Archive of SID

کاربرد فرایندهای آماری در بهبود تولید لیپید توسط مخمر بومی اولئوژنز *Rhodotorula* spp. سویه Yr_2

حسین قنواتی[1*]، آزاده عبدلی[2]، ایرج نحوی[3]، مرجان انشائیه[2*]، محبوبه مدنی[4]

1- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
2- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان
3- استاد بخش میکروبیولوژی ، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
4- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان

تاریخ دریافت: 1390/12/21، تاریخ پذیرش: 1391/3/22

چکیده

در این تحقیق به منظور بهینه سازی تولید لیپید توسط مخمر اولئوژنز بومی *Rhodotorula* spp. **سویه** Yr_2، از دو روش تک فاکتوره و طراحی تاگوچی استفاده گردید و نتایج بدست آمده با یکدیگر مقایسه شد. فاکتورهای مورد بررسی در هر دو روش شامل دما، هوادهی، منبع نیتروژن، منبع کربن، pH و مدت زمان انکوباسیون بودند. با توجه به آزمایشات صورت گرفته در روش تک فاکتوره، بیشترین میزان تولید در حالت منبع ازت از نوع سولفات آمونیوم(1 g/L)، منبع کربن از نوع گلوکز(90 g/L)، دمای 25 C°، هوادهی 150 rpm، مدت زمان انکوباسیون 96 ساعت و pH تنظیم شده در 6 بدست آمد که در شرایط مذکور مقدار لیپید تولیدی به 8/9 g/L رسید. درحالیکه در روش تاگوچی برنامه ریزی کل آزمایشات توسط نرم افزار Qualitek-4 و در قالب طراحی L16 انجام پذیرفت. شرایط اپتیمم پیش بینی شده توسط نرم افزار در حالت منبع ازت از نوع سولفات آمونیوم(1 g/L)، منبع کربن از نوع گلوکز(75 g/L)، دمای 25 C° ، هوادهی 150 rpm، مدت زمان انکوباسیون 72 ساعت و pH تنظیم شده در 6/5 بود و در این شرایط میزان تولید لیپید توسط نرم افزار 11/052 g/L پیش بینی گردید که میزان آن در حالت عملی تا 95% پیش بینی تاگوچی(10/49 g/L) به دست آمد. طبق نتایج آنالیز واریانس بدست آمده با طرح تاگوچی مدت زمان، میزان کربن، دما، pH و میزان نیتروژن به ترتیب بیشترین اثر را بر روی میزان تولید لیپید داشتند. با توجه به نتایج بدست آمده، طرح تاگوچی میزان تولید را تا 1/59 g/L و در حدود 18 % بالا برده است که نشان دهنده کارایی بالای این طرح در مقایسه با طرح تک فاکتوره می باشد.

واژه های کلیدی: *روغن میکروبی، بهینه سازی تک فاکتوره، بهینه سازی با طرح تاگوچی.*

* نویسنده مسئول: حسین قنواتی تلفن: 09131651164 Email: ghanavatih@hotmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لیپید میکروبی از نظر نوع و ترکیب به روغن به دست آمده از گیاهان و حیوانات شباهت دارد. حوادث کلیدی که باعث افزایش توجه به روغن میکروبی در طی چند سال گذشته شده است، اهمیت غذایی اسیدهای چرب غیر اشباع و نبودن منبع گیاهی مناسب برای به دست آوردن آن ها می باشد. تولید روغن های مخمری معمولاً پر هزینه تر از روغن های گیاهی است. بنابراین تولید روغن میکروبی تنها زمانی که از نظر اقتصادی به صرفه باشد، با ارزش است. کاهش هزینه‌ی تولید، با کاربرد سوبستراهای ارزان قیمت و بهینه سازی فرایند، قابل دستیابی است. تری آسیل گلیسرول به عنوان سوخت ذخیره ای در بیشتر سلول های یوکاریوتی تجمع می یابد. احیا بودن بیشتر اتم های کربن تری آسیل گلیسرول باعث آزاد شدن میزان زیادی از انرژی می شود. علاوه بر این آب گریز بودن آن باعث می شود که نیاز به حمل آب هیدراتاسیون نداشته باشد (Lehninger *et al.*, 1942). تجمع لیپید خنثی که بیشتر شامل تری آسیل گلیسرول و استریل استرهاست، یک پاسخ القا شده به واسطه ی استرس محیطی است که در آن روغن به عنوان یک ذخیره داخل سلولی در مخمرها تجمع می یابد (Ratledge 2005). تشکیل ذرات لیپیدی در اواخر فاز لگاریتمی شروع شده و طی فاز سکون ادامه می یابد (Raschke & Knorr, 2009). دو آنزیم مهم موثر بر تجمع لیپید، آنزیم مالیک و ATP-سیترات لیاز هستند. رابطه ی قوی بین فعالیت ATP-سیترات لیاز و توانایی تجمع لیپید در سلول های مخمری وجود دارد(Fidler *et al.*, 1999; Meng *et al.*, 2009). علت این که میکروارگانیسم های مولد چربی توانایی ذخیره ی مقادیر متفاوتی لیپید داخل سلولی را دارند به فعالیت آنزیم مالیک در مقایسه با ATP-سیترات لیاز است. فعالیت آنزیم مالیک به واسطه ساختار ژنتیکی سلول کنترل می شود. در سلول هایی که مقادیر قابل توجهی لیپید تجمع می دهند ژن مربوط به سنتز آنزیم مالیک در همه مواقع روشن است. در حالی که در سلول های با میزان لیپید کم، ژن بعد از مصرف نیتروژن خاموش می شود، وقتی این اتفاق می افتد فعالیت آنزیم مالیک و تجمع لیپید متوقف می شود. این موضوع علت تفاوت میکروارگانیسم ها در تجمع یا عدم تجمع لیپید، همچنین تفاوت در میزان تجمع می باشد(Wynn *et al.*, 2005). بیوژنز اجسام لیپیدی ممکن است از طریق جوانه زدن از شبکه اندوپلاسمی صورت گیرد. آنزیم ها در شبکه اندوپلاسمی سنتز لیپیدهای خنثی را انجام می دهند که این لیپیدها بین دو طرف غشا شبکه اندوپلاسمی برای تشکیل اجسام لیپیدی نابالغ رسوب می کنند. زمانی که این ساختار به اندازه معینی رسید، برای تشکیل اجسام لیپیدی جوانه می زند (Kraisintu *et al.*, 2010).

میکروارگانیسم های مولد چربی به علت سرعت رشد زیاد و توانایی آن ها در جذب منابع کربنی متفاوت که در محصولات جانبی بسیاری از صنایع یافت می شود، مورد توجه هستند

www.SID.ir

Archive of SID

(Economou *et al.*, 2010). پارامترهای مهمی که قیمت روغن مخمری را مشخص می کنند شامل هزینه ی سوبسترا، سرعت تولید و غلظت نهایی محصول است (Meester *et al.*, 1996). روش متداول برای بهینه سازی تولید محصول، روش تک فاکتوره می باشد. در این روش اثر یک عامل در یک زمان بررسی می شود و سایر عوامل ثابت نگه داشته می شوند. بدین ترتیب با متغیر قرار دادن عوامل مختلف نهایتاً به میزان بهینه برای هر یک از عوامل دست می یابیم. اما، در طراحی آزمایشات تعدادی از حالات ممکن بین متغیرهای مختلف انتخاب شده و با کمک نتایج به دست آمده از این حالات، ارزیابی آماری صورت می‌گیرد و حالت بهینه تعیین می شود. برای افزایش سرعت تولید و غلظت نهایی محصول، بهینه سازی شرایط تولید در مخمر مورد استفاده، اهمیت زیادی دارد. اکثراً برای بهینه سازی از روش یک متغیر در یک زمان استفاده می شود که این روش به علت نیاز به بررسی تمام حالات ممکن، بسیار وقت گیر و هزینه بر است. برای کاهش تعداد آزمایشات مورد بررسی می توان از روش طراحی آزمایشات استفاده کرد. یکی از انواع روش های طراحی، روش تاگوچی است. با کمک این طراحی تعداد آزمایشات لازم کمتر شده و نتیجه دقیق تری به دست می آید. همچنین امکان بررسی اثر متقابل بین عوامل مختلف وجود دارد. واریانس خطا در این روش با کمک فاکتوری تحت عنوان فاکتور pool سنجیده می‌شود (تاثیر کمتر از 10%، البته این میزان بستگی به نوع آزمایش و طراح دارد). فاکتورهای pool شده را می توان برای کاهش هزینه ها حذف نمود. یکی از تکنیک هایی که جهت تایید نوع ترکیب یک محصول به کار گرفته می شود تکنیک FTIR (Fourier Transform Infrared) Spectroscopy 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(Lin-Vein *et al.*, 1991; Elumalai *et al.*, 2011; European Standard EN 14078).

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی

سویه مخمر بومی الئوژنز از جنس *Rhodotorula* spp. با نام اختصاری Yr_2، از نمونه خاک اطراف اصفهان جداسازی گردید. جهت جداسازی از محیط کشت مورد استفاده توسط Dai *et al.* (2007) استفاده شد. شناسایی در حد جنس انجام گرفت و با توجه به خصوصیات مرفولوژیک و تست های بیوشیمیایی مخمر مورد نظر در جنس ردوترولا (*Rhodotorula* sp.) قرار گرفت (Kurtzman & Fell, 1998).

محیط های کشت فعال سازی و تولید

برای این منظور در ابتدا سویه ی مورد نظر به محیط پیش تولید (محیط فعال سازی) انتقال

www.SID.ir

Archive of SID

داده شد. این محیط حاوی g/L 15 گلوکز، g/L $(NH_4)_2SO_4$5، g/L $KH_2PO_4$1، g/L 0/5 $MgSO_4.7H_2O$ و g/L 0/5 عصاره مخمر با pH= 5 بوده و به مدت 48 ساعت در دمای 28ºC و 180rpm قرار گرفت. پس از آن به محیط تولید که دارای g/L 35 گلوکز، g/L 2 $(NH_4)_2SO_4$، g/L 7 KH_2PO_4، g/L 2 NaH_2PO_4، g/L 1/5 $MgSO_4.7H_2O$ و g/L 1 عصاره مخمر با pH= 6 می باشد، انتقال داده و به مدت 72 ساعت در دمای 28ºC و در شیکر با دور 180rpm قرار گرفت (Pan *et al.*, 2009).

استخراج لیپید

استخراج لیپید طبق روش Bligh & Dyer اصلاح شده صورت گرفت (Pan *et al.* 2009). در این روش ml 50 نمونه کشت داده شده بر روی محیط تولید در rpm 5000 به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ و دو مرتبه شست و شو داده شد. به بیومس حاصل 10ml اسید کلریدریک 4 مولار اضافه گردید و به مدت 1 ساعت در دمای ºC 60 قرار داده شد. پس از آن ml 20 متانول - کلروفرم 1:1 به بیومس هیدرولیز شده با اسید، اضافه گردید و 2 الی 3 ساعت همزنی صورت پذیرفت. سپس در 5000rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ گردید تا دو فاز آبی بالایی و آلی پایینی جدا شوند. فاز پایینی با پیپت پاستور جدا شد و در خلا با دستگاه دسیکاتور خشک گردید و چربی بدست آمده وزن شد (Pan *et al.*, 2009).

بهینه سازی تولید لیپید به روش تک فاکتوره

برای این منظور در ابتدا منبع نیتروژن آلی و معدنی مورد آزمون قرار گرفت. از بین منابع آلی عصاره مخمر و پپتون و از بین منابع معدنی سولفات آمونیوم و کلرید آمونیوم بررسی گردید. میزان هر یک از منابع آلی و معدنی g/L 1 در نظر گرفته شد. پس از آن بهینه سازی تک فاکتوره برای میزان سولفات آمونیوم 0/5، 1 و 1/5 گرم بر لیتر ، میزان گلوکز 35، 55 ،75 ، 95 و 115 گرم بر لیتر، میزان هوادهی rpm 200 و 150 ، میزان pH 5 ، 5/5 ، 6 ، 6/5 و مدت زمان انکوباسیون 24، 48، 72 و 96 ساعت انجام گرفت. برای این منظور میزان بهینه برای نیتروژن انتخاب شد، پس از آن میزان کربن بررسی گردید و به همین ترتیب ادامه داده شد، یعنی میزان بهینه ی هر فاکتور در هر مرحله انتخاب شده و در مرحله ی بعدی مورد استفاده قرار گرفت تا نهایتاً بهترین میزان برای همه ی پارامترها به دست آمد.

بهینه سازی تولید لیپید به روش تاگوچی

در این روش با کمک نرم افزار Qualitek-4 در ابتدا برنامه ریزی برای طراحی صورت پذیرفت. برای میزان دما و هوادهی 2 سطح، میزان نیتروژن 3 سطح و میزان گلوکز، pH و مدت زمان انکوباسیون 4 سطح در نظر گرفته شد. بر این اساس طراحی L16 توسط نرم افزار انتخاب گردید که مشتمل بر 16 آزمایش بود. یعنی با 16 آزمایش برنامه ریزی شده و با مشخص بودن برنامه ی کار تا انتها، بهترین حالت به دست آمد. چنانچه حالت بهینه در بین 16 آزمایش ما نباشد

www.SID.ir

Archive of SID

باز هم توسط نرم افزار بهترین حالت انتخاب می گردد و مقدار تولید در شرایط بهینه توسط نرم افزار پیش بینی می شود. جدول 1 طراحی L16 را نشان می دهد.

جدول 1- طراحی L16 تاگوچی برای بهینه سازی تولید لیپید.

Table 1- L16 Taguchi design for optimization of lipid production .

آرایه ها Arrays	نیتروژن Nitrogen	کربن Carbon	دما Temperature	مدت زمان Time	pH	هوادهی(rpm) aeration
آرایه ی 1 (Array 1)	0.5	55	25	24	6	150
آرایه ی 2 (Array 2)	0.5	75	25	48	5.5	200
آرایه ی 3 (Array 3)	0.5	95	35	72	6	150
آرایه ی 4 (Array 4)	0.5	115	35	96	6.5	200
آرایه ی 5 (Array 5)	1	55	25	96	6	200
آرایه ی 6 (Array 6)	1	75	25	72	6.5	150
آرایه ی 7 (Array 7)	1	95	35	48	5	200
آرایه ی 8 (Array 8)	1	115	35	24	5.5	150
آرایه ی 9 (Array 9)	1.5	55	35	48	6.5	150
آرایه ی10 (Array 10)	1.5	75	35	24	6	200
آرایه ی11 (Array 11)	1.5	95	25	96	5.5	150
آرایه ی12 (Array 12)	1.5	115	25	72	5	200
آرایه ی13 (Array 13)	0.5	55	35	72	5.5	200
آرایه ی14 (Array 14)	0.5	75	35	96	5	150
آرایه ی15 (Array 15)	0.5	95	25	24	6.5	200
آرایه ی16 (Array 16)	0.5	115	25	48	6	150

بررسی تولید روغن تک یاخته بوسیله تکنیک Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy

تولید لیپید در سویه مخمری جداسازی شده، در ابتدا بوسیله روش رنگ آمیزی با سودان سیاه مورد تایید قرار گرفت و به منظور تایید تکمیلی و حتمی ترکیبات روغنی تولید شده از تکنیک FTIR Spectroscopy، با استفاده از دستگاه مدل JASCO FT/IR-6300, Japan استفاده گردید. گستره مورد بررسی دستگاه از 400 cm^{-1} تا 4000 cm^{-1} تنظیم شد. استاندارد تری اولئین (خریداری شده از شرکت سیگما آلدریچ-آلمان) به عنوان شاهد و جهت مقایسه با روغن تک یاخته تولیدی مورد استفاده قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

بهینه سازی تولید لیپید با طرح تک فاکتوره

تولید در شرایط اولیه ی بدون بهینه سازی به صورت 6/17 g/L لیپید، 17/82 g/L بیومس خشک و 34/62% تولید لیپید می باشد. نتایج حاصل از بهینه سازی به روش تک فاکتوره در جدول 2 ارائه شده است. همان طور که در این جدول نشان داده شده است، ابتدا بهترین منبع نیتروژن بدست آمده است که این منبع سولفات آمونیوم می باشد. بعد از آن منبع کربن مناسب بد ست آمد که بهترین آن گلوکز بود. در مرحله بعد غلظت مناسب برای منبع نیتروژن بدست آمد که مقدار آن 1 g/L بدست آمد و با این مقدار میزان تولید لیپید تا 7/2 g/L افزایش یافت. سپس غلظت منبع کربن انتخابی مورد ارزیابی قرار گرفت که در غلظت 90 g/L گلوکز بیشترین میزان تولید(7/13 g/L) بدست آمد. بهینه سازی برای دما، هوادهی، مدت انکوباسیون و pH نیز به ترتیب انجام پذیرفت و نتایج این بررسی در جدول شماره 2 مشخص می باشد. در پایان بهینه سازی تک فاکتوره بیشترین میزان تولید 8/9 g/L بدست آمد که مربوط به منبع ازت سولفات آمونیوم (1g/L)، منبع کربن گلوکز (90g/L)، دمای 25 درجه سانتیگراد، هوادهی در 150 rpm، مدت زمان انکوباسیون 96 ساعت و pH تنظیم شده در 6 بدست آمد. منبع ازت آلی تاثیر به سزایی در تولید لیپید نداشته است. افزایش میزان کربن تا 90g/L منجر به افزایش تولید لیپید می- شود، اما افزایش بیش از این مقدار منجر به کاهش تولید لیپید می گردد. دمای بهینه نیز با توجه به محیطی بودن سویه ی مورد نظر 25 ºC است. با افزایش میزان rpm نیز میزان تولید تا حدودی کاهش می یابد. پس از بهینه سازی به روش تک فاکتوره، بهینه سازی به روش طراحی تاگوچی انجام پذیرفت. با توجه به این که نوع منبع ازت آلی تاثیر زیادی بر تولید لیپید نداشته است در طراحی تاگوچی این فاکتور را حذف می کنیم و تنها غلظت سولفات آمونیوم را بهینه می نماییم. در پژوهشی، Kraistinta *et al.* (2010) اثر عواملی نظیر غلظت گلوکز، عصاره مخمر، سولفات آمونیوم، سولفات منیزیم و pH را بر روی تولید لیپید در مخمر رودوسپوریدیوم تورولوئیدس DMKU3-TK16 را بررسی کردند. میزان تولید لیپید در مخمر مورد بررسی در شرایط بهینه (70 g/L گلوکز، 0/55 g/L سولفات آمونیوم، 0/75 g/L عصاره مخمر و 2g/L سولفات منیزیم) به 71/3% از وزن خشک آن گزارش شده است. در تحقیقی که توسط Kumar *et al.* (2010) انجام گرفت، اثر منابع کربنی مختلف نظیر گلوکز، فروکتوز و سوکروز را بر روی میزان تولید لیپید در مخمر رودوتورولا گلوتینیس بررسی گردید. در میان منابع کربنی بررسی شده توسط آنها، گلوکز بیشترین بیومس و محتوای لیپیدی را ایجاد می کند. میزان تولید لیپید، بیومس و درصد تولید نسبت به وزن خشک در این مخمر به صورت 2/43 g/L، 10/21 g/L و 23/78% گزارش شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2- نتایج حاصل از تولید لیپید به روش تک فاکتوره

Table 2: Results of lipid production by the one factor at a time optimization method.

*درصد تولید لیپید به وزن خشک *Percent of lipid to dry biomass	*بیومس خشک (g/L) *Dry biomass	*مقدار لیپید تولیدی (g/L) *Amount of lipid production	شرایط Conditions
			منبع نیتروژن(g/L) (Nitrogen source)
35.78	17.57	6.29	عصاره مخمر و سولفات امونیوم (1) Ammonium sulfate & yeast extract
34.35	17.9	6.15	عصاره مخمر و کلرید امونیوم (1) Ammonium chloride & yeast extract
34.37	17.68	6.11	پپتون و سولفات امونیوم (1) Ammonium sulfate & peptone
34.55	17.88	6.18	پپتون و کلرید امونیوم (1) Ammonium chloride & peptone
			منبع کربن(g/L) (Carbon source)
36.1	17.45	6.3	گلوکز (50) glucose
30	17.16	5.15	زایلوز (50) xylose
			غلظت سولفات امونیوم (g/L) (Ammonium sulfate concentration)
55.8	12.36	6.0	0.5
56.3	12.78	7.2	1
54	12.4	6.7	1.5
			غلظت گلوکز(g/L)؛ Glucose concentration
35	12.42	4.35	35
40.2	16.21	6.52	55
53.2	10.79	5.84	75
56.1	12.7	7.13	95
50	11.42	5.71	115
			دما (°C)؛ Temperature
56.2	12.86	7.23	25
54.1	11.73	6.35	35
			هوادهی (rpm)؛ Aeration
56.28	13.04	7.34	150
54	12.64	6.83	200
			مدت زمان انکوباسیون(h)؛ Incubation time
48	9.58	4.6	24
52	11.59	6.03	48
56.2	14.14	7.95	72
57.5	15.39	8.85	96
			pH
57	15.49	8.83	5
57.4	14.54	8.35	5.5
58.2	15.29	8.9	6
57.8	14.84	8.58	6.5

* The data in the columns are means of three replicates * نتایج ارائه شده در ستونها میانگین سه تکرار می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

بهینه سازی شرایط برای تولید لیپید در مخمر رودوتورولا ماینوتا IIP-33 انجام گرفته است و نتیجه این تحقیق این بوده است که بر خلاف ویژگی های تکثر مخمرهای مولد چربی، نسبت کربن به نیتروژن معادل 30 برای تجمع لیپید به میزان حداکثر 48% کافی است (Saxena *et al.*, 1998).

بهینه سازی تولید لیپید به روش تاگوچی

نتایج حاصل از تولید در طراحی L16 در جدول 3 نشان داده شده است. بهترین حالت در آرایه ی 6 مشاهده می شود. شکل 1 نمودارهای مربوط به اثر هریک از عوامل میزان تاثیر آن ها را نشان می دهد. شکل 2 نیز نمودار درصد تاثیر عوامل مختلف را نشان می دهد.

هر یک از این نمودارها مربوط به اثر عوامل مختلف بر روی میزان تولید لیپید می باشد. شماره های 1، 2، 3 و 4 بر روی محور x ها نشان دهنده سطوح مختلف متغیرهاست و محور y نیز میزان تولید لیپید را نشان می دهد. نمودارها نشان می دهند که سطح دوم نیتروژن، سطح دوم کربن، سطح اول دما، سطح سوم مدت زمان، سطح چهارم pH و سطح اول rpm دارای بهترین اثر برای تولید لیپید می باشند.

شکل 2 درصد تاثیر هریک از عوامل را به صورت نمودار ستونی نشان می دهد. محور x نمایش دهنده فاکتورهای مختلف و محور y مربوط به درصد تاثیر هریک از عوامل می باشد. همان طور که می بینید مدت زمان و منبع کربن دارای بیشترین تاثیر بر روی تولید لیپید می باشند (20/5%). کمترین تاثیر نیز مربوط به خطای آزمایش می باشد.

جدول 4 اثر متقابل عوامل مختلف را نشان می دهد. 15 اثر متقابل مختلف بین دو فاکتور توسط نرم افزار محاسبه شده است. جالب توجه است که عاملی مثل rpm که دارای کمترین تاثیر در بین سایر عوامل بوده است دارای بیشترین اثر متقابل با فاکتور نیتروژن می باشد (SI=51.12%). با توجه به نوع مطالعه چنانچه اثر متقابل دو فاکتور دارای اهمیت باشد باید سطوح پیشنهادی در این جدول را برای رسیدن به میزان بیشتر تولید انتخاب کرد.

جدول 5 نتایج آنالیز واریانس را نشان می دهد. ستون آخر در جدول آنالیز واریانس، درصد تاثیر هر یک از عوامل را بر روی میزان تولید لیپید نشان می دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان می دهد که مدت زمان، میزان کربن، دما، pH و میزان نیتروژن به ترتیب دارای بیشترین اثر بر روی میزان تولید لیپید هستند. همان طور که مشاهده می کنید عوامل مدت زمان و منبع کربن دارای بیشترین مجموع خالص مربعات (S´) هستند اما عامل هوادهی دارای کمترین اثر نسبت به سایر عوامل می باشد. خطای آزمایش نیز همانطور که مشاهده می کنید بسیار ناچیز و نزدیک به صفر است. با توجه به جدول اثر متقابل و آنالیز واریانس در کنار هم متوجه می شویم، عاملی که به تنهایی می تواند اثر کمی داشته باشد، ممکن

www.SID.ir

Archive of SID

است دارای اثر متقابل قابل توجهی در رابطه با یک عامل دیگر باشد.

جدول 3- نتایج تولید لیپید در آرایه های طراحی تاگوچی.

Table 3: Lipid production in different arrays as designed by Taguchi method.

آرایه ها Arrays	میزان تولید لیپید(g/L) Amount of lipid production	بیومس خشک(g/L) Dry biomass
آرایه ی 1 (Array 1)	**4.15**	**13.17**
آرایه ی 2 (Array 2)	**5.98**	**16.98**
آرایه ی 3 (Array 3)	**5.12**	**14.88**
آرایه ی 4 (Array 4)	**4.83**	**15**
آرایه ی 5 (Array 5)	**5.82**	**16.62**
آرایه ی 6 (Array 6)	**10.97**	**18.84**
آرایه ی 7 (Array 7)	**4.13**	**13.12**
آرایه ی 8 (Array 8)	**5.16**	**14.95**
آرایه ی 9 (Array 9)	**5.1**	**14.86**
آرایه ی10 (Array 10)	**4.01**	**12.93**
آرایه ی11 (Array 11)	**6.36**	**16.82**
آرایه ی12 (Array 12)	**6.14**	**16.59**
آرایه ی13 (Array 13)	**4.03**	**12.93**
آرایه ی14 (Array 14)	**5.89**	**16.82**
آرایه ی15 (Array 15)	**5.34**	**15.34**
آرایه ی16 (Array 16)	**4.71**	**14.67**

بررسی و تایید روغن تک یاخته با تکنیک FTIR Spectroscopy

گراف های حاصل از نمونه روغن تولیدی مخمر Yr_2 و تری اولئین استاندارد در شکل 3 نشان داده شده است. همانطور که مقایسه دو گراف در شکل 3 نشان می دهد، بین روغن جداسازی شده از سویه مخمری و استاندارد تری اولئین شباهت بسیار زیادی وجود دارد. 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 (از نوع استری) است (ASTM D7371 method). این پیوند استری در ساختار تری آسیل گلیسرول (محل پیوند بین آسیل با گلیسرول) و نیز در اسیدهای چرب متیل استره شده (بیودیزل) وجود دارد. در حد فاصل بین 2850 تا $2929\ cm^{-1}$ نیز پیک های مشخص نشان دهنده گروه های متیلن می باشد که ساختار اصلی تشکیل دهنده اسیدهای چرب است (Elumalai *et al.*,

www.SID.ir

Archive of SID

2011). بنابراین پیک ها در نقاط قید شده اثبات کننده ترکیبات روغنی قابل تبدیل به بیودیزل است (Elumalai *et al.*, 2011، European Standard EN 14078 و Lin-Vien *et al.*, 1991).

جدول 4- اثر متقابل عوامل مختلف مربوط به طرح تاگوچی.

Table 4- Factor interaction effects in Taguchi method.

Interacting Factor Pairs	SI (%)[1]	Opt[2]
Nitrogen ×rpm	**51.12**	**(1,2)**
Carbon ×rpm	**49.08**	**(2,1)**
Nitrogen × Temperature	**47.81**	**(2,1)**
Carbon × Temperature	**39.7**	**(2,1)**
Nitrogen × Carbon	**23.74**	**(2,2)**
Temperature ×pH	**20.05**	**(1,4)**
pH ×rpm	**13.94**	**(4,1)**
Nitrogen ×Time	**11.7**	**(2,3)**
Nitrogen× pH	**7.5**	**(2,4)**
Temperature× rpm	**4.39**	**(1,1)**
Carbon× Time	**7.32**	**(2,3)**
Temperature ×Time	**7.16**	**(1,3)**
Time ×pH	**6.03**	**(3,4)**
Time ×rpm	**1.91**	**(3,1)**
Carbon ×pH	**1.5**	**(2,4)**

[1] SI: Interaction Severity Index; [2] Opt: the Factor Levels Desirable for the Optimum Condition

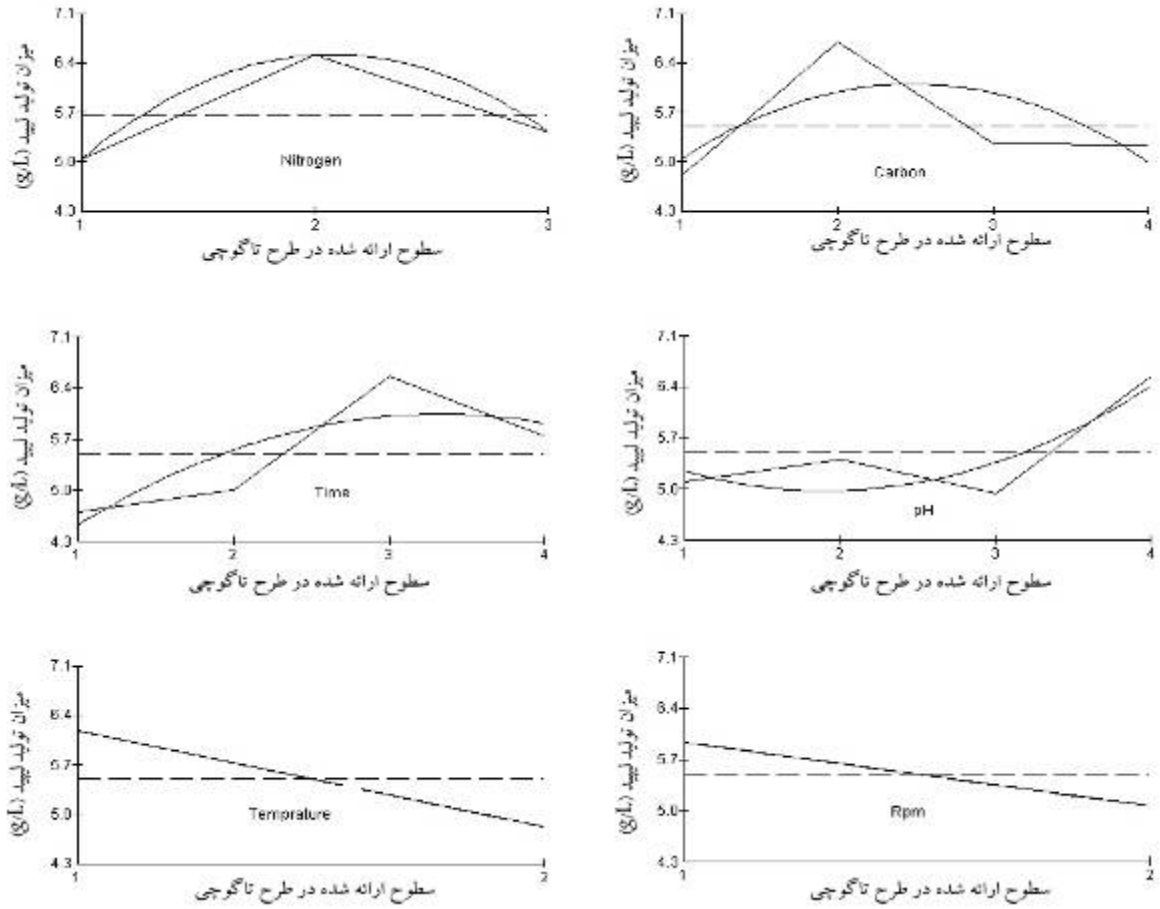
www.SID.ir

Archive of SID

جدول 5- نتایج آنالیز واریانس.

Table 5- Results of Variance analysis.

عامل Factor	درجه آزادی DOF	مجموع مربعات(S) Sum of squares	واریانس Variance	نسبت F F-Ratio	مجموع خالص مربعات(S´) Pure sum	درصد تاثیر عامل Percent of factor effect
نیتروژن (Nitrogen)	2	6.145	3.072	52.478	6.028	14.65
کربن (Carbon)	3	8.59	2.863	48.905	8.415	20.45
دما (Temperature)	1	7.84	7.84	133.891	7.781	18.91
مدت زمان (Incubation time)	3	8.605	2.868	48.989	8.43	20.486
pH	3	6.628	2.209	37.732	6.452	15.68
هوادهی (Aeration)	1	3.221	3.221	55.025	3.163	7.687
اثرعوامل محیطی(خطا) (Errors)	2	0.116	0.058	-----	-----	2.137
مجموع (Total)	15	41.149	-----	-----	-----	100

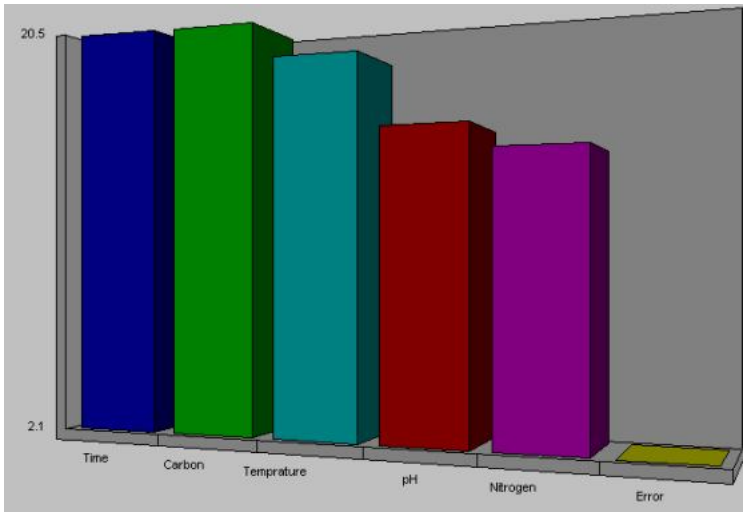


شکل 1- نمودارهای مربوط به اثر هر یک از عوامل بر میزان تولید لیپید در طرح تاگوچی.

Figure 1- the effect of different factors on lipid production by Taguchi method.

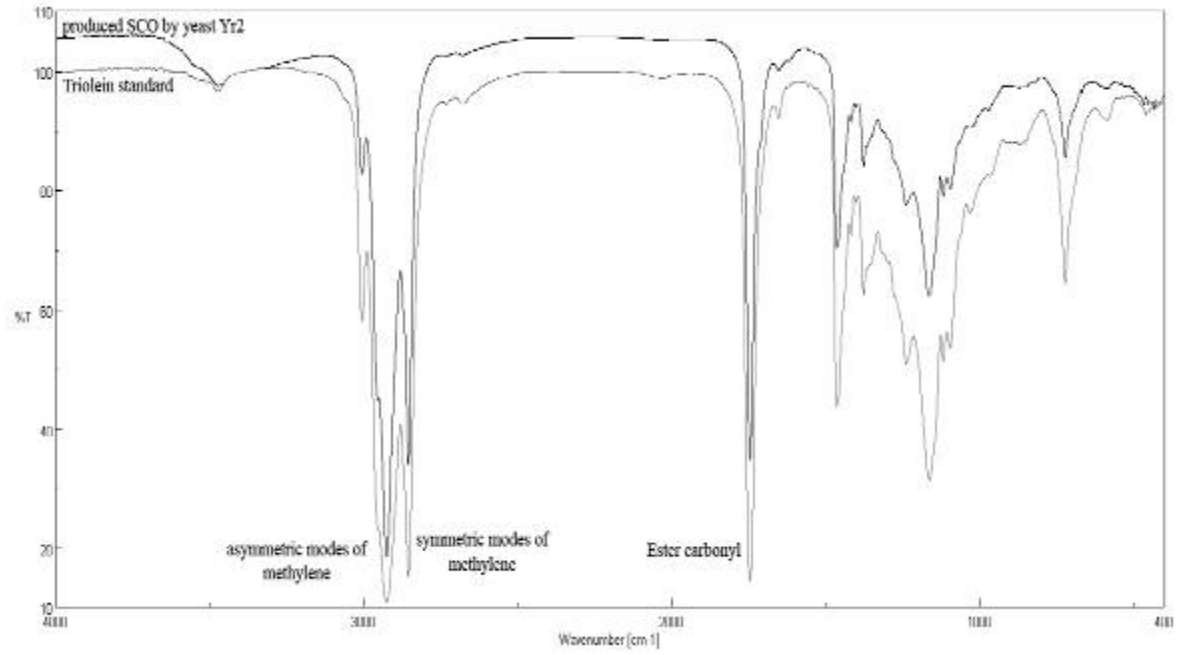
www.SID.ir

Archive of SID



شکل 2- درصد تاثیر پارامترهای مختلف بر میزان تولید لیپید در طرح تاگوچی.

Figure 2- percentage effect of different factors on the amount of lipid produced in Taguchi method.



شکل 3- گراف های FTIR مربوط به روغن تک یاخته تولیدی توسط مخمر Yr2 و استاندارد تری اولئین.

Figure 3- FTIR spectra of the produced Single Cell Oil (SCO) by yeast Yr_2 and triolein standard.

نتیجه گیری کلی

طبق روش تک فاکتوره بیشترین میزان تولید لیپید 8/9 g/L تحت شرایط 90 g/L گلوکز، 1 g/L سولفات آمونیوم در pH 6 و در دمای 25ºC و دور 150 rpm به مدت زمان 96 ساعت می باشد. برای این آزمایشات هر مرحله نیاز به

www.SID.ir

Archive of SID

تفکر و برنامه ریـزی داشـته تـا نهایتـاً بـه نتیجـه مطلوب دست یابیم. اما، در روش تاگوچی یـک بار در ابتدا برنامه ریزی انجام شـده و در نهایـت به نتیجه مطلوب توسط نرم افزار با بررسی هـای آماری می رسیم. نرم افـزار حالـت اپتـیمم را بـه صورت 75 g/L گلوکز و 1 g/L سولفات آمونیوم در pH 6/5 و دمای ºC 25 و به مدت زمان 72 ساعت با دور150rpm در نظر می گیرد و میزان تولید را 11/052 g/L پیش بینی می کنـد. حالـت اپتیمم انجام شد و میزان تولید تا 95% پیش بینی تاگوچی(10/49 g/L) را محقق ساخت. بـا توجـه به نتایج بدست آمده، طرح تاگوچی میزان تولیـد را تا 1/59 g/L و در حدود 18% بالا برده اسـت که نشان دهنده کارایی بالای این طرح در مقایسه با طرح تک فاکتوره می باشد. بـا مقایـسه نتـایج حاصل از دو روش فوق می توان نتیجه گرفت که برای بهینه سازی با روش تـک فـاکتوره نیـاز بـه صرف هزینه و وقت زیاد است و امکان خطا در طراحی مرحله بعد وجود دارد و همراه با ریسک بالاتری جهت دستیابی به بهترین شرایط می باشد. این در حالی است که با انجـام طراحـی بـا یـک روش مناسـب مثـل روش تـاگوچی، بـا انجـام آزمایشات کمتر در زمان کوتاهتر و صرف هزینه کمتر می توان به نتایج بسیار مفیدی جهت بهینـه سازی تولید محصول مورد نظر دست یافت و از بهینه سـازی در بهتـرین حالـت ممکـن اطمینـان حاصل کرد.

سپاسگزاری

از معاونـت محتـرم تحقیقـات و فنـاوری دانشگاه اصفهان به دلیل حمایـت از ایـن تحقیـق تشکر و قدردانی می نمائیم.

منابع

ASTM International D7371-07: Standard Test Method for Determination of Biodiesel (Fatty Acid Methyl Esters) Content in Diesel Fuel Oil Using Mid Infrared Spectroscopy (FT-IR-ATR-PLS Method).

Dai C, Tao J, Xie F, Dai Y, Zhao M (2007). Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. African Journal of Biotechnology 6: 2130-2134.

Economou CN, Aggelis G, Pavlou S, Vayenas DV (2010). Modeling of single cell oil production under nitrogen-limited and substrate inhibition condition. Biotechnology Bioengineering 108: 1049-1055.

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: 19-25.

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

Fidler N, Koletzho B, Sauerwald TU (1999). Single cell oil production and application. Agricultural science and technology 74: 37-45.

www.SID.ir

Archive of SID
Kraisintu P, Yongmanitchai W, Limtong S (2010). Selection and optimization for lipid production of newly isolated oleaginous yeast, *Rdodosporidium toruloides* DMKU3-TK16. Natural Science 44: 436-445.

Kumar SV, Kumutha K, Santhana Krishnan P, Gopal H (2010). Effect of carbon sources on lipid and biomass production by oleaginous yeast cultures. Madras Agricultural Journal 97: 62-64.

Kurtzman CP, Fell JW, (1998). The Yeasts, a taxonomic study. 4th ed. Elsevier Science B.V. ISBN: 0 444 81312 8.

Lehninger A, Nelson DL, Cox MM (1942). Lehninger principles of biochemistry 4th ed., W. H. Freeman, New York.

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.

Meester PAEP, Huijberts GNM, Eggink G (1996). High-cell-density of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. Applied Microbiology and Biotechnology 45: 575-579.

Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy 34: 1-5.

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. Food technology and Biotechnology 47: 215-220.

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: 178-183.

Ratledge C (2005). Single Cell Oils, Lipid Research Center, University of Hull. AOCS Press, champaign, Illinois, pp. 1-20.

Saxena V, Sharma CD, Bhagat SD, Saini VS, Adhikari DK (1998). Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. Journal of the American Oil Chemists' Society 75: 501-505.

Wynn PJ, Ratledge C (2005). Oils from microorganisms, Martek Bioscience Corporation, Columbia, pp.121-153.

www.SID.ir

Archive of SID

Application of statistical processes in improving lipid production by native oleaginous yeast *Rhodotorula* spp. strain Yr2

Ghanavati H.*[1], Abdoli A.[2], Nahvi I.[3], Enshaeieh M.[2], Madani M.[4]

1- PhD student of microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Isfahan.
2-MSc student of microbiology, Department of biology, Azad University of Falavarjan.
3-Professor of Biotechnology, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Isfahan.
4-Assistant Professor of microbiology, Department of biology, Azad University of Falavarjan.

Abstract

In this study, the factorial optimization method and designing of experiments by the Taguchi method were applied for optimization of lipid production by a native oleaginous yeast *Rhodotorula* spp. strain Yr2. The factors investigated were temperature, aeration, nitrogen source, carbon source, pH and incubation time. Based on results obtained by factorial optimization method, maximum production (8.9 g/L) was achieved with ammonium sulfate (1g/L) as nitrogen source, glucose (90g/L) as carbon source, at 25°C, aeration speed of 150rpm, incubation time of 96h and at pH 6. Whereas using the Taguchi method, the predicted optimal conditions were ammonium sulfate (1g/L) as nitrogen source, glucose (75g/L) as carbon source, at 25°C, aeration speed of 150rpm, incubation time of 72h and at pH 6.5. The amount of lipid production predicted by the software under these conditions was 11.052 g/L. and in the predicted case, 95% of the predicted value was achieved (10.49 g/L). The ANOVA results obtained with the Taguchi design showed that time; the amount of carbon, temperature, pH and nitrogen levels, respectively had the highest effects on lipid production in descending order. In conclusion, the application of the Taguchi method in compared with one factorial method led to increased lipid production by 1.59 g/L or 18%.

Keywords: *microbial lipid, factorial optimization method, Taguchi method.*

* Corresponding Author: Ghanavati H. Tel: 09131651164 Email: ghanavatih@hotmail.com

www.SID.ir