان طول قطعه را نشان می‌دهد، که نشان‌دهنده صحیح بودن مراحل انجام آزمون است. در تمامی مراحل مربوط به PCR ژن 16S rRNA از شاهد، که در علم مولکولی کنترل منفی نامیده می‌شود، استفاده شد. نمونه کنترل منفی دارای تمامی مخلوط‌های شرکت‌کننده در واکنش PCR است، به جز DNA مربوط به رشته الگو، آمپلیکون مربوط به نمونه کنترل منفی باید در هنگام الکتروفورز و مشاهده در زیر نور UV، فاقد الگوی بانندی باشد. هرچند سیکل‌های دمایی برای



شکل ۱. پروفایل‌های بانندی مربوط به سویه آزمون شده شماره ۳

نتایج و بحث

جداسازی باکتری

نه ایزوله باکتریایی از نمونه عصاره زیتون بعد از غنی‌سازی و کشت در محیط نوترینت براث غنی‌سازی شده با روغن زیتون جداسازی شدند. میوه‌های روغنی مانند زیتون به‌عنوان منابع عمده میکروارگانیسم‌های تولیدکننده لیپاز شناخته شده‌اند. زیتون دارای ترکیبات ایده‌آل برای رشد میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آنزیم لیپاز مانند روغن است که به‌عنوان محرک رشد عمل می‌کند و یکی از ترکیبات ضروری به حساب می‌آید. روغن زیتون حاوی اسیداولئیک زیادی است که این اسید چربی تک‌غیراشباعی است و سوبسترای بسیار ایده‌آلی برای رشد این نوع میکروارگانیسم‌ها به حساب می‌آید. روغن‌ها به‌عنوان القاگر در تولید آنزیم لیپاز عمل می‌کنند و حضور آنها در محیط کشت کاملاً ضروری است. این نه ایزوله با استفاده از محیط ردامین B آگار پلیت براساس خاصیت ایجاد هاله نارنجی در اطراف کلنی‌های تولیدکننده لیپاز در زیر تابش نور لامپ UV (۳۵۰ نانومتر) غربال‌سازی شدند. از ردامین B به‌عنوان رنگ فلورسنت برای تعیین باکتری‌های تولیدکننده آنزیم لیپاز استفاده شد. تشکیل هاله فلورسنت در تابش اشعه UV می‌تواند به‌علت تشکیل دی‌مرهای ردامین B با مونو یا دی‌گلیسریدها و اسیدهای چرب آزاد تولیدی به‌وسیله آنزیم در محیط باشد

کینتیک رشد سلولی

برای تعیین کینتیک رشد، باکتری را در محیط کشت مورد نظر کشت داده شد. سپس در فواصل زمانی ۶ ساعته نمونه‌برداری و شمارش سلولی انجام شد.

تهیه محیط تخمیر حالت جامد

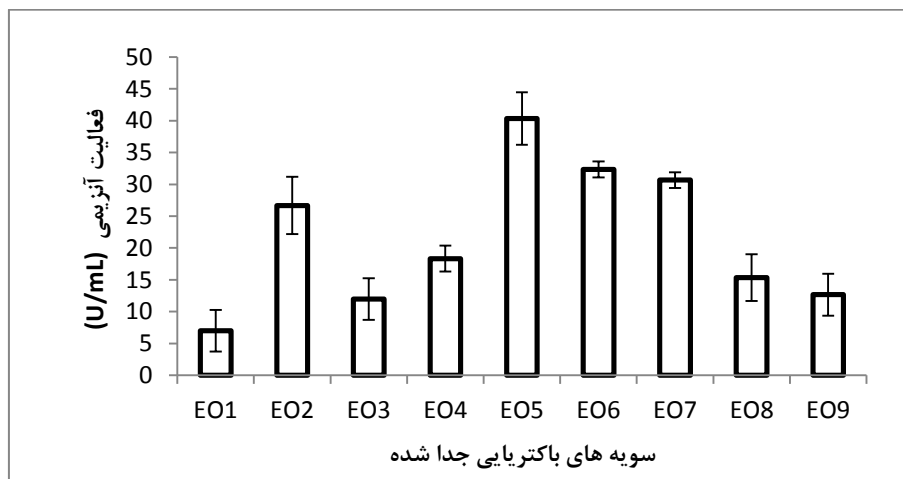
برای تهیه این نوع محیط کشت هسته انار، انگور، و گشنیز را به پودر تبدیل و با الک‌های سایز ۰/۵ تا ۱ میلی‌متری (شماره ۱۸، ۲۵ و ۳۵) پودر الک و سایزبندی شد. در یک ارلن‌مایر ابتدا تمام اجزای خشک براساس مقادیری مشخص و سپس مقداری آب برای رسیدن به درصد رطوبت مورد نظر اضافه شد. دمای گرمخانه‌گذاری در تمام آزمایش‌ها ۳۷ درجه سانتیگراد بود. در اینجا اثر نوع سوبسترای جامد (هسته انار، انگور، و گشنیز) به مقدار ۳ درصد، اندازه ذرات ۰/۵ تا ۱ میلی‌متری (الک شماره ۱۸، ۲۵ و ۳۵)، درصد رطوبت (% v/w) (۷۰، ۶۰، ۵۰، ۸۰ درصد) و سرعت چرخش (۱۴۰، ۱۵۰، ۱۶۰، ۱۷۰، ۱۸۰ rpm) بر تولید آنزیم بررسی شد. ترکیبات ثابت محیط کشت شامل ۱۰ g/l عصاره مخمر، ۲۵ g/l روغن زیتون است و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. از طرح یک فاکتور در هر زمان (One factor at a time) استفاده شد. فاکتورهای درصد روغن زیتون و عصاره مخمر در تمام آزمایش‌ها ثابت در نظر گرفته شد. همه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

زمینه تولید لیپاز از آمیکولاتوپسیس مدیترانه‌ای و میکروباکتریوم لوتئوم اثبات شده است (Joseph *et al.*, 2012; Dheeman, 2011). اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر در زمینه تولید لیپاز استرپتوکوکوس فسیالیس نسبت به اسیدهای چرب بلندزنجیر و غیر اشباع مانند اولئیک‌اسید تأثیر بازدارندگی دارد (Chander *et al.*, 1979). اضافه کردن روغن زیتون تولید لیپاز از اسینتوباکتر رادیورسیسنس را تقویت کرده است (Chen *et al.*, 1998). در این محیط کشت از عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژنی استفاده شده است. در محیط کشت پنی‌سیلیوم سیترونیوم از ۱ درصد روغن زیتون و ۵ درصد عصاره مخمر استفاده شد که با استفاده از روغن زیتون به‌عنوان منبع کربن، عصاره آنزیمی بالاترین فعالیت را نشان داده است و موجب کاهش غلظت عصاره مخمر و فعالیت آنزیم شده است و هنگامی که آمونیوم سولفات جایگزین عصاره مخمر شده است فعالیت مشاهده نشده است (Pimentel *et al.*, 1994). همچنین در پژوهش‌های دیگر صورت گرفته از عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن و روغن زیتون به‌عنوان منبع کربن برای تولید لیپاز از باسیلوس FH5 استفاده شده است (Hasan *et al.*, 2006). از روغن زیتون با غلظت ۱/۵ درصد به‌عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن برای تولید لیپاز توسط کاندیدا ویسواناتی استفاده شده است که موجب کسب نتایج خوبی در تولید لیپاز (۱۰/۶۳ U/mg) شد. همچنین گزارش شده است که استفاده از شربت ذرت به‌عنوان منبع نیتروژن تأثیر منفی بر رشد و تولید لیپاز دارد. در نتیجه از روغن زیتون به‌عنوان منبع کربن روغنی، صمغ عربی به‌عنوان امولسیون‌کننده و پایدارکننده، و عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده شده است (De Almeida *et al.*, 2013).

(Hou & Johnston, 1992). سپس فعالیت لیپاز این باکتری‌ها با روش اسپکتروفتومتری براساس خاصیت تجزیه پلی‌نیتروفنیل‌پالمیتات به‌عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان می‌دهد که در میان باکتری‌های جداسازی شده باکتری OE5 (Olive Extract 5) بیشترین فعالیت ($40/33 \pm 4$ U/ml) را از خود نشان داد که برای مطالعات بعدی انتخاب شد (شکل ۲). با استفاده از روش توالی‌یابی ژن rRNA ۱۶S باکتری جداسازی شده شناسایی شد که نشان می‌دهد که ایزوله مورد نظر تا حد بسیار زیادی به *Bacillus sp.* شبیه است. این باکتری گرم مثبت، میله‌ای، غیرمتحرک است. همچنین قادر به رشد تا غلظت ۵ درصد نمک طعام و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد است (جدول ۲).

آماده‌سازی محیط کشت تخمیری

آماده‌سازی امولسیون روغن زیتون با صمغ عربی در محیط کشت به دلایل گوناگون تهیه شد. ویژه‌گزینی سوبسترا بستگی به ساختار شیمیایی ملکول سوبسترا و خصوصیات فیزیکی امولسیون دارد (Esposito *et al.*, 1973). آنزیم لیپاز در سطح مشترک آب و روغن عمل می‌کنند هرچه سطح تماس بین روغن و آب افزایش یابد سبب افزایش دسترسی میکروارگانیسم برای جذب مواد لازم خود می‌شود. پس باید به طریقی با ایجاد امولسیون مناسب و پایدار این سطح تماس را افزایش داد. بدین منظور از صمغ عربی به‌عنوان امولسیون‌کننده و پایدارکننده قوی (Winkler & Stuckmann, 1979) و همچنین از روغن زیتون استفاده شد. افزایش فعالیت آنزیم در حضور روغن زیتون که به‌عنوان القاکننده در محیط کشت عمل می‌کند را می‌توان به مقدار بالای اسیدهای چرب بلندزنجیر و غیراشباع مانند اولئیک‌اسید نسبت داد. این حقیقت در مطالعات صورت گرفته در



شکل ۲. مقایسه فعالیت آنزیمی سویه‌های جدا شده از عصاره زیتون

جدول ۲. مشخصات موفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری جداشده

مشخصات	باکتری
گرم	مثبت
مشخصات مورفولوژیکی	میله‌ای، تشکیل اندوسپور، غیرمتحرک
هیدرولیز اوره	مثبت
تولید سولفید هیدروژن	مثبت
احیا نیترات	منفی
اکسیداز	منفی
کاتالاز	مثبت
مصرف سیترات	مثبت
تولید اندول	مثبت
وگس پروسکوئر	منفی
گلوکز	مثبت
فروکتوز	مثبت
ساکارز	مثبت
مالتوز	مثبت
لاکتوز	مثبت
مانوز	مثبت
رافینوز	منفی
ملی بیوز	مثبت
اینولین	مثبت
آرابینوز	منفی
سلوبیوز	منفی
دامنه دمایی رشد	۴۵-۱۵ درجه سانتیگراد
دامنه pH رشد	۱۰-۴/۵
دما و pH بهینه رشد	۳۷ و ۷ درجه سانتیگراد
مقاومت به نمک (w/v درصد)	تا ۷ درصد

تأثیر نوع سوبسترای جامد

تأثیر سه سوبسترای هسته انار و انگور آسیاب شده و دانه گشنیز آسیاب شده (مقدار ۳۰ g/L) بر فعالیت آنزیمی بررسی شد. با توجه به نتایج دانه گشنیز تأثیر بیشتری به نسبت هسته انار و هسته انگور روی تولید آنزیم داشته است. دانه گشنیز و انگور تأثیر مثبت اما دانه انار در مقایسه با نمونه شاهد (محیط کشت حاوی ۱۰ g/l عصاره مخمر و ۲۵ g/l روغن زیتون امولسیون شده در pH ۷) تأثیر منفی داشته است (شکل ۳ الف). تأثیر بیشتر دانه گشنیز به نسبت هسته انار و انگور را می‌توان به مقدار بیشتر مواد نیتروژن آلی این دانه و همچنین نوع اسید چرب شاخص این دانه نسبت داد (جدول ۲)، نیتروژن و کربن سوبستراهای اصلی برای رشد باکتری هستند که معمولاً از منابع

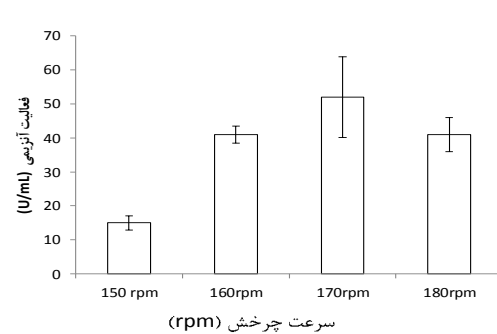
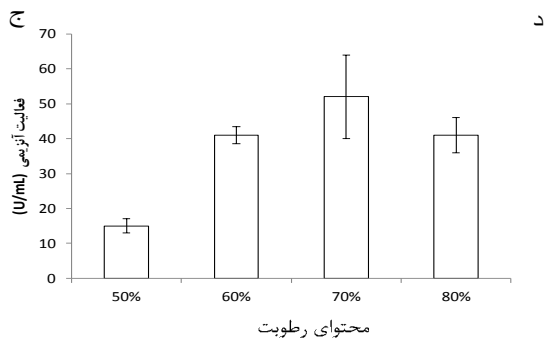
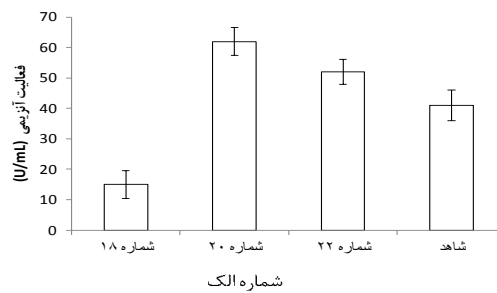
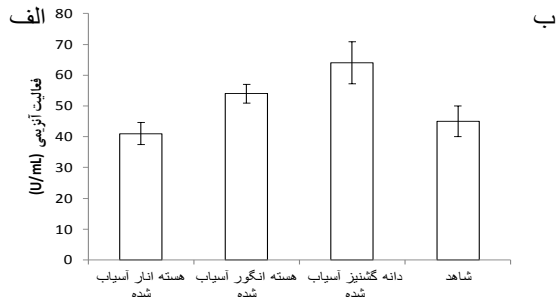
طبیعی فراهم می‌شوند (Pimentel et al., 1994). این سه سوبسترای جامد دارای روغن (روغن به عنوان منبع کربن برای باکتری‌های تولیدکننده آنزیم لیپاز است) در ترکیبات تشکیل دهنده خود هستند که این روغن‌ها همانند روغن زیتون به عنوان منبع کربن عمل می‌کنند. در تحقیقات مشابه مشخص شده است که میکروارگانیسم‌هایی بازده بالاتری از لیپاز را نشان می‌دهند که در محیط تخمیری آنها منبع نیتروژن آلی همراه با روغن زیتون به عنوان منبع کربن در غلظت بهینه استفاده شده است (Pokorny et al., 1994). پانیسیک اسید (اسید چرب ۱۸ کربنه تک غیراشباعی، و ایزومری از اولئیک اسید)، و لینولئیک اسید (اسید چرب ۱۸ کربنه دو غیراشباعی) به ترتیب اسید چرب شاخص هسته انار (Abbasi et al., 2008)، دانه گشنیز (Mironova et al., 1990)، و هسته انگور (Rabak, 1921) هستند. در ساختار دانه گشنیز پتروسلنیک اسید به عنوان ایزومر اولئیک اسید حضور دارد، که در نتیجه شبیه به اسید چرب موجود در روغن زیتون است. می‌توان مقدار فعالیت بیشتر لیپازی گزارش شده در حضور دانه گشنیز را در مقایسه با هسته انار و انگور به نوع اسید چرب این ماده نسبت داد. افزایش فعالیت آنزیم در حضور روغن زیتون، را که به عنوان القاکننده در محیط کشت عمل می‌کند، می‌توان به مقدار بالای اسیدهای چرب بلند زنجیر و غیراشباع مانند اولئیک اسید که دانه گشنیز نیز اسید چربی مشابه با روغن زیتون دارد، نسبت داد. این حقیقت در مطالعات صورت گرفته در زمینه تولید لیپاز از آمیکولاتوپسیس مدیترانه‌ای و میکروباکتریوم لوتنوم اثبات شده است (Joseph et al., 2012; Dheeman, 2011). اسید چرب موجود در روغن دانه انار پانیسیک است که با توجه به نتیجه به دست آمده این مطلب استنباط می‌شود که این اسید چرب، اسید چرب ایده‌آلی برای میکروارگانیسم نیست و مورد مصرف قرار نگرفته و در نتیجه موجب کاهش فعالیت آنزیمی شده است.

تأثیر اندازه ذرات سوبسترا

از الک‌های شماره ۱۸، ۲۵، و ۳۵ با اندازه ۰/۵ تا ۱ میلی‌متری استفاده شد که بیشترین فعالیت آنزیمی هنگامی به دست آمد که از الک شماره ۲۵ استفاده شد (شکل ۳ ب). در فرایند تخمیر حالت جامد، اندازه ذرات سوبسترا به دلیل تأثیر بر ویژگی‌های سوبسترا در مبادلات مربوط به رشد و انتقال حرارت و جرم اهمیت دارد. علاوه بر این، اندازه ذره بر نسبت سطح به حجم که تعیین کننده جزء قابل دسترس سوبسترا برای میکروارگانیسم و دانسیته تراکم در جرم سطحی است، نیز تأثیر می‌گذارد. از آن

حرارت و تبادل گازهای تنفسی میان هوا و سطح جامد مفیدتر است. همزمان ذرات بزرگتر کارایی تنفس و هوادهی بهتری دارند اما سطح کمتری برای عملکرد میکروارگانیسم فراهم می کنند (Pandey et al., 1999). ساختار ذرات سوبسترا باعث افزایش تخلخل و حلالیت برای انتقال اکسیژن به *Bacillus sp.* می شود و در نتیجه به افزایش فعالیت لیپاز می انجامد (Veerabhadrapa et al., 2014).

جا که شدت انتقال اکسیژن به فضای خالی بر رشد میکروبی تأثیر می گذارد، سوبسترا باید حاوی ذراتی با اندازه مناسب باشد تا انتقال جرم را افزایش دهد. به طور کلی ذرات کوچکتر سوبسترا سطح بیشتری برای میکروارگانیسمها فراهم می کند اما ذرات بسیار کوچک ممکن است منجر به کلوخه شدن سوبسترا شوند و در پی آن مزاحمت برای تنفس میکروبی ایجاد کنند و باعث کاهش رشد شوند. اندازه کوچکتر ذرات برای انتقال



شکل ۳. الف) مقایسه اثر سوبستراهای هسته انار و انگور آسیاب شده و دانه گشنیز آسیاب شده با نمونه شاهد، ب) مقایسه تأثیر اندازه ذرات سوبسترای جامد بر اساس شماره الک استفاده شده، ج) مقایسه اثر محتوای رطوبت گوناگون، و د) بررسی اثر سرعت چرخش گوناگون در هنگام گرمخانه گذاری بر فعالیت آنزیمی در تخمیر حالت جامد (ترکیبات ثابت محیط کشت شامل ۱۰g/l عصاره مخمر، ۲۵ g/l روغن زیتون، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، زمان ۲۴ ساعت)

تأثیر محتوای رطوبت و سرعت چرخش

محتوی رطوبت ۷۱ درصد مشاهده شد که سوییۀ اسپریژیلوس نایجر فعالیت بیشتری را در این مقدار رطوبت بروز داده است (Mahadik et al., 2002). این مطلب معرفی رطوبت ۷۰ درصد در این مطالعه را به عنوان رطوبت بهینه گزارش شده برای فعالیت آنزیمی در این شرایط تقویت می کند. همچنین مقدار بهینه محتوی رطوبت ۵۱ درصد برای تولید لیپاز به وسیله سودوموناس آئروجینوزا در تخمیر حالت جامد با کنجاله دانه جاتروفا به عنوان سوبسترا گزارش شده است. از تحقیقات صورت گرفته می توان نتیجه گیری کرد که تنظیم صحیح مقدار رطوبت تأثیر مهمی بر فعالیت آنزیمی خواهد داشت که مقدار بهینه رطوبت در شرایط گوناگون و با توجه به نوع میکروارگانیسم و محیط تخمیری متفاوت است. اما معمولاً در تخمیر حالت جامد مقادیر رطوبتی پایین و بسیار بالا تأثیر منفی

تأثیر محتوای رطوبتی ۵۰، ۶۰، ۷۰، و ۸۰ درصد بر تولید لیپاز بررسی شد که نتیجه بهتر (فعالیت آنزیمی بیشتر) در محتوای رطوبتی ۷۰ درصد به دست آمد (شکل ۳. ج). اما در کل محتوای رطوبت ۶۰، ۷۰، و ۸۰ درصد اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند. کاهش فعالیت لیپاز با افزایش محتوای رطوبت (بیش از ۸۰ درصد) را می توان به تجمع ذرات سوبسترا، هوادهی ضعیف، و شرایط غیرهوازی احتمالی نسبت داد (Pandey et al., 1999). محتوی رطوبت پایین نیز باعث کاهش شایان توجهی در حلالیت و درجه بادکردگی سوبسترای جامد می شود در نتیجه با ایجاد تنش آبی بیشتر می تواند لیپازی با فعالیت پایین تر تولید کنند (Veerabhadrapa, 2014). در تحقیق صورت گرفته روی فعالیت آنزیمی اسپریژیلوس نایجر در تخمیر حالت جامد با

بر رشد سلولی و فعالیت آنزیمی خواهد داشت.

تأثیر سرعت ۱۵۰، ۱۶۰، ۱۷۰، و ۱۸۰ rpm روی تولید آنزیم بررسی و مشاهده شد که در سرعت ۱۷۰ rpm فعالیت آنزیمی به مقدار کمی بیشتر بوده است و تقریباً فعالیت آنزیمی در سرعت چرخش ۱۶۰، ۱۷۰، و ۱۸۰ rpm اختلاف معناداری ندارد (شکل ۳. د). در سرعت چرخش ۱۵۰ rpm از آن جا که باکتری جدا شده میکروارگانیسمی هوازی است، سرعت چرخش پایین به نظر می‌رسد که سطح اکسیژن را محدود می‌کند. به دلیل ماهیت غیرهمگنی محیط تخمیری بایستی چرخش به شیوه‌ای صورت گیرد که اکسیژن به قسمت‌های گوناگون محیط برسد زیرا در صورت عدم اکسیژن‌رسانی فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد. همچنین فعالیت لیپاز با افزایش سرعت چرخش در محدوده ۱۵۰ تا ۱۸۰ rpm افزایش یافته است. (Elibol (2000 و Ozer تأثیر انتقال اکسیژن بر تولید لیپاز را در سرعت جریان و سرعت چرخش گوناگون در بیوراکتور الیتری با *Rhizopus arrhizus* بررسی کردند. آنها تعیین کردند که وقتی سرعت چرخش افزایش می‌یابد، ضریب حجمی انتقال اکسیژن نیز بیشتر می‌شود. بر این اساس، فعالیت لیپازی هم به دلیل افزایش سرعت چرخش افزایش یافته است. در تحقیقات گوناگون سرعت چرخش ۲۰۰ rpm (Alonso *et al.*, 2005) و ۳۰۰ rpm (Freire *et al.*, 1997) نیز به عنوان سرعت بهینه گزارش شده است. بنابراین این تحقیقات نشان می‌دهند که افزایش بیش از حد سرعت چرخش (بیش از ۱۸۰ یا ۲۰۰ یا ۳۰۰ rpm) با توجه به مقاومت میکروارگانیسم‌ها و همچنین محیط کشت تأثیر نامطلوبی بر فعالیت آنزیم خواهد گذاشت. کاهش فعالیت آنزیم در این حالت در نتیجه تنش مکانیکی، تنش اکسیداسیون، کف بیش از حد، و همچنین نابودی ساختار سلولی میکروارگانیسم است (Liu *et al.*, 2011).

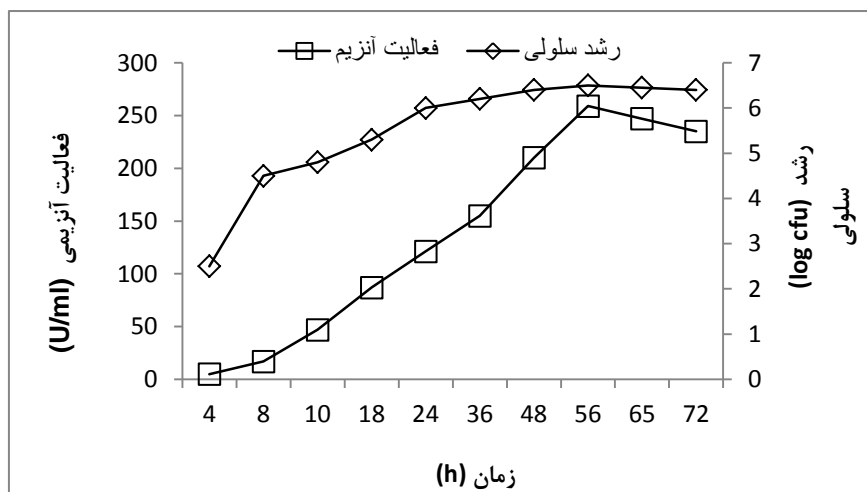
رشد سلولی و پارامترهای کینتیکی در نقطه بهینه

پس از انتخاب فاکتورهای مؤثر بر کشت برای تأیید نهایی در شرایط بهینه فعالیت آنزیم، منحنی رشد سلولی، و پارامترهای کینتیکی به دست آمد. با استفاده از محیط کشتی حاوی ۳ درصد عصاره دانه گشنیز آسیاب شده، ۱۰ g/l عصاره مخمر، ۲۵ g/l روغن زیتون، محتوای رطوبت ۷۰ درصد، و سرعت چرخش rpm ۱۷۰ فعالیت آنزیمی ۱۲۰ U/ml بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری به دست آمد. با توجه به نتایج (شکل ۴) فعالیت آنزیم به نسبت حالت قبل غوطه‌وری قبل از انتخاب پارامترهای مناسب ۳/۰۷ برابر افزایش نشان می‌دهد. جدول ۳ فعالیت آنزیم

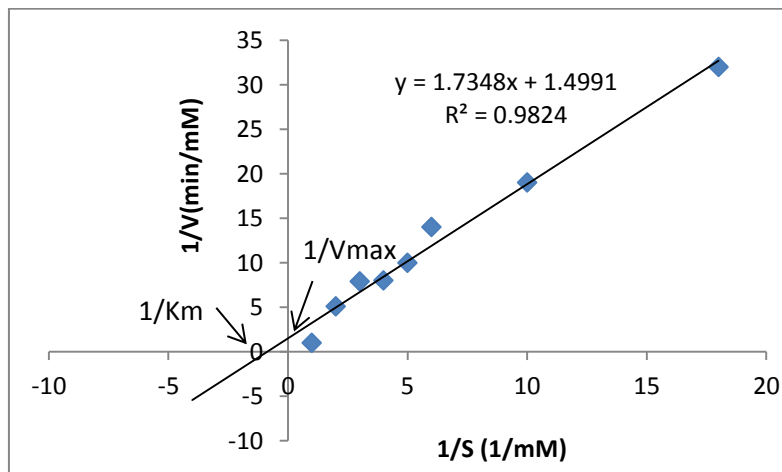
سویه‌های گوناگون را نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم کمتری در مقایسه با سویه *Bacillus sp.* را نشان می‌دهند. کینتیک رشد و فعالیت آنزیم (شکل ۴) نشان می‌دهد که ۴ ساعت اول کشت فعالیت آنزیم و رشد سلولی تغییر شایان توجهی نداشته و بعد از این زمان وارد فاز لگاریتمی رشد شده است. در فاز سکون (ساعت ۵۶) بیشترین فعالیت نشان داده شده است. گزارش‌های زیادی در رابطه با کارایی بیشتر تخمیر حالت جامد به نسبت تخمیر حالت غوطه‌وری وجود دارد. تولید لیپاز به وسیله پنی‌سیلیوم کاندیدوم در تخمیر بستر جامد و مایع مقایسه شد، که برتری فرایندهای تخمیر بستر جامد را تأیید کرده است (Rivera-Munoz *et al.*, 1991). لیپاز خارج سلولی رابزوپوس هموتالیکوس از طریق تخمیر بستر جامد و مایع تولید و تصفیه شده است که در نتیجه فعالیت ویژه آنزیم به ترتیب برای تخمیر بستر مایع ۸۶۰۰ U/mg و جامد ۱۰۷۰۰ U/mg گزارش شد (Mateos Diaz *et al.*, 2006). پارامترهای کینتیکی V_{max} و K_m آنزیم لیپاز خام به ترتیب برابر با ۰/۶۶۷ mM/min.ml و ۱/۶۲ mM از طریق نمودار معادله میکائیلیس-منتن محاسبه شد (شکل ۵). هرچه مقدار K_m کمتر باشد نشان‌دهنده V_{max} بالاتر بین آنزیم و سوبسترا است و V_{max} بیشتر نشان‌دهنده کارایی کاتالیتیکی بالاتر آنزیم است. مقدار V_{max} و K_m لیپاز سودوموناس سپاسیا برابر با ۳۰ $\mu\text{mol}/\text{min}$ و ۱۲ mM (Pencreac'h & Baratti, 2001) گزارش شده است. هنگامی که از پلی‌نیتروفنیل‌پالمیتات به عنوان سوبسترا استفاده شده است مقدار K_m لیپاز سویه فوزاریوم سولانی ۱/۸ mM FSI و V_{max} برابر با ۰/۴۱۶ $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ (Maia *et al.*, 2001)، همچنین مقدار V_{max} برابر با ۰/۴۱۶ $\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{min}$ و K_m برابر با ۵/۰۵ برای لیپاز باسیلوس FH5 به دست آورده شد (Hasan *et al.*, 2006). در مقایسه با K_m گزارش شده برای باکتری‌های ذکر شده، مقدار این پارامتر برای سویه جدا شده کمتر است که نشان‌دهنده $affinity$ یا گرایش بیشتر آنزیم تولید شده به وسیله این باکتری به مصرف سوبسترای پلی‌نیتروفنیل‌پالمیتات است همچنین مقدار V_{max} آنزیم تولیدی به وسیله *Bacillus sp.* جداسازی شده از مقدار V_{max} سویه‌های فوزاریوم سولانی FSI و باسیلوس FH5 بیشتر است که نشان‌دهنده فعالیت کاتالیتیکی بیشتر سویه جداسازی شده در مقایسه با این دو سویه که در مقالات دیگر گزارش شده است، نشان می‌دهد. این نتیجه تأییدکننده این است که انتخاب پلی‌نیتروفنیل‌پالمیتات به عنوان سوبسترا برای اندازه‌گیری فعالیت انتخاب مناسبی است و آنزیم تولیدی تمایل زیادی به فعالیت در این محیط دارد.

جدول ۳. فعالیت آنزیمی در پژوهش های گوناگون

منبع	فعالیت آنزیمی	سویه
Contesini <i>et al.</i> , 2009	۳۳/۰۳ U/mL	<i>Aspergillus niger</i>
Bose <i>et al.</i> , 2013	۰/۴۳۲ U/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AAU2
Krishnaveni <i>et al.</i> , 2013	۱۴/۸ U/mL	<i>Staphylococcus aureus</i>
D'Annibale <i>et al.</i> , 2006	۹/۲۳ U/ml	<i>Candida cylindracea</i>



شکل ۴. نمودار رشد سلولی و فعالیت آنزیمی سویه باسیلوس پس از انتخاب پارامترهای مناسب در محیط کشتی حاوی ۳ درصد عصاره دانه گشنیز آسیاب شده، ۱۰g/l عصاره مخمر، ۲۵ g/l روغن زیتون، محتوی رطوبت ۷۰ درصد، و سرعت چرخش ۱۷۰ rpm در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد



شکل ۵. نمودار معادله میکائیلیس منتن برای تعیین پارامترهای کینتیکی سویه باسیلوس تولیدکننده آنزیم لیپاز

شایان توجه است. با توجه به اهمیت این آنزیم از نمونه عصاره زیتون *Bacillus sp.* تولیدکننده لیپاز خارج سلولی جداسازی شد (۴۰ U/mL). سوبسترای دانه گشنیز آسیاب شده به عنوان سوبسترای تأثیرگذار بر تولید لیپاز انتخاب شد. در نتیجه با توجه به بررسی های صورت گرفته، سرانجام این سوبسترا از محیط کشتی حاوی ۳ درصد عصاره دانه گشنیز آسیاب شده، ۱۰g/l

نتیجه گیری کلی

آنزیم لیپاز به دلیل کاربردهای متنوعی که امروزه در دنیای صنعت دارد، آنزیمی پرتقاضا در بازار مصرف است، از طرف دیگر قیمت بالای این آنزیم نیاز به روش هایی دارد که بتواند همراه با هزینه پایین تر تولید و بازده بیشتر را افزایش دهد. روش تخمیر بستر جامد به دلیل استفاده از مواد ارزان قیمت و تولید بالاتر

بیشتری را در مقایسه با تخمیر حالت مایع تولید کرده است. لیپاز سنتز شده توسط این سویه پتانسیل بالقوه برای انجام واکنش‌های استریفیکاسیون و ترنس استریفیکاسیون در حلال‌های آلی، سنتز برخی استرهای صنعتی، و فرایند زیستی پساب‌های صنعتی غنی از چربی را دارد.

عصاره مخمر، ۲۵ g/l روغن زیتون، محتوی رطوبت ۷۰ درصد، و سرعت چرخش ۱۷۰ rpm فعالیت آنزیمی ۱۲۰ U/ml بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به دست آمد که ۳/۰۷ برابر افزایش فعالیت نشان داده است. با توجه به نتایج این پژوهش ملاحظه می‌شود که تخمیر حالت جامد آنزیم

REFERENCES

- Abbasi, H., K. Rezaei, and L. Rashidi. (2008). Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(1): p. 83-89.
- Alegria, A., Alvarez-Martin, P., Sacristan, N., Fernandez, E., Delgado, S., & Mayo, B. (2009). Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136:44-51.
- Alonso, F. O. M., E. B. L. Oliveira, G. M. D. Ortiz, F. V. P. and Meirelles. (2005). Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. *Brazilian J. Chem. Eng*, 22(01): 9-18.
- Bose, A. and H. Keharia. (2013). Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(3): 255-266.
- Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez-Murcia, A., & Phillips, A. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letter*, 77:5-12.
- Contesini, F. J., V. C. F. da Silva, R. F. Maciel, R. J. de Lima, F. F. C. Barros and P. de Oliveira Carvalho. (2009). Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *The Journal of Microbiology*, 47(5): 563-571.
- Elibol, M., and D. Ozer. (2000). Lipase production by immobilized *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, 36: 219-223.
- Ertugrul, S., G. Donmez and S. Takaç (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149(3): 720-724.
- Esposito, S., M. Semeriva and P. Desnuelle (1973). Effect of surface pressure on the hydrolysis of ester monolayers by pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 302(2): 293-304.
- Chander, H., B. Ranganathan and J. Singh (1979). Purification and some properties of lipase from *Streptococcus faecalis*. *Journal of Food Science*, 44(6): 1747-1751.
- Chen, S. -J., C. -Y. Cheng and T. -L. Chen (1998). Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. *Journal of fermentation and bioengineering*, 86(3): 308-312.
- Maia, M., A. Heasley, M. Camargo de Morais, E. Melo, M. Morais Jr, W. Ledingham and J. Lima Filho (2001). Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology*, 76(1): 23-27.
- Mironova, A., Filippova, G., Fedina, N., Volkova, Z., Kozlova, V., Alymova, T., Gorshkova, E. and Bykova, S. (1990). Chemical and biological properties of coriander fatty oil. *Voprosy pitaniia*, 59-62.
- D'Annibale, A., G. G. Sermanni, F. Federici and M. Petruccioli (2006). Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource technology*, 97(15): 1828-1833.
- Dheeman, D. S., G. Henahan and J. M. Frías (2011). Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. *Bioresource technology*, 102(3): 3373-3379.
- De urraza, P. J., A. Gomez-Zavaglia, M. E. Lozano, V. Romanowsky and G. L. De antony (2000). DNA fingerprinting of thermophilic lactic acid bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Journal of dairy research*, 67(03): 381-392.
- De Almeida, A. F., S. M. Taulk-Tornisielo, and E. C. Carmona (2013). Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. *Annals of Microbiology*, 63(4): p. 1225-1234.
- Gharibzahedi, S. M. T., S. M. Mousavi, M. Hamedi and F. Khodaiyan (2013). Application of response surface modeling to optimize critical structural components of walnut-beverage emulsion with respect to analysis of the physicochemical aspects. *Food and Bioprocess Technology*, 6(2): 456-469.
- Gupta, R., N. Gupta and P. Rathi (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6): 763-781.
- Joseph, B., N. Shrivastava and P. W. Ramteke (2012). Extracellular cold-active lipase of *Microbacterium luteolum* isolated from Gangotri glacier, western Himalaya: Isolation, partial

- purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10(1): 137-144.
- Kempka, A. P., N. L. Lipke, T. d. L. F. Pinheiro, S. Menoncin, H. Treichel, D. M. Freire, M. Di Luccio and D. de Oliveira (2008). Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(2): 119-125.
- Hasan, F., A. A. Shah and A. Hameed (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2): 235-251.
- Hou, C. and T. Johnston (1992). Screening of lipase activities with cultures from the agricultural research service culture collection. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(11): 1088-1097.
- Haba, E., O. Bresco, C. Ferrer, A. Marques, M. Busquets and A. Manresa (2000). Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and microbial technology*, 26(1): 40-44.
- Kok, R. G., J. J. Thor, I. M. Nugteren-Roodzant, M. B. Brouwer, M. R. Egmond, C. B. Nudel, B. Vosman and K. J. Hellingwerf (1995). Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Molecular microbiology*, 15(5): 803-818.
- Krishnaveni, M. (2013). Characterization of lipase producing *Staphylococcus aureus* MTCC 10787 from soil sample at Salem, Tamil Nadu, India. *Journal of Pharmacy Research*, 6(2): 304-308.
- Lineweaver, H. and D. Burk (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3): 658-666.
- Liu, C. H., Chen, C. Y., Wang, Y. W., Chang, J. S. (2011). Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C20. *Biochem. Eng. J.*; 58-59, 96-102.
- Mateos Diaz, J., J. Rodríguez, S. Roussos, J. Cordova, A. Abousalham, F. Carriere and J. Baratti (2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5): 1042-1050.
- Mahanta, N., Gupta, A., Khare, S. K., 2008. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresour. Technol.* 99, 1729-1735.
- Mahadik, N. D., U. S. Puntambekar, K. B. Bastawde, J. M. Khire and D.V. Gokhale. (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38(5): 715-721.
- Maia, M., A. Heasley, M. Camargo de Morais, E. Melo, M. Morais Jr, W. Ledingham and J. Lima Filho (2001). Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology*, 76(1): 23-27.
- Pandey, A., S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger and V. T. Soccol. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and applied biochemistry*, 29(2): 119-131.
- Pencreac'h, G. and J.C. Baratti. (2001). Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. *Enzyme and microbial technology*, 28(4): p. 473-479.
- Pimentel, M., N. Krieger, L. Coelho, J. Fontana, E. Melo, W. Ledingham and J. Lima Filho. (1994). Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 49(1): 59-74.
- Pokorny, D., J. Friedrich and A. Cimerman. (1994). Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnology letters*, 16(4): 363-366.
- Rivera-Munoz, G., J. Tinoco-Valencia, S. Sanchez and A. Farres (1991). Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. *Biotechnology letters*, 13(4): 277-280.
- Rabak, F., (1921). Grape-Seed Oil. *Industrial & Engineering Chemistry*. 13(10): p. 919-921.
- Sharma, R., Y. Chisti and U. C. Banerjee (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, 19(8): 627-662.
- Veerabhadrapa, M. B., Shivakumar, S. B., Devappa, S. (2014). Solid-state fermentation of *Jatropha* seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. *J. Biosci. Bioeng.* 117, 208-214.
- Winkler, U. K. and M. Stuckmann (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138(3): 663-670.
- Yadav, R. P., R. K. Saxena, R. Gupta and W. Davidson (1998). Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 28(3): 243-249.