Research Article

Nova Biologica Reperta 8(3): 183-194 (2021)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.8.3.183

مقاله پژوهشی

**یافته‌های نوین در علوم زیستی**

جلد ۸، شماره ۳، صفحات ۱۸۳ الی ۱۹۴ (۱۴۰۰)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

# مقایسه تولید گاما- دکالاکتون در سویه طبیعی و جهش یافته مخمر *Yarrowia lipolytica*

**فرشاد درویشی[۱،۲] و آرمین خیراللهی میدانی[۱]**

[۱]دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران؛ [۲]گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: فرشاد درویشی، f.darvishi@maragheh.ac.ir; f.darvishi@alzahra.ac.ir

**چکیده.** گاما-دکالاکتون استری حلقوی از اسیدهای چرب هیدروکسی است که دارای رایحه هلویی بوده و در صنایع غذایی و آرایشی کاربرد گسترده‌ای دارد. تولید زیست‌فناورانه این ترکیب با تبدیل زیستی روغن دانه کرچک توسط مخمر *Yarrowia lipolytica* امکان پذیر است. هدف تحقیق حاضر مقایسه تولید گاما-دکالاکتون توسط سویه طبیعی با سویه جهش یافته دارای قابلیت تولید لیپاز با مقادیر بالا است. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، سلول‌هایی با مورفولوژی مخمری بیش از سلول‌های هیفی شکل گاما-دکالاکتون تولید می‌کنند. زمان اوج تولید نیز برای سویه طبیعی و جهش یافته به ترتیب ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح و بیشینه تولید گاما-دکالاکتون برای سویه طبیعی و جهش یافته به ترتیب ۶۵ و ۹۰ میلی گرم در لیتر به دست آمد. سویه جهش یافته ۳۸ درصد سوبسترای بیشتری را نسبت به سویه طبیعی به گاما-دکالاکتون تبدیل می‌کند که بهره‌وری تولید در مقیاس صنعتی می‌تواند به صورت قابل توجهی افزایش یابد.

**واژه‌های کلیدی.** اسید ریسینولئیک، رایحه هلو، روغن دانه کرچک، زیست تبدیلی، لیپاز

# A comparison of the production of gamma-decalactone in wild-type and mutant strains of *Yarrowia lipolytica*

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

[1]Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran; [2]Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Correspondent author: Farshad Darvishi, f.darvishi@maragheh.ac.ir; f.darvishi@alzahra.ac.ir

**Abstract.** Gamma-decalactone, an intramolecular 4-hydroxydecanoic acid ester, has a peach-like aroma and is widely used in the food and cosmetics industries. The biotechnological production of this compound is possible via biotransformation of castor seed oil by the yeast *Yarrowia lipolytica*. This study aimed to compare the production of gamma-decalactone by wild-type strain with that in a mutant strain producing lipase in high amounts. It was found that cells with yeast-like morphology produce more gamma-decalactone than hyphae-like cells. The maximum production of gamma-decalactone by wild-type and mutant strains was 65 mg/L after 24h of inoculation and 90 mg/L after 72h of inoculation, respectively. The mutant strain converts 38% more substrate into gamma-decalactone than the wild-type strain, therefore, it could significantly increase the productivity of industrial-scale production of gamma-decalactone.

**Key words.** biotransformation, castor seed oil, lipase, peach-like aroma, ricinoleic acid

Received 03.01.2021/ Revised 01.04.2021/ Accepted 26.04.2021/ Published 22.10.2021

دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۴/ اصلاح: ۱۴۰۰/۰۱/۱۲/ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۶/ انتشار: ۱۴۰۰/۰۷/۳۰



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]

[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]

[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]

## مقدمه

منشاء استفاده از مواد معطر در زندگی انسان به آغاز تاریخ بشر باز می‌گردد (Berger, 2007). امروزه نیز مواد معطر کاربرد وسیعی در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و شیمیایی دارند و تقاضای مصرف‌کنندگان برای ترکیبات معطر هر ساله رو به افزایش است (Braga & Belo, 2016; Vandamme, 2003). با توجه به کاهش گرایش مصرف کنندگان به ترکیبات شیمیایی، علاقه‌مندی برای تولید این محصولات به وسیله میکروب‌ها و روش‌های زیست‌فناورانه افزایش یافته است زیرا محصولاتی که به این روش تولید می‌شوند می‌توانند برچسب "طبیعی" دریافت کنند (Gatfield, 1988; Vandamme, 2003).

لاکتون‌ها استرهای حلقوی از اسیدهای چرب هیدروکسی هستند که به علت داشتن عطرهای میوه‌ای، کره‌ای و شیرین کاربردهای صنعتی فراوانی دارند (Maga & Katz, 1976). گاما-دکالاکتون مایعی روغنی و متمایل به زرد است که بو و طعم هلو مانند دارد و جزو فراورده‌های GRAS ( Generally Recognize As Safe) طبقه‌بندی می‌شود ( Arctander, 1969; Siek et al., 1971). کاربرد اصلی گاما-دکالاکتون در صنایع غذایی به منظور تولید نوشدنی‌هایی با رایحه هلو، انبه، توت‌فرنگی و همچنین در شکلات سازی است ( Malajowicz et al., 2020).

برخی از سویه های مخمر می‌توانند گاما-دکالاکتون را با تبدیل زیستی اسید ریسینولئیک که جزء اصلی تشکیل دهنده روغن کرچک است، تولید کنند ( Braga, 2014; Darvishi & Chen, 2018). نخستین تحقیقات در زمینه تولید زیست‌فناورانه لاکتون‌ها از دهه ۶۰ میلادی حین مطالعه بر روی کاتابولیسم اسیدهای چرب هیدروکسیله توسط ارگانیسم‌های مختلف آغاز شد که در تحقیق مذبور گزارشی مبنی بر تولید لاکتون توسط سویه مخمر کاندیدا ارائه شد (Okui et al., 1963).

یکی از مخمرهایی که به لطف آنزیم‌های مسیر بتا-اکسیداسیون و لیپازهای خارج سلولی خود قادر به تبدیل زیستی این ماده است مخمر *Yarrowia lipolytica* است ( Darvishi et al., 2018; Farbood & Willis, 1985). *Yarrowia lipolytica* یک میکروارگانیسم دوریختی است که معمولا به شکل تک سلول یا هیف رشته‌ای دیده می‌شود. این مخمر ایمن بوده و تاکنون برای کاربردهای متفاوت صنعتی از جمله تهیه آنزیم‌های صنعتی، ترکیبات فلاونوئیدی و سوخت‌های زیستی مورد استفاده صنایع قرار گرفته است ( Kawasse et al., 2003; Liu et al., 2021; Marsafari et al., 2020).

یکی از روش‌های بهبود تولید محصول زیست‌فناورانه، افزایش دسترسی سلول‌ها به سوبسترا است که این کار با افزایش هیدرولیز سوبسترا به کمک آنزیم‌ها امکان‌پذیر است ( Braga et al., 2012; Darvishi et al., 2009). هرچند آنزیم‌های خالص شده سلولی (به صورت آزاد یا تثبیت شده) نیز می‌توانند به عنوان کاتالیزگر زیستی عمل کنند ولی به علت پایدارتر بودن آنزیم‌ها در محیط داخل سلولی و مشکلات مربوط به خالص سازی و کنترل مسیر واکنش، استفاده از سلول کامل برای انجام فرایند گزینه مناسب‌تری است (Liese et al., 2006).

روش‌های مختلف مهندسی ژنتیک به منظور افزایش تولید محصولات متابولیکی در مخمرها صورت گرفته است. ولی در برخی از کشورها استفاده از سویه‌های دستورزی ژنتیکی شده دارای محدودیت‌هایی است که استفاده از برچسب طبیعی بر روی محصول را با مشکل مواجه می‌کند. ولی با جهش‌زایی به وسیله تکنیک‌های بر گرفته شده از طبیعت (عواملی که در محیط طبیعی نیز موجب جهش‌زایی می‌شوند) می‌توان سویه‌هایی ایمن ایجاد کرد که محصولات تولید شده توسط آن‌ها طبیعی شناخته می‌شوند (Zeng et al., 2015).

در این تحقیق از سویه جهش‌یافته مخمر *Yarrowia lipolytica* که تولید لیپاز در آن ارتقاء یافته است به منظور سنتز گاما-دکالاکتون از روغن کرچک استفاده شد. استفاده از سویه جهش‌یافته به منظور بهبود تولید گاما-دکالاکتون رویکردی است که باعث حفظ برچسب طبیعی روی محصولات می‌شود. سپس از لحاظ میزان تولید محصول، زمان اوج تولید و شرایط دخیل در تولید با سویه طبیعی مورد مقایسه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

سویه استاندارد مورد استفاده در این تحقیق *Yarrowia lipolytica* DSM3286 نام دارد که از کلکسیون DSMZ آلمان خریداری شده است. سویه جهش‌یافته مورد استفاده *Yarrowia lipolytica* U6 نام دارد که سویه جهش یافته حاصل از DSM3286 است که توسط درویشی و همکاران در سال ۲۰۱۱ با هدف افزایش تولید و ترشح لیپاز خارج سلولی، جهش داده شده است. این مخمر قادر است نسبت به سویه طبیعی تا ۱۰ برابر لیپاز بیشتری ترشح کند ( Darvishi et al., 2011).

### محیط‌های کشت مورد استفاده

**محیط کشت YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)**

محیط کشت YPD جامد به منظور رشد، ذخیره‌سازی و جداسازی تک کلنی‌های *Yarrowia lipolytica* مورد استفاده قرار گرفت. از محیط کشت YPD مایع نیز به عنوان محیط پیش‌کشت (مایه تلقیح) جهت آماده سازی سلول‌های مخمری برای ورود به محیط تبدیل زیستی استفاده شد. به منظور تهیه این محیط گلوکز، عصاره مخمر و پپتون به ترتیب با غلظت‌های ۲۰، ۱۰ و ۲۰ گرم در یک لیتر آب ترکیب شدند. جهت جامد سازی محیط به ازای هر لیتر از ترکیب ذکر شده، ۲۰ گرم آگار افزوده شد.

**محیط کشت تبدیل زیستی**

به منظور تولید گاما-دکالاکتون و تامین دیگر نیازهای زیستی سلول‌ها از محیط کشت تغییر یافته بر پایه YPD استفاده شد. بدین منظور عصاره مخمر و پپتون هر دو با غلظت ۹ گرم در یک لیتر آب ترکیب شدند، سپس مقادیر مختلفی از روغن کرچک با غلظت‌های ۵ الی ۵۰ میلی‌لیتر در لیتر به عنوان منبع کربن و پیش‌ماده تبدیل زیستی به محیط افزوده شد.

**آماده سازی محیط تولید محصول**

به منظور در اختیار داشتن سلول‌های مناسب و فعال جهت تولید گاما-دکالاکتون و یکنواخت بودن تعلیقه (سوسپانسیون) سلولی، از مایه تلقیح (پیش کشت) استفاده می‌شود. در این تحقیق YPD مایع به عنوان مایع تلقیح مورد استفاده قرار گرفت. به این صورت که از مخمرهای تازه رشد یافته در محیط جامد (در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت) یک لوپ برداشته شد و به ارلن صد میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر YPD مایع منتقل گردید. سپس ارلن به مدت ۱۸ ساعت در شیکرانکوباتور با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. در نهایت به منظور تولید محصول، ۱۰۰ میکرولیتر از مایه تلقیح به ارلن حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط تبدیل زیستی منتقل شد و در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد با ۲۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد.

**بررسی ریخت‌شناسی سلولی و مشاهده کلنی‌ها**

کلنی‌های تشکیل شده روی پلیت‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت به خوبی قابل رویت و به وسیله لوپ با بزرگنمایی ۱۵ برابر تصویر برداری شدند. به منظور بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها از میکروسکوپ نوری زمینه روشن استفاده شد. به کمک دوربین مخصوص تصویربرداری از میکروسکوپ، تصاویر نمونه‌ها تهیه شد.

**روش اندازه‌گیری رشد سلولی**

بدین منظور از روش شمارش مستقیم سلول‌ها استفاده شد. برای این‌کار از لام نئوبار استفاده شد. در این روش به صورت چشمی تعداد مخمرها در واحد مشخصی از حجم شمرده و سپس با اعمال ضریب (معادله ۱)، تعداد سلول در یک میلی‌لیتر تعیین شد. پس از قرار دادن لامل مخصوص بر روی لام، زیر میکروسکوپ نوری عمل شمارش انجام پذیرفت. در صورتی زیاد بودن تراکم سلولی، نمونه‌ها با ضریب مشخصی رقیق شدند (Mather & Roberts, 1998).

**معادله ۱**

$$\text{تعداد سلول در یک میلی‌لیتر} = \frac{\text{۱۰۰۰۰× ضریب رقت× تعداد سلول شمارش شده}}{\text{تعداد مربع شمارش شده}}$$

**تهیه منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف گاما-دکالاکتون**

به منظور تعیین غلظت گاما-دکالاکتون در نمونه‌های مجهول، باید از منحنی استاندارد این ماده استفاده کرد. برای رسم این منحنی، از گاما-دکالاکتون استاندارد (یعنی با درصد خلوص و غلظت مشخص) با بازه غلظت بین ۰/۲ تا ۲ گرم در لیتر سری رقت تهیه شد. سپس بر اساس پروتکل روش رنگ‌سنجی، نمونه‌ها آماده شدند و جذب نوری هر یک در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. سپس بر اساس نمودار حاصل از برازش سری رقت و جذب، رابطه ریاضی حاکم بین این دو عامل استخراج شد. سپس جذب نوری به دست آمده از نمونه‌های مجهول در رابطه حاصل قرار داده شد و غلظت آن‌ها تعیین گردید.

**سنجش تولید گاما-دکالاکتون**

به منظور سنجش مقدار تولید محصول از روش رنگ‌سنجی استفاده شد. این روش جدید که بر پایه واکنش فریک هیدروکسامات توسعه داده شده است، قادر است مقادیر گاما-دکالاکتون را به صورت کمی و سریع شناسایی کند. نمونه‌ها به مخلوطی از هیدروکسیل‌آمین هیدروکلراید ۰/۴ مولار و سدیم هیدروکسید ۲ مولار افزوده شدند و تحت حرارت ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند تا ترکیبات وارد واکنش شوند. سپس در دمای محیط، هیدروکلریک اسید ۱/۵ مولار افزوده شد. جهت رنگ آمیزی، فریک کلرید ۱/۲ مولار به محلول اضافه شده و با اتانول ۷۵ درصد رقیق شد. مقدار جذب نوری محلول حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-1800 Shimadzu) در طول موج ۵۱۰ نانومتر سنجش شد. (Zhao et al., 2014).

**محاسبه درصد بازیابی گاما-دکالاکتون از محیط کشت**

به منظور بررسی کارایی این روش در شناسایی مقادیر گاما-دکالاکتون موجود در محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق پس از تخمیر، ابتدا غلظت محصول تولید شده در سه نمونه



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]

محیط کشت سنجش شد. بدین منظور مقداری از محیط کشت سانترفیوژ شد (توسط دستگاه Eppendorf Mini spin plus). سپس مایع رویی حاصل، به عنوان نمونه برداشته شد. نمونه‌ها طبق مراحل گفته شده جهت رنگ‌سنجی آماده شدند. مقدار محصول تولیدی توسط اسپکتروفتومتر تعیین شد. سپس غلظت مشخصی از گاما-دکالاکتون استاندارد (یعنی با درصد خلوص و غلظت مشخص) به نمونه محیط کشت‌های ذکر شده افزوده شد. غلظت گاما-دکالاکتون پس از افزودن نمونه نیز طبق مراحل گفته شده در قبل اندازه‌گیری شد. در نهایت بر اساس معادله ۲ میزان بازیابی گاما-دکالاکتون محاسبه شد (Zhao et al., 2014).

**معادله ۲**

$$\text{GDL sample recovery}(\%) = \frac{w_a - w_s}{w_r} \times 100$$

در این معادله، $w_a$ غلظت گاما-دکالاکتون اندازه‌گیری شده پس از افزودن استاندارد به نمونه، $w_s$ غلظت گاما-دکالاکتون موجود در نمونه و $w_r$ غلظت گاما-دکالاکتون استاندارد افزوده شده به نمونه است.

**بررسی تاثیر زمان کشت و غلظت روغن کرچک بر میزان تولید گاما-دکالاکتون**

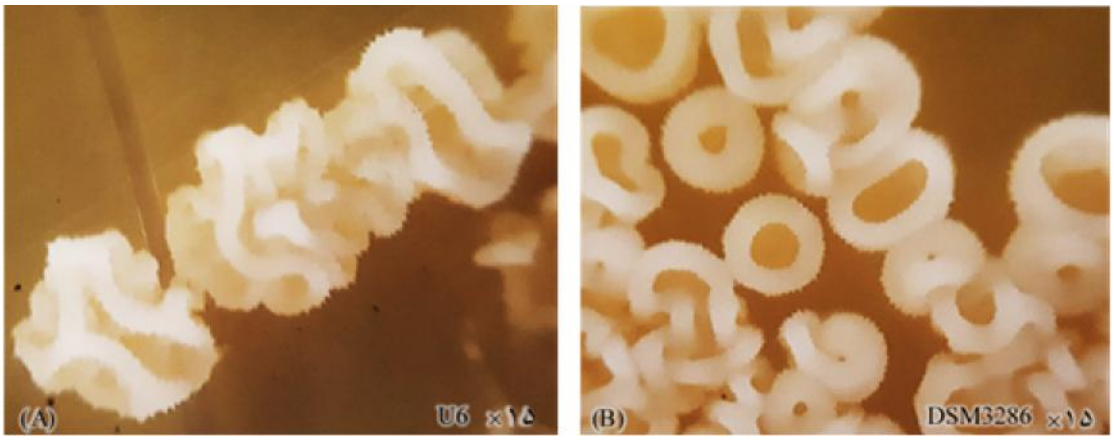
برای بررسی میزان تحمل سویه‌های مورد استفاده به غلظت روغن کرچک موجود در محیط، ۱۰ سری محیط کشت با غلظت‌های متفاوت روغن کرچک در بازه ۵ الی ۵۰ میلی‌لیتر در لیتر تهیه شد. سایر عوامل در این آزمایش بر اساس مقادیر بهینه گزارش شده در مقالات ثابت در نظر گرفته شدند. بر این اساس مقدار پپتون و عصاره مخمر برابر با ۹ گرم در لیتر، و pH محیط روی ۶ تنظیم شد (Moradi et al., 2016). سپس میزان رشد سلول‌ها و میزان تولید محصول در بازه‌های زمانی ۸ ساعته رصد شد.

داده‌های حاصل وارد نرم‌افزار DesignExpert11 شده و به کمک روش آماری تحلیل واریانس (ANOVA) مورد بررسی قرار گرفتند.

## نتایج

ابتدا به مشاهده و مقایسه کلنی‌های دو سویه مخمری رشد کرده در محیط جامد پرداخته شد. تفاوت ظاهری بین کلنی‌های سویه جهش‌یافته و طبیعی به وضوح قابل تشخیص است. سویه طبیعی دارای کلنی‌هایی فنجانی‌شکل و کنگره‌دار است ولی سویه جهش‌یافته کلنی‌هایی چروک خورده و گل‌مانند دارد (شکل ۱).

با مشاهده تصاویر میکروسکوپی سلول‌های رشد کرده در محیط YPD مایع، مشخص شد که سلول‌های طبیعی بیشتر به حالت هیفی دیده می‌شوند در حالی که سلول‌های سویه جهش‌یافته بسیار به ندرت تشکیل هیف داده و با مورفولوژی مخمری دیده می‌شوند (شکل ۲). در محیط حاوی روغن کرچک پس از گذشت ۸۴ ساعت از تلقیح، سلول‌های سویه طبیعی هیف‌های باریک‌تری پیدا کرده بودند و پس از سانتریفیوژ، مایع رویی به دلیل عدم ته‌نشین شدن کامل سلول‌ها به صورت کدر باقی می‌ماند. اما این حالت برای سویه جهش یافته مشاهده نشد و سلول‌های جهش یافته در طول مدت کشت اندازه بزرگ‌تری پیدا کرده بودند (شکل ۳). پس از گذشت ۸۰ ساعت از گرماگذاری، در هر دو سویه تعداد جوانه‌جانبی متصل به سلول مادر افزایش پیدا کرده است و این افزایش در سویه جهش‌یافته بیشتر قابل رویت است.

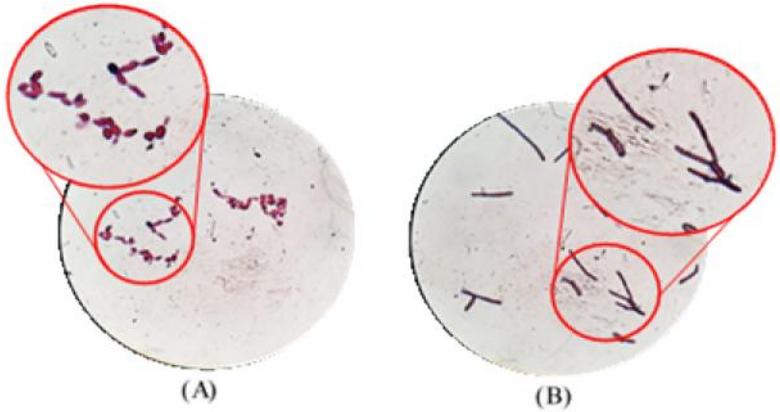



**شکل ۱**- مقایسه کلنی‌های مخمر *Yarrowia lipolytica* طبیعی DSM3286 با سویه جهش‌یافته U6. دو سویه بر روی یک پلیت در شرایط یکسان رشد یافته‌اند. **A**. سویه جهش یافته و **B**. سویه طبیعی را نشان می‌دهد.

**Figure 1.** Comparison of wild *Yarrowia lipolytica* yeast colonies DSM3286 with those of U6 mutant strain. The both strains are grown on the same plate under the same conditions. **A.** Mutant strain U6 and **B.** Wild type DSM3286.

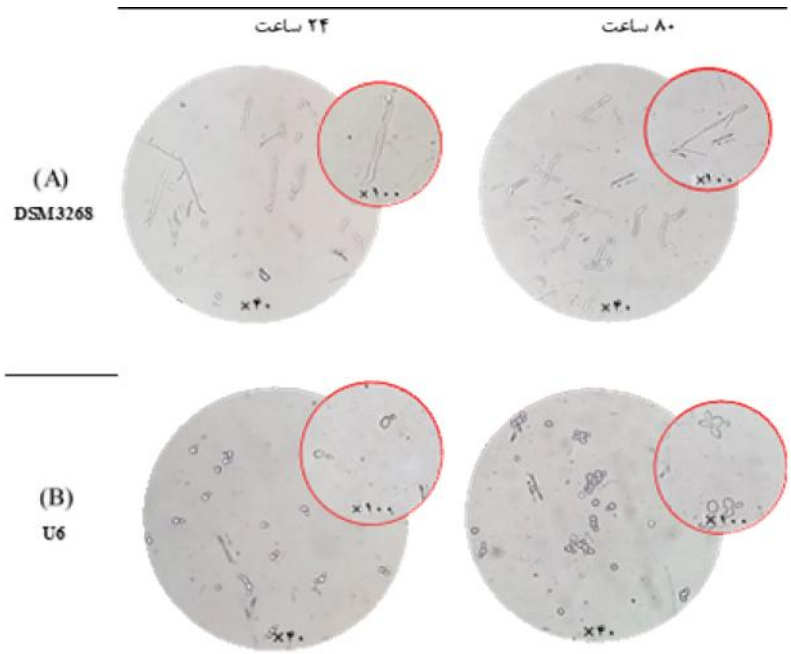


[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]




**شکل ۲**- تصاویر میکروسکوپی از لام مخمر *Yarrowia lipolytica* (عدسی ۱۰۰×). سلول‌ها به مدت ۱۸ ساعت در محیط YPD مایع رشد کرده‌اند (رنگ آمیزی شده با سافرانین). **A**. سویه جهش‌یافته U6 در حالت مخمری رشد کرده و **B**. سویه طبیعی DSM3286 در حالت هیفی رشد کرده است.

**Figure 2.** Microscopic images of the slide of *Yarrowia lipolytica* (100*x* lens). Cells were grown in liquid YPD medium (stained with safranin) for 18 h. **A.** The mutant strain U6 grew into yeast-like form. **B.** The wild strain DSM3286 grew into the hyphae-like form.




**شکل ۳**- مقایسه مورفولوژی سلول‌های مخمر *Yarrowia lipolytica* طبیعی DSM3286 و جهش یافته U6 رشد کرده درون محیط تبدیل‌زیستی، در ساعت‌های مختلف کشت. **A**. *Yarrowia lipolytica* طبیعی DSM3286. **B**. *Yarrowia lipolytica* جهش یافته U6.

**Figure 3.** Comparison of the morphology of wild *Yarrowia lipolytica* DSM3286 cells and U6 mutant yeast cells grown in the biotransformation medium, cultured for different hours (24h and 80h). **A.** Wild strain of *Yarrowia lipolytica* DSM3286. **B.** Mutant strain of *Yarrowia lipolytica* U6.

پس از تهیه سری رقت، نمونه‌برداری و رنگ‌سنجی از هر یک از غلظت‌ها صورت گرفت. تفاوت رنگ حاصل از غلظت‌های مختلف گاما-دکالاکتون با چشم غیر مسلح قابل تمییز دادن است. جذب نوری نمونه‌ها از طول موج ۷۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر به صورت پیوسته مورد سنجش قرار گرفت. بیشترین جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. نمودار استاندارد در این طول موج بر اساس مقادیر جذبی رسم شد. معادله حاصل از رگراسیون خطی به صورت $y = 0.0005x + 0.0389$ با مربع رگراسیون بالای ۰/۹۹ برقرار شد. در معادله حاصل از نمودار استاندارد، y میزان جذب نوری نمونه (OD) و x غلظت نمونه مورد آزمایش است. جهت بررسی میزان تولید محصول، میزان جذب نوری هر نمونه در فرمول حاصل از نمودار استاندارد قرار داده شد.



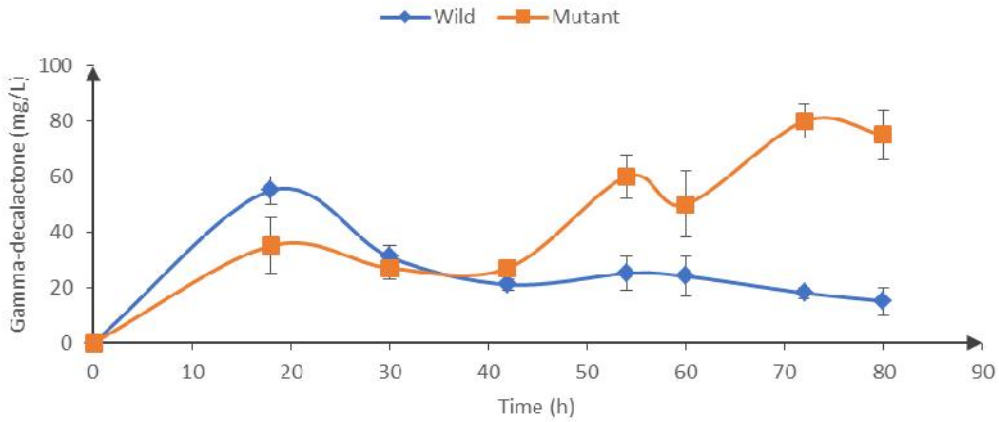
[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]

**جدول ۱**- درصد بازیابی گاما-دکالاکتون از نمونه‌های کشت میکروبی.

**Table 1.** Percentage of gamma-Decalactone recovery from microbial culture samples.

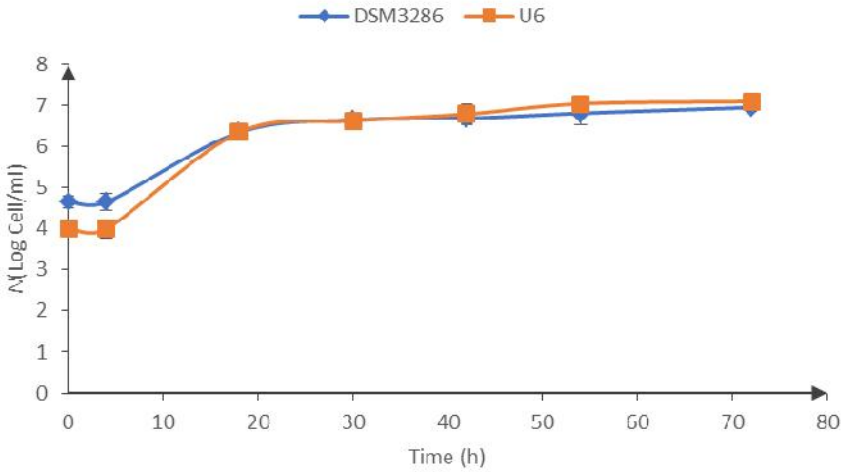
| Sample GDL* (g/L) | GDL added (g/L) | GDL recovered (g/L) | Mean recovery (%) |
|---|---|---|---|
| 0.063 | 0.05 | 0.11 | 94 |
| | 0.1 | 0.17 | 107 |
| | 0.2 | 0.25 | 93.5 |
| 0.11 | 0.05 | 0.16 | 100 |
| | 0.1 | 0.21 | 100 |
| | 0.2 | 0.32 | 105 |
| 0.058 | 0.05 | 0.11 | 104 |
| | 0.1 | 0.15 | 92 |
| | 0.2 | 0.25 | 96 |

*GDL: gamma-Decalactone




**شکل ۴**- نمودار تولید گاما-دکالاکتون توسط سویه طبیعی DSM3286 و جهش‌یافته U6 مخمر *Yarrowia lipolytica* در زمان‌های مختلف کشت. (لوزی آبی) سویه طبیعی DSM3286 *Yarrowia lipolytica*. (مربع نارنجی) سویه جهش‌یافته U6 *Yarrowia lipolytica*.

**Fig**ure **4.** Diagram of gamma-Decalactone production by wild strain DSM3286 (Blue rhombus) and U6 mutant of *Yarrowia lipolytica* (Orange Square) cultured for different times.




**شکل ۵**- منحنی رشد سلول‌های طبیعی DSM3286 و جهش‌یافته مخمر U6 *Yarrowia lipolytica* در محیط تبدیل زیستی. (لوزی آبی) سویه طبیعی DSM3286 *Yarrowia lipolytica*. (مربع نارنجی) سویه جهش‌یافته U6 *Yarrowia lipolytica*.

**Fig**ure **5**. Growth curve of wild DSM3286 (Blue rhombus) and mutant U6 strains (Orange Square) of *Yarrowia lipolytica* in biotransformation medium.



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]

به منظور مشخص شدن مقدار گاما-دکالاکتون واقعی نمونه‌ها و مقدار قابل سنجش به روش رنگ‌سنجی، ابتدا غلظت محصول تولید شده در نمونه‌های کشت شده سنجش شد. سپس به نمونه‌های کشت شده غلظت مشخصی از گاما-دکالاکتون استاندارد افزوده شد. در نهایت نمونه‌ها سانترفیوژ شده و طبق مراحل ذکر شده در بخش‌های قبل، اقدام به سنجش گاما-دکالاکتون در آن‌ها شد. این آزمایش با سه نمونه انجام شد و هر نمونه سه بار مورد سنجش قرار گرفت. میانگین داده‌های حاصل در جدول ۱ آورده شده است. درصد بازیابی با قرار دادن مقادیر حاصل در معادله ۲ به دست آمد. طبق جدول ۱ میانگین درصد بازیابی گاما-دکالاکتون از نمونه‌ها برابر ۹۹ درصد با انحراف معیار ۵/۵ است.

در ساعات ابتدایی، تولید محصول توسط سویه طبیعی DSM3286 بیشتر از سویه جهش‌یافته U6 بود ولی با گذشت ۴۰ ساعت از کشت، تولید محصول در سویه جهش‌یافته U6 شروع به افزایش کرد و پس از ۷۰ ساعت به اوج خود رسید. زمان اوج تولید برای سویه طبیعی DSM3286 حدود ۲۰ ساعت پس از گرماگذاری است و سپس مقدار گاما-دکالاکتون در محیط کشت شروع به کاهش می‌نماید ( شکل ۴).

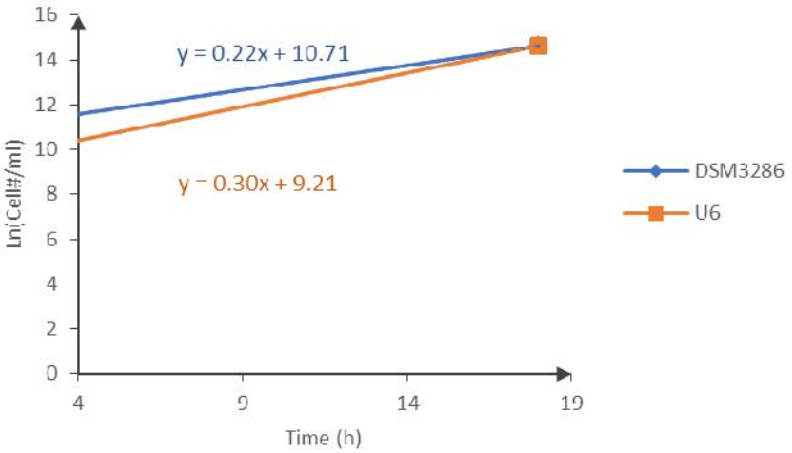
رشد سلولی بر اساس روش شمارش سلولی، در مدت ۷۲ ساعت پایش شد و نمودار رشد سلولی برای دو سویه رسم شد (شکل ۵). به منظور یافتن زمان دو برابر شدن تعداد سلول‌ها در محیط تبدیل زیستی، منحنی لگاریتم طبیعی مرحله لگاریتمی رشد رسم شد.

با محاسبه شیب خط نمودار حاصل، سرعت ویژه رشد به دست می‌آید. ضریب شیب خط به دست آمده نشان دهنده سرعت رشد ویژه مخمرها است. این ضریب برای سویه طبیعی و جهش‌یافته به ترتیب برابر با ۰/۲۲ و ۰/۳ است (شکل ۶).

نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت روغن کرچک بر میزان تولید گاما-دکالاکتون برای دو سویه طبیعی DSM3286 و جهش‌یافته U6 مخمر *Yarrowia lipolytica* به ترتیب در شکل‌های ۷ و ۸ آورده شده است.

با توجه به شکل ۷ در سویه طبیعی بیست ساعت پس از گرماگذاری، تولید گاما-دکالاکتون با افزایش مقدار روغن کرچک افزایش می‌یابد. با افزایش غلظت روغن از ۲۵ میلی‌لیتر در لیتر، تولید محصول با شیب بیشتری افزایش پیدا می‌کند ولی در بازه بین ۲۵ تا ۵۰ میلی‌لیتر در لیتر، مقدار محصول تولیدی با نوسان و به صورت اندک افزایش می‌یابد. طبق شکل ۸ نمودار تولید محصول برای سویه جهش یافته U6 در ساعات اولیه کشت، تولید کمتری نسبت به سویه طبیعی DSM3286 را نمایش می‌دهد. با افزایش غلظت روغن کرچک از ۲۵ میلی‌لیتر در لیتر مقدار محصول تولیدی با شیب بیشتری افزایش می‌یابد ولی برخلاف سویه طبیعی، در غلظت‌های بالای روغن، مقدار تولید محصول کاهش می‌یابد.

به منظور بررسی کفایت آماری داده‌های حاصل، و مشخص شدن بهینه‌ترین رابطه بین زمان کشت و غلظت روغن، داده‌ها توسط نرم‌افزار Design-Expert11 به روش ANOVA مورد تحلیل و بررسی قرار گرفتند (جدول ۲، ۳).

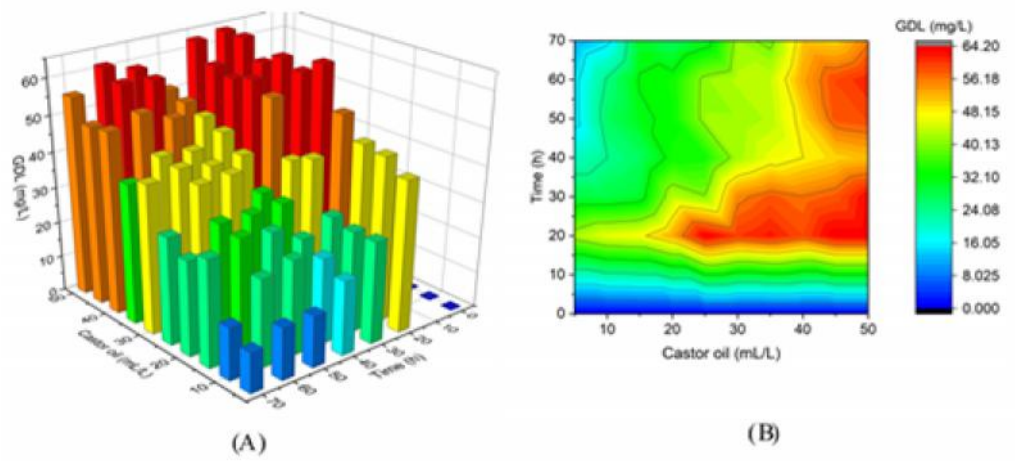



**شکل ۶**- نمودار لگاریتم طبیعی تعداد سلول در واحد حجم بر حسب زمان. بازه زمانی به کار برده شده بر اساس فاز لگاریتمی رشد در محیط تبدیل زیستی انتخاب شده است. (لوزی آبی) سویه طبیعی DSM3286 *Yarrowia lipolytica*. (مربع نارنجی) سویه جهش‌یافته U6 *Yarrowia lipolytica*.

**Figure 6.** Natural logarithm diagram of the number of cells per unit volume by time for wild DSM3286 (Blue rhombus) and mutant U6 strains (Orange Square) of *Yarrowia lipolytica*. The time interval used is selected based on the logarithmic phase of growth in the biotransformation environment.

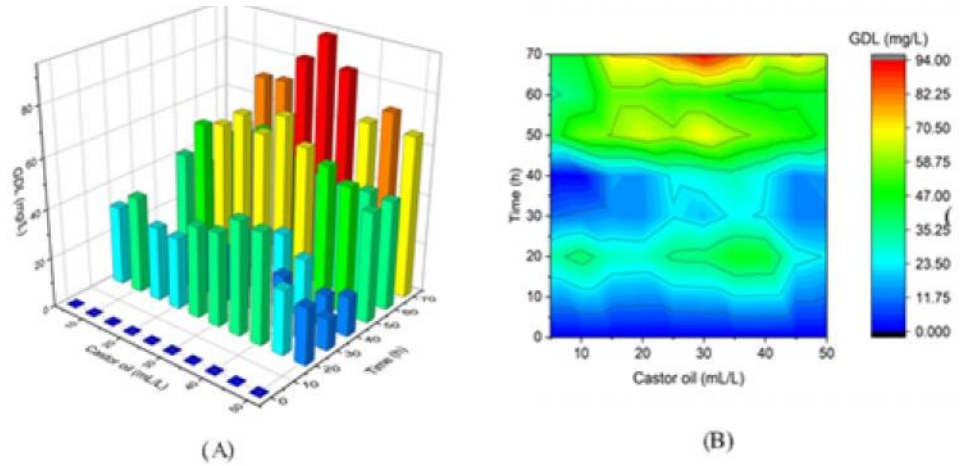


[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]




**شکل ۷**- نمودار سه‌محوری تاثیر غلظت روغن کرچک و زمان کشت بر تولید گاما-دکالاکتون در سویه طبیعی DSM3286 مخمر *Yarrowia lipolytica*. **A**. نمودار ستونی. **B**. نمای کانتور.

**Figure 7.** Three-axis diagram of the effect of castor oil concentration and culture time on gamma-Decalactone production in natural strain DSM3286 yeast *Yarrowia lipolytica*. **A.** Bar chart. **B.** Contour view.




**شکل ۸**- نمودار سه‌محوری تاثیر غلظت روغن کرچک و زمان کشت بر تولید گاما-دکالاکتون در سویه جهش یافته U6 مخمر *Yarrowia lipolytica*. نمودار ستونی. **B**. نمای کانتور.

**Figure 8.** Three-axis diagram of the effect of castor oil concentration and culture time on gamma-Decalactone production in the U6 mutant strain of *Yarrowia lipolytica*. **A.** Bar chart. **B.** Contour view.

**جدول ۲**- تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های حاصل از آزمایش بررسی اثر غلظت روغن کرچک و زمان کشت در سویه طبیعیDSM3286 مخمر *Yarrowia lipolytica* بر تولید محصول.

**Table 2.** Analysis of variance of experimental data Investigation of the effect of castor oil concentration and culture time in natural strain DSM3286 yeast *Yarrowia lipolytica* on the production yield.

| Factor | Sum of squares | Degree of Freedoms | Mean square | F-value | p-value | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Model** | 11355.25 | 14 | 811.09 | 44.84 | <0.0001 | Significant |
| **Castor oil** | 8451.77 | 9 | 939.09 | 51.91 | <0.0001 | |
| **Time** | 2903.48 | 5 | 580.70 | 32.10 | <0.0001 | |
| **Residue** | 814.06 | 45 | 18.09 | | | |
| **Sum** | 12169.32 | 59 | | | | |



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]

**جدول ۳**- تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های حاصل از آزمایش بررسی اثر غلظت روغن کرچک و زمان کشت در سویه جهش‌یافته U6 مخمر *Yarrowia lipolytica* بر تولید محصول.

**Table 3**. Analysis of variance of experimental data Investigation of the effect of castor oil concentration and culture time in U6 mutant strain *Yarrowia lipolytica* on the production yield.

| Factor | Sum of squares | Degree of Freedoms | Mean square | F-value | p-value | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Model** | 25876.52 | 14 | 1848.32 | 37.89 | <0.0001 | Significant |
| **Castor oil** | 2995.73 | 9 | 332.86 | 6.82 | <0.0001 | |
| **Time** | 22880.79 | 5 | 4576.16 | 93.82 | <0.0001 | |
| **Residue** | 2194.95 | 45 | 48.78 | | | |
| **Sum** | 28071.47 | 59 | | | | |

## بحث

در سلول‌های طبیعی، ریخت‌شناسی کلنی‌ها می‌تواند تحت تاثیر ژنتیک و شرایط محیطی از حالت صاف و براق تا زبر و مات تغییر یابد که در این مورد احتمالا به علت تغییرات ژنتیکی حاصل از جهش‌زایی با پرتو فرا بنفش، ریخت‌شناسی کلنی‌های سویه U6 تحت تاثیر قرار گرفته است (Darvishi, 2014).

طبق مطالعات صورت گرفته وجود منابع کربنی مانند گلوکز، سیترات و اسیدهای چرب در محیط کشت مخمر *Yarrowia lipolytica* موجب القای تشکیل هیف در این مخمر می‌شود (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002) که با نتایج حاصل از این پژوهش برای سویه طبیعی مطابقت دارد. اما سویه جهش یافته در هر دو محیط کشت روغنی و گلوکز دار، تشکیل هیف نداد.

محققان حین بررسی ریخت‌شناسی مخمر *Yarrowia lipolytica* با روش تجزیه و تحلیل کمی تصویر (Quantitative image analyses) متوجه شدند سلول‌هایی با حالت مخمری مانند، بیشتر از سلول‌های هیفی شکل، گاما-دکالاکتون تولید می‌کنند. آن‌ها به این منظور با تغییر شرایط محیطی (از قبیل در دسترس قرار دادن گلوکز) حالت هیفی را در سلول‌ها القا کرده و سپس به مقایسه تولید محصول با حالت مخمری شکل پرداختند که طبق نتایج حاصل، در ساعات ابتدایی، تولید محصول در سلول‌های هیفی کمی بیشتر بوده ولی پس از ۱۵۰ ساعت از کشت، تولید محصول در سلول‌های مخمری شکل حدود ۱/۵ برابر بیشتر از حالت هیفی شده بود (Braga et al., 2015). در پژوهش حاضر نیز تولید محصول در سویه جهش‌یافته مخمری شکل بیشتر از سویه طبیعی هیفی شکل است. همچنین زمان اوج تولید محصول در سویه جهش‌یافته مخمری شکل بیشتر از سویه طبیعی هیفی شکل است ( شکل ۴)، که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

محققان در پی بررسی نقش آنزیم‌های پراکسیداز پراکسی‌زومی (POX) بر متابولیسم چربی‌ها، متوجه شدند سویه‌های جهش یافته‌ای که ژن POX2 در آن‌ها غیرفعال شده و POX3 بیان مضاعف شده بود باریک‌تر دیده می‌شوند. در حالی که مخمرهای جهش یافته‌ای که ژن POX3 در آن‌ها غیرفعال شده و POX2 بیان مضاعف شده بود، بزرگ‌تر دیده می‌شدند. این تغییر ابعاد احتمالا به دلیل تجمع اجسام چربی رخ می‌دهد (Beopoulos et al., 2009). در پژوهش حاضر نیز سلول‌های جهش‌یافته پس از ۷۰ ساعت از گرماگذاری اندازه بزرگتری نسبت به سلول‌های طبیعی در زمان مشابه پیدا کردند که احتمالا نشانگر بیان کمتر ژن‌های POX3 نسبت به سایر اکسیدازها در سویه جهش‌یافته باشد.

محققان با حذف ژن‌های POX2 و POX3 در سویه W29 مخمر *Yarrowia lipolytica*، متوجه شدند که تولید محصول نسبت به سویه طبیعی در ساعات ابتدایی کشت کمتر بوده ولی پس از گذشت ۷۰ ساعت، بیش از دو برابر محصول بیشتری تولید شده است (Waché et al., 2001). این احتمال وجود دارد که در سویه U6 بر اثر جهش، ژن‌های POX نیز دچار جهش شده باشند. همچنین محققین با مقایسه تولید گاما-دکالاکتون توسط سلول‌های هیفی شکل و مخمری شکل *Yarrowia lipolytica* گزارش دادند که در حالت مخمری تولید محصول نسبت به حالت هیفی دیرتر به اوج خود می‌رسد ولی مقدار محصول تولیدی بیشتر است (Braga et al., 2015). افزایش عملکرد آنزیم POX2 و حذف آنزیم POX3 موجب افزایش تولید گاما-دکالاکتون و جلوگیری از تجزیه آن می‌شود (Beopoulos et al., 2009)، این موضوع می‌تواند با تولید محصول بیشتر توسط سویه جهش‌یافته نسبت به سویه طبیعی در پژوهش حاضر تا حدودی تایید شود.

پس از گذشت ۸۰ ساعت از گرماگذاری، در هر دو سویه تعداد جوانه‌جانبی متصل به سلول مادر افزایش پیدا کرده است و این افزایش در سویه جهش‌یافته بیشتر قابل رویت است. وجود مقادیر بالای اسید ریسینولئیک (ماده اصلی تشکیل دهنده روغن کرچک) در محیط کشت مخمرها موجب رشد قطبی جوانه‌ها و توقف چرخه سلولی در فاز G2 می‌شود. این اثر بازدارندگی



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]

احتمالا به دلیل تاثیر این ماده بر روی سیگنال‌های کلسیمی رخ می‌دهد زیرا اسید ریسینولئیک موجب فعال شدن اجباری این سیگنال‌ها می‌شود (Attrapadung et al., 2009). تحت تاثیر لیپاز خارج سلولی مخمر *Yarrowia lipolytica* بر روی روغن کرچک، اسید ریسینولئیک که بالای ۹۰ درصد این روغن را تشکیل داده است در محیط آزاد می‌شود. بنابراین هرچه از زمان کشت بیشتر بگذرد و لیپاز بیشتری در محیط آزاد شود اسید ریسینولئیک بیشتری در محیط انباشته شده و اثرات این ماده بر سلول‌ها بیشتر دیده می‌شود. این موضوع می‌تواند علت تغییرات جوانه‌زایی در پژوهش حاضر، پس از ۸۰ ساعت گرماگذاری را مشخص نماید.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، میانگین درصدهای بازیابی گاما-دکالاکتون از محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق، بالای ۹۹ درصد است که نشانگر قابل قبول بودن نتایج حاصل از این روش است. برای این روش در پژوهش‌های پیشین، ۹۸ درصد بازیابی گزارش شده است (Zhao et al., 2014).

نمودار حاصل برای تولید محصول توسط سویه طبیعی DSM3286 مخمر *Yarrowia lipolytica* با نتایج حاصل از پژوهش‌های پیشین برای همین سویه که در شرایط بیوراکتور سنجیده شده است و مطالعات صورت گرفته بر روی سویه W29 مطابقت و شباهت دارد (Moradi et al., 2016; Waché et al., 2001). با این حال در مطالعه دیگری ۱۵۰ ساعت پس از کشت، به عنوان زمان بیشینه تولید سویه W29 مخمر *Yarrowia lipolytica* گزارش شده است (Braga et al., 2012).

در محیط حاوی روغن کرچک، سویه جهش‌یافته سرعت رشد بیشتری نسبت به سویه طبیعی داشت. بیشتر بودن سرعت رشد سویه جهش‌یافته نسبت به سویه طبیعی ممکن است به علت عدم تشکیل هیف در سویه جهش‌یافته رخ داده باشد. تغییر در سرعت رشد ارگانیسم‌ها می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد. به عنوان مثال افزایش عملکرد پمپ پروتونی غشا در مخمر *Yarrowia lipolytica* می‌تواند عامل محدود کننده رشد این مخمر باشد (Portillo & Serrano, 1989).

در پژوهشی به منظور بررسی مقدار روغن کرچک بهینه برای تولید گاما-دکالاکتون در سویه CCMA0242 مخمر *Yarrowia lipolytica*، غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۳۰ درصد از روغن کرچک را مورد بررسی قرار دادند که غلظت بهینه روغن برای تولید محصول را برابر با ۳۰ درصد محیط کشت گزارش کردند که معادل ۳۰۰ میلی‌لیتر در لیتر روغن کرچک است (de Andrade et al., 2017). همچنین در تحقیقی که بر روی مخمر *Yarrowia lipolytica* صورت گرفته، مشخص شده است بین غلظت روغن کرچک و تولید گاما-دکالاکتون رابطه مستقیم وجود دارد به طوری که با افزایش مقدار غلظت روغن در محیط، تولید محصول نیز افزایش می‌یابد. این تیم مقدار ۶۰ گرم در لیتر روغن کرچک را به عنوان غلظت بهینه گزارش دادند (Braga & Belo, 2015). پیش‌تر با استفاده از روش تاگوچی به بهینه‌سازی مقدار تولید گاما-دکالاکتون اقدام شده است که نتایج حاصل نشانگر افزایش تولید محصول با افزایش مقدار غلظت روغن در محیط است. در مطالعه مذبور به بررسی اثر مقادیر بیشتر روغن کرچک در محیط کشت نیز پرداخته شده است که با افزایش روغن از ۳۰ الی ۴۰ میلی‌گرم در لیتر، تولید محصول کاهش یافته است (Moradi et al., 2016). در این تحقیق نیز در بازه اشاره شده نوسان تولید مشاهده شد و در غلظت ۲۵ میلی‌لیتر روغن در یک لیتر محیط کشت، افزایش تولید نسبت به نقاط هم‌جوار مشاهده می‌شود که با نتایج مطالعه مذبور مطابقت دارد.

در تحقیقی گاما-دکالاکتون را به عنوان سوبسترا در اختیار مخمر *Yarrowia lipolytica* قرار دادند و مشاهده کردند که این سلول‌ها قادر به مصرف این ماده به عنوان منبع کربن هستند (Aguedo et al., 2003). در نتایج به‌دست آمده مشاهده شد که مصرف (تجزیه) گاما-دکالاکتون در ساعات بعدی گرماگذاری، با افزایش روغن کاهش یافت، احتمالا این پدیده به علت خاصیت حفاظتی روغن از گاما-دکالاکتون رخ داده است. تحقیقات نشان داده‌اند که محیط دوفازی (آب و روغن) موجب کاهش اثر سمی لاکتون‌ها بر روی سلول‌ها و همچنین کاهش مصرف لاکتون به وسیله سلول می‌گردد. در واقع به نظر می‌رسد، لاکتون در فاز روغنی مخلوط شده و از دسترس سلول خارج می‌شود (Ta et al., 2010).

نمودار تولید محصول برای سویه جهش یافته U6 در ساعات اولیه کشت، تولید کمتری نسبت به سویه طبیعی DSM3286 را نمایش دادبا افزایش غلظت روغن کرچک از ۲۵ میلی‌لیتر در لیتر مقدار محصول تولیدی با شیب بیشتری افزایش یافت ولی برخلاف سویه طبیعی، در غلظت‌های بالای روغن، مقدار تولید محصول کاهش یافت. این موضوع می‌تواند با توجه به تولید بالای لیپاز توسط این سویه توجیه شود. مقدار تولید لیپاز در این سویه بیشتر از توانایی مصرف خود است، وجود سوبسترای بیشتر (روغن کرچک) در محیط موجب افزایش فعالیت این آنزیم شده که در نتیجه اسید ریسینولئیک بیشتری در محیط تولید شده است. اسیدهای چرب (مانند اسید ریسینولئیک) می‌توانند خاصیت بازدارندگی رشد بر روی سلول‌های مخمری داشته باشند (Lee et al., 1998).

نمودار تولید محصول در سویه جهش‌یافته U6 با گذشت زمان کشت، دچار افزایش و کاهش شده و حالتی شبیه به نمودارهای کشت خوراک‌دهی شونده پیدا کرده است. احتمالا سلول‌ها پس از



[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]

آن‌که لاکتون تولیدی به آستانه تحمل نزدیک می‌شود، با فعال‌سازی مسیر بیان ژن‌های تجزیه کننده اسیدهای چرب کوتاه زنجیر اقدام به تجزیه و مصرف آن می‌کنند. پس از کاهش مقدار لاکتون، مجدد سوبسترای خود را به اسید ریسینولئیک تغییر می‌دهند. ولی این موضوع نمی‌تواند توجیه کاملی برای پدیده رخ داده باشد چون لاکتون به صورت پلکانی در حال افزایش در محیط است. این احتمال وجود دارد که سلول‌های این سویه مخمری قادر هستند در شرایطی، تا حدودی خود را با سمیت لاکتون تطبیق دهند. در حقیقت توانایی سازگاری غشاهای میکروبی نکته بسیار مهمی است، به عنوان نمونه بعضی از مقالات سازگاری میکروارگانیسم‌ها با ترکیبات معطر را مورد بررسی قرار داده‌اند (Robichon & Dugail, 2007; Thati et al., 2007). این موضوع می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات آینده در زمینه تکامل تطبیقی آزمایشگاهی (Adoptive Laboratory Evolution) این سویه با هدف بهینه سازی تولید لاکتون‌ها باشد.

نتایج حاصل از تحلیل ANOVA نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تاثیر دو عامل مورد آزمایش است. با توجه به مقادیر F برای عامل‌های مورد آزمایش، در سویه طبیعی DSM3286 مخمر *Yarrowia lipolytica* تاثیر غلظت روغن کرچک بر تولید محصول بیشتر از زمان کشت است و در سویه جهش‌یافته U6 مقدار F برای عامل روغن کرچک بیشتر است.

## نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، سلول‌هایی با مورفولوژی مخمری بیش از سلول‌های هیفی شکل گاما-دکالاکتون تولید می‌کنند. با توجه به نتایج حاصل، مقدار ۵۰ میلی لیتر در لیتر روغن و ۲۰ ساعت گرماگذاری، مناسب‌ترین حالت برای تولید محصول توسط سویه طبیعی است. در سویه جهش‌یافته ۳۰ میلی‌لیتر در لیتر روغن و ۷۲ ساعت گرماگذاری برای تولید محصول، مناسب تشخیص داده شد. سویه جهش یافته نسبت به سویه طبیعی محصول بیشتری تولید می‌کند که در نتیجه سویه جهش‌یافته U6 مخمر *Yarrowia lipolytica* به منظور تولید گاما-دکالاکتون مناسب‌تر تشخیص داده شد.

## سپاسگزاری

از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه مراغه و دانشگاه الزهرا سپاسگزاریم.

## REFERENCES

**Aguedo, M., Beney, L., Waché, Y. & Belin, J.M.** 2003. Mechanisms underlying the toxicity of lactone aroma compounds towards the producing yeast cells. Journal of Applied Microbiology 94: 258-265.

**Arctander, S.** 1969. Perfume and flavor chemicals: Aroma chemicals (Vol. 2). Allured Publishing Corporation, Carol Stream. pp:31-170.

**Attrapadung, S., Yoshida, J., Kimura, K.i., Mizunuma, M., Miyakawa, T. & Thanomsub, B.W.** 2009. Identification of ricinoleic acid as an inhibitor of Ca2+ signal-mediated cell-cycle regulation in budding yeast. FEMS Yeast Research 10: 38-43.

**Beopoulos, A., Chardot, T. & Nicaud, J.M.** 2009. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. Biochimie 91: 692-696.

**Berger, R. G.** 2007. Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability. Springer Science & Business Media, Berlin. pp: 1-86.

**Braga, A. & Belo, I.** 2015. Production of γ-decalactone by *Yarrowia lipolytica*: insights into experimental conditions and operating mode optimization. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 90: 559-565.

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

**Braga, A., Gomes, N. & Belo, I**. 2012. Lipase induction in *Yarrowia lipolytica* for castor oil hydrolysis and its effect on γ-decalactone production. Journal of the American Oil Chemists' Society 89: 1041-1047.

**Braga, A., Mesquita, D., Amaral, A., Ferreira, E. & Belo, I.** 2015. Quantitative image analysis as a tool for *Yarrowia lipolytica* dimorphic growth evaluation in different culture media. Journal of Biotechnology 217: 22-30.

**Braga, A. C.** 2014. Strategies for increasing aroma production from castor oil by *Yarrowia lipolytica*. Doctoral dissertation, University of Minho. Portugal.

**Darvishi, F.** 2014. Biotechnological applications of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Springer, New York, 77 pp.

**Darvishi, F., Ariana, M., Marella, E. R. & Borodina, I.** 2018. Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals. Applied microbiology and biotechnology 102: 5925-5938.

**Darvishi, F. & Chen, H**. 2018. Microbial Biotechnology*:* Progress and Trends. CRC Press, Florida, 380 pp.

**Darvishi, F., Destain, J., Nahvi, I., Thonart, P. & Zarkesh-Esfahani, H.** 2011. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. New Biotechnology 28: 756-760.

**Darvishi, F., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H. & Momenbeik, F.** 2009. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. BioMed Research International 2009: 1041-1047.

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]
[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]
[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]

**de Andrade, D. P., Ferreira Carvalho, B., Freitas Schwan, R. & Ribeiro Dias, D.** 2017. Production of γ-Decalactone by Yeast Strains under Different Conditions. Food Technology and Biotechnology 55: 225-230.

**Farbood, M., & Willis, B.** 1985. Production of gamma-decalactone (U.S. Patent No. 4, 560, 656). **Gatfield, I. L.** 1988. Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. Food Technology 42: 169.

**Kawasse, F.M., Amaral, P.F., Rocha-Leão, M.H. M., Amaral, A., Ferreira, E. & Coelho, M.** 2003. Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. Bioprocess and Biosystems Engineering 25: 371-375.

**Lee, S.-L., Cheng, H.-Y., Chen, W.C. & Chou, C.C.** 1998. Production of γ-decalactone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. Process Biochemistry 33: 453-459.

**Liese, A., Seelbach, K. & Wandrey, C.** 2006. Industrial biotransformations. John Wiley & Sons, New Jersey, 570pp.

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

**Maga, J. A. & Katz, I.** 1976. Lactones in foods. Critical Reviews in Food Science & Nutrition 8: 1-56.

**Malajowicz, J., Nowak, D., Fabiszewska, A. & Iuliano, A.** 2020. Comparison of gamma-decalactone biosynthesis by yeast *Yarrowia lipolytica* MTLY40-2p and W29 in batch-cultures. Biotechnology & Biotechnological Equipment 34: 330-340.

**Marsafari, M., Samizadeh, H., Rabiei1, B., Ashraf Mehrabi, A., Lv, Y. & Xu, P.** 2020. The optimization of Naringenin biosynthesis pathway using *Yarrowia lipolytica* cell culture. Nova Biologica Reperta 7: 133-144. (In Persian).

**Mather, J. P. & Roberts, P. E.** 1998. Introduction to cell and tissue culture: theory and technique (1 ed.). Springer Science & Business Media, Berlin, 250 pp.

**Moradi, H. Asadollahi, M. A., & Nahvi, I.** 2016. Optimaztion of gamma-decalactone production by yeast *Yarrowia lipolytica* using the taguchi method. Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences 6: 684-689.

**Okui, S., Uchiyama, M., Mizugaki, M. & Sugawara, A.** 1963. Intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by *Candida genus*. Biochimica et Biophysica Acta 70: 346-348.

**Portillo, F. & Serrano, R.** 1989. Growth control strength and active site of yeast plasma membrane ATPase studied by site-directed mutagenesis. European Journal of Biochemistry 186: 501-507.

**Robichon, C. & Dugail, I.** 2007. De novo cholesterol synthesis at the crossroads of adaptive response to extracellular stress through SREBP. Biochimie 89: 260-264.

**Ruiz-Herrera, J. & Sentandreu, R.** 2002. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. Archives of Microbiology 178: 477–483.

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

**Ta, T. M. N., Cao-Hoang, L., Phan-Thi, H., Tran, H. D., Souffou, N., Gresti, J., Marechal, P.A., Cavin, J.F. & Waché, Y.** 2010. New insights into the effect of medium-chain-length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium. Applied microbiology and biotechnology 87: 1089-1099.

**Thati, B., Noble, A., Rowan, R., Creaven, B.S., Walsh, M., McCann, M., Egan, D. & Kavanagh, K.** 2007. Mechanism of action of coumarin and silver (I)–coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. Toxicology in Vitro 21: 801-808.

**Vandamme, E. J.** 2003. Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes. Fungal Diversity 13: 153-166.

**Waché, Y., Aguedo, M., Choquet, A., Gatfield, I.L., Nicaud, J.-M. & Belin, J.M.** 2001. Role of β-oxidation enzymes in γ-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology 67: 5700-5704.

**Zeng, W., Du, G., Chen, J., Li, J. & Zhou, J.** 2015. A high-throughput screening procedure for enhancing α-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* by random mutagenesis. Process Biochemistry 50: 1516-1522.

**Zhao, Y., Mu, X., Nie, Y. & Xu, Y.** 2014. 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 23: 1935-1940.

*****

**How to cite this article:**

**Darvishi, F. & Kheirollahi Meidani, A.** 2021. Comparison of gamma-decalactone production in wild-type and mutant strains of *Yarrowia lipolytica*. Nova Biologica Reperta 8: 183-194. (In Persian).

**درویشی، ف. و خیراللهی میدانی، آ.** ۱۴۰۰. مقایسه تولید گاما-دکالاکتون در سویه طبیعی و جهش یافته مخمر *Yarrowia lipolytica*. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۱۹۴-۱۸۳.

[ Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07 ]

[ DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.3.3.6 ]

[ DOI: 10.52547/nbr.8.3.183 ]