مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان 1391، دوره چهارم، شماره سیزدهم، صفحه 44-37

تبدیل زیستی هیدرولیز چمن به روغن تک یاخته و بیودیزل با استفاده از *رودوتورولا موسیلاژینوزا*

مرجان انشاییه[1]، آزاده عبدلی[1]، ایرج نحوی[2]، محبوبه مدنی[3]

1- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی،گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
2- استاد بیوتکنولوژی، دانشکده علوم،گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
3- استادیار قارچ شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

نویسنده مسؤول: مرجان انشاییه. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان. m_enshaeieh@yahoo.com

دریافت: 91/4/14 پذیرش: 91/6/18

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به رشد روزافزون تقاضا برای منابع روغنی قابل تبدیل به بیودیزل، تلاش های زیادی در زمینه یافتن منابع روغنی میکروبی انجام پذیرفته است. این روغن ها مشابه روغن های گیاهی بوده و در صورت استفاده از سوبسترای ارزان قیمت، از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه هستند. امروزه توجه زیادی به استفاده از ضایعات کشاورزی به عنوان سوبسترای تولید روغن میکروبی شده است. در این بین ضایعات زیست محیطی نظیر چمن به دست آمده از فضاهای سبز، قابلیت تبدیل به مواد با ارزش از نظر اقتصادی را دارد.

روش بررسی: در این پژوهش با استفاده از یکی از روش های طراحی آزمایش ها تحت عنوان روش تاگوچی به بهینه سازی پارامترهای مرتبط با استفاده از چمن به عنوان سوبسترا پرداخته شد تا بیشترین میزان تولید لیپید به دست آید. بررسی لیپید تولید شده با کمک روش کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده ای (GC-MS) صورت گرفت.

یافته ها: پس از بهینه سازی شرایط تخمیر و هیدرولیز اسیدی سوبسترا بیشترین میزان تولید لیپید و محتوای لیپیدی معادل 6/8 g/L ، 55% (درصد لیپید به بیومس مخمری) به دست آمد و بازده تولید بیودیزل نسبت به سوبسترای مصرف شده معادل 79% بود. بیشترین اسیدهای چرب تولید شده شامل پالمیتیک اسید و اولئیک اسید به میزان 18/51% و 67/29 % بودند.

نتیجه‌گیری: از یافته های حاصل از این پژوهش می توان دریافت که با استفاده از مخمرهای مولد چربی می توان ضایعات زیست محیطی را به مواد با ارزش تبدیل کرد. همچنین ترکیب به دست آمده از روغن استخراج شده قابلیت تبدیل آن به بیودیزل را نشان می دهد.

واژه‌های کلیدی: بیودیزل، روغن میکروبی، ضایعات محیطی

www.SID.ir

مقدمه

اثرات منفی سوخت های فسیلی بر جوامع انسانی منجر به توجه بیشتر به سمت تولید بیودیزل شده است. در روش قدیمی استفاده از روغن های گیاهی برای تولید بیودیزل وجود دارد اما هزینه زیاد آن ها باعث جلب توجه به منابع جایگزین، نظیر روغن های میکروبی شده است(۱،۲). تشابه ساختاری روغن های میکروبی به روغن های گیاهی باعث اهمیت آن ها به عنوان منابع لیپیدی جایگزین گردیده است(3). تبدیل ضایعات کشاورزی و صنعتی به روغن میکروبی به عنوان بهترین راه جهت کاهش هزینه های مربوط به تولید روغن تک یاخته (SCO Single Cell Oil) مطرح شده است. بسیاری از مخمرهای مولد چربی توانایی تجمع لیپید به میزان بیش از 20% بیومس خود را دارند(6-4). محدودیت نیتروژن در محیط رشد به عنوان اصلی ترین عامل تجمع لیپید در مخمرهای مولد چربی محسوب می شود. بیودیزل یک سوخت قابل تجزیه، قابل تجدید و غیر سمی است که میزان بسیار کمتری دی اکسید کربن به اتمسفر آزاد کرده و سولفور خالص را نیز به اتمسفر آزاد نمی کند. در این بین هزینه زیاد سوبسترای مربوط به تولید سوخت زیستی تنها مانع برای تجاری شدن آن می باشد(1). استفاده از روغن های گیاهی و حیوانی و یا روغن های ضایعاتی نیز پاسخگوی نیاز تولید بیودیزل نیست (9-7). بنابراین استفاده از ضایعات کشاورزی و صنعتی برای تولید روغن میکروبی بسیار حائز اهمیت است(۱۰،۱۱). مواد لیگنوسلولزی نظیر سبوس برنج و پوشال برنج و ذرت تا کنون برای تولید روغن میکروبی مورد استفاده قرار گرفته اند (14-12).

البته طی هیدرولیز اسیدی مواد ممانعت کننده ای نظیر اسیدهای ارگانیک، آلدئیدها و الکل ها در محیط کشت به وجود می آیند(15-17). یافتن راهی برای خنثی کردن این ممانعت کننده ها و یا یافتن میکروارگانیسم های مقاوم به آن ها از نظر اقتصادی بسیار ارزشمند است. ترکیبات لیگنوسلولزی دارای قندهایی هستند که به سلولز و همی سلولز پلیمریزه شده است و به واسطه هیدرولیز قابل رها شدن و تبدیل زیستی آن ها به روغن میکروبی و نهایتاً بیودیزل می باشند. با توجه به وجود زایلوز و گلوکز در سوبسترای هیدرولیز شده حاصله، میکروارگانیسم هایی که توانایی استفاده از زایلوز را دارند از لحاظ اقتصادی بسیار با اهمیت هستند (۱۸،۱۹). در این پژوهش از چمن هیدرولیز شده به عنوان سوبسترا برای تولید بیودیزل استفاده شد. هدف از این کار بررسی امکان تبدیل ضایعات زیست محیطی به موادی با ارزشی همچون بیودیزل بود. علاوه بر آن استفاده از طراحی تاگوچی به جای روش تک فاکتوره به عنوان نقطه ی عطفی در بهینه سازی های بیولوژیکی بوده که نتایج قابل اطمینان تری را برای محقق فراهم می آورد؛ برای این منظور در این پژوهش از روش تاگوچی در دو مرحله استفاده گردید. پس از آن تبدیل لیپید میکروبی به بیودیزل صورت پذیرفت.

روش بررسی

سویه مخمری مورد استفاده و روش کشت: در این تحقیق از سویه مخمری بومی *رودوتورولا موسیلاژینوزا* که از محیط طبیعت جداسازی و شناسایی شده بود، استفاده شد. در ابتدا این سویه مخمری در محیط فعالسازی حاوی 30 g/L گلوکز، NH_4Cl 1/5 g/L، KH_2PO_4 7 g/L، NaH_2PO_4 5g/L، $MgSO_4.7H_2O$ 1/5 g/L، $FeCl_3$ 0/08 g/L به مدت 48 ساعت در دمای 28°C و 180 rpm کشت داه شد. پس از آن به محیط دارای محدودیت نیتروژن که دارای عصاره چمن هیدرولیز شده به عنوان منبع کربن و میزان 1g/l عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن بود، منتقل گردید. هیدرولیز چمن در حالت های مختلف انجام شده بود و حالت بهینه برای هیدرولیز و رسیدن به بیشترین میزان تولید لیپید با استفاده از روش آماری تاگوچی به دست آمد. از آن جایی که بین میزان تولید لیپید و میزان قند آزاد شده در محیط رابطه ای مستقیم وجود دارد و هدف ما به دست آوردن بیشترین میزان تولید لیپید است، لیپید تولید شده معیاری است که توسط آن حالت بهینه تعیین می گردد. پس از آن بهترین شرایط بهینه برای به دست آوردن بیشترین میزان تولید لیپید بررسی شد(۶،۱۸).

هیدرولیز چمن با استفاده از سولفوریک اسید : در ابتدا چمن خشک و الک شده (از الک های متداول و معمول می توان استفاده کرد، در این قسمت هدف تنها حذف تکه های بزرگ است و سایز الک اهمیت چندانی ندارد) و سپس از سولفوریک اسید 4 مولار رقیق شده تا میزان 5% با نسبت وزنی 1 به 10 برای مدت 8 ساعت جهت هیدرولیز آن استفاده شد. سپس اتوکلاو در فشار 1 بار و در هر مرتبه دمای مورد بررسی که شامل ۱۱۵،۱۲۵ و135 درجه سانتی گراد بود، انجام گرفت.

www.SID.ir
Archive of SID

پس از آن برای بر طرف کردن توده هیدرولیز نشده سانتریفوژ به مدت 10 دقیقه در 6000rpm انجام گرفت.

توکسین زدایی از عصاره هیدرولیز شده چمن: طی هیدرولیز چمن در بین مواد حاصل از تجزیه ترکیباتی وجود دارد که حالت نسبتاً سمی داشته و مانع از رشد مخمر بر روی آن می شوند. برای کاهش غلظت این ممانعت کننده های موجود در عصاره هیدرولیز شده، خنثی سازی با کمک $Ca(OH)_2$ صورت پذیرفت. $Ca(OH)_2$ به صورت آرام آرام به عصاره هیدرولیز شده اضافه شد تا pH محیط به 7 برسد این ماده با ممانعت کننده های موجود در محیط واکنش داده و آن ها را جدا می کند. میزان $Ca(OH)_2$ مورد استفاده حدود 0/5 گرم بر لیتر می باشد. البته از سود نیز می توان استفاده کرد ولی در مقاله رفرنس مورد نظر از $Ca(OH)_2$ استفاده شده بود. به همین دلیل $Ca(OH)_2$ انتخاب گردید. پس از آن با فسفریک اسید pH محیط بر روی 5.5 تنظیم شد. پس از آن زغال فعال (10% w/v) به هیدرولیزات اضافه شده و در 30°C و 200 rpm برای 1 ساعت قرار داده شد. سپس سوبسترای هیدرولیز شده با کاغذ وات من NO.1 فیلتر شده تا ذرات رسوب کرده، جدا شوند. در نهایت سوبسترای هیدرولیز شده در 110°C برای 15 دقیقه اتوکلاو شد تا استریل گردد(20).

تعیین میزان تولید لیپید: برای تعیین در صد تولید لیپید از فرمول زیر استفاده شد.

$$\text{در صد تولید لیپید} = \frac{\text{وزن روغن تولید شده}}{\text{وزن خشک بیومس}} \times 100$$

برای اندازه گیری روغن تولید شده، باید روغن استخراج شده را توزین نمود. البته باید توجه داشت که چنانچه میزان روغن استخراج شده در مورد نمونه ای با حجم 50 میلی لیتر بوده، آن را با استفاده از تناسب در 1 لیتر به دست آورد. برای بیومس خشک نیز میزان 5 میلی لیتر از محیط تولید را برداشته و در 5000rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ نموده و پس از آن به مدت 24 ساعت در دمای 60 درجه سانتی گراد قرار گرفت. از اختلاف وزن لوله آزمایش ثانویه و اولیه بیومس خشک در 5 میلی لیتر به دست آمد که با کمک تناسب میزان آن در 1 لیتر محاسبه شد.

استخراج لیپید تولید شده: جهت استخراج از روش Bligh & Dyer استفاده شد. برای این منظور 50 ml از نمونه محیط تولید در 5000 rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آن بیومس به دست آمده، دو مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. سپس به میزان 10 ml HCl 4 مولار به نمونه مورد نظر اضافه کرده و به مدت 2 ساعت در دمای 60 °C قرار داده شد. سپس به توده ی هیدرولیز شده با اسید، به میزان 20ml متانول- کلروفرم (1:1) اضافه کرده و به مدت 2 الی 3 ساعت در شیکر قرار گرفت. پس از آن با سانتریفوژ فاز آبی بالایی و آلی پایینی جدا گردید. فاز آلی پایینی را با کمک پیپت پاستور جدا کرده و در خلا با دستگاه دسیکاتور خشک گردید. حلال مورد نظر به علت فرار بودن کاملاً خارج می شود ضمن اینکه در GC-MS نیز هیچ اثری از وجود آن مشاهده نشد. وزن خشک به دست آمده میزان لیپید تولید شده را نشان می دهد(3).

تولید بیودیزل: ترانس استریفیکاسیون در فلاسک حاوی سولفوریک اسید به عنوان کاتالیزور با نسبت مولی 30:1 متانول به روغن استخراج شده از مخمرها در 170 rpm به مدت 5/5-5 ساعت صورت گرفت. پس از آن دو لایه تشکیل شد. لایه بالایی که حاوی سوخت زیستی بود به واسطه پترولیوم اتر جداسازی گردید(18).

آنالیز لیپید: در ابتدا آنالیز لیپید استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک(TLC) صورت پذیرفت. برای انجام TLC از صفحات سیلیکاژل 60F254 همراه با تری اولئین به عنوان استاندارد برای بررسی تولید تری آسیل گلیسرول استفاده شد. محلول مورد استفاده حاوی n-هگزان، دی اتیل اتر و استیک اسید با نسبت 90:10:2 می باشد. باندها پس از رنگ آمیزی صفحات با بخارات ید قابل مشاهده هستند. به این ترتیب آنالیز کیفی و نیمه کمی لیپید داخل سلولی با کمک TLC قابل انجام است(21).

آنالیز با کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده ای (GC-MS): در ابتدا ترانس استریفیکاسیون با استفاده از سولفوریک اسید به عنوان کاتالیزور با نسبت 80% وزن روغن مورد استفاده و متانول با نسبت 1: 30 در دمای 55 °C به مدت 5/5 ساعت در 60 rpm صورت گرفت. بیودیزل تولید شده در فاز بالایی بوده که با کمک پترولیوم اتر جداسازی شد(۲۲،۲۳). پس از آن

Archive of SID
www.SID.ir

آنالیز با استفاده از GC-MS (HP 5972 mass selective detector, serie II gas chromatography, Hp) انجام گرفت.

بهینه سازی شرایط هیدرولیز چمن: متغیرهای تاثیر گذار بر شرایط هیدرولیز شامل مدت زمان اتوکلاو، دمای اتوکلاو، میزان آب و میزان اسید می باشند. چون این محیط قرار است به عنوان محیط تولید برای رشد مخمرها استفاده شود، میزان آب استفاده شده ممکن است بر روی این فرایند زیستی موثر باشد که توسط برنامه تاگوچی تاثیر آن بررسی شد. برای این چهار متغیر 3 سطح متفاوت جهت برنامه ریزی با کمک روش آماری تاگوچی (برنامه Qualitek-4) در نظر گرفته شد. سطوح مربوط به متغیرها در جدول 1 قابل مشاهده است. سطوح داده شده به برنامه تاگوچی سطوحی است که محقق به صورت پیش فرض و بر اساس اطلاعاتی که در مورد مبحث مورد نظر دارد، به برنامه ارائه می دهد و نحوه تاثیر آن ها را بررسی می کند. چنانچه سطوح داده شده پاسخ مطلوبی بر روند بهینه سازی نداشته باشد، محقق باید طیف مورد بررسی را گسترده تر کرده و مجدداً آزمایش نماید.

جدول1. سطوح مرتبط با متغیرهای در نظر گرفته شده برای شرایط هیدرولیز

متغیرها	سطح اول	سطح دوم	سطح سوم
مدت زمان اتوکلاو(min)	10	20	30
دما(°C)	115	125	135
میزان آب(ml)	30	40	50
میزان اسید(ml)	50	100	150

پس از انتخاب بهترین شرایط هیدرولیز با توجه به نتایج میزان لیپید تولید شده، مرحله دوم بهینه سازی انجام شد.

مرحله دوم بهینه سازی با کمک روش تاگوچی: در مرحله دوم شرایط فیزیکی موثر بر میزان لیپید تولید شده بهینه سازی شد. عوامل فیزیکی زیست تولید موثر شامل دمای انکوباسیون، مدت زمان، pH و rpm می باشند. برای 3 عامل اول 3 سطح و برای متغیر آخر 2 سطح در نظر گرفته شد. جدول 2 سطوح متغیرها را نشان می دهد. مخمرها و قارچ ها توانایی رشد خوبی در محیط اسیدی دارند با توجه به کارهای مشابه انجام شده در این زمینه بازه مورد بررسی انتخاب شد(6).

جدول2. سطوح مرتبط با متغیرهای در نظر گرفته شده برای بهینه سازی شرایط فیزیکی

متغیرها	سطح اول	سطح دوم	سطح سوم
دما(°C)	25	30	35
مدت زمان انکوباسیون(h)	48	72	96
pH	4	5	6
rpm	150	200	----

یافته ها

در این مطالعه شرایط متفاوت هیدرولیز اسیدی چمن مورد بررسی قرار گرفت. برنامه ریزی تاگوچی روش L9 را پیشنهاد داد که در آن 9 آزمایش با شرایط متفاوت برای رسیدن به بهترین حالت انجام شد. این 9 آزمایش به راحتی با دادن این متغیرها و سطوح مورد نظر به برنامه تاگوچی قابل مشاهده است لذا نتایج آزمون L9 در جدول 3 آمده است.

جدول3. نتایج آزمون L9 برای بهترین حالت هیدرولیز اسیدی

آزمون	میزان تولید لیپید(g/L)	درصد تولید لیپید
1	1/5	21
2	2/5	24
3	3/8	33
4	4/1	35
5	1/8	22
6	2/5	23
7	3/1	30
8	5/5	44
9	3	29

جدول 4 نتایج آنالیز واریانس در مورد شرایط هیدرولیز را نشان می دهد. در این جدول درصد تاثیر هر یک از عوامل مختلف بر میزان تولید لیپید نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول4. نتایج آنالیز واریانس در مورد شرایط هیدرولیز اسیدی

عامل	درجه آزادی	مجموع مربعات(S)	واریانس	مجموع خالص مربعات(S´)	درصد تاثیر عامل
مدت زمان(min)	2	2/782	1/391	2/782	22/751
دما(°C)	2	0/202	0/101	0/202	1/653
میزان آب(ml)	2	0/162	0/081	0/162	1/326
میزان اسید(ml)	2	9/082	4/541	9/082	74/267

همان طور که در جدول 4 نشان داده شده است عوامل مدت زمان و میزان اسید بیشترین تاثیر را بر روی هیدرولیز دارند و در ایجاد حالت بهینه نسبت به سایر عوامل سهم بیشتری دارند. نرم افزار بهترین حالت برای شرایط هیدرولیز را در 125 °C به مدت 30 دقیقه با میزان 40ml آب و 150ml اسید پیش بینی می کند؛ که با توجه به آنالیز های انجام شده توسط برنامه تاگوچی و گرفتن نتیجه مطلوب نیازی به بررسی طیف های گسترده تر از متغیر ها نیست. لازم به ذکر است روش تاگوچی با کمک تحلیل نتایج به ما کمک می کند تا آزمایش های مورد بررسی کمتر شده و نتیجه مطلوب زودتر به دست آید. در این حالت میزان تولید لیپید معادل 5/53 گرم بر لیتر تخمین زده شده است که پس از ایجاد این شرایط نتایج به دست آمده معادل 5/5 گرم بر لیتر است و با پیش بینی نرم افزار مطابقت دارد.

نتایج تولید لیپید پس از ایجاد شرایط بهینه تولید زیستی: در این مرحله نتایج حاصل از تاثیر دمای انکوباسیون، pH، مدت زمان و دور شیکر که بر هوادهی موثر است، به دست آمد. آزمون تاگوچی در این مرحله نیز به صورت L9 انجام گرفت. نتایج مربوط به این آزمون در جدول 5 نشان داده شده است.

آنالیز اسیدهای چرب با GC-MS: روغن استخراج شده از مخمرها پس از متیلاسیون با کمک GC-MS مورد آنالیز قرار گرفت. ترکیب به دست آمده شامل:18/51% پالمیتیک اسید، 67/29% اولئیک اسید، 1/11% میریستیک اسید، 1/25% استئاریک اسید، 4/76% لینولئیک اسید و غلظت پایینی از سایر متیل استرها بود.

جدول5. نتایج تولید لیپید در شرایط فیزیکی مختلف در آزمون L9

آزمون	میزان تولید لیپید(g/L)	درصد تولید لیپید
1	2/5	27
2	4/5	43
3	6/8	55
4	1/9	25
5	3/8	36
6	2/5	26
7	1/5	23
8	1/3	21
9	3/5	31

بحث

همانطور که در جدول 5 نشان داده شده است بهترین شرایط برای تولید بیشترین میزان لیپید در آزمون 3 که دارای شرایط دمای 25°C ، pH= 6 ،rpm= 150 و مدت زمان انکوباسیون معادل 96 ساعت است، به دست آمد. با توجه به بررسی های انجام شده قبلی سویه مورد نظر در مدت زمان بیشتر از 96 ساعت لیپیدهای درون سلولی خود را مصرف می کند. Carvalho و همکارانش گزارش دادند که بهترین دما برای تولید بیومس در مورد سویه های موکور °C 28 می باشد (24). Amaretti و همکارانش گزارش دادند که تغییر دما از -3°C تا 25°C در مورد مخمر مولد چربی *رودوتورولا گلاسیالیس* بر روی سرعت رشد تاثیر گذاشته اما بر روی بازده نهایی لیپید به بیومس چندان موثر نیست، به عبارتی دیگر دما بر روی میزان رشد نسبت به زمان طبق گزارش این محققین در سویه مورد بررسی توسط آن ها، تاثیر داشته اما بر روی تولید نهایی لیپید چندان موثر نبوده است (25). در مورد اثر pH نیز Syed و همکارانش گزارش دادند که میزان تولید لیپید در pH= 8 و pH= 4 به صورت برجسته ای کاهش می یابد و pH بین 5 تا 6 باعث افزایش غلظت لیپید می شود (26). Angerbauer و همکارانش گزارش دادند که pH محیط بر روی تولید لیپید اثر می گذارد و به نظر می رسد که به نوع منبع کربن بستگی داشته باشد(27).

Zhu و همکارانش (7)، Angerbauer و همکارانش (27) و Easterling و همکارانش (28) و Li و همکارانش (29) گزارش دادند که توانایی تولید لیپید به واسطه pHهای مختلف

Archive of SID
www.SID.ir

محیط کشت تحت تاثیر قرار می گیرد و pH بهینه برای سلول های مخمری در محیط بین 5 تا 6 به دست آمده است. در این مطالعه نیز سطح سوم pH یعنی pH= 6 بهترین حالت برای تولید لیپید بوده است. لازم به توضیح است که مقادیر کمتر و بیشتر از بازه داده شده به برنامه تاگوچی جهت اطمینان در آزمایشگاه به صورت تک فاکتوره مورد بررسی قرار گرفت. مثلا در مورد pH مقادیر بیشتر نظیر 6/5 و 7 در شرایط بهینه از نظر سایر فاکتورها بررسی شد و با کاهش میزان تولید لیپید مواجه شدیم. به طور کلی در کار با این برنامه چنانچه با روند کاهشی یا افزایشی با تغییر مقادیر یک متغیر مواجه شدیم جهت اطمینان یک مقدار بعدی را در خارج از برنامه، به صورت تک فاکتوره، با کنترل سایر شرایط بررسی می کنیم.

Leesing و همکارانش(30) با بررسی بر روی مخمر *تورولاسپورا گلوبوسا* گزارش دادند که پس از روز هشتم میزان بیومس و تولید لیپید کاهش می یابد. در مورد سویه بررسی شده بیشترین میزان تولید لیپید در 96 ساعت به دست آمد. Yan و Chen (31)، Yi و Zheng(32) و Liang (33) گزارش دادند که غلظت اکسیژن محلول دارای رابطه مثبتی با تجمع لیپید است. Kraisintu و همکارانش (6) اثر عوامل مختلفی را بر روی تولید لیپید در مخمر *رودوسپوریدیوم تورولوئیدس* بررسی کردند که بیشترین میزان تولید لیپید در مطالعات آن ها معادل 9/2 g/L در 150 rpm بر روی گلوکز به دست آمد. نتایج کار این محققین نشان می دهد که دور شیکر نیز در کنار سایر عوامل می تواند بر روی تولید لیپید اثر قابل توجهی داشته باشد.

Huang و همکارانش تولید روغن میکروبی از *تریکوسپورون فرمنتنس* را که بر روی پوشال برنج هیدرولیز شده با سولفوریک اسید رشد کرده بود، بررسی کردند. آن ها نشان دادند که سوبسترای هیدرولیز شده ی حاصله مخلوطی از قندهای پنتوز قابل تبدیل به روغن تک یاخته توسط میکروارگانیسم ها است(13). روغن به دست آمده در این پژوهش نیز این مطلب را تایید می کند.

نتیجه گیری

بنابراین سویه *رودوتورولا موسیلاژینوزا* قابلیت رشد بر روی سوبسترای هیدرولیز شده حاصل از چمن به دست آمده از فضاهای سبز را داشته و این موضوع قابلیت بالای این مخمر برای کاربردهای صنعتی را نشان می دهد. در این تحقیق با استفاده از طراحی آزمایش ها در دو مرحله مجزا، روند بهینه سازی انجام گرفت تا بهترین حالت برای بیشترین میزان تولید لیپید در این مخمر به دست آید. با کمک این روش تعداد آزمون های مورد نیاز کاهش می یابد و می توان در صد تاثیر هر یک از عوامل مختلف را به راحتی به دست آورد.

References

1- Ma F, Hanna MA. B*iodiesel production: a review*. Bioresour. Technol, 1999; 70: 1-15.
2- Krawczyk T. *Biodiesel alternative fuel makes inroads but hurdles remain*. Inform. 1996; 7: 801-829.
3- Pan LX, Yang DF, Shao L, Li W, Chen GG, Liang ZQ. *Isolation of oleaginous yeast from the soil and studies of their lipid-producing capacities*. Food technol. Biotechnol, china. 2009; 215-220.
4- Ratledge C, Wynn JP. *The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms*. Adv. Applied Microbial. 2002; 51: 1-44.
5- Daum G, Wanger A, Czabany T, Athenstaedt K, *Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast*, Biochimie. 2009; 89: 243-248.
6- Kraisintu P, Yongmanitchai W, Limtong S. *Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, Rdodosporidium toruloides DMKU3-TK16*, Kasetsart university, Thailand. 2010; 44:436-445.
7- Zhu LY, Zong MH , Wu H. *Efficient lipid production with Trichosporon fermentans and its use for biodiesel preparation*. Bioresour Technol. 2008; 99: 7881-7885.
8- Hass MJ, Foglia T A. *Alternative feedstocks for biodiesel production*. AOCS Press, Champaign,USA. 2005;101.
9- Li Y, Zhao Z, Bai F. *High- density cultivation of oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides Y4 in fed-batch culture*. Enzyme and Microbial Technology. 2007; 41, 312-317.
10- Xue FY, Miao JX, Zhang X, Luo H, Tan TW. *Studies on lipid production by Rhodotorulla glutinis fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium*. Bioresour.Technol. 2008; 99: 5923-5927.
11- Papanikolaou S, Sarantou S, Komaitis M, Aggelis G. *Repression of reserve lipid turnover in Cunninghamell echinulata and Mortierella isabellina cultivated in multiple- limited media*. Journa of Applied Microbiolgy. 2004; 97: 867-875.
12- Huang C, Wu H, Liu QP, Li YY, Zong MH. *Effects of aldehydes on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast Trichosporon fermentans*. J. Agric. Food Chem. 2011; 59: 4606-4613.
13- Huang C, Zong MH, Wu H, Liu Q P. *Microbial oil production from rice straw hydrolysate by Trichosporon fermentans*. Bioresource Technology. 2009; 100:4535–4538.
14- Economou CN, Aggelis G, Pavlou S, Vayenas D. *Single cell oil production from rice hulls*

Archive of SID

www.SID.ir

hydrolysate. Bioresour. Technol.2011; 102: 9737-9742.
15- Chen X, Li Z, Zhang X, Hu F, Ryu D, Bao J. *Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds*. Appl. Biochem. Biotechnol. 2009; 159: 1-14.
16- Yu X, Zheng Y, Dorgan KM, Chen S. *Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid*. Bioresour. Technol. 2011; 102: 6134-6140.
17- Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition*. Bioresour. Technol. 2000; 74: 25-33.
18- Dai C , Tao J, Xie F, Dai Y J, Zhao M. *Biodiesel generation oleaginous yeast Rhodotorula glutinis with xylose assimilating capacity*. African Journal of Biotechnology China. 2007; 2130-2134.
19- Dai CC, Tao J, wang Y, Hao Y. *Research advance and superiority of microdiesel production with biowastes* . African Journal of Microbiology.2010; 4(10): 977-983.
20- Canilha L, Almeida J B, Felipe M G A., Carvalho W. *Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using Candida guilliermondii in a stirred tank reactor*. Biotechnology letters. 2003; 25: 1811-1814.
21- Alvarez AF, Alvarez HM, Kalscheuer R, Waltermann M, Steinbuchel A. *Cloning and characterization of a gene involved in triacylglycerol biosynthesis and identification of additional homologous genes in the oleaginous bacterium Rhodococcus opacus PD630*. Microbiology. 2008; 2327-2335.
22- Liu GY, Yuan S, Dai CC. *Factors affecting γ-linoleic acid content in fermented glutinous rice brewed by Rhizopus sp.* Food Microbiol.2004; 21(3): 299-304.
23- Wu Q, Miao XL. *Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil*, Bioresour.Technol. 2006; 97: 841-846.
24- Carvalho PO, Oliveira JG, Pastore GM. *Enhancement of gamma-linolenic acid producyion by the fungus Mucor sp. LB-54 by the growth temperature*. Rev. Microbiol. 1999;30: 170-175.
25- Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, Lucia M D, Leonardy A, Rossi M. *Production of Single cell oil by the cold adapted oleaginous yeast Rhodotorula glacialis AS 4.7: effects of the growth temperature and the C:N ratio*. Department of Chemistry. 2010; 183.
26- Syed M A, Singh S K, Pandey A, Kanjilal S, Prasad RBN. *Effects of various process parameters on the production of α-Linolenic acid in submerged fermentation.* Food Technol.Biotechnol. 2006; 44:282-287.
27- Angerbauer C. *Conversion of sewage sludge in to lipids by lipomyces starkeyi for biodiesel production*. Bioresour.Technol. 2008; 99: 3051-3056.
28- Easterling ER, French WT, Hernandez R, Licha M. *The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of Rodotorula glutinis*. Bioresour.Technol. 2009; 100:356-361.
29- Li YH, Liu B, Sun Y, Zhao Z B, Bai F W. *Screening of oleaginous yeasts for broad-spectrum carbohydrates assimilation capacity*. China Biotechnol. 2005; 25: 39-43.
30- Leesing R, Baojungharn R. *Microbial Oil production by isolated oleaginous yeast Torulaspora globosa YU5/2*. World academy of science, Engineering and Technology. 2011; 76: 799-803.
31- Yan Z, Chen J. *Research advance on microbial oils and their exploitation and utilization*. Journal of Cereals & Oils. 2003; 7:13-15.
32- Yi SJ, Zheng YP. *Research and application of oleaginous microorganism*. China Foreign Energy. 2006; 11(2):90-94.
33- Liang XA, Dong WB, Miao XJ, Dai CJ. *Production technology and influencing factors of microorganism grease*. Food Res Dev. 2006; 27(3): 46-47.

Archive of SID

www.SID.ir