افزایش تولید روغن غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع ضروری در مخمر مولد چربی *یارویا لیپولیتیکا* با موتاسیون و روش غربالگری سرولنین

مرجان انشاییه*[۱]، آزاده عبدلی[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: ۹۳/۳/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲۹)

چکیده

روغن میکروبی شباهت زیادی به روغن گیاهی دارد؛ تنها تفاوت موجود غنی بودن روغن میکروبی از اسیدهای چرب غیراشباع است. این روغن ها در صنایع دارویی جهت مقاصد تکنیکی و در صنایع غذایی به عنوان روغن خوراکی قابل استفاده هستند. هدف از این مطالعه افزایش تولید لیپید و میزان اسید های چرب غیر اشباع با کمک موتاسیون در مخمر مولد چربی می باشد. در این پژوهش بهینه سازی تولید لیپید در مخمر *یارویا لیپولیتیکا* با استفاده از موتاسیون تصادفی با اشعه ماورای بنفش انجام شد و از سرولنین که دارای اثر ممانعت کننده بر تولید لیپید است جهت غربالگری استفاده گردید. موتانت هایی که دارای رشد طبیعی در حضور سرولنین بودند به عنوان سویه های برتر جهت مطالعات بعدی انتخاب شدند. تولید لیپید در سویه های موتانت و وحشی پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون مقایسه شد. بدین ترتیب سویه ی موتانتی که دارای افزایش قابل توجهی در تولید لیپید بود انتخاب گردید. بهترین موتانت دارای افزایش ۵۰ درصدی و ۳۰ درصدی به ترتیب در تولید لیپید و بازده رشد بود. میزان لینولئیک اسید نیز پس از موتاسیون افزایش یافت. ترکیب اسیدهای چرب موجود در پروفایل لیپیدی مخمر مورد بررسی، پس از موتاسیون تغییر زیادی نکرده بود. البته میزان اسیدهای چرب غیر اشباع افزایش یافته، لذا این تکنیک جهت بهبود تولید لیپید بسیار موثر بود. استفاده از سرولنین به عنوان یک تکنیک غربالگری موثر در این پژوهش راه را برای جداسازی موتانت های برتر هموار نمود.

کلید واژگان: روغن میکروبی، اسیدهای چرب غیر اشباع، *یارویا لیپولیتیکا*، موتاسیون

* مسئول مکاتبات: m_enshaeieh@yahoo.com

۱- مقدمه

میکروارگانیسم های مولد چربی دارای توانایی تولید و تجمع روغن به صورت تری آسیل گلیسرول می باشند. در بین میکروارگانیسم های مولد چربی، مخمرها و قارچ ها توجه زیادی را به خود جلب کرده اند[۳-۱]. نکته جالب توجه در مورد چربی های میکروبی، بالا بودن میزان اسیدهای چرب غیر اشباع با ۱۶و۱۸ اتم کربن از سری امگا (ω) است. این اسیدهای چرب دارای اهمیت غذایی هستند. اسیدهای چرب غیر اشباع شامل لینولئیک اسید، آلفا لینولئیک اسید، گاما لینولئیک اسید، اولئیک اسید، پالمیتولئیک اسید، میریستولئیک اسید، آراشیدونیک اسید، ایکوزاپنتانوئیک اسید، دوکوزاپنتانوئیک اسید ودوکوزاهگزانوئیک اسید می باشند[٦-٤]. روغن های میکروبی غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع بوده و به صورت ذاتی ایمن هستند. این چربی ها در برابر اکسیداسیون نیز، پایداری ویژه ای را نشان می دهند که این موضوع به دلیل آنتی اکسیدان های طبیعی موجود در آنها می باشد.

دو آنزیم مهم موثر بر تجمع لیپید، مالیک آنزیم و ATP- سیترات لیاز هستند[۸ ،۷]. به طور کلی مالیک آنزیم مهم ترین تنظیم کننده تجمع لیپید از طریق تولید NADPH است. سنتز اسیدهای چرب در مخمر توسط هگزامری از زیر واحدهای ۳α و ۳β صورت می گیرد که به ترتیب توسط ژن های Fas1 و Fas2 کد می شوند[۹]. روغن های میکروبی شباهت ساختاری و ترکیبی زیادی به روغن های گیاهی دارند [۱۱، ۱۰]. گیاهان و جلبک های فیتوپلانکتون و بعضی از قارچ ها و مخمرها دارای آنزیم های دلتا ۱۲و دلتا ۱۵ دسچوراز هستند که در تولید لینولئیک اسید و گاما لینولئیک اسید موثر هستند. به دلیل عدم حضور این دو آنزیم در انسان ها و حیوانات، اسیدهای چرب لینولئیک اسید و لینولنیک اسید برای انسان وحیوان ضروری اند[۸]. اهمیت غذایی روغن های مخمری وجود اسیدهای چرب غیر اشباع چند زنجیره و بلند زنجیره می باشد. این ویژگی منجر به استفاده از این میکروارگانیسم ها در تولید صنعتی روغن تک یاخته (SCO) و یا تولید مکمل های غذایی که غنی از اسیدهای چرب هستند، می شود[۱۲]. میکروارگانیسم های مولد این روغن ها اخیراً اهمیت زیادی یافته اند زیرا منبع تولید این اسید های چرب غیر اشباع محسوب می شوند[۱۳].

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، پلی-هیدروکسی‌آلکانوات و اسیدهای چرب هیدروکسیله‌ی آزاد استفاده کرد[١٤]. مزیت میکروارگانیسم‌هایی که به صورت وسیع در سیستم‌های بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل تولید طیف وسیعی از محصولات، سرعت رشد بالا و امکان ایجاد جهش تصادفی در آن‌ها جهت افزایش تولید می‌باشد. آن‌ها می-توانند تولید سریع‌تر و ایمن‌تری داشته باشند و محصولات آن‌ها دارای کیفیت تضمین شده بوده و در طول سال به نوسانات آب - وهوایی بستگی ندارد. بنابراین بهترین سیستم‌های کنترل شده‌ی زنده هستند. روغن های میکروبی می توانند در مقیاس بسیار زیاد، بیش از ۲۲۰ متر مکعب، تولید شوند. علاوه بر آن مشکل خاصی در زمینه استخراج روغن وجود ندارد و با استفاده از روش های مختلف قابل خالص سازی است [۱۳].

یکی از راه های بهبود ژنتیکی مخمرهای مولد چربی افزایش نرخ موتاسیون در آن ها با استفاده از موتاژن هایی نظیر اشعه ی UV، اشعه های یونیزه کننده و یا سایر فاکتورهای موتاسیون زا می باشد[۲۱-۱۵]. مهم ترین موضوع در زمینه ی دست یابی به سویه های برتر به واسطه موتاسیون تصادفی، توسعه ی روش های غربالگری برای جداسازی سویه های برتر در میان موتانت ها می باشد. در زمینه ی مخمرهای مولد چربی روش های متفاوتی تا کنون استفاده شده است. در این بین روش هایی نظیر اندازه گیری میزان جذب نوری پس از رنگ آمیزی با سودان سیاه B (۲۲) و یا استفاده از روش رنگ سنجی بر اساس واکنش سولفو- فسفو- وانیلین [۲۳] و یا روش رپلیکاپرینتینگ [۲٤] می باشد. اما در این روش ها لازم است که اندازه گیری در مورد تعداد زیادی از موتانت ها انجام گیرد تا موتانت برتر شناسایی گردد.

سرولنین مولکولی است که به طور طبیعی از قارچ *سفالوسپوریوم سرولنس* (*Cephalosporium caerulens*) جداسازی شده و دارای خاصیت ضد قارچی است علاوه بر آن دارای خاصیت مهار کنندگی در بیوسنتز لیپید می باشد که این اثر مهاری به علت تاثیر

بر روی آنزیم فتی اسید سنتاز است[۲۵] و دارای اثر مهاری بر روی فتی اسید سنتاز که یک آنزیم مهم در بیوسنتز لیپیدهاست، می باشد. بنابراین می توان از این ماده به منظور غربالگری سویه های موتانت استفاده کرد. بیوسنتز لیپید به عنوان یک متابولیسم ضروری برای رشد سلول است بنابراین ممانعت به واسطه ی سرولنین باعث کاهش قابل توجهی در رشد کلنی ها می گردد. لذا موتانت هایی که در حضور سرولنین رشد معمولی دارند، دارای پتانسیل بالایی جهت تولید لیپید بوده اند که توانسته اند بر این اثر مهاری فایق آیند[۲۶].

در این پژوهش از روش موتاسیون تصادفی با استفاده از اشعه UV برای ایجاد جهش در مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* DSM8218 استفاده شد. تکنیک مورد استفاده جهت غربالگری، سرولنین بود که از تکنیک رپلیکا پرینتینگ موثرتر عمل کرد. ۸ سویه ی موتانت با توانایی بالای تولید بیومس و لیپید جداسازی شدند که در بین آن ها یکی از موتانت ها دارای بیشترین توانایی در زمینه ی تولید لیپید میکروبی بود. از تکنیک کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده ای برای آنالیز پروفایل اسید چرب تولید شده استفاده گردید. علاوه بر این اثر موتاسیون به همراه سه فاکتور مهم و موثر بر تولید چربی مخمری با کمک روش آماری تاگوچی مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش ها

سویه ی مخمری

سویه ی مخمری مورد استفاده در این تحقیق *یاروویا لیپولیتیکا* DSM8218 به عنوان سویه ی استاندارد مولد چربی بود.

آماده سازی مایه تلقیح و تهیه محیط تولید

سویه ی مخمری در ابتدا بر روی محیط (Yeast Extract YPD Peptone Dextrose Agar) به مدت دو روز کشت داده شد. پس از آن به ارلن مایر ۱۰۰ میلی لیتری که حاوی ۲۰ml محیط پیش تولید بود، منتقل گردید. این محیط دارای ۲۰ g/L گلوکز، ٤ g/L $(NH_4)_2SO_4$ ، ۲ g/L KH_2PO_4 ، ۱ g/L $MgSO_4.7H_2O$ و ۱ g/L عصاره مخمر با pH= ۵ بوده و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۵°C و ۱۵۰rpm قرار گرفت. پس از آن ۵ میلی لیتر از مایه تلقیح به ٤۵ میلی لیتر از محیط تولید در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری انتقال داده شد، این محیط دارای g/L ۳۰ گلوکز، ۱g/L $(NH_4)_2SO_4$، ۷g/L KH_2PO_4، ۲g/L NaH_2PO_4 ، ۱/۵ g/L $MgSO_4.7H_2O$ و ۱ g/L عصاره مخمر با pH= ٦ بوده و به مدت ۹٦ ساعت در دمای ۲۵°C و ۱۵۰rpm کشت داده شد[۲۷].

موتاسیون با اشعه ی UV

در ابتدا سویه ی مورد بررسی به محیط فعال سازی انتقال داده شد. پس از ٤٨ ساعت ۰/۲ میلی لیتر از محیط به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید(٦۰۰۰ rpm). پس از آن دو مرتبه با بافر فسفات شستشو داده شد. بعد از این مرحله به میزان لازم جهت رقیق شدن بافر فسفات اضافه شد. پس از آن ۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون مخمری، کف یک پلیت استریل ریخته شده و داخل دستگاه UV قرار داده شد. مدت زمان های در نظر گرفته شده جهت موتاسیون شامل ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه بود[۲۸].

غربالگری سویه های موتانت

پس از انجام موتاسیون سلول ها بر روی پلیت آگار دار حاوی محیط فقر ازت کشت داده شدند این محیط دارای ۱۰ µg /L سرولنین بود(۲۰). یک کشت از سلول های موتاسیون نیافته نیز در محیط آگار دار حاوی سرولنین و بدون سرولنین جهت بررسی اثر مهاری سرولنین بر سویه های وحشی به عنوان کنترل استفاده گردید. پلیت ها برای مدت ۵ تا ۸ روز انکوبه شده تا کلنی های قابل رویت ایجاد شوند.

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

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 از $400\ cm^{-1}$ 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[۳۱-۲۹].

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 ۶۰ rpm صورت گرفت. روغن استریفیه ی تولید شده در فاز بالایی بوده که با کمک پترولیوم اتر جداسازی شد. پس از آن آنالیز با استفاده از GC-MS (HP 5972 mass selective detector, serie II gas chromatography, Hp) انجام گرفت [۳۲-۳٤].

تعیین میزان لیپید و بیومس سلولی

به منظور تعیین میزان لیپید، استخراج لیپید درون سلولی به روش Bligh & Dyer صورت گرفت. این روش در پژوهش های پیشین به صورت کامل توضیح داده شده است[۱۷-۱۵].

به منظور تعیین بیومس خشک سلول نیز ۵ml از محیط تولید در ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از دو مرتبه شستشو با آب، در آون ۸۰ °C قرار داده شد تا به وزن ثابت رسیده و خشک شود. پس از آن بیومس خشک شده توزین گردید[۱۷، ۳۵].

تعیین میزان تولید لیپید

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

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

به منظور اندازه گیری میزان روغن تولیدی، ابتدا روغن استخراج شده توزین گردید [۵].

بررسی سوپرناتانت برای محاسبه قند مصرف شده

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

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

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

بررسی میزان قند مصرف شده با کمک معرف DNS (دی نیتروسالیسیلات) صورت پذیرفت[۵].

تولید لیپید در شبه فرمانتور آزمایشگاهی

برای این منظور از یک ارلن ۳ لیتری استفاده شد که میزان محیط کشت موجود در آن به صورت L ۱/۵در نظر گرفته شد تا میزان تولید لیپید در مقیاس بالاتر توسط سویه ی موتانت مورد بررسی قرار گیرد. انکوباسیون در دمای ۲۵°C به مدت ۷۲ ساعت با دور ۱۵۰ rpm و ٦= pH انجام گرفت. غلظت مواد مطابق شرایط بهینه ی به دست آمده در مرحله ی بعد، استفاده گردید. سوسپانسیون فعالسازی شده (از موتانت برتر)، به عنوان مایه تلقیح به میزان ۵٪ به محیط تولید اضافه شد.

بررسی سایر فاکتورهای موثر بر تولید چربی

در این مرحله اثر ٤ فاکتور مهم بر تولید روغن مخمری مورد بررسی قرار گرفت. این فاکتورها شامل مدت زمان جهش، مدت زمان انکوباسیون، غلظت گلوکز و غلظت سولفات آمونیوم بودند. تحقیقات قبلی انجام شده [۱۷-۱۵] نشان دادند که غلظت گلوکز و نیتروژن و یا به عبارتی نسبت کربن به نیتروژن مهم ترین عامل در تولید روغن مخمری است. در بین پارامترهای فیزیکی نیز مدت زمان انکوباسیون سهم به سزایی دارد. لذا در اینجا این سه عامل به همراه جهش بررسی شدند. جدول ۱ سطوح مختلف پارامترهای مورد بررسی را نشان می دهد. انتخاب سطوح پارامترهای مورد بررسی با توجه به ویژگی های مخمر مورد نظر انجام می شود. برای مثال دانستن این موضوع که مخمرهای *یاروویا لیپولیتیکا* پس از ۷۲ ساعت چربی ذخیره ای خود را مصرف می کنند به انتخاب طیف مورد بررسی کمک می کند. انجام آزمایشات نیز در این مرحله موثر هستند. برای مثال یک بررسی اولیه در مورد این مخمر نشان داد که مدت زمان جهش بیش از ۵ دقیقه بیشتر کلنی ها را از بین می برد لذا بررسی این عامل در همین محدوده انجام شد. علاوه بر آن برنامه ی تاگوچی نیز به انتخاب درست محدوده ی بررسی کمک می کند.

جدول۱ سطوح مرتبط با متغیرهای موثر بر تولید روغن مخمری

متغیرها	سطح اول	سطح دوم	سطح سوم
مدت زمان جهش (min)	۳	۵	۷
مدت زمان انکوباسیون (h)	٤٨	۷۲	۹٦
غلظت گلوکز (g/L)	۳۰	۵۰	۷۰
غلظت سولفات آمونیوم(g/L)	۰/۵	۱	۱/۵

۳- نتایج

تولید لیپید قبل از ایجاد موتاسیون

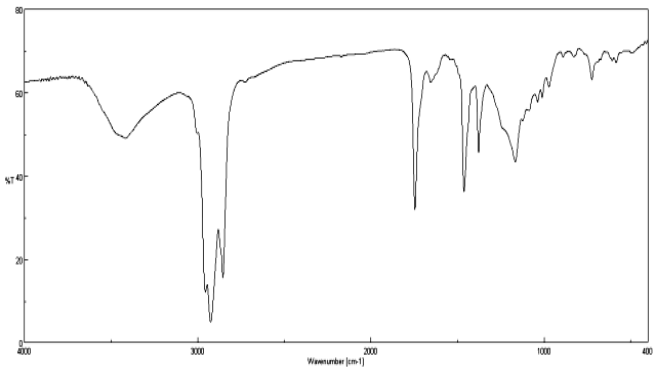
نتایج تولید لیپید در این سویه قبل از ایجاد موتاسیون در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول۲ نتایج تولید لیپید در محیط تولید قبل از ایجاد موتاسیون

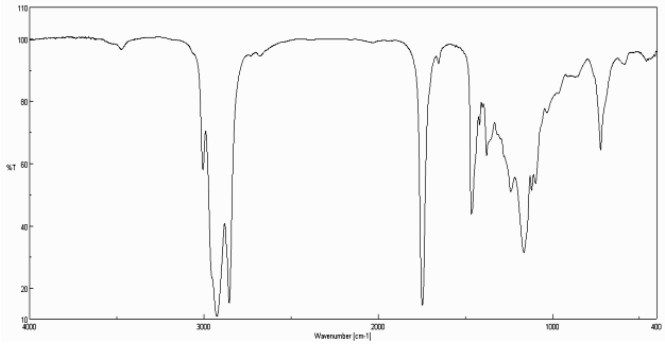
شرایط	مقدار لیپید تولیدی (g/L)	بیومس خشک (g/L)	درصد تولید لیپید به وزن خشک	SCO Yield Efficiency	Growth Yield Efficiency
محیط تولید قبل از بهینه شدن	۵/٦۷	١٦/٧٦	۳۳/۸۳	٦/۵	۲۵/۱۵

آنالیز لیپید تولید شده با استفاده از تکنیک FTIR Spectroscopy

گراف های حاصل از نمونه روغن تولیدی و تری اولئین (استاندارد) در شکل شماره ۱ (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[۲۹-۳۱].



شکل ۱ گراف FTIR مربوط به استاندارد تری اولئین



شکل ۲ گراف FTIR مربوط به روغن سویه ی یارویا لیپولیتیکا DSM8218

انتخاب موتانت با استفاده از روش غربالگری سرولنین

در مدت زمان های موتاسیون بیش از ۵ دقیقه کلنی های بسیار کمتری رشد کردند که نشان دهنده ی مرگ مخمرها در مدت زمان های موتاسیون بالاتر است.

پس از موتاسیون، سلول ها در محیط دارای سرولنین غربالگری شدند. در محیط های بدون سرولنین قطر کلنی های مخمر حدود ۰/۸ میلی متر است در حالی که در محیط های حاوی سرولنین قطر کلنی بسیار کوچکتر و بین ۰/۱ تا ۰/۲ میلی متر باقی می ماند. اما در مورد سویه های موتانت قطر کلنی ها در حضور سرولنین بزرگتر شده و این کلنی های بزرگ جداسازی و غربالگری شدند. ۸ مورد از این کلنی ها برای استخراج لیپید انتخاب گردیدند و یک مورد از بهترین آن ها به همراه سویه ی وحشی جهت آنالیز پروفایل اسیدهای چرب آن و تغییرات ترکیب اسیدهای چرب قبل و بعد از موتاسیون بررسی شدند. قبلاً از سرولنین جهت افزایش محتوای اسیدهای چرب غیر اشباع در قارچ *مورتیرلا مارینا* استفاده شده بود(۳۶). علاوه بر آن جهت شناسایی موتانت های با قدرت بالای تولید لیپید در مخمر *رودوتورولا گلوتینس* نیز به کار رفته بود(۲۰).

جدول ۳ نتایج مربوط به غربالگری کلنی های با قابلیت بالاتر تولید لیپید در مدت زمان ۵ دقیقه را نشان می دهد. مدت زمان های بیشتر موجب از بین رفتن مخمر شده و در نتیجه هیچ گونه رشدی مشاهده نشد. کلیه ی نتایج ارائه شده در جدول بر اساس میانگین سه بار تکرار آزمایشات گزارش شده است.

جدول ۳ نتایج تولید لیپید مربوط به کلنی های موتانت غربال شده با روش سرولنین

شرایط	مقدار لیپید تولیدی (g/L)	بیومس خشک (g/L)	درصد تولید لیپید به وزن خشک	SCO Yield Efficiency	Growth Yield Efficiency
کلنی A	۵/۹۵	۱۶/۳۵	۳۶/۳۹	۷/۸	۳۰/۴۵
کلنی B	۶/۶۴	۱۴/۳۵	۴۶/۲۵	۷/۹	۴۰/۴۳
کلنی C	۶/۸۵	۱۳/۸۵	۴۹/۴۴	۸/۸	۴۲/۳۲
کلنی D	۷/۵۶	۱۳/۸۴	۵۴/۶۲	۹/۲	۵۰/۱۲
کلنی E	۷/۹۲	۱۴/۰۰	۵۶/۵۶	۹/۶	۵۱/۲۰
کلنی F	۸/۴۲	۱۴/۸۱	۵۶/۸۳	۱۰/۱	۵۲/۴۵
کلنی G	۹/۲۷	۱۶/۱۳	۵۷/۴۵	۱۰/۶	۵۳/۹
کلنی H	۱۰/۶۳	۱۷/۶۱	۶۰/۳۴	۱۱/۳	۵۶/۵۵

آنالیز اسیدهای چرب با GC-MS

جدول ۴ پروفایل اسیدهای چرب را در سویه ی وحشی و موتانت نشان می دهد(درصد ناچیزی از سایر اسیدهای چرب نیز وجود دارد که به علت جزئی بودن نشان داده نشده است). میزان اسید های چرب غیر اشباع در سویه ی موتانت به میزان حدود ۳٪ و ۶٪ در مورد اولئیک اسید و لینولئیک اسید به ترتیب افزایش یافته است. در مورد سایر اسید های چرب غیر اشباع نیز افزایش کمی در سویه ی موتانت مشاهده شد. به این ترتیب پروفایل اسید چرب در بین سویه ی وحشی و موتانت دست خوش تغییرات زیادی نشده است. این موضوع از نظر حفظ پروفایل لیپیدی مخمر که غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع است، اهمیت دارد. بنابراین با حفظ پروفایل و حتی افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع، می توان به تولید بالاتری دست یافت. در مورد هر دو سویه اولئیک اسید بیشترین در صد اسیدهای چرب غیر اشباع را به خود اختصاص داده است که نشان دهنده ی این است که موتاسیون بر تغییر پروفایل اسید چرب تاثیر چندانی نداشته است. تنها تفاوت موجود افزایش کمی در میزان اسید های چرب غیر اشباع می باشد. جدول ۴ نشان می دهد که همزمان با افزایش در اولئیک اسید کاهشی جزئی در استئاریک اسید مشاهده می شود. این موضوع نشان می دهد که به دنبال ایجاد موتاسیون در ژن کد کننده ی آنزیم دلتا- ۹ فتی اسید دسچوراز و ایجاد پیوند توسط آنزیم مذکور استئاریک اسید به اولئیک اسید تبدیل شده و میزان اسیدچرب غیر اشباع افزایش یافته است(۳۷). از دیدگاه بیوتکنولوژی این نتایج جالب توجه است زیرا میزان اشباع بودن اسیدهای چرب بر ویژگی های فیزیکی – شیمیایی مهمی نظیر ویسکوزیته، اکسیداسیون و نقطه ی ذوب تاثیر می گذارد (۳۸).

Mlickova و همکارانش نیز در یک بررسی به این نتیجه رسیدند که موتاسیون باعث تغییر چندان زیادی در پروفایل اسیدهای چرب مخمری نمی شود(۳۹).

جدول ٤ پروفایل اسیدهای چرب در سویه ی وحشی و استاندارد

سویه ی مخمری	C14:0 (myristic acid)	C16:0 (palmitic acid)	C16:1 (palmitoleic acid)	C18:0 (Stearic acid)	C18:1 (oleic acid)	C18:2 (linoleic acid)
سویه ی وحشی	۰/۸٦	۸/۲	۱۳/۸	۱/۱	٦۳/۷	٤/۳
سویه ی موتانت	۰/۳	۵/۵	۱٤/۵	۰/۹	٦٦/٦	۱۰/٦

تولید لیپید در فرمانتور آزمایشگاهی

تولید لیپید با استفاده از سویه ی موتانت در مقیاس بالاتر با موفقیت انجام گردید و سویه ی موتانت نسبت به سویه ی وحشی تولید بیشتری داشت. میزان تولید در سویه ی موتانت ۵۰٪ بیشتر شده بود و افزایش ظرفیت تولید در سویه ی موتانت را مورد تایید قرار داد. این میزان افزایش که تولید را تا دو برابر بالا می برد از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت می باشد و ارزش این تکنیک را دو چندان می نماید. هر چند با سایر روش های بهینه سازی نیز می توان تولید لیپید را افزایش داد، لیکن ظرفیت مخمر برای تولید تغییر نمی کند. اما با کمک موتاسیون می توان ظرفیت مخمری را نیز افزایش داد. بدیهی است همگام شدن این روش با بهینه سازی شرایط نتیجه ی حاصله را بسیار مطلوب تر می نماید.

نتایج بهینه سازی با استفاده از روش تاگوچی

جدول ۵ نتایج حاصل از بهینه سازی با استفاده از روش تاگوچی را نشان می دهد. برنامه ریزی تاگوچی روش L9 را پیشنهاد داد که در آن ۹ آزمایش با شرایط متفاوت برای رسیدن به بهترین حالت انجام داده شد. در جدول ۵ شرایط هر آزمایش به همراه نتیجه ی آن قابل مشاهده است. میزان لیپید تولید شده بر اساس میانگین سه تکرار گزارش شده است. به طور کلی برنامه ی تاگوچی بر اساس میانگین حداقل سه تکرار آزمایش، نتایج را مورد بررسی قرار می دهد.

جدول ۵ شرایط آزمون L9 و نتایج حاصل از تولید لیپید

آرایه ها	مدت زمان جهش (min)	مدت زمان انکوباسیون (h)	غلظت گلوکز (g/L)	غلظت سولفات آمونیوم (g/L)	تولید لیپید(g/L)
آرایه ی ۱	**۳**	**٤۸**	**۳۰**	**۰/۵**	**۸/٦۷**
آرایه ی ۲	**۳**	**۷۲**	**۵۰**	**۱**	**۹/٤۱**
آرایه ی ۳	**۳**	**۹٦**	**۷۰**	**۱/۵**	**٦/۱۷**
آرایه ی ٤	**۵**	**٤۸**	**۵۰**	**۱/۵**	**۹/۱۹**
آرایه ی ۵	**۵**	**۷۲**	**۷۰**	**۰/۵**	**۱۱/٤۳**
آرایه ی ٦	**۵**	**۹٦**	**۳۰**	**۱**	**۸/۲٦**
آرایه ی ۷	**۷**	**٤۸**	**۷۰**	**۱**	**٦/۹۸**
آرایه ی ۸	**۷**	**۷۲**	**۳۰**	**۱/۵**	**٦/۸۲**
آرایه ی ۹	**۷**	**۹٦**	**۵۰**	**۰/۵**	**۸/۹۱**

جدول ٦ نتایج آنالیز واریانس در مورد بهینه سازی تولید لیپید را نشان می دهد. در این جدول درصد تاثیر پارامترهای مختلف بر میزان تولید لیپید در این مخمر مقایسه شده است. همان طور که نتایج نشان می دهد بیش از آن که غلظت گلوکز و نیتروژن مهم باشد، نسبت کربن به نیتروژن دارای اهمیت است. چون هر چه میزان سولفات آمونیوم کاهش می یابد میزان تولید لیپید به دلیل

افزایش نسبت کربن به نیتروژن بیشتر می شود. البته به دلیل نیاز مخمر به نیتروژن این کاهش نیز محدودیت دارد و باید تا حدی باشد که نیازهای مخمر را بر آورده سازد.

جدول ٦ نتایج آنالیز واریانس در مورد شرایط هیدرولیز اسیدی

عامل	درجه آزادی	مجموع مربعات(S)	واریانس	مجموع خالص مربعات(S´)	درصد تاثیر عامل
مدت زمان جهش (min)	٢	٦/٨٧٥	٣/٤٣٧	٦/٨٧٥	٣٣/٢٨٢
مدت زمان انکوباسیون (h)	٢	٣/٢٠٧	١/٦٠٣	٣/٢٠٧	١٥/٥٢٦
غلظت گلوکز (g/L)	٢	٢/٦٠١	١/٣	٢/٦٠١	١٢/٥٩٢
غلظت سولفات آمونیوم (g/L)	٢	٧/٩٧٣	٣/٩٨٦	٧/٩٧٣	٣٨/٥٩٨
مجموع	٨	٢٠/٦٥٦	----	٢٠/٦٥٦	١٠٠

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. Leesing و همکارانش به بیشترین میزان تولید لیپید در مخمر *تورولاسپورا گلوبوسا* با غلظت ٨٠g/L گلوکز دست یافتند. افزایش غلظت گلوکز به بیش از ٨٠g/L منجر به کاهش غلظت لیپید و بیومس می شود که این نشان دهنده اثر ممانعت کننده گلوکز در غلظت های بالاست(٤٠). Karatay و همکارانش گزارش دادند که میزان لیپید در سلول های مخمری با افزایش غلظت سولفات آمونیوم به بیش از ١/٥ g/L کاهش می یابد(١٠). در سویه های *یاروئیا لیپولیتیکا* میزان تولید چربی پس از ٧٢ ساعت رو به کاهش می رود که این موضوع با سویه مورد بررسی قابل تطبیق است، زیرا سویه های مخمر *یاروئیا لیپولیتیکا* حتی در حضور منبع کربن پس از حدود ٨٠ ساعت شروع به مصرف چربی ذخیره ای خود می کند(٤١). این نتایج با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد. تحلیل نتایج نشان می دهد که مدت زمان جهش چنانچه بیش از ٥ دقیقه باشد منجر به مرگ اکثر مخمرها شده و کلنی های بسیار کمتری رشد خواهند کرد. نتایج نشان می دهد که مدت زمان ٥ دقیقه بهترین نتیجه را به دنبال دارد. همان طور که در جدول ٦ نشان داده شده است مدت زمان جهش به میزان ٣٣/٢٨٪ بر تولید لیپید موثر بوده است. چنانچه جهش منجر به افزایش تولید لیپید در کلنی های مورد بررسی شده باشد اندازه کلنی افزایش می یابد. Beopoulos و همکاران در مقایسه ژنومی بین *یاروئیا لیپولیتیکا* و *ساکارومایسس سروزیه* به این نتیجه رسیدند که ژن GUT2 که کد کننده گلیسرول ٣ فسفات دهیدروژناز است باعث هدایت مسیر کربن به سمت سنتز لیپید می گردد(٤٢). به این ترتیب با شناسایی آنزیم های موثر بر مسیر سنتز لیپید می توان علاوه بر جهش های تصادفی نظیر موتاسیون UV با کمک جهش های هدفمند، مستقیماً بر روی ژن مربوطه اثر گذاشت و محتوای لیپیدی آن را افزایش داد. عدم توانایی در دستکاری ژنتیکی سویه های مخمری باعث وجود مشکل برای کاربرد صنعتی این میکروارگانیسم ها در تولید بیودیزل و سایر محصولات بیولوژیکی می شود(٤٣). در این تحقیق از *یاروئیا لیپولیتیکا* به عنوان سویه ای با پتانسیل کاربردی بالا در تولید روغن میکروبی استفاده شد و با موتاسیون اشعه ماورای بنفش و روش غربالگری سرولنین میزان تولید لیپید در این مخمر افزایش یافت. سرولنین در مطالعه ی سنتز و متابولیسم اسیدهای چرب و استرول ها توسط میکروارگانیسم ها استفاده می شود که از آن برای غربالگری سویه های با پتانسیل بالای تولید لیپید در مورد *رودوتورولا گلوتینیس* استفاده شده است(٤٨-٤٤).

٤- نتیجه گیری کلی

موتاسیون و غربالگری با سرولنین به عنوان راهی موثر، منجر به افزایش تولید لیپید در مخمرهای مولد چربی می گردد. بهینه سازی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی تا حد ظرفیت سویه ی مخمری می تواند تولید چربی را افزایش دهد در حالی که با دست کاری ژنتیکی می توان گامی فراتر نهاده و پتانسیل تولید در سویه ی مورد نظر را بالاتر برد. بهینه سازی فاکتورهای موثر بر

تولید چربی در مخمرها سهم به سزایی در افزایش تولید روغن تک یاخته دارد. علاوه بر آن با موتاسیون می توان میزان اسیدهای چرب غیر اشباع مورد نظر را در ترکیب چربی مخمری افزایش داد. این مطالعه نشان داد که موتاسیون تصادفی به همراه روش غربالگری سرولنین برای افزایش ظرفیت تولید لیپید در مخمرهای مولد چربی موثر عمل می کند. در این پژوهش میزان تولید لیپید در سویه ی موتانت تا حدود۵۰ ٪ افزایش یافته است که عملکرد موثر این روش را نشان می دهد.

۵- تقدیر و تشکر

این مقاله از طرح پژوهشی به کد ۹۲۰۶۲ 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] 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.

[2] 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, 1-13.

[3] Ratledge, C, 2002, Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms, Biochemical society, 6, 1047-1050.

[4] 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 Factories, 9(73),1-6.

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

[6] Zlatanov, M, Pavlova, K, Grigrova, D, 2001, Lipid composition of some yeast strains from Livingston island, Antarctica, Folia Microbiology, 46(5), 402-406.

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

[8] Fidler, N, Koletzho, B, Sauerwald, TU, 1999, Single cell oil production and application, 5, 37-45.

[9] Kosa, M, Ragauskas, AJ, 2010, Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research, Trends in Biotechnology, 29, 53-61.

[10] 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.

[11] 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, 1750-54.

[12] Drucken, Z, 2008, Triacylglycerol synthesis in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, Bioresource Technology, 9(2), 309-319.

[13] Wynn, PJ, Ratledge, C, 2005, Oils from microorganisms, Martek Bioscience Corporation, 4, 121-153.

[14] Sabirova, JS, Haddouche, R, Van Bogaert, IN, Mulua, F, Verstraete, W, Timmis,C, Schmidt-Dannert, KN, Nicaud, JM, Soetaert, W, 2011, 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), 47-54.

[15] 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.(a)

[16] 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. (b)

[17] Enshaeieh, M, Nahvi, I, Madani, M, 2014, Improving Microbial Oil Production with Standard and native Oleaginous Yeasts by using Taguchi Design, International Journal of Environmental Science and Technology, 11, 597-604.

[18] Keller, B, Zolzer, F, Kiefer, J, 2004, Mutation induction in haploid yeast after split-dose radiation exposure. II. Combination of UV-irradiation and X-rays, Environmental and Molecular Mutagenesis, 43, 28-35.

[19] Patnayak, S, Sree, A, 2005, Screening of bacterial associates of marine sponges for single cell oil and PUFA, Letters in Applied Microbiology, 40, 358-363.

[20] Wang, JF, Li, RM, Lu, D, Ma, S, Yan, YP, Li, WJ, 2009, A quick isolation method for mutants with high lipid yield in oleaginous yeast, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25, 921-925

[21] Nishiuchi, H, Tabira, Y, Yamagishi, K, 2012, A combination of flow cytometry and traditional screening using chemicals to isolate high glutathione-producing yeast mutants, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 76(6), 1085-1090.

[22] Thakur, MS, Prapulla, SG, Karanth, NG, 1989, Estimation of intracellular lipid by the measurement of absorbance of yeast cells stained with Sudan Black B, Enzyme and Microbial Technology, 11, 252-254.

[23] Izard, J, Limberger, RJ, 2003, Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells, Journal of Microbiological Methods, 55, 411-418.

[24] Evans, CT, Ratledge, C, Gillbert, C, 1985, A rapid screening method for lipid-accumulating yeast using replica- printing technique, Journal of Microbiological Methods, 4, 203-210.

[25] Satoshi, Ô, 1976, The Antibiotic Cerulenin, a Novel Tool for Biochemistry as an Inhibitor of fatty Acid Synthesis, AMS News, 40, 681-697. [26] Heath, RJ, White, SW, Rock, CO, 2001, Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents, Progress in Lipid Research, 40, 467-497.

[27] 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, china, 215-220.

[28] Tapia, EV, Anschau, A, Coradini, ALV, Franco, T, Deckmann, AC, 2012, Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening, AMB express, 2 (64), 1186- 91.

[29] 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.

[30] 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.

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

[32] 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.

[33] Wu, Q, Miao, XL, 2006, Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil, Bioresource Technology, 97, 841-846.

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

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

[36] Morita, N, Nishida, T, Tanaka, M, Yano, Y, Okuyama, H, 2005, Enhancement of polyunsaturated fatty acid production by cerulenin treatment in polyunsaturated fatty acid-producing bacteria, Biotechnology Letters, 27, 389-393.

[37] Martin, CE, Jiang, Y, 2007, Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in

yeast. Biochimica Biophysica Acta, 1771(3), 271-285.

[38] Shahidi, F, 2005, Quality Assurance of Fats and Oils. In: Shahidi F (ed) Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6 Volume Set, 6th edn. John Wiley & Sons, Inc.

[39] Mlickova, K, Roux, E, Athenstaedt, K, Andrea, S, Daum, G, Chardot, T, Nicaud, JM, 2004, Lipid accumulation, Lipid body formation and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*, Applied and environmental microbiology, 70 (7), 3918-3924.

[40] Leesing, R, Baojungharn, R, 2011, Microbial Oil production by isolated oleaginous yeast *Torulaspora globosa* YU5/2,World academy of science, Engineering and Technology,76, 799-803.

[41] 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, Verlag, 58:308-312.

[42] Beopoulos, A, 2009, *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation, Biochimie, 91, 692-696.

[43] Ageitos, JM, Vallejo, JA, Veiga-Crespo, P, Villa, TG, 2011, Oily yeasts as oleaginous cell factories, Applied Microbiology and Biotechnology, 90(4), 1219-1227.

[44] Hata, T, Matsumae, A, Nomura, S, Kim, T, Ryan, K, 1960, Studies on cerulenin, a new antifungal antibiotic. II. Biological characteristic and therapeutic effect of cerulenin, Japanese Journal of Medical Mycology, 1, 382-383.

[45] Kawaguchi, A, Tomoda, H, Nozoe, S, Omura, S, Okuda, S, 1982, Mechanism of action of cerulenin on fatty acid synthetase, Effect of cerulenin on iodoacetamide-induced malonyl-CoA decarboxylase activity, The Journal of Biochemistry, 92(1), 7-12.

[46] Altenbern, RA, 1977, Cerulenin-Inhibited Cells of *Staphylococcus aureus* Resume Growth When Supplemented with Either a Saturated or an Unsaturated Fatty Acid, Antimicrob Agents Chemother, 11(3), 574-576.

[47] Parrish, NM, Kuhajda, FP, Heine, HS, Bishai, WR, Dick, JD, 1999, Antimycobacterial activity of cerulenin and its effects on lipid biosynthesis, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 43(2), 219-226.

[48] Parsons, JB, Frank, MW, Subramanian, C, Saenkham, P, Rock, CO, 2011, Metabolic basis for the differential susceptibility of Gram-positive pathogens to fatty acid synthesis inhibitors, Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(37), 15378-15383. #

Improving production of oil rich in essential unsaturated fatty acids by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* with mutagenesis and cerulenin screening method

Enshaeieh, M. [1*], Azadeh Abdoli[1], Mahboobeh Madani[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: 93/3/31 Accepted: 93/9/29)

Microbial oil has lots of similarity to the plant's oil; the only difference between them is that microbial oil is rich in unsaturated fatty acids. This oil can be used in pharmaceutical industry for technical purposes or as edible oil in food industry. The purpose of this study was to increase lipid production and the amount of unsaturated fatty acids in oleaginous yeasts by mutagenesis. In this study, optimization of lipid production in the yeast ,*Yarrowia lipolytica*, was done using ultraviolet random mutation and screening was done with the inhibitory effect of cerulenin on lipid synthesis. Mutants that had normal growth in the presence of cerulenin were selected as superior strains for further investigations. Lipid production in mutants and wild strains were compared after incubation period. Then, the mutant with significant increase in lipid production was selected. The best mutant had increasing of 50% and 30% in lipid production and growth yield, respectively. Also, Linoleic acid was increased after mutation. The composition of fatty acids in the lipid profile of the evaluated yeast did not change a lot after mutation. Of course, unsaturated fatty acids were increased, so this technique was very effective to improve lipid production. Cerulenin used as an effective screening technique in this study and paved the way for the isolation of superior mutants.

Key words: Microbial oil, Unsaturated fatty acids, *Yarrowia lipolytica,* Mutation

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