مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1391، دوره چهارم، شماره چهاردهم، صفحه 20-13

جداسازی مخمرهای مولد چربی و بهینه سازی تولید لیپید با استفاده از روش تاگوچی

آزاده عبدلی[1]، مرجان انشاییه[2]، ایرج نحوی[3]، محبوبه مدنی[4]

1- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی،گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
2- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
3- استاد بیوتکنولوژی، دانشکده علوم،گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
4- استادیار قارچ شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

نویسنده مسؤول: مرجان انشاییه، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران.m_enshaeieh@yahoo.com

دریافت: 91/7/8 پذیرش:91/9/25

چکیده

زمینه و هدف: میکروارگانیسم هایی که بیش از **20%** بیومس خود، لیپید ذخیره می کنند، تحت عنوان سویه های مولد چربی معرفی می شوند. مخمرهای مولد چربی تری آسیل گلیسرول های غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع را در خود انباشته می کنند. این ترکیبات لیپوفیلیک میکروبی، به علت خصوصیات ویژه، از دیدگاه صنعتی مورد توجه قرار گرفته اند. روغن های میکروبی پتانسیل کاربرد در تولید سوخت زیستی را دارند. سوخت زیستی در مقایسه با سوخت های فسیلی از نظر زیست محیطی بسیار مسالمت آمیز است.

روش بررسی: در این تحقیق **70** مخمر از خاک مناطق مختلف جداسازی شدند که **23** عدد از آن ها مولد چربی بودند. نحوه ی غربالگری آن ها با غنی سازی در محیط گلیسرول و پس از آن به واسطه رنگ آمیزی با سودان سیاه بود. پس از آن میزان چربی تولید شده در این مخمرها با استفاده از روش **Bligh & Dyer** سنجیده شد. در این بین یکی از سویه ها با کد شناسایی **Aa2** برای شناسایی و تحقیقات بعدی انتخاب گشت.

یافته ها: این سویه **(Aa2)** پس از انجام روند بهینه سازی در شرایط محیط کشت حاوی **95g/L** گلوکز، **1/5g/L** $(NH_4)_2SO_4$ ، **3 g/L** KH_2PO_4 ، **1/5g/L** $MgSO_4.7H_2O$ ، **2 g/L** NaH_2PO_4 و **1 g/L** عصاره مخمر به مدت **96** ساعت در دور **150 rpm** با **pH=5/5** به میزان تولید لیپید، بیومس خشک و درصد تولید لیپید نسبت به وزن خشک معادل **5/44g/L**، **14/39 g/L** و **37/8%** رسید.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان دهنده ی وجود سویه های بومی با ارزش درکشورماست که با جداسازی و بهینه سازی تولید لیپید در آن ها می توان بدون نیاز به سویه های خارجی، از آن ها در بخش های متفاوت صنعتی به ویژه در تولید سوخت زیستی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بهینه سازی، تری آسیل گلیسرول، مخمرهای مولد چربی

.

www.SID.ir

مقدمه

استفاده از لیپیدهای میکروبی به عنوان منبع جایگزین روغن و چربی برای استفاده انسان ها در سال های ابتدایی قرن 20 مورد توجه قرار گرفت. تولید میکروبی روغن های غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع یکی از جنبه های مهم تولید روغن میکروبی (SCO Single Cell Oil) است(1). جنبه‌ی دیگر اهمیت روغن میکروبی در مورد تولید سوخت زیستی است(2). بحران ناشی از گرم شدن زمین به علت تولید CO_2 در اثر مصرف زیاد سوخت های فسیلی، تقاضا برای تولید سوخت های زیستی را افزایش داده است. روش سنتی برای تولید سوخت زیستی، ترانس استریفیه کردن روغن های گیاهی با متانول است. محدودیت توسعه گیاهان باعث توجه بیشتر به تولید روغن میکروبی شده است. کاربرد میکروارگانیسم هایی که توانایی استفاده از یک سری منابع ارزان قیمت نظیر پوشال برنج، ساقه ذرت و سایر باقیمانده های گیاهی و جنگل کاری را دارند؛ برای تولید روغن میکروبی و نهایتاً سوخت زیستی از نظر اقتصادی ارزشمند است(3-5). مهم ترین اسیدهای چرب تولید شده توسط میکروارگانیسم های مولد چربی شامل میریستیک اسید، پالمیتیک اسید، استئاریک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید و لینولنیک اسید می باشند. این اسیدهای چرب از اجزا اصلی سوخت زیستی هستند(6). سوخت زیستی معمولاً حاوی متیل و اتیل استرهای اسیدهای چرب است که به واسطه ی ترانس استریفیه کردن تری آسیل گلیسرول ایجاد می شود(7-9).

از راه های اصلی برای تولید سوخت زیستی با کمک میکروارگانیسم ها، غربالگری سویه های مولد چربی و دیگری استفاده کامل از محصولات جانبی است. میکروارگانیسم های مولد چربی دارای مقادیر زیاد پروتئین، کربوهیدرات و سایر مواد هستند. استفاده از این مواد باعث کاهش هزینه تولید سوخت زیستی می شود. به عنوان مثال باقیمانده بیومس تولید شده از سوخت زیستی پتانسیل استفاده به عنوان غذای دام را دارد. گلیسرول جانبی را نیز می توان به مواد شیمیایی تبدیل کرد. به این ترتیب هزینه های تولید کاهش می یابد(10).

تولید لیپید در میکروارگانیسم های مولد چربی 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 گلوکز به ذخایر لیپیدی داخل سلولی تبدیل می شود. علت توقف تکثیر سلول ها محدودیت در یکی از مواد غذایی اصلی نظیر نیتروژن است(11، 12). میکروارگانیسم های ذخیره کننده ی لیپید بیشتر شامل گونه های مخمری و قارچی هستند؛ که گونه های مخمری مولد لیپید بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند. این گونه ها شامل *Yarrowia*، *Candida*، *Rhodotorula* ، *Rhodosporidium* ، *Cryptococcus* ، *Trichosporon* و *Lipomyces* می باشند(13).

در این مطالعه پس از جداسازی مخمرها و بررسی تولید لیپید در مخمرهای مولد چربی، به شناسایی یکی از سویه های جدا شده پرداخته شد. پس از آن بهینه سازی تولید لیپید در این مخمر با تغییر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی موثر بر تولید صورت پذیرفت. هدف از این تحقیق دست یافتن به یک سویه بومی مولد چربی با پتانسیل بالای تولید لیپید است، پس از بهینه سازی تولید لیپید در این مخمر و بررسی چربی تولید شده می توان از آن در مصارف صنعتی متفاوت استفاده کرد.

روش بررسی

جداسازی و انتخاب مخمرهای مولد چربی: جداسازی سویه های مخمری از نمونه های برگ درختان، خاک مزرعه ذرت و آفتابگردان، خاک های آلوده به مواد روغنی مثل خاک تعمیرگاه ها، قصابی و شیرابه زباله انجام گرفت. یک گرم از نمونه مورد نظر به 50mL محیط غنی کننده شامل 100g/L گلیسرول، 1g/L $(NH_4)_2SO_4$ ، 1 g/L KH_2PO_4، 1 g/L $MgSO_4.7H_2O$ و 1 g/L عصاره مخمر در ارلن مایر 250 میلی لیتری اضافه شد و به مدت 96 ساعت در 30 ^oC در شیکر 180 rpm قرار گرفت.

پس از آن 0/1mL از این محیط به محیط جامد حاوی 20g/L گلوکز، 2g/L $(NH_4)_2SO_4$ ، 0/5 g/L KH_2PO_4، 2g/L $MgSO_4.7H_2O$، 0/1 g/L $CaCl_2$ و 2% آگار اضافه گردید و به مدت 48 ساعت در 28 ^oC قرار داده شد. پس از آن کلنی های به دست آمده بر روی پلیت بر اساس مورفولوژی متفاوت آن ها خالص سازی شدند. گاهی برای به دست آوردن کلنی خالص باید این کار را تا چند بار تکرار کرد. بعد از آن کلنی های خالص را بر روی محیط اسلنت YPD(yeast extract peptone dextrose agar) نگهداری کرده و هر یک الی دو ماه یک بار مجددا از آن ها اسلنت جدید تهیه می نماییم. بعد از آن با استفاده از رنگ سودان سیاه نمونه های جدا شده بررسی گردید(14).

www.SID.ir
Archive of SID

آنالیز روغن تولید شده با TLC: برای انجام TLC از صفحات سیلیکاژل $60F_{254}$ همراه با تری اولئین به عنوان استاندارد برای بررسی تولید تری آسیل گلیسرول استفاده شد. محلول مورد استفاده حاوی n-هگزان، دی اتیل اتر و استیک اسید با نسبت 90:10:2 می باشد. باندها پس از رنگ آمیزی صفحات با بخارات ید قابل مشاهده هستند(16،15).

تعیین میزان لیپید تولید شده در مخمرهای مولد چربی: برای این منظور سویه های دارای جواب مثبت در مرحله رنگ آمیزی به محیط پیش تولید تلقیح گردید. این محیط حاوی 15g/Lگلوکز، 5g/L $(NH_4)_2SO_4$ ، 1 g/L KH_2PO_4، 0/5g/L $MgSO_4.7H_2O$، و 0/5g/L عصاره مخمر است. پس از آن که 48h در دور 180 rpm و دمای 28 ^oC در همزن قرار گرفتند، به محیط تولید منتقل گردیدند. محیط تولید حاوی 35g/L گلوکز، 1g/L $(NH_4)_2SO_4$ ، 3 g/L KH_2PO_4، 1/5g/L $MgSO_4.7H_2O$ ، 2 g/L NaH_2PO_4 و 1 g/L عصاره مخمر است. میزان تلقیح 5 mL از محیط پیش تولید داخل 45 mL از محیط می باشد. پس از 96 ساعت میزان تولید به روش Bligh & Dyer اصلاح شده مورد بررسی قرار گرفت(14).

بهینه سازی شرایط تولید با کمک روش طراحی آزمایش ها: برای این منظور از یکی از روش های طراحی آزمایش ها تحت عنوان روش تاگوچی استفاده گردید. در این روش فاکتورهای مورد سنجش به برنامه Qualitek-4 داده شد. فاکتورهای مورد سنجش شامل غلظت گلوکز، غلظت سولفات آمونیوم، مدت زمان، pH، دما و هوادهی می باشند. این عوامل به ترتیب دارای ۲،۴،۴،۳،۴ و2 سطح هستند. نرم افزار طرح L16 را پیشنهاد می کند. در این طرح 16 آزمایش مجزا انجام می گیرد و نتایج آن ها توسط نرم افزار آنالیز می گردد. جدول 1، 16 آزمایش طراحی شده را نشان می دهد.

بررسی سوپرناتانت جهت تعیین میزان قند و ازت مصرف شده : قند باقیمانده در محیط با کمک معرف DNS (دی نیترو سالیسیلات) سنجیده شد. برای سنجش میزان ازت نیز از روش کجدال استفاده شد(14).

جدول1. آرایه های به دست آمده از طراحی L16

آرایه ها	نیتروژن(g/l)	کربن(g/l)	دما(°C)	مدت زمان(h)	pH	rpm(round /min)
آرایه ی 1	0/5	55	25	24	5	150
آرایه ی 2	0/5	75	25	48	5/5	200
آرایه ی 3	0/5	95	35	72	6	150
آرایه ی 4	0/5	115	35	96	6/5	200
آرایه ی 5	1	55	25	96	6	200
آرایه ی 6	1	75	25	72	6/5	150
آرایه ی 7	1	95	35	48	5	200
آرایه ی 8	1	115	35	24	5/5	150
آرایه ی 9	1/5	55	35	48	6/5	150
آرایه ی10	1/5	75	35	24	6	200
آرایه ی11	1/5	95	25	96	5/5	150
آرایه ی12	1/5	115	25	72	5	200
آرایه ی13	0/5	55	35	72	5/5	200
آرایه ی14	0/5	75	35	96	5	150
آرایه ی15	0/5	95	25	24	6/5	200
آرایه ی16	0/5	115	25	48	6	150

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 Spectroscopy (Fourier Transform Infrared) FTIR می باشد و 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.

تولید لیپید در سویه مخمری جداسازی شده، در ابتدا به وسیله رنگ آمیزی با سودان سیاه مورد تایید قرار گرفت و به منظور تایید تکمیلی و حتمی روغن تولید شده از تکنیک FTIR Spectroscopy، با استفاده از دستگاه مدل JASCO FT/IR-6300, Japan استفاده گردید. گستره مورد بررسی دستگاه از400 cm-1 تا 4000 cm-1 تنظیم شد. استاندارد تری اولئین (خریداری شده از شرکت سیگما آلدریچ-آلمان) به عنوان شاهد و برای مقایسه با روغن تک یاخته تولیدی مورد استفاده قرار گرفت(19،18،17).

Archive of SID

www.SID.ir

یافته ها

از بین 70 مخمر جدا شده 23 عدد از آن ها مولد چربی بودند. مخمرهای مولد چربی پس از رنگ آمیزی با سودان سیاه دارای گرانول های چربی سیاه رنگ بوده که در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. این سویه ها برای استخراج چربی انتخاب شدند و در مقابل استاندارد مورد استفاده در TLC باند قابل مشاهده ایجاد کردند. به این ترتیب با استخراج لیپید از آن ها، نتایج تولید چربی در این سویه ها به دست آمد. این نتایج، مقادیر تولید چربی متفاوتی را از کمترین میزان معادل g/L 0/81 (20/88%) تا بیشترین میزان معادل g/L 4/95 (28/60%) نشان دادند. به این ترتیب سویه ای که بیشترین میزان تولید لیپید را داشت (سویه Aa_2) برای مراحل بعدی یعنی شناسایی و بهینه سازی انتخاب گردید(نام 70 نمونه جدا شده با استفاده از حروف انگلیسی به ترتیب گذاشته شد. در این بین سویه هایی که شباهت های موفولوژی از لحاظ شکل کلنی و یا رنگ به یکدیگر داشتند، با استفاده از یک حرف بزرگ و حروف کوچک متفاوت تعیین شدند(مثلاً Aa_2، Az_1، AZ_2). البته این نامگذاری ها صرفاً توسط محقق حین انجام کار بوده و ارزش علمی ندارند). در این تحقیق هدف دست یابی به سویه ای با قابلیت تولید لیپید بالا جهت استفاده از آن در مصارف صنعتی بود. لذا شناسایی در این مرحله تنها با استفاده از روش های بیوشیمیایی انجام پذیرفت. شناسایی ابتدا بر اساس خصوصیات کلنی بر روی پلیت و نمای میکروسکوپی صورت گرفت. مشخصات ماکروسکوپی سویه ی مورد نظر بر روی محیط جامد YPD به صورت کلنی موکوئیدی، گرد، براق، نرم، کوچک و شیری رنگ و مشخصات میکروسکوپی آن به صورت سلول های کروی و مونوپلار بود. پس از آن شناسایی مخمرها بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی صورت گرفت. نتایج تست های بیوشیمیایی انجام شده برای سویه ی مورد نظر به صورت جدول 2 به دست آمد.

بر اساس نتایج به دست آمده و مطابقت آن با کلید تست های مخمری و ویژگی های میکروسکوپی و ماکروسکوپی، نمونه ی Aa_2 از جنس کاندیدا بوده و با کمک تست های بیوشیمیایی گونه ی پالمی اولئوفیلا برای این مخمر به دست می آید. البته برای تعیین دقیق سویه ها در حد گونه، باید تست های مولکولی انجام گردد که در این تحقیق هدف یافتن سویه ی مخمری بومی (داخل کشور) با پتانسیل بالای تولید لیپید، معرفی آن در حد جنس، بهینه سازی تولید لیپید در آن و بررسی لیپید تولید شده بود. نتایج بهینه سازی با کمک روش تاگوچی و میزان قند که پارامترهای راندمان رشد و تولید را تعیین می کند در جدول 3 نشان داده شده است.

جدول 2- نتایج تست های بیوشیمیایی (2a – نتایج جذب ، 2b- نتایج تخمیر ،2c- نتایج سایر تست ها)

منبع کربن	نتایج Aa_2
گلوکز	+
سوکروز	+
مالتوز	+
لاکتوز	-
ملیبیوز	+
د- زایلوز	+
ال- آرابینوز	+
اینولین	-
د- مانیتول	+
اینوزیتول	+
د- مانوز	+
سلوبیوز	n
نشاسته	-
سیترات	-

2A – نتایج جذب

2B- نتایج تخمیر

منبع کربن	نتایج Aa2
گلوکز	-
سوکروز	-
مالتوز	-
لاکتوز	-

2C - نتایج سایر تست ها

نوع تست	نتایج Aa_2
نیترات	n
رشد در 50٪ گلوکز	N
رشد در10٪ NaCl -5٪ گلوکز	n
رشد دردمای 25°C	+
رشد دردمای 37°C	+

n: no data

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 3. نتایج تاگوچی، بیومس خشک، درصد تولید، راندمان رشد و راندمان تولید لیپید

آرایه ها	میزان تولید لیپید(g/L)	بیومس خشک (g/L)	SCO Productivity	Growth Yield Efficiency	SCO Yield Efficiency
آرایه ی 1	4/61	14/36	32/1	26/59	8/53
آرایه ی 2	4/81	14/66	32/8	24/76	8/12
آرایه ی 3	5/15	14/71	35	22/98	8/04
آرایه ی 4	2/58	9/05	28/5	28/1	8/01
آرایه ی 5	4/35	13/8	31/5	25/79	8/13
آرایه ی 6	4/86	14/77	32/9	24/38	8/03
آرایه ی 7	5/35	15/73	34	24/46	8/32
آرایه ی 8	3/52	11/42	30/8	25/95	8
آرایه ی 9	3/12	10/26	30/4	25/9	7/87
آرایه ی10	5/03	14/70	34/2	23/94	8/19
آرایه ی11	5/44	14/39	37/8	21/22	8/02
آرایه ی12	4/31	13/68	31/5	26/3	8/28
آرایه ی13	3/11	10/28	30/24	27/05	8/18
آرایه ی14	4/88	14/83	32/9	24/88	8/18
آرایه ی15	4/97	15/01	33/1	25/01	8/28
آرایه ی16	4/67	14/36	32/5	24/75	8/05

نتایج ANOVA (آنالیز واریانس) برای این سویه نیز به صورت جدول 4 می باشد. در این جدول تاثیر هر یک از پارامترها بر میزان تولید لیپید در ستون آخر نشان داده است. طبق این نتایج بیشترین اثر بر تولید لیپید مربوط به میزان کربن می باشد (58/664%). بیشترین میزان مجموع خالص مربعات نیز مربوط به میزان کربن می باشد. کمترین اثر نیز مربوط به میزان نیتروژن است.

جدول 5 تاثیر متقابل فاکتورهای مختلف را نشان می دهد. با توجه به جدول 4 متوجه می شویم که فاکتوری نظیر نیتروژن که دارای کمترین درصد تاثیر در بین نتایج آنالیز واریانس بود دارای بیشترین تاثیر متقابل با فاکتور rpm است (SI= %82/44). بنابراین چنانچه تاثیر متقابل یک فاکتور با فاکتور دیگر در روند مطالعه ارزشمند باشد باید سطوح بهینه عوامل مختلف را با توجه به جدول تاثیر متقابل انتخاب کرد. به این معنا که مثلاً در این مطالعه عواملی مثل میزان نیتروژن و یا مدت زمان دارای میزان تاثیر ناچیزی در حدود 0/4 و 0/5 درصد به ترتیب هستند. چنانچه فقط بیشترین میزان تولید لیپید مدنظر باشد، به این نتیجه می رسیم که این عوامل تاثیر چندانی نداشته و حتی می توان آن ها را از روند بهینه سازی حذف کرد ولی ممکن است در مطالعه ای مثلاً در بررسی های ویژه ای نظیر مطالعات مرتبط با عملکرد ژن ها و یا آنزیم ها میزان نیتروژن و نحوه عملکرد میکروارگانیسم و تاثیر فاکتوری مثل مدت زمان بر آن ارزشمند باشد.

جدول 4. نتایج آنالیز واریانس در مورد تولید لیپید در مخمر Aa2

عامل	درجه آزادی	مجموع مربعات(S)	واریانس	نسبت F	مجموع خالص مربعات(S')	درصد تاثیر عامل
نیتروژن	2	0/094	0/047	2/003	0/047	0/413
کربن	3	6/75	2/25	95/893	6/68	58/664
دما	1	1/742	1/742	74/254	1/718	15/095
مدت زمان	3	0/13	0/043	1/855	0/06	0/528
pH	3	2/433	0/811	34/566	2/362	20/75
هوادهی	1	0/189	0/189	8/064	0/165	1/455
اثرعوامل محیطی(خطا)	2	0/046	0/023	-----	-----	3/095
مجموع	15	11/387	-----	-----	-----	100

این جدول به ما کمک می کند که بفهمیم دو عامل کم تاثیر بر روند بهینه سازی، می توانند دارای تاثیر متقابلی در حدود 40/5 درصد(طبق جدول 5) باشند؛ که در مطالعات علمی ارزشمند است ولی از دیدگاه اقتصادی و صنعتی در روند بهینه سازی اهمیت چندانی ندارد.

جدول 5. درصد تاثیر متقابل عوامل مختلف موجود در روند بهینه سازی

Interacting Factor Pairs	SI(%)	Opt
Nitrogen × rpm	82/44	(2و1)
Temperature × pH	54/17	(1و2)
Nitrogen × Time	40/51	(3و4)
Nitrogen × Temperature	35/18	(3و1)
Glucose× Temperature	33/75	(3و2)
pH × rpm	26/65	(3و1)
Glucose × pH	25	(3و2)
Nitrogen × pH	22/52	(3و2)
Glucose ×Time	22/2	(3و4)
Nitrogen× Glucose	10/23	(3و3)
Time × pH	9/61	(4و2)
Temperature × rpm	7/69	(1و1)
Time × rpm	7/37	(4و1)
Glucose × rpm	5	(3و1)
Temperature × Time	0/42	(1و4)

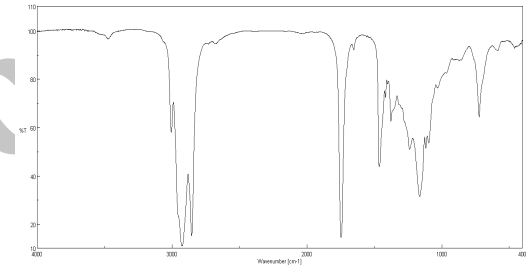
I= Interaction Severity Index
Opt= The Factor Levels Desirable for the Optimum Condition

Archive of SID

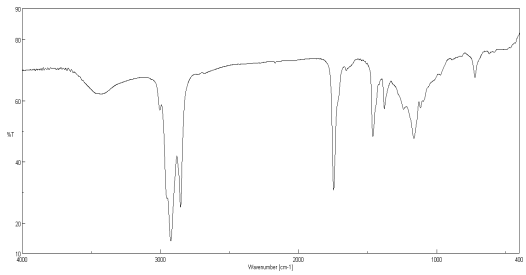
www.SID.ir

بررسی روغن میکروبی با تکنیک FTIR Spectroscopy:

گراف های حاصل از نمونه روغن تولیدی سویه مخمری Aa2 و تری اولئین استاندارد در شکل شماره 1 (a,b) نشان داده شده است. مقایسه دو گراف تشابه قابل توجهی بین روغن جداسازی شده از سویه مخمری و استاندارد مربوطه را نشان می دهد. 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(۱۷،۱۸، 19). بررسی و تایید ترکیب بیودیزل به صورت یک متود شناسایی در استاندارد اروپایی به شماره EN 14078 آورده شده است (18).



شکل شماره 1a: گراف FTIR مربوط به استاندارد تری اولئین



شکل شماره 1b: گراف FTIR مربوط به روغن استخراج شده از

بحث

نمونه هایی از پژوهش های محققین مختلف و میزان تولید لیپید در مخمر مورد بررسی توسط آن ها در این جا آورده شده تا بتوان مخمر بومی جداسازی شده در این تحقیق را با آن ها مقایسه کرد. Hassan و همکارانش میزان تولید لیپید در *کریپتوکوکوس کرواتوس* بر روی گلوکز را به صورت 7/31 g/L چربی و 53% محتوای لیپیدی پس از یک هفته انکوباسیون گزارش کردند(20). Han و همکارانش با کشت *کریپتوکوکوس پوتوتکوئیدس* بر روی هیدورولیزات نشاسته میزان محتوای لیپیدی را معادل 46/13% گزارش کردند(21).

Papanikolaou و همکارانش با کشت *یارویا لیپولیتیکا* به مدت 4 روز بر روی استئارین میزان محتوای لیپیدی و تولید تری آسیل گلیسرول را معادل 52% و 7/9 g/L گزارش کردند(22). Ratledge و Wynn گزارش دادند که از بین 600 گونه مخمری تنها 25 عدد از آن ها می توانند بیشتر از 20% لیپید تجمع دهند. هر چند از آن زمان تا کنون سویه های بیشتری با این توانایی شناسایی شده اند ولی هنوز هم سویه هایی با توانایی تجمع لیپید به میزان بالا ارزشمند هستند(23).

سویه ی مخمری(Aa2) که در این تحقیق جداسازی شد دارای میزان تولید لیپید معادل 5/44g/l و میزان محتوای لیپیدی در این سویه معادل 37/8% بود که نشان می دهد این سویه دارای توانایی تولید لیپید به میزان بالایی بوده و پتانسیل کاربرد های صنعتی را دارد.

Pan و همکارانش در سال 2009 با کمک رنگ آمیزی سودان سیاه 13 سویه ی مخمری که توانایی جذب زایلوز و تولید لیپید را داشتند، جداسازی کردند. بالاترین میزان تولید لیپید توسط یکی از این سویه ها 5/68 g/L با بیومس 22/3 g/L گزارش شده که در این حالت در صد تولید لیپید 25/47% بوده است(14). لیزینگ نیز در سال 2011 مخمر مولد چربی *تورولاسپورا گلوبوسا* سویه YU5 (Torulaspora globasa YU5/2) را جداسازی و به میزان تولید لیپید معادل 4/16 g/L در محیط دارای محدودیت نیتروژن و میزان 80 g/L گلوکز دست یافت(24).

Ratledge و همکارش گزارش دادند که غلظت گلوکز مهم ترین فاکتور موثر بر تولید لیپید در مخمرهای مولد چربی است همان طور که می بینید در این تحقیق نیز غلظت گلوکز دارای 58% تاثیر است که نشان دهنده اهمیت این فاکتور بر تولید لیپید می باشد(23). Syed و همکارانش گزارش دادند که افزایش غلظت گلوکز منجر به کاهش بیومس خشک می شود. این موضوع ممکن است به علت عدم تحمل سلول های مخمری به غلظت بالای گلوکز باشد زیرا پتانسیل اسمزی محیط را افزایش می دهد(25). به همین دلیل است که در این تحقیق نیز افزایش غلظت گلوکز تا میزان 75g/l دارای اثر مثبت بر تولید لیپید بوده و در سطح چهارم یعنی 95g/l همان طور که در شکل 2 مشاهده می کنید میزان تولید لیپید کاهش می یابد.

Archive of SID
www.SID.ir

El-Fadaly و همکارانش اثر pH 4 تا 7 را بر روی میزان تولید لیپید در مخمر کریپتوکوکوس *آلبیدوس* بررسی کردند. بهترین pH به صورت 5/5 بوده که میزان تولید در آن به 1/7g/L رسیده است. در این تحقیق نیز مخمر کاندیدا در pH 6 که در همین محدوده قرار گرفته است بیشترین میزان تولید لیپید را نشان داده است(26).

این نتایج نشان می دهد سویه های مخمری مختلف برحسب نوع سویه دارای شرایط بهینه متفاوتی هستند که با استفاده از آزمایش های مربوطه قابل دستیابی می باشد. بهینه سازی شرایط کشت قبل از کاربرد سویه مخمری در مقاطع صنعتی مورد نیاز است.

نتیجه گیری

این سویه با درصد تولید حدود 40% و میزان تولید لیپید 5/44 g/L در شرایط بهینه قابلیت استفاده در زمینه های مختلف صنعتی را دارد. بهینه سازی این سویه باعث افزایش میزان تولید لیپید از 28/5% به 40% شد. جداسازی این سویه بومی با پتانسیل بالای تولید لیپید نوید بخش جداسازی سایر سویه های مولد چربی و همچنین استفاده از این مخمر ها در زمینه های مختلف صنعتی است. این سویه با قابلیت تولید لیپید می تواند سوبسترای لازم برای تولید سوخت زیستی را فراهم نماید.

تشکر و قدردانی

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

References

1- Ratledge C. Single Cell Oils, Lipid Research Center, 2005, 1-20.
2- 2-Zhao X, Kong X, Hua Y. *Medium Optimization for lipid production through co-fermentation of Glucose and Xylose by the Oleaginous Yeast*. Lipomyces Starkei. 2008; 405-412.
3- Li Q, Du W, Liu D. *Perspective of microbial oils for biodiesel production.* Appl Microbial Biotechnol. 2008; 80:749-756.
4- Dai C, Tao J, Xie F, Dai Y J, Zhao M. *Biodiesel generation oleaginous yeast Rhodotorula glutinis with xylose assimilating capacity*. African Journal of Biotechnology. 2007; 2130-2134.
5- Karatay SE, Donmez G. *Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses*. Bioresource Technology. 2010; 7988-7990.
6- Fei Q, Chang H et al. *The effect of volatile fatty acid as a sole carbon source on lipid accumulation by Cryptococcus albidus for biodiesel production.* Bioresource Technology. 2010; 102:2695-2701.
7- Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. *Biodiesel production from oleaginous microorganisms*. Renewable Energy. 2009; 1-5.
8- Kosa M, Ragauskas A J. *Lipids from heterotrophic microbes:advances in metabolism research*. Department of chemistry and biochemistry. 2010; 4-10.
9- Liu G Q, Lin Q L, Jin X C, Wang X L, Zhao Y. *Screening and fermentation optimization of microbial lipid-producing molds from forest soils*. African Journal of Microbiology. 2010; 1462-1468.
10- Yazdani SS, Gonzalez R. *Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry*. ScienceDirect.2007; 18:213-219.
11- Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, Lucia M D, 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*. Department of chemistry.2010; 10-15.
12- 12-Raschke D, Knorr D. *Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in oleaginous yeast Waltomyces lipofer*, Journal of Microbiologocal Methods. 2009; 178-183.
13- Manuel A J, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. *Oily yeasts as oleaginous cell factories*. Appl Microbiol Biotechnol. 2011; 4-5.
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*. Food technol Biotechnol. 2009; 215-220.
15- Alvarez AF, Alvarez HM, Kalscheuer R, Waltermann M, Steinbuchel A. *Cloning and characterization of a gene involved in triacylglycerol biosynthesis and identification of additional homologous genes in the oleaginous bacterium Rhodococcus opacus PD630*. Microbiology. 2008; 2327-2335.
16- Pelizzola V, Povolo M, Avalli A, Bottari B, Neviani E, Contarini G. *Study on lipid fractions of Streptococcus thermophilus by TLC, GC and GC/MC techniques*. The Open Analytical Chemistry Journal. 2007; 1: 15-20.
17- 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.
18- European Standard EN 14078: Liquid petroleum products –Determination of fatty acid methyl esters (FAME) in middle distillates – Infrared spectroscopy method.
19- 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; pp: 141.
20- Hassan M, Blanc PJ, Granger LM, Pareilleux A, Goma G. *Influence of nitrogen and iron limitation on lipid production by Cryptococcus curvatus grown in batch and fed-batch culture*. Process Biochem. 1996; 31: 355-361.

Archive of SID
www.SID.ir

21- Han X, Miao XL, Wu QY. *High quality biodiesel production from heteotrophic growth of chlorella Protothecoides in fermenters by using starch hydrolysate as organic carbon*. J Biotech. 2006; 126(4): 499-507.
22- Papanikolaou S, Chevalot I, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Marc I, Aggelis G. *Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single cell protein and lipase production by Yarrowia lipolytica*. Electron J Biotechnol. 2007; 10: 425-435.
23- Ratledge C, Wynn JP. *The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms*. Adv Appl Microbiol. 2002; 51:1-51.
24- Leesing R, Baojungharn R. *Microbial Oil production by isolated oleaginous yeast Torulaspora globosa YU5/2*. World academy of science, Engineering and Technology. 2011; 76:799-803.
25- Syed MA, Singh SK, Pandey A, Kanjilal S, Prasad RBN. *Effects of various process parameters on the production of α-Linolenic acid in submerged fermentation*. Food Technol Biotechnol. 2006; 44:282-287.
26- 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.

Archive of SID

www.SID.ir