جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تأثیر گلوکز و زایلوز روی رشد و تولید روغن تک یاخته توسط سویه‌های مخمری منتخب

حسین قنواتی* و ایرج نحوی
دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی
ghanavatih@hotmail.com

پژوهش نفت
سال بیست و سوم
شماره ۷۵
صفحه ۳۶-۲۴ ۱۳۹۲
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۶/۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۱/۱۲/۱۹

چکیده

استفاده از قندهای حاصل از هیدرولیز ترکیبات لیگنوسلولزی راهکار مناسبی برای تولید بیودیزل مخمری است. در این تحقیق برای شناسایی سویه‌های مخمری مولد چربی از رنگ‌آمیزی با سودان سیاه و رنگ فلورسنت نایل رد استفاده شد. رشد و تولید لیپید با استفاده از گلوکز، زایلوز و نیز مخلوط گلوکز و زایلوز به عنوان منبع کربنی در ۱۱ سویه مخمری منتخب بومی و ۲ سویه مخمری از کلکسیون میکروبی DSMZ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد سویه‌های بومی توانایی تولید مقادیر بالایی از لیپید را دارا می‌باشد، در نتیجه می‌توان از آن برای تولید این محصول استفاده کرد. در این تحقیق براساس نوع سویه و منبع کربن، میزان تولید لیپید بین gr/lit ۰/۲۱ تا ٦/۹۵، میزان زی توده خشک سلولی بین g/lit ۰/۷۳ تا ۱۰/۹، محتوای لیپیدی بین ۲٦/٤٪ تا ۸۱/٤٪ و کارآیی تولید لیپید بین ٦/٤۱٪ تا ۲۱/۹۵٪ متغیر بود. بیشترین محتوای لیپیدی (۸۱/٤ ٪) و کارآیی تولید لیپید (۲۱/۹۵٪) توسط سویه UIMC65 به دست آمد. بیشترین میزان تولید لیپید (٦/۹۵ gr/lit) مربوط به سویه‌های UIMC35 (در حضور مخلوط گلوکز و زایلوز) و UIMC74 (درحضور گلوکز) بود. از تکنیک‌های TLC و FT-IR spectroscopy به منظور ارزیابی کیفی روغن تک یاخته تولیدی استفاده گردید.

واژه‌های کلیدی: سویه‌های مخمری مولد چربی، روغن تک یاخته، بیودیزل، گلوکز، زایلوز

مقدمه

به دلیل محدودیت منابع نفتی، جایگزینی سوخت‌های فسیلی با سوخت‌های جدید همچون سوخت‌های زیستی لازم و ضروری می‌باشد. در حال حاضر قیمت بالای سوخت‌های زیستی استفاده از آنها را محدود کرده است. در صورتی‌که بتوان سوخت‌های زیستی را از منابع اولیه ارزان قیمت به دست آورد، تولید آنها از نظر اقتصادی توجیه‌پذیر خواهد شد. از جمله ترکیبات فراوان و ارزان قیمت در طبیعت، زائدات لیگنوسلولزی است که قابلیت تبدیل به محصولات بیوتکنولوژیک مخصوصاً سوخت‌های زیستی را دارا می‌باشد. قسمت اعظم ساختار لیگنوسلولز را پلیمرهای سلولز و همی سلولز تشکیل می‌دهد که از پلیمریزه شدن قندهای مونومریک به خصوص گلوکز و زایلوز به وجود می‌آید [۱]. اکثر ترکیبات لیگنوسلولزی به عنوان مواد زائد سوزانده شده و در اثر سوختن، ترکیبات آلاینده زیست محیطی تولید می‌شود، در صورتی‌که می‌توان از این زائدات، سوخت تولید کرد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

برای این منظور، لازم است از میکروارگانیسم‌هایی استفاده شود که با دارا بودن قابلیت رشد بر روی قندهای حاصل از هیدرولیز ترکیبات لیگنوسلولزی، از این قندها، روغن تک یاخته تولید کنند. میکروارگانیسم‌های محدودی در طبیعت قادر به تجمع لیپید در درون خود می‌باشند که به آنها مولد چربی گفته می‌شود. این مواد قادر به تجمع لیپید تا بیش از ۲۰٪ وزن خشک خود هستند [۱]. برخی از سویه‌های مخمری مثل گونه‌های رودوسپوریدیوم[1]، رودوتورولا[2] و لیپومایسس[3] می‌توانند حتی بیش از ۷۰٪ وزن خشک سلولی خود لیپید درون سلول تجمع دهند [۲]. قسمت اعظم ترکیبات لیپیدی تجمع یافته توسط این میکروارگانیسم‌ها، تری آسیل گلیسرول و مقدار محدودتری، استریل استر می‌باشد [۱].

تبدیل چربی تولید شده به بیودیزل طی فرآیندی به نام ترانس استریفیکاسیون انجام می‌شود. در این فرآیند اسیدهای چرب موجود در ساختار تری آسیل گلیسرول توسط یک الکل مثل متانول، متیل استره شده و به اسیدهای چرب متیل استره[4] تبدیل می‌شود [۳].

در حال حاضر، روغن‌های گیاهی مهم‌ترین منبع اسیدهای چرب هستند که تولید آنها با مشکلاتی همچون فضای لازم، شرایط آب و هوایی و اقلیمی مناسب و پروسه تولید طولانی همراه است. تولید چربی‌های دامی نیز با مشکلاتی همچون هزینه تغذیه دام و زمان طولانی تولید روبرو است. همچنین منابع گیاهی و دامی به دلیل کاربرد در خوراک انسان‌ها، استفاده محدودی در تولید سوخت‌های زیستی دارند. تولید اسیدهای چرب مشابه توسط میکروارگانیسم‌های مولد چربی، مشکلات فوق را بر طرف می‌نماید [٤]. از بین میکروارگانیسم‌های مولد چربی، مخمرها مزایای بیشتری نسبت به باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها دارند. مخمرهای تک سلولی با سرعت رشد نسبتاً بالا، توانایی انباشتن سریع لیپیدها را در اجسام لیپیدی دارند. آنها همچنین می‌توانند از محیط‌های تخمیری ارزان قیمت مثل پس مانده غذایی محصولات زراعی و صنعتی به عنوان مواد خام اولیه استفاده کنند [۵].

در این تحقیق، مخمرهای مولد چربی جداسازی شده از خاک با قدرت مصرف زایلوز و گلوکز به عنوان منبع کربن، جهت تولید روغن تک یاخته قابل تبدیل به بیودیزل مورد استفاده قرار گرفت و میزان تولید آنها در شرایط مختلف از نظر نوع منبع کربن بررسی گردید.

تکنیک FT-IR spectroscopy برای بررسی کیفی روغن تک یاخته تولیدی مخمرها به کار گرفته شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب سویه‌های مخمری

از میان سویه‌های مخمری بومی موجود در بانک میکروبی بخش میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان، ۹ سویه که تولید لیپید بیشتری را داشتند، انتخاب شده و آزمایشات تکمیلی بر روی آنها انجام پذیرفت. جهت مقایسه میزان تولید روغن توسط مخمرهای جداسازی شده با سویه‌های استاندارد با قابلیت تولید روغن تک یاخته، ۲ سویه از کلکسیون میکروبی DSMZ (Yarrowia lipolytica 70562 & 3286) در کنار سویه‌های بومی مورد بررسی قرار گرفت.

غربال‌گری و نگه‌داری سویه‌های مخمری مولد چربی

جهت غربال‌گری سویه‌های جداسازی شده، از دو روش رنگ آمیزی با سودان سیاه B [۳] و رنگ آمیزی با رنگ فلورسنت نایل رد [٦ و ۷] استفاده شد. آماده‌سازی رنگ سودان سیاه با حل کردن ۰/۳ gr از پودر سودان در ۱۰۰ ml محلول ۷۰٪ اتانل به دست آمد. پس از تهیه اسمیر از سویه‌های مخمری، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول سودان سیاه قرار گرفته و سپس با آب مقطر و زایلول شستشو داده شدند و زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردیدند [۳].

برای تهیه محلول نایل رد جهت رنگ آمیزی، محلول ۰/۰۳۳ gr/lit در حلال استون این ماده تهیه گردید. برای رنگ آمیزی با نایل رد مقدار ۱ ml از سوسپانسون سلولی در دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شده و دو بار با ۱ ml محلول بافر فسفات نمکی شستشو داده شد.

1. Rhodosporidium
2. Rhodotorula
3. Lipomyces
4. Fatty Acid Methyl Esters

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجدداً ۱ ml محلول بافر به آن اضافه شد و پس از همگن‌سازی، مقدار ۱۰ µl از محلول نایل رد به آن اضافه گردید [٦ و ٧]. سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ min در دمای ۳۷ °C در تاریکی قرار داده شد و سپس از آن گستره تهیه گردید و با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد. جهت نگه‌داری سویه‌های خالص شده از محیط کشت جامد YPD[1] آگار حاوی گلوکز، عصاره مخمر، پپتون و آگار با غلظت ۲۰ gr/lit در لوله‌های اسلنت ٤ °C استفاده گردید.

تولید روغن تک یاخته

برای تولید روغن تک یاخته توسط سویه‌های مخمری از یک فرآیند ۳ مرحله‌ای استفاده شد که شامل مراحل فعال‌سازی، پیش تولید و تولید بود. پس از این مرحله یک لوپ از مخمر خالص فعال شده به "محیط پیش تولید" تلقیح گردید. محیط پیش تولید شامل (۱) $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۵)، عصاره مخمر (۱) و پپتون (۱) (gr/lit): گلوکز(یا زایلوز) (۲۰)، $(NH_4)_2SO_4$ (۳)، KH_2PO_4 در pH برابر ۵/۵ بود.پس از این مرحله یک لوپ از مخمر خالص فعال شده به "محیط پیش تولید" در ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت تلقیح گردید و در دمای ۲۸ °C و دور ۱۸۰ rpm در مدت زمان ٤٨ ساعت گرماخانه گذاری شد. محیط پیش تولید شامل (g/L): گلوکز (یا زایلوز) (۲۰)، $(NH_4)_2SO_4$ (۳)، KH_2PO_4 (۱)، $MgSO_4,7H_2O$ (۰/۵)، عصاره مخمر (۱) و پپتون (۱) در pH ۵/۵ می باشد.

بعد از گذشت گرماخانه گذاری و رشد مخمرها درون محیط پیش تولید، مقدار ۵ میلی لیتر از آن به ۵۵ میلی لیتر "محیط تولید" حاوی (g/L): گلوکز (یا زایلوز) (٤٠)، $(NH_4)_2SO_4$ (۲)، KH_2PO_4 (٤)، K_2HPO_4 (۱)، $MgSO_4,7H_2O$ (۰/۵) و عصاره مخمر (۰/۵) در pH ۵/۵ اضافه گردید و در دمای ۲۸ °C و دور ۱۸۰ rpm در مدت زمان ٤ روز گرماخانه گذاری شد. در حالت بررسی همزمان رشد روی گلوکز و زایلوز مقدار مساوی از دو قند یعنی ۲۰ گرم گلوکز و ۲۰ گرم زایلوز به همراه بقیه ترکیبات اشاره شده در محیط تولید مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه قندها به دمای بالا (۱۲۱ °C) حساس می باشند و از بین می روند، عملیات استریلیزاسیون تمامی محیط های کشت ذکر شده در دمای پایین تر و در ۱۱۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

استخراج روغن تولید شده

استخراج روغن با استفاده از روش بلای و دایر اصلاح شده انجام پذیرفت [۱]. برای این منظور ٤٠ ml از محیط کشت تولید در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و دو مرتبه با محلول بافر فسفات نمکی (PBS) شستشو داده شد. به توده میکروبی به دست آمده مقدار ۱۰ ml اسید کلریدریک ٤ مولار اضافه شد و برای مدت زمان یک ساعت در حمام آب با دمای ٦٠ °C قرار گرفت. سپس مقدار ۲۰ ml محلول متانل: کلرفرم به نسبت حجمی ۱:۱ به آن افزوده شد و برای ۲ تا ۳ ساعت در شیکر رفت و برگشتی با دور ۲۵۰ rpm قرار گرفت. سپس با استفاده از سانتریفیوژ دور ۵۰۰۰ rpm جداسازی لایه‌ها تسهیل شده و به کمک پیپت پاستور لایه زیرین جداسازی گردید. لایه زیرین جداسازی شده جهت تبخیر زودتر حلال، در اتاقک خلاء قرار داده شد و روغن تولید شده پس از تبخیر کامل حلال وزن گردید [۱].

اندازه‌گیری میزان قند، ازت و زی توده خشک سلولی

برای اندازه‌گیری قند از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) استفاده شد [۳]. قرائت نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر ۵۷۰ nm انجام گرفت. برای این منظور در ابتدا با مقادیر مشخص از قند (گلوکز یا زایلوز) منحنی استاندارد مربوطه رسم گردید و معادله تبدیل میزان جذب قرائت شده به قند موجود در محلول تعیین شد. اندازه‌گیری میزان قند نمونه‌های تحت بررسی با اندازه‌گیری جذب آنها و قرار دادن عدد قرائت شده در معادله مذکور انجام پذیرفت. میزان نیتروژن باقی مانده در محیط کشت با استفاده از روش کجلدال و در سوپرناتانت نمونه‌ها تعیین گردید [۸].

برای به دست آوردن میزان زی توده خشک سلولی مقدار ۵ ml از محیطی که مخمر در آن رشد یافته بود، در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و با PBS شستشو داده شد، سپس توده میکروبی تا زمان ثابت شدن وزن، در دمای ۸۰ °C قرار داده شد و زی توده خشک شده با ترازوی دقیق وزن گردید.

1. Yeast Peptone Dextrose (YPD)

بررسی تولید روغن تک یاخته با تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک[1]

به منظور بررسی کیفی تولید روغن توسط سویه‌های مخمری از تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک استفاده گردید. برای این منظور ورق‌های TLC مدل سیلیکا ژل 60 F254 (شرکت مرک آلمان) مورد استفاده قرار گرفت. حلال معرفی شامل n هگزان، دی اتیل اتر و استیک اسید با نسبت حجمی ۸۰، ۲۰ و ۱ بود. نمونه‌های روغن استخراج شده بر روی کاغذ TLC نقطه‌گذاری شد و در تانک مخصوص در مدت زمان ۲ تا ۳ ساعت قرار گرفت. پس از خشک شدن کاغذ با استفاده از بخار ید، ترکیبات روغنی در سطح کاغذ به صورت لکه‌های قهوه‌ای رنگ نمایان شد [۹].

بررسی تولید روغن تک یاخته با تکنیک طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه[1]

یکی از تکنیک‌های مناسب جهت اثبات تولید روغن‌های قابل تبدیل به بیودیزل تکنیک FT-IR spectroscopy می‌باشد. در این تحقیق از دستگاه مدل JASCO FT/IR-6300, Japan استفاده گردید. گستره مورد بررسی دستگاه در بازه $400\ cm^{-1}$ تا $4000\ cm^{-1}$ تنظیم شد. استاندارد تری اولئین (شرکت سیگما آلدریچ-آلمان) به عنوان شاهد برای مقایسه با روغن‌های تولیدی مورد استفاده قرار گرفت.

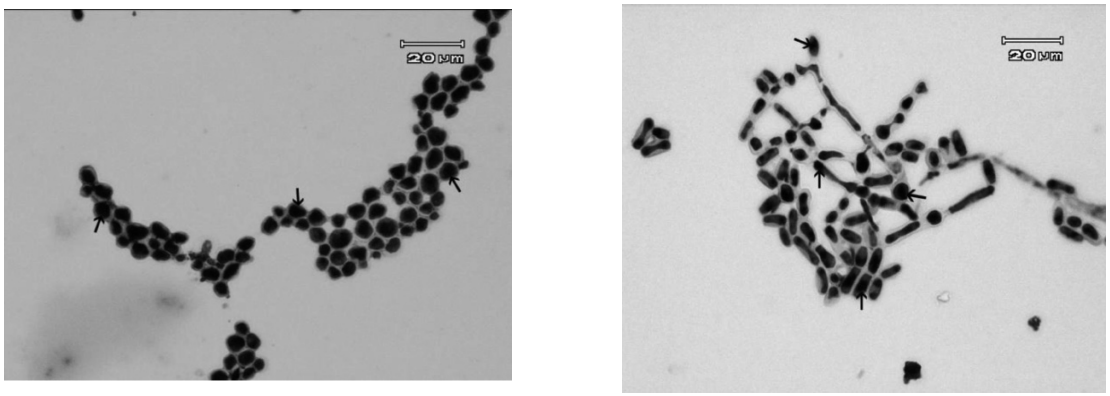
نتایج و بحث

رنگ‌آمیزی مخمرها به منظور بررسی اولیه تولید روغن تک یاخته

رنگ سودان سیاه به منظور بررسی تولید لیپید درون سلولی مورد استفاده قرار گرفت. این روش غربال‌گری در تحقیقات دیگر نیز استفاده شده است [۱]. تصاویر مربوط به رنگ‌آمیزی با سودان سیاه در دو سویه UIMC1 و UIMC35 در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، نقاط سیاه رنگ که با فلش مشخص گردیده، نشان دهنده حضور روغن درون سلولی است. تصاویر مربوط به رنگ آمیزی با سودان سیاه در بقیه سویه‌ها در این شکل رسم نشده است. در این تحقیق، مشابه کار انجام شده توسط Kraisintu و همکارانش رنگ آمیزی با رنگ نایل رد نیز برای بررسی تولید روغن درون سلولی در میکروارگانیسم‌ها به کار رفته است [۷]. تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ فلورسنت برای سویه‌های UIMC35 و UIMC43 در شکل ۲ رسم شده است. بررسی فلش‌ها در این شکل نشان‌دهنده محل تجمع لیپید درون سلولی است که با رنگ فلورسنت زرد طلایی مشخص گردیده و ناشی از ساطع شدن نور از رنگ فلورسنت نایل رد بعد از اتصال به ترکیبات روغنی تولید شده درون سلول‌های مخمری مولد چربی می‌باشد.

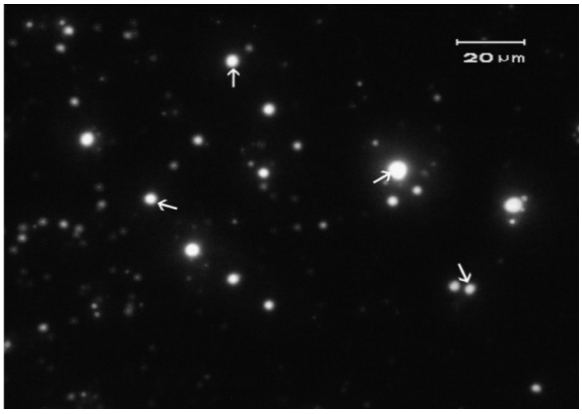
بررسی میزان تولید لیپید و محتوای لیپیدی

میزان تولید لیپید و محتوای لیپیدی در سویه‌های مخمری رشد داده شده روی گلوکز، زایلوز و توام گلوکز و زایلوز، به ترتیب در شکل‌های ۳ تا ۵ رسم شده است. همان‌گونه که در شکل ۳ نشان داده شده، تمامی سویه‌های مولد چربی مورد بررسی از جمله سویه های استاندارد، در حضور گلوکز، میزان تولید لیپید بالاتر از gr/lit ۳ از خود نشان دادند.

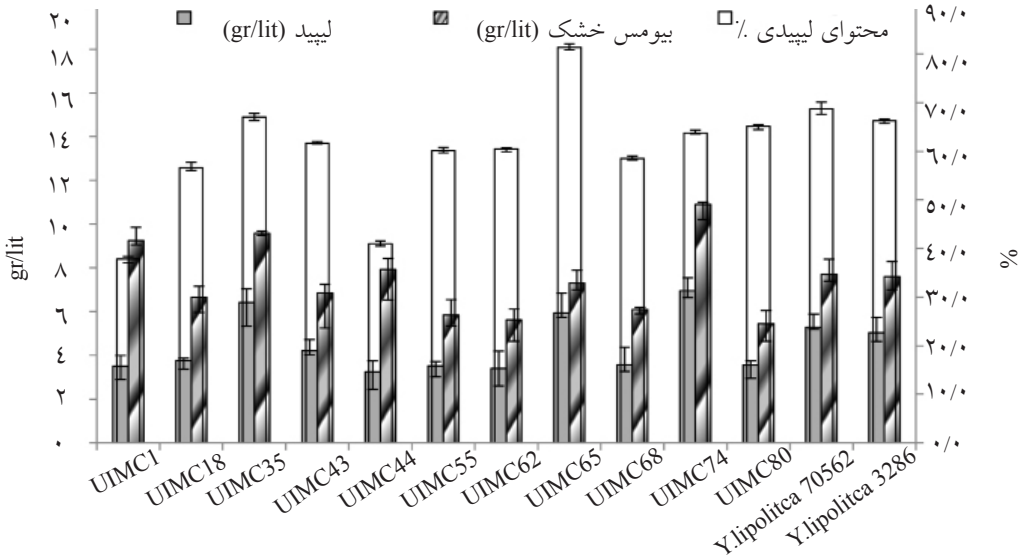


شکل ۱- رنگ‌آمیزی با رنگ سودان سیاه مربوط به دو سویه UIMC1 (تصویر سمت راست) و UIMC35 (تصویر سمت چپ). تصویر گرفته شده با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر می‌باشد. برای رنگ زمینه سلول‌های مخمری از رنگ فوشین اسیدی استفاده شده است.

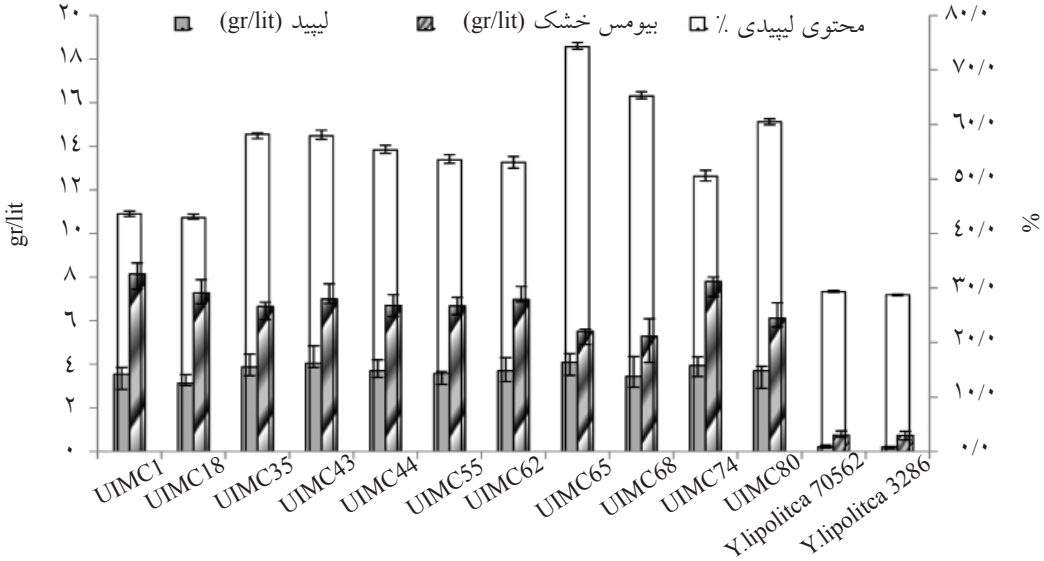
1. Thin Layer Chromatography (TLC)



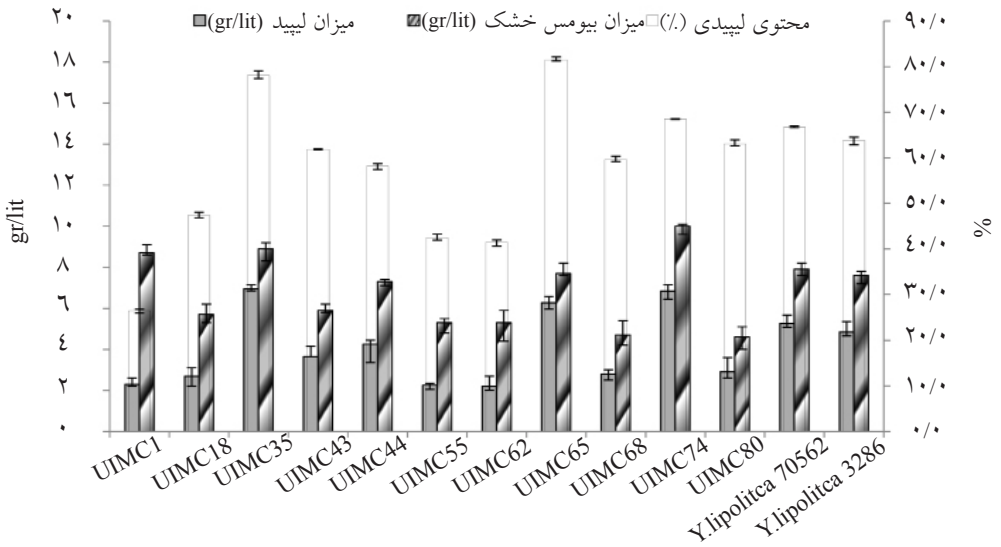
شکل ۲- رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت نایل رد مربوط به دو سویه UIMC43



شکل ۳- بررسی میزان تولید لیپید، زی توده خشک سلولی و محتوای لیپیدی درحضور گلوکز در سویه‌های مخمری مولد چربی. (نتایج میانگین سه تکرار می‌باشد).



شکل ٤- بررسی میزان تولید لیپید، زی توده خشک سلولی و محتوای لیپیدی درحضور زایلوز در سویه‌های مخمری مولد چربی (نتایج میانگین سه تکرار می‌باشد).



شکل ۵- بررسی میزان تولید لیپید، زی توده خشک سلولی و محتوای لیپیدی درحضور توام زایلوز و گلوکز در سویه‌های مخمری مولد چربی (نتایج میانگین سه تکرار می‌باشد).

با توجه به نسبت حاصل از میزان لیپید به زی توده خشک سلولی که تحت نام محتوای لیپیدی ارائه شده است، در سویه‌های مورد بررسی این عدد بالاتر از ۳۵٪ می‌باشد. در حضور گلوکز بیشترین میزان لیپید تولیدی gr/lit ۹۵/٦ مربوط به سویه UIMC74 می‌باشد، در حالی‌که بیشترین محتوای لیپیدی مربوط به سویه UIMC65 برابر با ۸۱/٤٪ است. سویه‌های استاندارد با تولید لیپید در حدود gr/lit ٥ و محتوای لیپیدی در حدود ٦۸٪، از تولید کنندگان خوب به حساب می‌آیند. در تحقیق صورت گرفته توسط Dai و همکارانش برروی ردوترولا گلوتینیس[1] در حضور گلوکز به عنوان منبع کربن در شرایط بهینه، میزان تولید لیپید gr/lit ١٤/٦٦ و محتوای لیپیدی بالاتر از ٤۹/۲٥٪ به دست آمده است [۳]. مقدار گزارش شده برای محتوای لیپیدی پایین‌تر از مقادیر به دست آمده در تحقیق می‌باشد، ولی مقدار تولید لیپید بالاتر بوده است. در تحقیق انجام گرفته توسط VijayaKumar و همکارانش در مخمرهای مورد بررسی بر روی ماده گلوکز، مقدار تولید لیپید gr/lit ۲/٤۳ و محتوای لیپیدی ۲۳/۸٪ گزارش شده است [۱۰]. Johnson و همکارانش با به کارگیری مخمر ردوترولا گلوتینیس در سیستم راکتور بسته و با استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن، بیشترین مقدار لیپید در شرایط بهینه را gr/lit ۱۸ و محتوای لیپیدی را برابر ٦٦٪ گزارش نمودند [۱۱].

مقدار تولید لیپید و محتوای لیپیدی در شرایط بهینه با منبع کربن گلوکز به ترتیب gr/lit ۱۹ و ٦۸٪ توسط Amaretti و همکارانش به دست آمد [۱۲]. لازم به ذکر است که اکثر مقادیر گزارش شده توسط این محققین در شرایط بهینه و در سیستم‌های رآکتوری حاصل شده است، در حالی‌که مقادیر به دست آمده در تحقیق حاضر درون ارلن و بدون ایجاد شرایط بهینه بوده است. در این پژوهش، شرایط یکسان برای همگی سویه‌ها در نظر گرفته شده و هدف مقایسه تولید بین سویه‌ها در شرایط یکسان می‌باشد. محتوای لیپیدی بعضی سویه‌های مورد بررسی در این تحقیق، بسیار بالاتر از تحقیقات قبلی می‌باشد نکته مهم در مورد تولید روغن تک یاخته محتوای لیپیدی بالاتر سویه‌ها است که نشان دهنده قابلیت تجمع روغن در درون سلول می‌باشد.

به کارگیری زایلوز به عنوان منبع کربن نیز در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های مخمری مولد چربی که پیش از این رشدشان روی این منبع کربن ثابت شده بود، جهت تولید لیپید بررسی گردید. میزان لیپید تولیدی، زی توده خشک سلولی و محتوای لیپیدی در شکل شماره ٤ رسم شده است.

1. Rhodotorula glutinis

سویه‌های مختلف مخمری مورد بررسی میزان تولید لیپیدی بین gr/lit ۳/۱ تا gr/lit ٤/۰۹ داشتند. میزان محتوای لیپیدی نیز بین ٤۲/۳٪ تا ۷٤/۲٪ به دست آمد. با توجه به نتایج حاصل، در سویه‌های UIMC 1, 44, 55, 62, 80 تولید لیپید در حضور زایلوز به عنوان منبع کربن، بیشتر از زمانی بود که گلوکز مورد استفاده قرار گرفت. سویه‌های UIMC 18, 43, 55, 62, 80 زی توده خشک سلولی بیشتری در مقایسه با حضور گلوکز از خود نشان دادند. محتوای لیپیدی در سویه‌های UIMC 1, 44, 80 بیش از حالت حضور گلوکز به عنوان منبع کربن بود. تنها سویه‌ای که در هر سه پارامتر مورد بررسی مقادیر بالاتری در حضور زایلوز نسبت به حضور گلوکز از خود نشان داد، سویه UIMC 80 بود. نتایج فوق نشان می‌دهد که سویه‌هایی که محتوای لیپیدی بالایی دارند، لزوماً مقدار تولید لیپید بالایی نداشته و میزان تولید لیپید بستگی به مقدار لیپید تولید شده توسط میکروارگانیسم در واحد حجم محیط کشت دارد. در سویه‌های مورد بررسی توسط Pan و همکارانش در حضور زایلوز به عنوان منبع کربن، میزان تولید لیپید gr/lit ٥/٦٨ و محتوای لیپید ۳۸/۹٤٪ گزارش شده است [۱]. در تحقیق انجام شده توسط He و همکارانش ۱٦ سویه مخمری با قابلیت جذب زایلوز جهت تولید روغن تک یاخته مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین محتوای لیپیدی و میزان تولید لیپید به ترتیب ٥۱/٤۳٪ و gr/lit ۰/۱٥٥ به دست آمده است [۱۳]. مقایسه این تحقیقات با تحقیق موجود، نشان دهنده محتوای لیپیدی بالاتر در سویه‌های جداسازی شده در این تحقیق است.

حاصل هیدرولیز ترکیبات ارزان قیمت همچون لیگنوسلولز، آزاد شدن قندهای مونوساکاریدی است که قسمت اعظم آن را گلوکز و زایلوز تشکیل می‌دهد. گلوکز از تجزیه سلولز و زایلوز از تجزیه همی سلولز تولید می‌شود. به همین دلیل، حضور همزمان گلوکز و زایلوز درمحیط کشت به منظور شبیه‌سازی شرایط هیدرولیز مورد بررسی قرار گرفت. بررسی تولید لیپید بر روی ترکیبات لیگنوسلولزی هیدرولیز شده هم اکنون در حال بررسی و انجام است. نتایج حاصل از استفاده همزمان گلوکز و زایلوز نشان می‌دهد که در بیشتر سویه‌ها میزان تولید در این حالت کمتر از استفاده از منبع کربنی واحد می‌باشد. البته در بعضی سویه‌ها همچون UIMC 35 و UIMC 44 میزان تولید در این حالت بیش از زمانی است که منبع کربن گلوکز یا زایلوز به صورت خالص به کار برده شده است. در سویه‌هایی همچون UIMC 65 و UIMC 74، میزان تولید در این حالت نسبت به تولید در حضور زایلوز تنها، بیشتر و نسبت به حضور گلوکز تنها، کمتر است. مقایسه سویه‌های مختلف مورد بررسی در این تحقیق نشان دهنده رفتار متفاوت سویه‌های مختلف نسبت به استفاده از منابع مختلف کربن جهت تولید لیپید می‌باشد. در مورد میزان زی توده خشک سلولی و محتوای لیپیدی در سویه‌های مختلف نیز نتایج مشابهی از نظر تنوع در رفتار سویه‌های مختلف می‌توان یافت و مقایسه نتایج در شکل شماره ٥ رسم شده است.

Zhao و همکارانش در سال ۲۰۰۸ با استفاده از مخمر مولد چربی لیپومایسس استارکه‌ای[1] و به کارگیری همزمان گلوکز و زایلوز به عنوان منبع کربن و بهینه‌سازی با استفاده از مدل Plackett–Burman، محتـــوای لیپیدی ٦۱/٥٪ به دست آوردند [٤]. استفاده از ترکیبات لیگنوسلولزی هیدرولیز شده به منظور آزاد شدن قندهای گلوکز و زایلوز توسط محققینی همچون Galafassi و همکارانش انجام گرفت [١٤]. در تحقیق آنها، مخمر ردوترولاگرا مینیس[2] در لیگنوسلولز هیدرولیز شده رشد داده شد و مقدار لیپید gr/lit/hr ۰/۱٥ و محتوای لیپیدی ٥٤٪ گزارش شد [١٤]. همچنین Liang و همکارانش با به کارگیری مخمر کریپتوکوکوس کورواتوس[3] بر روی سورگوم شیرین هیدرولیز شده با اسید سولفوریک رقیق شده، موفق به تولید لیپید به میزان gr/lit ۱۰/۸۳ و محتوای لیپیدی ۷۳/۲٦٪ شدند [۱٥].

با توجه به نتایج به دست آمده از سویه‌های مورد بررسی در این تحقیق، سویه UIMC 65 بیشترین محتوای لیپیدی را در هر سه حالت (بر اساس نوع قند مصرفی) از خود نشان داد که در حضور قندهای گلوکز، زایلوز و حضور همزمان گلوکز و زایلوز به ترتیب ۸۱/٤، ۷٤/۲ و

1. Lipomyces Starkeyi
2. Rhodotorula Graminis
3. Cryptococcus Curvatus

۸۱/٤٪ بود. همچنین سویه UIMC 65 بیشترین میزان تولید لیپید(٤/۰۹ gr/lit) را با مصرف قند زایلوز، سویه UIMC 74 بیشترین میزان تولید لیپید (٦/۹۵ gr/lit) را با مصرف قند گلوکز و سویه UIMC 35 بیشترین میزان لیپید (٦/۹۵ gr/lit) را در حضور توام قندهای گلوکز و زایلوز از خود نشان دادند.

بررسی میزان قند و ازت مصرفی و کارآیی تولید لیپید

میزان کربن و ازت اولیه از جمله فاکتورهایی هستند که در تولید لیپید توسط میکروارگانیسم‌ها اهمیت فراوانی دارند و به صورت نسبت C/N اولیه نشان داده می‌شود. در اکثر مطالعات انجام گرفته محدودیت نیتروژن اثر بسزایی در افزایش تولید لیپید درون سلولی دارد [١٦-١٩]. کاهش نیتروژن باعث می‌شود تا آنزیم AMP-دآمیناز، AMP درون سلولی را به IMP و NH_4^+ تبدیل کند. به دلیل اینکه نیتروژن در محیط وجود ندارد، یون‌های آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۰ و ۲۱].

به این ترتیب با کاهش AMP درون سلولی آنزیم NAD-ایزوسیترات دهیدروژناز فعالیت خود را از دست می‌دهد [٢٢-٢٤]. به همین دلیل ایزوسیترات درون میتوکندری تجمع می‌یابد و وقتی که غلظت آن درون میتوکندری به حد بحرانی برسد، در حالت تبادل با مالات وارد سیتوپلاسم می‌شود [۲۱ و ۲۵] که درنهایت سیترات به وسیله آنزیم ATP سیترات لیاز به acetyl-CoA و اگزالواستات تقسیم می‌شود [۲۵]. ماده acetyl-CoA تولید شده، ماده اولیه ساخت اسیدهای چرب است و به این ترتیب تجمع روغن تک یاخته در دورن سلول آغاز می شود.

میزان C/N اولیه در آزمایشات انجام گرفته در این تحقیق در حدود ٤۰ بوده است. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۱ این نسبت در انتهای فرآیند در سویه‌های مختلف تغییرات زیادی داشته و اعدادی بین ۰/۰۰۳ تا ۹۵/۷ را نشان می‌دهد.

در اکثر سویه‌هایی که مقدار قابل توجهی لیپید تولید کرده‌اند، نسبت C/N از ٤۰ تا نزدیک ۱۵ کاهش پیدا کرده است. این در حالی است که نسبت‌های خارج از این بازه، تولید لیپید قابل توجهی نداشته‌اند. بررسی تغییرات C/N محیط کشت در فاز نهایی رشد، اولین بار در این مقاله گزارش شده و می‌تواند به عنوان موضوع تحقیقات مرتبط با هدف تعریف شاخص، جهت بررسی کیفی تولید لیپید توسط سویه‌های مولد چربی مورد استفاده قرار گیرد.

کارآیی تولید لیپید نیز از فاکتورهایی است که درصد تبدیل قند به لیپید را نشان می‌دهد و هر چه این نسبت بالاتر باشد، بیان‌گر این مطلب است که در سیستم متابولیسمی سویه مورد بررسی، قند مصرفی به جای اینکه صرف سایر تولیدات متابولیتی اولیه یا ثانویه شود، صرف تولید لیپید شده است. استوکیومتری گلوکز و قندهای مشابه مثل لاکتوز و فروکتوز نشان می‌دهد که از هر gr ۱۰۰ (معادل تقریباً ۰/٥٦ مول)، مقدار ۱/۱ مول acetyl CoA تولید می‌شود. زایلوز می‌تواند از طریق واکنش فسفوکتولاز که مؤثرترین مسیر می‌باشد، از هر gr ۱۰۰ (تقریباً ۰/٦٦ مول) زایلوز، مقدار ۱/۲ مول acetyl CoA تولید شود [٢٦].

بنابراین اگر تمامی acetyl CoA جهت تولید لیپید مصرف شود، بیشترین مقدار روغن تک یاخته تولیدی نسبت به گلوکز مصرفی برابر با gr/gr ۰/۳۲ خواهد بود. در مورد زایلوز زمانی که وارد واکنش فسفوکتولاز شود. این نسبت به gr/gr ۰/۳٤ خواهد رسید [۲۱]. با این وجود حتی در شرایط بهینه میزان تولید روغن تک یاخته به ندرت به مقدار بالاتر از gr/gr ۰/۲۲ خواهد رسید [۱۷ و ۱۹].

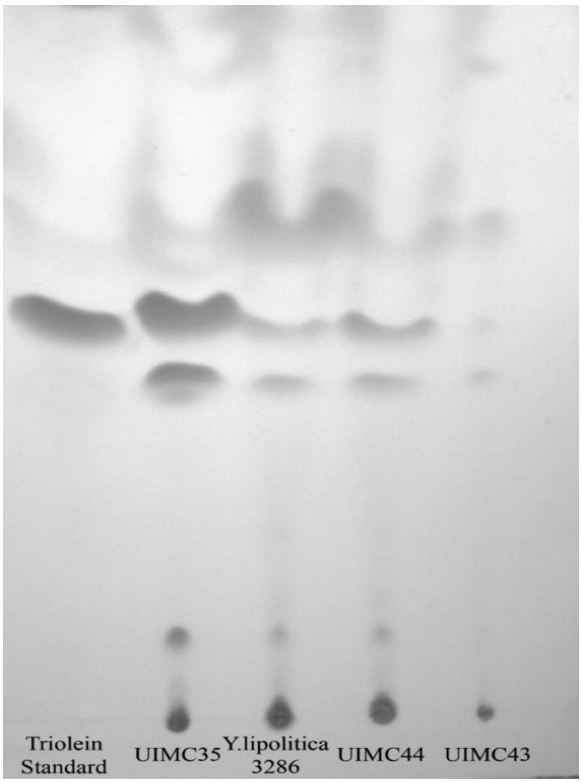
در ستون آخر جدول ۱ کارآیی تولید لیپید نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده کارآیی تولید لیپید در بعضی از سویه‌ها بسیار قابل توجه بوده و به بالاتر از ۲۰٪ می‌رسد. بیشترین کارآیی در سویه UIMC65 با ۲۱/۹۵٪ در حالت استفاده همزمان از گلوکز و زایلوز می‌باشد که در مقایسه با مقادیر گزارش شده در تحقیقات دیگر، در زمره سویه‌هایی است که بیشترین درصد کارآیی تولید لیپید را از خود نشان داده است [٤ و ١٤].

بررسی لیپید تولید شده توسط سویه‌های مخمری با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک

شکل ٦، عکس TLC مربوط به ترکیبات روغنی جداسازی شده در برخی سویه‌های مخمری را در مقایسه با استاندارد تری اولئین نشان می‌دهد.

جدول ۱- بررسی میزان قند مصرف شده و باقی‌مانده، میزان ازت باقی‌مانده، نسبت C/N نهایی و کارآیی تولید لیپید در سویه‌های مخمری مولد چربی (نتایج میانگین سه تکرار می‌باشد).

نوع سویه	نوع قند محیط کشت	میزان قند مصرف‌شده (gr/lit)	میزان قند باقی‌مانده (gr/lit)	میزان کربن باقی‌مانده (gr/lit)	میزان ازت باقی‌مانده (٪)	C/N نهایی	کارآیی تولید لیپید (٪)
UIMC1	زایلوز	۲۰/۸	۱۹/۹	۹/۷	۰/۰۱۱	۸۸/۰	۱۷/۰۷
	گلوکز	۱۷/۹	۲۳/۵	۱۱/٤	۰/۰۱٦	۷۱/۵	۱۹/۵۵
	زایلوز+گلوکز	۱٦/٤	۲۳/٦	۱۱/۵	۰/۰۱۲	۹۵/۷	۱٤/۰۲
UIMC18	زایلوز	۲٤/۷	۱٦	۷/۸	۰/۰۲٤	۳۲/٤	۱۲/٦۳
	گلوکز	۳۷/٤	٤	۱/۹	۰/۰۲۷	۷/۲	۱۰/۰۸
	زایلوز+گلوکز	۳٦/۱	۳/۹	۱/۹	۰/۰۲٤	۷/۹	۷/٤۸
UIMC35	زایلوز	۲٤/۷	۱٦	۷/۸	۰/۰۲۷	۲۸/۸	۱۵/٦۷
	گلوکز	۳٦/۸	٤/٦	۲/۲	۰/۰۳۱	۷/۲	۱۷/٤۵
	زایلوز+گلوکز	۳۲/۷	۷/۳	۳/٦	۰/۰۳۲	۱۱/۱	۱۷/۹۲
UIMC43	زایلوز	۳۵/۲	۵/۵	۲/۷	۰/۰۲٦	۱۰/۳	۱۱/۵۱
	گلوکز	٤۱/۳۹	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۲۸	۰/۰۱۷	۱۰/۲۰
	زایلوز+گلوکز	۳٦/۲	۳/۸	۱/۸	۰/۰۲۸	٦/٦	۱۰/۰۸
UIMC44	زایلوز	۲٤/۱	۱٦/٦	۸/۱	۰/۰۱۳	٦۲/۱	۱۵/۳۵
	گلوکز	۲۰/۱	۲۱/۳	۱۰/٤	۰/۰۲۵	٤۱/٤	۱٦/۱۷
	زایلوز+گلوکز	۲۳/۵	۱٦/۵	۸/۰	۰/۰۱۹	٤۲/۲	۱۸/۰۹
UIMC55	زایلوز	۲۰/۵	۲۰/۲	۹/۸	۰/۰۲۲	٤٤/۷	۱۷/٤۱
	گلوکز	۳٦/۹	٤/۵	۲/۲	۰/۰۱۹	۱۱/۵	۹/۵٤
	زایلوز+گلوکز	۲۷/٤	۱۲/٦	٦/۱	۰/۰۲۳	۲٦/۷	۸/۲۱
UIMC62	زایلوز	۳۵	۵/۷	۲/۸	۰/۰۲۳	۱۲/۱	۱۰/۵۷
	گلوکز	۳٦/۸	٤/٦	۲/۲	۰/۰٤٦	٤/۹	۹/۲٤
	زایلوز+گلوکز	۳٤/۳	۵/۷	۲/۸	۰/۰۳۵	۷/۹	٦/٤۱
UIMC65	زایلوز	۱۹/۵	۲۱/۲	۱۰/۳	۰/۰۲٤	٤۳/۰	۲۰/۹۷
	گلوکز	۳۰/٦	۱۰/۸	۵/۳	۰/۰۲۳	۲۲/۸	۱۹/٤۱
	زایلوز+گلوکز	۲۸/۵۷	۱۱/٤۳	۵/٦	۰/۰۲٦	۲۱/٤	۲۱/۹۵
UIMC68	زایلوز	۲۰/۷	۲۰	۹/۷	۰/۰۳	۳۲/٤	۱٦/٦۷
	گلوکز	۲۵/۱	۱٦/۳	۷/۹	۰/۰۲۸	۲۸/۳	۱٤/۲۲
	زایلوز+گلوکز	۲۳/۸	۱٦/۲	۷/۹	۰/۰۲۹	۲۷/۲	۱۱/۷٦
UIMC74	زایلوز	۲۷/٦	۱۳/۱	٦/٤	۰/۰۳٤	۱۸/۷	۱٤/۲۸
	گلوکز	٤۱/۳۹	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۲۹	۰/۰۱۷	۱٦/۷۹
	زایلوز+گلوکز	۳۱/٤	۸/٦	٤/۲	۰/۰۲٦	۱٦/۱	۲۱/۸۲
UIMC80	زایلوز	۳٤/۹	۵/۸	۲/۸	۰/۰۳	۹/٤	۱۰/٦۰
	گلوکز	٤۱/۳۹	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۱۹	۰/۰۰۳	۸/۵۸
	زایلوز+گلوکز	۳٤/٦	۵/٤	۲/٦	۰/۰۲۷	۹/۷	۸/۳۸
Y.lipolitica 70562	زایلوز	۸/٤	۳۲/۳	۱۵/۷	۰/۰٤۲	۳۷/٤	۲/٦۲
	گلوکز	۲۹/۳	۱۲/۱	۵/۹	۰/۰۱۹	۳۱/۰	۱۸/۰۵
	زایلوز+گلوکز	۲٦/۸	۱۳/۲	٦,٤	۰/۰۲۱	۳۰/٦	۱۹/٦٦
Y.lipolitica 3286	زایلوز	۸/۱	۳۲/٦	۱۵/۹	۰/۰٤۳	۳٦/۹	۲/۵۹
	گلوکز	۲۹/۱	۱۲/۳	٦/۰	۰/۰۲۵	۲۳/۹	۱۷/۳۲
	زایلوز+گلوکز	۲٦/٦	۱۳/٤	٦/۵	۰/۰۲۲	۲۹/٦	۱۸/۲۳

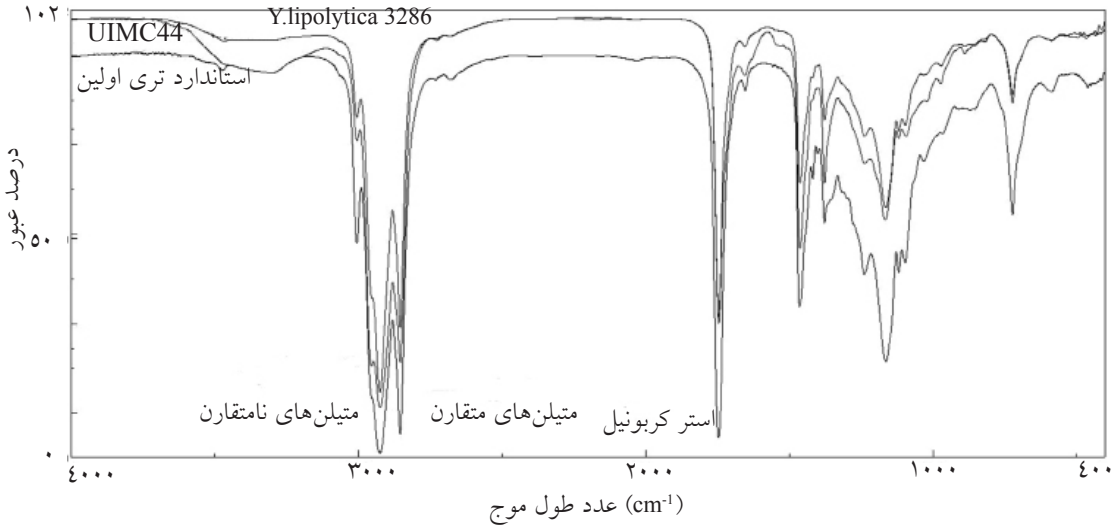


شکل ٦- عکس کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) جهت بررسی نوع روغن تولید شده توسط سویه‌های مخمری (نمونه‌های مورد بررسی از چپ به راست شامل استانداردتری اولئین، سویه UIMC35، سویه Y.lipolytica 3286، سویه UIMC44 و UIMC43 می‌باشد).

همان‌گونه که در شکل مشخص است، هم‌راستای باند مربوط به تری اولئین، باندهای مشخص مربوط به سویه‌های مخمری نیز وجود دارد که اثبات کننده تولید روغن از نوع تری آسیل گلیسرول در این سویه‌ها است و با توجه به پهنای باند ایجاد شده، می‌توان نتیجه گرفت که مقدار تولید این ترکیب در این سویه‌ها قابل توجه است. باندهایی که در دیگر نقاط وجود دارد، نشان دهنده دیگر ترکیبات لیپیدی تولید شده از قبیل مونو و دی آسیل گلیسرول و نیز استریل استرها می‌باشد. استفاده از تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک جهت بررسی کیفی لیپیدها در تحقیقات دیگر نیز انجام شده است [۲۷ و ۲۸].

بررسی لیپید تولیدی در سویه‌های مخمری با تکنیک طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

یکی از تکنیک‌های مطمئن که اخیراً جهت بررسی ترکیبات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد، تکنیک طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه است. استفاده از این تکنیک جهت بررسی بیودیزل در استانداردهای اروپایی EN 14078 [۲۹] و استاندارد ASTM D7371 method [۳۰] ذکر شده است. در تحقیقات مختلفی از این تکنیک جهت بررسی و اثبات ترکیبات روغنی قابل تبدیل به بیودیزل استفاده شده است. پیک‌های ایجاد شده در واحدهای cm^{-1} می‌باشد. ایجاد پیک در هر نقطه خاص، نشان‌دهنده گروه عاملی خاصی است. جهت مقایسه، از تری اولئین به عنوان شاهد استفاده شد و پیک‌های مربوط به روغن‌های تک یاخته تولیدی توسط سویه‌ها با استاندارد مقایسه گردید. در شکل شماره ۷ پیک مربوط به سویه‌های UIMC44، Y. lipolytica 3286 و استاندارد تری اولئین نشان داده شده است (پیک مربوط به بقیه سویه‌ها در اینجا نشان داده نشده است). پیک‌های ایجاد شده در ۱٦۷۰ تا ۱۸۲۰ و نیز ۲۸۵۰ تا ۲۹۲۹ نشان‌دهنده گروه‌های کربونیل استر و متیلن است که در ساختار اسیدهای چرب و تری آسیل گلیسرول وجود دارد [۳۱]. تمامی پیک‌ها در نقاط قید شده، اثبات کننده نوع روغن قابل تبدیل به بیودیزل است. از تکنیک FTIR جهت بررسی و تایید بیودیزل تولید شده توسط میکروجلبک Chlorella vulgaris و Senedesmis sp استفاده شده است [۳۲].



شکل ۷- گراف مربوط به تکنیک طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، (سه گراف نشان‌داده شده در شکل مربوط به استاندارد تری اولئین و روغن استخراج شده از دو سویه Y.lipolitica 3286 و UIMC44 می‌باشد).

با توجه به اینکه مواد اولیه لازم برای تولید بیودیزل در واکنش ترانس استریفیکاسیون اسیدهای چرب می‌باشند، ترکیبات اسیدچرب و تری آسیل گلیسرول موجود در لیپید تولیدی میکروارگانیسم‌ها جهت تولید بیودیزل مناسب می‌باشد [۱ و ۳]. همچنین پروفیل اسیدهای چرب تولیدی توسط مخمرها نشان‌دهنده شباهت ساختاری روغن تولیدی با روغن‌های گیاهی است که هم اکنون جهت تولید بیودیزل استفاده می‌شود [٤].

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که سویه‌های بومی با توانایی تولید لیپید قابل تبدیل به بیودیزل وجود دارد که می‌توان از آنها جهت تولید صنعتی بیودیزل استفاده کرد. غربال‌گری میکروارگانیسم‌های تولید کننده روغن تک یاخته با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی با سودان سیاه و رنگ فلورسنت نایل رد از کارآیی مناسبی برخوردار می‌باشد. روش‌های TLC و FTIR به عنوان روش‌های ارزان، دقیق و سریع جهت آنالیز کیفی روغن تک یاخته تولید شده شناخته می‌شوند. با توجه به رشد مخمرهای مورد بررسی و نیز تولید لیپید در حضور قندهای گلوکز و زایلوز، می‌توان از مواد خام اولیه ارزان قیمت جهت تولید لیپید و روغن تک یاخته استفاده کرد که ارزش بسیار بالایی از نظر تولید سوخت و تامین انرژی دارد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان به دلیل حمایت در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌گردد.

مراجع

[1]. Pan L. X., Yang D. F., Shao L., Li W., Chen G. G. and Liang Z. Q., "*Isolation of oleaginous yeast from the soil and studies of their lipid-producing capacities*". Food technology and Biotechnology. 47, pp. 215-220, 2009.

[2]. Li Y., Zhao Z., Bai F., "*High- density cultivation of oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides Y4 in fed-batch culture*", Enzyme and microbial technology, 41, pp. 312-317, 2007.

[3]. Dai C., Tao J., Xie F., Dai Y. and Zhao M., "*Biodiesel generation from oleaginous yeast Rhodotorula glutinis with xylose assimilating capacity*", African Journal of Biotechnology, 6 (18), pp. 2130-2134, 2007.

[4]. Zhao X., Kong X., Hua Y., Feng B. and Zhao Z. "*Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast Lipomyces starkeyi*", European Journal of Lipid Science and Technology, pp. 110, 405–412, 2008.

[5]. Zhao X., Wu S., Hu C., Wang Q., Hua Y. and Zhao Z. "*Lipid production from Jerusalem artichoke by Rhodosporidium toruloides Y4*", Journal of Indian Microbiology and Biotechnology. 37, 581-585, 2010.

[6]. Andrade R., Lea R., Roseiro J., Reis A. and Lopes S. T., "*Monitoring Rhodosporidium toruloides NCYC 921 batch fermentations growing under carbon and nitrogen limitation by flow cytometry*", World Journal of Microbiology and Biotechnology. 28, 1175–1184, 2012.

[7]. Kraisintu P., Yongmanitchai W. and Limtong S., "*Selection and Optimization for Lipid Production of a Newly Isolated Oleaginous Yeast*", Rhodosporidium toruloides DMKU3-TK16. Kasetsart Journal, 44: pp. 436-445, 2010.

[8]. Clesceri L. S., Greenberg A. E., Eaton A. D., *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th eds. American Public Health Association, Washington DC., 1999.

[9]. Sherma J. and Fried B., *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, Second Edition, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel. Chromatographic science series; v: 71., 1996

[10]. VijayaKumar S., Kumutha K., Santhana Krishnan P. and Gopal H., "*Effect of Carbon Sources on Lipid and Biomass Production by Oleaginous Yeast Cultures*", Madras Agricultural Journal. 97, pp. 62-64, 2010.

[11]. Johnson V., Singh M., Saini V. S., Sista V. R. and Yadav N. K., "*Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: Rhodotorula glutinis IP-30,". World Journal of Microbiology and Biotechnology*," 8, pp. 382-384, 1992.

[12]. Amaretti A., Raimondi S., Sala M., Roncaglia L., De Lucia M., Leonardi A. and Rossi M., "*Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast Rhodotorula glacialis DBVPG 4785. Microbial Cell Factories,*". 9, pp. 73-78, 2010.

[13]. He M. X., Hu Q., Gou X., Liu X., Li Q., Pan K., Zhu Q. and Wu J., "*Screening of oleaginous yeast with xylose assimilating capacity for lipid and bio-ethanol production*,". African Journal of Biotechnology. 9(49), pp. 8392-8397, 2010.

[14]. Galafassi S., Cucchetti D., Pizza F., Franzosi G., Bianchi D. and Compagno C., "*Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast Rhodotorula graminis*". Bioresource Technology. 111, pp. 398–403, 2012.

[15]. Liang Y., Tang T., Siddaramua T., Choudhary R. and Umagiliyage A. L., . "*Lipid production from sweet sorghum bagasse through yeast fermentation*," Renewable Energy. 40, pp. 130-136, 2012.

[16]. Fakas S., Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M. and Aggelis G., "*Biochemistry and biotechnology of single cell oil, in: Pandey*", A. Larroche, C. Soccol, C.R. Dussard, C.G. (Eds.), New Horizons in Biotechnology, AsiaTech Publishers Inc., New Delhi (India). pp. 38–60, 2009.

[17]. Papanikolaou S., Aggelis G., "*Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by Yarrowia lipolytica,*" Lipid Technology. 21, pp. 83–87, 2009.

[18]. Papanikolaou S. and Aggelis G., "*Yarrowia lipolytica: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids*," European Journal of Lipid Science and Technology. 112, pp. 639–654, 2010.

[19]. Ratledge C. and Cohen Z., "*Microbial and algal lipids: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? Lipid Technology*," 20, pp. 155–160, 2008.

[20]. Evans C. T. and Ratledge C., "*The role of the mitochondrial NADþ isocitrate dehydrogenase in lipid accumulation by the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides CBS 14*", Canadian Journal of Microbiology. 31, pp. 479–484, 1985.

[21]. Papanikolaou S. and Aggelis G., "*Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production*", European Journal of Lipid Science and Technology. 113, pp. 1031–1051, 2011.

[22]. Boulton C. and Ratledge C. "*Regulatory studies on citrate synthase in Candida 107*", an oleaginous yeast. Journal of Genetic and Microbiology. 121, 441–447, 1980.

[23]. Papanikolaou S., Sarantou S., Komaitis M. and Aggelis G., "*Repression of reserve lipid turnover in Cunninghamella echinulata and Mortierella isabellina cultivated in multiple limited media*", Journal of Applied Microbiology, 97, 867–874, 2004.

[24]. Wynn J. P., Hamid A. A., Li Y. and Ratledge C., "*Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi Mucor circinelloides and Mortierella alpina*", Microbiology. 147, pp. 2857–2864, 2001.

[25]. Evans C.T., Scragg A. H. and Ratledge C. A., "*Comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous microorganisms*", European Journal of Biochemistry. 130, 195–204, 1983.

[26]. Ratledge C. "*Biochemistry, stoichiometry, substrates and economics*", in: Moreton, R.S. (Ed.), Single Cell Oil, Longman Scientific & Technical, Harlow (UK). pp. 33–70, 1988.

[27]. Alvarez A. F., Alvarez H. M., Kalscheuer R., Waltermann and 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. 154, pp. 2327–2335, 2008.

[28]. Gangar A., Raychaudhur S., Rajasekharan R., "*Alteration in the cytosolic triacylglycerol biosynthetic machinery leads todecreased cell growth and triacylglycerol synthesis in oleaginous yeast*", Biochemical Journal. 365, pp. 577-589, 2002.

[29]. European Standard EN 14078: Liquid petroleum products–Determination of fatty acid methyl esters (FAME) in middle distillates – Infrared spectroscopy method.

[30]. ASTM International D7371-07: Standard Test Method for Determination of Biodiesel (Fatty Acid Methyl Esters) Content in Diesel Fuel Oil Using Mid Infrared Spectroscopy (FT-IR-ATR-PLS Method).

[31]. Lin-Vien D., Colthup N. B., Fateley W. G. and Grasseli J. G., *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, Inc. United Kingdom. 141, 1991.

[32]. Elumalai S., Sakthive R. and Kumar G. S., "*Ultra Structural and Analytical Studies of Biodiesel Producing Microalgae (Chlorella vulgaris and Senedesmis sp.) Collected from Tamil Nadu*", India. Current Botany. 2(6), pp. 19-25, 2011.