تولید روغن غنی از اسیدهای چرب سری امگا توسط مخمرهای مولد چربی و میزان تاثیر پارامترهای مختلف بر فرایند تولید

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

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲۱)

چکیده

کاربرد لیپید میکروبی به عنوان منبع جایگزین روغن در سال های ابتدایی قرن ۲۰ مورد توجه قرار گرفت. تولید میکروبی روغن های غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع ضروری (سری امگا) یکی از جنبه های مهم تولید روغن تک یاخته است. با توسعه ی فرایند های تکنیکی- اقتصادی و بهینه سازی فرایند تولید، می توان بازده لیپید میکروبی را در مقیاس بالا تامین کرد. در این پژوهش دو سویه ی مخمری استاندارد و چهار سویه ی بومی از نظر پتانسیل تولید لیپید مورد ارزیابی قرار گرفتند. بهینه سازی تولید لیپید در این سویه ها با استفاده از روش طراحی آزمایش ها صورت گرفت و عوامل موثر بر تولید لیپید در این سویه ها مورد مقایسه قرار گرفتند. آنالیز روغن به دست آمده با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی – اسپکترومتری توده ای (GC-MS) انجام شد. در بین سویه های استاندارد *یاروویا لیپولیتیکا* DSM8218 و در بین سویه های بومی *کریپتوکوکوس آلبیدوس* دارای بیشترین میزان تولید لیپید، به ترتیب معادل ۷/۶۵ g/L و ۱۱/۸۱ g/L بودند. آنالیز ترکیب لیپیدی به دست آمده با روش های مورد استفاده، شباهت آن را به روغن های گیاهی نشان داده و علاوه بر آن پتانسیل کاربرد آن را در صنایع غذایی مورد تایید قرار می دهد. کاربرد برنامه ی تاگوچی در زمینه ی بهینه سازی تولید لیپید میکروبی بسیار موثر بوده و باعث افزایش تولید قابل توجهی در سویه های مورد بررسی گردید. این لیپیدها قابلیت کاربرد در صنایع غذایی و دارویی را دارند.

کلید واژگان: صنایع غذایی، روغن تک یاخته، تری آسیل گلیسرول

*مسئول مکاتبات: m_enshaeieh@yahoo.com

۱- مقدمه

لیپیدهای سنتز شده توسط میکروارگانیسم ها در صنایع غذایی و دارویی قابلیت کاربرد دارند. این روغن ها توانایی جایگزین شدن برای لیپیدهای غذایی و استریفیکاسیون داخلی را دارند. علاوه بر آن از نظر نوع و ترکیب به روغن به دست آمده از گیاهان و حیوانات مشابهند. اهمیت غذایی آن ها وجود اسیدهای چرب غیر اشباع چند زنجیره و بلند زنجیره می باشد. میکروارگانیسم های مولد این لیپید ها اخیراً اهمیت زیادی یافته اند زیرا منبع تولید اسید های چرب غیر اشباع محسوب می شوند(۱). مهم‌ترین جزء مخمرهای مولد چربی، تری‌آسیل‌گلیسرول (TAG) است که متشکل از اسیدهای چرب C_{16} و C_{18} با اهمیت غذایی می باشد. این ترکیب مشابه روغن‌های گیاهی مثل دانه انگور و روغن سویا است. اخیراً برای تهیه غذاهای مناسب برای سلامتی، روغن هایی با محتوای بالای اسیدهای چرب بلند زنجیر غیر اشباع و مقاوم در برابر اکسیداسیون، تولید می شوند(۲). آن چه در این بین اهمیت دارد کاهش هزینه تولید این روغن ها می باشد. این کار با استفاده از مواد لیگنوسلولزی موجود در طبیعت و علاوه بر آن بهینه سازی پروسه ی تولید قابل انجام است (۳). مواد آلی حاصل از کشاورزی از جمله ضایعاتی هستند که بازیافت آن ها از نظر اقتصادی و زیست محیطی حائز اهمیت است. از طرف دیگر بهینه سازی فرایند تولید نیز گامی موثر در جهت کاهش هزینه هاست(۸-٤).

تولید روغن با استفاده از میکروارگانیسم ها دارای مزایای زیادی می باشد: از جمله این مزایا، کوتاه بودن چرخه زندگی میکروارگانیسم ها، روش رشد و کشت آسان، عدم نیاز به زمین برای کشت آن ها بر خلاف گیاهان، عدم نیاز به نیروی انسانی (کارگر) در مقایسه با گیاهان و مشابهت فوق العاده پروفایل اسید های چرب آن ها به روغن های گیاهی می باشد(۱۱-۹). علاوه بر آن نسبت به گیاهان کمتر تحت تاثیر آب و هوا و شرایط فصلی قرار گرفته و امکان افزایش مقیاس آن ها وجود دارد(۱۲،۱۳). فاکتورهای متفاوت فیزیکی و شیمیایی بر میزان تولید لیپید در مخمرها موثر هستند که در این بین منبع کربنی و نسبت کربن به نیتروژن در میزان تجمع لیپید اهمیت به سزایی دارد(١٤). علاوه بر آن میکروارگانیسم هایی وجود دارند که دارای قابلیت تولید و تجمع لیپید به میزان بالا در سلول های خود می باشند. در بین آن ها مخمرها و قارچ ها توجه زیادی را به خود جلب کرده اند (۱۷-۱۵).

تشکیل ذرات لیپیدی در مخمرها با محدودیت نیتروژن شروع شده و تا زمانی که منبع کربن محیط شروع به کاهش کند، ادامه می یابد(۱۸). مسئله مهم در زمینه درخواست‌های بیوتکنولوژی تبدیل مواد لیپیدی ارزان و زیاد به محصولات با ارزش است. برای این منظور می‌توان از مخمرهای مولد چربی جهت تبدیل ترکیبات لیپیدی به استرهای مختلف، ترکیبات مشتق از ایزوپرنوئید، کاروتنوئید، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات و اسیدهای چرب هیدروکسیله‌ی آزاد استفاده کرد (۱۹). اسیدهای چرب غیر اشباع لینولئیک اسید($C_{18:2}$) و لینولنیک اسید ($C_{18:3}$) توسط بدن انسان ساخته نمی شوند، بنابراین از مواد غذایی به دست می آیند. لینولنیک اسید از انسداد عروق خونی جلوگیری می کند و لینولئیک اسید نیز دارای مزایای زیادی نظیر بهبود سرطان زایی، دیابت، چاقی و آرتروواسکلروزیس می باشد(۲،۲۰). نکته جالب در مورد TAG های میکروبی، بالا بودن میزان اسیدهای چرب غیر اشباع با ١٦و١٨ اتم کربن از سری ω است. این اسیدهای چرب شامل لینولئیک اسید، آلفا لینولئیک اسید، گاما لینولئیک اسید، اولئیک اسید، استئاریک اسید، پالمیتیک اسید، میریستیک اسید، آراشیدونیک اسید، ایکوزاپنتانوئیک اسید، دوکوزاپنتانوئیک اسید ودوکوزاهگزانوئیک اسید می باشند(۱۳،۲۱،۲۲).

مزیت میکروارگانیسم‌هایی که به صورت وسیع در سیستم‌های بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل تولید طیف وسیعی از محصولات بیوتکنولوژی، سرعت رشد بالا و امکان ایجاد جهش تصادفی در آن‌ها جهت افزایش محصولات می‌باشد. آن‌ها می‌توانند تولید سریع‌تر و ایمن‌تری داشته باشند و دارای محصولات با کیفیت تضمین شده هستند. علاوه بر آن بهترین سیستم‌های کنترل شده‌ی زنده می باشند(۲۳). روغن‌های میکروبی کاملاً ایمن و غیر سمی بوده و مشکل خاصی در زمینه استخراج روغن از آن‌ها وجود ندارد. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این زمینه غیرپاتوژن و غیرآلوده بوده و استفاده از آن‌ها حتی در غذای نوزادان دارای امنیت است. طی بررسی ها به این نتیجه رسیده اند که استفاده از SCO به اندازه ی استفاده از روغن آفتابگردان دارای امنیت است. به این ترتیب مطالعات زیادی در کشورهای مختلف و توسط محققین بر روی این مخمرها و نحوه تولید در آن‌ها و همچنین پارامترهای موثر بر روی میزان تولید لیپید، انجام شده است. روغن های میکروبی در مقیاس بسیار زیاد قابل تولید بوده و به صورت ذاتی ایمن هستند و آزمایش سمیت را گذارنده اند (۲۳).

آن چه در این پژوهش حایز اهمیت است انتخاب سویه های مخمری بومی و استاندارد جهت بررسی تولید لیپید و بهینه سازی پارامترهای موثر بر تولید می باشد. در این تحقیق قابلیت بالای این سویه های مخمری و امکان افزایش تولید با بهینه سازی پارامترهای موثر، ارزیابی گردید و امکان کاربرد این مخمرها در زمینه های مختلف صنعتی نشان داده شد. برای این منظور از روش طراحی آزمایش ها (روش تاگوچی) استفاده شد تا امکان بررسی همزمان کلیه ی عوامل و مقایسه ی نحوه عملکرد سویه های مختلف مخمری فراهم گردد. همچنین ترکیب اسیدهای چرب موجود در این مخمر ها بررسی و مورد مقایسه قرار گرفت تا پتانسیل کاربرد روغن به دست آمده در زمینه های مختلف صنعتی مشخص گردد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- سویه های مخمری

سویه ها ی مخمری مورد استفاده در این تحقیق شامل *یاروئیا لیپولیتیکا* DSM8218 و *یاروئیا لیپولیتیکا* DSM70562 به عنوان سویه های استاندارد و *رودوتورولا موسیلاژینوزا*، *کریپتوکوکوس آلبیدوس*، *کاندیدا پالمی اولئوفیلا* و *ژئوتریکوم* ۱۱۰ به عنوان سویه های بومی بود.

۲-۲- 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 محیط پیش تولید، منتقل گردیدند. این محیط دارای ۱۵ g/L گلوکز، ۵ g/L $(NH_4)_2SO_4$، ۱ g/L KH_2PO_4، ۰/۵ g/L $MgSO_4.7H_2O$ و ۰/۵ g/L عصاره مخمر با pH= ۵ بوده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸°C و ۱۵۰rpm قرار گرفت(۲۴).

۲-۳- تهیه محیط تولید

۵ میلی لیتر از مایه تلقیح به ۴۵ میلی لیتر از محیط تولید انتقال داده شد، این محیط دارای ۴۰ g/L گلوکز، ۱/۵ g/L $(NH_4)_2SO_4$، ۵ g/L KH_2PO_4، ۲ g/L NaH_2PO_4 ، ۱/۵ g/L $MgSO_4.7H_2O$ و ۱ g/L عصاره مخمر با pH= ۶ بوده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸°C و ۱۸۰rpm کشت داده شد(۲۴).

۲-۴- بررسی تولید روغن مخمری با تکنیک (Fourier Transform Infrared) FTIR Spectroscopy

یکی از تکنیک هایی که جهت تایید نوع ترکیب یک محصول به کار گرفته می شود تکنیک FTIR Spectroscopy می باشد و اصول این روش ایجاد پیک در دامنه خاصی از طیف ایجاد شده بر اساس واحد cm^{-1} می باشد. تولید لیپید در سویه مخمری جداسازی شده با کمک تکنیک FTIR Spectroscopy، با استفاده از دستگاه مدل JASCO FT/IR-6300, Japan آنالیزگردید. گستره مورد بررسی دستگاه ازcm^{-1} 400 تا cm^{-1} 4000 تنظیم شد. استاندارد تری اولئین (خریداری شده از شرکت سیگما آلدریچ- آلمان) به عنوان شاهد و برای مقایسه با روغن تولیدی مورد استفاده قرار گرفت (۲۷-۲۵).

۲-۵- آنالیز با کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده ای (GC-MS)

در ابتدا ترانس استریفیکاسیون با استفاده از سولفوریک اسید به عنوان کاتالیزور با نسبت ۸۰٪ وزن روغن مورد استفاده و متانول با نسبت ۱: ۳۰ در دمای ۶۰ °C به مدت ۵/۵ ساعت در rpm ۷۰ صورت گرفت. روغن استریفیه شده در فاز بالایی بوده که با کمک پترولیوم اتر جداسازی شد(۳۰-۲۸). پس از آن آنالیز با استفاده از GC-MS (HP 5972 mass selective detector, serie II gas chromatography, Hp) انجام گرفت.

۲-۶- تعیین میزان لیپید و بیومس سلولی

به منظور تعیین میزان لیپید، استخراج به روش Bligh & Dyer صورت گرفت. برای این منظور ۵۰ ml از نمونه محیط تولید در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آن بیومس به دست آمده دو مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. سپس به میزان ۱۰ ml، ۴ HCL مولار به نمونه مورد نظر اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ °C قرار داده شد. سپس به توده ی هیدرولیز شده با اسید، به میزان ۲۰ml 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 شدند. فاز آلی پایینی با کمک پیپت پاستور جدا گردیده و در خلا با دستگاه دسیکاتور خشک شد. حلال مورد نظر به علت فرار

بودن کاملاً خارج می شود ضمن اینکه در GC-MS نیز هیچ اثری از وجود آن مشاهده نشد. وزن خشک به دست آمده میزان لیپید تولید شده را نشان می دهد.

به منظور تعیین بیومس خشک سلول نیز 5ml از محیط تولید در 5000rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از شستشو با آب برای دو مرتبه، در آون ^{o}C ۸۰ قرار داده تا به وزن ثابت رسیده و خشک شود. پس از آن بیومس خشک شده وزن گردید(۳۱).

۲-۷- تعیین میزان تولید لیپید و بررسی سوپرناتانت برای محاسبه قند مصرف شده

به منظور تعیین درصد تولید لیپید از فرمول زیر استفاده شد:

۱۰۰× بیومس خشک/ وزن روغن استخراج شده = در صد تولید لیپید (محتوای لیپیدی)

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(۲۱).

۲-۸- بهینه سازی تولید لیپید به روش تاگوچی

در این روش با کمک نرم افزار Qualitek-4 در ابتدا برنامه ریزی برای طراحی آزمایش ها صورت گرفت. برای میزان دما و هوادهی ۲ سطح، میزان نیتروژن ۳ سطح و میزان گلوکز، pH و مدت زمان انکوباسیون ٤ سطح در نظر گرفته شد. بر این اساس طراحی L16 توسط نرم افزار انتخاب گردید. بدین معنی که با ١٦ آزمایش برنامه ریزی شده، بهترین شرایط به دست می آید. چنانچه حالت بهینه در بین ١٦ آزمایش انجام شده نباشد باز هم توسط نرم افزار بهترین حالت انتخاب می گردد و مقدار تولید در شرایط بهینه توسط نرم افزار پیش بینی می گردد. جدول ۱ طراحی L16 را نشان می دهد(۳۲).

جدول ۱ طراحی L16 تاگوچی برای بهینه سازی تولید لیپید

آرایه ها	نیتروژن(g/l)	کربن(g/l)	دما (°C)	مدت زمان (h)	pH	rpm(round/min)
آرایه ی ۱	۰/۵	۵۵	۲۵	٢٤	۵	۱۵۰
آرایه ی ۲	۰/۵	۷۵	۲۵	٤٨	۵/۵	۲۰۰
آرایه ی ۳	۰/۵	۹۵	۳۵	۷۲	٦	۱۵۰
آرایه ی ٤	۰/۵	۱۱۵	۳۵	۹٦	٦/۵	۲۰۰
آرایه ی ۵	۱	۵۵	۲۵	۹٦	٦	۲۰۰
آرایه ی ٦	۱	۷۵	۲۵	۷۲	٦/۵	۱۵۰
آرایه ی ۷	۱	۹۵	۳۵	٤٨	۵	۲۰۰
آرایه ی ۸	۱	۱۱۵	۳۵	٢٤	۵/۵	۱۵۰
آرایه ی ۹	۱/۵	۵۵	۳۵	٤٨	٦/۵	۱۵۰
آرایه ی۱۰	۱/۵	۷۵	۳۵	٢٤	٦	۲۰۰
آرایه ی۱۱	۱/۵	۹۵	۲۵	۹٦	۵/۵	۱۵۰
آرایه ی۱۲	۱/۵	۱۱۵	۲۵	۷۲	۵	۲۰۰
آرایه ی۱۳	۰/۵	۵۵	۳۵	۷۲	۵/۵	۲۰۰
آرایه ی۱٤	۰/۵	۷۵	۳۵	۹٦	۵	۱۵۰
آرایه ی۱۵	۰/۵	۹۵	۲۵	٢٤	٦/۵	۲۰۰
آرایه ی١٦	۰/۵	۱۱۵	۲۵	٤٨	٦	۱۵۰

۳- نتایج و بحث

۳-۱- میزان تولید لیپید قبل از بهینه سازی

جدول ۲ میزان تولید لیپید در سویه های مخمری را قبل از انجام بهینه سازی نشان می دهد.

جدول ۲ نتایج حاصل از تولید لیپید در محیط فقیر ازت

سویه های مخمری	میزان تولید لیپید(g/L)	بیومس خشک (CDW) (g/L)	درصد تولید لیپید
یاروویا لیپولیتیکا DSM8218	٤/٢١	١٣/٢٨	٣١/٧
یاروویا لیپولیتیکا DSM70562	٤/٤١	١٣/٨٦	٣١/٨١
رودوتورولا موسیلاژینوزا	٦/١٧	١٧/٨٢	٣٤/٦٢
کریپتوکوکوس آلبیدوس	٥/٨٣	١٦/٤	٣٥/٥٤
کاندیدا پالمی اولئوفیلا	٤/٩٥	١٨/٣	٢٨/٦
ژئوتریکوم ١١٠	٤/١٣	١٦/٢٤	٢٥/٤٣

CDW: Cell Dry Weight

۳-۲- نتایج مرتبط با بهینه سازی

بهینه سازی طبق روش تاگوچی انجام شد. نتایج حاصل از تولید لیپید در ١٦ حالت مورد بررسی در جدول ٣ نشان داده شده است. جدول ٤ درصد تولید لیپید (محتوای لیپیدی) در حالت های مختلف در برنامه ی تاگوچی را نشان می دهد. علاوه بر آن در جدول ٥ بهترین راندمان رشد و تولید لیپید در مورد سویه های مورد بررسی نشان داده شده است.

جدول ۳ نتایج تولید لیپید (g/L) در ١٦ آرایه ی مختلف در سویه های مخمری مورد بررسی

آرایه ها	*یاروویا لیپولیتیکا* DSM8218	*یاروویا لیپولیتیکا* DSM70562	*رودوتورولا موسیلاژینوزا*	*کریپتوکوکوس آلبیدوس*	*کاندیدا پالمی اولئوفیلا*	*ژئوتریکوم ١١٠*
آرایه ی ١	٣/٧٨	٤/٢٥	٤/١٥	٤/٣٢	٤/٦١	١/٧٨
آرایه ی ٢	٤/٢٢	٤/٨٩	٥/٩٨	٦/١٦	٤/٨١	٣/٩٣
آرایه ی ٣	٦/٧١	٧/٣٥	٥/١٢	٥/٠٥	٥/١٥	٣/٧٨
آرایه ی ٤	٢/٦٨	٣/٢٥	٤/٨٣	٣/٦٣	٢/٥٨	٢/١٨
آرایه ی ٥	٢/١٧	٢/٦٩	٥/٨٢	٥/٧٢	٤/٣٥	٠/٥
آرایه ی ٦	٣/٨١	٤/٤١	١٠/٩٧	١١/٨١	٤/٨٦	١/٠١
آرایه ی ٧	٤/٠١	٤/٦٢	٤/١٣	٣/٩٨	٥/٣٥	٣/٩٨
آرایه ی ٨	٢/٠١	٢/٥١	٥/١٦	٤/٩٥	٣/٥٢	٣/٠٤
آرایه ی ٩	١/٩٨	٢/٤٨	٥/١	٥/٥١	٣/١٢	٠/٧٨
آرایه ی١٠	٣/١٨	٣/٧٨	٤/٠١	٣/٧٧	٥/٠٣	١/٠٢
آرایه ی١١	٣/٦٥	٤/١٥	٦/٣٦	٦/٤١	٥/٤٤	٥/٣٥
آرایه ی١٢	٣/١٠	٣/٦٩	٦/١٤	٦/١٧	٤/٣١	١/١٥
آرایه ی١٣	٤/٤٥	٥/٢٥	٤/٠٣	٣/٨٠	٣/١١	١/٦٧
آرایه ی١٤	٤/٠١	٤/٦٥	٥/٨٩	٥/٨٤	٤/٨٨	١/١١
آرایه ی١٥	٤/٥٢	٥/١٢	٥/٣٤	٥/٢٦	٤/٩٧	٤/١٣
آرایه ی١٦	٣/٢٥	٣/٨١	٤/٧١	٤/٦٥	٤/٦٧	٣/٠٨

جدول ٤ نتایج محتوای لیپیدی (٪) در ١٦ آرایه ی مختلف در سویه های مخمری مورد بررسی

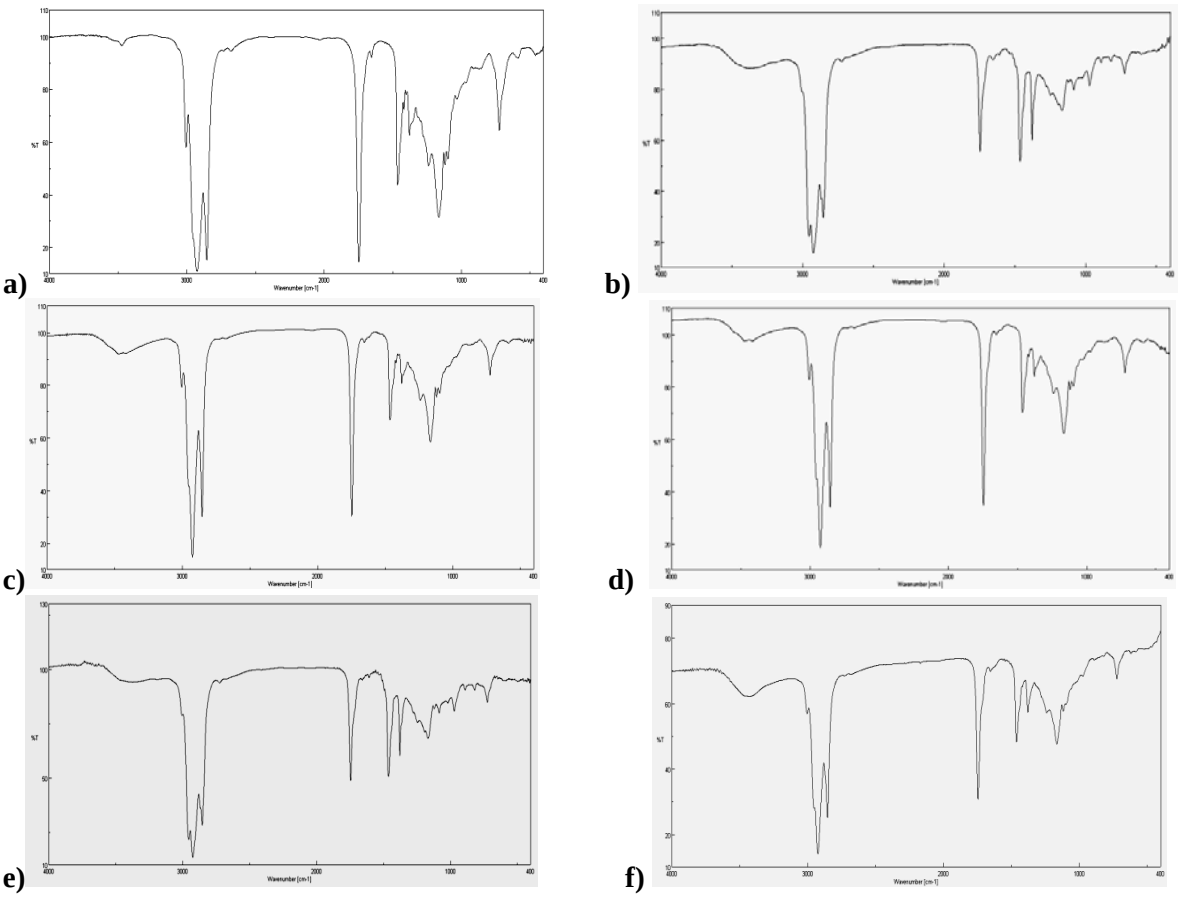
آرایه ها	*یاروویا لیپولیتیکا* DSM8218	*یاروویا لیپولیتیکا* DSM70562	رودوتورولا موسیلاژینوزا	کریپتوکوکوس آلبیدوس	کاندیدا پالمی اولئوفیلا	ژئوتریکوم ١١٠
آرایه ی ١	٣٠	٣٢/٨	٣١/٥	٣٣/٤	٣٢/١	٢٢
آرایه ی ٢	٣٢	٣٥/١	٣٥/٢	٣٧/١	٣٢/٨	٢٤/٨
آرایه ی ٣	٤٢	٤٦/٢١	٣٤/٤	٣٦/٤	٣٥	٢٤/٥
آرایه ی ٤	٢٨/٢	٣٠/٢	٣٢/٢	٣٤/١٥	٢٨/٥	٢٢/٥
آرایه ی ٥	٢٧/٨	٢٩	٣٥	٣٦/٨	٣١/٥	٢٠
آرایه ی ٦	٣٠/٣	٣٢/٣	٥٨/٢	٦٠/١	٣٢/٩	٢١
آرایه ی ٧	٣١/٨	٣٣/٤	٣١/٤٧	٣٣/٦٨	٣٤	٢٤/٩
آرایه ی ٨	٢٦/٢٥	٢٨/٤	٣٤/٥	٣٦/٢	٣٠/٨	٢٤
آرایه ی ٩	٢٥/١٥	٢٧/٢٥	٣٤/٣	٣٦/٠١	٣٠/٤	٢٠/٤
آرایه ی١٠	٢٩/٤	٣١/٤	٣١	٣٢/٧	٣٤/٢	٢١
آرایه ی١١	٣٣	٣٥/٢	٣٧/٨	٣٩/٢	٣٧/٨	٢٦
آرایه ی١٢	٢٩/١٣	٣١/١٤	٣٧	٣٩	٣١/٥	٢١/٦
آرایه ی١٣	٣٢/٤	٣٤/١٨	٣١/١٥	٣٢/٣٥	٣٠/٢٤	٢١/٨
آرایه ی١٤	٣١	٣٣/٥	٣٥	٣٦/١٥	٣٢/٩	٢١/٥
آرایه ی١٥	٣٢/٥	٣٤/٧	٣٤/٨	٣٥/٤	٣٣/١	٢٥
آرایه ی١٦	٢٩/٥	٣٢/١٥	٣٢/١	٣٤/١٨	٣٢/٥	٢٤/١

جدول ٥ نتایج مربوط به بهترین راندمان رشد وتولید لیپید در سویه های مورد بررسی

سویه ها	بهترین راندمان رشد	بهترین راندمان تولید لیپید
یاروویا لیپولیتیکا DSM8218	٣٤/٠١	٨/٨٩
یاروویا لیپولیتیکا DSM70562	٣٢/١٥	٩/٨
رودوتورولا موسیلاژینوزا	٤٣/٩	١٥/٠٢
کریپتوکوکوس آلبیدوس	٤٧/٨	١٥/٩٥
کاندیدا پالمی اولئوفیلا	٢٦/٥٩	٨/٥٣
ژئوتریکوم ١١٠	٢٨/٠٧	٦/٠٦

٣-٣- آنالیز لیپید تولید شده با تکنیک (Fourier Transform Infrared) FTIR Spectroscopy

گراف تری اولئین (به عنوان استاندارد) در شکل شماره ١(a) نشان داده شده است. مقایسه سایر گراف ها با گراف استاندارد تشابه قابل توجهی بین روغن جداسازی شده از سویه های مخمری و استاندارد مربوطه را نشان می دهد. در نقاط بین 1670 تا cm^{-1} 1820 (نوک پیک در cm^{-1} 1745) پیک قابل توجهی ایجاد شده است که نشان دهنده حضور گروه های کربونیل است. در حد فاصل بین 2850 تا cm^{-1} 2929 نیز پیک های مشخص نشان دهنده گروه های متیلن می باشد (٢٧-٢٥). بررسی و تایید ترکیب روغن ترانس استریفیه شده با FTIR به صورت یک متود شناسایی در استاندارد اروپایی به شماره EN 14078 آورده شده است (٢٦).



a) گراف FTIR مربوط به استاندارد تری اولئین b) گراف FTIR مربوط به روغن تک یاخته تولیدی توسط مخمرهای *یاروییا لیپولیتیکا* c) گراف FTIR مربوط به مخمر *رودوتورولا موسیلاژینوزا* d) گراف FTIR مربوط به مخمر *کریپتوکوکوس آلبیدوس* e) گراف FTIR مربوط به مخمر *کاندیدا پالمی اولئوفیلا* f) گراف FTIR مربوط به مخمر *ژئوتریکوم* ۱۱۰

۳-٤- آنالیز اسیدهای چرب با کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده ای

جدول ٦ ترکیب اسیدهای چرب موجود در روغن استخراج شده از این سویه های مخمری را نشان می دهد. ترکیب اسیدهای چرب موجود در سویه های مخمری که دارای تولید قابل توجه بودند مورد بررسی قرار گرفت، لذا این مرحله در مورد سویه ی ژئوتریکوم۱۱۰ انجام داده نشد.

جدول ٦ ترکیب اسید چرب تولید شده توسط سویه های مخمری مختلف (٪)

گونه	C_{14}	$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{18:3}$
یاروییا لیپولیتیکا DSM8218	۰/۲٦	٦/۸	۱/۱	٦۳/۷	٦/۳	nd
یاروییا لیپولیتیکا DSM70562	۰/۱	۵/۹	۲/۲	۵۹/۸	٤/۷	nd
رودوتورولا موسیلاژینوزا	۱	۱۸/٤۹	۱/۲٤	٦۷	٤/۸۳	nd
کریپتوکوکوس آلبیدوس	nd	۲۳	۱٦/۸	۳۹/٦	۱۵/۳	nd
کاندیدا پالمی اولئوفیلا	nd	٤۰/٦	۱۳	٤۱	۳/۵	nd

nd: not determined

۳-۵- آنالیز واریانس نتایج تولید لیپید در سویه های مخمری

جدول ۷ نتایج آنالیز واریانس در سویه های مخمری را نشان می دهد. در این جدول درصد تاثیر عوامل مختلف نشان داده شده است و با استفاده از آن می توان درصد تاثیر پارامترهای مختلف را در سویه های مورد بررسی مقایسه کرد. در این جدول تنها درصد تاثیر پارامترهای مختلف بر تولید لیپید در مورد هر سویه نشان داده شده است. این در حالی که تاگوچی آنالیز واریانس را به صورت کامل در مورد هر سویه انجام می دهد؛ لذا بهترین سویه ی لیپیدی را انتخاب کرده و آنالیز واریانس در مورد آن، به صورت کامل در جدول ۸ ارائه داده شده است. دلیل ارائه ی این جدول تنها برای بهترین سویه جلوگیری از اطاله ی مطلب می باشد. ضمن آن که جدول ۷ نتایج اصلی درصد تاثیر هر فاکتور را نشان می دهد.

جدول ۷ درصد تاثیر پارامترهای مختلف در سویه های مخمری

آرایه ها	*یاروویا لیپولیتیکا* DSM8218	*یاروویا لیپولیتیکا* DSM70562	*رودوتورولا موسیلاژینوزا*	*کریپتوکوکوس آلبیدوس*	*کاندیدا پالمی اولئوفیلا*	*ژئوتریکوم ۱۱۰*
نیتروژن	۲۷/۷۴۸	۲۸/۸۵۶	۱۴/۶۵	۱۴/۴۱	۰/۴۱۳	۲/۸۰۵
کربن	۴۲/۶۳۸	۴۱/۳۷۲	۲۰/۴۵	۱۹/۷۷۳	۵۸/۶۶۴	۶۳/۵۷۲
دما	۰	۰	۱۸/۹۱	۲۱/۴۷۱	۱۵/۰۹۵	۱/۳۳۵
مدت زمان	۲۱/۴۹۲	۲۳/۵۹۸	۲۰/۴۸۶	۱۶/۸۵۳	۰/۵۲۸	۴/۳۷۷
pH	۲/۴۹۲	۲/۸۸۲	۱۵/۶۸	۱۱/۸۸۴	۲۰/۷۵	۱۶/۶۵۶
هوادهی	۰	۰	۷/۶۸۷	۱۰/۹۶۲	۱/۴۵۵	۰
اثرعوامل محیطی(خطا)	۵/۶۳	۳/۲۹۲	۲/۱۳۷	۴/۶۴۷	۳/۰۹۵	۱۱/۲۵۵

جدول ۸ آنالیز واریانس اثر کلیه ی عوامل بر تولید لیپید در مخمر *کریپتوکوکوس آلبیدوس*

عامل	درجه آزادی	مجموع مربعات(S)	واریانس	نسبت F	مجموع خالص مربعات(S´)	درصد تاثیر عامل
نیتروژن	۲	۸/۴۱۶	۴/۲۰۸	۲۴/۲۷۳	۸/۰۷	۱۴/۴۱
کربن	۳	۱۱/۵۹۳	۳/۸۶۴	۲۲/۲۸۹	۱۱/۰۷۳	۱۹/۷۷۳
دما	۱	۱۲/۱۹۷	۱۲/۱۹۷	۷۰/۳۵۲	۱۲/۰۲۴	۲۱/۴۷۱
مدت زمان	۳	۹/۹۵۸	۳/۳۱۹	۱۹/۱۴۵	۹/۴۳۸	۱۶/۸۵۳
pH	۳	۷/۱۷۵	۲/۳۹۱	۱۳/۷۹۶	۱۳/۷۹۶	۱۱/۸۸۴
هوادهی	۱	۶/۳۱۲	۶/۳۱۲	۳۶/۴۱	۳۶/۴۱	۱۰/۹۶۲
اثرعوامل محیطی(خطا)	۲	۰/۳۴۶	۰/۱۷۳	-----	-----	۴/۶۴۷
مجموع	۱۵	۵۶/۰۰۱	-----	-----	-----	۱۰۰

۳-٦- مهمترین پارامترهای تاثیر گذار در مورد سویه های مورد بررسی

برنامه ی تاگوچی برای هر یک از سویه های مورد بررسی یک جدول آنالیز واریانس ارائه می دهد که درصد تاثیر فاکتورهای مورد بررسی را نشان می دهد. برحسب نتایج آنالیز واریانس برخی فاکتورها دارای بیشترین تاثیر بر تولید لیپید می باشند. جدول ۹ فاکتورهای دارای بیشترین و کمترین تاثیر را در مورد هر سویه نشان می دهد.

جدول ۹ عوامل دارای بیشترین و کمترین تاثیر بر تولید لیپید بر حسب نتایج آنالیز واریانس در روش تاگوچی

سویه ی مخمری	فاکتور دارای بیشترین تاثیر بر تولید لیپید	فاکتور دارای کمترین تاثیر بر تولید لیپید
یاروویا لیپولیتیکا DSM8218	غلظت کربن (٤٢/٦٪)	دما و هوادهی (۰٪)
یاروویا لیپولیتیکا DSM70562	غلظت کربن (٤١/٣٪)	دما و هوادهی (۰٪)
رودوتورولا موسیلاژینوزا	غلظت کربن (گلوکز) و مدت زمان (٢٠/٤٪)	هوادهی (٧/٦٪)
کریپتوکوکوس آلبیدوس	دما (٢١/٤٪)	هوادهی (١٠/٩٪)
کاندیدا پالمی اولئوفیلا	غلظت کربن (٥٨/٦٪)	غلظت نیتروژن (٠/٤٪)
ژئوتریکوم ۱۱۰	غلظت کربن (٦٣٪)	دما (١/٣٪)

مخمرهای مولد چربی به علت مشابهت به روغن گیاهی کاربردهای متفاوتی می توانند داشته باشند. آن چه این منابع روغنی را متمایز کرده است تجدیدپذیر بودن آن هاست. جهت تولید روغن میکروبی نظیر هر فرایند تولیدی دیگری لازم است پروسه ی مربوطه بهینه شود. بهینه سازی باعث می شود زمان و هزینه ی کمتری صرف شده و پروسه ی تولیدی بازده بالاتری داشته باشد. هدف از این پژوهش، بررسی پارامترهای موثر بر تولید لیپید در سویه های مخمری، مقایسه ی میزان تاثیر این پارامترها بر روند تولید و بررسی پروفایل اسیدهای چرب بوده است. همچنین پتانسیل مخمرهای مولد چربی متفاوت جهت تولید لیپید مورد مقایسه قرار گرفت. استفاده از روش آماری تاگوچی انجام این پژوهش را از نظر وقت و زمان میسر نمود. تا کنون 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. 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. 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 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 ی 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 و کاهش قابلیت تغییر و انطباق بیشتر نسبت به مقادیر مورد انتظار می شود. یکی از روش های طراحی آزمایش ها روش یک عامل در یک زمان یا روش تک عاملی یا تک فاکتوره می باشد. در این روش یکی از عوامل تغییر داده می شود در حالی که سایر عوامل ثابت است. سپس برای هر عامل یک سطح به عنوان مقدار بهینه انتخاب می شود. اما در این روش چنانچه بین متغیرها اثر متقابل وجود داشته باشد احتمال دستیابی به وضعیت بهینه بسیار کاهش می یابد. از طرف دیگر چون آزمایش ها باید به ترتیب و به طور متوالی انجام شوند زمان مورد نیاز برای رسیدن به نتیجه نیز طولانی خواهد بود. اما در سایر روش

هـای طراحـی نظیـر روش تـاگوچی کـه از روش هـای کـسری از فاکتوریـل محـسوب مـی شـود، تعـدادی از ترکیـب هـای ممکـن بـین متغیرهـا انتخـاب شـده و پـس از بـه دسـت آوردن نتیجـه حالـت بهینـه انتخـاب مـی گـردد. در ایـن روش تعـداد آزمایش های مـورد نیـاز کمتـر بـوده و امکـان انجـام مـوازی آن ها وجود دارد در نتیجه زمـان کلـی تـا حـد زیـادی کـاهش مـی یابد. تاگوچی عـلاوه بـر آنـالیز نتـایج، روشـی را بـرای طراحـی و اجرای آزمـایش هـا ارائـه مـی کنـد. بنـابراین محقـق در ابتـدا دارای یـک طـرح مـدون بـرای انجـام آزمـایش هـای خـود مـی باشـد و بـر خـلاف روش یـک عامـل در یـک زمـان نیـازی نیست کـه در هـر قـسمت بـرای مرحلـه بعـدی تـصمیم گرفـت و مـی تـوان چنـدین آزمـایش را بـه طـور همزمـان انجـام داد. بـدین ترتیـب در میـان روش هـای طراحـی آزمـایش هـا کـه شـامل روش یـک عامـل در یـک زمـان، روش فاکتوریـل کامـل و روش کـسری از فاکتوریـل مـی شـود روش آخـر بهتـرین بـوده و آن چـه روش تـاگوچی را در میـان سـایر روش هـای کـسری از فاکتوریـل برجـسته مـی سـازد کـاهش تغییـر در کیفیـت در اثـر وجـود عوامـل غیـر قابـل کنتـرل بـدون حـذف کردن آن ها می باشد. بـه ایـن ترتیـب نقطـه ی بهینـه بـرای هـر عامل به نحـوی تعیـین مـی گـردد کـه در اثـر تغییـرات جزیـی، تغییرات شـدیدی در کیفیـت نهـایی مـشاهده نـشود. بـا اسـتفاده از طراحـی تـاگوچی مـی‌تـوان اثـر متقابـل بـین دو فـاکتور متفاوت را بررسی کرد. بـه ایـن منظـور تنهـا در مـورد سـویه ی برتـر (*کریپتوکوکـوس آلبیـدوس*) تـاثیر عوامـل متقابـل مطـرح شده است. هـدف از ارائـه ایـن بخـش تنهـا نـشان دادن توانـایی های متفاوت تـاگوچی در زمینـه بهینـه سـازی مـی باشـد لـذا از مطرح کردن این بخش در مورد سـایر سـویه هـا بـه دلیـل اطالـه ی مطلب اجتناب گردیـد. بـا توجـه بـه جـدول ۱۰ کـه تـاثیرات متقابل فاکتورهای مـورد بررسـی را نـشان مـی دهـد، مـی تـوان نتیجه گرفت: یک فـاکتور کـه بـه تنهـایی اثـر چنـدانی در تولیـد لیپید نداشته است، وابـسته بـه سـایر فاکتورهـا بـوده و در رابطـه بـا سـایر فـاکتور هـا در رونـد بهینـه سـازی تـاثیر مـی گـذارد. جالب توجه است کـه شـاخص هـایی مثـل هـوادهی و pH کـه بـه صـورت فـردی درصـد تـاثیر کمتـری در جـدول آنـالیز واریـانس دارنـد، دارای اثـر متقابـل قابـل تـوجهی در رابطـه بـا سایر فاکتورهـا هـستند کـه از ایـن موضـوع مـی تـوان در رونـد بهینه سازی بـرای رسـیدن بـه تولیـد بیـشتر اسـتفاده کـرد. مـثلاً pH در رابطـه بـا منبـع کـربن و نیتـروژن دارای بـه ترتیـب ۴۸٪ و ۴۳٪ تاثیر متقابل است(۴۵).

جدول ۱۰ تاثیرمتقابل فاکتورهای مختلف در مورد سویه ی *کریپتوکوکوس آلبیدوس*

شماره	جفت برهم کنش های متقابل	SI%	Opt.
۱	کربن × هوادهی	۴۸/۰۴	(۱،۲)
۲	نیتروژن× هوادهی	۴۳/۶۴	(۱،۲)
۳	نیتروژن × دما	۳۴/۶۳	(۱،۲)
۴	نیتروژن × کربن	۲۳/۱۳	(۲،۲)
۵	کربن × دما	۲۱/۸۸	(۱،۲)
۶	کربن × مدت زمان	۲۱/۵۷	(۳،۲)
۷	مدت زمان × هوادهی	۱۵/۴۲	(۳،۱)
۸	دما × pH	۱۴/۸۵	(۱،۴)
۹	دما × مدت زمان	۱۴/۰۲	(۱،۳)
۱۰	pH × هوادهی	۱۲/۰۶	(۴،۱)
۱۱	نیتروژن × مدت زمان	۸/۸۱	(۲،۳)
۱۲	مدت زمان × pH	۸/۶۲	(۳،۴)
۱۳	نیتروژن × pH	۵/۹۵	(۲،۴)
۱۴	کربن ×pH	۴/۶۷	(۲،۴)
۱۵	دما × هوادهی	۱/۶۶	(۱،۱)

شاخص شدت تاثیر متقابل برای پارامترهای مختلف =SI

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

همان طور که نشان داده شده است غلظت منبع کربن دارای بیشترین تاثیر بر تولید لیپید است و عواملی همچون هوادهی و بعضاً دما در مورد بعضی از سویه ها دارای تاثیر بسیار کمی بر تولید لیپید هستند. آمارتی و همکارانش تاثیر نسبت C/N بر میزان تولید لیپید در مخمر سایکروفیل *رودوتورولا گلایسیالیس* DBVPE4785 را در مقادیر ۱/٦، ٤، ۸، ١٦، ٤٠، ۸۰، ١٢٠ و g/L ١٦٠گلوکز بررسی کرد. این مخمر در غلظت g/L ١٢٠ گلوکز به بیشترین میزان محتوای لیپیدی رسیده است(۱۳). تجمع لیپید یک پاسخ القا شده ی تحت استرس است که در آن روغن به عنوان یک ذخیره داخل سلولی تجمع می یابد. نسبت کربن به نیتروژن (C/N) حدود ٤٠ تا ٥٠ به ١ برای تولید لیپید مناسب می باشد، هر چند نسبت اپتیمم برای هر ارگانیسم باید مشخص شود. برای تولید بیشترین میزان بیومس، غلظت کربن و نیتروژن باید اضافه شود در حالی که نسبت آن ها به همان میزان نگهداشته می شود. این موضوع باعث می شود که فاز رشد تا تولید بیشترین غلظت بیومس ادامه یابد و بعد از آن فاز تجمع لیپید شروع شود. جیل گزارش داد که در محدودیت کربن (گلوکز g/L ١٢ و کلرید آمونیوم g/L ٣) محدودیت رشد اتفاق می افتد و محتوای لیپیدی مخمر همراه با کاهش سرعت رشد کاهش می یابد، این موضوع احتمالاً به خاطر تبدیل درصد بیشتری از گلوکز به انرژی و نگهداشتن ارگانیسم در سرعت های رشد پایین تر می باشد (۳۳). یاماچی و همکارانش نیز به نتایج مشابهی در مطالعه رشد *لیپومایسس استارکی* DSM70595دست یافتند(٣٤). حاسن با بهینه سازی تولید چربی در *کریپتوکوکوس کرواتوس* (۳۵)، لی و همکارانش با کار بر روی *رودوسپوریدیوم تورولوئیدس* (۳٦)، انگربائر و همکارانش با بهینه سازی *لیپومایسس استارکی* (۳۷)، بئوپولوس و همکارانش با بررسی شرایط بر روی *یاروئیا لیپولیتیکا* (۳۸) و ژو و همکارانش در مورد *تریکوسپورون فرمنتنس* (۳۹) به طور عمومی گزارش دادند که افزایش نسبت C/N (بیشتر از ٥٠) و همچنین بالا بردن مدت زمان انکوباسیون منجر به افزایش میزان تجمع لیپید می شود. وایلد و همکارانش اثر نسبت C/N بر روی *لیپومایسس استارکی* را بررسی کردند. آن ها در نسبت های C/N ۱۹/۸، ۳۹/۷ و ٦١/٢ به محتوای لیپیدی به ترتیب ۱۹/٤٪ ، ۲۲/۱٪ و ۳۰٪ دست یافتند، اگر چه محتوای لیپیدی با زیاد کردن C/N افزایش یافت اما میزان بیومس سلولی و سرعت رشد کاهش می یابد(٤٠). انگربائر و همکارانش نیز محتوای لیپیدی معادل ٤٠٪ در C/N = ٦٠ در مورد این مخمر را گزارش دادند(۳۷). همان طور که نتایج تحقیقات انجام شده نشان می دهد روند کلی افزایش C/N تاثیر مثبتی بر تولید لیپید دارد که با نتایج به دست آمده در تحقیق ما مطابقت دارد. در این تحقیق ٤ سطح برای غلظت منبع کربن و ۳ سطح برای غلظت منبع نیتروژن در نظر گرفته شد. بر این اساس ۱۲ نسبت C/N متفاوت به دست می آید. کمترین میزان C/N معادل ٦٩ و بیشترین میزان C/N معادل ٤٤٤ می باشد. نتایج به دست آمده در مورد سویه های مورد بررسی نشان می دهد که سویه های *یاروئیا لیپولیتیکا* DSM70562 و DSM8218 در غلظت C/N معادل ۳٥۸ دارای بیشترین میزان تولید لیپید بوده اند. در بین سویه های بومی نیز، *رودوتورولا موسیلاژینوزا* و *کریپتوکوکوس* آلبیدوس در C/N معادل ١٤١/٥ بیشترین میزان تولید چربی به دست آمد. سویه های مولد چربی *کاندیدا پالمی اولئوفیلا* و *ژئوتریکوم* ۱۱۰ نیز در C/N معادل ۱۱۹/٥ دارای بیشترین میزان تولید بوده اند. به این ترتیب با توجه به نوع سویه میزان تاثیر نسبت کربن به نیتروژن متفاوت است؛ اما نسبت C/N و منبع کربن و نیتروژن به عنوان موثرترین عوامل در تولید لیپید مطرح هستند. این موضوع با توجه به جدول آنالیز واریانس در مورد سویه های بررسی شده قابل تایید است.

تغییرات القا شده به واسطه دما در بیوسنتز لیپید از این نظر با اهمیت است که بدانیم چگونه میکروارگانیسم قدرت تطبیق با طیف متفاوتی از دماها را دارد و چگونه تغییرات دمایی بر روی میزان تولید لیپید و ترکیب لیپیدی آن تاثیر می گذارد (٤١). بنابراین تغییرات دمایی تاثیر زیادی بر میزان تولید لیپید نمی تواند داشته باشد مگر این که از طیف دمایی مناسب برای مخمر خارج شود که در این صورت میزان رشد و تولید لیپید کاهش خواهد یافت. سید و همکارانش گزارش دادند که میزان تولید لیپید در pH=۸ و pH=٤ به صورت بر جسته ای کاهش می یابد. آن ها همچنین گزارش دادند که pH بین ٥ تا ٦ باعث افزایش غلظت لیپید می شود(٤٢). بسیاری از محققین گزارش دادند که pH محیط بر روی تولید لیپید تاثیر دارد و به نظر می رسد که به نوع منبع کربن بستگی داشته باشد(۳۷). در مورد مدت زمان

انکوباسیون در مورد سویه *یاروییا لیپولیتیکا* DSM8218 مدت زمان بهینه ۷۲ ساعت با میزان تاثیر ۲۱/٤۹٪ بر تولید لیپید می باشد. برای سویه *یاروییا لیپولیتیکا* DSM70562 نیز مدت زمان بهینه ۷۲ ساعت با میزان تاثیر ۲۳/۵۹٪ بر تولید لیپید می باشد. در این سویه ها میزان تولید پس از ۷۲ ساعت رو به کاهش می رود که این موضوع با سویه مورد بررسی قابل تطبیق است، زیرا مخمر *یاروییا لیپولیتیکا* حتی در حضور منبع کربن پس از حدود ۸۰ ساعت شروع به مصرف چربی ذخیره ای خود می کند(٤۳). در مورد سویه های *کریپتوکوکوس آلبیدوس* و *رودوتورولا موسیلاژینوزا* نیز مدت زمان بهینه ۷۲ ساعت با میزان تاثیر به ترتیب ۲۰/٤۸٪ و ۱٦/۸۵٪ می باشد. در مورد *کاندیدا پالمی اولئوفیلا* سطح بهینه دمایی ۲٤ ساعت می باشد البته تفاوت زیادی بین میزان لیپید تولید شده در سایر سطوح نیز نمی باشد و مدت زمان در این سویه تنها ۰/۵۲٪ تاثیر دارد. مدت زمان بهینه برای *ژئوتریکوم* ۱۱۰ نیز ٤۸ ساعت بوده و دارای ٤/۳٪ تاثیر است. به این ترتیب اثر مدت زمان در سویه های مختلف، متفاوت است و هر سویه دارای مدت زمان بهینه مخصوص به خود می باشد.

هوادهی در سویه های *یاروییا لیپولیتیکا*DSM8218 و DSM70562 دارای اثر محسوسی نیست. با توجه به این که تاگوچی منطبق با روند اقتصادی انتخاب سطوح بهینه را انجام می دهد، پس ۱۵۰rpm به عنوان سطح بهینه برای این دو سویه انتخاب می شود زیرا مستلزم انرژی کمتری است. در مورد *کریپتوکوکوس آلبیدوس* و *رودوتورولا موسیلاژینوزا* نیز سطح بهینه هوادهی rpm ۱۵۰ است و تاثیر آن به ترتیب ۷/٦۸٪ و ۱۰/۹٦٪ می باشد. در کاندیدا *پالمی اولئوفیلا* نیز سطح بهینه ۱۵۰ بوده چون میزان تاثیر آن ۱/٤۵٪ می باشد. بنابراین rpm ۱۵۰ از نظر اقتصادی انتخاب می شود. در ژئوتریکوم ۱۱۰ نیز دارای تاثیر محسوسی نیست و سطح اول آن انتخاب شده است.

اسیدهای چرب غیر اشباع به دست آمده از لیپید میکروبی قابلیت استفاده به عنوان مکمل غذایی را دارند. آبزیانی مانند ماهی ها عمدتاً به عنوان منبع اسیدهای چرب غیر اشباع مطرح می شوند اما استفاده از آن ها دارای محدودیت هایی از قبیل پیچیده بودن محتوای اسید چرب، وجود ویروس ها و پریون ها در آن ها و نگرانی در مورد تجمع احتمالی آلاینده ها مثل فلزات سنگین از محیط های دریایی را به دنبال دارد. بنابراین توجه به سمت تولید روغن میکروبی سوق یافت. روغن تولید شده در این میکروارگانیسم ها علاوه بر کاربرد به عنوان مکمل غذایی دارای ترکیب مشابه کره کاکائویی نیز می باشد(۲۳). انشاییه و همکارانش از سویه ی مخمری *یاروییا لیپولیتیکا* M_7 برای تولید روغن تک یاخته استفاده کردند. آن ها با کشت این مخمر بر روی ضایعات گوشتی با منشا دامی و فراوری این ضایعات جهت تبدیل به روغن تک یاخته استفاده کردند. سویه ی *یاروییا لیپولیتیکا* M_7 با رشد بر روی ضایعات گوشتی، دارای تولید روغن به میزان ٤/۲۸g/L بود(٤٤).

٤- نتیجه گیری

با استفاده از روش تاگوچی می توان تاثیر پارامترهای متفاوت بر تولید لیپید را مورد بررسی قرار داده و میزان تولید لیپید را در سویه های مولد چربی افزایش داد. این افزایش در مورد سویه های *رودوتورولا موسیلاژینوزا* و *کریپتوکوکوس آلبیدوس* بسیار چشمگیر بوده و میزان تولید لیپید را تا حدود ۳۰٪ بالا برده است. همچنین نتایج FTIR نشان می دهد که روغن مخمری دارای ترکیب روغن خنثی از نوع تری آسیل گلیسرول می باشد. پروفایل اسیدهای چرب به دست آمده با کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده ای نشان می دهد که روغن مخمری قابلیت کاربرد در زمینه های متفاوت را دارد و با توجه به پتانسیل بالای تولید تعدادی از این مخمرها، امکان کاربرد آن ها در پروسه های صنعتی وجود دارد.

۵- تقدیر و تشکر

این مقاله از طرح پژوهشی به کد ۹۲۰٦٤ استخراج شده و از کلیه ی عزیزانی که در انجام این پژوهش ما را یاری دادند، به ویژه مسئولین محترم باشگاه پژوهشگران جوان واحد دانشگاه آزاد اسلامی فلاورجان، قدردانی و تشکر می نماییم.

٦- منابع

[1] Ratledge, C, 2002, Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms, Biochemical society, 4, 1047-1050.

[2] Schorken U, Kempers P, 2009, Lipid biotechnology: industrially relevant production processes, Lipid Science Technology, 111(7), 627-645.

[3] Zheng, Y, Yu, X, Zeng, J, Chen, Sh, 2012, Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw, Biotechnology for Biofuels, 5, 34-50.

[4] Shen, JJ, Li, FC, Yang, QL, Feng, DW, Qin, S, Zhao, ZB, 2007, Fermentation of Spartina anglica acid hydrolysate by *Trichosporon cutaneum* for microbial lipid production, Marine Sci, 3(8), 38-41.

[5] Benjamas, CH, Louhasakul Y, 2013, Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel, Bioresource Technology, 142, 329-337.

[6] Enshaeieh, M, Abdoli, A, Nahvi, I, Madani, M, 2013, Selection and optimization of single cell oil production from *Rodotorula* 110 using environmental waste as substrate, Journal of cell and molecular research, 4(2):1-10.(a)

[7] Enshaeieh, M, Abdoli, A, Nahvi, I, 2013, Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using *Yarrowia lipolytica* M_7 and *Candida* sp**.** Journal of cell and molecular research, 5(1):17-23.(b)

[8] Muniraj, IK, Xiao, L, Hu, Z, Zhan, X, Shi, J, 2013, Microbial lipid production from potato processing wastewater using oleaginous filamentous fungi *Aspergillus oryzae*, Water Res, 47(10), 3477-83.

[9] Karatay, SE, Donmez, G, 2010, Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. Bioresource Technology, 101(20), 7988-7990.

[10] Sriwongchai, S, Pokethitiyook, P, Kruatrachue, M, Bajwa, PK, Lee, H, 2013, Screening of selected oleaginous yeasts for lipid production from glycerol and some factors which affect lipid production by Yarrowia lipolytica strains, Journal of Microbilogy, Biotechnology and Food Sciences, 2(5), 2344-2348.

[11] Smith, VH, Sturm, BSM, DeNoyelles, FJ, Billings, SA, 2009, The ecology of algal biodiesel production. Trends Ecol. Evol., 25, 301-309.

[12] Li, Q, Du, W, Liu, D, 2008, Perspective of microbial oils for biodiesel production. Appl Microbial Biotechnol , 80, 749-756.

[13] Amaretti, A, Raimondi, S, Sala, M, Roncaglia, L, Lucia, DM, Leonardi, A, Rossi, M, 2010, Single cell oil of cold adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785, Microbial Cell Factoties, 9(73), 1-6.

[14] Braunwald, T, Schwemmlein, L, Graeff-Hönninger, S, French, WT, Hernandez, R, Holmes, WE, Claupein W, 2013, Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by Rhodotorula glutinis, Appl Microbiol Biotechnol, 97(14): 6581-8.

[15] Balat, M, Balat, H, 2010, Progress in biodiesel processing. Appl Energy, 87, 1815-1835.

16-Katre, G, Joshi, Ch, Khot, M, Zinjarde, S, Ravikumar, A, 2012, Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel, AMB Express, 2(36), 15-36.

[17] Khot, M, Kamat, S, Zinjarde, S, Pant, A, Chopade, B, Ravikumar, A , 2012, Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel, Microbial Cell Factories, 11(71), 59-71.

[18] Raschke, D, Knorr, D, 2009, Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*, Journal of Microbiologocal Methods, 79(2), 178-183.

[19] Sabirova, JS, Haddouche, R , Van Bogaert, IN, Mulua, F, Verstraete, W , Timmis, KN, Schmidt-Dannert, C, Nicaud, JM, Soetaert, W, 2010, 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 , 4(1), 1751-7915.

[20] Iassonova, RD, Hammond, EG, Beattie, SE, 2008, Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerols encapsulated in oleaginous yeast, Journal of oil and fat industries, 85, 711-716.

[21] 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.

[22] Zlatanov, M, Pavlova, K, Grigrova, D, 2001, Lipid composition of some yeast strains from Livingston island, Antarctica, Folia Microbiol, 402-406.

[23]Wynn, PJ, Ratledge, C, 2005, Oils from microorganisms, Martek Bioscience Corporation, Columbia, 121-153.

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

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

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

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

[28] Liu, GY, Yuan, S, Dai, CC, 2004, Factors affecting γ- linoleic acid content in fermented glutinous rice brewed by *Rhizopus sp.* Food Microbiology, 21(3), 299-304.

[29] Wu, Q, Miao, XL, 2006, Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresour.Technol, 97, 841-846.

[30] Dai, C, Tao, J, Xie, F, Dai, YJ, Zhao, M, 2007, Biodiesel generation oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. African Journal of Biotechnology, 6, 2130-2134.

[31] Kraisintu, P, Yongmanitchai, W, Limtong, S, 2010, Selection and optimization for lipid production of newly isolated oleaginous yeast, *Rdodosporidium toruloides* DMKU3-TK16. Kasetsart J.(Nat.Sci.), 44, 436-445.

[32] Enshaeieh, M, Nahvi, I, Madani, M, 2013, Improving Microbial Oil Production with Standard and native Oleaginous Yeasts by using Taguchi Design, Int. J. Environ. Sci. Technol. Available on line with DOI 10.1007/s13762-013-0373-2 (c)

[33] Gill, CO, Hall, MJ, Ratledge, C, 1977, Lipid accumulation in an oleaginous yeast(Candida 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. Applied And Environmental Microbiology, 33, 2 , 231-239.

[34]Yamauchi, H, Mori, H, Kobayashi, T, Shimizu, S, 1983, Mass production of lipids by *Lipomyces starkeyi* in microcomputeraided fed-batch culture, J.Ferment.Technol, 61, 275-280.

[35] Hassan, M., Blanc, Ph, Granger, LM, Pareilleux, A, Goma, G, 1996, Influence of nitrogen and iron limitation on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture, Process Biochem, 31(4), 355-361.

[36] Li, Y, Zhao, Z, Bai, F, 2007, High- density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture.Enzyme and Microbial Technology, 41, 312-317.

[37] Angerbauer, C., Siebenhofer, M, Mittelbatch, M, Guebitz, GM, 2008, Conversion of sewage sludge in to lipids by *lipomyces starkeyi* for biodiesel production, Bioresour.Technol, 99, 3051-3056.

[38] Beopoulos, A, Mrozova, Z, Thevenieau, F, Dall, MTL, Hapala, I, Papanikplaou, S, Chardot, T, Nicaud, JM, 2008, control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*, American Society for Microbiology, 74, 7779-7789.

39-Zhu, LY, 2008, Efficient lipid production with Trichosporon fermentans and its use for biodiesel preparation, Bioresour.Technol, 99, 7881-7885.

[40] Wild, R, Patil, S, Popovic, M, Zappi, M, Dufreche, S, Bajpai, R, 2010, Lipids from *Lipomyces starkeyi* , Food technol. Biotechnol, 48, 329-335.

[41] Saxena, RK, Anand, P, Saran, S, Isar, J, 2009, Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities, Biotechnol Adv, 27, 895-913.
[42] Syed, MA, Singh, SK, Pandey, A, Kanjilal, S, Prasad, RBN, 2006, Effects of various process parameters on the production of α-Linolenic acid in submerged fermentation, Food Technol.Biotechnol, 44, 282-287.
[43] Papanikolaou, S, Chevalot, I, Komaitis, M, Marc, I, Aggelis, G, 2001, Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch *cultures*, Appl Microbial Biotechnol, 58, 308-312.
[44] Enshaeieh, M, Abdoli, A, Nahvi, I, 2012, Processing of meat and dairy wastes for single cell oil production by oleaginous yeasts, In: First national congress of industry and food sanitation with animal origin, Ghom, Veterinary Council of Ghom, 150-152. (d)
[45] Shoja sadati, A, Asadolahi, M, 2010, Industrial biotechnology, Tarbiat Modares University, Nashre Asar Elmi, 369-374.

Production of oil rich in omega series fatty acids by oleaginous yeasts and effect of different parameters on production process

Abdoli, A. [1], Enshaeieh, M. [2*], Madani, M. [2]

1. Young Researchers and Elite Club, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2. Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

(Received: 92/12/21 Accepted: 93/3/21)

Application of microbial lipids as an alternative source of oil was considered in the early years of 20th century. Microbial oil rich in essential polyunsaturated fatty acids (omega series) is one of the important aspects of single cell oil production. By development of technical - economical processes and also by optimization of microbial lipid production, high efficiency of microbial lipid can be provided. In this study, two standard yeast strains and four native strains were evaluated for potential of lipid production. Optimization of lipid production in these strains was carried out using design of experiments and factors affecting lipid synthesis in these strains were compared. Obtained oil was analyzed using Gas Chromatography-Mass spectrometry (GC-MS). Among the standard strains, *Yarrowia lipolytica* DSM8218 and the native strain *Cryptococcus albidus* had maximum lipid production rate of 7.65 g/L and 11.81 g/L, respectively. Application of Taguchi method was so effective in optimization of microbial lipid production and significantly increased production in evaluated strains. These lipids have potential for applications in food and pharmaceutical industries.

Key words: Food industry, Single cell oil, Triacylglycerol

* Corresponding Author E-Mail Address: m_enshaeieh@yahoo.com