مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره دوم (پیاپی ۱۵) تابستان ۱۳۹۲
صفحات ۱۱۶-۱۰۵

Original Article

جداسازی و شناسایی مولکولی *رودوتورولا موسیلاژینوزا* و پتانسیل کاربرد آن در تولید سوخت زیستی

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

[۱] کارشناس ارشد، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه زیست شناسی، [۲] استاد، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، گروه زیست شناسی، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: لیپید میکروبی از نظر نوع و ترکیب به روغن حاصل از گیاهان و حیوانات شباهت دارد. در ابتدا به منظور تولید بیودیزل از روغن های گیاهی استفاده می شد. اما به دلیل هزینه تولید بسیار بالا، امروزه دیدگاه جدیدی در مورد تولید بیودیزل از منابع میکروبی به وجود آمده است. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی مخمر مولد چربی با پتانسیل بالای تولید لیپید، بهینه سازی و استخراج چربی تولید شده و آنالیز و تبدیل آن به بیودیزل انجام شده است.

مواد و روش ها: در این پژوهش پس از جداسازی مخمر، تولید بالای لیپید میکروبی در محیط فقر ازت، پوشال گندم و برنج هیدرولیز شده بررسی شد. آنالیز روغن تولید شده با تکنیک کروماتوگرافی گازی – اسپکترومتری توده ای انجام گردید. همچنین بهینه سازی تولید لیپید، با دو روش تک عاملی و روش تاگوچی انجام و نتایج حاصل از آن ها مقایسه گردید. در نهایت سویه مخمر با استفاده از پرایمر های اختصاصی ITS شناسایی شد.

یافته ها: سویه مخمری جداسازی شده در این مطالعه به عنوان *رودوتورولا موسیلاژینوزا* معرفی گردید. این سویه در شرایط بهینه به میزان بالای تولید معادل ۱۰/۹۷ g/l لیپید و ۱۸/۸۴ g/l توده زیستی خشک رسید. بیشترین اسیدهای چرب تولید شده نیز شامل پالمیتیک اسید (۱۸/۵۱٪) و اولئیک اسید (۶۷/۲۹٪) بود.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان دهنده وجود سویه های بومی با ارزش در کشور است که می توان از آن ها در بخش های مختلف صنعتی به ویژه در تولید سوخت زیستی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: لیپید میکروبی، کروماتوگرافی گازی – اسپکترومتری توده ای، *رودوتورولا موسیلاژینوزا*.

دریافت مقاله: دی ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۲

مقدمه

تجمع لیپید خنثی، که بیشتر شامل تری آسیل گلیسرول و استریل استرها می باشد، یک پاسخ القا شده به واسطه تنش محیطی است که در آن روغن به عنوان یک ذخیره درون سلولی در مخمرها تجمع می یابد (۱). تشکیل ذرات لیپیدی در اواخر فاز لگاریتمی شروع و تا فاز سکون ادامه می یابد (۲). آنزیم های مالیک و ATP سیترات لیاز در تجمع لیپید نقش اصلی و مهمی را دارند (۳ و ۴). دلیل ذخیره مقادیر متفاوت لیپید درون سلولی در میکروارگانیسم های مولد چربی، به فعالیت آنزیم مالیک در مقایسه با ATP سیترات لیاز وابسته است. فعالیت آنزیم مالیک به واسطه ساختار ژنتیکی سلول کنترل می گردد.

*) آدرس برای مکاتبه: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه زیست شناسی
تلفن: ۰۹۱۳۱۰۴۰۱۴۵ پست الکترونیک: m_enshaeieh@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

در سلول هایی که لیپید با مقادیر قابل توجهی تجمع می یابد، ژن مربوط به سنتز آنزیم مالیک در تمامی مواقع روشن می باشد. در حالی که در سلول های با میزان لیپید کم، ژن پس از مصرف نیتروژن خاموش شده و به دنبال آن فعالیت آنزیم مالیک و تجمع لیپید نیز متوقف می گردد (۵). امروزه میکروارگانیسم های مولد چربی به دلیل سرعت رشد بالا، چرخه زندگی کوتاه، عدم تأثیرپذیری از فصول و آب و هوا، امکان افزایش مقیاس و نیز توانایی در جذب منابع کربنی متفاوت وارزان قیمت مورد توجه قرار گرفته اند (۶). پارامترهای مانند هزینه سوبسترا، سرعت تولید و غلظت نهایی محصول در قیمت روغن های میکروبی نقش اصلی را دارند (۷). از میکروارگانیسم هایی که دارای قابلیت تولید و تجمع لیپید به میزان بالا در سلول های خود می باشند، می توان به مخمرها و قارچ ها اشاره نمود (۱۰-۸). از طرف دیگر جلبک ها و میکرو جلبک ها نیز به دلیل بازده فتوسنتزی بالا، تولید مقادیر زیاد از زیست توده و رشد سریع کاندید مناسبی در تولید سوخت زیستی می باشند. اما نیاز به مساحت زیاد برای کشت و مدت زمان تخمیر بیشتر نسبت مخمرها استفاده از آنها را با محدودیت مواجه ساخته است. روغن میکروجلبک ها نسبت به روغن های گیاهی، از اسیدهای چرب غیر اشباع با ۴ و یا تعداد بیشتری پیوند دو گانه برخوردار می باشد. این مساله موجب افزایش احتمال اکسیداسیون شان درهنگام ذخیره سازی می شود و از این رو پذیرش آن ها برای استفاده در سوخت زیستی را کاهش می دهد (۴). روغن های مخمری به دلیل مشابهت در ساختار و ترکیب اسیدهای چرب خود با روغن های گیاهی، پتانسیل کاربرد در تولید سوخت زیستی را دارا می باشند (۱۱). علاوه بر آن، امکان استفاده از مخمرها در تبدیل مواد لیگنوسلولزی موجود در طبیعت به روغن میکروبی، اهمیت موضوع را دو چندان می نماید. زیرا با استفاده از این مواد فراوان و بی ارزش نیاز مخمرها به منبع کربنی برای تولید لیپید، بر طرف می گردد (۱۲). بحران ناشی از گرم شدن زمین به دلیل 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 سازی روغن های گیاهی با متانول می باشد. امروزه با توجه به محدودیت توسعه گیاهان، تولید روغن میکروبی توجه بیشتری را به خود جلب نموده است. به کارگیری میکروارگانیسم های دارای توانایی استفاده از منابع ارزان قیمت مانند پوشال برنج، ساقه ذرت و سایر بقایای گیاهی و جنگل کاری به منظور تولید روغن میکروبی و نهایتاً سوخت زیستی، از نظر اقتصادی بسیار ارزشمند می باشد (۱۳ و ۱۴). از مهم ترین اسیدهای چرب تولید شده توسط میکروارگانیسم های مولد چربی می توان به میریستیک اسید، پالمیتیک اسید، استئاریک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید و لینولنیک اسید اشاره نمود. این اسیدهای چرب از اجزای اصلی سوخت زیستی به شمار می روند (۱۵). هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی مخمر مولد چربی با پتانسیل بالای تولید لیپید، بهینه سازی و استخراج چربی تولید شده و آنالیز و تبدیل آن به بیودیزل بود.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی و انتخاب مخمرهای مولد چربی: برای این منظور ابتدا نمونه هایی مانند برگ درختان، گل ها و میوه ها به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در آب خیسانده شدند. سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول یاد شده به ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط غنی کننده شامل ۱۰۰ g/l گلیسرول، ۱ g/l $(NH_4)_2SO_4$، ۱ g/l KH_2PO_4، ۱ g/l $MgSO_4.7H_2O$ و ۱ g/l عصاره مخمر اضافه و به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۰ °C در شیکر با دور ۱۸۰ rpm نگهداری شد. در ادامه ۰/۱ میلی لیتر از این محیط به محیط جامد حاوی ۲۰ g/l گلوکز، ۲ g/l $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۵ g/l KH_2PO_4، ۲ g/l $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۱ g/l $CaCl_2$ و ۲٪ آگار اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸°C قرار داده شد. سپس کلنی های جدا شده بر روی پلیت بر اساس مورفولوژی متفاوت خالص سازی گردیدند. کلنی های خالص بر روی محیط YPD (Yeast extract peptone dextrose agar) نگهداری شدند و هر یک تا دو ماه کشت

Archive of SID

www.SID.ir

مجدد از آنها انجام شد. پس از آن با استفاده از رنگ سودان سیاه، کلنی های خالص شده بررسی گردیدند. کلنی هایی که پس از رنگ آمیزی و مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری، دارای گرانول های سیاه رنگ درون سلولی بودند، به عنوان کلنی های مولد چربی انتخاب و تولید روغن در آن ها با روش TLC به صورت کیفی مورد تأیید قرار گرفت (۱۶).

ب) آنالیز روغن تولید شده با روش TLC: به منظور ارزیابی تولید تری آسیل گلیسرول در سلول های مخمری از روش Bligh & Dyer استفاده گردید. در این مطالعه از صفحات سیلیکاژل F_{254} 60 همراه با تری اولئین به عنوان استاندارد استفاده شد. محلول مورد استفاده در TLC حاوی n–هگزان، دی اتیل اتر و استیک اسید با نسبت ۹۰:۱۰:۲ می باشد. باندها پس از رنگ آمیزی صفحات با بخارات ید قابل مشاهده هستند. در نهایت سویه برتر با استفاده از معیار های، مشاهده میکروسکوپی گرانول های بزرگتر و بیشتر، تایید روغن تولید شده با روش TLC و وزن بیشتر لیپید در مرحله استخراج درون سلولی شناسایی و انتخاب گردید (۱۷ و ۱۸).

ج) محیط کشت های فعال سازی و تولید لیپید: برای این منظور در ابتدا سویه مورد نظر به محیط پیش تولید یا محیط فعال سازی حاوی 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 انتقال داده شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸° C در شیکر با دور ۱۸۰ rpm نگهداری گردید. در ادامه سویه مورد بررسی به محیط تولید که دارای ۳۵ g/l گلوکز، ۲ g/l $(NH_4)_2SO_4$، ۷ 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 بود، انتقال داده شد. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸° C با دور ۱۸۰ rpm قرار گرفت (۱۹).

د) استخراج لیپید: برای این منظور از روش اصلاح شده Bligh & Dyer استفاده گردید. در این روش ۵۰ میلی لیتر از نمونه کشت داده شده بر روی محیط تولید در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و با آب مقطر استریل شست و شو داده شد. در مرحله بعد ۱۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۴ مولار به توده زیستی اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰°C قرار گرفت. پس از آن ۲۰ میلی لیتر متانول- کلروفرم ۱:۱ به محصول هیدرولیز شده با اسید افزوده شد و به مدت ۲ تا ۳ ساعت مخلوط گردید. سپس در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید تا فازهای آبی (در بالا) و آلی (در پایین) جدا شوند. فاز پایینی با پیپت پاستور جداسازی و در خلأ با دستگاه دسیکاتور خشک گردید. وزن حاصله نشان دهنده چربی تولید شده توسط سویه مورد نظر می باشد (۱۶).

ه) 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 ۵۵ °C به مدت ۵/۵ ساعت در ۶۰ rpm صورت گرفت. بیودیزل تولید شده در فاز بالایی با کمک پترولیوم اتر جداسازی شد (۲۰ و ۲۱). سپس آنالیز با استفاده از روش GC-MS (HP 5972 mass selective detector, serie II gas chromatography, Hp) انجام گردید.

و) تولید بیودیزل: ترانس استریفیکاسیون در فلاسک حاوی سولفوریک اسید به عنوان کاتالیزور، با نسبت مولی ۳۰:۱ متانول به روغن استخراج شده از مخمرها، به مدت ۵/۵- ۵ ساعت (در ۱۷۰ rpm) صورت گرفت. پس از آن دو لایه تشکیل شد. لایه بالایی که حاوی سوخت زیستی می باشد به واسطه پترولیوم اتر جداسازی گردید (۱۴).

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

۱۰۰× بیومس خشک/ وزن روغن استخراجی = درصد تولید لیپید (محتوای لیپیدی)

به منظور اندازه گیری میزان روغن تولیدی، ابتدا روغن استخراج شده توزین گردید. شایان یاد آوری است که چنانچه میزان روغن استخراج شده در نمونه ای با حجم ۵۰ میلی لیتر مد نظر باشد، این میزان باید با استفاده از تناسب در ۱ لیتر محاسبه گردد. به منظور ارزیابی توده زیستی خشک (بیوماس) ، ۵ میلی لیتر از محیط تولید در ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه

Archive of SID

www.SID.ir

سانتریفوژ گردید. سپس محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. از اختلاف وزن لوله آزمایش ثانویه و اولیه، توده زیستی خشک در ۵ میلی لیترمحاسبه گردید. از طرفی می توان میزان توده زیستی را با کمک تناسب در ۱ لیتر محاسبه نمود.

ح) *هیدرولیز پوشال برنج و سبوس گندم:* در ابتدا پوشال برنج و سبوس گندم خشک و الک گردید. سپس به منظور هیدرولیز آنها از سولفوریک اسید ۴ مولار رقیق شده تا میزان ۵٪ با نسبت وزنی ۱ به ۱۰ به مدت ۸ ساعت استفاده شد. پس از اتوکلاو در فشار ۱ بار و دمای ۱۲۵ درجه سانتی گراد، برای بر طرف نمودن توده هیدرولیز نشده سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm انجام گرفت (۱۴). به منظور تهیه محیط تولید، از عصاره حاصله به میزان ۲۰٪ به عنوان منبع کربن و میزان ۱ g/l عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن استفاده شد.

ط) *بهینه سازی تولید لیپید به روش یک عامل در یک زمان:* برای این منظور در ابتدا منبع نیتروژن آلی و معدنی مورد آزمایش 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 ۱ g/l در نظر گرفته شد. پس از آن بهینه سازی تک عاملی برای میزان سولفات آمونیوم ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم بر لیتر، میزان گلوکز ۳۵، ۵۵، ۷۵، ۹۵ و ۱۱۵ گرم بر لیتر، میزان هوادهی ۲۰۰ rpm و ۱۵۰، میزان pH ۵ ، ۵/۵، ۶، ۶/۵ و مدت زمان گرما گذاری ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انجام گرفت. برای این منظور ابتدا میزان بهینه برای نیتروژن انتخاب و پس از آن میزان کربن بررسی گردید و به همین ترتیب ادامه داده شد. این بدین معنی است که میزان بهینه هر عامل در هر مرحله انتخاب شده و در مرحله بعدی مورد استفاده قرار می گیرد، تا در نهایت بهترین میزان برای تمامی پارامترها به دست آید.

ی) *بهینه سازی تولید لیپید به روش تاگوچی:* در این روش با کمک نرم افزار Qualitek-4 در ابتدا برنامه ریزی برای طراحی صورت گرفت. برای میزان دما و هوادهی ۲ سطح، میزان نیتروژن ۳ سطح و میزان گلوکز، pH و مدت زمان انکوباسیون ۴ سطح در نظر گرفته شد. بر این اساس طراحی L16 توسط نرم افزار انتخاب گردید. بدین معنی که با ۱۶ آزمایش برنامه ریزی شده و با مشخص بودن برنامه کار تا پایان، بهترین حالت به دست می آید. چنانچه حالت بهینه در بین ۱۶ آزمایش انجام شده نباشد باز هم توسط نرم افزار بهترین حالت انتخاب می شود و مقدار تولید در شرایط بهینه توسط نرم افزار پیش بینی می گردد. جدول ۱ طراحی L16 را نشان می دهد.

ک) *شناسایی مخمرها توسط تعیین توالی RNA ریبوزومی:* سویه مخمر مولد چربی، به کمک تعیین توالی قطعه ای از ژنوم ریبوزومی شناسایی گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش مربوط به نواحی بینابینی درونی نسخه برداری شده (Internal Transcribed Spacer=ITS) بودند. به منظور استخراج DNA، ابتدا مخمر مورد نظر در محیط عصاره مخمر- پپتون- گلوکز مایع (YPD) کشت داده شد. سپس سلول ها جداسازی و با استفاده از آب مقطر شستشو گردیدند. در ادامه سلول ها با بافر لیز کننده، دانه های شیشه ای (۶۰۰-۴۲۵ میکرون)، محلول فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) به مدت ۳ تا ۵ دقیقه مخلوط (Vortex) شدند. در این مطالعه بافر لیز کننده حاوی تریتون X-100 (۲ ml)، سدیم دودسیل سولفات (۱ g)، کلرید سدیم (۰/۴ g)، تریس- اسید کلریدریک (۱ ml) و اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (۰/۲ ml) بود که با آب دیونیزه به حجم ۱۰۰ml رسانده شد. سپس به منظور انحلال DNA از بافر TE (Tris-EDTA buffer) استفاده گردید. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، به محلول بالایی جدا شده به میزان دو برابر حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و به آرامی مخلوط گردید.پس از سانتریفوژ مجدد، محلول روماند دور ریخته شد و پس از تبخیر شدن ایزوپروپانول در زیر هود به رسوب باقی مانده ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE اضافه و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد (۲۲). قطعه مورد نظر با استفاده از پرایمرهای ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') به عنوان پرایمر رو به جلو و ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') به عنوان پرایمر برگشتی انجام شد (۲۳).

Archive of SID

www.SID.ir

واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. درجه خلوص و اندازه نسبی محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵درصد تعیین گردید. سپس توسط شرکت فزا پژوه تعیین توالی شد. در نهایت توالی به دست آمده در سایت NCBI جستجو گردید تا نام جنس و گونه مخمر مورد نظر مشخص شود.

یافته ها

الف) بهینه سازی تولید لیپید با طرح تک فاکتوره: تولید لیپید در سویه مخمری مورد بررسی در شرایط اولیه (قبل از انجام مراحل بهینه سازی) به صورت ۶/۱۷ g/l لیپید، ۱۷/۸۲ g/l توده زیستی خشک و ۳۴/۶۲٪ بود (جدول ۲).

ب) بهینه سازی تولید لیپید به روش تاگوچی: نتایج حاصل از تولید در طراحی L16 در جدول ۳ نشان داده شده است.

بهترین حالت در آرایه ۶ مشاهده گردید. شکل ۱ درصد تأثیر عوامل مختلف بر میزان تولید لیپید را به صورت نمودار ستونی نشان می دهد. محور X نمایش دهنده فاکتورهای مختلف و محور Y مربوط به درصد تأثیر هریک از عوامل می باشد که مقدار آن بین حداقل تاثیر یعنی ۲/۱٪ (اثر عوامل محیطی) و حداکثر تاثیر ۲۰/۴۸ ٪ (اثر مدت زمان) تنظیم شده است. همان طور که مشخص است مدت زمان و منبع کربن دارای بیشترین تأثیر (۲۰/۵٪) بر روی تولید لیپید می باشند. کمترین تأثیر نیز مربوط به خطای آزمایش می باشد.

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 می باشند (جدول ۴). همان گونه که مشاهده می گردد پارامترهایی چون مدت زمان و منبع کربن دارای بیشترین مجموع خالص مربعات (S´) هستند. اما میزان هوادهی، کمترین اثر را نسبت به سایر فاکتورهای مورد بررسی نشان می دهد. خطای آزمایش نیز همان طور که مشاهده می شود بسیار ناچیز و نزدیک به صفر است.

ج) آنالیز اسیدهای چرب با GC-MS : روغن استخراج شده از مخمرها پس از متیلاسیون با روش GC-MS مورد آنالیز قرار

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)
۱	۰/۵	۵۵	۲۵	۲۴	۵	۱۵۰
۲	۰/۵	۷۵	۲۵	۴۸	۵/۵	۲۰۰
۳	۰/۵	۹۵	۳۵	۷۲	۶	۱۵۰
۴	۰/۵	۱۱۵	۳۵	۹۶	۶/۵	۲۰۰
۵	۱	۵۵	۲۵	۹۶	۶	۲۰۰
۶	۱	۷۵	۲۵	۷۲	۶/۵	۱۵۰
۷	۱	۹۵	۳۵	۴۸	۵	۲۰۰
۸	۱	۱۱۵	۳۵	۲۴	۵/۵	۱۵۰
۹	۱/۵	۵۵	۳۵	۴۸	۶/۵	۱۵۰
۱۰	۱/۵	۷۵	۳۵	۲۴	۶	۲۰۰
۱۱	۱/۵	۹۵	۲۵	۹۶	۵/۵	۱۵۰
۱۲	۱/۵	۱۱۵	۲۵	۷۲	۵	۲۰۰
۱۳	۰/۵	۵۵	۳۵	۷۲	۵/۵	۲۰۰
۱۴	۰/۵	۷۵	۳۵	۹۶	۵	۱۵۰
۱۵	۰/۵	۹۵	۲۵	۲۴	۶/۵	۲۰۰
۱۶	۰/۵	۱۱۵	۲۵	۴۸	۶	۱۵۰

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: نتایج حاصل از تولید لیپید به روش تک عاملی

شرایط	مقدار لیپید تولیدی (g/l)	بیومس خشک (g/l)	درصد تولید لیپید به وزن خشک
منبع نیتروژن (g/l)			
عصاره مخمر و سولفات آمونیوم (۱)	۶/۲۹	۱۷/۵۷	۳۵/۷۸
عصاره مخمر و کلرید آمونیوم (۱)	۶/۱۵	۱۷/۹	۳۴/۳۵
پپتون و سولفات آمونیوم (۱)	۶/۱۱	۱۷/۶۸	۳۴/۳۷
پپتون و کلرید آمونیوم (۱)	۶/۱۸	۱۷/۸۸	۳۴/۵۵
منبع کربن (g/l)			
گلوکز (۵۰)	۶/۳	۱۷/۴۵	۳۶/۱
زایلوز (۵۰)	۵/۱۵	۱۷/۱۶	۳۰
غلظت سولفات آمونیوم (g/l)			
۰/۵	۶/۹	۱۲/۳۶	۵۵/۸
۱	۷/۲	۱۲/۷۸	۵۶/۳
۱/۵	۶/۷	۱۲/۴	۵۴
غلظت گلوکز (g/l)			
۳۵	۴/۳۵	۱۲/۴۲	۳۵
۵۵	۶/۵۲	۱۶/۲۱	۴۰/۲
۷۵	۷/۱۳	۱۲/۷۰	۵۶/۱
۹۵	۵/۸۴	۱۰/۹۷	۵۳/۲
۱۱۵	۵/۷۱	۱۱/۴۲	۵۰
دما (^{o}C)			
۲۵	۷/۲۳	۱۲/۸۶	۵۶/۲
۳۵	۶/۳۵	۱۱/۷۳	۵۴/۱
هوادهی(rpm)			
۱۵۰	۷/۳۴	۱۳/۰۴	۵۶/۲۸
۲۰۰	۶/۸۳	۱۲/۶۴	۵۴
مدت زمان گرماگذاری (h)			
۲۴	۴/۶	۹/۵۸	۴۸
۴۸	۶/۰۳	۱۱/۵۹	۵۲
۷۲	۸/۸۵	۱۵/۳۹	۵۷/۵
۹۶	۷/۹۵	۱۴/۱۴	۵۶/۲
pH			
۵	۸/۸۳	۱۵/۴۹	۵۷
۵/۵	۸/۳۵	۱۴/۵۴	۵۷/۴
۶	۸/۵۸	۱۴/۸۴	۵۷/۸
۶/۵	۸/۹	۱۵/۲۹	۵۸/۲

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳: نتایج تولید لیپید در طراحی تاگوچی

آرایه ها	میزان تولید لیپید(g/l)	بیومس خشک (g/l)
۱	۴/۱۵	۱۳/۱۷
۲	۵/۹۸	۱۶/۹۸
۳	۵/۱۲	۱۴/۸۸
۴	۴/۸۳	۱۵
۵	۵/۸۲	۱۶/۶۲
۶	۱۰/۹۷	۱۸/۸۴
۷	۴/۱۳	۱۳/۱۲
۸	۵/۱۶	۱۴/۹۵
۹	۵/۱	۱۴/۸۶
۱۰	۴/۰۱	۱۲/۹۳
۱۱	۶/۳۶	۱۶/۸۲
۱۲	۶/۱۴	۱۶/۵۹
۱۳	۴/۰۳	۱۲/۹۳
۱۴	۵/۸۹	۱۶/۸۲
۱۵	۵/۳۴	۱۵/۳۴
۱۶	۴/۷۱	۱۴/۶۷

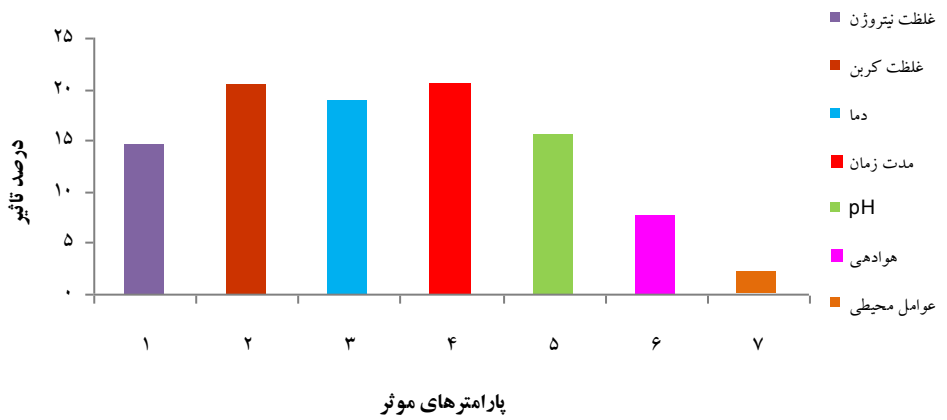
گرفت. ترکیب به دست آمده شامل: ۱۸/۵۱٪ پالمیتیک اسید، ۶۷/۲۹٪ اولئیک اسید، ۱/۱۱٪ میریستیک اسید، ۱/۲۵٪ استئاریک اسید، ۴/۷۶٪ لینولئیک اسید و غلظت پایینی از سایر متیل استرها بود.

د) تولید سوخت زیستی از لیپید میکروبی: در این مطالعه تولید سوخت زیستی به واسطه ترانس استریفیکاسیون با متانول صورت گرفت و بازده آن ۸۱٪ بود.

ه) شناسایی مخمرها توسط تعیین توالی RNA ریبوزومی: نتایج به دست آمده از تعیین توالی نشان داد که طول قطعات به دست آمده با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS2 در مخمرهای مختلف متفاوت بوده و در صورت خوانده شدن از انتهای ´۵ به ´۳ دارای توالی به صورت 28S rRNA ، ITS2، 5.8S rRNA، ITS1 و 18S rRNA می باشد. شکل ۲ تصویر حاصل از الکتروفورز محصول PCR مخمر جداسازی شده در این بررسی را نشان می دهد. پس از تعیین توالی و مقایسه در سایت NCBI، ایزوله شماره۶ به عنوان *رودوتورولا موسیلاژینوزا* (*Rhodotorula mucilaginosa*) مشخص گردید. همچنین از نظر مورفولوژیکی این سویه مخمری بر روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) به شکل کلنی های نرم، صاف، موکوئیدی و به رنگ قرمز- نارنجی مشاهده شد.

بحث

امروزه میکروارگانیسم های مولد چربی به دلیل سرعت رشد بالا، چرخه زندگی کوتاه و توانایی در جذب منابع کربنی متفاوت مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته اند. در ادامه به منظور مقایسه مخمر بومی جداسازی شده و نیز میزان لیپید

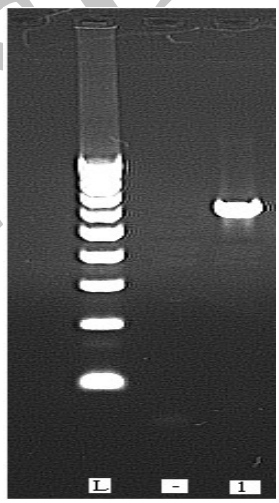


شکل ۱: درصد تأثیر پارامترهای مختلف بر میزان تولید لیپید

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴: نتایج آنالیز واریانس

عامل	درجه آزادی	مجموع مربعات (S)	واریانس	نسبت F	مجموع خالص مربعات (S´)	درصد تاثیر عامل
نیتروژن	۲	۶/۱۴۵	۳/۰۷۲	۵۲/۴۷۸	۶/۰۲۸	۱۴/۶۵
کربن	۳	۸/۵۹	۲/۸۶۳	۴۸/۹۰۵	۸/۴۱۵	۲۰/۴۵
دما	۱	۷/۸۴	۷/۸۴	۱۳۳/۸۹۱	۷/۷۸۱	۱۸/۹۱
مدت زمان	۳	۸/۶۰۵	۲/۸۶۸	۴۸/۹۸۹	۸/۴۳	۲۰/۴۸۶
pH	۳	۶/۶۲۸	۲/۲۰۹	۳۷/۷۳۲	۶/۴۵۲	۱۵/۶۸
هوادهی	۱	۳/۲۲۱	۳/۲۲۱	۵۵/۰۲۵	۳/۱۶۳	۷/۶۸۷
اثرعوامل محیطی(خطا)	۲	۰/۱۱۶	۰/۰۵۸	–	–	۲/۱۳۷
مجموع	۱۵	۴۱/۱۴۹	–	–	–	۱۰۰



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR سویه جدا شده. L) سایز مارکر (۱۰۰bp)، -) کنترل منفی، ۱) باند نشان دهنده سویه *ردوتورولا موسیلاژینوزا* (۶۵۰ bp)

تولید شده در پژوهش حاضر و نتایج به دست آمده در سایر مطالعات، به برخی از تحقیقات انجام شده در سراسر جهان اشاره می گردد. پان (Pan) و همکاران در سال ۲۰۰۹ به کمک رنگ آمیزی سودان سیاه، موفق به جداسازی ۱۳ سویه مخمری با توانایی جذب زایلوز و تولید لیپید شدند. بالاترین میزان تولید لیپید توسط یکی از این سویه ها g/l ۵/۶۸ با بیومس g/l ۲۲/۳ گزارش گردید که در این حالت درصد تولید لیپید ٪۲۵/۴۷ بوده است (۱۶). لیزینگ (Leesing) و بوجانگ هارن (Baojungharn) نیز در سال ۲۰۱۱ مخمر مولد چربی را به عنوان *تورولاسپورا گلوبوسا* (*Torulaspora globasa*) سویه YU5/2 معرفی نمودند. میزان تولید لیپید در این سویه g/l ۴/۱۶ در محیط دارای محدودیت نیتروژن و میزان g/l ۸۰ گلوکز گزارش گردید (۲۴). نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نیز نشان داد که سویه مخمر جداسازی شده قادر به تولید میزان بالای لیپید معادل g/l ۱۰/۹۷ و g/l ۱۸/۸۴ توده زیستی خشک در شرایط بهینه می باشد.

به منظور بهینه سازی تولید لیپید توسط این مخمر، از دو روش تک عاملی و روش طراحی تاگوچی استفاده گردید. فاکتورهای مورد بررسی در هر دو روش شامل دما، هوادهی، منبع نیتروژن، منبع کربن، pH و مدت زمان گرما گذاری بود. با توجه به این که نوع منبع آلی تأثیر زیادی بر روی تولید لیپید نداشت، در طراحی تاگوچی این عامل حذف و تنها غلظت سولفات آمونیوم بهینه گردید. با توجه به آزمایشات صورت گرفته در روش تک عاملی، بیشترین میزان تولید در حالت منبع ازت سولفات آمونیوم (g/l ۱)، منبع کربن گلوکز (g/l ۹۰)، دمای ۲۵ °C ، هوادهی ۱۵۰ rpm، مدت زمان گرماگذاری ۹۶ ساعت و pH ۶ به دست آمد. به طوری که که در این شرایط میزان لیپید تولید شده به g/l ۸/۹ رسید. در پژوهش حاضر برنامه ریزی تمامی آزمون ها توسط نرم افزار Qualitek-4 و در قالب طراحی L16 به روش تاگوچی انجام پذیرفت. شرایط بهینه پیش بینی شده توسط نرم افزار در حالت منبع ازت

Archive of SID

www.SID.ir

سولفات آمونیوم (۱ g/l)، منبع کربن گلوکز (۷۵ g/l)، دمای ۲۵°C ، هوادهی ۱۵۰ rpm، مدت زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت و pH معادل ۶/۵ بوده است. در این شرایط میزان تولید لیپید توسط نرم افزار ۱۱/۰۵۲ g/l پیش بینی گردید. این میزان در حالت عملی تا ۹۵٪ پیش بینی تاگوچی (۱۰/۴۹ g/l) به دست آمد.

بنابراین می توان چنین نتیجه گرفت که با کمک طراحی آزمایش ها مانند روش تاگوچی، می توان بهینه سازی را به صورت هدف دار تنظیم نمود و به نتایج بهتر و صحیح تری دست یافت. زیرا در این روش امکان بررسی عوامل موثر بر تولید لیپید به صورت هم زمان وجود دارد. مطالعات نشان می دهد که ترکیبات آلی برای تجمع لیپید مناسب هستند، اما برای رشد مناسب نمی باشند. برعکس ترکیبات معدنی برای رشد مناسب هستند، اما برای تجمع لیپید مناسب نمی باشند (۱۴). یافته های ما در این پژوهش نشان می دهد که بهترین غلظت نیتروژن برای تولید بیشترین میزان لیپید، ۱ گرم بر لیتر می باشد. کرایستینتا (Kraistinta) و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر عوامل مختلفی مانند غلظت گلوکز، عصاره مخمر، سولفات آمونیوم، سولفات منیزیم و pH را بر روی تولید لیپید در مخمر *رودوسپوریدیوم تورولوئیدس* (*Rhodosporidium toruloides*) سویه DMKU3-TK16 بررسی نمودند. میزان تولید لیپید در این مخمر در شرایط بهینه شامل ۷۰ g/l گلوکز، ۰/۵۵ g/l سولفات آمونیوم، ۰/۷۵ g/l عصاره مخمر و ۲ g/l سولفات منیزیم، ۷۱/۳٪ از وزن خشک آن بوده است (۱۹). همچنین تأثیر منابع مختلف کربنی مانند گلوکز، فروکتوز و سوکروز نیز بر روی میزان تولید لیپید در مخمر *رودوتورولا گلوتینیس* (*Rhodotorula glutinis*) بررسی شده است. از میان منابع کربنی، گلوکز بیشترین توده زیستی و محتوای لیپیدی را ایجاد می نماید. میزان تولید لیپید، بیومس و درصد تولید نسبت به وزن خشک در این مخمر به صورت ۲/۴۳ g/l، ۱۰/۲۱ g/l و ۲۳/۷۸٪ گزارش شده است (۲۵). ساکسنا (Saxena) و همکاران در سال ۱۹۹۸ با بهینه سازی شرایط تولید لیپید در مخمر *رودوتورولا ماینوتا* (*Rhodotorula minuta*) سویه IIP-33، دریافتند که بر خلاف ویژگی های تکثیر مخمرهای مولد چربی، نسبت کربن به نیتروژن معادل ۳۰ برای تجمع لیپید به میزان حداکثر ۴۸٪ کافی است (۲۶).

سترلینگ (Easterling) و همکاران در سال ۲۰۰۹ و لی (Li) و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی جداگانه ای گزارش نمودند که توانایی تولید لیپید تحت تأثیر pH های مختلف محیط کشت قرار می گیرد. به طوری که pH بهینه برای سلول های مخمری در محیط بین ۵ تا ۶ می باشد (۲۷ و ۲۸). این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر هم خوانی دارد. در مطالعه حاضر تولید سوخت زیستی به واسطه ترانس استریفیکاسیون با متانول صورت گرفت و بازده آن ۸۱٪ گزارش گردید. دای (Dai) و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ به منظور تولید سوخت زیستی از مخمر *رودوتورولا گلوتینیس* استفاده نمودند. میزان تجمع لیپید در این مخمر و همچنین بازده تولید سوخت زیستی به ترتیب ۴۹/۲۵٪ و ۸۱/۷٪ بود (۱۴).

نتیجه گیری

سویه جداسازی شده در این پژوهش، با درصد تولید حدود ۵۸/۲۲٪ ، میزان تولید لیپید ۱۰/۹۷ گرم بر لیتر در شرایط بهینه و بازده تولید بیودیزل معادل ۸۱٪ قابلیت استفاده در زمینه های مختلف صنعتی را دارا می باشد. جداسازی سویه بومی *رودوتورولا موسیلا ژینوزا* با پتانسیل بالای تولید لیپید، نوید بخش جداسازی سایر سویه های مولد چربی و نیز استفاده از این مخمر ها در صنایع مختلف است. این سویه با قابلیت تولید بالای لیپید می تواند سوبسترای لازم برای تولید سوخت زیستی را فراهم نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه فلاورجان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Ratledge C. Single Cell Oils, Lipid Research Center, University of Hull, Department of Biologcal Sciences. 2005; 51: 1-20.

2. Raschke D, Knorr D. Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*. J Microbiol Method. 2009; 79(2): 178-183.

3. Fidler N, Koletzho B, Sauerwald TU. Single cell oil production and application. Pharmaceutical J Slovenia. 1999; 37-45.

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

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

6. Economou CN, Aggelis G, Pavlou S, Vayenas DV. Modeling of single cell oil production under nitrogen-limited and substrate inhibition condition. Biotechnol Bioengineer. 2011; 108(5): 1049 -1055.

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

8. Ratledge C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. Biochem Soc Transaction. 2002; 30(Pt 6): 1047-1050.

9. Katre G, Joshi Ch, Khot M, Zinjarde S, Ravikumar A. Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. AMB Express. 2012; 2 (1): 36.

10. Khot M, Kamat S, Zinjarde S, Pant A, Chopade B, Ravikumar A. Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. Microb Cell Fact. 2012; 11: 1-13.

11. Karatay SE, Donmez G. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. Bioresource Technol. 2010; 101(20): 7988-7990.

12. Zheng Y, Yu X, Zeng J, Chen Sh. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. Biotechnol Biofuels. 2012; 5: 1750-1754.

13. Li Q, Du W, Liu D. Perspective of microbial oils for biodiesel production. Appl Microbiol Biotechnol. 2008; 80: 749-756.

14. Dai C, Tao J, Xie F, Dai Y J, Zhao M. Biodiesel generation oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. Afr J Biotechnol. 2007; 6: 2130-2134.

15. Fei Q, Chang HN, Shang L, Choi JD, Kim N, Kang J. The effect of volatile fatty acid as a sole carbon source on lipid accumulation by Cryptococcus albidus for biodiesel production. Bioresource Technol. 2010; 102: 2695-2701.

Archive of SID

www.SID.ir

16. 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; 47: 215-220.

17. 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. Microbiol. 2008; 154(8): 2327-2335.

18. 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. Open Analytical Chemistry J. 2007; 1: 15-20.

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

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

21. Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technol. 2006; 97(6): 841-846.

22. Hoffman CS. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley and Sons, New York. 1997.

23. Deak T, Chen J, Beuchat LR. Molecular characterization of *Yarrowialipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. Appl Environ Microbiol. 2000; 66: 4340-4344.

24. Leesing R, Baojungharn R. Microbial oil production by isolated oleaginous yeast *Torulaspora globosa* YU5/2. Engineer Technol. 2011; 76: 799-803.

25. VijayaKumar S, Kumutha K, Santhana Krishnan P, Gopal H. Effect of carbon sources on lipid and biomass production by oleaginous yeast cultures. Madras Agri J. 2010; 97(1-3): 62-64.

26. Saxena V, Sharma CD, Bhagat SD, Saini VS, Adhikari DK. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. J Am Oil Chemists's Soc. 1998; 25: 501-505.

27. Easterling ER, French WT, Hernandez R, Licha M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rodotorula glutinis*. Bioresource Technol. 2009; 100: 356-361.

28. Li YH, Liu B, Sun Y, Zhao ZB, Bai FW. Screening of oleaginous yeasts for broad-spectrum carbohydrates assimilation capacity. China Biotechnol. 2005; 25(12): 39-43.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 2, June 2013

Original Article

Isolation and molecular identification of *Rhodotorula musilaginosa* and its potential for applications in biodiesel production

Marjan Enshaeieh[1], Azadeh Abdoli[1], Iraj Nahvi[2], Mahboobeh Madani[3]

[1] M.Sc., Young Researchers and Elite Club, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University Esfahan, Iran.
[2] Professor, Department of Bacteriology, Department of Biology, Science Branch, Esfahan University, Esfahan, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Microbial lipid composition is similar to the oil obtained from plants and animals. Although vegetable oils were originally used for producing biodiesel, high costs of the process encouraged industries to use microbial lipids as biodiesel sources. This study was conducted to isolate yeast strains with high lipid productivity, to optimize the extraction process of produced lipid and to convert the lipids to biodiesel.

Materials and Methods: In this study, after isolation of the yeast *Rhodotorula*, the productivity of microbial lipid in nitrogen limited condition, rice straw and wheat bran hydrolyzate was evaluated. The products were analyzed based on Gas Chromatography-Mass Spectrometry technique (GC-MS). The lipid production was optimized by two techniques (one factorial and Taguchi method) and the results were compared. At the end, the yeast strain was identified using polymerase chain reaction (PCR) techniques.

Results: The strain isolated from this study was identified as *Rhodotorula musilaginosa*. The strain had high lipid production and dry biomass of 10.97 g/l and 18.84 g/l in optimized conditions, respectively. The highest fatty acids were Palmitic acid (18.51%) and Oleic acid (67.29%).

Conclusion: The results obtained in this study indicate that there are valuable native strains in our country that they can be used in different industries , especially biodiesel production.

Keywords: Microbial lipids, Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Rhodotorula musilaginosa*.

Correspondance to: Marjan Enshaeieh

Tel: +989131040145

E-mail: m_enshaeieh@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 6(2): 105-116.

Archive of SID

www.SID.ir