بهینه‌سازی تولید گاما-دکالاکتون توسط سویه جهش‌یافته مخمر *یاررووییا لیپولیتیکا* با روش سطح پاسخ

فرشاد درویشی[1*]، آرمین خیراللهی میدانی[2]

1- استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران و گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

2- کارشناس ارشد زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

* نویسنده مسئول: f.darvishi@alzahra.ac.ir

دریافت:1399/10/21 پذیرش:1400/2/27

چکیده:

امروزه مواد معطر کاربرد وسیعی در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و شیمیایی دارند. با توجه به گرایش روز افزون مصرف کنندگان برای استفاده از محصولات طبیعی، زیست تبدیلی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها به روشی جالب توجه برای تولید ترکیبات معطر تبدیل شده است. گاما-دکالاکتون یک استر حلقوی معطر با عطر و طعم مشابه هلو است. مخمر *یاررووییا لیپولیتیکا* قادر به زیست تبدیلی سوبسترای ارزان قیمت روغن کرچک به ماده ارزشمند گاما-دکالاکتون می‌باشد. شروع این فرایند با هیدرولیز روغن به وسیله آنزیم لیپاز به اسید ریسینولئیک آغاز و سپس با کوتاه شدن زنجیره به وسیله بتا-اکسیداسیون ادامه پیدا کرده است و درنهایت با لاکتونیزاسیون پایان می‌یابد. در این تحقیق، تولید گاما-دکالاکتون از طریق روش سطح پاسخ (RSM) توسط سویه جهش یافته این مخمر با توانایی تولید مقادیر بالای لیپاز بهینه شد. به این منظور چهار عامل روغن کرچک، عصاره مخمر، پپتون و pH هرکدام در پنج سطح مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس تجزیه و تحلیل‌های آماری روابط حاکم بر متغیرهای آزمایش، یک مدل ریاضی برای روابط حاکم بین متغیرهای آزمایش به‌دست آمد. با توجه به مدل پیشنهادی، بهترین مقادیر برای روغن کرچک 35 میلی‌لیتر در لیتر، عصاره مخمر 6 گرم در لیتر، پپتون 8/5 گرم در لیتر و برای pH عدد 4 به دست آمد. برای تأیید مدل ریاضی، مقادیر پیشنهادی به صورت تجربی مورد آزمایش قرار گرفتند که در نتیجه 126 میلی‌گرم در لیتر گاما-دکالاکتون توسط سویه مخمر تولید شد که مقدار محصول تولید شده در مقایسه با شرایط غیربهینه 46 درصد افزایش را نشان داد. نتایج این تحقیق می‌تواند برای مقرون به صرفه کردن تولید زیستی گاما-دکالاکتون از روغن کرچک با فرایند زیست تبدیلی میکروبی به کار رود.

کلید واژگان: بهینه‌سازی، جهش‌یافته، زیست تبدیلی، گاما-دکالاکتون، مخمر *یاررووییا لیپولیتیکا*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

مقدمه

عطر و طعم مواد غذایی به صورت قابل توجهی بر تصمیمات مصرف‌کنندگان برای خرید مجدد تأثیرگذار است. به‌طور تقریبی کل مواد غذایی موفق دارای عطر و طعم متمایزی هستند که این عطر و طعم خاص به کمک افزودنی‌های طبیعی یا مصنوعی ایجاد می‌شود. امروزه در بازار محصولات مواد غذایی که عطر و طعم مطلوبی نداشته باشند مورد توجه مصرف‌کنندگان قرار نخواهند گرفت [1].

یکی از مواد معطری که به‌طور معمول در صنایع غذایی به‌عنوان طعم دهنده استفاده می‌شود، گاما-دکالاکتون است، که یک استر حلقوی با رایحه هلو و زردآلو می‌باشد. گاما-دکالاکتون به‌طور کلی ایمن شناخته می‌شود و مورد تأیید FDA (سازمان غذا و دارو آمریکا) است. این ترکیب یک افزودنی غذایی بی‌خطر محسوب می‌شود و از آن به‌طور گسترده‌ای در تولید نوشیدنی‌ها، محصولات نانوایی، دسر و شیرینی استفاده می‌شود. در صنایع آرایشی و بهداشتی از آن در تولید عطر، شوینده، صابون، اسپری مو، شامپو، کرم و خوشبو کننده هوا استفاده می‌شود [2-4].

در گذشته گاما-دکالاکتون به‌طور مستقیم از میوه‌ها استخراج می‌شد و یا با روش‌های شیمیایی تولید می‌شد. اما با توجه به بهره‌وری پایین روش استخراج و سخت بودن مراحل سنتز شیمیایی، در طول چند دهه اخیر استفاده از میکروارگانیسم‌ها به منظور تولید طبیعی این محصول گسترش یافته است. محصولاتی که به روش میکروبی تولید می‌شوند، به دلیل برخورداری از برچسب طبیعی بازار فروش مناسبی دارند [5, 6].

مخمرها یکی از مهمترین میکروارگانیسم‌ها در فرایندهای سنتی و نوین زیست‌فناورانه هستند. مخمرها توانایی کاتالیزوری بالایی دارند و به همین دلیل در صنایع، به‌منظور انجام تبدیلات زیستی انتخابی از آنها استفاده فراوانی می‌شود. تا کنون از مخمرهایی مانند *ساکارومایسس سرویزیه*، *روترولا آئورانتیاکا*[1] و *یاررووییا لیپولیتیکا* به‌منظور تولید گاما-دکالاکتون استفاده شده است. مخمر *یاررووییا لیپولیتیکا* با توجه به بازده بالای تولید و شرایط کشت آسان‌تر، یکی از مناسب‌ترین میکروارگانیسم‌ها به‌منظور سنتز زیستی گاما-دکالاکتون است. تاکنون بیشترین تعداد ژن‌های کد کننده برای آنزیم‌های اختصاصی تجزیه کننده سوبسترای آبگریز در این مخمر یافت شده است. این آنزیم‌ها عمدتا در تجزیه اسیدهای چرب در چرخه پراکسی‌زومی نقش دارند [7-12].

لاکتون‌ها در مخمر *یاررووییا لیپولیتیکا* از مسیر بتا-اکسیداسیون تولید می‌شوند. بتا-اکسیداسیون در مخمرها درون پراکسی‌زوم‌ها صورت می‌گیرد. هرچند به صورت تئوری بتا-اکسیداسیون باید تا شکسته شدن کامل سوبسترا ادامه یابد اما وجود عامل هیدروکسیل در یکی از کربن‌های 9 الی 14 سوبسترای 18 کربنه موجب اکسیداسیون نهایی آن به صورت لاکتون (با 9 الی 12 کربن) خواهد شد. در اکثر تحقیقات جهت تولید زیستی گاما-دکالاکتون توسط مخمر *یاررووییا لیپولیتیکا*، از ریسینولئیک اسید که 80 درصد روغن دانه کرچک را تشکیل می‌دهد، استفاده می‌شود. روغن دانه کرچک بسیار ارزان قیمت بوده و در مقادیر بالا قابل دسترس است که تولید صنعتی این محصول را ممکن می‌سازد [13-17].

ابتدا مواد جهت ورود به درون سلول‌ها باید تحت فرایندهایی قرار بگیرند تا شرایط لازم را کسب کنند.

1. *Rhodotorula aurantiaca*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

به همین دلیل هنگامی که مخمرها به‌منظور تولید گاما-دکالاکتون در محیط حاوی روغن کرچک قرار می‌گیرند، باید با ترشح آنزیم لیپاز آن را به واحدهای کوچک‌تر اسید ریسینولئیک تبدیل کنند. وجود مقادیر بیشتر لیپاز در محیط موجب دسترسی بهتر سلول‌ها به سوبسترا خواهد شد [9, 16, 18].

به‌منظور بررسی کامل عامل‌های مؤثر بر نتیجه آزمایش در کوتاه‌ترین زمان ممکن و با کمترین تعداد اجرای آزمایش، از روش آماری طراحی آزمایش استفاده می‌شود. طراحی آزمایش عبارتنداز ایجاد چندین آزمایش با کنار هم قرار دادن تعدادی متغیر از پیش تعیین شده به گونه‌ای که اثرات عامل‌های مختلف بر نتیجه آزمایش و تأثیر متقابل آنها بر یکدیگر مشخص شود. طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ (RSM) یکی از مناسب‌ترین روش‌ها به منظور بررسی روابط بین متغیرها با کمترین تعداد آزمایش می‌باشد [19, 20].

درویشی و همکاران با استفاده از روش سطح پاسخ موفق به افزایش تولید آسپارژیناز تا 210 واحد در میلی‌لیتر توسط مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا* شدند. همچنین این گروه با استفاده از روش پاسخ سطح به صورت موفقیت آمیزی تولید لاکاز و روغن تک سلولی در مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا* را افزایش دادند که نشان دهنده مناسب بودن این روش در بهینه‌سازی تولید محصولات توسط این مخمر می‌باشد [21-23].

تاکنون مطالعات مختلفی در زمینه تولید گاما-دکالاکتون صورت گرفته است. برای نمونه اندریزی و همکاران برای نخستین‌بار نقش مسیر بتا-اکسیداسیون در تولید گاما-دکالاکتون را توصیف کردند، [5] این موضوع توسط تحقیقات پژوهشگران دیگری نیز مورد تأیید قرار گرفت [24-26].

فرون و همکاران مطالعات خود را بر روی سمیت لاکتون‌ها متمرکز کردند که به تکمیل مطالعات قبلی در زمینه تجزیه لاکتون‌ها منجر شد [27, 28]. در سال 2000 میلادی، واچی و همکاران موفق به توصیف نقش انواع آنزیم‌های اسیل-کوآ اکسیداز، در تبدیل زیستی متیل ریسینولئات به گاما-دکالاکتون توسط مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا* شدند [29]. همچنین مطالعاتی در زمینه متابولیسم لیپید که منجر به تولید لاکتون می‌شود، صورت گرفته است [13, 30]. اثر متقابل سلول- سوبسترا و تأثیر شرایط محیط کشت در تولید لاکتون‌ها نیز مورد مطالعه قرار گرفته است [31-33]. به‌تازگی نیز در یک بیوراکتور بستر جامد کوچک به مطالعه عبور اکسیژن و به دام انداختن لاکتون خارج شده از محیط پرداخته شده است [34].

در این تحقیق از روش سطح پاسخ (RSM) برای بهینه‌سازی تولید زیستی گاما-دکالاکتون توسط یک سویه جهش‌یافته مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا* که ترشح لیپاز آن بهبود یافته است، استفاده شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم مورد استفاده: در این تحقیق از یک سویه جهش یافته مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا* به نام U6 استفاده شد که توسط درویشی و همکاران به‌وسیله جهش‌زایی تحت اشعه ماورابنفش از سویه طبیعی DSM3286 به دست آمده است. این سویه می‌تواند نزدیک به ده برابر سویه طبیعی لیپاز بیشتری تولید کند [35].

محیط‌های کشت مورد استفاده

محیط کشت YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)

به منظور کشت، ذخیره‌سازی و جداسازی تک کلنی‌های *یاررورویا لیپولیتیکا* از محیط کشت YPDA

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

(حاوی آگار) استفاده شد. جهت تهیه محیط پیش‌کشت (مایه تلقیح) نیز از محیط کشت YPD (مایع) استفاده شد. به‌منظور تهیه این محیط، 20 گرم گلوکز، 10 گرم عصاره مخمر و 20 گرم پپتون در یک لیتر آب ترکیب شدند. برای جامدسازی محیط به ترکیب ذکر شده به ازای هر لیتر، 20 گرم آگار اضافه شد.

محیط کشت تبدیل زیستی

به‌منظور تولید گاما-دکالاکتون و تأمین دیگر نیازهای زیستی سلول‌ها از محیط کشت تغییر یافته بر پایه YPD استفاده شد. شباهت محیط کشت تبدیل زیستی به محیط پیش‌کشت باعث کاهش تنش وارده به سلول‌ها هنگام تلقیح می‌شود. برای تهیه این محیط، 9گرم عصاره مخمر و 9گرم پپتون در یک لیتر آب ترکیب شدند. سپس به‌عنوان منبع کربن و همچنین پیش‌ماده تبدیل زیستی، مقادیر مختلفی از روغن کرچک در بازه بین 20 الی 40 میلی‌لیتر در لیتر به محیط افزوده شد.

آماده سازی محیط تولید محصول

به‌منظور تهیه سلول‌های مناسب و فعال جهت تولید گاما-دکالاکتون و همچنین هم‌سان بودن تعلیقه (سوسپانسیون) سلولی، از مایه تلقیح (پیش کشت) استفاده می‌شود. در این مطالعه از YPD مایع جهت تهیه مایع تلقیح استفاده شد. ابتدا برای تهیه مایع تلقیح، که از مخمرهای تازه رشد یافته درون پلیت (در دمای 29 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت) یک لوپ برداشته شد و به ارلن صد سی‌سی حاوی 20 میلی‌لیتر YPD مایع منتقل شد. سپس ارلن به مدت 18 ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای 29 درجه سلسیوس و سرعت 200 دور در دقیقه گرماگذاری شد. درنهایت به‌منظور تولید محصول، 100 میکرولیتر از مایه تلقیح به ارلن حاوی 20 میلی‌لیتر محیط تبدیل زیستی منتقل شد و در دمای 29 درجه سلسیوس با سرعت 200 دور در دقیقه گرماگذاری شد.

روش اندازه‌گیری رشد سلولی

به این منظور از روش شمارش مستقیم سلول‌ها استفاده شد. در این روش به صورت چشمی تعداد مخمرها در واحد مشخصی از حجم شمرده شدند. سپس با اعمال ضریب، تعداد سلول در یک میلی‌لیتر تعیین شد. برای این‌کار از یک لام مخصوص (لام نئوبار) استفاده شد [36].

سنجش میزان تولید محصول

برای سنجش کمی میزان محصول تولیدی از روش رنگ‌سنجی استفاده شد. در این روش جدید که بر پایه واکنش فریک هیدروکسامات توسعه داده شده است، می‌توان مقادیر مجهول گاما-دکالاکتون را به صورت کمی و سریع مشخص کرد. به این منظور پس از سانترفیوژ کردن نمونه کشت سلولی، 200 میکرولیتر از مایع‌رویی محصول به محلول حاوی 460 میلی‌لیتر هیدروکسل آمین هیدروکلراید و 140 میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید به ترتیب با غلظت 0/4 و 2 مولار اضافه شد. سپس به مدت 10 دقیقه در حرارت 45 درجه سلسیوس بن‌ماری قرار گرفت تا مواد وارد واکنش شوند. در مرحله دوم پس از سرد شدن محلول در دمای محیط، 300 میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک 1/5 مولار به محلول اضافه شد. پس از آن 120 میلی‌لیتر کلرید آهن خشک 1/2 مولار جهت

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

رنگ آمیزی لاکتون افزوده شد و درنهایت با 780 میلی‌لیتر اتانول 75 درصد رقیق شد. به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر تفاوت جذب نوری حاصل از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده گاما-دکالاکتون اندازه‌گیری شد [37].

به‌منظور تعیین غلظت گاما-دکالاکتون در نمونه‌های مجهول، باید از منحنی استاندارد این ماده استفاده کرد. برای رسم این منحنی، از گاما-دکالاکتون استاندارد با بازه غلظت بین 0/2 تا 2 گرم در لیتر سری رقت تهیه شد. پس از رنگ‌آمیزی محلول‌ها طبق مراحل گفته شده، مقدار جذب نوری آنها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. رنگ حاصل در طول موج 510 نانومتر حداکثر جذب را دارد. معادله حاصل از منحنی استاندارد به منظور سنجش کمی مقادیر مجهول گاما-دکالاکتون استفاده شد.

بهینه سازی تولید به روش طراحی آزمایش RSM:

طرح آزمایش RSM برای این تحقیق از نوع CCD[1] انتخاب شد. در این طرح برای هر عامل، دو بازه بالا و پایین تعیین شده و هر عامل در سه سطح اصلی[2] و دو سطح فرعی[3] مورد مطالعه قرار می‌گیرد (در مجموع 5 سطح). بازه سطوح عوامل آزمایش به نوعی انتخاب شد که نزدیک به محیط پیش‌کشت و همچنین نزدیک به بهترین مقادیر گزارش شده در مطالعات قبلی باشد [38]. برای طراحی آزمایش‌های RSM از نرم‌افزار Design-Expert-11 استفاده شد. در این نرم افزار پس از وارد کردن نام عامل‌ها، سطوح بالا و پایین هر عامل تعیین می‌شود. در این تحقیق چهار عامل مورد بررسی قرار گرفت. مقدار سطح مرکزی[4] حاصل میانگین سطوح بالا و پایین خواهد بود. دو سطح باقی مانده دیگر (یعنی نقاط آلفا یا Star Point) بر اساس مقدار عددی که به آلفا اختصاص داده می‌شود، تعیین شدند. در جدول 1 پنج سطح هر چهار عامل آورده شده است.

به‌منظور افزایش دقت در سنجش، آزمایشات در سه بلوک تنظیم شدند. در هر بلوک دو نقطه مرکزی قرار داده شد تا خطاهای احتمالی ناشی از بلوک بندی رصد شود. در نهایت طرح آزمایش حاصل دارای 30 آزمایش شد که از این بین شش آزمایش نقطه مرکزی هستند. ارلن‌های حاوی محیط کشت بر اساس این مقادیر آماده شدند و بقیه مراحل تلقیح و گرماگذاری طبق شرایط گفته شده در بخش‌های قبل، انجام گرفت. میزان تولید محصول 72 ساعت پس از تلقیح (نقطه اوج تولید) سنجش شد. ترتیب آزمایش‌ها توسط نرم‌افزار به صورت تصادفی تنظیم شد تا خطای مطلق آزمایش کاهش یابد. در ستون استاندارد[5] آزمایش‌ها با ترتیب اصلی خود شماره گذاری شدند (جدول 2).

1. Central Composite Design
2. Factorial Point
3. Star Point
4. Central Point
5. Standard (Std)

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

جدول 1- عوامل مورد بررسی و مقادیر اختصتص داده شده به هر عامل در طراحی آزمایش RSM

نام عامل	واحد	مقدار کمینه	مقدار بیشینه	منفی آلفا	مثبت آلفا	سطح مرکزی
روغن کرچک	میلی‌لیتر بر لیتر	25	35	20	40	30
پپتون	گرم بر لیتر	8	10	7	11	9
عصاره مخمر	گرم بر لیتر	5	7	4	8	6
pH	-	4	6	3	7	5

جدول 2- آزمایش‌های طراحی شده توسط نرم‌افزار Design-Expert11 برای RSM.

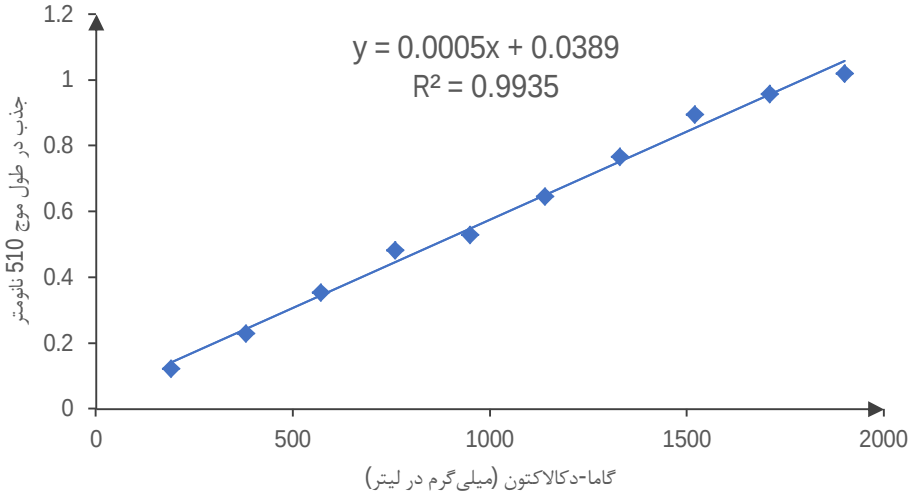
ترتیب استاندارد	بلوک	ترتیب اجرا	عامل 1 A: روغن کرچک (میلی‌لیتر در لیتر)	عامل 2 B: پپتون (گرم در لیتر)	عامل 3 C: عصاره مخمر (گرم در لیتر)	عامل 4 D: pH
3	بلوک 1	1	25	10	5	4
18	بلوک 1	2	30	9	6	5
14	بلوک 1	3	35	8	7	6
2	بلوک 1	4	35	8	5	4
17	بلوک 1	5	30	9	6	5
8	بلوک 1	6	35	10	7	4
5	بلوک 1	7	25	8	7	4
9	بلوک 1	8	25	8	5	6
15	بلوک 1	9	25	10	7	6
12	بلوک 1	10	35	10	5	6
16	بلوک 2	11	35	10	7	6
19	بلوک 2	12	30	9	6	5
10	بلوک 2	13	35	8	5	6
11	بلوک 2	14	25	10	5	6
7	بلوک 2	15	25	10	7	4
1	بلوک 2	16	25	8	5	4
13	بلوک 2	17	25	8	7	6
4	بلوک 2	18	35	10	5	4
20	بلوک 2	19	30	9	6	5
6	بلوک 2	20	35	8	7	4
28	بلوک 3	21	30	9	6	7
25	بلوک 3	22	30	9	4	5
21	بلوک 3	23	20	9	6	5
23	بلوک 3	24	30	7	6	5
22	بلوک 3	25	40	9	6	5
29	بلوک 3	26	30	9	6	5
24	بلوک 3	27	30	11	6	5
27	بلوک 3	28	30	9	6	3
26	بلوک 3	29	30	9	8	5
30	بلوک 3	30	30	9	6	5

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

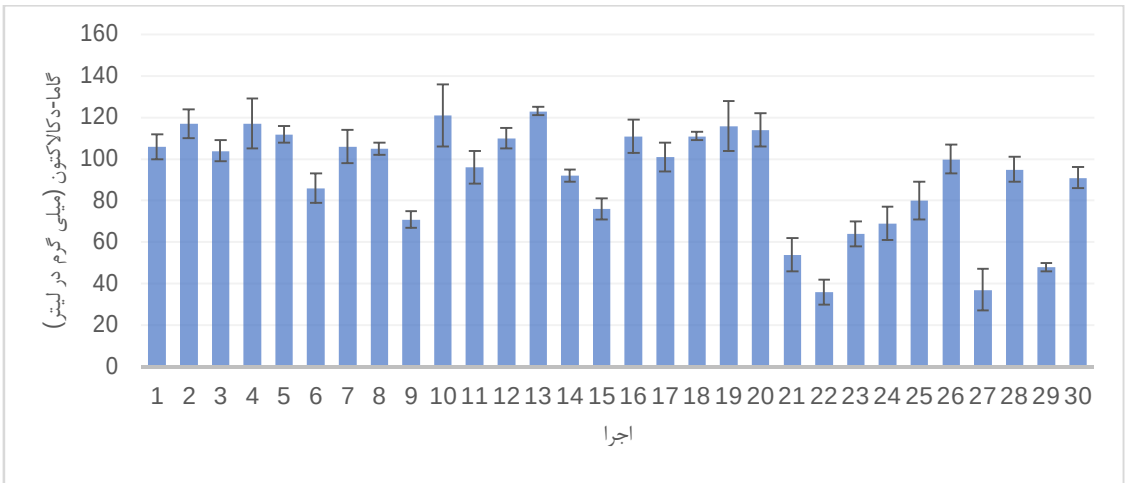
[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

یافته‌ها

پس از تهیه سری رقت از محلول استاندارد، جذب نوری نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر سنجیده شد. بیشترین جذب در طول موج 510 نانومتر ثبت شد. نمودار استاندارد در این طول موج بر اساس مقادیر جذبی رسم شد (شکل 1). در معادله حاصل از نمودار استاندارد، y میزان جذب نوری نمونه (OD) و x غلظت نمونه مورد آزمایش می‌باشد. جهت بررسی میزان تولید محصول، میزان جذب نوری هر نمونه در فرمول حاصل از نمودار استاندارد قرار داده شد.



شکل 1- نمودار استاندارد جذب نوری گاما-دکالاکتون در طول موج 510 نانومتر. معادله حاصل از برازش غلظت گاما-دکالاکتون و مقدار جذب نوری در بالای نمودار آورده شده است. مربع رگراسیون به دست آمده بالای 0/99 است.



شکل 1- نتایج مقدار گاما-دکالاکتون تولید شده حاصل از آزمایش‌های RSM برای سویه جهش‌یافته U6 مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا*.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

به‌منظور بررسی تأثیرات عوامل و صحت مدل ریاضی ارائه شده از تجزیه واریانس (ANOVA) استفاده شد. نتایج این تحلیل در **Error! Reference source not found.** 3 آورده شده است. همان‌طور که در این جدول قابل مشاهده است، نرم‌افزار به منظور شبیه‌سازی نتایج از مدل مکعب استفاده کرده است اما تعدادی از جملات مکعب که معنی‌دار نبوده‌اند حذف شده است که به مدل حاصل مکعب کاهش یافته می‌گویند. مجموع مربعات از نوع سوم جرئی است. مقدار F برای مدل بیش از 17 می‌باشد که نشان‌دهنده معنی‌دار بودن مدل به دست آمده است. وجود 0/01 درصد تصادف در مقادیر F ممکن است به علت خطاهای[1] آزمایش باشد. اگر مقدار P برای عوامل آزمایش کمتر از 0/05 باشد نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تأثیر آن عامل در مدل است. مقادیر P بالای 0/1 به معنی غیرمعنی‌دار شدن آن عامل در مدل نهایی می‌باشد. مقدار بالای p برای آزمون فقدان برازش[2]، حاکی از عدم وجود روابط خارج از مدل برای عوامل است که تأییدی بر صحت مدل ارائه شده می‌باشد.

مقدار تولید محصول در هر اجرای آزمایش سطح پاسخ در شکل 2 آورده شده است. کمترین مقدار محصول تولیدی در اجراهای شماره 21، 22، 27 و 29 مشاهده شد. در اجرای شماره 21 بر خلاف دیگر اجراها pH محیط خنثی می‌باشد که نشانگر تأثیر منفی این عامل در تولید گاما-دکالاکتون است. در اجراهای 21 و 29 مقدار عصاره مخمر در سطوح مثبت و منفی آلفا (سطوح فرعی آزمایش) قرار دارد، پس مقادیر بسیار زیاد و بسیار کم از عصاره مخمر نیز تأثیر منفی بر تولید محصول داشته است. در اجرای شماره 27 نیز مقدار پپتون در سطح مثبت آلفا قرار گرفته که مقدار آن در محیط کشت نسبت به عوامل دیگر بسیار بیشتر بوده است و تأثیر منفی بر تولید محصول گذاشته است. به طور میانگین بیشترین مقدار تولید محصول مربوط به اجراهای 10 و 13 می‌باشد. در هر دو این اجراها مقدار روغن کرچک در سطح بالای خود قرار دارد که نشان دهنده تأثیر مثبت افزایش این ماده بر تولید محصول است.

1. Noise

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

جدول 3- تجزیه و تحلیل واریانس مدل مکعب کاهش یافته حاصل از نتایج RSM برای سویه جهش‌یافته U6 مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا*.

مرجع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	p	
بلوک	9484/32	2	4742/16			
مدل	8370/28	11	760/93	17/46	<0/0001	معنی‌دار
A: روغن کرچک	989/64	1	989/64	22/70	0/0002	
B: پپتون	1460/24	1	1460/24	35/50	<0/0001	
C: عصاره مخمر	71/38	1	71/38	1/64	0/2189	
D: Ph	840/50	1	840/50	19/28	0/0005	
AD	153/23	1	153/23	3/52	0/0792	
BC	289/96	1	289/96	6/65	0/0202	
CD	0/8927	1	0/8927	0/0205	0/8880	
B^2	1229/11	1	1229/11	28/20	<0/0001	
C^2	2554/60	1	2554/60	58/60	<0/0001	
B^2C	690/44	1	690/44	15/84	0/0011	
C^2D	497/49	1	497/49	11/41	0/0038	
باقی‌مانده[1]	697/45	16	43/59			
فقدان برازش[2]	551/76	13	42/44	0/8739	0/6320	بی‌معنی
خطای مطلق[3]	145/70	3	48/57			
مجموع	18552/05	29				

1. Residual
2. Lack of Fit
3. Pure error

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

با توجه به جدول 3، برهم‌کنش مستقیم بین روغن کرچک با pH و همچنین پپتون و عصاره مخمر به صورت معنی‌داری در روند تولید گاما-دکالاکتون تأثیرگذار می‌باشند در حالی که برهم‌کنش عصاره مخمر و pH با یکدیگر تأثیر معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

به‌منظور بررسی کفایت داده‌های به دست آمده از جدول رگراسیون، نمودار احتمال نرمال، باقی‌مانده استیودنتیده داخلی، نمودار مقادیر واقعی در برابر مقادیر پیش‌بینی شده استفاده شد.

در جدول 4 مقدار مربع رگراسیون[1] بیش از 90% بوده و بین مربع رگراسیون تنظیم‌شده[2] و مربع رگراسیون پیش‌بینی شده[3] اختلاف کمتر از 20% مشاهده می‌شود که قابل قبول بوده و مدل حاصل توانایی به‌نسبت خوبی در تحلیل نتایج داشته است.

به‌منظور بیان اختلاف مقدار پاسخ پیش‌بینی شده توسط مدل با مقدار میانگین خطای پیش‌بینی (نسبت سیگنال به اغتشاش) از ثابت دقت استفاده می‌کنند. نسبت بالای چهار برای مقدار این ثابت نشان‌دهنده مطلوب بودن مدل حاصل است. نسبت بالای 19 برای مدل حاصل از این پژوهش بیانگر کفایت سیگنال موجود است.

در شکل‌های 3 الی 6 برهم‌کنش‌های معنی‌دار عوامل شرکت کننده در مدل و تأثیر آنها بر تولید محصول، نمایش داده شده است. در شکل 3 نمودار پرشیدگی عوامل مورد آزمایش بر تولید گاما-دکالاکتون نشان داده شده است. در این نمودار هرچه شیب خط بیشتر باشد تأثیر آن عامل بر تولید محصول بیشتر است. تغییر مقادیر روغن کرچک و pH در بازه مورد آزمایش، تأثیر زیادی بر تولید محصول داشته است.

با توجه به شکل 4 که تاثیر برهم‌کنش روغن کرچک و pH بر تولید محصول را نشان می‌دهد، با افزایش مقدار غلظت روغن کرچک و کاهش pH تولید گاما-دکالاکتون افزایش پیدا کردهو برعکس است. به‌معنی در بازه سطوح مورد آزمایش هرچه محیط اسیدی‌تر و مقدار پیش‌ماده تبدیل زیستی بیشتر بوده، تولید محصول بیشتر شده است.

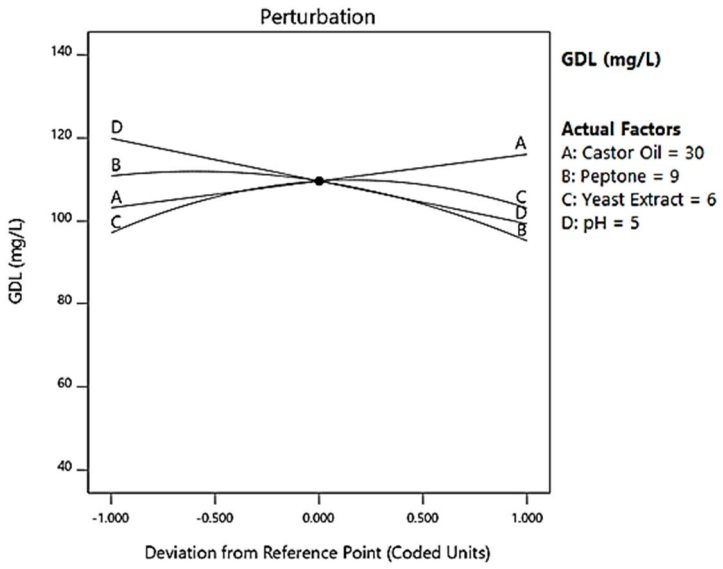
1. R^2
2. Adjusted R^2
3. Predicted R^2

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

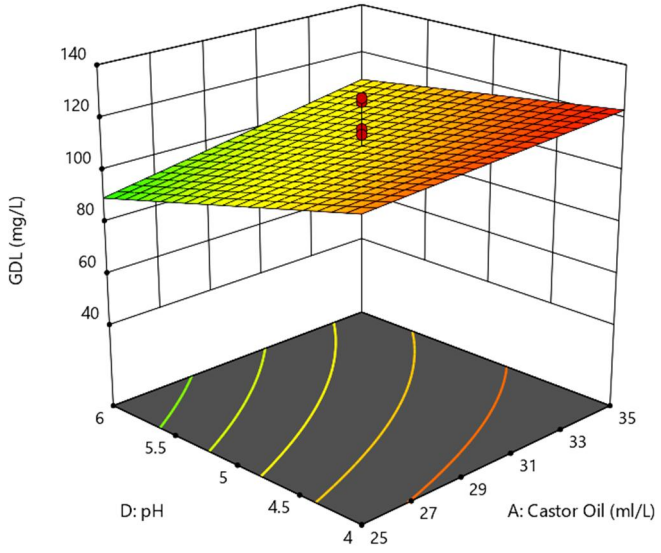
[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

جدول 4- جدول رگراسیون برای مدل ارائه شده از نتایج RSM برای سویه جهش‌یافته U6 مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا*.

مربع رگراسیون	مربع رگراسیون تنظیم شده	مربع رگراسیون پیش‌بینی شده	ثابت دقت	انحراف معیار	میانگین
0/9231	0/8702	0/7163	19/2665	6/60	96/83



شکل 2- نمودار پرشیدگی برای عوامل مؤثر بر تولید گاما-دکالاکتون توسط سویه جهش‌یافته U6 مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا*.

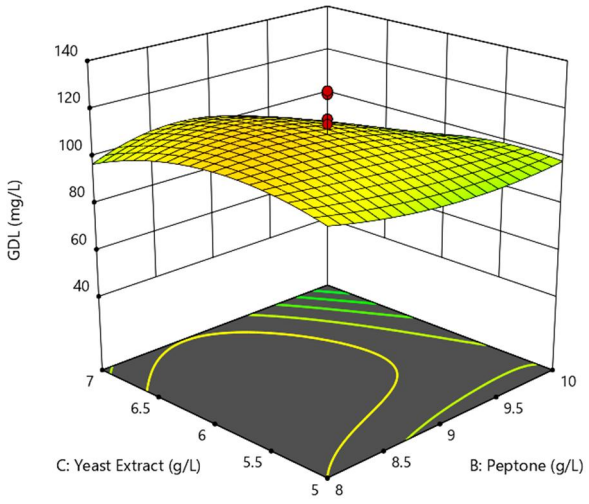


شکل 3- نمایش برهم‌کنش روغن کرچک و pH و تأثیر آن بر تولید گاما-دکالاکتون توسط سویه جهش‌یافته U6 مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا*.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

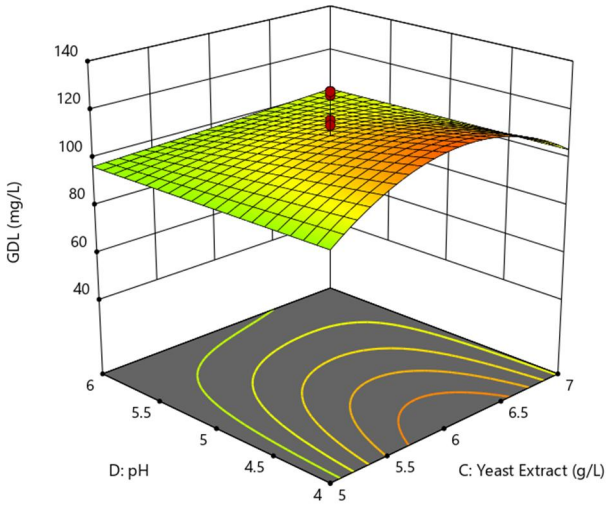
[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

تأثیر برهم‌کنش پپتون و عصاره مخمر بر تولید محصول کمی پیچیده است (شکل 5). در حضور مقادیر کمتر پپتون، مقدار محصول تولیدی با افزایش غلظت عصاره مخمر تا 6 گرم بر لیتر، افزایش یافته و پس از آن کاهش یافته است. اما در صورت وجود پپتون با غلظت بالا در محیط کشت، با افزایش غلظت عصاره مخمر تولید محصول کاهش یافته است.



شکل 4- نمایش برهم‌کنش پپتون و عصاره مخمر و تأثیر آن بر تولید گاما-دکالاکتون توسط سویه جهش‌یافته U6 مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا*.

در شکل 6 تأثیر برهم‌کنش عصاره مخمر و pH بر تولید محصول را نشان می‌دهد. در pH بالای 5 با افزایش غلظت عصاره مخمر مقدار محصول تولیدی به صورت پیوسته اندکی افزایش می‌یابد. اما در pH پایین‌تر و به خصوص در pH حدود 4، افزایش عصاره مخمر تا 6 گرم بر لیتر تأثیر مثبت بر تولید محصول داشته و در مقادیر بالاتر از 6 گرم بر لیتر اثر منفی داشته است.

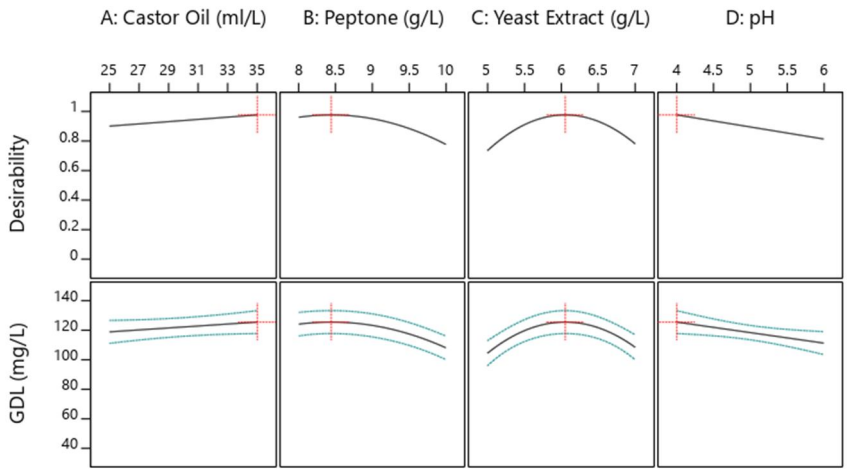


شکل 5- نمایش برهم‌کنش عصاره مخمر و pH و تأثیر آن بر تولید گاما-دکالاکتون توسط سویه جهش‌یافته U6 مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا*.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

درنهایت توسط نرم‌افزار DesignExpert11 برای آزمایش سطح پاسخ مدلی ارائه شد. بر اساس محاسبات این مدل، بهینه‌ترین سطح برای روغن کرچک 35 میلی‌لیتر در لیتر، پپتون 8/5 گرم در لیتر، عصاره مخمر 6 گرم در لیتر و pH برابر 4 است (شکل 7).



شکل 6- نمایش بهینه‌ترین مقادیر پیش‌بینی شده برای هر عامل به منظور بیشینه کردن تولید گاما-دکالاکتون، به کمک مدل ارائه شده توسط RSM برای سویه جهش‌یافته U6 مخمر *یاروویا لیپولیتیکا*.

محیط کشت تبدیل زیستی بر اساس سطوح پیشنهادی برای متغیرها آماده شد و طی سه آزمایش مستقل از هم مقدار گاما-دکالاکتون تولیدی 126 میلی‌گرم در لیتر ثبت شد.

به‌منظور پیش‌بینی مقدار تولید محصول در شرایط دیگر، از مدل کدبندی شده حاصل از نتایج RSM استفاده شد که با روش تجزیه و تحلیل رگراسیون چندگانه توسط نرم‌افزار Design-Expert11 ارائه شده است (جدول 5).

جدول 5- مدل کدبندی شده حاصل از نتایج RSM برای تولید گاما-دکالاکتون.(A: روغن کرچک، B: پپتون، C: عصاره مخمر D: pH)

عامل	ضریب
	+109.67
A	+6.42
B	-7.80
C	+2.99
D	-10.25
AD	+3.09
BC	-4.26
CD	-0.2362
B^2	-6.57
C^2	-9.48
B^2C	-11.38
C^2D	+9.66

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

معادله حاصل به صورتی خطی شده:

$$GDL\ (mg/L) = +109.67 + 6.42A - 7.80B + 2.99C - 10.25D + 3.09AD - 4.26BC - 0.2362CD - 6.57B^2 - 9.48C^2 - 11.38B^2C + 9.66C^2D$$

بحث

در این تحقیق از مخمر چربی دوست *یاررورویا لیپولیتیکا* که یک میزبان صنعتی مهم برای تولید آنزیم‌ها، مواد معطر، روغن‌ها، داروهای ضد سرطان و مواد آرایشی- بهداشتی است، به‌منظور تولید گاما-دکالاکتون استفاده شد. توانایی بالای این مخمر در استفاده از پیش‌ماده‌های آب‌گریز، ایمن بودن آن برای استفاده در صنایع غذایی و همچنین شناخته بودن مسیرهای متابولیسمی این مخمر، موجب شده است تا انتخاب مناسبی برای تولید زیستی گاما-دکالاکتون باشد [17, 39, 40].

به‌منظور کاهش تنش وارد هنگام تلقیح، محیط کشت تبدیل زیستی با تغییر اندکی از محیط پیش‌کشت (استفاده از روغن کرچک به جای گلوکز) آماده شد. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، دو منبع نیتروژنی (پپتون و عصاره مخمر) تأثیر معنی‌داری بر تولید گاما-دکالاکتون دارند. بر اساس مطالعه مائوم و چیتام بر روی تأثیر انواع منابع نیتروژنی روی میکروارگانیسم‌ها در محیط حاوی اسیدهای چرب، مقادیر زیاد منابع نیتروژنی در محیط موجب کاهش اثرات سمی اسیدهای چرب روی میکروارگانیسم‌ها می‌شود [41]. در تحقیق دیگر به بررسی و بهینه سازی انواع منابع نیتروژنی برای تولید گاما-دودکالاکتون از مخمر *والتومایسز لیپوفر* پرداخته شده‌است. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه مذبور، نبود وجود منابع نیتروژنی سبب کاهش زیادی در تولید محصول خواهد شد [42]. بنابراین در تحقیق حاضر وجود عصاره مخمر و پپتون در محیط کشت موجب کاهش اثر سمی روغن کرچک بر روی مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا* می‌شود. پس با توجه به وجود این دو منبع نیتروژنی در محیط کشت، مخمر می‌تواند مقادیر بالاتری از روغن کرچک را تحمل کند و در نتیجه تولید محصول افزایش یابد.

در این صورت براساس نتایج مطالعه حاضر، افزایش غلظت منابع نیتروژنی در محیط کشت بیش از حدی مشخص موجب کاهش تولید محصول شده است. گروه آل-شیهاب به بهینه‌سازی منابع نیتروژنی در محیط کشت مخمر *روترولا آئورانتیاکا*[1] با هدف افزایش تولید گاما-دکالاکتون اقدام کردند که طبق نتایج مطالعه آنها، بهترین مقادیر عصاره مخمر و پپتون به ترتیب برابر با شش گرم در لیتر و سه گرم در لیتر می‌باشد [43]. در مطالعه دیگری از بین منابع نیتروژنی مختلف، تریس[2] به‌عنوان بهترین ماده جهت تولید بیشینه لاکتون‌ها انتخاب شد [42]. بر اساس نتایج تحقیق دیگری، پپتون به عنوان تأثیرگذارترین منبع نیتروژن برای تولید گاما-دکالاکتون در *اسپوردیوبولوس سالمونیکالر*[3] شناخته شد [44]. بنابراین نوع و نسبت غلظت منابع نیتروژنی مختلف در محیط کشت تبدیل زیستی بر میزان تولید لاکتون‌ها مؤثر است که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. احتمالاً تأثیر متفاوت منابع نیتروژنی مختلف ناشی از فعال‌سازی مسیرهای متابولیسمی خاصی در این مخمر است که این موضوع باید در مطالعات آینده مورد بررسی قرار گیرد.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کاهش pH محیط کشت تبدیل زیستی موجب بهبود تولید گاما-دکالاکتون شده است. در مطالعات پیشین نیز تولید گاما-دکالاکتون در محیط اسیدی بیشتر بوده است، این اتفاق با توجه به این که لاکتونی شدن (ایجاد حلقه لاکتون) در شرایط اسیدی بهتر انجام می‌گیرد، قابل توجیه است [45]. مرادی و همکاران و همچنین نتو و همکاران نیز pH اسیدی را برای تولید گاما-دکالاکتون مناسب دانسته‌اند که با نتایج این پژوهش منطبق است [31, 46].

1. *Rhodotorula aurantiaca*
2. Tris
3. *Sporidiobolus salmonicolor*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

براساس نتایج پژوهش حاضر، افزایش غلظت روغن کرچک در محیط کشت موجب افزایش تولید گاما-دکالاکتون می‌شود. طبق تحقیقات پیشین نیز بین تولید گاما-دکالاکتون و غلظت روغن کرچک در محیط کشت رابطه مستقیم وجود دارد که با نتایج این پژوهش منطبق است [47]. پژوهش مرادی و همکاران نشان می‌دهد افزایش غلظت روغن کرچک در محیط کشت سویه طبیعی مخمر *یاررورویا لیپولیتیکا*، تا سی میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش تولید گاما-دکالاکتون می‌شود اما در غلظت‌های بالاتر موجب کاهش تولید محصول می‌شود [31]. کاهش تولید محصول بر اثر افزایش غلظت روغن کرچک به دلیل اثر سمیت این روغن بر مخمر طبیعی می‌باشد که احتمالاً در سویه جهش‌یافته مورد استفاده در تحقیق حاضر (سویه U6) این آستانه تحمل افزایش یافته است.

در این مطالعه از روش سطح پاسخ به منظور بهینه‌سازی و بررسی عوامل مؤثر بر تولید گاما-دکالاکتون استفاده شد. پراساد و همکاران به روش سطح پاسخ اقدام به بهینه‌سازی تولید گاما-دکالاکتون توسط *اسپوردیوبولوس سالمونیکالر* نمودند. طبق گزارش آنها، روش آماری سطح پاسخ به خوبی توانسته شرایط محیط کشتی این مخمر را بهینه نماید، همچنین معادله حاکم بر عوامل مختلف آزمایش را به روش تجزیه و تحلیل رگراسیون چندگانه ایجاد و منتشر کردند [44].

درویشی و همکاران با انجام آزمایش RSM به بهینه‌سازی تولید آنزیم لاکاز به وسیله سویه نوترکیب *یاررورویا لیپولیتیکا* اقدام کردند و با تجزیه و تحلیل‌های آماری، مدلی ریاضی برای عوامل دخیل بر تولید لاکاز ارائه کردند [48]. بنابراین طراحی آزمایش سطح پاسخ به خوبی می‌تواند روابط بین متغیرهای آزمایش را آشکار سازد و مدل ریاضی حاصل از تجزیه و تحلیل رگراسیون چندگانه قادر است به درستی بهترین مقدار هر متغیر را تعیین نماید.

نتیجه‌گیری

با انجام آزمایش‌های تأییدی در مقادیر بهینه پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار برای مدل RSM، مقدار تولید محصول به صورت میانگین 126 میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. مقدار گاما-دکالاکتون تولید شده در این روش نسبت به شرایط غیر بهینه، 46درصد افزایش تولید را نشان می‌دهد. بنابراین طراحی آزمایش پاسخ سطح (RSM) می‌تواند به عنوان ابزار آماری مناسبی جهت تجزیه و تحلیل داده‌های مطالعات زیست‌فناورانه به کار گرفته شود و مدل‌های ریاضی به دست آمده از این روش می‌توانند به طرز قابل قبولی جهت پیش‌بینی نتایج فرایند استفاده شوند. این قبیل مطالعات و مدل‌سازی‌های آماری فرایندهای زیست‌فناورانه در طراحی‌های صنعتی و به خصوص در مدل‌سازی‌های کامپیوتری آینده بسیار کارامد خواهند بود.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

منابع

1. Parker JK, Elmore S, Methven L. Flavour development, analysis and perception in food and beverages. Amsterdam: Elsevier; 2014.

2. Siek T, Albin I, Sather L, Lindsay R. Comparison of flavor thresholds of aliphatic lactones with those of fatty acids, esters, aldehydes, alcohols, and ketones. Journal of Dairy Science. 1971;54(1):1-4.

3. Arctander S. Perfume and flavor chemicals: Aroma chemicals. Michigan: Allured Publishing Corporation; 1969.

4. Gopinath M, Vijayakumar L, Dhanasekar R, Viruthagiri T. Microbial biosynthesis of γ-decalactone and its application-a review. Global J Biotechnol Biochem. 2008;3(2):60-8.

5. Endrizzi A, Awadé AC, Belin J-M. Presumptive involvement of methyl ricinoleate β-oxidation in the production of γ-decalactone by the yeast *Pichia guilliermondii*. Fems Microbiology Letters. 1993;114(2):153-9.

6. Darvishi F, Chen H. Microbial Biotechnology: Progress and Trends. Florida: CRC Press; 2018.

7. Johnson EA, Echavarri-Erasun C. Yeast biotechnology. The Yeasts. Amsterdam: Elsevier; 2011. p. 21-44.

8. Darvishi F. Biotechnological applications of the yeast *Yarrowia lipolytica*. New York: Springer; 2014.

9. Darvishi F, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. BioMed Research International. 2009;2009(1):114-9.

10. Fickers P, Benetti P-H, Waché Y, Marty A, Mauersberger S, Smit M, et al. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS yeast research. 2005;5(6-7):527-43.

11. Alchihab M, Destain J, Aguedo M, Wathelet J-P, Thonart P. The utilization of gum tragacanth to improve the growth of *Rhodotorula aurantiaca* and the production of γ-decalactone in large scale. Applied biochemistry and biotechnology. 2010;162(1):233-41.

12. Rong S, Yang S, Li Q, Cai B, Guan S, Wang J, et al. Improvement of γ-decalactone production by stimulating the import of ricinoleic acid and suppressing the degradation of γ-decalactone in *Saccharomyces cerevisiae*. Biocatalysis and Biotransformation. 2017;35(2):96-102.

13. Waché Y, Aguedo M, Nicaud J-M, Belin J-M. Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. Applied microbiology and biotechnology. 2003;61(5-6):393-404.

14. Hussain MS, Rodriguez GM, Gao D, Spagnuolo M, Gambill L, Blenner M. Recent advances in bioengineering of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. Aims Bioeng. 2016;3(4):493-514.

15. Marella ER, Dahlin J, Dam MI, Ter Horst J, Christensen HB, Sudarsan S, et al. A single-host fermentation process for the production of flavor lactones from non-hydroxylated fatty acids. Metabolic engineering. 2020;61(2):427-36.

16. Romero-Guido C, Belo I, Ta TMN, Cao-Hoang L, Alchihab M, Gomes N, et al. Biochemistry of lactone formation in yeast and fungi and its utilisation for the production of flavour and fragrance compounds. Applied Microbiology and Biotechnology. 2011;89(3):535-47.

17. Darvishi F, Ariana M, Marella ER, Borodina I. Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals. Applied microbiology and biotechnology. 2018;102(14):5925-38.

18. Boualem K, Waché Y, Garmyn D, Karbowiak T, Durand A, Gervais P, et al. Cloning and expression of genes involved in conidiation and surface properties of *Penicillium camemberti* grown in liquid and solid cultures. Research in Microbiology. 2008;159(2):110-7.

19. Lee K-M, Gilmore DF. Statistical experimental design for bioprocess modeling and optimization analysis. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2006;135(2):101-15.

20. Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. 2010;2(2):128-49.

21. Darvishi F, Faraji N, Shamsi F. Production and structural modeling of a novel asparaginase in *Yarrowia lipolytica*. International journal of biological macromolecules. 2019;125(1):955-61.

22. Darvishi F, Salmani N, Hosseini B. Biovalorization of vegetable oil refinery wastewater into value-added compounds by *Yarrowia lipolytica*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2019;94(9):2961-8.

23. Darvishi F, Moradi M, Jolivalt C, Madzak C. Laccase production from sucrose by recombinant

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

state fermentation, importance of in situ gas-phase recovery systems. Applied Microbiology and Biotechnology. 2018;102(17):7239-55.

35. Darvishi F, Destain J, Nahvi I, Thonart P, Zarkesh-Esfahani H. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. New biotechnology. 2011;28(6):756-60.

36. Mather JP, Roberts PE. Introduction to cell and tissue culture: theory and technique. 1 ed. New York: Springer Science & Business Media; 1998.

37. Zhao Y, Mu X, Nie Y, Xu Y. A new rapid spectrophotometric quantitative determination method for γ-decalactone and application in high throughput screening for γ-decalactone producing strains. Food Science and Biotechnology. 2014;23(6):1935-40.

38. Moradi H, Asadollahi MA, Nahvi I. Optimaztion of gamma-decalactone production by yeast *Yarrowia lipolytica* using the taguchi method. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2016;2021(1):685-8.

39. Mazloum-Ravasan S, Madadi E, Fathi Z, Mohammadi A, Mosafer J, Mansoori B, et al. The effect of *Yarrowia lipolytica* L-asparaginase on apoptosis induction and inhibition of growth in Burkitt's lymphoma Raji and acute lymphoblastic leukemia MOLT-4 cells. International Journal of Biological Macromolecules. 2020;146(1):193-201.

40. Liu Z, Moradi H, Shi S, Darvishi F. Yeasts as microbial cell factories for sustainable production of biofuels. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2021;143(1):110907.

41. Maume K, Cheetham P. The production of γ-decalactone by fermentation of castor oil. Biocatalysis. 1991;5(2):79-97.

42. An J-U, Joo Y-C, Oh D-K. New biotransformation process for production of the fragrant compound γ-dodecalactone from 10-hydroxystearate by permeabilized *Waltomyces lipofer* cells. Applied and Environmental Microbiology. 2013;79(8):2636-41.

43. Alchihab M, Destain J, Aguedo M, Majad L, Ghalfi H, Wathelet J-P, et al. Production of Gamma-decalactone by a psychrophilic and Mesophilic strain of the yeast *Rhodotorula aurantiaca*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2009;158(1):41-50.

44. Prasad MV, Narayana AV, Raju CA, Venkateswarulu T, Swamy A. Optimum production of γ-decalactone by *Sporidiobolus salmonicolor* *Yarrowia lipolytica* and its application to decolorization of environmental pollutant dyes. Ecotoxicology and environmental safety. 2018;165(1):278-83.

24. Gatfield I. Some aspects of the microbiological production of flavor-active lactones with particular reference to γ-decalactone. Food Chemistry, Microbiology, Technology. 1993;15:165-70.

25. Haffner T, Tressl R. Biosynthesis of (R)-γ-decanolactone in the yeast *Sporobolomyces odorus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1996;44(5):1218-23.

26. Spinnler HE, Ginies C, Khan JA, Vulfson EN. Analysis of metabolic pathways by the growth of cells in the presence of organic solvents. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996;93(8):3373-6.

27. Feron G, Bonnarme P, Durand A. Prospects for the microbial production of food flavours. Trends in Food Science & Technology. 1996;7(9):285-93.

28. Feron G, Dufosse L, Pierard E, Bonnarme P, Quere J, Spinnler H. Production, Identification, and Toxicity of (gamma)-Decalactone and 4-Hydroxydecanoic Acid from *Sporidiobolus spp*. Applied and Environmental Microbiology. 1996;62(8):2826-31.

29. Waché Y, Aguedo M, Choquet A, Gatfield IL, Nicaud J-M, Belin J-M. Role of β-oxidation enzymes in γ-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology. 2001;67(12):5700-4.

30. Escamilla Garcia E. Aspects of the degradation of hydrophobic substances into flavor compounds by the yeast *Yarrowia lipolytica*. France: Dijon University; 2008.

31. Moradi H, Asadollahi MA, Nahvi I. Optimaztion of gamma-decalactone production by yeast *Yarrowia lipolytica* using the taguchi method. Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences. 2016;6(1).

32. Gomes N, Teixeira JA, Belo I. Fed-batch versus batch cultures of Yarrowia lipolytica for γ-decalactone production from methyl ricinoleate. Biotechnology Letters. 2012;34(4):649-54.

33. Aguedo M, Beney L, Waché Y, Belin J-M. Interaction of an odorant lactone with model phospholipid bilayers and its strong fluidizing action in yeast membrane. International Journal of Food Microbiology. 2003;80(3):211-5.

34. Try S, Voilley A, Chunhieng T, De-Coninck J, Waché Y. Aroma compounds production by solid

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

using Response Surface Methodology. Journal of ChemTech Research. 2014;6(7):3478-86.

45. Braga A, Belo I. Biotechnological production of γ-decalactone, a peach like aroma, by *Yarrowia lipolytica*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2016;32(10):169.

46. Neto R, Pastore G, Macedo G. Biocatalysis and biotransformation producing γ-decalactone. Journal of food science. 2004;69(9):C677-C80.

47. Braga A, Belo I. Production of γ-decalactone by *Yarrowia lipolytica*: insights into experimental conditions and operating mode optimization. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2015;90(3):559-65.

48. Darvishi F, Moradi M, Madzak C, Jolivalt C. Production of laccase by recombinant *Yarrowia lipolytica* from molasses: bioprocess development using statistical modeling and increase productivity in shake-flask and bioreactor cultures. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2017;181(3):1228-39.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Optimization of gamma-decalactone production by *Yarrowia lipolytica* mutant strain via Response surface methodology

Farshad Darvishi[1*], Armin Kheirollahi Meidani[2]

1- Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran and Department of Biology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

2- M.Sc. of Microbial Biotechnology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

*Corresponding author: f.darvishi@alzahra.ac.ir

Received: 2021/1/10 Accepted: 2021/5/17

Abstract:

Nowadays, aromatic componds are widely used in food, pharmaceutical, cosmetic and chemical industries. Due to the growing tendency of consumers to use natural products, biotransformation by microorganisms is an interesting method for the production of aromatic compounds. Gamma-decalactone is a cyclic aroma with a peach-like flavor. The non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* can bioconversion the inexpensive castor oil substrate into the valuable gamma-decalactone. The process begins with the hydrolysis of castor oil by the lipase to ricinoleic acid, then continues by shortening the chain by beta-oxidation, and finally ends by lactonization. In this study, gamma-decalactone production was optimized via Response surface methodology (RSM) by a mutant strain of this yeast with the ability to produce high amounts of lipase. For this purpose, castor oil, yeast extract, peptone and pH were studied as factors at five levels. Based on statistical analysis of the relationships between the experimental variables, a mathematical model was obtained for the governing relationships between the experimental variables. Based on the results, the best values were obtained for castor oil 35 ml/l, yeast extract 6 g/l, peptone 8.5 g/l and pH 4. To validate the mathematical model, the proposed values were tested and 126 mg/L of gamma-decalactone was produced by the yeast strain, which shows a 46% increase compared to non-optimal conditions. The results of this study can be used to make cost-effective production of gamma-decalactone from castor oil by microbial biotransformation process.

Keywords: Optimization, Mutation, Biotransformation, Gamma-decalactone, *Yarrowia lipolytica* yeast

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.9.9]