جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های مولد لیپاز از پساب کارخانه فرآورده‌های گوشتی گل‌بهار خرم‌آباد

زهرا خداکرمی فرد[۱]، علیرضا شیرازی نژاد[۲*]، محسن محمدی[۳]، سید محمد باقر هاشمی[۴]

۱-دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سروستان، دانشگاه آزاد اسلامی، سروستان، ایران

۲-استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سروستان، دانشگاه آزاد اسلامی، سروستان، ایران

۳-دانشیار، گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۴-دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه فسا، فسا، ایران

یافته / دوره ۲۴ / شماره ۲ / تابستان ۱۴۰۱ / مسلسل ۹۲

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۳/۸ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۴/۲۱

مقدمه: لیپازها، به دلیل توانایی زیست کاتالیزوری در محیط‌های آبی و غیرآبی یکی از مهم‌ترین کاتالیزورها برای صنایع مختلف مانند شوینده، لبنیات و نساجی به شمار می‌روند. غربال‌گری زیستگاه‌های مختلف برای شناسایی باکتری‌های مولد لیپاز و بهینه‌سازی پارامترهای فعالیت آن‌ها، تولید و استفاده مؤثر لیپازها را در صنایع مختلف تسهیل می‌کند. با توجه به اهمیت یافتن منابع جدید لیپاز، پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد لیپاز و بررسی ویژگی‌های آن‌ها صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، نمونه پساب کارخانه فرآورده‌های گوشتی گل‌بهار خرم‌آباد از نظر وجود سویه‌های باکتریایی مولد لیپاز غربال‌گری گردید. جدایه‌های تولیدکننده لیپاز بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و توالی ژن **16S rRNA** شناسایی شدند. پارامترهای محیط کشت مانند **pH**، دما و زمان به منظور بهینه‌سازی فعالیت لیپازی متفاوت بودند.

یافته‌ها: در این مطالعه تعداد سه ایزوله با فعالیت لیپازی بالا در اثر غربال‌گری پساب کارخانه فرآورده‌های گوشتی گل‌بهار خرم‌آباد شناسایی شدند. ایزوله‌هایی که بیشترین فعالیت لیپازی را نشان داده بودند با استفاده از بلاست توالی نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده برای ژن **16S rRNA** به‌عنوان ***Bacillus amyloliquefaciens*** شناسایی شدند. همچنین بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز برای ایزوله‌های شناسایی شده در ۴۸ ساعت ثبت شد. علاوه بر این، در این پژوهش مشخص شد که حداکثر فعالیت لیپازی در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و **pH** = ۸ صورت می‌گیرد.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه مشخص شد که لیپازهای خارج سلولی ایزوله‌های باکتری *B. amyloliquefaciens* از نوع لیپازهای قلیایی بوده و دارای پایداری دمایی نسبتاً مناسبی هستند. با استخراج و تخلیص لیپاز خارج سلولی این ایزوله‌ها می‌توان از آن در صنایع مختلف بهره برد. همچنین با شناسایی و جداسازی ژن تولید کننده آنزیم لیپاز از ایزوله‌های مذکور می‌توان آن را در فرآیند مهندسی آنزیم وارد کرده و با ایجاد جهش‌های هدفمند، میزان فعالیت آن را به طور دلخواه تغییر داد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنزیمی، لیپاز، ***Bacillus amyloliquefaciens***، **16S rRNA** .

***آدرس مکاتبه: سروستان، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سروستان، دانشگاه آزاد اسلامی.**

پست الکترونیک: shirazinejad@iausarv.ac.ir

مقدمه

طی فرآیند تکامل، موجودات زنده برای بقا و سازگاری با شرایط محیطی پیرامونشان توانایی انجام انواع واکنش‌های بیوشیمیایی را کسب کرده‌اند که اغلب این واکنش‌ها به‌وسیله‌ی دسته‌ای از مواد زیستی به نام آنزیم‌ها صورت می‌گیرند (۱). از مهم‌ترین خصوصیاتی که عملکرد آنزیم‌ها را در فرآیندهای بیولوژیکی متمایز کرده است توان کاتالیتیکی بالا و همچنین قابل تنظیم بودن فعالیت آن‌ها است. با توجه به این ویژگی‌ها همچنین وجود ساختارهای شیمیایی و فرم‌های ایزومری مختلف، کاربرد آنزیم‌ها در سنتز مواد بخصوص مواد دارویی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۲، ۱).

لیپازها (E.C.3.1.1.3، تری گلیسرول آسیل‌هیدرولازها) دسته‌ای از آنزیم‌های خانواده هیدرولازها هستند (۲،۳). از نظر ساختاری لیپازها شامل یک صفحه بتای احاطه شده با یک مارپیچ آلفا می‌باشند. مرکز کاتالیزوری لیپازها شامل سه اسید آمینه سرین، آسپاراژین و هیستیدین است که از نظر عملکردی مشابه پروتئازهای سرین بوده، اما در سازمان‌دهی فضایی متفاوت می‌باشند (۴). مکانیسم عمل لیپازها شامل هیدرولیز زنجیره‌های بلندتر گلیسرید و تبدیل آن‌ها به دی‌آسیل‌گلیسریدها، مونوگلیسریدها، گلیسرول و اسیدهای چرب است (۵-۷). همچنین این گروه از آنزیم‌ها توانایی واکنش معکوس هیدرولیز، یعنی تشکیل استرهای مختلف از الکل و اسیدهای چرب (گلیسریدها) را داشته و نیز قادرند که واکنش‌های استریفیکاسیون را در شرایط با حداقل آب یا در حضور حلال آلی را کاتالیز کنند. این ویژگی، یعنی عملکرد واکنش در حد فاصل فازهای آبی و غیرآبی، لیپازها را از استرازها تفکیک می‌کند (۹، ۸). از نظر اقتصادی نیز لیپازها دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشند به‌طوری که پس از پروتئازها و آمیلازها جایگاه سوم فروش جهانی را به خود اختصاص داده‌اند و پیش‌بینی می‌شود میزان فروش سالانه این نوع از آنزیم در جهان تا سال ۲۰۲۳ به ۵۹۰/۲ میلیون دلار برسد (۱۱، ۱۰). با توجه به ظرفیت بالای لیپازها به‌عنوان کاتالیزور بیولوژیکی چندمنظوره، چشم‌انداز مطلوبی از کاربرد این آنزیم‌ها در رفع نیازهای صنایع مختلف از جمله بیودیزل، صنایع غذایی و نوشیدنی‌ها، چرم، نساجی، تولید شوینده‌ها، داروسازی و پزشکی قابل تصور است (۱۴، ۱۳، ۱۲، ۷، ۳).

تاکنون طیف وسیعی از منابع زیستی مختلف با قابلیت تولید لیپاز از گونه‌های مختلف جانوری، گیاهی و میکروارگانیسم‌ها شناسایی شده است (۱۶، ۱۵). با این حال، کارایی بالاتر لیپازهای با منشأ میکروبی در سنتز ترکیبات آلی نسبت به لیپازهای با منشأ گیاهی یا جانوری گزارش شده است (۸). لیپازهای باکتریایی به دلیل توانایی بالا در انجام انواع فرآیندهای کاتالیزوری، عدم ایجاد واکنش‌های جانبی هنگام کاتالیز، تولید با عملکرد و پایداری بالا، سرعت رشد بالا، سهولت در غربالگری، کشت و دست‌کاری‌های ژنتیکی در مقایسه با دیگر منابع تولید کننده لیپاز از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (۱۸، ۱۷، ۱۴، ۱۳).

لیپازهای باکتریایی در دامنه وسیعی از pH (از ۴ تا ۱۱) دارای فعالیت هستند به طوری که دارای بیشترین فعالیت در شرایط pH خنثی و قلیایی هستند. همچنین پایداری حرارتی آن‌ها در محدوده ۲۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد است. بر خلاف بسیاری از گروه‌های آنزیمی، اغلب لیپازها در حلال‌های آلی فعال هستند و نیاز به کوفاکتور ندارند (۱۹). بر اساس اختصاصیت سوبسترا، لیپازهای میکروبی در سه طبقه غیراختصاصی (non-specific)، اختصاصی ناحیه‌ای (region-specific) و اختصاصی اسید چرب (fatty acid-specific) قرار می‌گیرند. لیپازهای غیراختصاصی به صورت تصادفی روی مولکول‌های تری‌گلیسیرید اثر کرده و آن‌ها را به اسید چرب و گلیسرول تبدیل می‌کنند. لیپازهای اختصاصی ناحیه‌ای به صورت

هیدرولیز ناحیه‌ای sn1 و sn3 روی پیوندهای استری اولیه عمل کرده (پیوندهای استری در اتم‌های C1 و C3 گلیسرول) و تری گلیسریدها را به اسیدهای چرب هیدرولیز می‌کنند (۲۰، ۱۹). سویه‌های باکتریایی شامل Pseudomonas alcaligenes، P. aeruginosa، P. fragi، P. fluorescens، Bacillus subtilis، B. nealsonii، B. licheniformis و B. amyloliquefaciens از جمله مهم‌ترین باکتری‌های مولد لیپاز در جهان به شمار می‌روند که در طیف وسیعی از شرایط دمایی و pH بیشترین کارایی را نشان داده‌اند (۱۱).

بر اساس مرور منابع، جنس باسیلوس (Bacillus) یکی از مهم‌ترین منابع باکتریایی مولد لیپاز به‌شمار می‌رود که در شرایط سخت صنعتی کارایی بالایی را نشان می‌دهند (۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۳، ۷، ۶). انواع مختلف باکتری‌های مولد لیپاز متعلق به جنس باسیلوس، اغلب در محیط‌های غذایی حاوی کربن، نیتروژن، فسفر و نمک‌های معدنی با pH در محدوده خنثی (۵-۷/۸) و در دمای بین ۷۰-۲۰ درجه رشد می‌کنند (۴). روغن‌های طبیعی (زیتون، پنبه‌دانه، خردل، کنجد، سویا، ماهی، سبوس برنج، روغن ذرت)، تری گلیسرید (تریولئین، تریبوتیرین) یا اسیدهای چرب آزاد (اسید اولئیک) به تنهایی یا در ترکیب با هم بهترین منبع کربن برای باسیلوس‌های مولد لیپاز شناخته شده‌اند (۲۱). همچنین اسیدهای آمینه آلانین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین بهترین منابع نیتروژن برای تولید لیپاز در باکتری‌های جنس باسیلوس به شمار می‌روند (۲۲). علاوه بر این اغلب نمک‌های نیتروژن‌دار، مانند نیترات آمونیوم، نیترات سدیم، نیترات پتاسیم، آمونیوم سولفات، کلرید آمونیوم، یا فسفات آمونیوم از جمله مهم‌ترین منابع نمکی برای رشد بهینه این جنس از باکتری‌های مولد لیپاز شناخته شده‌اند (۲۳).

با توجه به اهمیت باکتری‌های مولد لیپاز به عنوان منابع ارزشمند زیستی، تاکنون باکتری‌های مولد لیپاز از طیف وسیعی از نمونه‌های زیستی از پساب کارخانه‌ها تا فرآورده‌های غذایی، شناسایی و جداسازی شده و بهینه‌سازی شرایط تولید لیپاز در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (۲۶-۲۴). از این‌رو، مطالعه حاضر به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولید کننده لیپاز از پساب کارخانه فرآورده‌های گوشتی گل‌بهار خرم‌آباد صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و غربال‌گری

در این مطالعه توصیفی به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده لیپاز، نمونه‌گیری پساب کارخانه فرآورده‌های گوشتی گل‌بهار خرم‌آباد در محدوده زمانی خرداد ماه تا تیر ماه ۱۳۹۹ صورت گرفت. نمونه‌برداری در ظروف استریل درب‌دار صورت گرفته و نمونه‌ها در شرایط مناسب به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌های پساب در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری تقسیم شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، تمامی رونشین به استثنای یک میلی‌لیتر آخر به دقت حذف شده و مقدار ۱۲ میلی‌لیتر از نوترینت براث به فالکون اضافه شد. پس از اینکه محتویات به خوبی یکدست شدند، فالکون‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محدوده‌ی دمایی بین ۲۵ تا ۴۵ درجه در انکوباتور شیکردار قرار گرفتند. پس از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت، محتویات فالکون‌ها روی هم ریخته و به خوبی یکدست شد. مقدار ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری حاصل به محیط‌های کشت غربال‌گری منتقل و به صورت خطی کشت داده شدند. محیط کشت غربال‌گری باکتری‌های تولید کننده لیپاز

شامل نوترینت آگار، رودامین B روغن زیتون سیگما بود. پس از کشت خطی، محیط‌ها به مدت ۴۸ ساعت دیگر در محدوده‌ی دمایی بین ۲۵ تا ۴۵ درجه در انکوباتور نگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون، محیط‌ها به وسیله‌ی دستگاه ترانسیلومیناتور و زیر نور UV مورد بررسی قرار گرفتند. ظهور هاله زرد- نارنجی رنگ در اطراف کلونی‌ها، نشان دهنده تولید لیپاز خارج سلولی در باکتری بود (۱۹) .

شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی باکتری‌های تولید کننده لیپاز

رنگ‌آمیزی گرم با استفاده از کیت رنگ‌آمیزی شرکت لاب ترون و با استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به منظور تعیین حرکت باکتری از تست تحرک با محیط کشت SIM استفاده شد. تولید ایندول در باکتری با استفاده از معرف کواکس مورد بررسی قرار داده شد. تست TSI با هدف بررسی تخمیر قندها و هم چنین تولید سولفید هیدروژن با استفاده از محیط TSI انجام گرفت. آزمایش استفاده از سیترات (CIT)، با استفاده از محیط کشت سیمون سیترات صورت گرفت. به منظور بررسی تولید همولایزین‌ها و توانایی همولیز، از محیط کشت آگار خون‌دار استفاده شد. در نهایت تست‌های کاتالاز و اکسیداز نیز روی باکتری‌های شناسایی شده صورت گرفتند (۴۴، ۴۳).

شناسایی مولکولی باکتری‌های تولید کننده لیپاز

ابتدا از باکتری‌های جداسازی شده کشت‌های خالص تهیه گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناکلون صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد و همچنین نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت. تکثیر ژن 16SrRNA با استفاده از جفت پرایمر پیشرو 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و پرایمر معکوس 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' صورت گرفت. برنامه دمایی مورد استفاده برای تکثیر این ژن در ۳۵ سیکل صورت گرفت. در هر سیکل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته‌سازی)، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (اتصال پرایمر) و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه (گسترش) مورد استفاده قرار گرفت. از دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه به عنوان دماهای واسرشته‌سازی اولیه و گسترش نهایی استفاده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شده و پس از بررسی اندازه قطعه تکثیری، قطعات از روی ژل آگارز برش خورده و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل آگاروز سیناکلون تخلیص شدند. محصولات تخلیص شده به منظور تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شدند (۴۴، ۴۳).

بررسی نتایج توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی

نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Chromas Lite مورد بررسی قرار گرفتند. پس از بررسی به وسیله‌ی این نرم‌افزار، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BLASTn پایگاه NCBI به منظور شناسایی گونه مورد بررسی قرار گرفتند. پس از شناسایی گونه باکتری‌ها، آنالیز فیلوژنتیکی صورت گرفت. به این منظور توالی 16SrRNA باکتری‌های شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار BLASTn پایگاه NCBI با توالی‌های 16SrRNA موجود در بانک ژن مقایسه شد و توالی‌های مشابه با آن دریافت شدند. توالی‌های دریافت شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 مورد هم‌ردیف سازی قرار گرفتند. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 و الگوریتم Neighborhood-joining ترسیم گردید.

سنجش میزان فعالیت آنزیمی لیپاز در دما، pH و مدت زمان انکوبه کردن مختلف

به منظور سنجش فعالیت لیپازی باکتری‌های شناسایی شده، باکتری‌ها با میزان اینوکولوم یکسان در

محیط نوترینت براث کشت داده شدند. کشت‌ها بـه مـدت ۴۸ سـاعت در دماهـای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد درون شیکر با میزان دور یکسان قرار گرفتند و نمونه‌برداری صـورت گرفـت. پـس از بـه دسـت آوردن دمـای بهینـه فعالیـت آنزیمـی، از آن بـرای سـایر آزمایش‌هـا اسـتفاده شـد. بـه منظـور تعیـین pH بهینـه، باکتری‌ها با میزان اینوکولوم یکسـان در محـیط نوترینـت بـراث بـا pHهـای ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ کشـت داده شـدند. کشـت‌ها بـه مـدت ۴۸ سـاعت در دمـای ۴۵ درجه سانتی‌گراد درون شیکر بـا میـزان دور یکسـان قـرار گرفتند. پس از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت نمونه‌برداری صورت گرفت. در نهایت به منظور تعیین زمان بهینه انکوبه کردن، باکتری‌ها بـا میـزان اینوکولـوم یکسـان در محـیط نوترینت بـراث بـه مـدت ۷۲ سـاعت در دمـای ۴۵ درجـه سانتی‌گراد درون شیکر با میزان دور یکسان قـرار گرفتنـد. هر ۶ ساعت یکبار نمونه‌برداری صورت گرفـت. بـه منظـور سنجش میزان فعالیت آنزیمی لیپاز، نمونه‌های جمـع‌آوری شده مختلف در بالاترین دور سانتریفیوژ شـدند و رونشـین آن‌ها که حاوی آنزیم لیپاز بود برای تعیین فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین فعالیت آنزیم لیپـاز از روش رنگ سنجی و قرائت توسط اسپکتروفتومتر در طـول موج ۴۱۰ نانومتر استفاده شـد (۲۹-۲۷). در ایـن روش از پارانیتروفنل لورات (pNPL) بـه‌عنوان سوبسـترای آنـزیم لیپاز استفاده شد. یک واحد فعالیت آنزیمی برابر اسـت بـا مقدار آنزیمی که یـک میکرومـول پارانیتروفنـل در دقیقـه تحت شرایط سنجش آزاد می کند. تمامی آزمایش‌هـا در ۴ تکرار صـورت گرفتنـد. ترسـیم نمودارهـا بـا اسـتفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 صورت گرفت.

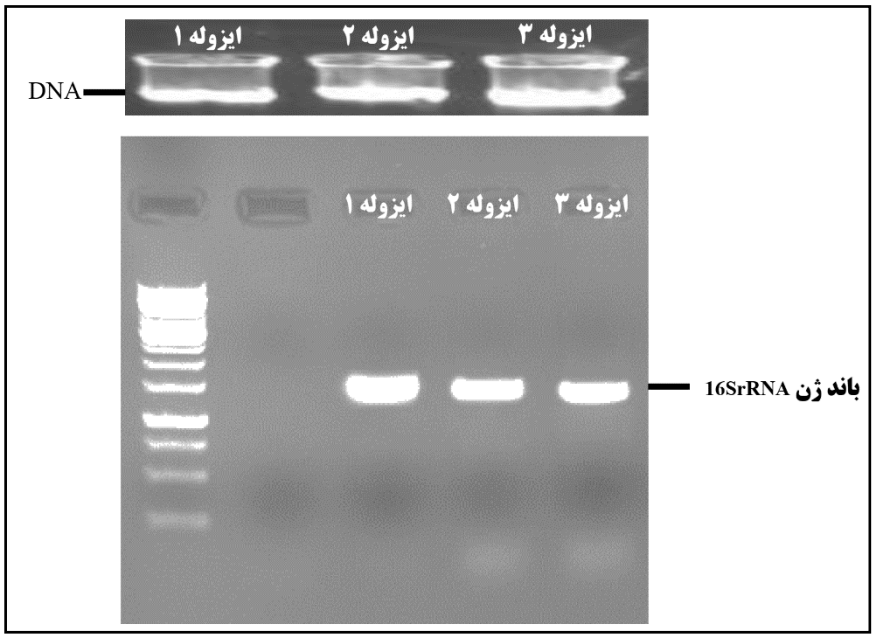
یافته‌ها

بررسی کشت‌های پساب غنی شده کارخانه فرآورده‌های گوشتی گل‌بهار خرم‌آباد روی محیط غربال‌گری حاوی رودامین B با استفاده از نور UV، وجود سه ایزوله با هاله زرد واضح را نشان داد. نتایج تست‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی برای هر سه ایزوله کاملاً یکسان بود. سه ایزوله مذکور به منظور بررسی‌های بیشتر جداسازی شده و پس از تخلیص، ذخیره گلیسرولی آن‌ها تهیه گردید. نتایج رنگ‌آمیزی گرم برای هر سه ایزوله واکنش گرم مثبت را برای آن‌ها نشان داد و مشخص کرد که هر سه ایزوله باسیل گرم مثبت هستند. نتایج تست تحرک با محیط کشت SIM وجود تحرک در هر سه ایزوله را مشخص کرد. هر سه ایزوله فاقد توانایی تولید ایندول بودند. تست TSI نشان داد که هر سه ایزوله تنها گلوکز را تخمیر می‌کنند. این تست همچنین مشخص کرد که ایزوله‌ها فاقد توانایی تولید گاز سولفید هیدروژن هستند. نتایج آزمایش استفاده از سیترات (CIT) برای تمامی سه ایزوله شناسایی شده مثبت بود و هر سه ایزوله توانایی مصرف سیترات را دارا بودند. نتایج آزمایش تولید گاز برای هر سه ایزوله نشان داد که این ایزوله‌ها فاقد تولید گاز هستند. نتایج بررسی تولید اندوسپور، وجود اندوسپور در هر سه ایزوله را مشخص نمود. بررسی تولید همولایزین‌ها و توانایی همولیز روی محیط کشت آگار خون‌دار، وجود توانایی همولیز را در هر سه ایزوله نشان داد. نتایج آزمون حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها، وجود حساسیت به پنی‌سیلین را در سه ایزوله مشخص کرد. در نهایت، نتایج تست‌های کاتالاز و اکسیداز نشان داد که هر سه ایزوله دارای فعالیت کاتالازی و اکسیدازی هستند (جدول ۱).

بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از سه ایزوله نشان داد که این DNA دارای کیفیت قابل قبولی برای انجام واکنش PCR برای تکثیر ژن 16SrRNA است (شکل ۱). نتایج تکثیر ژن 16SrRNA هر سه ایزوله نیز باند حدود ۱۵۰۰ جفت بازی را برای هر سه ایزوله نشان داد و مشخص کرد که برای توالی‌یابی دارای کیفیت مناسبی است (شکل ۱).

جدول ۱. نتایج شناسایی فنوتیپی و بیوشیمایی باکتری‌های تولید کننده لیپاز

نوع بررسی	ایزوله ۱	ایزوله ۲	ایزوله ۳
شکل باکتری	باسیل	باسیل	باسیل
واکنش گرم	G+	G+	G+
تحرک	+	+	+
ایندول	-	-	-
سولفید هیدروژن	-	-	-
سیترات	+	+	+
تولید گاز	-	-	-
اندوسپور	+	+	+
همولیز	+	+	+
آنتی‌بیوتیک	پنی‌سیلین	پنی‌سیلین	پنی‌سیلین
کاتالاز	+	+	+
اکسیداز	+	+	+



شکل ۱. نتایج استخراج DNA و تکثیر ژن 16SrRNA

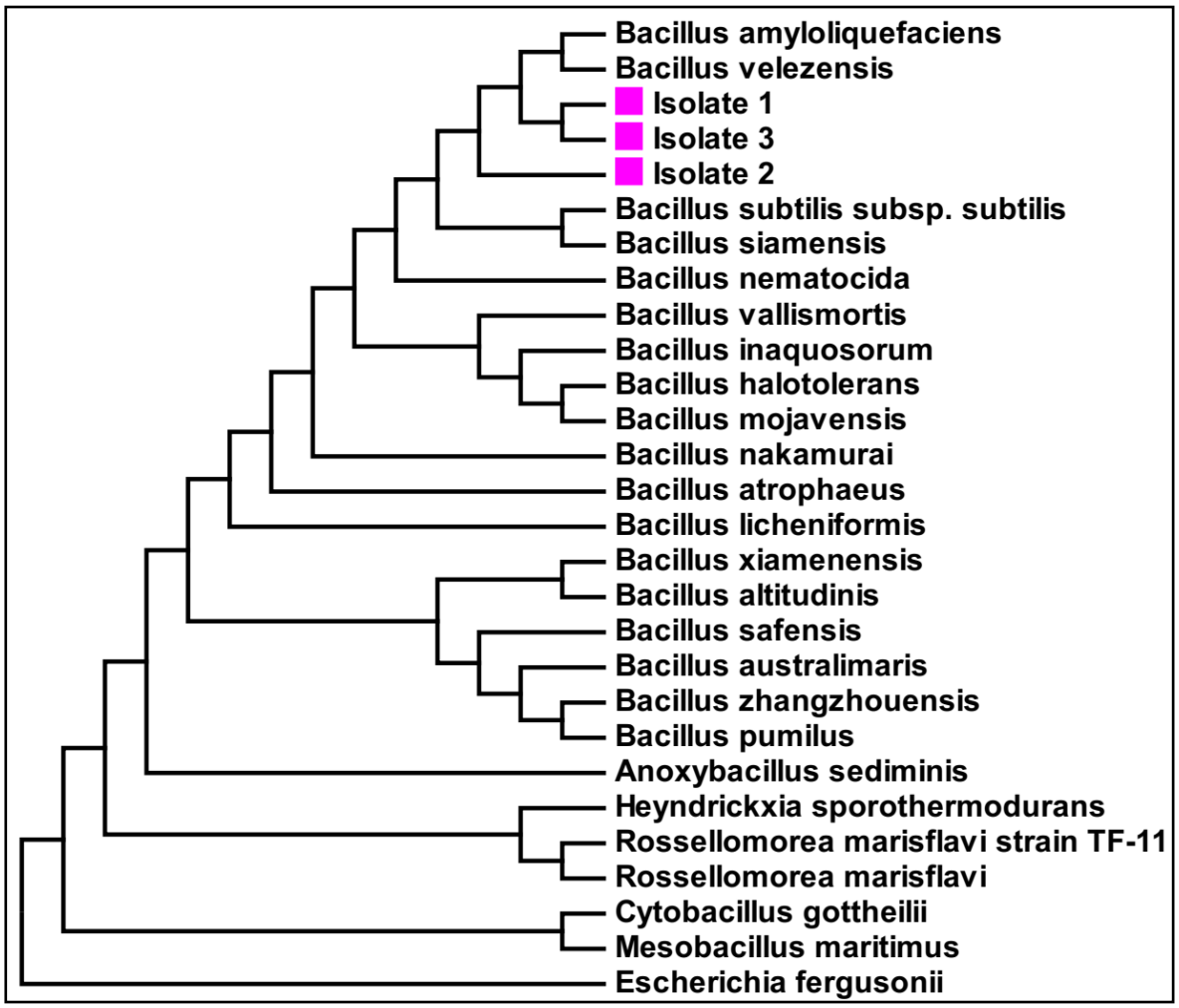
بررسی نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Chromas Lite، توالی‌یابی مناسب و بدون خطایی را برای ایزوله‌ها نشان داد. بررسی نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار BLASTn پایگاه NCBI نشان داد که هر سه ایزوله با میزان شباهت بالایی (بیش از ۹۹ درصد) به باکتری گونه *B. amyloliquefaciens* شباهت نشان می‌دهند. پس از شناسایی گونه باکتری‌ها، آنالیز فیلوژنتیکی صورت گرفت. نتایج بررسی فیلوژنتیکی نیز نتایج توالی‌یابی را مورد تأیید قرار داد و مشخص کرد که تمامی ایزوله‌های شناسایی شده یکسان بوده و باکتری گونه *B. amyloliquefaciens* هستند (شکل ۲).

نتایج بررسی فعالیت لیپازی باکتری‌های شناسایی شده در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز برای باکتری‌های شناسایی شده در دمای

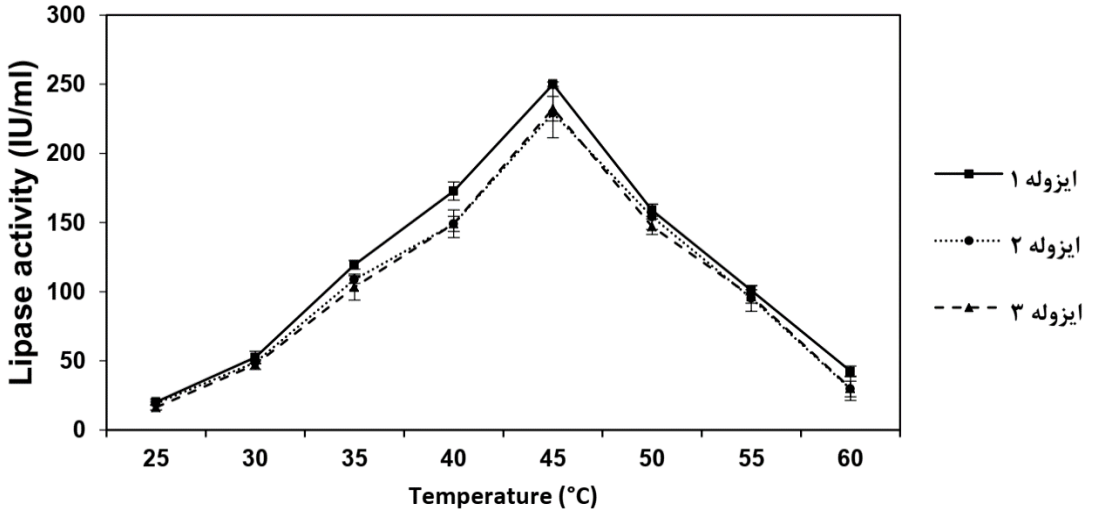
۴۵ درجه سانتی‌گراد و به میزان ۲۵۰ واحد در میلی‌لیتر برای ایزوله ۱، ۲۲۹ واحد در میلی‌لیتر برای ایزوله ۲ و ۲۳۲ واحد در میلی‌لیتر برای ایزوله ۳ است (شکل ۳).

نتایج بررسی فعالیت لیپازی باکتری‌های شناسایی شده در pHهای ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز برای باکتری‌های شناسایی شده در pH برابر با ۸ مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم لیپاز در pH برابر با ۸ برای ایزوله‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب برابر با ۴۸۵، ۴۶۱ و ۴۶۷ واحد در میلی‌لیتر محاسبه گردید (شکل ۴).

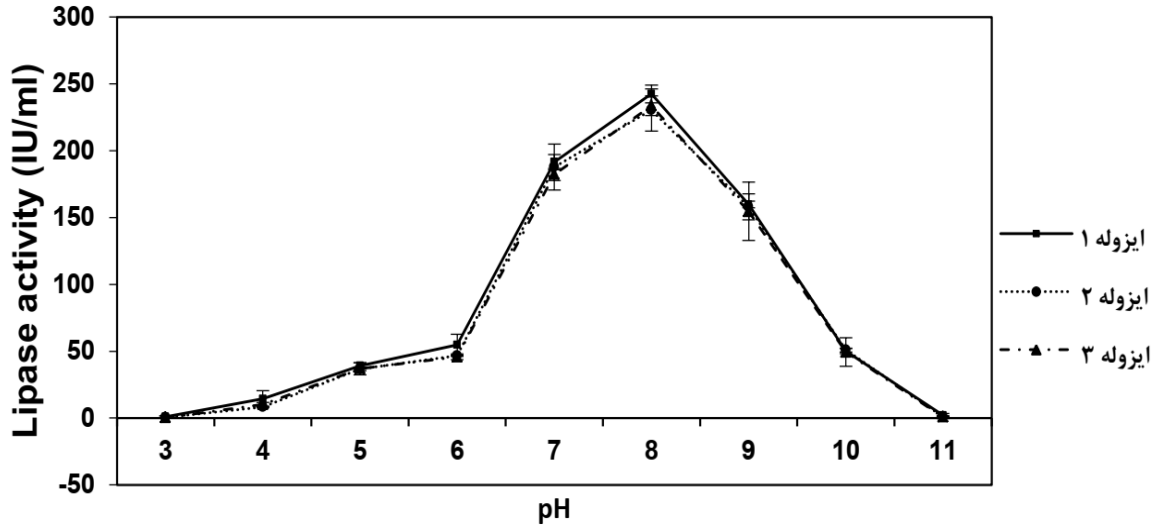
نتایج بررسی فعالیت لیپازی باکتری‌های شناسایی شده در زمان‌های مختلف انکوبه نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز برای باکتری‌های شناسایی شده در مدت زمان ۴۸ ساعت کشت و به میزان ۳۶۰ واحد در میلی‌لیتر برای ایزوله ۱، ۳۸۷ واحد در میلی‌لیتر برای ایزوله ۲ و ۳۷۳ واحد در میلی‌لیتر برای ایزوله ۳ است (شکل ۵).



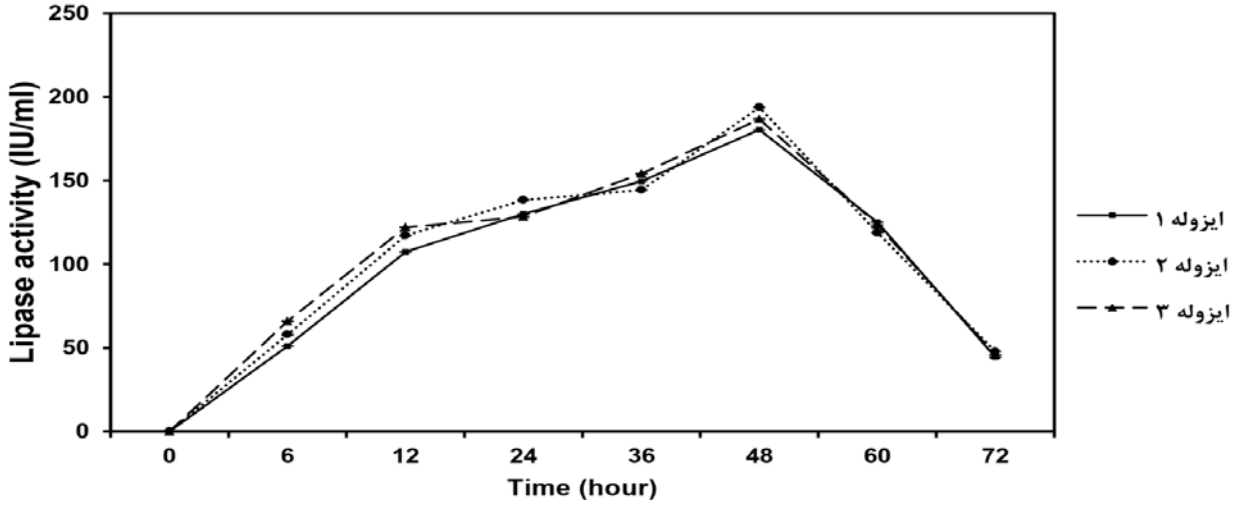
شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده برای ایزوله‌های شناسایی شده



شکل ۳. سنجش فعالیت آنزیم لیپاز در دماهای مختلف



شکل ۴. سنجش فعالیت آنزیم لیپاز در pHهای مختلف



شکل ۵. سنجش فعالیت آنزیم لیپاز در زمان‌های مختلف انکوبه

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم‌های لیپاز گروه مهمی از آنزیم‌ها هستند که به دلیل دارا بودن قابلیت هیدرولیز پیوندهای استری در محیط‌های آبی کاربرد گسترده‌ای در صنایع مختلفی مانند داروسازی، غذایی، کشاورزی، بیوسورفاکتانت‌ها، شیمی (تولید پلیمرهای زیست تخریب پذیر) و بیودیزل دارند (۳۰). لیپازها به دلیل داشتن اختصاصیت بالا در انجام واکنش، شرایط ملایم واکنش و عدم وجود واکنش‌های جانبی ناخواسته مزایای زیادی را در صنایع مختلف دارند و به همین دلیل تقاضا برای آنزیم‌های لیپاز رو به افزایش است (۳۱). آنزیم‌های لیپاز در تمام موجودات زنده مانند گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها وجود دارند اما به دلیل پایداری، داشتن سوبستراهای متنوع و همچنین انتخابی بودن، لیپازهای موجود در میکروارگانیسم‌ها اهمیت ویژه‌ای در صنایع مختلف پیدا کرده‌اند. میکروارگانیسم‌های مختلف باکتریایی و قارچی آنزیم‌های لیپاز خارج سلولی را تولید می‌کنند و لیپازهای تولید شده توسط آن‌ها به طور گسترده‌ای در زمینه تغییرات زیستی، کاتالیزوری و بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۲). میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنزیم‌های لیپاز در زیستگاه‌های مختلفی مانند پساب‌های صنعتی، پساب کارخانه‌های فرآوری چرم، کارخانه‌های فرآوری روغن، پساب صنایع لبنی، پساب صنایع غذایی، خاک‌های آلوده به مشتقات نفتی، غذاهای فاسد، توده کمپوست و به طور کلی محیط‌های روغنی یافت می‌شوند و این مکان‌ها محل مناسبی برای شناسایی میکروارگانیسم‌های مذکور است (۳۳). سه ایزوله شناسایی شده در این پژوهش از باکتری گونه *B. amyloliquefaciens* بودند و به دلیل اینکه در کارخانه‌های فرآورده‌های گوشتی مواد حیوانی اولیه دارای مقادیر زیادی از انواع چربی‌ها و لیپیدها هستند و در مراحل فرآوری این مواد تجمع پیدا کرده و حذف و وارد پساب می‌شوند، شناسایی باکتری‌های تولید کننده لیپاز خارج سلولی دور از انتظار نخواهد بود. در سال ۲۰۱۶، یک استرین تولید کننده لیپاز باکتری Bacillus از پساب غذایی غنی از چربی شناسایی و جداسازی شد (۳۴). در سال ۲۰۰۷، یک استرین Bacillus تولید کننده لیپاز با فعالیت بالا از نمونه پساب یک شرکت روغن زیتون شناسایی و جداسازی شد (۳۵). گروه دیگری از پژوهشگران در سال ۲۰۰۹ تعدادی استرین باکتریایی گرم مثبت و منفی تولید کننده لیپاز را از لجن فعال و نیز تانک‌های بی هوازی واحد تصفیه یک شرکت لبنیات شناسایی و جداسازی کردند (۳۶). همچنین در گزارشی دیگر، یک استرین تولید کننده لیپاز باکتری *P. aeruginosa* از پساب یک رستوران شناسایی و جداسازی گردید (۳۷). نتایج تست‌های فنوتیپی و بیوشیمایی برای هر سه ایزوله کاملاً یکسان بود و نتایج توالی‌یابی نیز نتایج به دست آمده از مراحل قبل را مورد تأیید قرار داد. این نتایج به وضوح مشخص کرد که ایزوله‌های شناسایی شده هر سه مورد یکسان و مربوط به باکتری*B. amyloliquefaciens* هستند. بررسی فیلوژنتیکی نیز تمامی نتایج قبل را مورد تأیید قرار داد و نشان داد که ایزوله‌های شناسایی شده با استرین ARP23 از باکتری *B. amyloliquefaciens* در یک گروه تکاملی قرار گرفتند.

در این پژوهش بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز برای ایزوله‌های شناسایی شده در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر فعالیت آنزیم‌ها و از جمله لیپاز دمای محیط فعالیت است که نقش بسزایی در کاربردهای صنعتی آن‌ها دارد. برای کاربردهای صنعتی آنزیم‌ها پیداکردن دمای بهینه برای فعالیت آنها از مهم‌ترین نکاتی است که باید مورد توجه قرار گیرد (۳۸, ۳۹). در این تحقیق نیز فعالیت آنزیم در دمای ۴۵ درجه در بیشترین حالت خود بود و با افزایش دما به آرامی

فعالیت آنزیم رو به کاهش گذاشت، به طوری که با افزایش ۵ درجه‌ای در دمای رشد باکتری، میزان فعالیت آنزیم لیپاز حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد کاهش نسبت به دمای بهینه نشان می‌داد. در دمای ۶۰ درجه میزان فعالیت آنزیم لیپاز حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد فعالیت بهینه بود. با توجه به این موارد به نظر می‌رسد که ایزوله‌های باکتری *B. amyloliquefaciens* و آنزیم‌های لیپاز آن‌ها مزوفیل بوده و در دماهای زیر ۵۰ درجه بهترین فعالیت را دارند.

در این مطالعه بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز برای ایزوله‌های شناسایی شده در pH برابر با ۸ مشاهده شد. از دیگر عوامل تأثیرگذار بر فعالیت آنزیم‌ها و از جمله لیپاز، pH بهینه فعالیت است که نقش بسزایی در کاربردهای صنعتی آن‌ها بازی می‌کند. هر چقدر که لیپازها در دامنه‌ی بیشتری از pH فعال باشند، برای کاربردهای صنعتی مناسب‌تر هستند (۴۰-۳۸). میزان فعالیت آنزیم لیپاز در ایزوله‌های شناسایی شده در pHهای بین ۷ تا ۹ در بیشترین مقدار بود که نشان می‌دهد لیپاز ایزوله‌های باکتری B. amyloliquefaciens در pHهای قلیایی پایداری و فعالیت مناسبی را دارد و به نوعی لیپاز قلیایی محسوب می‌گردد (۴۱).

در مطالعه حاضر بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز برای ایزوله‌های شناسایی شده ۴۸ ساعت پس از کشت مشاهده گردید. میزان تولید و ترشح آنزیم‌های خارج سلولی و از جمله لیپاز در باکتری‌ها رابطه مستقیمی با سرعت و روند رشدی این میکروارگانیسم‌ها دارد (۴۲). این امر به این معنی است که تا میزان جمعیت یک باکتری به حد کافی نرسد میزان تولید و ترشح آنزیم‌های خارج سلولی مانند لیپاز در آن‌ها به حد بهینه خود نخواهد رسید. با توجه به موارد مذکور به احتمال زیاد میزان رشد ایزوله‌های باکتری *B. amyloliquefaciens* به گونه‌ای است که در مدت زمان ۴۸ ساعت به میزان رشد کافی برای تولید بهینه آنزیم لیپاز می‌رسند.

بسیاری از میکروارگانیسم‌ها دارای توانایی ترشح آنزیم لیپاز هستند اما در این بین باکتری‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. لیپازهای باکتریایی به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فردی مانند عدم نیاز به کوفاکتور برای انجام فعالیت آنزیم، پوشش‌دهی محدوده‌ی وسیعی از سوبستراها، پایداری در حلال‌های آلی، عدم ایجاد واکنش‌های جانبی هنگام فعالیت دارای اولویت هستند. در این پژوهش برای اولین بار، سه ایزوله از باکتری *B. amyloliquefaciens* تولید کننده لیپاز خارج سلولی از پساب کارخانه فرآورده‌های گوشتی گل‌بهار خرم‌آباد جداسازی و شناسایی شدند و ویژگی‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی آن‌ها و همچنین ویژگی‌های مختلف آنزیم لیپاز در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی دقیق‌تر ویژگی‌های آنزیم لیپاز ایزوله‌های باکتری *B. amyloliquefaciens*، باید آنزیم مذکور از محیط کشت خالص‌سازی شده و بررسی‌های مختلف روی آنزیم تخلیص شده صورت پذیرد. نتایج این پژوهش می‌تواند در بهبود و گسترش بانک میکروارگانیسمی کشور مفید واقع شود. با استخراج و تخلیص لیپاز خارج سلولی این ایزوله‌ها می‌توان از آن در صنایع مختلف بهره برد. همچنین با شناسایی و جداسازی ژن تولید کننده آنزیم لیپاز از ایزوله‌های مذکور می‌توان آن را در فرآیند مهندسی آنزیم وارد کرده و با ایجاد جهش‌های هدفمند، میزان فعالیت آن را به طور دلخواه تغییر داد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سروستان با کد اخلاق IR.IAU.M.REC.1401.010 می باشد.

References

1. Gargiulo S, Soumillion P. Directed evolution for enzyme development in biocatalysis. Current Opinion in Chemical Biology. 2021;61:107-13.
2. Nimkande VD, Bafana A. A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. Journal of Water Process Engineering. 2022;46.
3. Salgado CA, dos Santos CIA, Vanetti MCD. Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. Food Bioscience. 2022;45.
4. Guncheva M, Zhiryakova D. Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2011;68(1):1-21.
5. Najjar A, Hassan EA, Zabermawi N, Saber SH, Bajrai LH, Almuhayawi MS, et al. Optimizing the catalytic activities of methanol and thermotolerant Kocuria flava lipases for biodiesel production from cooking oil wastes. Scientific Reports. 2021;11(1).
6. Yasar G, Gulhan UG, Guduk E, Aktas F. Screening, partial purification and characterization of the hyper-thermophilic lipase produced by a new isolate of Bacillus subtilis LP2. Biocatalysis and Biotransformation. 2020;38(5):367-75.
7. Balaji L, Chittoor JT, Jayaraman G. Optimization of extracellular lipase production by halotolerant Bacillus sp. VITL8 using factorial design and applicability of enzyme in pretreatment of food industry effluents. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2020;50(7):708-16.
8. Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M, Oliveira JV. A review on microbial lipases production. Food and Bioprocess Technology. 2010;3(2):182-96.
9. Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnology and applied biochemistry. 1999;29(2):119-31.
10. Kempka AP, Lipke NL, da Luz Fontoura Pinheiro T, Menoncin S, Treichel H, Freire DM, et al. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from Penicillium verrucosum in solid-state fermentation. Bioprocess and biosystems engineering. 2008;31(2):119-25.
11. Chandra P, Enespa, Singh R, Arora PK. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. Microbial Cell Factories. 2020;19(1):169.
12. Farias TC, Kawaguti HY, Bello Koblitz MG. Microbial amylolytic enzymes in foods: Technological importance of the Bacillus genus. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2021;35.
13. Ameri A, Shakibaie M, Soleimani-Kermani M, Faramarzi MA, Forootanfar H. Overproduction of thermoalkalophilic lipase secreted by Bacillus atrophaeus FSHM2 using UV-induced mutagenesis and statistical optimization of medium components. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2019;49(2):184-91.

14. Sharma P, Sharma N, Pathania S, Handa S. Enhanced production of extracellular lipase produced from bacillus methylotrophicus PS3 by optimization of different process parameters under response surface methodology. Trends in Carbohydrate Research. 2017;9(2):54-61.
15. Singh P, Patel V, Shah V, Madamwar D. A Solvent-tolerant Alkaline Lipase from Bacillus sp. DM9K3 and Its Potential Applications in Esterification and Polymer Degradation. Applied Biochemistry and Microbiology. 2019;55(6):603-14.
16. Oyedele SA, Ayodeji AO, Bamidele OS, Ajele JO, Fabunmi TB. Enhanced lipolytic activity potential of mutant Bacillus niacini EMB-5 Grown on Palm Oil Mill Effluent (POME) and biochemical characterization of purified lipase. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019;18.
17. Ameri A, Shakibaie M, Sahami Z, Khoobi M, Forootanfar H. Statistical optimization of cultural medium composition of thermoalkalophilic lipase produced by a chemically induced mutant strain of Bacillus atrophaeus FSHM2. 3 Biotech. 2019;9(7).
18. Bhushan I, Saraswat R, Gupta P, Shah BA. Enantioselective resolution of 2-arylpropionic acid derivatives employing immobilization of lipase from Bacillus subtilis strain Kakrayal_1 (BSK-L). Bioresource Technology. 2018;269:581-5.
19. Thomson CA, Delaquis PJ, Mazza G. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. Critical reviews in food science and nutrition. 1999;39(2):165-87.
20. Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied microbiology and biotechnology. 2004;64(6):763-81.
21. Ebrahimpour A, Rahman RNZRA, Ean Ch'ng DH, Basri M, Salleh AB. A modeling study by response surface methodology and artificial neural network on culture parameters optimization for thermostable lipase production from a newly isolated thermophilic Geobacillus sp. strain ARM. BMC Biotechnology. 2008;8(1):96.
22. Abada EAE-mJPJoBS. Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from Bacillus stearothermophilus AB-1. 2008;11(8):1100-6.
23. Dutta S, Ray LJAb, biotechnology. Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of Bacillus cereus C7. 2009;159(1):142-54.
24. Heravi KM, Eftekhar F, Yakhchali B, Tabandeh F. Isolation and identification of a lipase producing Bacillus sp. from soil. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2008;11(5):740-5.
25. Ghasemi Y, Rasoul-Amini S, Kazemi A, Zarrini G, Morowvat MH, Kargar M. Isolation and characterization of some moderately halophilic bacteria with lipase activity. Microbiology. 2011;80(4):483-7.
26. Anbu P, Hur BK. Isolation of an organic solvent-tolerant bacterium Bacillus licheniformis PAL05 that is able to secrete

solvent-stable lipase. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2014;61(5):528-34.
27. Quinn DM, Shirai K, Jackson RL, Harmony JA. Lipoprotein lipase-catalyzed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II. Biochemistry. 1982;21(26):6872-9.
28. Shirai K, Jackson R. Lipoprotein lipase-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate. Interfacial activation by phospholipid vesicles. The Journal of biological chemistry. 1982;257(3):1253-8.
29. Winkler UK, Stuckmann M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. Journal of bacteriology. 1979;138(3):663-70.
30. Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications. Applied biochemistry and biotechnology. 2004;118(1-3):155-70.
31. Saxena R, Ghosh P, Gupta R, Davidson WS, Bradoo S, Gulati R. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. Current Science. 1999;77(1):101-15.
32. Zheng C, editor Screening and identification of lipase producing bacterium. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science; 2018: IOP Publishing.
33. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology advances. 2001;19(8):627-62.
34. Saengsanga T, Siripornadulsil W, Siripornadulsil S. Molecular and enzymatic characterization of alkaline lipase from Bacillus amyloliquefaciens E1PA isolated from lipid-rich food waste. Enzyme and Microbial Technology. 2016;82:23-33.
35. Ertuğrul S, Dönmez G, Takaç S. Isolation of lipase producing Bacillus sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. Journal of hazardous materials. 2007;149(3):720-4.
36. Loperena L, Ferrari MD, Díaz AL, Ingold G, Pérez LV, Carvallo F, et al. Isolation and selection of native microorganisms for the aerobic treatment of simulated dairy wastewaters. Bioresource technology. 2009;100(5):1762-6.
37. Dharmsthiti S, Kuhasuntisuk B. Lipase from Pseudomonas aeruginosa LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 1998;21(1):75-80.
38. Mehta A, Guleria S, Sharma R, Gupta R. The lipases and their applications with emphasis on food industry. Microbial biotechnology in food and health: Elsevier; 2021. p. 143-64.
39. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial technology. 2006;39(2):235-51.
40. Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications. Applied biochemistry and biotechnology. 2004;118(1):155-70.
41. Jaeger K-E, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O. Bacterial

lipases. FEMS microbiology reviews. 1994;15(1):29-63.
42. Arvidson S. Extracellular enzymes. Gram-Positive Pathogens. 2006:478-85.
43. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Diagnostic microbiology: Mosby St Louis; 2007.
44. Koneman EW, Allen SD, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnostic microbiology. The nonfermentative gram-negative bacilli Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1997:253-320.

Isolation and Molecular identification of Lipase-Producing Bacteria from Wastewaters of a Meat Factory in Khorramabad, Iran

Khodakaramifard Z[1], Shirazinejad Ar[2*], Mohammadi M [3], Hashemi SMB [4]

1.Ph.D student, Department of Food Science and Technology, Sarvestan Branch, Islamic Azad University, Sarvestan, Iran

2.Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Sarvestan Branch, Islamic Azad University, Sarvestan, Iran; Email: shirazinejad@iausarv.ac.ir

3.Associate Professor, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

4.Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa University, Fasa, Iran

Received: *2022/05/29* Accepted: *2022/07/12*

Abstract

Background: Lipases are one of the most important catalysts in the detergent, dairy, and textile industries due to their biocatalytic activity in aqueous and non-aqueous environments. The screening of different habitats to identify lipase-producing bacteria and optimizing their activity parameters facilitates the production and effective use of lipases in different industries. The present study aims to isolate and identify lipase-producing bacteria from wastewaters of a meat and investigate their characteristics.

Materials and Methods: In the present study, wastewater samples from Golbahar Meat Factory in Khorramabad, Iran were screened for lipase-producing bacterial strains. The lipase-producing isolates were identified based on morphological and biochemical properties and 16S rRNA gene sequencing. The culture medium parameters such as pH, incubation time, and temperature were different for optimization.

Results: Three isolates with high lipase activity were identified. These isolates were identified as Bacillus amyloliquefaciens using the nucleotide BLAST obtained for the 16S rRNA gene. the highest lipase activity for the identified isolates was recorded at 48 hours of incubation, 45 °C, and pH= 8.0.

Conclusion: The alkaline lipases from *Bacillus amyloliquefaciens* isolates with relatively good temperature stability can be used in various industries. By identifying and isolating the lipase enzyme-producing gene from the mentioned isolates, it can be used in enzyme engineering process and the lipase activity can be changed by site-directed mutagenesis.

Keywords: 16S rRNA, *Bacillus amyloliquefaciens*, Enzymatic activity, Lipase.

Citation: Khodakaramifard Z, Shirazinejad Ar, Mohammadi M, Hashemi SMB. Isolation and Molecular identification of Lipase-Producing Bacteria from Wastewaters of a Meat Factory in Khorramabad, Iran. Yafte. 2022; 24(2):15-29.