مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دوازدهم، پاییز ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تولید و بهینه سازی روغن میکروبی در مخمرهای مولد چربی یارویا لیپولیتیکا DSM 70562و مخمر بومی ژئوتریکوم BL

مرجان انشاییه*[۱]، آزاده عبدلی[۱]، ایرج نحوی[۲]، محبوبه مدنی[۳]

۱دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی ، اصفهان، ایران
۲هیئت علمی و استاد بخش میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۳ هیئت علمی و استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان

چکیده

سابقه و هدف: میکروارگانیسم هایی که قابلیت تجمع لیپید به میزان بیش از ۲۰٪ بیومس خود را دارند، تحت عنوان میکروارگانیسم های مولد چربی نامیده می شوند. روغن های میکروبی شباهت زیادی با روغن های گیاهی دارند، اندک تفاوت بین آن ها غنی بودن روغن میکروبی از اسیدهای چرب غیر اشباع است. لیپیدهای سنتز شده توسط مخمرها قابلیت استفاده در صنایع دارویی جهت مقاصد تکنیکی و یا به عنوان مکمل غذایی را دارند. اهمیت تری آسیل گلیسرول های میکروبی بالا بودن اسیدهای چرب غیر اشباع با ۱۶ و ۱۸ اتم کربن در آن هاست که از نظر غذایی بسیار با اهمیت است.

مواد وروش: در این تحقیق توانایی تولید لیپید در سویه های استاندارد و بومی بر روی منابع کربنی متفاوت نظیر گلوکز، زایلوز و گلیسرول بررسی شد. پس از انتخاب نوع منبع کربن، اثر سولفات منیزیم نیز به روش تک فاکتوره بر میزان تولید لیپید بررسی شد. بعد از این مراحل با کمک طراحی تاگوچی بهینه سازی سایر عوامل از قبیل غلظت منبع کربن و نیتروژن، دما، هوادهی، pH و مدت زمان انکوباسیون انجام پذیرفت . در این پژوهش جهت آنالیز و تایید روغن تولید شده از تکنیک FTIR Spectroscopy استفاده گردید.

یافته ها: مخمرهای یارویا لیپولیتیکا DSM70562 و ژئوتریکوم BL پس از بهینه سازی شرایط به میزان تولید لیپید به ترتیب معادل ۷/۳۵ g/L و ۵/۳۵ g/L رسیدند. موثرترین عامل در روند بهینه سازی در مخمرهای مورد بررسی غلظت منبع کربن بود. این عامل در مورد مخمر استاندارد و بومی مورد بررسی به ترتیب دارای میزان تاثیر ۴۱/۳۷٪ و ۶۳/۵۷٪ بود. نتایج حاصل از آنالیز لیپید با تکنیک FTIR Spectroscopy تشابه قابل توجهی را بین روغن جداسازی شده از سویه های مخمری و استاندارد مربوطه (تری اولئین) نشان داد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده با استفاده از طراحی تاگوچی میزان تولید لیپید در مخمرهای استاندارد و بومی مورد بررسی پس از بهینه سازی شرایط به ترتیب به میزان ۲/۹۴ g/L و ۱/۲۲ g/L افزایش یافت که نشان دهنده ی کارایی بالای طراحی تاگوچی در زمینه بهینه سازی شرایط محیط کشت می باشد. بدین ترتیب با کمک طراحی تاگوچی می توان فرایند بهینه سازی را که مرحله ی لازم و موثر در تمامی پروسه های صنعتی جهت افزایش بازدهی تولید و کاهش هزینه هاست؛ به بهترین شکل ممکن انجام داد.

واژه های کلیدی: میکروارگانیسم های مولد چربی، روغن میکروبی، طراحی تاگوچی،FTIR Spectroscopy

مقدمه

کمتر از ۵٪ مخمرهای مولد چربی گزارش شده اند که توانایی تجمع لیپید به میزان بیش از ۲۵٪ را دارند (۱۲). این جنس ها دارای قابلیت استفاده از منابع کربنی مختلف موجود در محیط کشت هستند و می توانند با جایگزین کردن اسیدهای چرب موجود در محیط، ترکیب چربی خود را تغییر دهند. مخمرها دارای فوایدی نسبت به سایر منابع زیستی مولد چربی هستند: برای مثال مدت زمان دو برابر شدن آن ها معمولاً کمتر از یک

آدرس نویسنده مسئول : .اصفهان، خ کاوه، خ بهمن، نبش کوچه شبنم، پلاک ۶۶
Email : m_enshaeieh@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۵/۱۲
تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۴

ساعت است، نسبت به گیاهان کمتر تحت تاثیر فصل و یا شرایط آب و هوایی قرار می گیرند و کشت آن ها نسبت به جلبک ها به راحتی افزایش می یابد. با توجه به تنوع میکروارگانیسم ها و شرایط رشد، مخمرهای مولد چربی می توانند منابع خوبی برا ی تولید تری گلیسریدها، سورفاکتانت ها و یا اسیدهای چرب غیر اشباع باشند(۲۰). این امر در تولید اسیدهای چرب غیر اشباع برای مصارف دارویی و یا غنی سازی مواد غذایی نظیر شیر خشک نوزادان اهمیت دارد (۴،۱،۲۱). هر یک از این اسیدهای چرب غیر اشباع دارای اثرات بسیار مهمی بر سلامتی انسان هستند. به عنوان مثال لینولنیک اسید باعث کاهش شیوع بیماری های قلبی، بهبود سرطان، چاقی، دیابت و آرترواسکلروزیس شده، محرک تشکیل استخوان بوده و کلسترول خون را کاهش می دهد(۴). ایکوزاهگزانوئیک اسید نیز پیش ساز مولکول های سیگنال مهمی مثل پروستاگلاندین ها و ایکوزانوئیدها می باشد(۱۸). تجمع لیپید در میکروارگانیسم های مولد چربی با گرسنگی سلول در زمینه ی نیتروژن یا ماده غذایی دیگری غیر از کربن نظیر فسفر، روی، آهن یا منگنز اتفاق می افتد. تشکیل ذرات لیپیدی در اواخر فاز لگاریتمی شروع و طی فاز سکون ادامه می یابد تا زمانی که منبع کربن محیط شروع به کاهش کند. به این ترتیب تولید لیپید در محیط غنی از کربن طی یک فرایند دو مرحله ای اتفاق می افتد. در مرحله اول سلول ها افزایش یافته و با مصرف مواد غذایی و کاهش آن (به غیر از کربن) این مرحله به پایان می رسد. طی فاز دوم مقدار اضافی منبع کربنی به ذخایر لیپیدی داخل سلولی تبدیل می شود(۱). طی فقر نیتروژن سویه های مولد و غیر مولد چربی به جذب کربن ادامه می دهند ولی تنها ارگانیسم های مولد چربی آن را متابولیزه کرده و نسبت ATP/AMP سلولی را افزایش می دهند. سلول های موجود با رشد ذرات لیپیدی بزرگ تر می شوند(۷،۱۸). در مخمرهای غیر مولد، کربن اضافه بدون استفاده باقی می ماند یا به پلی ساکارید تبدیل می شود در حالی که در گونه های مولد چربی به لیپید تبدیل می گردد و به صورت TAG (Tri acyl glycerol) در اجسام لیپیدی داخل سلولی تجمع می یابد(۱۳،۱). محدودیت فسفر نیزمی تواند در تولید بیشتر لیپید نقش داشته باشد(۹،۸). زمانی که نیتروژن در محیط کم باشد فعالیت نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید ایزوسیترات دهیدروژناز کاهش می یابد و یا حتی از میتوکندری مخمرهای مولد چربی حذف می شود، سپس چرخه تری کربوکسیلیک اسید تحت تاثیر قرار گرفته، مسیر متابولیسم تغییر یافته، سنتز پروتئین متوقف شده و تجمع لیپید فعال می گردد. یارویا لیپولیتیکا از مخمرهای مولد چربی با کاربردهای بیولوژی و بیوتکنولوژی متفاوت است. این میکروارگانیسم به عنوان مدل در مطالعه فیزیولوژی، ژنتیک، دی مورفیسم، دست کاری ژنی، بیان ژن و تجمع لیپید شناخته شده است(۳). این مخمر از لحاظ توانایی رشد بر روی انواع متفاوتی از سوبستراهای غنی از لیپید نظیر محصولات لبنی و گوشتی متفاوت است(۱۶). این توانایی منجر به استفاده از این مخمر در تولید صنعتی SCO (Cell Oil Single) و یا تولید مکمل غذایی غنی از اسیدهای چرب شده است. یارویا به عنوان یک ارگانیسم الگو برای مطالعه مصرف لیپید داخل آدیپوسیت هاست زیرا نه تنها توانایی تجمع لیپید در ذرات لیپیدی را دارد بلکه ساختمان این سلول مخمری مشابه آدیپوسیت های یوکاریوت های عالی است(۱۴). این مخمر تمایل به تجزیه تجمع لیپیدی خود دارد. حتی در شرایطی که سوبستراهای چرب غنی از استئاریک اسید در محیط باشد بازهم تمایل به تجزیه ی تجمع لیپیدی خود دارد(۱۵). زمانی که از گلیسرول به عنوان کمک سوبسترا همراه با استئارین استفاده شود غلظت اسیدهای چرب غیر اشباع در لیپید های ذخیره ای افزایش می یابد. گلیسرول یکی از پیش سازهای سنتز لیپید در مخمرهای مولد چربی است که استفاده از آن سرعت تولید چربی را بالا می برد(۲،۱۹). با توسعه ی فرایندهای تکنیکی- اقتصادی و شناسایی سوبستراهای ارزان قیمت می توان تولید لیپید میکروبی در مقیاس بالا را در آینده تامین کرد(۱۷). هدف از این مطالعه بررسی تولید روغن میکروبی در سویه های مخمری استاندارد و بومی، بررسی روش Bligh & Dyer در استخراج لیپید مخمری و همچنین ارزیابی میزان تاثیر عوامل مختلف شیمیایی و فیزیکی بر روند بهینه سازی تولید روغن میکروبی بوده است. در این مطالعه استفاده از روش تاگوچی برای بهینه سازی به عنوان نقطه ی عطفی جهت ارتقای بازدهی فرایندهای تولیدی مطرح شده است. در این مطالعه تولید روغن تک یاخته نیز با تکنیک Spectroscopy FTIR تایید گردید.

مواد و روش ها

- سویه های مخمری

سویه های مخمری مورد استفاده در این تحقیق شامل یارویا لیپولیتیکا DSM70562 به عنوان سویه ی استاندارد و BL به عنوان سویه ی بومی جدا شده از خاک مزرعه ی ذرت وآفتابگردان بودند.

- آماده سازی مایه تلقیح

برای این منظور سویه های مخمری در ابتدا بر روی محیط YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar) به مدت دو روز کشت داده شدند. پس از آن به ارلن مایر ۱۰۰ میلی لیتری که حاوی ml۲۰ محیط پیش تولید بود، منتقل گردیدند. این محیط دارای g/L ۱۵ گلوکز، g/L۵ $(NH_4)_2SO_4$ ، g/L۱ KH_2PO_4 ، g/L۵ /۰ $MgSO_4.7H_2O$ و g/L ۰/۵ عصاره مخمر با pH= ۵ بوده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ºC۲۸ و rpm۱۵۰ قرار گرفت(۱۴).

- تهیه محیط تولید

۵ میلی لیتر از مایه تلقیح به ۴۵ میلی لیتر از محیط تولید در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری انتقال داده شد، این محیط دارای g/L ۳۰ گلوکز، g/L۱ $(NH_4)_2SO_4$، g/L۷ KH_2PO_4، g/ L۲NaH_2PO_4 ،۵ g/L /۱ $MgSO_4.7H_2O$ و g/L ۱ عصاره مخمر با pH= ۶ بوده و به مدت ۹۶ ساعت در دمای ºC۲۸ و rpm۱۸۰ کشت داده شد(۱۴).

- تعیین میزان لیپید و بیومس سلولی

استخراج لیپید درون سلولی به روش Bligh & Dyer صورت گرفت (۱۴). برای این منظور ml ۵۰ از نمونه محیط تولید در rpm ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آن بیومس به دست آمده دو مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. سپس به میزان ml ۱۰ HCL ۴ مولار به نمونه مورد نظر اضافه کرده و به مدت ۲ ساعت در دمای ºC ۶۰ قرار داده شد. سپس به توده ی هیدرولیز شده با اسید، به میزان ml۲۰ متانول- کلروفرم (۱:۱) اضافه گردید و به مدت ۲ الی ۳ ساعت در شیکر قرار داده شد. پس از آن با سانتریفوژ فاز آبی بالایی و آلی پایینی جدا گردید. فاز آلی پایینی با کمک پیپت پاستور جدا شده و در خلا با دستگاه دسیکاتور خشک گردید، وزن خشک به دست آمده میزان لیپید تولید شده را نشان می دهد. به منظور تعیین بیومس خشک سلولی نیز ml۵ از محیط تولید در rpm۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از شستشو با آب برای دو مرتبه، در آون ºC ۸۰ قرار داده تا به وزن ثابت رسیده و خشک شود. پس از آن بیومس خشک شده وزن گردید(۱۴).

- بررسی سوپرناتانت برای محاسبه قند مصرف شده

محاسبه قند مصرف شده برای به دست آوردن راندمان رشد و تولید لیپید اهمیت دارد:

۱۰۰ × (قند مصرف شده)/ (بیومس خشک سلولی) =راندمان رشد

۱۰۰ × (قند مصرف شده)/ (وزن لیپید تولید شده) = راندمان تولید لیپید

بررسی میزان قند مصرف شده با کمک معرف DNS (دی نیتروسالیسیلات) صورت پذیرفت(۴).

- بهینه سازی منبع کربن

در ابتدا اثر منابع کربنی گلیسرول، گلوکز و زایلوز بر روی میزان تولید لیپید بررسی شد. پس از انتخاب منبع کربن بهینه سازی سایر فاکتورها با کمک روش تاگوچی انجام گرفت.

- بهینه سازی با کمک روش تاگوچی

برای بررسی تاثیر فاکتورهای مختلف بر میزان تولید لیپید از روش تاگوچی استفاده شد. پارامترهای غلظت کربن(گلوکز) و نیتروژن(سولفات آمونیوم)، pH، هوادهی، مدت زمان انکوباسیون و دما جهت بهینه سازی در طرح مورد استفاده قرار گرفت. گلوکز، مدت زمان و pH در ۴ سطح، نیتروژن در ۳ سطح و هوادهی و دما در ۲ سطح بررسی گردید. جدول ۱ این سطوح را نشان می دهد. نرم افزار Qualitek-4 و مدل L16 در این گلوکز، مدت زمان و pH در ۴ سطح، نیتروژن در ۳ سطح و هوادهی و دما در ۲ سطح بررسی گردید. جدول ۱ این سطوح را نشان می دهد. نرم افزار Qualitek-4 و مدل L16 در این طرح به کار

گرفته شد. جدول ۲ آرایه های L16 را نشان می دهد. پس از انجام ۱۶ آزمایش برای هر سویه و وارد کردن نتایج، نرم افزار بهترین حالت برای تولید بیشترین مقدار لیپید را برای هر سویه پیش بینی کرد.

- بررسی تولید روغن تک یاخته به وسیله تکنیک FTIR spectroscopy

تایید تکمیلی و حتمی ترکیبات روغنی با استفاده از تکنیک FTIR Spectroscopy با دستگاه مدل JASCO FT/IR-6300, Japan انجام گرفت. این تکنیک جهت تایید نوع ترکیب یک محصول به کار گرفته می شود. اصول این روش ایجاد پیک در دامنه خاصی از طیف ایجاد شده بر اساس واحد Cm^{-1} می باشد که هر گروه شیمیایی در نقطه خاصی در گستره مشخص شده پیک می دهد(۵، ۱۱،۶). گستره مورد بررسی دستگاه از $400\ cm^{-1}$ تا $4000\ cm^{-1}$ تنظیم شد. استاندارد استفاده شده تری اولئین (خریداری شده از شرکت سیگما آلدریچ-آلمان) به عنوان شاهد و جهت مقایسه با روغن تک یاخته تولیدی مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱- فاکتورهای مختلف و سطوح آن ها جهت طراحی تاگوچی

متغیرها	سطح اول	سطح دوم	سطح سوم	سطح چهارم
گلوکز	۵۵	۷۵	۹۵	۱۱۵
سولفات آمونیوم	۰/۵	۱	۱/۵	-
مدت زمان	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
دما	۲۵	۳۵	-	-
pH	۵	۵/۵	۶	۶/۵
rpm	۱۵۰	۲۰۰	-	-

جدول ۲- طراحی L16 در روش تاگوچی

آرایه ها	نیتروژن	کربن	دما	مدت زمان	pH	rpm
آرایه ی ۱	۰/۵	۵۵	۲۵	۲۴	۵	۱۵۰
آرایه ی ۲	۰/۵	۷۵	۲۵	۴۸	۵/۵	۲۰۰
آرایه ی ۳	۰/۵	۹۵	۳۵	۷۲	۶	۱۵۰
آرایه ی ۴	۰/۵	۱۱۵	۳۵	۹۶	۶/۵	۲۰۰
آرایه ی ۵	۱	۵۵	۲۵	۹۶	۶	۲۰۰
آرایه ی ۶	۱	۷۵	۲۵	۷۲	۶/۵	۱۵۰
آرایه ی ۷	۱	۹۵	۳۵	۴۸	۵	۲۰۰
آرایه ی ۸	۱	۱۱۵	۳۵	۲۴	۵/۵	۱۵۰
آرایه ی ۹	۱/۵	۵۵	۳۵	۴۸	۶/۵	۱۵۰
آرایه ی۱۰	۱/۵	۷۵	۳۵	۲۴	۶	۲۰۰
آرایه ی۱۱	۱/۵	۹۵	۲۵	۹۶	۵/۵	۱۵۰
آرایه ی۱۲	۱/۵	۱۱۵	۲۵	۷۲	۵	۲۰۰
آرایه ی۱۳	۰/۵	۵۵	۳۵	۷۲	۵/۵	۲۰۰
آرایه ی۱۴	۰/۵	۷۵	۳۵	۹۶	۵	۱۵۰
آرایه ی۱۵	۰/۵	۹۵	۲۵	۲۴	۶/۵	۲۰۰
آرایه ی۱۶	۰/۵	۱۱۵	۲۵	۴۸	۶	۱۵۰

نتایج

- میزان تولید لیپید در محیط فقیر نیتروژن با منابع کربن گلوکز، گلیسرول و زایلوز

لیپید تولید شده از دو سویه ی مورد بررسی در محیط های با منبع کربنی مختلف در جداول ۳ و ۴ و ۵ نشان داده شده است.

جدول ۳- میزان لیپید(g/L) ، بیومس خشک (g/L) و در صد تولید لیپید در منبع گلوکز

سویه ها	لیپید(g/L)	بیومس(g/L)	درصد تولید لیپید
یارویا لیپولیتیکا DSM 70562	۴/۴۱	۱۳/۸۶	۳۱/۸۱
سویه BL	۴/۱۳	۱۶/۲۴	۲۵/۴۳

جدول ۴- لیپید(g/L) ، بیومس خشک (g/L) و در صد تولید لیپید در منبع گلیسرول

سویه ها	لیپید(g/L)	بیومس(g/L)	درصد تولید لیپید
یارویا لیپولیتیکا 70562 DSM	۴/۴۹	۱۴/۴۵	۳۱/۰۷
سویه BL	۳/۹۸	۱۶/۱۲	۲۴/۶۸

جدول ۵- لیپید(g/L) ، بیومس خشک (g/L) و در صد تولید لیپید در منبع زایلوز

سویه ها	لیپید (g/L)	بیومس (g/L)	درصد تولید لیپید
یارویا لیپولیتیکا 70562 DSM	۴/۰۱	۱۳/۶۵	۲۹/۳۷
سویه BL	۳/۸۹	۱۶/۰۲	۲۴/۲۸

با انتخاب گلوکز به عنوان منبع کربن، طراحی L16 را برای سویه ها اجرا کردیم. نتایج این آزمایشات در جداول ۶ و ۷ برای دو سویه نشان داده شده است. بهترین آزمایشات برای این سویه ها، آزمایش ۷ برای یارویا لیپولیتیکا DSM 70562 با میزان تولید لیپید g/L ۷/۳۵ و آزمایش ۱۱ برای سویه ی BL با میزان g/L ۵/۳۵ می باشد. ستون آخر در جدول ANOVA (آنالیز واریانس) درصد تاثیر عوامل مختلف را بر روی میزان تولید لیپید نشان می دهد.

برای سویه یارویا لیپولیتیکا غلظت گلوکز دارای بیشترین تاثیر (۴۱/۳۷۲٪) می باشد. پس از آن عوامل غلظت نیتروژن و مدت زمان به ترتیب دارای بیشترین تاثیر بودند. بیشترین مجموع خالص مربعات نیز مربوط به منبع کربن است. در این بین عوامل pH، دما و هوادهی به ترتیب دارای کمترین تاثیر هستند. در مورد سویه بومی BL غلظت کربن با ۶۳/۵۷۲٪ و بیشترین مجموع خالص دارای بیشترین تاثیر بر روی تولید لیپید است.

جدول ۶- نتایج L16 برای سویه یارویا لیپولیتیکا ۷۰۵۶۲ DSM

آزمایش ها	تولید لیپید (g/L)	بیومس خشک (g/L)	درصدتولید لیپید	راندمان رشد	راندمان تولید لیپید
۱	۴/۲۵	۱۲/۹۵	۳۲/۸	۲۵/۹۷	۹/۸
۲	۴/۸۹	۱۳/۹۳	۳۵/۱	۲۵/۴۹	۸/۹۵
۳	۷/۳۵	۱۵/۹	۴۶/۲۱	۱۹/۱۲	۸/۸۳
۴	۳/۲۵	۱۰/۷۶	۳۰/۲	۲۹/۱۹	۸/۸۱
۵	۲/۶۹	۹/۲۷	۲۹	۲۹/۲۸	۸/۴۹
۶	۴/۴۱	۱۳/۶۵	۳۲/۳	۲۷/۲	۸/۷۹
۷	۴/۶۲	۱۳/۸۳	۳۳/۴	۲۶/۶۸	۸/۹۱
۸	۲/۵۱	۸/۸۳	۲۸/۴	۳۰/۰۹	۸/۵۵
۹	۲/۴۸	۹/۱	۲۷/۲۵	۳۲/۱۵	۸/۷۶
۱۰	۳/۷۸	۱۲/۰۳	۳۱/۴	۲۷/۷۵	۸/۷۲
۱۱	۴/۱۵	۱۱/۷۸	۳۵/۲	۲۴/۵۴	۸/۶۴
۱۲	۳/۶۹	۱۱/۸۴	۳۱/۱۴	۲۷/۸۵	۸/۶۸
۱۳	۵/۲۵	۱۵/۳۵	۳۴/۱۸	۲۵/۷۹	۸/۸۲
۱۴	۴/۶۵	۱۳/۸۸	۳۳/۵	۲۶/۲۸	۸/۸
۱۵	۵/۱۲	۱۴/۷۵	۳۴/۷	۲۵/۶	۸/۸۸
۱۶	۳/۸۱	۱۱/۸۵	۳۲/۱۵	۲۷/۰۵	۸/۶۹

جدول ۷- نتایج L16 برای سویه BL

آزمایش ها	تولید لیپید (g/L)	بیومس خشک (g/L)	درصد تولید لیپید	راندمان رشد	راندمان تولید لیپید
۱	۱/۷۸	۸/۰۹	۲۲	۲۷/۴۲	۶/۰۳
۲	۳/۹۳	۱۵/۸۴	۲۴/۸	۲۳/۹۲	۵/۹۳
۳	۳/۷۸	۱۵/۴۲	۲۴/۵	۲۴/۷۱	۶/۰۵
۴	۲/۱۸	۹/۶۸	۲۲/۵	۲۴/۰۱	۵/۴
۵	۰/۵	۲/۵	۲۰	۲۵	۵
۶	۱/۰۱	۴/۸	۲۱	۲۸/۰۷	۵/۹
۷	۳/۹۸	۱۵/۹۸	۲۴/۹	۲۴/۵۱	۶/۱
۸	۳/۰۴	۱۲/۶۶	۲۴	۲۵/۲۳	۶/۰۶
۹	۰/۷۸	۳/۸۲	۲۰/۴	۲۲/۰۸	۴/۵
۱۰	۱/۰۲	۴/۸۵	۲۱	۲۶/۳۵	۵/۵۴
۱۱	۵/۳۵	۲۰/۵۷	۲۶	۲۳/۲۴	۶/۰۴
۱۲	۱/۱۵	۵/۳۲	۲۱/۶	۲۸/۰۴	۶/۰۶
۱۳	۱/۶۷	۷/۶۶	۲۱/۸	۲۶/۸۷	۵/۸۵
۱۴	۱/۱۱	۵/۱۶	۲۱/۵	۲۶/۴۶	۵/۶۹
۱۵	۴/۱۳	۱۶/۵۲	۲۵	۲۳/۷۶	۵/۹۴
۱۶	۳/۰۸	۱۲/۷۸	۲۴/۱	۲۴/۳۴	۵/۸۶

نتایج ANOVA (آنالیز واریانس) در جدول ۸ و ۹ برای هر دو سویه نشان داده شده است. ستون آخر در جدول آنالیز واریانس درصد تاثیر هر یک از عوامل را بر روی میزان تولید لیپید نشان می دهد. نتایج آنالیز واریانس در مورد یارویا لیپولیتیکا 70562 DSM نشان می دهد که کربن، نیتروژن و پس از آن مدت زمان بیشترین تاثیر را بر روی میزان تولید لیپید دارند. به همین ترتیب کربن و نیتروژن دارای بیشترین مجموع مربعات خالص هستند. خطای آزمایش نیز بسیار ناچیز است. با توجه به جدول آنالیز واریانس و جدول اثر متقابل در کنار هم متوجه می شویم عاملی که به تنهایی می تواند اثر کمی داشته باشد، در رابطه با سایر عوامل می تواند دارای اثر قابل توجهی باشد.

جدول ۸- نتایج ANOVA برای سویه یارویا لیپولیتیکا۷۰۵۶۲ DSM

عامل	درجه آزادی	مجموع مربعات (S)	واریانس	نسبت F	مجموع خالص مربعات (S´)	درصد تاثیر عامل
نیتروژن	۲	۶/۵۵۵	۳/۲۷۷	۶۲/۵۸۵	۶/۴۵	۲۸/۸۵۶
کربن	۳	۹/۴۰۶	۳/۱۳۵	۵۹/۸۶۴	۹/۲۴۸	۴۱/۳۷۲
دما	۱	۰/۰۴۸	۰/۰۴۸	۰/۹۲۴	۰	۰
مدت زمان	۳	۵/۴۳۲	۱/۸۱	۳۴/۵۷۶	۵/۲۷۵	۲۳/۵۹۸
pH	۳	۰/۸۰۱	۰/۲۶۷	۵/۱۰۱	۰/۶۴۴	۲/۸۸۲
هوادهی	۱	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۱۲۲	۰	۰
اثرعوامل محیطی (خطا)	۲	۰/۱۰۴	۰/۰۵۲	-----	-----	۳/۲۹۲
مجموع	۱۵	۲۲/۳۵۵	-----	-----	-----	۱۰۰

جدول ۹- نتایج ANOVA برای سویه BL

عامل	درجه آزادی	مجموع مربعات (S)	واریانس	نسبت F	مجموع خالص مربعات (S´)	درصد تاثیر عامل
نیتروژن	۲	۱/۴۶۴	۰/۷۳۲	۲/۸	۰/۹۴۱	۲/۸۰۵
کربن	۳	۲۲/۱۲۶	۷/۳۷۵	۲۸/۲۰۸	۲۱/۳۴۲	۶۳/۵۷۲
دما	۱	۰/۷۰۹	۰/۷۰۹	۲/۷۱۴	۰/۴۴۸	۱/۳۳۵
مدت زمان	۳	۲/۲۵۳	۰/۷۵۱	۲/۸۷۳	۱/۴۶۹	۴/۳۷۷
pH	۳	۶/۳۷۶	۲/۱۲۵	۸/۱۲۸	۵/۵۹۱	۱۶/۶۵۶
هوادهی	۱	۰/۱۱۷	۰/۱۱۷	۰/۴۴۸	۰	۰
اثرعوامل محیطی (خطا)	۲	۰/۵۲۲	۰/۲۶۱	-----	-----	۱۱/۲۵۵
مجموع	۱۵	۳۳/۵۷۱	-----	-----	-----	۱۰۰

علاوه بر این که تاگوچی تعداد آزمایشات را محدود می کند، مزیت های دیگری مثل بررسی تاثیر متقابل بین عوامل و واریانس خطا را دارد. واریانس خطا تحت عنوان فاکتور pool مطرح می شود و فاکتورهایی که دارای تاثیر کمتر از ۱۰٪ هستند، حذف می شوند. این موضوع از لحاظ اقتصادی اهمیت دارد. جدول ۱۰ تاثیر متقابل فاکتورهای مختلف برای سویه بهتر یعنی یارویا لیپولیتیکا DSM 70562 را نشان می دهد. با دقت در جدول تاثیر متقابل فاکتورهای مختلف به نتایج قابل توجهی دست می یابیم. فاکتور pH به تنهایی دارای تاثیر زیادی نیست(۲/۸۸٪) اما این فاکتور در رابطه با منبع نیتروژن دارای بیشترین تاثیر است. همچنین فاکتور هوادهی بدون تاثیر است اما این فاکتور در رابطه با pH ۴۳/۳۹٪ موثر است. فاکتور دما نیز به همین ترتیب در رابطه با سایر فاکتور ها دارای درصد تاثیر قابل توجهی شده است. بنابر این چنانچه مطالعه ی یک عامل در روند بهینه سازی مورد نظر باشد توجه به تاثیر متقابل آن با سایر فاکتورها دارای اهمیت است.

جدول ۱۰- تاثیر متقابل عوامل مختلف

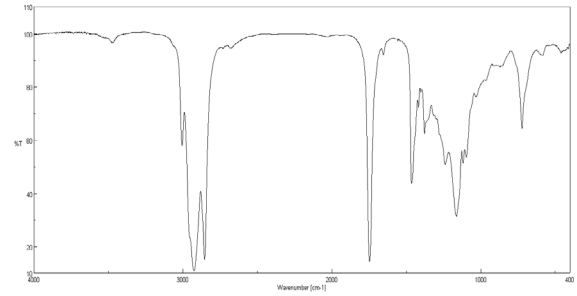
Interacting Factor Pairs	SI(%)	Opt
Nitrogen ×pH	۴۴/۰۳	(۳و۱)
pH ×Rpm	۴۳/۳۹	(۱و۳)
Nitrogen ×Time	۳۲	(۳و۱)
Carbon ×Time	۲۹/۵۶	(۳و۳)
Temperature × pH	۲۴/۱۶	(۳و۲)
Nitrogen ×Carbon	۲۲/۶۳	(۳و۱)
Time ×pH	۲۰/۶۳	(۳و۳)
Nitrogen ×Rpm	۱۷/۱۳	(۱و۱)
Rpm×Carbon	۱۵/۴۴	(۱و۳)
Nitrogen× Temperature	۱۴/۸۴	(۲و۱)
Carbon× Temperature	۱۳/۳۶	(۲و۳)
Temperature ×Time	۱۱/۷۲	(۳و۲)
Temperature ×Rpm	۱۱/۶۶	(۱و۲)

شاخص شدت اینتراکشن برای پارامترهای مختلف =SI

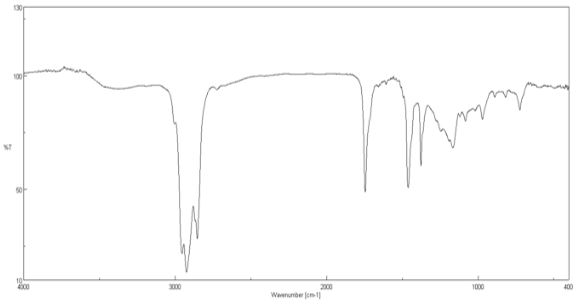
نشان دهنده ی سطوح مطلوب فاکتور ها برای شرایط بهینه سازی = Opt

بررسی و تایید روغن تک یاخته با تکنیک FTIR Spectroscopy:

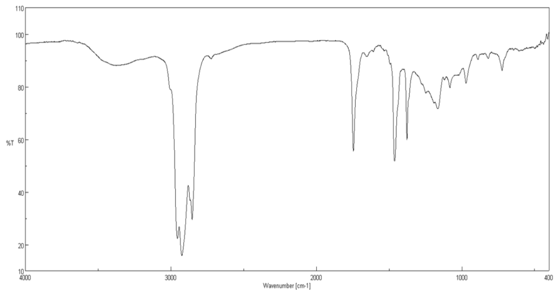
گراف های حاصل از نمونه روغن شاهد (تری اولئین استاندارد)، روغن تولیدی مخمر یارویا لیپولیتیکا DSM 70562 و ژئوتریکوم BL در شکل های شماره ۱ ،۲و ۳ نشان داده شده است. همانطور که مقایسه دو گراف نشان می دهد، تشابه قابل توجهی بین روغن جداسازی شده از سویه مخمری و استاندارد مربوطه مشاهده می گردد. در نقاط بین 1670 تا $1820\ cm^{-1}$ (نوک پیک در $1745\ cm^{-1}$) پیک قابل توجهی ایجاد شده است که نشان دهنده حضور گروه های کربونیل است. در حد فاصل بین 2850 تا $2929\ cm^{-1}$ نیز پیک های مشخص نشان دهنده گروه های متیلن می باشد. تمامی پیک ها در نقاط قید شده اثبات کننده نوع روغن قابل تبدیل به بیودیزل است(۵ ،۱۱،۶). بررسی و تایید ترکیب بیودیزل به صورت یک متود شناسایی در استاندارد اروپایی به شماره EN 14078 آورده شده است (۶). از تکنیک FTIR جهت بررسی و تایید بیودیزل تولید شده توسط میکروجلبک *Chlorella vulgaris* و *Senedesmis sp.* استفاده شده است (۵).



شکل ۱- گراف FTIR مربوط به استاندارد تری اولئین



شکل ۲- گراف FTIR مربوط به روغن تک یاخته تولیدی توسط مخمر یارویا لیپولیتیکا



شکل ۳- گراف FTIR مربوط به روغن تک یاخته تولیدی توسط مخمر ژئوتریکوم Bl

بحث

Kraisintu و همکارانش در سال ۲۰۱۰ اثر عوامل مختلف بر روی میزان تولید لیپید در مخمر رودوسپوریدیوم تورولوئیدس را به صورت روش یک عامل در یک زمان (روش تک فاکتوره) بررسی کردند. میزان بهینه برای تولید لیپید در این مخمر به صورت ۷۰ g/L گلوکز، ۰/۷۵ g/L عصاره مخمر، ۰/۵۵ g/L سولفات آمونیوم، ۰/۴ g/L فسفات دی هیدروژن پتاسیم و g/L ۲ سولفات منیزیم در pH =۵/۵ بوده که در این حالت میزان لیپید تولید شده به ۹/۲۶ g/L رسیده است (۱۰). روش تک فاکتوره باعث افزایش تعداد آزمایشات و صرف وقت بیشتری می گردد. در صورتی که با به کارگیری روش تاگوچی علاوه بر غلبه بر این مشکلات نتایج دقیق تری نیز حاصل می گردد؛ به همین دلیل ما در این مطالعه از روش تاگوچی استفاده کردیم. Papanikoluou و همکارانش در سال ۲۰۰۱ با کشت یارویا لیپولیتیکا بر روی یک چربی صنعتی که متشکل از اسیدهای چرب اشباع (استئارین) بود به میزان تولید معادل ۱۲ g/L-۹ بیومس خشک و ۰/۵۴ g – ۰/۴۴ لیپید به ازای هر گرم بیومس رسیدند (۱۵). میزان تولید بیومس خشک و لیپید در مورد یارویا لیپولیتیکا DSM 70562 بر روی منبع گلیسرول به ترتیب g/L ۱۴/۴۵ و ۴/۴۹ g/L به دست آمد. این مخمر بر روی گلوکز در شرایط بهینه به میزان تولید لیپید معادل ۷/۳۵ g/L دست یافت که مقدار قابل توجهی است. تاکنون نتایج متفاوتی در مورد بهینه سازی تولید لیپید توسط محققین مختلف گزارش شده است که در اکثر آن ها علت این تفاوت ها نوع سویه و یا منبع کربن مورد استفاده مطرح شده است. اما علاوه بر این میانکنش عوامل مختلف با یکدیگر نیز می تواند باعث تفاوت در نتایج شود. به همین دلیل در این تحقیق از روش آماری تاگوچی بهره گرفته شد تا ضمن به حداقل رساندن اثر عوامل محیطی، بتوان میانکنش بین عوامل مختلف را نیز بررسی کرد. نکته بسیار مهم در مورد تاثیر میانکنش ها این است که عواملی می توانند اثر خود را بیشتر نشان دهند که دارای کمترین برهمکنش با سایر عوامل باشند؛ یعنی عواملی که کمترین تاثیر را نشان می دهند به گونه ای دارای بیشترین برهمکنش با سایر عوامل هستند. روش تاگوچی باعث کاهش تغییر کیفیت در اثر وجود عوامل غیر قابل کنترل می شود. این روش بدون این که عوامل غیر قابل کنترل را حذف کند، می تواند از طریق تنظیم سطوح و کنترل سایر عوامل اثر آن ها را به حداقل برساند. علاوه بر این روش تاگوچی تعداد آزمایش های مورد نیاز را نیز تا حد زیادی محدود می کند. مطرح شدن روش های آماری در طراحی آزمایش اولین بار توسط رونالد فیشر صورت پذیرفت که تحلیل واریانس را به عنوان یک روش اولیه تحلیل آماری توسعه داد. طراحی آزمایش ها در سال های اخیر در بسیاری از صنایع مورد توجه زیادی قرار گرفته است. کاربرد طراحی آزمایش ها مثل روش تاگوچی منجر به افزایش میزان بازدهی، کاهش هزینه، صرف زمان کمتر، کاهش قابلیت تغییر و انطباق بیشتر نسبت به مقادیر مورد انتظار می شود.

یارویا لیپولیتیکا DSM 70562 به عنوان سویه مولد چربی با میزان تولید لیپید، بیومس خشک و درصد تولید به ترتیب ۷/۳۵ g/L ، ۱۵/۹ g/L و ۴۶/۲۱٪ در شرایط بهینه می باشد. سویه ی بومی ژئوتریکوم BL نیز تحت شرایط بهینه دارای بیشترین میزان تولید لیپید، بیومس خشک و درصد تولید به ترتیب ۵/g/L۳۵ ، ۲۰/۵۷ g/L و ۲۶٪ می باشد. آنالیز FTIR Spectroscopy وجود ترکیبات روغنی استخراج شده را تایید نموده و طراحی تاگوچی نیز فرایند بهینه سازی را به بهترین شکل ممکن هدایت کرد. تولید لیپید توسط این سویه ها، نوید بخش تامین لیپید مورد نیاز برای مصارف صنعتی از مخمرهای مولد چربی می باشد.

سپاسگزاری

از واحد پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان که در انجام این پروژه ما را حمایت نمودند، سپاسگذاریم.

منابع

1-Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, Lucia MD, Leonardy A, Rossi M. Production of Single cell oil by the cold adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* AS 4.7: effects of the growth temperature and the C:N ratio. Microbial Cell Factoties, 2010; 110-115.

2-Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, Lucia MD, Leonardi A, Rossi M. Single cell oil of cold adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. Microbial Cell Factoties, 2010; 23: 59-73.

3- Banakar AV, Kumar AR, Zinjarde SS. Environmental and industrial applications of yarrowia lipolytica. Appl microbiol biotecnol, 2009; 84:847-865.

4- El-Fadaly H, El-Ahmady N, Marvan EM. Single cell oil production by an oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium. Research Journal of Microbiology, 2009; 4(8):301-313.

5-Elumalai S, Sakthivel R, Ganesh Kumar S. Ultra Structural and Analytical Studies of Biodiesel Producing Microalgae (Chlorella vulgaris and Senedesmis sp.) Collected from Tamil Nadu India. Current Botany, 2011; 2(6): 19-25.

6- European Standard EN 14078: Liquid petroleum products –Determination of fatty acid methyl esters (FAME) in middle distillates – Infrared spectroscopy method.

7- Fidler N, Koletzho B, Sauerwald TU. Single cell oil production and application. Germany, 1999; 37-45.

8-Gill CO, Hall MJ, Ratledge C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast(Candida 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. Applied And Environmental Microbiology, 1997; 33(2): 231-239.

9- Kosa M, Ragauskas AJ. Lipids from heterotrophic microbes:advances in metabolism research. Trends Biotechnol, 2010; 29(2):53-61.

10-Kraisintu P, Yongmanitchai W, Limtong S. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rdodosporidium toruloides* DMKU3-TK16, Nat. Sci. Kasetsart university, 2010; 44:436-445.

11- Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Grasselil JG. The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. Academic Press, Inc. United Kingdom. 1991; p. 141.

12- Manuel Ageitos J, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. Oily yeasts as oleaginous cell factories. Appl Microbiol Biotechnol, 2011; 4-5.

13-Meester PAEP, Huijberts GNM, Eggink G. High-cell-density of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. Appl Microbial Biotechnol, 1996; 45: 575-579.

14-Pan LX, Yang DF, Shao L, Li W, Chen GG, Liang ZQ. Isolation of oleaginous yeast from the soil and studies of their lipid-producing capacities. ISSN, Food technol.Biotechnol, 2009; 47(2): 215-220.

15-Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, Marc I, Aggelis G. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch *cultures*. Appl Microbial Biotechnol, 2001; 58:308-312.

16-Sabirova JS, Haddouche R, Van Bogaert IN, Mulua F, Verstraete W, Timmis KN, Schmidt-Dannert C, Nicaud JM, Soetaert W. The lipo yeasts project: using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* in combination with specific bacterial genes for the bioconversion of lipid, fats and oil in to high-value products. Microbial Biotechnology, 2010; 10: 1751-1759.

17-Saxena V, Sharma CD, Bhagat SD, Saini VS, Adhikari DK. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta,* Indian institute of petroleum, 1998; 501-505.

18-Wynn PJ, Ratledge C. Oils from microorganisms, Martek Bioscience Corporation, Columbia, 2005; 121-153.

19-Yazdani SS, Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. ScienceDirect, 2007; 18: 213-219.

20- Zhao X, Wu S, Hu C, Wang Q, Hua Y, Zhao KZ. Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodosporidium toruloides* Y4. Microbial Biotechnol, 2010; 37:581-585.

21-Zlatanov M, Pavlova K, Grigorova D. lipid composition of some yeast strains from livingston island, Antarctica. Folia Microbiol, 2001; 46: 402-406.