

بررسی تولید روغن تک یاخته در مراحل مختلف رشد *Rhodotoru- la Mvsylvzhynvza* سویه UIMC35 توسط فلوسایتومتری

حسین قنواتی^{۱*}، ایرج نحوی^۲

تاریخ دریافت ۹۲/۱۱/۲۴

تاریخ تصویب ۹۳/۳/۵

چکیده

در تحقیق حاضر مخمر بومی مولد چربی به نام *Rhodotoru- la mucilaginosa* سویه UIMC35 جهت تولید روغن تک یاخته جداسازی و شناسایی گردید. تکنیک فلوسایتومتری جهت بررسی میزان شدت فلورسنت سلولی (در کانال FL₂)، اندازه سلولی (با پارامتر FSC) و تراکم درون سلولی (با پارامتر SSC) به کار گرفته شد. رابطه بین شدت فلورسنت و محتوای لیپیدی، جهت محاسبه سریع و آسان میزان محتوای لیپیدی ارائه گردید. تغییرات فاکتورهای مختلف همچون میزان تولید لیپید و توده زیستی زیست توده، محتوای لیپیدی، کارایی تولید لیپید و توده زیستی، میزان قند، میزان ازت، نسبت کربن به ازت و pH در مراحل مختلف رشد مخمر در کشت بسته مورد بررسی قرار

۱ * استادیار، بخش میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان (نویسنده مسئول ghanavatih@hotmail.com)

۲ استاد، بخش میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

گرفت. بیشترین میزان تولید لیپید، محتوای لیپیدی و کارایی تولید لیپید به ترتیب ۶/۵۷ گرم در لیتر، ۶۷/۰۴ درصد و ۲۱/۱۳ درصد بدست آمد. کاهش نسبت C/N در مراحل انتهایی کشت از عوامل تاثیر گذار در کاهش میزان تولید لیپید به شمار می رود.

واژه های کلیدی: روترولا موسیلوژینوزا، روغن تک یاخته، شدت فلورسنت، فلوسایتومری، محتوای لیپیدی

مقدمه

و نیز آسان بودن تولید صنعتی آن مورد توجه قرار گرفته است Lopes da silva et al. (2011).

از میان میکروارگانیسم ها، مخمرها به دلیل وجود مزایایی از جمله سرعت رشد و محتوای لیپیدی بالا، کاندیدای مناسبی جهت تولید صنعتی بیودیزل است. He et al. (2010). به میکروارگانیسم هایی که قدرت تجمع لیپید را بیش از ۲۰ درصد وزن خشک سلولی خود داشته باشند، مولد چربی اطلاق می گردد (Li et al. (2007). تعدادی از گونه های مخمیری مولد چربی که تا کنون شناسایی شده اند شامل: *Cryptococcus albidus*، *Lipomyces lipofera*، *Rhodospiridium toruloides*، *Rhodotorula glutinis*، *Yarrowia lipo-* و *Trichosporon pullulan lytica* می باشند (Li et al. (2008). شناسایی سویه های میکروبی با قابلیت تولید روغن تک یاخته بالا، می تواند به توجیه پذیر شدن بیشتر تولید این محصول کمک کند

بیودیزل یکی از سوخت های زیستی است که به دلیل تجدید پذیری، تجزیه پذیری و آلاینده کمی کمتر محیط زیست در سالهای اخیر مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. منابعی که هم اکنون جهت تولید بیودیزل استفاده می شوند شامل دانه های گیاهان روغنی، چربی های حیوانی و پسماند روغن های خوراکی است که جوابگوی نیاز جوامع بشری نمی باشند (Andrade et al. (2012). هزینه تولید بیودیزل، که بیشتر آن مربوط به مواد خام اولیه می باشد، یکی از چالش های است که تولید این محصول را محدود کرده است. یافتن راه حلی به منظور کاهش قیمت این محصول توسط محققین بسیاری در حال بررسی است (Dai et al. (2007).

روغن های میکروبی قابلیت تبدیل شدن به بیودیزل را دارند و به دلیل وجود مزایایی همچون چرخه زمانی کوتاه تولید و عدم تاثیر پذیری از فصول و شرایط آب و هوایی

(Lopes da silva et al. 2012).

به کار گیری روش هایی که بتوان به صورت سریع و آسان شرایط تولید و رشد میکروارگانیسم ها را در محیط های کشت بررسی کند، جهت کنترل تولید محصولات بیوتکنولوژیک ضروری است. یکی از این روش ها فلوسایتومتری می باشد که قابلیت گزارش اطلاعات در مورد خصوصیات فلورسانتی، اندازه و تراکم سلولی را دارد (Lopes da silva et al. 2012). تا گذشته ای نزدیک کنترل فرایند تولید سوخت های زیستی با روش های سنتی همچون اندازه گیری وزن خشک سلولی و روش استخراج با حلال انجام می گرفته است که استفاده از این روشها پرهزینه بوده و نیاز به مقدار زیادی زیست توده سلولی می باشد (Lopes da silva et al. 2012). همچنین روشهای سنتی اطلاعاتی را در مورد خصوصیات فیزیولوژیک سلول ها را ارائه نمی دهد (Dai et al. 2007). به کارگیری روش فلوسایتومتری و نیز رنگ فلورسنت نایل رد جهت رنگ آمیزی چربی درون سلول ها به منظور اندازه گیری محتوای سلولی، که با دقت بسیار بالا قابل اندازه گیری است، کنترل فرایند تولید را بسیار آسان خواهد کرد (Lopes da silva et al. 2011).

در این پژوهش مخمر بومی مولد چربی *Rhodotrula muciloginosa* سویه UIMC35، به منظور تولید مقادیر بالایی از

روغن تک یاخته، جداسازی و شناسایی شد. این تحقیق اولین گزارشی است که تولید لیپید توسط این گونه مخمری را معرفی می کند. محتوای لیپیدی، اندازه و تراکم سلول های مخمر در مراحل مختلف رشد توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه و تبدیل معادلات روشهای سنتی و روش فلوسایتومتری به منظور دستیابی سریع به نتایج مورد نیاز در کنترل فرایند تولید ارائه گردید. به دلیل اینکه روش های سنتی بسیار وقت گیر و نیاز به زمان زیاد برای دستیابی به اطلاعات صحیح صحت انجام فرایند دارند، از روش فلوسایتومتری جهت بررسی سریع شرایط تخمیر استفاده شد.

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی سویه مخمری

جداسازی سویه مخمر ردوترولا موسیلاژینوزا از خاک های اطراف شهر اصفهان و بر اساس روش ارائه شده توسط Pan et al., (2009) شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی بر اساس روش ارائه شده توسط Kurtzman and Fell (2000) انجام پذیرفت. توالی ژنی 18S rRNA جهت شناسایی مولکولی استفاده گردید (White et al. 1990). استخراج DNA جهت انجام عملیات PCR، با تکنیک تخریب با دانه های شیشه ای انجام شد (Yamada

و دور ۱۸۰ rpm در مدت زمان ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سوسپانسیونی معادل ۵ درصد محیط تولید، از محیط پیش تولید در شرایط آسپتیک سانتریفیوژ شد و پلت میکروبی بدست آمده به محیط کشت "تولید" که حاوی (g/L): گلوکز، (40) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2)، KH_2PO_4 (4)، K_2HPO_4 (5/0) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1) و عصاره مخمر (۰/۵) در pH ۵/۵ بود و در دمای 110°C به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شده بود، تلقیح گردید و در دمای 28°C و دور ۱۸۰ rpm در مدت زمان ۴ روز گرمخانه گذاری شد. برای تمامی مراحل قید شده از نمونه شاهد بدون تلقیح میکروارگانیسم در کنار نمونه ها استفاده شد. در محیط کشت تولید نسبت به محیط کشت پیش تولید، مقادیر کربن و ازت به ترتیب افزایش و کاهش یافته است و این امر به دلیل ایجاد شرایط C/N بالاتر در محیط کشت تولید می باشد چون در این شرایط است که ذخیره ترکیبات لیپید درون سلولی اتفاق می افتد (Zhao et al. 2008).

آماده سازی سلول ها و بررسی با دستگاه فلوسایتومتری

برای رنگ آمیزی سلول ها با نایل رد مقدار ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی در rpm ۵۰۰۰ و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و دو بار با ۱ میلی لیتر محلول بافر فسفات نمکی شستشو داده شد و مجدداً یک میلی لیتر از این

(et al. 2002). پرایمرهای عمومی ITS1 (5'TC-CGTAGGTGAACCTGCGG3') و ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') جهت تکثیر ناحیه rDNA استفاده شدند. از دستگاه توالی یاب اتوماتیک و به شکل قرائت توالی از دو جهت (دو بار خوانش) به منظور تعیین توالی محصول PCR استفاده شد. جهت شناسایی سویه مورد بررسی، همولوژی توالی بدست آمده با توالی های موجود در سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> و با انجام عملیات BLAST مورد بررسی قرار گرفت.

شرایط کشت

جهت بررسی تولید روغن تک یاخته توسط سویه مخمری از یک فرایند ۳ مرحله ای استفاده گردید که شامل مراحل "فعال سازی اولیه"، "پیش تولید" و "تولید" بود. در مرحله فعال سازی سویه مخمری در محیط Yeast Peptone Dextrose (YPD) آگار در پتری دیش کشت داده و به مدت زمان ۴۸ ساعت در دمای 28°C قرار گرفت. بعد از این مرحله یک لوپ از مخمر خالص فعال شده به محیط "پیش تولید" تلقیح گردید. این محیط شامل (g/L): گلوکز (۲۰)، $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3)، KH_2PO_4 (1)، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (۰/۵)، عصاره مخمر (۱) و پپتون (۱) در pH ۵/۵ بود. نمونه ها در دمای 110°C در ۱۰ دقیقه اتوکلاو شده و در دمای 28°C

گیری فلورسنت خودبخودی سلولها (autofluorescent) مورد استفاده قرار گرفت. اندازه سلولها با پارامتری به نام FSC (Forward Scatter light) و تراکم درون سلولی با پارامتر SSC (Side Scatter light) اندازه گیری می شود. قرائت این دو پارامتر بدون نیاز به رنگ فلورسنت توسط دستگاه فلوسایتومتری انجام می گیرد. برای نمایش نتایج از دو نوع گراف به نام های Histogram و Density plot استفاده شد. تعداد سلول آنالیز شده در هر بار قرائت با دستگاه بیش از ده هزار سلول بود. تمامی نتایج ارائه شده در بخش فلوسایتومتری این مقاله سه بار تکرار شده اند. تمامی منحنی های ارائه شده در قسمت نتایج یکی از سه تکرار مستقل می باشد. نرم افزار Flow Max 2.4e جهت ارائه نتایج با دستگاه فلوسایتومتری مورد استفاده قرار گرفت.

روش های اندازه گیری

استخراج روغن با استفاده از روش بالای و دایر اصلاح شده انجام پذیرفت (Pan et al. 2009). در این روش ۵۰ میلی لیتر از "محیط کشت تولید" در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و دو بار با محلول بافر فسفات نمکی (PBS) شستشو داده شد. به توده میکروبی بدست آمده مقدار ۱۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۴ مولار اضافه شد و برای مدت زمان یک ساعت در حمام آب دمای ۶۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس

بافر به آن اضافه شد و بعد از همگن سازی، رقیق سازی با بافر برای بدست آوردن ۱۰۶ سلول در میلی لیتر انجام گرفت. برای بدست آوردن بیشترین شدت فلورسنت، مقدار اضافه شده از محلول نایل رد جهت رنگ آمیزی و زمان انکوباسیون بعد از رنگ آمیزی بهینه شد. بر اساس نتایج حاصل از بهینه سازی شدت فلورسنت، مقدار بهینه از محلول نایل رد که باید به سوسپانسیون رقیق شده اضافه گردد ۲۰ μ l (محلول ۰/۰۳۳ گرم در میلی لیتر در حلال استون) بود. همچنین بهینه مدت زمان انکوباسیون ۴ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در تاریکی بدست آمد. سپس سوسپانسیون به دستگاه فلوسایتومتری تزریق گردید. روش فلوسایتومتری جهت بررسی ذرات لیپید درون سلولی، تراکم ترکیبات درون سلولی و اندازه سلولی مورد استفاده قرار گرفت (Lopes da silva et al. (2011); Lopes da silva et al. (2010); Raschke & Knorr. (2009). بررسی شدت فلورسنت نسبی ایجاد شده در اثر رنگ آمیزی سلول ها با رنگ نایل رد با دستگاه فلوسایتومتری PAS/Dako (Partec, Denmark) flow cytometer مجهز به لیزر آرگون با طول موج ۴۸۸ نانومتر انجام گرفت. نایل رد در اثر برانگیختگی با این طول موج رنگ زرد طلایی در حضور چربی های خنثی از خود نشان می دهد که توسط کانال FL2 دستگاه اندازه گیری می شود. سلولهای رنگ نشده جهت اندازه

مقدار ۲۰ میلی لیتر محلول متائل:کلر فرم به نسبت (V:V) ۲:۱ به آن افزوده شد و برای ۲ تا ۳ ساعت در شیکر رفت و برگشتی (۲۵۰ rpm) قرار گرفت. سپس با استفاده از سانتریفیوژ (۵۰۰۰ rpm) جداسازی لایه ها تسهیل گردید و به کمک پیپت پاستور لایه زیرین جداسازی شد. لایه زیرین جداسازی شده جهت تبخیر زودتر حلال، در اتاقک خلاء قرار داده شد و روغن تولید شده بعد از تبخیر کامل حلال وزن گردید.

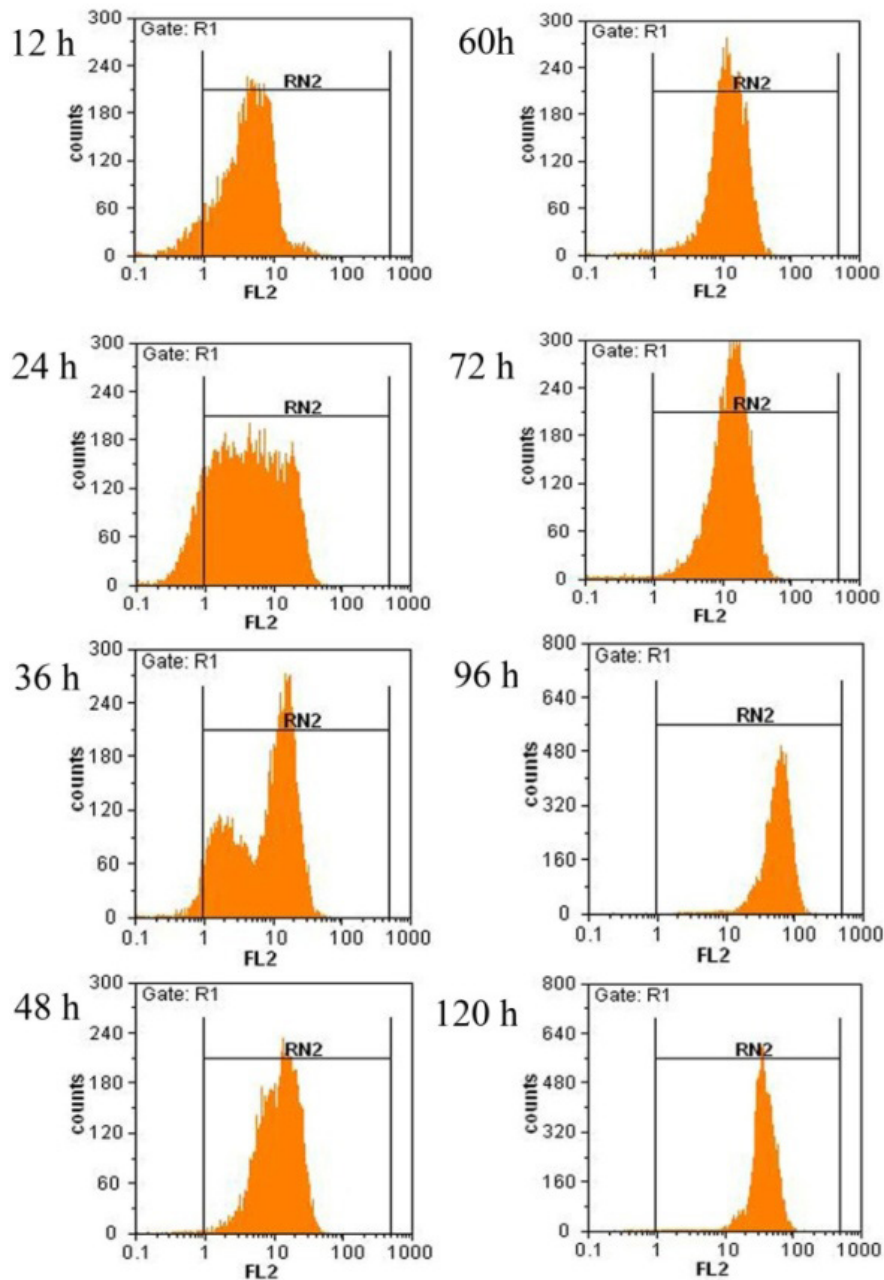
اندازه گیری قند از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) و با استفاده از روش ارائه شده توسط (Miller et al. (1959 استفاده گردید. میزان نیتروژن باقی مانده در محیط کشت با استفاده از روش کجلدال انجام گرفت (Clesceri et al. (1999).

نتایج و بحث

بررسی شدت فلورسنت نسبی سلولی در مراحل رشد با دستگاه فلوسایتومتری شدت فلورسنت نسبی سلول ها در کانال FL2 که در اثر اتصال رنگ فلورسنت نایل رد به چربی های خنثی درون سلولی ایجاد شده است، در طی مراحل رشد در زمان های ۲۴، ۱۲، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت توسط دستگاه فلوسایتومتری اندازه گیری شد. گراف های هیستوگرام مربوطه در شکل ۱ نشان داده شده است. محدوده مشخص شده توسط واحد RN2 (بین ۱ تا ۱۰۰۰ در محور X) محدوده با شدت فلورسنت در اثر اتصال رنگ نایل رد به چربی خنثی درون سلولی است. محدوده بین ۰/۱ تا ۱ در محور X مربوط به اتوفلورسنت سلول ها پیش از

برای بدست آوردن میزان زیست توده خشک سلولی مقدار ۵ میلی لیتر از محیطی که مخمر در آن رشد یافته بود، در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و با PBS شستشو داده شد، سپس توده میکربی در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد تا زمان ثابت شدن وزن قرار داده شد و زیست توده خشک شده با ترازوی دقیق وزن گردید. Pan et al. (2009). میزان دانسیته نوری سلول ها با دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج 600 nm انجام گرفت (Li et al. (2007).

رنگ آمیزی با محلول متیلن بلو به منظور افتراق سلولهای مرده از زنده مورد استفاده قرار گرفت. ماده متیلن بلو با غلظت



شکل ۱: هیستوگرام های مربوط به شدت فلورسنت در نقاط زمانی مختلف (۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت) مربوط به سلول های مخمری *R. muciliginosa* سویه UIMC^{۳۵}. شدت فلورسنت در کانال FL_p دستگاه فلوسایتومتر اندازه گیری شده است. محور عمودی مربوط به تعداد سلولهای قرائت شده و محور افقی مربوط به شدت فلورسنت FL_p می باشد. گراف ها به صورت نیمه لگاریتمی رسم شده اند.

رنگ آمیزی با نایل رد است که قبل از تزریق نمونه رنگ شده، با سلول های رنگ نشده مربوط به همان نمونه تنظیم شده است تا همانطور که در شکل یک مشخص می باشد. شدت فلورسنت اندازه گیری شده در نمونه مربوط به تجمع چربی درون سلولی باشد.

کرد و به این ترتیب هزینه های مربوط به استخراج و نیز هزینه سوبسترای اولیه کاهش می یابد و به این ترتیب میکروارگانسیم بیشترین انرژی خود را صرف تولید و ذخیره لیپید درون سلول می کند.

به منظور دستیابی به روشی که بتوان با سرعت و در هر لحظه میزان محتوای لیپیدی سلولها را اندازه گیری کرد، رابطه بین شدت فلورسنت نسبی سلول ها با دستگاه فلوسایتومتری و محتوای لیپیدی (ماحصل تقسیم میزان لیپید استخراج شده بر میزان وزن خشک سلولی که به صورت درصد گزارش می شود) در زمان های مختلف به صورت یک معادله خطی بدست آمد. مقادیر محتوای لیپیدی و شدت فلورسنت در مراحل مختلف رشد در جدول ۱ آورده شده است. معادله خطی مربوط به محتوای لیپیدی و شدت فلورسنت سلولها بدست آمد. بر اساس نتایج بدست آمده، R^2 معادله خطی $0/818$ بدست آمد. بنابراین با اندازه گیری شدت فلورسنت نسبی یک نمونه و قرار دادن آن در فرمول مربوطه می توان محتوای لیپیدی سلول را به راحتی محاسبه کرد.

بررسی شدت فلورسنت نسبی و اندازه سلولی در مراحل مختلف رشد:

یکی از ویژگی های سلولی که با دستگاه فلوسایتومتری قابل اندازه گیری می باشد اندازه سلولی است که به صورت پارامتر

شدت فلورسنت نسبی از زمان ۱۲ تا ۹۶ دقیقه افزایش یافته و سپس در زمان ۱۲۰ دقیقه کاهش یافته است که علت آن کاهش میزان چربی درون سلولی در اثر مصرف آن می باشد. همانطور که در گراف های هیستوگرام شکل ۱ نشان داده شده است، سلولها در ساعات اولیه کشت (تا ساعت ۳۶ h) دارای شدت فلورسنت ناهمگن و پراکنده ای هستند که نشان می دهد در فاز لگاریتمی رشد میزان محتوای لیپیدی سلول ها با یکدیگر متفاوت است و این به دلیل ایجاد شدن سلولهای تازه در اثر جوانه زنی می باشد و به همین دلیل سلولهای با مقادیر متفاوتی از ذرات لیپیدی درون سلولی در جمعیت میکروبی مورد بررسی قرار دارد. بررسی شدت فلورسنت حاصل از اتصال رنگ نایل رد به ترکیبات چربی در تحقیقات انجام شده توسط (Shakeri et al. (2011 روی پلی بتا هیدروکسی بوتیرات در سویه های باکتریایی تولید کننده این بیوپلیمر انجام گرفته است. این در حالی است که در تحقیق حاضر از مخمر های مولد چربی از نوع تری آسیل گلیسرول استفاده شده است.

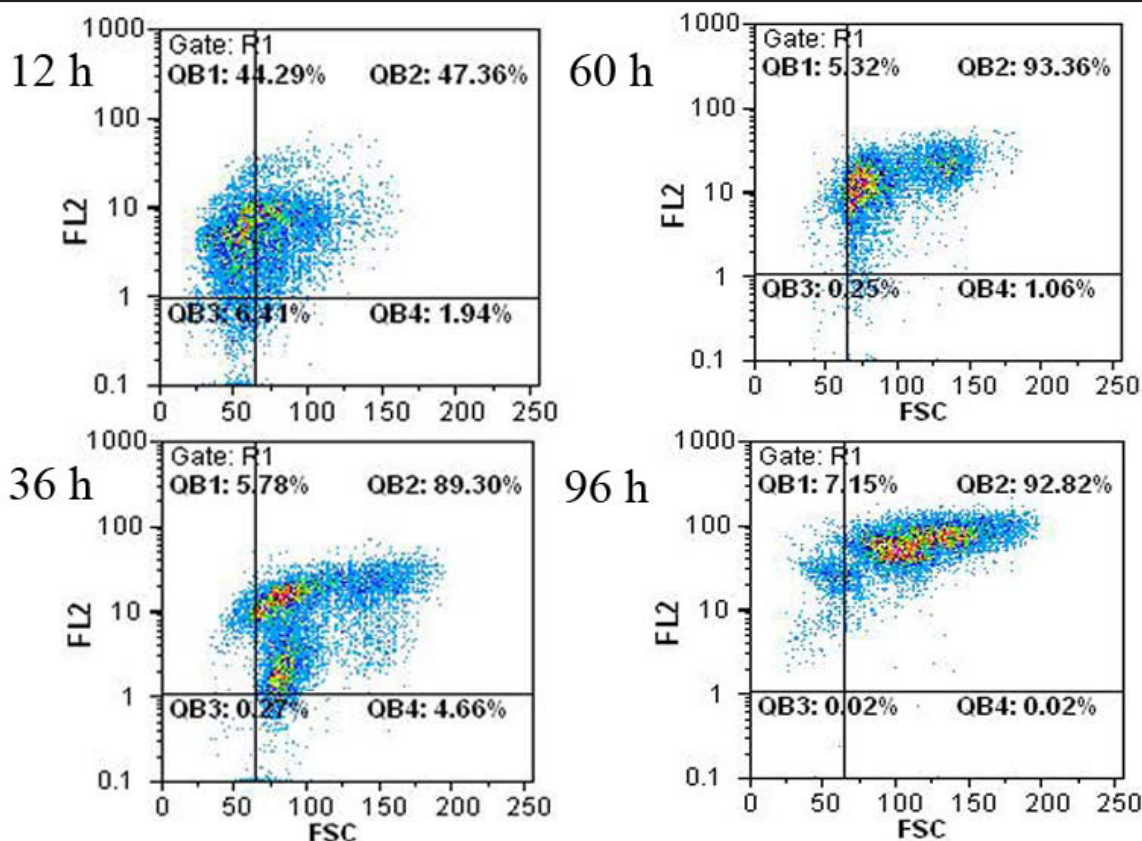
رابطه بین شدت فلورسنت نسبی و محتوای لیپیدی در سلول های مخمیری سویه های مخمیری که محتوای لیپیدی بالاتری داشته باشند از نظر صنعتی ارزش بالاتری دارند چون از وزن کمتری زیست توده سلولی می توان روغن بیشتری استخراج

جدول ۱: مقادیر محتوای لیپیدی و شدت فلورسنت نسبی سلولی در مراحل مختلف رشد مخمر سویه UIMC۳۵. مقادیر ارائه شده میانگین ۳ تکرار مستقل است و میزان خطا کمتر از ۱۰ درصد می باشد.

	محتوای لیپیدی	شدت فلورسنت
	Oil Content (%)	Fluorescent intensity
۱۲ h	۱۹,۷۴	۶
۲۴ h	۲۲,۱۷	۸,۲۵
۳۶ h	۳۰,۵۶	۱۱,۲
۴۸ h	۳۹,۴۷	۱۳,۷۷
۶۰ h	۴۰,۱۲	۱۴,۰۳
۷۲ h	۴۴,۶۷	۱۵,۳۹
۹۶ h	۶۷,۰۴	۶۰,۴۴
۱۲۰ h	۶۱,۳۷	۴۰,۰۲

ها محور Y مربوط به شدت فلورسنت نسبی است که با FL2 نشان داده شده و محور X مربوط به FSC است که نمادی از اندازه سلولی است. سطح زیر دو منحنی به چهار قسمت تقسیم بندی شده که این نواحی به صورت QB1 (فلورسنت زیاد و اندازه کوچک)، QB2 (فلورسنت زیاد و اندازه بزرگ)، QB3 (فلورسنت کم و اندازه کوچک) و QB4 (فلورسنت کم و اندازه بزرگ) نام گذاری شده اند. به دسته سلولهایی که در هر ناحیه قرار می گیرد زیر جمعیت گفته می شود و بنابراین هر ناحیه حاوی زیر جمعیتی است که از نظر شدت فلورسنت و FSC خصوصیات متفاوتی نسبت به دیگر

FSC نشان داده می شود و بدون وابستگی به رنگ فلورسنت قابل ردیابی است. شدت فلورسنت نیز از دیگر پارامترهایی است که بر اساس میزان رنگ فلورسنت (در اینجا نایل رد) متصل شده به سوبسترای خاص در سلول ردیابی می شود و هر چه میزان رنگ متصل شده به سوبسترا بیشتر باشد نشان دهنده حضور بیشتر ترکیب مورد نظر در سلول و در نتیجه افزایش شدت فلورسنت مورد بررسی خواهد بود. شکل ۲ شدت فلورسنت نسبی و اندازه سلولی را در زمان های ۱۲، ۳۶، ۶۰ و ۹۶ دقیقه نشان می دهد (گراف مربوط به دیگر زمان ها در اینجا نشان داده نشده است). در این گراف



شکل ۲: گراف های تراکمی (density plots) مربوط به شدت فلورسنت (FL_p) در مقابل اندازه سلولی (FSC) در زمان های ۱۲، ۳۶، ۶۰ و ۹۶ ساعت از ابتدای کشت. گرافها به صورت نیمه لگاریتمی رسم شده اند. هر کدام از گراف ها به چهار قسمت تقسیم بندی شده اند (QB_۱، QB_۲، QB_۳ و QB_۴) که درصد زیر جمعیت در هر کدام از نواحی درون آن ذکر شده است.

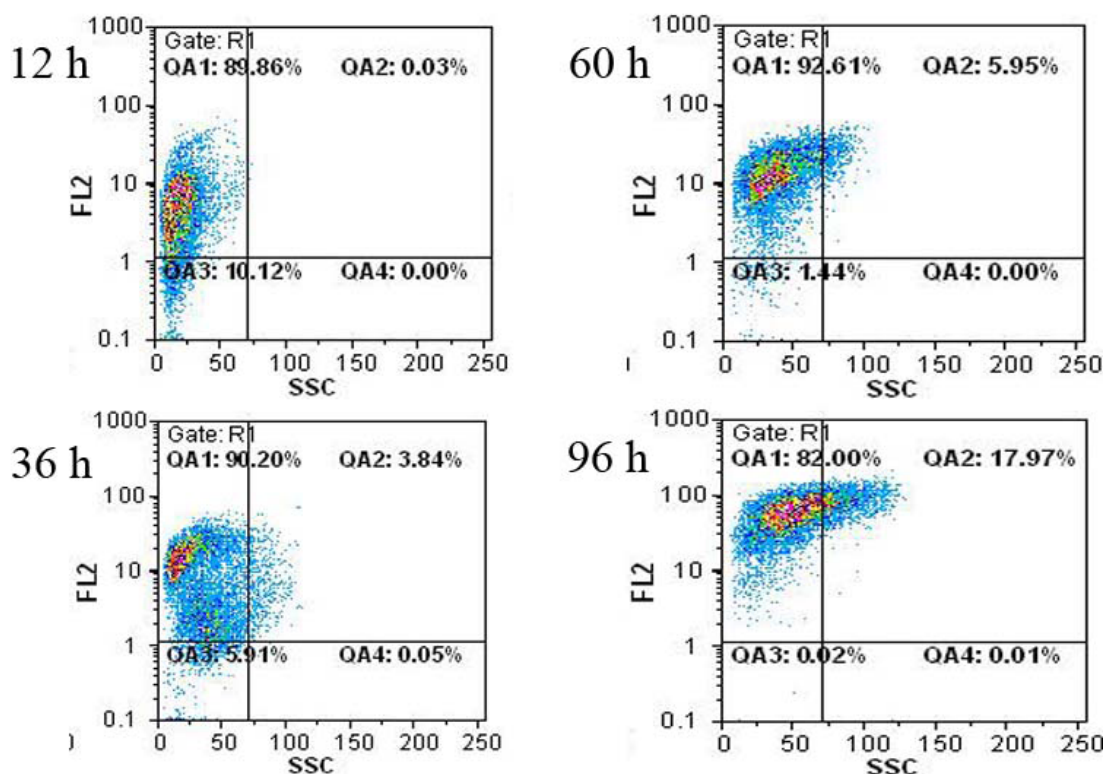
آنها نیز افزایش یافته است. در عین حال با دقت به گراف های تراکمی موجود در شکل ۲، شاهد دو دسته ای شدن سلول ها تا زمان ۷۲ ساعت هستیم و سپس مجدداً سلول ها به صورت یک دسته با شدت فلورسنت نسبی بالا تبدیل می شوند. علت این اتفاق جوانه زنی در سلول های مخمری است که در نتیجه آن سلول های کوچکی با مقدار چربی درون سلولی کم تولید می شود ولی در ادامه به دلیل افزایش تراکم جمعیت مخمری تکثیر به شدت کاهش می یابد و با رشد و افزایش چربی درون

نواحی دارد. درصد زیر جمعیت سلولی موجود در هر منطقه از کل جمعیت سلولی بررسی شده در آن ناحیه آورده شده است. همانطور که در شکل مشخص است درصد زیر جمعیت در منطقه QB2 با افزایش زمان، افزایش یافته است و از ۴۷/۳۶٪ در زمان ۱۲ ساعت به ۹۲/۸۲٪ در زمان ۹۶ ساعت رسیده است که نشان دهنده افزایش توام اندازه و شدت فلورسنت نسبی در جمعیت مخمری مورد بررسی است و بدین معنی است که در طی زمان سلولها بزرگتر شده و تجمع چربی درون سلولی

دستگاه فلوسایتومتری قابلیت ردیابی دارد، تراکم درون سلولی (گرانولوسیتی) است که با پارامتر SSC نمایش داده می شود. بررسی شدت فلورسنت در مقابل تراکم درون سلولی در تحقیقات انجام شده توسط Shakeri et al. (2011) روی باکتری های تولید کننده پلی بتا هیدروکسی بوتیرات انجام گرفته است. گراف های تراکمی SSC در برابر شدت فلورسنت به صورت نیمه لگاریتمی (شدت فلورسنت به صورت لگاریتمی و SSC به صورت خطی) در زمان های ۱۲، ۳۶، ۶۰ و ۷۲ ساعت در شکل ۳ نشان داده شده است. در این گراف ها محور Y

سلول های موجود، تمامی جمعیت مخمری یکدست و با محتوای لیپیدی بالا می شوند. در طی زمان انکوباسیون از تراکم سلولی در زیر جمعیت های QB1، QB3 و QB4 کاسته شده و به زیر جمعیت QB2 افزوده می شود. این تغییرات نشان دهنده تمایل سلولهای مخمری به تجمع لیپید درون سلولی و نیز افزایش اندازه این سلولها با گذشت زمان است.

بررسی شدت فلورسنت نسبی و تراکم درون سلولی در مراحل مختلف رشد از دیگر خصوصیات سلولی که توسط

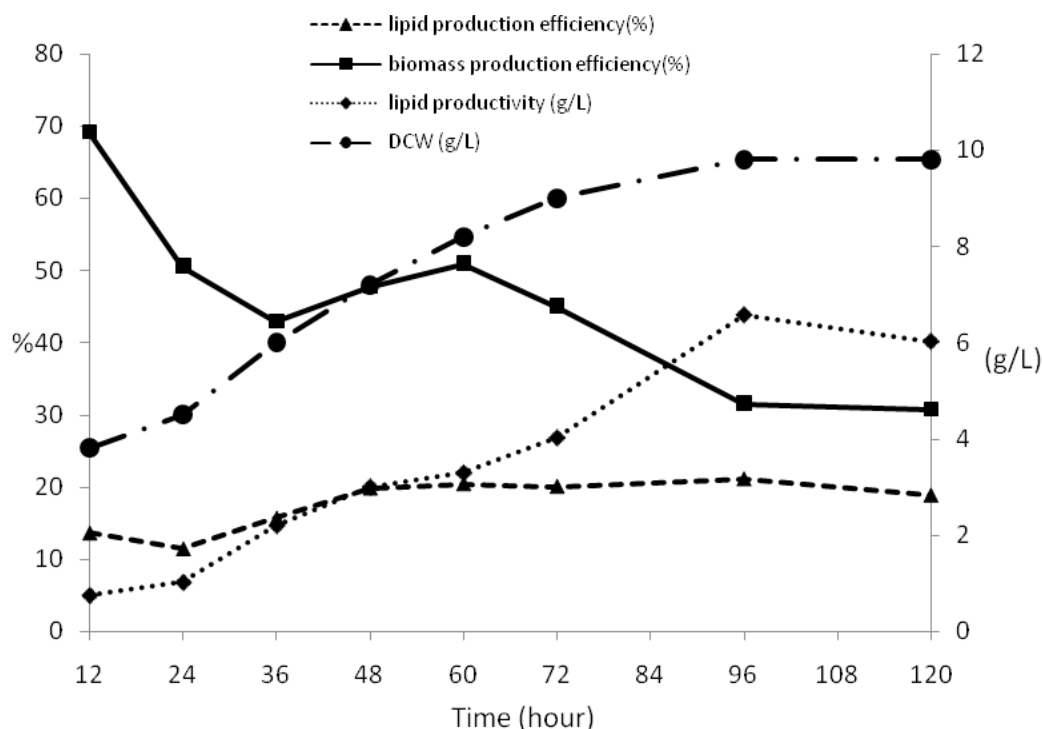


شکل ۳: گراف های تراکمی (density plots) مربوط به شدت فلورسنت (FL_2) در مقابل تراکم درون سلولی (SSC) در زمان های ۱۲، ۳۶، ۶۰ و ۹۶ ساعت از ابتدای کشت. گرافها به صورت نیمه لگاریتمی رسم شده اند. هر کدام از گراف ها به چهار قسمت تقسیم بندی شده اند (QA_1 ، QA_2 ، QA_3 و QA_4) که درصد زیر جمعیت در هر کدام از نواحی درون آن ذکر شده است.

رشد مخمر جمعیتی بیش از ۸۰ درصد را به خود اختصاص داده است. البته از زمان ساعت ۶۰ تا ۹۶، کاهش ۱۰/۶۱ درصدی در این ناحیه، نشان دهنده افزایش تراکم درون سلولی سلول ها در فاز سکون است که منطبق با مرحله افزایش میزان چربی درون سلولی است. به دلیل اینکه سلول های مخمر مورد بررسی از نوع مولد چربی می باشند، بنابراین در تمامی مراحل رشد درصد سلولهای ناحیه QA4، به دلیل محدودیت بسیار کم سلولهایی با میزان پایین ذخائر درون سلولی چربی و میزان بالایی از تراکم سلولی، نزدیک به صفر است. لازم به ذکر است که نتایج بدست آمده از محتوای لیپیدی و شدت فلورسنت نسبی سلول ها نیز این مطلب را تصدیق می کنند و نتایج بدست آمده با هم انطباق دارند.

تغییرات میزان زیست توده خشک سلولی، دانسیته نوری و تعداد سلول ها میزان زیست توده خشک سلولی در طی رشد مخمر مورد بررسی قرار گرفت است (شکل ۴). بر اساس نتایج ارائه شده در این شکل، از ساعت ۱۲ تا ۲۴ فاز تاخیری، از ساعت ۲۴ تا ۷۲ ساعت فاز رشد نمایی، از ساعت ۷۲ تا ۹۶ ساعت فاز تاخیری رشد نمایی یا فاز اولیه سکون و از ساعت ۹۶ تا ۱۲۰ فاز سکون می باشد. بیشترین میزان زیست توده خشک سلولی به میزان ۹/۸

مربوط به شدت فلورسنت نسبی است که با FL2 نشان داده شده و محور X مربوط به تراکم درون سلولی است که با علامت SSC نشان داده شده است. سطح زیر دو منحنی به چهار قسمت تقسیم بندی شده و به صورت QA1 (فلورسنت زیاد و تراکم کم)، QA2 (فلورسنت زیاد و تراکم زیاد)، QA3 (فلورسنت کم و تراکم کم) و QA4 (فلورسنت کم و تراکم زیاد) نام گذاری شده است. درصد زیر جمعیت سلولی موجود در هر منطقه از کل جمعیت سلولی بررسی شده در کنار آن آورده شده است. درصد زیر جمعیت سلولی در ناحیه QA2 با افزایش زمان زیاد شده است و از ۰/۰۳ درصد در زمان ساعت ۱۲ به ۱۷/۹۷ در زمان ساعت ۹۶ رسیده است و با توجه به اینکه این ناحیه مربوط به زیر جمعیت های با تراکم بالا و شدت فلورسنت بالا می باشد، بنابراین در طی زمان زیر جمعیت حاوی ترکیبات لیپیدی درون سلولی افزایش یافته است. در مقابل این زیر جمعیت زیر جمعیت QA3 قرار دارد که مربوط به سلول های با فلورسنت نسبی و تراکم درون سلولی پایین هستند و در طی گذشت زمان از ساعت ۱۲ به ۹۶ درصد سلول ها در این ناحیه از ۱۰/۱۲ درصد به ۰/۰۲ درصد کاهش یافته است که نشان دهنده کاهش تعداد سلول های با میزان لیپید پایین می باشد. بیشترین زیر جمعیت سلولی در ناحیه QA1 قرار گرفته که در تمامی مراحل



شکل ۴: تغییرات میزان زیست توده خشک سلولی، تولید لیپید، کارایی تولید لیپید و کارایی تولید زیست توده در مراحل مختلف رشد مخمر سویه UIMC35. تمامی نتایج میانگین ۳ تکرار مستقل بوده و میزان خطا کمتر از ۱۰ درصد بوده است.

0.941 محاسبه شده است. بدین ترتیب با اندازه گیری آسان و سریع دانسیته نوری و یا تعداد سلول ها در هر مرحله از رشد و قرار دادن اعداد بدست آمده در فرمول مورد نظر می توان زیست توده خشک سلولی را محاسبه کرد. این معادلات در تولید صنعتی روغن تک یاخته از مخمر جهت رسیدن سریع و آسان به میزان زیست توده خشک سلولی کاربرد دارد. تعداد سلولهای مرده و زنده نیز در هر مرحله در جدول ۲ آورده شده است. همانطور که در نتایج مشاهده می شود با گذشت زمان درصد سلولهای مرده افزایش یافته که این مقدار در فاز سکون به بیشترین میزان خود (%)

گرم بر لیتر در فاز سکون رشد مخمر بدست آمد.

به منظور بدست آوردن سریع و آسان میزان زیست توده خشک سلولی (بدون انجام عملیات خشک کردن)، مقادیر دانسیته نوری و نیز شمارش سلولی در مراحل مختلف رشد، همزمان با اندازه گیری زیست توده خشک سلولی، انجام گرفت که مقادیر بدست آمده در جدول ۲ آورده شده است. همچنین معادله خطی تبدیل دانسیته نوری و زیست توده $(OD=3.339DCW+5.283)$ با $R^2=0.980$ و نیز شمارش سلولی و زیست توده $(count=3E+07DCW-1E+07)$ با $R^2 =$

جدول ۲: تغییرات میزان دانسیته نوری، تعداد سلولها و سلولهای مرده و زنده در مراحل مختلف رشد مخمر سویه UIMC۳۵. نتایج ارائه شده میانگین سه تکرار مستقل می باشد و میزان خطا در آزمایشات کمتر از ۱۰ درصد بوده است.

	وزن خشک سلولی	جذب نوری	کل سلول ها	سلول های زنده	سلول های مرده
	Dry cell weight (g/L)	Optical density	Cell count (millions)	Live cells (millions)	Dead cells (millions)
۱۲ h	۳/۸	۱۷	۶۳	۶۳	۰
۲۴ h	۴/۵	۲۰/۸	۱۰۰	۹۸/۷	۱,۳
۳۶ h	۶	۲۷/۲	۱۶۲	۱۵۷	۵
۴۸ h	۷/۲	۲۹	۱۸۵	۱۷۳/۸	۱۱,۲
۶۰ h	۸/۲	۳۱	۱۹۰	۱۰۲/۳	۸۷,۷
۷۲ h	۹	۳۴/۹	۲۲۲	۱۰۹/۵	۱۱۲,۵
۹۶ h	۹/۸	۳۸/۳	۲۲۵	۳۸	۱۸۷
۱۲۰ h	۹/۸۱	۳۸/۸	۲۲۴	۳۲/۸	۱۹۱,۲

داده شده است. بیشترین میزان تولید لیپید در ساعت ۹۶ بدست آمد (۶/۵۷ g/L) که بعد از آن این مقدار به ۶/۰۲ g/L در ساعت ۱۲۰ کاهش پیدا کرد. در واقع بعد از زمان ۹۶ ساعت سلول ها شروع به مصرف چربی های ذخیره ای خود کرده اند.

کارایی تولید لیپید از حاصل تقسیم میزان لیپید تولیدی (g/L) بر میزان قند مصرفی (g/L) بدست می آید و به صورت درصد گزارش می شود. هر چه این نسبت بالاتر باشد نشان می دهد در سیستم متابولیکی سویه مورد بررسی، قند مصرفی به جای اینکه صرف دیگر تولیدات متابولیتی اولیه یا ثانویه شود، بیشتر صرف تولید لیپید شده است. استوکیومتری گلوکز و قندهای مشابه

(۸۵/۴ در ساعت ۱۲۰) رسیده است. از روی تعداد سلولهای مرده می توان به فاز رشدی مخمر پی برد و در تولید صنعتی به تشخیص زمان مناسب جهت تولید کمک قابل توجهی خواهد کرد.

بررسی تغییرات میزان تولید لیپید، کارایی تولید لیپید و کارایی تولید زیست توده در مراحل مختلف رشد مخمر

میزان تولید لیپید، کارایی تولید لیپید و کارایی تولید زیست توده در مراحل مختلف رشد مخمر مورد ارزیابی قرار گرفت است. نتایج مربوط به تولید لیپید در طی رشد مخمر در طی ۱۲۰ ساعت در شکل ۴ نشان

کارایی تولید زیست توده برعکس کارایی تولید لیپید در مراحل اولیه رشد بالاتر از مراحل انتهایی است و این نشان می دهد که انرژی سلولی ابتدا جهت تولید زیست توده مصرف شده و سپس به ذخیره درون سلول شیفیت پیدا کرده است.

بررسی میزان قند، کربن، ازت، نسبت C/N و pH در مراحل مختلف رشد

میزان قند باقیمانده در طی رشد کاهش یافته است و مقدار آن از ۴۰ به ۸/۱ گرم در لیتر در طی مدت زمان ۱۲۰ ساعت رسیده است. مقدار قند مصرفی سویه مخمیری در نقاط زمانی مورد بررسی محاسبه شده است (جدول ۳). نکته قابل توجه این است که با توجه به مقدار باقیمانده قند در محیط کشت و نیز از آنجایی که در ساعت ۹۶ (که از این زمان به بعد میزان چربی کاهش پیدا کرده است) مقدار قند باقیمانده ۸/۹ گرم در لیتر بوده است، محدودیت قند عامل توقف تولید لیپید نبوده است.

تغییرات میزان ازت باقیمانده در طی زمان رشد مخمر در جدول ۳ نشان داده شده است. مقدار ازت اولیه در محیط کشت ۰/۵۳ گرم در لیتر بوده است. نتایج نشان می دهد مقدار ازت باقیمانده در محیط کشت در انتهای کشت و بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون به ۰/۱۷ گرم در لیتر رسیده است. بنابراین می توان جهت بهینه سازی تولید با این

مثل لاکتوز و فروکتوز نشان می دهد که از هر ۱۰۰ گرم (معادل تقریباً ۰/۵۶ مول)، مقدار ۱/۱ مول Acetyl CoA تولید می شود. بنابراین اگر تمامی Acetyl CoA جهت تولید لیپید مصرف شود، بیشترین مقدار روغن تک یاخته تولیدی نسبت به گلوکز مصرفی برابر با ۰/۳۲ g/g و در مورد زایلوز این نسبت به ۰/۳۴ g/g خواهد بود. با این وجود حتی در شرایط اپتیمم میزان تولید روغن تک یاخته به ندرت به مقدار بالاتر از ۰/۲۲ خواهد رسید Papanikolaou & Aggelis (2011). طبق نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر بیشترین کارایی تولید لیپید % ۲۱/۱۳ در ساعت ۹۶ بدست آمده و تغییرات این پارامتر در طی رشد در شکل ۴ نشان داده شده است. در مقایسه با تحقیقات دیگر Pa-panikolaou & Aggelis (2011); Dai et al. (2007); He et al. (2010); Li et al. (2007); Pan et al. (2009); Zhao et al. (2008) سویه ردوترولا موسیلوژینوزا UIMC35 از سویه هایی است که SCO را با کارایی بالا تولید می کند.

کارایی تولید زیست توده به منظور مقایسه با کارایی تولید لیپید در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته و اندازه گیری شده است. نتایج مربوط به این فاکتور در شکل ۴ نشان داده شده است و بر اساس نتایج ذکر شده بیشترین کارایی تولید زیست توده در ساعت ۱۲ و به مقدار % ۶۹/۰۹ بوده است.

جدول ۳: تغییرات میزان قند باقیمانده، قند مصرف شده، کربن باقیمانده، نیتروژن باقیمانده، نسبت C/N و pH در طی مراحل مختلف کشت مخمر سویه UIMC۳۵. نتایج میانگین ۳ تکرار مستقل می باشد و میزان خطا کمتر از ۱۰ درصد بوده است.

	قند باقیمانده	قند مصرف شده	کربن باقیمانده	نیتروژن باقیمانده	نسبت کربن به ازت	اسیدیته
	Residual sugar(g/L)	Consumed sugar(g/L)	Carbon (g/L)	Residual nitrogen (g/L)	C/N	pH
۱۲ h	۳۴/۵	۵/۵	۱۶/۷۸	۰/۳۹	۴۳/۰۴	۲/۹۵
۲۴ h	۳۱/۱	۸/۹	۱۵/۱۳	۰/۳۱	۴۸/۸۱	۲/۵۸
۳۶ h	۲۶	۱۴	۱۲/۶۵	۰/۲۳	۵۴/۹۹	۲/۳۲
۴۸ h	۲۴/۹	۱۵/۱	۱۲/۱۱	۰/۲	۶۰/۵۷	۲/۲۸
۶۰ h	۲۳/۹	۱۶/۱	۱۱/۶۳	۰/۱۹	۶۱/۱۹	۲/۲۱
۷۲ h	۲۰	۲۰	۹/۷۳	۰/۱۷	۵۷/۲۳	۲/۱۷
۹۶ h	۸/۹	۳۱/۱	۴/۳۳	۰/۱۶	۲۷/۰۶	۲/۱۱
۱۲۰ h	۸/۱	۳۱/۹	۳/۹۴	۰/۱۷	۲۳/۱۸	۲/۰۹

که بیشترین لیپید در pH پایین تولید شده است. پس کاهش اسیدیته در محیط کشت از فاکتورهای اساسی متوقف کردن تولید لیپید نمی باشد البته می تواند به عنوان یک فاکتور تاثیر گذار در کاهش تولید لیپید مطرح باشد.

نسبت C/N در ابتدای کشت تقریباً ۴۳ می باشد که با گذشت زمان این نسبت در ابتدا افزایش داشته است و در مراحل با بیشترین میزان تولید لیپید به حدود ۶۰ رسیده است ولی بعد از این مرحله این نسبت روندی

سویه مخمری مقدار ازت محیط کشت را تا مقدار پایین تر بررسی کرد.

تغییرات pH در طی رشد نشان می دهد که مقدار این فاکتور با گذشت زمان انکوباسیون روند کاهشی داشته است که علت آن تولید محصولاتی همچون اسیدهای آلی حاصل از مسیرهای متابولسمی مخمر می باشد. میزان pH بعد از ۲۴ ساعت تا زیر ۳ رسیده و بعد از این مرحله نیز روند نزولی آن ادامه داشته و تا نزدیک ۲ کاهش پیدا کرده است. این در حالیست

نتایج

جدایه مخمیری بومی مورد بررسی در این تحقیق (*R. mucilginosa* UIMC35)، توانایی مناسبی جهت تولید روغن تک یاخته دارد. تکنیک فلوسایتومتری که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت روش مناسبی جهت بررسی سریع و آسان میزان محتوای لیپیدی است و در تولید صنعتی بیودیزل، که بررسی سریع میزان لیپید تولیدی جهت راه بری فرایند تولید امری ضروری است، کاربرد فراوانی می تواند داشته باشد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه اصفهان به دلیل حمایت از این تحقیق تشکر و قدردانی می نمائیم.

کاهش را از خود نشان داد و به ۲۳/۱۸ در ساعت ۱۲۰ رسید. با توجه به نتایج بدست آمده همزمانی بین کاهش لیپید تولید و کاهش نسبت C/N مشاهده می شود. با توجه به اینکه بالا بودن نسبت C/N از موارد لازم برای تولید لیپید درون سلولی است (Zhao et al. (2008)، بنابراین می توان توقف و سپس کاهش تجمع لیپید درون سلولی را به کاهش نسبت C/N در محیط کشت نسبت داد. البته عوامل مهم دیگری از جمله کاهش میزان اکسیژن محلول در محیط کشت نیز تاثیر بسزایی در کاهش تجمع لیپید درون سلولی دارند (Andrade et al. (2012). در صورتیکه بتوان نسبت C/N و نیز میزان اکسیژن محلول را در سطوح بالایی درون محیط کشت نگه داشت، می توان میزان تولید لیپید درون سلولی را بالا برد.

- Andrade, R. Lea, R. Roseiro, J. Reis, A. Lopes da Silva, T. (2012) Monitoring *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch fermentations growing under carbon and nitrogen limitation by flow cytometry. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 28:1175-1184.
- Clesceri, L.S. Greenberg, A.E. Eaton, A.D. (1999) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed., American Public Health Association: Washington DC.
- Dai, C. Tao, J. Xie, F. Dai, Y. Zhao, M. (2007) Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology* 6: 2130-2134.
- He, M. Hu, Q. Gou, X. Liu, X. Li, Q. Pan, K. Zhu, Q. Wu, J. (2010) Screening of oleaginous yeast with xylose assimilating capacity for lipid and bio-ethanol production. *African Journal of Biotechnology* 9(49): 8392-8397.
- Kurtzman, C.P. Fell, J.W. (2000) The yeasts: a taxonomic study, 4th ed., Elsevier, Amsterdam.
- Li, Q. Du, W. Liu, D. (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production *Applied Microbiology & Biotechnology* 80:749-756.
- Li, Y. Zhao, Z. Bai, F. (2007) High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture *Enzyme Microbial Technology* 41: 312-317.
- Lopes da Silva, T. Carlos Roseiro, J. Reis, A. (2012) Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. *Trends in Biotechnology* 30(4): 225-232.
- Lopes da Silva, T. Feijão, D. Carlos Roseiro, J. Reis, A. (2011) Monitoring *Rhodotorula glutinis* CCMI 145 physiological response and oil production growing on xylose and glucose using multi-parameter flow cytometry *Bioresource. Technology* 102: 2998-3006.

- Lopes da Silva, T. Feijão, D. Reis, A. (2010) Using multi-parameter flow cytometry to monitor the yeast *Rhodotorula glutinis* CCMI 145 batch growth and oil production towards biodiesel. *Applied Biochemistry & Biotechnology* 162: 2166-2176.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Annals of Chemistry* 31: 426-428.
- Pan, L. Yang, D. Shao, L. Li, W. Chan, G. Liang, Z. (2009) Isolation of oleaginous yeasts from the soil as studies of their lipid-producing capacities *Food Technology & Biotechnology* 47: 215-220.
- Papanikolaou, S. Aggelis, G. (2011) Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production European. *Journal of Lipid Science & Technology* 113, 1031-1051.
- Raschke, D. Knorr, D. (2009) Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in the oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*. *Journal of Microbiological Methods* 79: 178-183.
- Shakeri, S. Roghanian, R. Emtiazi, G. (2011) Surveillance of single-cell behavior in different subpopulations of *Ralstonia pickettii* AR1 during growth and polyhydroxybutyrate production phases by flow cytometry. *Journal of Basic Microbiology* 51: 1-10.
- Shakeri, S. Roghanian, R. Emtiazi, G. (2011) Comparison of intracellular polyhydroxybutyrate granules formation between different bacterial cell subpopulations by flow cytometry. *Jundishapur Journal of Microbiology* 4(4): 229-238.
- White, T.J. Bruns, T. Lee, S. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p 315-322. in: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, (eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications*, New York: Academic Press Inc.
- Yamada, Y. Makimura, K. Mirhendi, H. Ueda, K. Nishiyama, Y. Yamaguchi, H. Osumi, M. (2002) Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Japanese Journal of Infection Disease* 55:122-125.

Zhao, X. Kong, X. Hua, Y. Feng, B. Zhao, Z. (2008) Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. European Journal of Lipid Science & Technology 110: 405-412.