

# جداسازی و تشخیص گونه های مخمر روغنی *Candida SAGSGC* *Orthopsilosi* با استفاده از ژن ریبوزومی از ماهی سوف و بهینه سازی تولید روغن و توده زیستی از آن

حمیدرضا صمدلویی<sup>۱\*</sup>، لیلا قاسمی<sup>۲</sup>، حسین جلالی<sup>۳</sup>، شاهرخ قرنجیک<sup>۴</sup>

۱- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

۲- دانش آموخته گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد واحد دامغان

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

۴- استادیار گروه پژوهشی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۱۲)

## چکیده

با توجه به نیاز بشر به غذای فراسودمند و با توجه به اهمیت اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره به عنوان غذای فراسودمند شناخت منابع غنی تولید کننده این اسیدهای چرب مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. نتایج تحقیقات نشان داده که ریزسازواره ها بویژه گونه های مخمری منبع غنی از این اسیدهای چرب غیراشباع می باشند. در این تحقیق نمونه های مخمری از ماهی سوف جداسازی شد در مرحله بعد DNA ریبوزومی گونه ای از مخمر که توانایی تولید بالای ۲۰ درصد روغن را داشت برای تشخیص گونه مخمری استفاده شد. با توجه به درختچه فیلوژنتیکی پی برده شد گونه مخمر جداسازی شده از آبشش ماهی سوف *Candida orthopsilosi SAGSGC* می باشد. طرح آماری سطح پاسخ نشان داد که بیشترین مقدار روغن (۲۶،۳) در غلظت گلوکز (۵۰ g/L) و عصاره مخمر (۵ g/L) بدست آمد. مقادیر متغیرهای گلوکز و عصاره مخمر به منظور تولید حداکثری توده زیستی (۱،۱۶٪) به ترتیب ۴۶،۱۶ گرم در لیتر و ۱۹،۶۷ گرم در لیتر بدست آمد. کاهش دما باعث افزایش اسید چرب غیراشباع بلندزنجیره تا سطح ۲۴ درصد در روغن این گونه میکروبی شد. نتایج نشان داد در شرایطی که دما در انتهای فرایند تخمیر کاهش یافت، اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره بالای ۲۰ کربن افزایش می یابد در حالیکه کاهش دما از ابتدای فرایند باعث افزایش غیراشباعیت در اسیدهای چرب ساختاری مانند لینولیک و لینولینیک شد.

**کلید واژگان:** مخمر، روغن تک یاخته، اسیدهای چرب چند غیراشباع، جداسازی، بهینه سازی و سطح پاسخ

## ۱- مقدمه

مخمرها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. توانایی تولید محدوده وسیع تری از اسیدهای چرب، با استفاده از ضایعات کشاورزی برای تولید محصول و رشد در محیط‌هایی با دامنه وسیع pH از ویژگی های مثبت این نوع از ریزسازواره‌ها می باشد. از آنجایی که محیط کشت برای رشد و تولید محصول توسط ریزسازواره‌ها بسیار اهمیت دارد تحقیقات وسیعی در جهت بهینه سازی این عوامل انجام شده است [۹-۱۱]. با توجه به تحقیقات اخیر انجام شده چنین به نظر می رسد که از مهمترین نکات مورد توجه برای تولید محصول روغنی از گونه‌های میکروبی مولد روغن، بهینه سازی شرایط محیط کشت می باشد. با توجه به تحقیقات انجام شده جداسازی گونه‌های روغنی واجد توانایی تولید اسیدهای چرب غیر اشباع مهم که نقش زیادی در سلامتی انسان دارند گامی موثر در جهت صنعتی کردن طیف وسیعی از ریزسازواره‌ها جهت تولید تجاری آنها می باشد. در این راستا در این تحقیق گونه‌های مخمیری از ماهیان کپور جداسازی و سپس به روش مولکولی شناسایی شد و با توجه به اهمیت ترکیبات محیط کشت در تولید روغن و توده زیستی شرایط محیط کشت با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه سازی شد و در انتها تاثیر کاهش دما بر پروفایل اسید چرب بررسی شد

## ۲- مواد و روشها

## ۱-۲- انتخاب گونه مناسب ماهی

در این پژوهش ۳ گونه ماهی شامل کپور، سوف و قزل آلا انتخاب شد. سطح بدن ماهی با الکل ۷۰٪ شستشو داده شد. توسط چاقوی استریل ۱ گرم نمونه از آبشش ماهی جداسازی شد. نمونه های جدا شده در محیط کشت YGC در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز گرمخانه گذاری گردید. تک کلنی جداسازی شده پس از رشد برای مطالعه بعدی در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد [۱۲].

## ۲-۲- مایه تلقیح و کشت‌های اصلی

تک کلنی بدست آمده از کشت خطی برای تهیه سوسپانسیون مخمیری استفاده شد. برای آماده سازی سوسپانسیون مخمر،

با رشد تکنولوژی و شناخت علمی تر نیاز های غذایی انسان توجه دانشمندان در سالیان اخیر به غذا های فراسودمند افزایش چشمگیری یافته است. غذا های فراسودمند نقش مهمی در سلامتی انسان داشته که از آنجمله می توان به اسیدهای چرب ضروری اشاره کرد که در بدن انسان یا ساخته نمی‌شود و یا میزان تولید آن کمتر از نیازش می‌باشد [۱]. اسیدهای چرب بلند زنجیره چند غیرشباعی<sup>۱</sup> در بین اسیدهای چرب نقش فیزیولوژیکی مهمی در بدن داشته که از آنجمله می توان به لینولئیک اسید (LA)، آراشیدونیک اسید (ARA)، دوکوگزانوئیک اسید (DHA) و ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) اشاره کرد. در مطالعات انجام شده در بین اسیدهای چرب لینولئیک اسید به علت اثرات مثبت در درمان بیماری-هایی مانند آترواسکلروزیس، آرتریت روماتوئید، فشارخون، برخی اسرطان‌ها و بیماری‌های روانی (شیزوفرنیوآلزایمر) مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (۲). بدن انسان اسید چرب آلفالینونیک اسید (ALA) را به EPA تبدیل می کند ولی میزان آن بسیار پایین است (۳،۴). مهمترین معضل در تولید این اسیدهای چرب ضروری منبع مناسب تولید می‌باشد دانشمندان در تحقیقات وسیعی در پی شناخت منبع مناسبی تولید این نوع اسیدهای چرب ضروری می‌باشند [۵]. گیاهان و جانوران فاقد توانایی تولید اسیدهای چرب بلند زنجیره غیراشباع می‌باشند. منبع اصلی PUFA روغن ماهی می‌باشد، اما جداسازی و تخلیص PUFA از آن مشکل و پیچیده است و وجود آلاینده‌های صنعتی خطر استفاده از این منبع غذایی را افزایش داده است (2004, FDA). با اندکی تحقیق دانشمندان پی بردند که ریزسازواره‌ها می توانند به عنوان منشا غنی از PUFA در رژیم غذایی انسان استفاده شوند از این رو بهره برداری تجاری از روغن تک یاخته<sup>۲</sup> به منظور مصرف انسانی آغاز گردید. ریزسازواره‌هایی که توانایی تولید روغن داشته<sup>۳</sup> در شرایطی که نیترژن محیط کشت تخلیه شده باشد و در حضور منبع کربنی با جذب آسان شروع به تجمع چربی می کند (۶،۷،۸). در بین ریزسازواره‌های روغنی، قارچ به خصوص

1. Poly unsaturated fatty acid (PUFA)  
2. Single Cell Oil (SCO)  
3. Oleaginous

## ۲-۴- اندازه‌گیری وزن خشک توده زیستی

برای جداسازی توده زیستی از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱، بر روی قیف بوختر مجهز به پمپ خلاء استفاده شد. سپس برای اندازه‌گیری وزن خشک سلولی<sup>۳</sup> آنها را بر روی شیشه‌های ساعت قرار داده و به مدت ۲ ساعت در آون با درجه حرارت ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند [۱۵].

## ۲-۵- استخراج روغن

برای استخراج روغن، توده زیستی خشک شده در هاون چینی خرد شد. روغن پودر حاصله با حلال نرمال هگزان در دستگاه سوکسله شیشه ای (Solab آلمان که مجهز به گرم کن مدل EV16 ساخت شرکت Gerhardt آلمان) استخراج گردید [۱۵].

## ۲-۶- اندازه‌گیری اسیدهای چرب

برای تعیین و اندازه‌گیری اسیدهای چرب، با توجه به عدم فراریت اسیدهای چرب بایستی مشتق‌های متیل استر آنها را تهیه نمود. پس از متیلاسیون نمونه‌های روغن، ۰/۵ میکرولیتر نمونه به دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی (78qoa- Gc system) ستون HP-5MS (کاپیلاری، طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و قطر فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) و دتکتور Mass Selective Detector (MSD) مدل 5975C شرکت Agilent Technology کشور آمریکا تزریق شد. گاز استفاده شده هلیوم به خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد با شدت جریان ۱ میلی‌متر در دقیقه استفاده شد. دمای آون از ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه با شیب ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و به مدت ده دقیقه در این دما باقی ماند [۱۶].

## ۲-۷- طراحی آزمایشات

در مرحله اول تحقیق گونه مخمری روغنی به روش مولکولی تشخیص داده شد و به منظور افزایش میزان توده زیستی و روغن بازه‌ای از دو ترکیب کلیدی کربن (گلوکز) و نیتروژن (عصاره مخمر) با توجه به مطالعات و کارهای تحقیقاتی انجام شده انتخاب گردید (جدول ۴-۱) و میزان این دو ترکیب به منظور افزایش تولید روغن و توده زیستی به روش آماری RSM بهینه شد.

۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت شامل گلوکز تک آبه<sup>۱</sup> (۳۰ گرم در لیتر) و عصاره مخمر (۱۰ گرم در لیتر) تولیدی شرکت مرک در یک ارلن ۵۰۰ میلی لیتری تهیه شد، در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سترون گردید. سپس ریزسازواره تلقیح شده و در درجه حرارت ۲۶ درجه سانتی-گراد به مدت ۷۲ ساعت و ۱۷۰ دور بر دقیقه<sup>۲</sup> در اینکوباتور شیکردار گرمخانه‌گذاری شد. ۳ تا ۱۰ درصد از کشت‌های توسعه تلقیح به‌عنوان مایه تلقیح به محیط کشت تولید محصول افزوده شد. برای رشد حداکثری مخمر ۲ گرم در لیتر  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۳ گرم در لیتر  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۱،۵ گرم در لیتر  $\text{MgSO}_4$  به عنوان عناصر معدنی از شرکت مرک استفاده شد (۱۳). محیط کشت تولید محصول که در این پژوهش سطوح کربن و نیتروژن آن بهینه سازی شده پس از استریل و تلقیح مخمر در اینکوباتور شیکر دار به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با دور همزن ۱۸۰ دور در دقیقه به منظور تولید روغن و بررسی نوع اسید چرب قرار گرفت.

## ۲-۳- تشخیص گونه

به منظور تشخیص گونه مخمری که حداکثر روغن را تولید کرده ابتدا نمونه مخمری به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت توسعه تلقیح انکوبه شد. سپس DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (امریکا، K721, Thermo) استخراج شد. نمونه DNA استخراجی با استفاده از پرایمر اختصاصی رفت (3'- و پرایمر برگشتی (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG)) جهت تکثیر منطقه ریبوزومی Non Transcribed Spacer 2 در دستگاه PCR قرار داده شد (۱۴). محصولات PCR با خوانش دوطرفه به طول ۶۸۰ جفت باز از روی ژل استخراج و برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد. پس از تعیین توالی با استفاده از سایت NCBI توالی‌ها BLAST و با استفاده از نرم افزار Mega5 درختچه فیلوژنیکی آن رسم گردید.

1. Glucose monohydrate  
2. Revolution per minute (rpm)

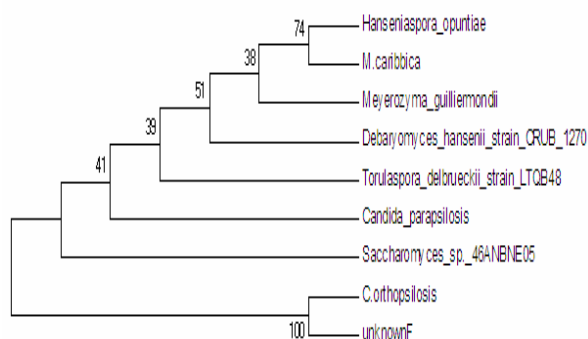
3. Dry cell weight (DCW)

**Table 1** coded and actual independent variation in RSM methods

factor	level				
	-1.4142	-1	0	1	1.4142
Yeast extract	1.8	5	12.5	20	23.1
glucose	13.79	20	35	50	56.2

### ۳-۱- تشخیص گونه میکروبی

در این مرحله از تحقیق شباهت توالی Non Transcribed Spacer 2 گونه مخمری جدا شده با توالی ریبوزومی سایر گونه های مشابه در سایت NCBI بررسی شد. درختچه فیلوژنیکی شکل ۲ تایید می کند که گونه جدا شده به *Candida orthopsilosis* شباهت زیادی دارد. از اینرو این گونه به عنوان *Candida orthopsilosis* SAGSG نامگذاری شد (شکل ۲)



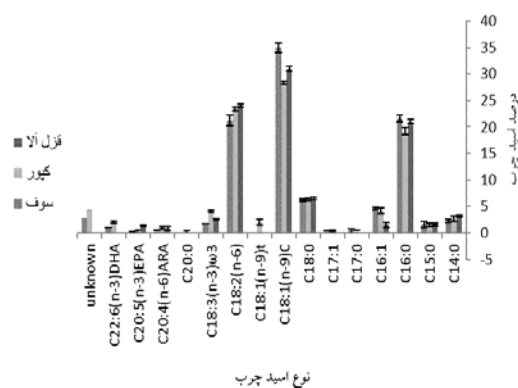
**Fig 2** The phylogenetic of the isolated yeast strain unknown with 8 similar species based on Nearest neighbor interchange analysis of the Non Transcribed Spacer 2 region (The bootstrap level : 1000 pseudo-replications)

درباره توانایی این گونه میکروبی *Candida orthopsilosis* SAGSG در تولید روغن و پروفایل اسید چرب این گونه میکروبی گزارشی محدودی وجود دارد. Kanti و همکاران در سال ۲۰۱۳ اشاره کردند [۱۷] که در دمای ۳۰ درجه و زمان تخمیر ۵ روز *Candida orthopsilosis*InaCC Y-302 توانایی بالایی در تولید روغن دارد. همچنین در تحقیقات اخیر نشان داده شد که گونه *Candida orthopsilosis* توانایی بالایی در تولید روغن داشته است. نتایج این تحقیق نیز نشان

در انتها با بررسی پروفایل نمونه های اعمالی در شرایطی که میزان لینولنیک در پروفایل اسید چرب حداکثری بود تحت تاثیر متغیر کاهش دما تغییرات اسیدهای چرب روغن گونه ایزوله شده بررسی شد.

### ۳- نتایج

پروفایل اسید چرب روغن حاصل از مخمرهای جدا شده از ماهی که در سطح گلوکز ۷۰ گرم در لیتر و عصاره مخمر ۱۰ گرم در لیتر در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد تولید شد نشان داد که در این سه نمونه ماهی، مخمر جدا شده دارای پروفایل اسید چرب مشابه است (شکل ۱).



**Fig 1** profile of fatty acids of lipid of various caspian fishes

همانطور که در شکل ۱ دیده می شود اسید چرب غالب در هر سه نمونه اولئیک می باشد. در هر پرفایل از سه نمونه، اسید-های چرب بلند زنجیره در مشاهده شد و با توجه به بالا بودن میزان اسید چرب لینولنیک در گونه مخمری کپور این گونه میکروبی برای بررسی های بیشتر انتخاب شد.

انطباق داده‌ها در مدل رگرسیون می‌باشد و می‌توان چنین نتیجه گرفت که مدل‌های رگرسیون بخوبی توانسته‌اند رابطه بین شرایط کشت (گلوکز و عصاره مخمر) و میزان توده زیستی و روغن در توده زیستی را نشان داده و پیش‌بینی کنند. همچنین مدل نهایی دارای عدم تطابق<sup>۱</sup> غیر معنی‌دار است که نشان دهنده برازش خوب مدل می‌باشد.

میزان  $R^2$  برای دو فرمول رگرسیون مربوط به توده زیستی و روغن به ترتیب ۰٫۹۵ و ۰٫۹۸ می‌باشد.

طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ به همراه میزان واقعی و پیش‌بینی شده داده‌ها در جدول ۳ گزارش شده است. همانطور که در جدول ۳ دیده می‌شود با ثابت ماندن سطح عصاره مخمر و با افزایش میزان گلوکز روغن و توده زیستی افزایش می‌یابد (نمونه‌های ۲ و ۶). بیشترین میزان روغن در کمترین سطح عصاره مخمر به عنوان منبع پروتئینی و سطوح حد واسط گلوکز بدست آمد که نشان دهنده تاثیر منفی منبع پروتئینی در تولید روغن در این گونه مخمری می‌باشد (نمونه ۸).

ضرایب مدل چند جمله‌ای درجه دوم پس از تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار و حذف عبارات‌های غیرمعنی‌دار توسط روش Forward در نرم افزار بدست آمد و نتیجه حاصل معادله  $(Y_1)$  و  $(Y_2)$  می‌باشد.

$$Y_1 = +11.66534 + 0.61928 \times C - 0.45944 \times N - 4.44444E-003 \times C^2 + 1.00000E-002 \times N^2$$

$$Y_2 = -0.49007 + 0.046189 \times C + 0.025902 \times N + 9.51111E-004$$

میزان  $Y_1$  و  $Y_2$  به ترتیب مربوط به درصد روغن در وزن خشک توده زیستی در روغن می‌باشد.  $C$  و  $N$  به ترتیب مربوط به میزان گلوکز و عصاره مخمر بر حسب گرم در لیتر است.

داد که در روغن این گونه میکروبی پالمیتیک، استئاریک، لینولئیک و اولئیک وجود دارد و به عنوان سوخت زیستی می‌توان از آن استفاده کرد. آن‌ها گزارش کردند که اولئیک اسید (۲۸ درصد میزان روغن) به عنوان اسید چرب غالب و لینولئیک اسید به میزان ۳ درصد در این گونه میکروبی می‌باشد [۱۸]. در تحقیقی که توسط Olstorpe و همکاران در سال ۲۰۱۴ [۱۹] انجام شد با بررسی اسیدهای چرب تشکیل دهنده گونه مخمری دریایی اسید چرب  $C_{16}$  و  $C_{18}$  دو اسید چرب غالب و همچنین اسید چرب لینولئیک اسید به میزان ۳٪ در روغن این گونه‌ها گزارش شد. با توجه به گزارشات چنین برداشت می‌شود که این گونه از گونه‌های وسیع مخمرهای مولد روغن محسوب می‌شود.

### ۲-۳- بهینه سازی به روش آماری سطح پاسخ (RSM)

آزمایش‌های بهینه‌سازی، جهت بدست آوردن یک مدل ریاضی برای پیش‌بینی رفتار فرایند می‌باشد. طرح‌های بهینه‌سازی از عوامل کمتری نسبت به طرح‌های معمولی برخوردار هستند ولی این عوامل شدیداً تاثیر گذار می‌باشند [۲۰].

همانطور که از جدول ۴-۲ مشخص است اثرات خطی عصاره مخمر و گلوکز در میزان روغن و توده زیستی اسید در محیط کشت، معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0.05$ ). اثرات متقابل گلوکز-عصاره مخمر برای پاسخ‌های مقدار توده زیستی معنی‌دار و روغن تولیدی معنی‌دار نمی‌باشند ( $P > 0.05$ ). اثر درجه دوم  $Y_1$  و  $Y_2$  معنی‌دار نیست. در مورد

اثر درجه دوم عصاره مخمر بر تولید توده زیستی اسید معنی‌دار نمی‌باشد ( $P > 0.05$ ). ولی اثر درجه دوم عصاره مخمر برای تولید روغن معنی‌دار می‌باشد ( $P < 0.05$ ). معادله‌های ۱ و ۲ مدل رگرسیون را برای روغن و مقدار توده زیستی پس از تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم‌افزار Design expert نشان می‌دهد. مقدار عددی ضریب تعیین ( $R^2$ ) برای دو فرمول توده زیستی ۰٫۹۵ و روغن ۰٫۹۸ درصد نشان‌دهنده میزان

1. Lack of fit

**Table 1** ANOVA parameters for biomass and lipid production optimized by RSM method (A glucose and B yeast extract)

Source	Sum of Squares		df		Mean Square		F Value		p-value Prob > F	
	Lipid	biomass	lipid	biomass	lipid	biomass	lipid	biomass	lipid	biomass
Model	141.76	0.80	5	5	28.35	0.161	60.96	18.869	0.0007	0.0069
A-C	67.94	0.27	1	1	67.94	0.274	146.07	32.019	0.0003	0.0048
B-N	59.94	0.38	1	1	59.94	0.389	128.89	45.443	0.0003	0.0025
AB	1	0.04	1	1	1	0.045	2.15	5.345	0.2164	0.0818
A^2	6.44	0.09	1	1	6.44	0.098	13.86	11.530	0.0204	0.0274
B^2	1.44	0.02	1	1	1.44	0.020	3.10	2.3953	0.1526	0.1966
Residual	1.86	0.034	4	4	0.46	0.008				
Lack of Fit	1.73	0.034	3	3	0.57	0.011	4.62	56.780	0.3263	0.0972
Pure Error	0.12	0.0002	1	1	0.12	0.0002				
Core Total	143.62	0.84	9	9						

**Table 2** The central composite design of the response surface method together with real and predicted data.

Sample	Yeast Extract (g/l)	Glucose (g/l)	Biomass (percentage of media)		Lipid (percentage of biomass)	
			Observed	Predicted	Observed	Predicted
1	12.5	35	0.89	0.88	21	20.75
2	12.5	35	0.87	0.88	20.5	20.75
3	1.893398	35	0.48	0.434	25	25.74
4	23.1066	35	1.1	1.058	18	18.00
5	20	50	1.088	1.18	20	19.44
6	12.5	56.2132	0.96	0.84	22	22.49
7	12.5	13.7868	0.3	0.32	14	14.25
8	20	20	0.6	0.59	15	14.97
9	5	20	0.37	0.36	20	20.75
1	12.5	50	0.89	0.88	21	20.75

### ۳-۳- نتایج میزان روغن

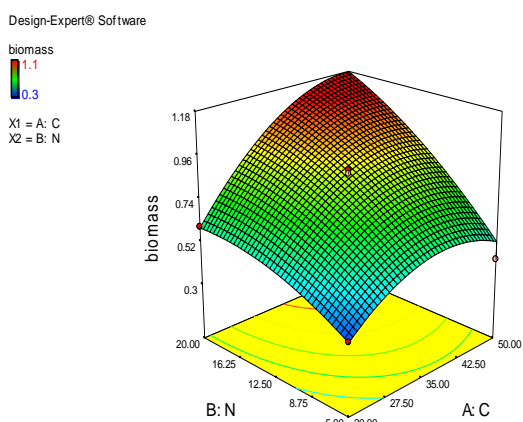
شکل ۳ تاثیر سطوح مختلف گلوکز و عصاره مخمر را بر میزان روغن نشان می‌دهد. سطح پاسخ نشان داد که هر چه میزان کربن افزایش و عصاره مخمر کاهش یابد میزان تولید روغن افزایش می‌یابد. بیشترین مقدار روغن (۲۶,۳) در غلظت گلوکز (۵۰ g/L) و عصاره مخمر (۵ g/L) بدست آمد (شکل ۱۰). در تحقیقی که توسط Jin و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت [۲۱] گزارش شد که با افزایش میزان نیتروژن میزان روغن کاهش می‌یابد. آن‌ها ادعا کردند که افزایش نیتروژن باعث شده است که میزان قابل توجهی از کربن به جای تبدیل به روغن وارد چرخه سیتریک اسید و تولید انرژی شود. تولید روغن و اسیدهای چرب غیر اشباع از گونه های

میزان وزن خشک توده زیستی نشان می‌دهد که در این گونه میکروبی همانند سایر گونه های روغنی افزایش میزان نیتروژن تاثیر قابل توجه ای در میزان وزن خشک توده زیستی داشته است به طوریکه حداکثر میزان وزن خشک در نمونه که بیشترین میزان نیتروژن در محیط کشت آن بوده بدست آمده است. در سطوح پایین منبع کربنی افزایش منبع کربنی تاثیر قابل توجه ای در افزایش وزن خشک توده زیستی داشته است در حالیکه در سطوح بالاتر چندان افزایش منبع کربنی تاثیر قابل توجه ای در افزایش توده زیستی نداشته است. افزایش منبع نیتروژنی از سطح حدود ۲ گرم در لیتر به ۲۳ گرم در لیتر باعث افزایش حدوداً ۳ برابری میزان وزن خشک توده زیستی شده است.

که نشان دهنده برازش خوب داده ها و میزان انطباق داده ها در مدل رگرسیون می باشد.

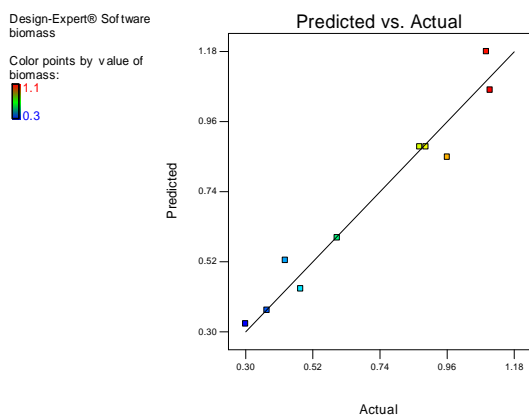
### ۳-۴ - نتایج میزان توده زیستی

شکل ۵ تاثیر سطوح مختلف گلوکز و عصاره مخمر را روی درصد توده زیستی نشان می دهد. همانطور که در کنتور مشاهده می شود افزایش میزان نیتروژن تاثیر قابل توجهی در تولید توده زیستی دارد. به طوری که افزایش میزان عصاره مخمر و افزایش غلظت گلوکز موجب افزایش درصد توده زیستی در محیط کشت می شود.



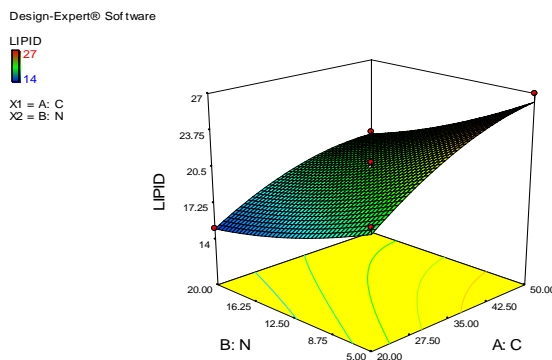
**Fig 5** Three-dimensional response surface plots for biomass and showing the interactions effects of (A) glucose content g/l and (B) protein content g/l

تغییرات ترکیبات محیط کشت در تولید این توده زیستی به روش سطح پاسخ بررسی شد که نتایج نشان داد با افزایش میزان گلوکز میزان این توده زیستی افزایش می یابد.



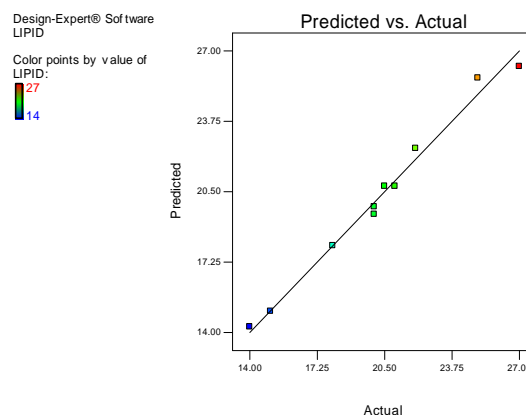
**Fig 6** ratio of real and predict value of biomass formula obtaining from RSM

روغنی توجه زیادی را در سالهای اخیر به خود معطوف کرده است.



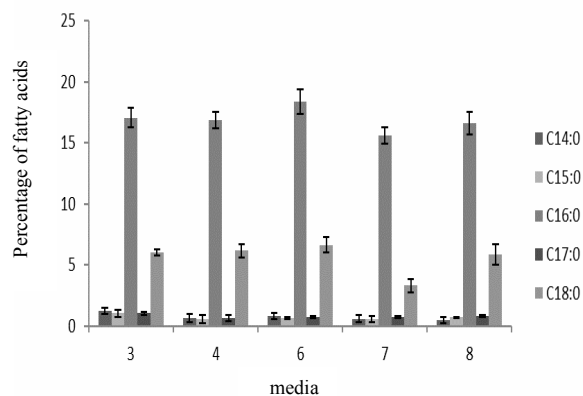
**Fig 3** Three-dimensional response surface plots for lipid production showing the interactions effects of (A) glucose content g/l and (B) protein content g/l

نتایج تحقیق بر روی این گونه میکروبی نشان داد که همانند سایر گونه های میکروبی روغنی، میزان روغن تولیدی آن تحت تاثیر شرایط محیطی کشت قرار می گیرد. میزان تولید روغن در این گونه مخمري در سطوح حد واسط گلوکز بیشترین میزان بدست آمد که همانند سایر گونه های میکروبی روغنی [۲۲] می توان این مشاهده را به تاثیر فشار اسمزی و اثر بازدارندگی سطوح بالای گلوکز در تولید روغن نسبت داد. عصاره مخمر به عنوان منبع پروتئینی تاثیر قابل توجهی در تولید روغن داشت به طوری اکثر تحقیقاتی این منبع را به عنوان منبع پروتئینی تولید روغن در گونه میکروبی روغن گزارش کرده اند (۲۳).

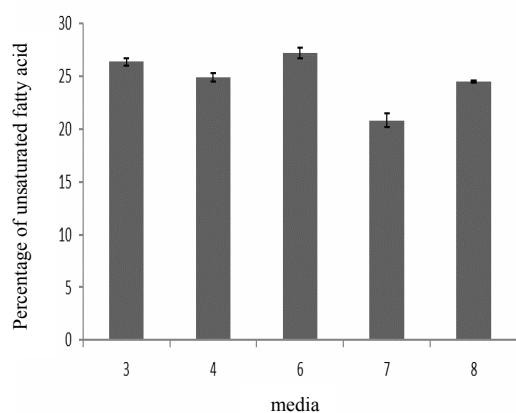


**Fig 4** ratio of real and predict value of lipid formula obtaining from RSM

همانطور که در شکل ۴ مشخص است میزان انطباق داده های مشاهده شده و پیش بینی شده مربوط به تولید روغن، بالا بوده



**Fig 7** effect of different media on saturated fatty acid of yeast lipid (numbers of media were based table 4-3)



**Fig 8** effect of different media on unsaturated fatty acid of yeast lipid (numbers of media were based on table 4-3)

همانطور که در شکل ۸ دیده می شود بیشترین میزان اشباعیت در نمونه ۶ و کمترین میزان اشباعیت در نمونه ۷ مشاهده شد.

### ۷-۳- بررسی پروفایل اسید چرب غیر اشباع در

#### گونه مخمری *Candida orthopsilosi*

##### SAGSG

در این مرحله چند نمونه از محیط های کشت که در بهینه سازی به روش RSM استفاده شد برای بررسی اسیدهای چرب غیر اشباع تشکیل دهنده روغن بررسی شد نتایج نشان داد که اسید چرب غالب غیر اشباع در این روغن اولئیک اسید و اسید چرب بعدی آن لینولئیک است (شکل ۴-۹).

همانطور که در شکل ۶ مشخص است میزان انطباق داده های مشاهده شده و پیش بینی شده مربوط به تولید توده زیستی، بالا بوده که نشان دهنده برازش خوب داده ها و میزان انطباق داده ها در مدل رگرسیون می باشد.

### ۵-۳- مقادیر بهینه پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم برای متغیرها

**Design** مقادیر بهینه پیش بینی شده با استفاده از نرم افزار Expert برای متغیرهای گلوکز (A) و عصاره مخمر (B) به منظور تولید حداکثری روغن به ترتیب ۵۰ و ۵ گرم در لیتر می باشد. میزان محصول ۲۷/۱۲ درصد پیش بینی شد. در حالیکه مقادیر بهینه پیش بینی شده برای متغیرهای گلوکز و عصاره مخمر به منظور تولید حداکثری توده زیستی (۱,۱۶٪) به ترتیب ۴۶,۱۶ گرم در لیتر و ۱۹,۶۷ گرم در لیتر بدست آمد.

### ۵-۳- ارزیابی مدل رگرسیون تولید روغن و

#### توده زیستی

به منظور ارزیابی مدل شرایط پیش بینی شده مدل تولید روغن و توده زیستی اعمال گردید. محیط کشت مناسب تولید توده زیستی حاوی ۴۶,۱۶ گرم در لیتر گلوکز و ۱۹,۶۷ گرم در لیتر عصاره مخمر بود و PH اولیه ۶ تنظیم شد. محیط کشت مناسب تولید روغن به ترتیب حاوی ۵۰ و ۵ گرم در لیتر گلوکز و عصاره مخمر بود. پس از ۵ روز تخمیر میزان توده زیستی ۱,۲٪ و میزان روغن ۲۸٪ بدست آمد که با نتیجه پیش بینی شده از فرمول که توده زیستی ۱,۲٪ و روغن ۲۷٪ می باشد نزدیکی قابل توجهی دارد.

### ۶-۳- بررسی پروفایل اسید چرب اشباع در

#### گونه مخمری *Candida orthopsilosi*

##### SAGSG

در این مرحله چند نمونه از محیط های کشت که در بهینه سازی اعمال شده بود برای بررسی اسیدهای چرب تشکیل دهنده روغن بررسی شد نتایج نشان داد که اسید چرب غالب اشباع در این روغن C16:0 می باشد و اسید چرب بعدی آن C18:0 است (شکل ۷).



## ۳-۸- بررسی تاثیر کاهش دما در پروفایل اسید

## چرب مخمر جدا شده از ماهی کپور

در این مرحله محیط کشتی که بالاترین درصد اسید لینولنیک را داشت مورد بررسی قرار گرفت. از دور همزن ۱۷۰ دور در دقیقه با دمای ۲۶ درجه سانتی گراد به مدت زمان تخمیر ۶ روز استفاده شد و از روز ۶ تا به روز ۸ دما به ۱۶ درجه سانتی گراد کاهش و دور همزن به ۱۸۰ دور در دقیقه افزایش یافت.

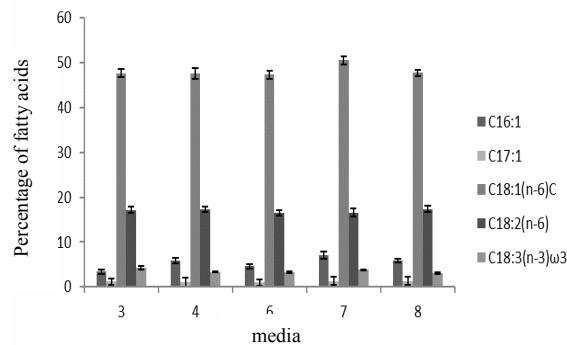


Fig 9 effect of media composition on saturated fatty acid production

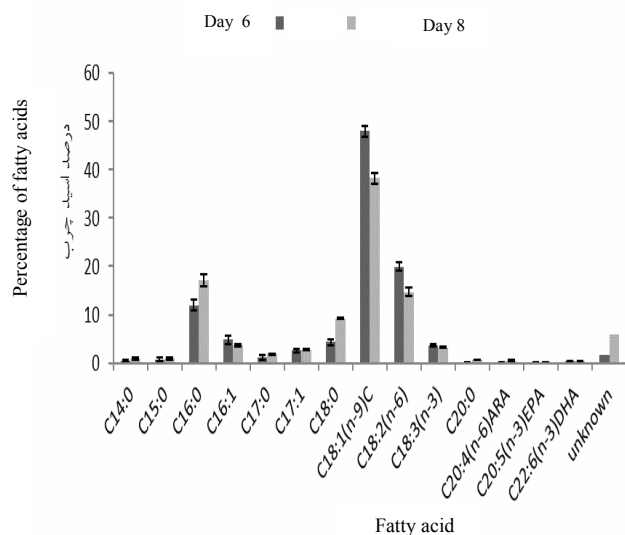


Fig 11 effect of fermentation time on profile of fatty acid profile

همانطور که در شکل ۱۱ مشاهده می‌شود اسید چرب های پروفایل روغن تحت تاثیر کاهش دما در انتهای فرایند تخمیر تغییرات قابل توجهی داشته به طوری که مقادیر اندکی اسیدهای چرب بلند زنجیره ۲۰ و ۲۲ کربنه افزایش داشته و تغییر عمده ای در کاهش سه اسید چرب اولئیک، لینولنیک و لینولنیک مشاهده شد. میزان توده زیستی در روز ششم ۱,۱ درصد و در روز ۸ به ۰,۹ درصد کاهش یافت.

نتایج تحقیقات Kanti و Sudiana در سال ۲۰۱۳ [۱۷] نشان داد که میزان چند غیراشباعیت های PUFA در روغن *Candida orthopsilosis* ۱۲,۵٪ می باشد که در بین گونه های روغنی که میزان PUFA بین ۱۴ تا ۵۲ درصد می باشد [۱۸] کم است. در تحقیق Kanti و Sudiana [۱۷] از دمای ۳۰ درجه سانتی گراد استفاده شده در حالیکه در تحقیق حاضر از متغیر دما به عنوان عامل موثر افزایش میزان غیراشباعیت

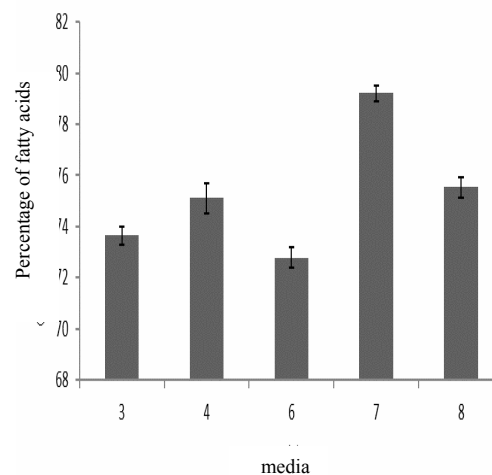


Fig 10 effect of different media on unsaturated fatty acid of yeast lipid (numbers of media were based on table 4-3)

همانطور که در شکل ۱۰ دیده می شود بیشترین میزان غیراشباعیت مربوط به نمونه ۷ با کمترین سطح روغن می باشد. با بررسی نمونه ها چنین برداشت شد که بالاترین سطح غیراشباعیت در کمترین سطح روغن بدست آمد و هر چه سطح روغن افزایش می یابد میزان غیراشباعیت کاهش می یابد. تحقیقات Samadlouie و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۲۳) چنین می باشد که با افزایش میزان فعالیت بیان ژن مالیک آنزیم که ژن اصلی تولید روغن می باشد و میزان تولید NADPH افزایش یافته که در نهایت باعث کاهش سطح اکسیژن در سلول شده و از آنجائیکه آنزیم های موثر در فرایند غیراشباع سازی شدیداً تحت تاثیر سطح اکسیژن می باشند فعالیتشان کاهش می یابد [۲۲]. از این رو در این تحقیق برای افزایش غیراشباعیت شرایطی باید فراهم شود که میزان روغن کاهش یابد.

افزایش فعالیت آنزیم غیراشباع ساز در روغن این گونه میکروبی می شود دانست که این تاثیر در شرایطی که دما در انتهای فرایند کاهش یافت با افزایش اندکی در میزان غیراشباعیت روغن در اسیدهای چرب بلند زنجیره بالای ۲۰ کربن مشاهده گردید در حالیکه در شرایط کاهش دما از ابتدای فرایند افزایش غیراشباعیت در اسیدهای چرب ساختاری مانند لینولنیک و لینولنیک مشاهده گردید. چنین برداشت می شود که افزایش دو اسید چرب ساختاری لینولنیک و لینولنیک در حفظ سیالیت غشاء در دمای پایین نقش داشته باشد. کاهش دما در نهایت باعث افزایش غیراشباعیت در روغن این گونه مخمری می شود نکته قابل تامل زمان این کاهش می باشد که می تواند در نوع غیراشباعیت موثر دانست. نکته مهم دیگر در مورد در این گونه مخمری وجود تنوع بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیره است که می تواند به عنوان منبع مناسبی از ژن های بلند زنجیره و غیراشباع کننده محسوب شود که در فرایند مهندسی ژنتیکی و انتقال ژن کاربرد های قابل توجه ای می تواند داشته باشد.

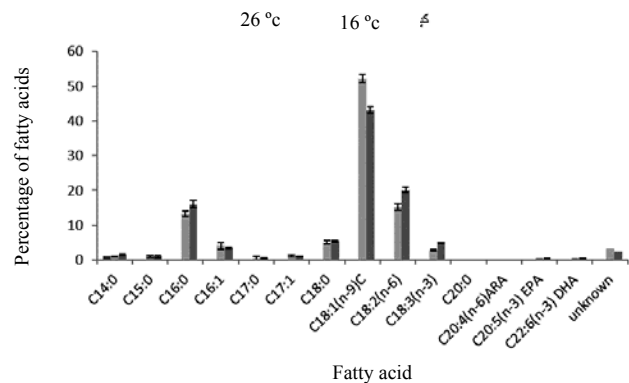
#### ۴- منابع

- [1] Sijtsma, L. and De Swaaf, M. E. 2004. Biotechnological production and applications of the  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Microbiology and Biotechnol.* 64(2), 146–153.
- [2] Ward, O. P. and Singh, A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.* 40, 3627–3652.
- [3] Yokoyama, M., Origasa, H. and Matsuzaki, M. 2007. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS), a randomised openlabel, blinded endpoint analysis. *Lancet.* 369,1090–1098.
- [4] Plourde, M. and Cunnane, S. C. 2007. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Physiology and Nutritional Metabolism.* 32, 619–634.
- [5] Ratledge, C. and Wynn, J. P. 2001. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Microbiology.* 51, 1–51.

روغن استفاده شد که نتایج نشان داد با کاهش دما از ۲۸ درجه سانتی گراد به ۱۶ درجه سانتی گراد در انتهای فرایند تخمیر میزان PUFA از ۲۰ درصد به ۲۴ درصد افزایش یافته است. در این تحقیق نشان داده شده است که شرایط محیط کشت تاثیر قابل توجه ای در میزان PUFA روغن در این گونه میکروبی دارد

#### ۳-۹- کاهش دما و بررسی پروفایل اسید چرب

در این مرحله محیط کشتی که بالاترین درصد اسید لینولنیک را داشت مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی دقیقتر تاثیر دما نمونه مخمری کپور از ابتدای فرایند تا انتهای فرایند در دو دمای ۲۶ و ۱۶ درجه سانتی گراد قرار گرفت



**Fig 12** effect of fermentation temperature on isolated yeast of perch fish

همانطوری که در شکل ۱۲ مشاهده می شود با کاهش دما هیچ افزایشی در میزان اسیدهای چرب بلند زنجیره بالای ۲۰ کربن مشاهده نشد. میزان اسیدهای چرب اولئیک اسید با کاهش دما کاهش و در حالیکه اسیدهای چرب لینولنیک و لینولنیک اسید در اثر کاهش دما افزایش قابل توجه ای یافت. با بررسی میزان توده زیستی مشاهده شد که میزان توده زیستی در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد ۱ درصد و در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد ۰٫۸ درصد کاهش یافته است.

نکته بسیار مهم با توجه به نتایج تحقیقات دانشمندان نشان می دهد که اسیدهای چرب بلند زنجیره غیراشباع در ریزسازوها در دو مرحله تولید می شود. مرحله اول تبدیل استات به اولئیک اسید می باشد و در مرحله بعد اولئیک اسید بوسیله آنزیم های طولی ساز و غیراشباع ساز به اسید چرب بلند زنجیره غیراشباع تبدیل می شوند [۱۳]. با در نظر گرفتن تحقیقات انجام شده و نتایج بدست آمده از این تحقیق می توان اثر کاهش دما را از طریق افزایش حلالیت اکسیژن را باعث

- [16] Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A. and Pelka, J. R. 1996. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*. 38(3), 514–15. [17]. Kanti, A., Sukara, E., Latifah, K. and Sukarno, N. 2013. Indonesian oleaginous yeasts isolated from piper betle and *Piper nigrum*. *Mycosphere*. 4 (3), 363 – 454.
- [18] Kanti, A. and Sudiana, I. M. (2015). Carboxymethyl cellulose as a C-source for lipid accumulation by the oleaginous yeast *Candida orthopsilosis*. *Current Research in Environmental and Applied Mycology*. 5 (4), 349–356.
- [19] Olstorpe, M., Pickova, J., Kiessling, A. and Passoth, V. 2014. Strain and temperature dependent changes of fatty acid composition in *Wickerhamomyces anomalus* and *Blastobotrys adenivorans*. *Biotechnology Biochemistry*, 61(1), 45–50.
- [20] Strobel, R. J. and Sullivan, G. R. 1999. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2nd ed, ASM press, Washington DC. 80–93.
- [21] Jin, M. J., Huang, H., Xiao, A. H., Gao, Z., Liu, X. and Peng, C. 2009. Enhancing arachidonic acid production by *Mortierella alpina* ME-1 using improved mycelium aging technology. *Bioprocess Biosystem Engineering*. 32(1), 117-122.
- [22] Gema, H., Kavadia, A., Dimou, D., Tsagou, V., Komaitis, M. and Aggelis, G. 2002. Production of  $\gamma$ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. *Microbiol Biotechnol*. 58, 303–307.
- [23] Samadlouie, H., Hamidi-Esfahani, Z., Alavi, S. M. and Varastegani, B. 2014. Expression analysis for genes involved in arachidonic acid biosynthesis in *Mortierella alpina* CBS 754.68. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(2), 439–445.
- [24] Jin, M. J., Huang, H., Xiao, A. H., Zhang, K., Liu, X., Li, S. and Peng, C. 2008. A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Biotechnology Letters*. 30(6), 1087-1091.
- [6] Koike, Y., Cai, H.J., Higashiyama, K., Fujikawa, S. and Park, E.Y. 2001. Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelia morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91(4), 382–389.
- [7] Zhu, H., Utilization of Rice Bran by *Pythium Irregulare* for Lipid Production, Master's thesis, Louisiana State University, Baton Rouge, 2002..
- [8] Dyal, S. and Narine, S. S. 2005. Implications of the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Research International*. 38, 445–467.
- [9] Wynn, J.P., Hamid, A. A., Li, Y. and Ratledge, C. 2001. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology*. 147(10), 2857–64.
- [10] Rocky-Salimi, K., Hamidi-Esfahani, Z. and Abbasi, S. 2011. Statistical optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* CBS 754.68 in submerged fermentation. *Iranian Journal of Biotechnology*. 9, 87–93.
- [12] Li, M., Liu, G.L., Chi, Z. and Chi, Z. M. 2010. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorulamucilaginosa* TJY15a. *Biomass and Bioenergy*. 34(1), 101–107.
- [13] Jang, H. D., Lin Y. Y. and Yang, S. S. 2005. Effect of culture medium and condition on polyunsaturated fatty acid production by *Mortierella alpina*. *Bioresource Technology*, 96(15), 1633–1644.
- [14] Maoura, N., Mbaiguinam, N., Nguyen, H. V., Gaillardin, C. and Pourquie, J. 2005. Identification and typing of the yeast strains isolated from bilibili, a traditional sorghum beer of Chad. *African Journal of Biotechnology*. 4(7), 646–656.
- [15] Folch, J., Lees, M. and Stanley G. H. S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226(1), 497–509.

## Isolation and identification of *Candida Orthopsilosi* SAGSGC as oleaginous yeast in perch fish by using ribosomal gene and optimization of oil and biomass production

Samadlouie, H. R. <sup>1\*</sup>, Ghasemi, L. <sup>2</sup>, Jalali, H. <sup>3</sup>, Gharanjik, Sh. <sup>4</sup>

1. Assistant professor of food science and technology, faculty of agriculture engineering, university of shahrood technology, Shahrood, Iran
  2. Food science and technology, damghan branch, Islamic Azad University, damghan, Iran
  3. Assistant professor of food science and technology, damghan branch, Islamic Azad University, damghan, Iran
  4. Assistant Professor in the Biotechnology Research Group, university of shahrood technology, Shahrood, Iran
- (Received: 2016/03/12 Accepted: 2016/06/12)

With respect to the human need for functional food and the importance of long-chain polyunsaturated fatty acids as a functional food, identifying the rich resources of fatty acids greatly attract of interest of scientists. Based on this studies, it is found that microorganisms especially yeast species are rich resources of unsaturated fatty acids. In the present study, yeast samples of perch fish, which has the ability of oil production, were isolated and then their ribosomal DNA were used to identify the yeast species. According to the phylogenetic tree, it was known that the yeast species isolated from the gills of perch fish was *Candida Orthopsilosi* SAKSG. The response surface method showed that the highest oil content (26.3) was achieved in media that had 50 g/L glucose and 5 g/L yeast extract. Moreover, maximum amount of biomass (1.16%) was obtained in medium with 46.16 g/L f glucose and 19.67 g/L yeast extract. It is notable that reduction in temperature treatment was led to improve unsaturated oil increment in this microbial lipid up to 24 percentages. reduction of temperature at the end of the fermentation time coincide with rising in unsaturated fatty acids with long fatty acid more than 20 carbon, while when temperature was increased from the beginning of the process, structural unsaturated fatty acids such as linoleic and linolenic acid were increased.

**Key words:** Yeast, Single cell oil, Poly unsaturated fatty acid isolation, Optimization and response surface method

---

\*Corresponding Author E-Mail Address: [hsamadlouie@yahoo.com](mailto:hsamadlouie@yahoo.com)