علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره نوزدهم، ویژه نامه شماره۴، بهار۱۳۹۶

تولید بیودیزل با استفاده از روش های بیوتکنولوژی و روغن میکروارگانیسمی

مرجان انشاییه [۱*]

m_enshaeieh@yahoo.com

آزاده عبدلی [۱]

محبوبه مدنی [۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷ **تاریخ پذیرش:۱۳۹۳/۱۰/۰۶**

چکیده

زمینه و هدف: مصرف زیاد از حد سوخت های فسیلی و تولید بیش از اندازه CO_2 علاوه بر مشکلات مربوط به گرم شدن کره زمین، مسایل مربوط به آلودگی هوا را نیز در پی دارد. این موضوعات منجر به توجه بیش تر به تولید بیودیزل شده است. از جمله فواید تولید بیودیزل این است که به هنگام سوختن آن، انتشار خالص CO_2 صورت نمی گیرد. بنابراین یافتن راهی زیستی برای تولید بیودیزل، نه تنها ارزش اقتصادی دارد بلکه از لحاظ زیست محیطی و تاثیر بر سلامتی انسان ها نیز ارزشمند است. هدف از این پژوهش به کارگیری قارچ مولد چربی جهت تولید سوخت زیستی و همچنین بهینه سازی فرایند تولید بوده است.

روش بررسی: در این پژوهش از قارچ مولد چربی مورتیرلا آلپینا با قابلیت تولید بالای چربی، جهت تولید روغن میکروبی استفاده شد. پس از آنالیز روغن تولید شده با کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده ای[۳] (GC-MS)، امکان تبدیل آن به بیودیزل مورد ارزیابی قرار گرفت. بهینه سازی شرایط محیط نیز برای افزایش تولید لیپید صورت پذیرفت. شرایط بهینه به دست آمده در یک شبه فرمانتور آزمایشگاهی برای تولید لیپید مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: سویه قارچی مورد نظر دارای بیش ترین میزان تولید لیپید معادل ۱۰/۹g/L بود. این سویه پس از ترانس استریفیکاسیون دارای بازده تولید بیودیزل معادل ۷۱٪ بوده و بیش ترین اسید چرب موجود در آن اولئیک اسید به میزان ۳۸٪ به دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: ترکیب روغن تولید شده در این قارچ مشابهت زیادی با روغن های گیاهی داشته و در این زمینه برای تولید سوخت زیستی با لیپید های گیاهی قابل رقابت می باشد که از نظر اقتصادی بسیار ارزشمند است.

واژه‌های کلیدی: بیودیزل، *مورتیرلا آلپینا*، ترانس استریفیکاسیون، قارچ مولد چربی.

---

*۱- (مسوول مکاتبات): ۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲- گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی ، اصفهان، ایران.

3-Gas chromatography- Mass Spectrometry

J.Env. Sci. Tech., Vol 19, Special No.4, Spring 2017

Biodiesel Production Using Biotechnology Methods and Microbial Oil

Marjan Enshaeieh [1]*
m_enshaeieh@yahoo.com
Azadeh Abdoli [1]
Mahboobeh Madani [2]

Abstract

Background and Objective: Excessive consumption of fossil fuels and excessive production of CO_2, in addition to problems related to the golabal warming cause air pollution. This has attracted more attention to biodiesel production. Among the benefits of biodiesel production is that when it burns no net CO_2 is emitted. Therefore, finding a biological way to produce biodiesel has not only economical value but also it is valuable in terms of environmental aspects and impact on human health. The goal of this study was application of oleaginous yeast for biodiesel production and optimization of production process.

Method: In this study, the oleaginous fungus *Mortierella alpina* with high capacity of lipid production was used for microbial oil production. After analyzing the produced oil by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), its potential for biodiesel production was evaluated. Also optimization of medium condition for increasing lipid production was done. The optimized condition was used in a semi laboratory (pilot-scale) fermentor I order to evaluate lipid production.

Findings: The evaluated fungal strain had the highest lipid production of 10.9g/L. This strain had biodiesel yield of 71% and the highest fatty acid was oleic acid with amount of 38%.

Conclusion: The lipid composition in this fungus has a high similarity with plants oil and can compete with plants lipid for biodiesel production and is valuable from economical point of view.

Keywords: Biodiesel, Mortierella alpine, Tran's sterification, oleaginous fungus.

1- Young Researchers and Elite Club, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. * *(Corresponding Author)*
2- Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

مقدمه

روغن های میکروبی به علت مشابهت ساختار و ترکیب اسیدهای چرب خود با روغن های گیاهی، قابلیت کاربرد در تولید سوخت زیستی را دارند (۱). سوخت های زیستی متیل و اتیل استرهای اسیدهای چرب هستند که از منابع لیپیدی قابل تجدید مشتق می شوند. مزیت این سوخت ها این است که آن ها قابل تجزیه، قابل تجدید و غیر سمی هستند؛ به همین دلیل یک سوخت جایگزین مناسب محسوب می شوند(۴-۲).

تولید بیودیزل از روغن های گیاهی و حیوانی در بسیاری از کشورها نظیر آلمان، ایتالیا، آمریکا، استرالیا، فرانسه، ژاپن، برزیل، آرژانتین، چین، اندونزی و مالزی صورت گرفته است. اما با توجه به استفاده بشر از روغن های گیاهی و حیوانی تولید بیودیزل از این منابع چندان مطلوب نیست و امکان استفاده طولانی مدت و در مقیاس زیاد برای تولید آن وجود ندارد(۵). این در حالی است که لیپیدهای میکروبی دارای مزیت های قابل توجهی هستند. این لیپیدها بر خلاف گیاهان نیازمند زمین برای کشت نیستند، میکروارگانیسم های مولد آن ها دارای چرخه زندگی کوتاه بوده، روش رشد و کشت آن ها آسان است، در مقایسه با گیاهان نیاز به نیروی انسانی و کارگر چندانی ندارند و کم تر تحت تاثیر فصل و آب و هوا قرار می گیرند. همچنین امکان افزایش مقیاس آن ها وجود دارد و پروفایل اسیدهای چرب آن ها مشابهت فوق العاده ای به روغن های گیاهی دارد(۹-۶). مهم ترین اسیدهای چرب تولید شده توسط میکروارگانیسم های مولد چربی شامل میریستیک اسید ($C_{14:0}$)، پالمیتیک اسید ($C_{16:0}$)، استئاریک اسید ($C_{18:0}$)، اولئیک اسید ($C_{18:1}$)، لینولئیک اسید ($C_{18:2}$) و لینولنیک اسید ($C_{18:3}$) می باشد که اجزای اصلی سوخت زیستی هستند (۱۱،۱۰).

سوخت زیستی به واسطه فرایند ترانس استریفیکاسیون از تری آسیل گلیسرول به وجود می آید که استرهای مونو آلکیل از اسیدهای چرب بلند زنجیره با الکل های کوتاه زنجیر را به وجود می آورد(۱۲،۲). میکروارگانیسم هایی وجود دارند که دارای قابلیت تولید و تجمع لیپید خنثی (تری آسیل گلیسرول) به میزان زیاد در سلول های خود می باشند که در این بین مخمرها و قارچ ها توجه زیادی را به خود جلب کرده اند (۱۵-۱۳). علاوه بر آن، امکان استفاده این مخمرها در تبدیل مواد لیگنوسلولزی موجود در طبیعت (ضایعات کشاورزی و فضاهای سبز) به روغن میکروبی، اهمیت موضوع را دو چندان می کند، زیرا با استفاده از این مواد فراوان و بی ارزش نیاز مخمرها به منبع کربنی برای تولید لیپید، بر طرف می شود (۱۶). بنابراین روغن های مخمری پتانسیل کاربرد در تولید سوخت زیستی را دارند(۱۷) که این توانایی به علت مشابهت اسیدهای چرب این لیپیدها به روغن های گیاهی می باشد(۱۸، ۱). عوامل متفاوت فیزیکی و شیمیایی بر میزان تولید لیپید در مخمرها موثر هستند که در این بین منبع کربنی و نسبت کربن به نیتروژن در میزان تجمع لیپید اهمیت به سزایی دارد(۱۹).

هدف این پژوهش به کارگیری قارچ مولد چربی برای تولید لیپید خنثی، استخراج این لیپید، بررسی پروفایل اسید چرب آن جهت انجام ترانس استریفیکاسیون و تولید سوخت زیستی می باشد. همچنین فرایند بهینه سازی جهت افزایش تولید لیپید در این سویه قارچی انجام گرفت تا تولید در مقیاس بالاتر مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

- فعال سازی سویه قارچی و تولید لیپید

در این پژوهش از سویه قارچی *مورتیرلا آلپینا* استفاده شد. جهت فعال سازی این سویه از محیط حاوی ۳۰ g/L گلوکز، ۲ g/L $(NH_4)_2SO_4$، ۱ g/L KH_2PO_4، ۱ g/L $MgSO_4.7H_2O$ و ۱ g/L عصاره مخمر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ °C و ۱۵۰ rpm استفاده شد. پس از آن به محیط دارای محدودیت نیتروژن که لازمه تولید لیپید در قارچ های مولد چربی است، انتقال داده شد. این محیط دارای منبع کربن گلوکز ۴۰ g/L و منبع نیتروژن به میزان ۱ g/L عصاره مخمر و ۱ g/L $(NH_4)_2SO_4$ و سایر مواد به صورت ۷ g/L KH_2PO_4، ۱/۵ g/L $MgSO_4.7H_2O$، ۲ g/L NaH_2PO_4 با pH = ۶ به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۲۵ °C و

rpm ۱۵۰ بود. این محیط جهت بررسی اولیه میزان تولید لیپید در سویه قارچی مورد بررسی، استفاده شد(۲۰،۴).

- تعیین میزان بیومس سلولی

بیومس سلولی پس از برداشت میسلیوم های قارچی از محیط با استفاده از فیلتر کردن با کاغذ وات من NO1 انجام گرفت. میسلیوم های برداشت شده به طور کامل با آب استریل شست و شو داده شد و پس از آن در دمای ^{o}C ۶۰ در آون به مدت ۱۵ ساعت خشک گردید(۲۱).

- استخراج لیپید از بیومس سلولی

استخراج لیپید با استفاده از محلول کلروفرم- متانول (۱:۱) انجام گرفت (روش Bligh & Dyer). در این روش ml ۵۰ از نمونه محیط تولید برداشت شده و بیومس سلولی آن با استفاده از کاغذ وات من NO1 جدا شد. پس از شستشوی بیومس با آب مقطر به میزان ml۱۰ HCL ۴ مولار به بیومس اضافه شده و به مدت ۳ ساعت در دمای ^{o}C ۷۰-۶۰ قرار داده شد. پس از آن ml ۲۰ متانول – کلروفرم (۱:۱) اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در شیکر قرار گرفت. پس از آن با سانتریفوژ دو فاز آلی لیپیدی و فاز آبی از یکدیگر جدا شدند. فاز آلی پایینی با کمک پیپت پاستور جدا گردید و در خلا با دسیکاتور خشک شد. وزن خشک به دست آمده میزان لیپید تولید شده را نشان می دهد(۲۲).

- تعیین درصد تولید لیپید، بازده رشد و بازده تولید لیپید

برای تعیین مقادیر فوق از فرمول های زیر استفاده شد (۲۳).

۱۰۰× وزن خشک بیومس / وزن روغن استخراج شده = در صد تولید لیپید یا محتوای لیپیدی

۱۰۰× میزان قند مصرف شده / وزن خشک بیومس = بازده رشد (Growth Yield Efficiency)

۱۰۰× میزان مصرف قند / وزن روغن تولید شده = بازده تولید لیپید (SCO Yield Efficiency)

میزان قند باقی مانده در محیط با کمک معرف دی نیترو سالیسیلات (DNS) بررسی شد. جهت ساختن این معرف ۱ گرم از دی نیترو سالیسیلات با ۲۵ گرم نمک تارتارات سدیم- پتاسیم و ۱/۶ گرم سود در میزان کمی آب مقطر حل گردید. پس از آن در بالن ژوژه به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد(۲۵،۲۴).

- بهینه سازی شرایط جهت افزایش میزان تولید لیپید

اثر شرایط فیزیکی بر روی میزان تولید لیپید مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر غلظت گلوکز و اثر نوع منبع نیتروژن بر روی میزان تولید لیپید ارزیابی گردید.

غلظت گلوکز: غلظت گلوکز در مقادیر g/L ۵۰- ۷۰- ۹۰- ۱۱۰ -۱۳۰ تغییر داده شد و میزان تولید لیپید در هر یک از غلظت ها مورد بررسی قرار گرفت. بهترین میزان برای مرحله بعدی انتخاب شد.

منبع نیتروژن: اثر منبع نیتروژن آلی عصاره مخمر و پپتون (هر یک به میزان g/L۱) و سولفات آمونیوم و کلرید آمونیوم (به میزان g/L ۱) بررسی شد و فاکتور بهینه انتخاب گردید.

غلظت سولفات آمونیوم: سولفات آمونیوم در غلظت های ۰/۵ ، ۱، ۱/۵ و ۲ گرم بر لیتر مورد بررسی قرار گرفت.

pH: اثر pH های ۵، ۶، ۷ و ۸ بر روی تولید لیپید ارزیابی شد.

مدت زمان انکوباسیون: تولید لیپید در زمان ۴۸- ۷۲- ۹۶- ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

دمای انکوباسیون در ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد مورد سنجش قرار گرفت و هوادهی در rpm ۱۵۰ و ۲۰۰ مورد بررسی قرار گرفت(۲۰).

- آنالیز لیپید تولید شده با TLC

در ابتدا آنالیز لیپید تولید شده با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک انجام گرفت. برای این منظور از صفحات سیلیکاژل $60F_{254}$ همراه با اولئیک اسید و تری اولئین به عنوان استاندارد استفاده شد تا تولید لیپید خنثی در این قارچ بررسی شود. حلال های مورد استفاده شامل n- هگزان، دی اتیل اتر و استیک اسید با نسبت ۱: ۱۵: ۸۰ بود. باندها پس از رنگ آمیزی صفحات با بخارات ید قابل مشاهده بودند(۲۶).

- تولید بیودیزل

ترانس استریفیه کردن اسیدهای چرب در فلاسک های حاوی سولفوریک اسید به عنوان کاتالیزور با نسبت مولی ۱: ۴۰ متانول به روغن استخراج شده در rpm ۱۸۰ به مدت ۵ ساعت

صورت گرفت. پس از آن دو لایه تشکیل شد که لایه بالایی حاوی سوخت زیستی بوده و به واسطه پترولیوم اتر جداسازی گردید(۴).

- آنالیز با کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده ای (GC-MS)

در ابتدا ترانس استریفیکاسیون با استفاده از سولفوریک اسید به عنوان کاتالیزور با نسبت ۸۰٪ وزن روغن مورد استفاده و متانول با نسبت ۱: ۳۰ در دمای ۵۵ °C به مدت ۶ ساعت در ۶۰ rpm صورت گرفت. بیودیزل تولید شده در فاز بالایی بوده که با کمک پترولیوم اتر جداسازی شد(۲۲،۲۳). پس از آن آنالیز با استفاده از GC-MS (HP 5972 mass selective detector, serie II gas chromatography, Hp) انجام گرفت.

- تولید لیپید در شبه فرمانتور آزمایشگاهی

برای این منظور از یک ارلن ۳ لیتری استفاده شد که میزان محیط کشت موجود در آن به صورت L ۱/۵در نظر گرفته شد تا میزان تولید لیپید در مقیاس بالاتر توسط سویه قارچی مورد بررسی قرار گیرد. شرایط بهینه به دست آمده برای تولید لیپید در مرحله بهینه سازی، در این مرحله مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون میسلیوم های قارچی فعال سازی شده، به عنوان مایه تلقیح به میزان ۵٪ محیط تولید اضافه شد(۲۱).

یافته ها

- میزان لیپید در محیط تولید قبل از بهینه سازی

این قارچ پس از ۷۲ ساعت در محیط فقیر ازت به میزان تولید لیپید(g/L)، بیومس خشک (g/L) و درصد تولید لیپید مطابق جدول ۱ رسید. نتایج ارایه شده میانگین سه بار تکرار آزمایش‌ها می باشد.

جدول۱- نتایج تولید لیپید در محیط تولید قبل از بهینه سازی

Table 1- Results of lipid production in the medium before optimization

شرایط	مقدار لیپید تولیدی (g/L)	بیومس خشک (g/L)	درصد تولید لیپید به وزن خشک
محیط تولید قبل از بهینه شدن	۵/۶	۱۷/۸	۳۱/۴۶

- تولید لیپید در حالت های مختلف بهینه سازی

نتایج تولید لیپید، بیومس خشک و در صد تولید لیپید در جدول ۲ نمایش داده شده است.

جدول ۲- تولید لیپید، بیومس خشک و درصد تولید لیپید در مورتیرلا آلپینا

Table 2- Lipid production, dry biomass and lipid productivity in Mortierella alpina

شرایط	مقدار لیپید تولیدی (g/L)	بیومس خشک (g/L)	درصد تولید لیپید به وزن خشک
غلظت گلوکز(g/L)			
۵۰	۶/۲	۱۸/۹	۳۲/۸۰
۷۰	۶/۸	۱۹/۷	۳۴/۵۱
۹۰	**۷/۶**	**۲۰/۲**	**۳۷/۶۲**
۱۱۰	۶/۶	۲۰/۵	۳۲/۱۹
۱۳۰	۴/۵	۱۵/۳	۲۹/۴۱
منبع نیتروژن(g/L)			

عصاره مخمر و سولفات آمونیوم(۱)	**۷/۸**	**۱۹/۹**	**۳۹/۱۹**
عصاره مخمر و کلرید آمونیوم(۱)	۷/۱	۱۹/۱	۳۷/۱۷
پپتون و سولفات آمونیوم(۱)	۶/۸	۱۸/۷	۳۶/۳۶
پپتون و کلرید آمونیوم(۱)	۶/۲	۱۸	۳۴/۴۴
غلظت سولفات آمونیوم (g/L)			
۰/۵	۷/۵	۱۹	۳۹/۴۷
۱	**۸/۱**	**۱۹/۹**	**۴۰/۷**
۱/۵	۷/۳	۱۸/۸	۳۸/۸۳
۲	۶/۲	۱۷/۴	۳۵/۶۳
pH			
۵	۸	۲۰	۴۰
۶	**۸/۴**	**۱۹/۸**	**۴۲/۴۲**
۷	۷/۹	۲۰/۵	۳۸/۵۳
۸	۶/۶	۱۹	۳۴/۷۳
مدت زمان انکوباسیون(h)			
۴۸	۶/۸	۱۷/۱	۳۹/۷۶
۷۲	۷/۵	۱۷/۳	۴۳/۳۵
۹۶	۷/۹	۱۷/۲	۴۵/۹۳
۱۲۰	**۹/۱**	**۱۸/۳**	**۴۹/۷۲**
۱۴۴	۸	۱۷/۹	۴۴/۶۹
دما (^{o}C)			
۲۰	۸/۱	۱۶/۵	۴۹/۰۹
۲۵	۸/۵	۱۵/۶	۵۴/۴۸
۳۰	**۹/۸**	**۱۶/۹**	**۵۷/۹۸**
هوادهی(rpm)			
۱۵۰	۹/۵	۱۶/۲	۵۸/۶۴
۲۰۰	**۱۰/۹**	**۱۸/۱**	**۶۰/۲۲**

- آنالیز اسیدهای چرب با TLC و GC-MS

باندهای ایجاد شده در صفحات TLC در مقابل استاندارد مورد استفاده وجود لیپید خنثی را اثبات می کند که این موضوع با استفاده از GC-MS نیز بررسی و تایید شد. روغن استخراج شده از مخمرها پس از متیلاسیون با GC-MS مورد بررسی قرار گرفت. ترکیب به دست آمده حاوی اولئیک اسید ۳۸٪، پالمیتیک اسید ۱۹/۱۳٪ ، پالمیتولئیک اسید ۰/۳۲٪، استئاریک اسید ۱۰/۹۸٪، لینولئیک اسید ۴/۳۸٪، لینولنیک اسید ۶۸٪ ،

آراشیدونیک اسید ۳/۱۵ ٪ و غلظت پایینی از سایر متیل استرها بود.

- تولید لیپید در مقیاس بالاتر

تولید لیپید در مقیاس بالاتر با موفقیت انجام یافت و بازده لیپیدی ۵۷٪ و میزان تولید لیپید g/L ۹/۸ به دست آمد. برای تولید بیودیزل، اسیدهای چرب زنجیر بلند نظیر اولئیک اسید، لینولئیک اسید، استئاریک اسید و پالمیتیک اسید برای عملکرد خوب موتور مورد نیاز هستند(۲۱). این اسیدهای چرب در *مورتیرلا آلپینا* با درصدهای ۴/۳۸٪، ۱۰/۹۸٪ و ۱۹/۱۳٪ یافت شدند که نشان دهنده امکان استفاده از این قارچ در زمینه های مختلف صنعتی به ویژه تولید بیودیزل می باشد.

بحث و نتیجه گیری

مهم ترین جنبه این پژوهش امکان استخراج و تبدیل روغن تولید شده در این سویه مخمری به بیودیزل می باشد. این که ترکیب روغن متیله شده با روغن گیاهی مشابهت داشته و اسیدهای چرب موجود در آن از اسیدهای چرب اصلی در ترکیب بیودیزل هستند، بسیار حایز اهمیت است. سایر تحقیقات انجام یافته توسط محققان نیز دال بر این موضوع است که روغن استخراج شده از مخمرها و قارچ های مولد چربی قابلیت تبدیل به بیودیزل را دارد. Dai و همکارانش روغن استخراج شده از مخمر *رودوتورولا گلوتینیس* را پس از ترانس استریفیکاسیون مورد بررسی قرار دادند و به دلیل وجود در صد بالایی از اولئیک اسید (۶۶/۹۶٪) ، پالمیتیک اسید (۱۸/۷۴٪) ، لینولئیک اسید (۴/۵۷٪) و استئاریک اسید (۱/۱۶٪) و سایر اسیدهای چرب با درصد پایین تر، پتانسیل تبدیل این روغن میکروبی به بیودیزل را نشان دادند (۴).

Kumar و همکارانش نیز تولید بیودیزل توسط روغن تولید شده در سویه های *مورتیرلا* را بررسی کردند (۲۱). نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر با نتایج به دست آمده توسط kumar و همکارانش کاملاً مشابهت داشته و درصد بالایی از ۴ اسید چرب مهم برای تولید بیودیزل را نشان داده است. Kraisintu و همکارانش نیز در بررسی روغن میکروبی *رودوسپوریدیوم تورولوئیدس* به درصد بالایی از اولئیک اسید (۴۱/۵۴٪)، پالمیتیک اسید(۲۲/۴۹٪)، لینولئیک اسید(۱۵/۱۲٪)، استئاریک اسید (۱۴/۵۶٪)، لینولنیک اسید(۴/۵۱٪) و سایر اسیدهای چرب به میزان جزئی دست یافتند(۲۰). تمامی این نتایج پتانسیل تبدیل روغن میکروبی به بیودیزل را نشان می دهند.

جهت بالا بردن بازدهی محصول، کاهش هزینه ها و صرفه‌ی اقتصادی لازم است میزان تولید لیپید در سویه های مورد بررسی را افزایش داد تا امکان کاربرد صنعتی آن ها افزایش داده شود. برای این منظور باید بهینه سازی شرایط محیطی از نظر فیزیکی و شیمیایی صورت پذیرد. از جمله شرایط فیزیکی مورد بررسی pH، دما و مدت زمان انکوباسیون و rpm می باشد که همگی بر رشد سویه ی میکروبی و تولید لیپید تاثیر می گذارند(۲۷-۲۹). Xiaو همکارانش نشان دادند که pH تاثیر به سزایی بر کشت Mucor circinelloides دارد (۳۰). Angerbauer و همکارانش نیز گزارش دادند که pH بر روی تولید لیپید اثر داشته و به نظر می رسد که به نوع منبع کربن نیز بستگی داشته باشد (۳۱).

Kumar و همکارانش شرایط بهینه برای سویه های *مورتیرلا* را به صورت دمای ۳۰°C، pH= ۶/۵ و مدت زمان انکوباسیون ۵ تا ۶ روز به دست آوردند. البته این شرایط با توجه به نوع سویه تا حدودی می تواند متغیر باشد(۲۱).

تجمع لیپید با فقر ازت در محیط شروع شده و تا زمان کاهش منبع کربن ادامه می یابد. البته سویه های میکروبی نظیر *یارویا* وجود دارند که قبل از کاهش منبع کربن تمایل به مصرف ذخایر خود دارند. بنابر این بر حسب سویه مورد بررسی زمان انکوباسیون متفاوت است. Leesing و همکارانش با بررسی بر *رودوتورولا گلوباسا* گزارش دادند که پس از روز هشتم میزان بیومس و تولید لیپید کاهش می یابد. به این ترتیب پس از چند روز مسلماً میزان نیتروژن موجود کاملاً تمام شده و میزان زیادی از گلوکز مصرف شده است. در کنار این موضوع pH محیط نیز کاهش می یابد و در نتیجه از رشد سلول ها ممانعت می شود(۳۲).

در این تحقیق نیز پس از ۵ روز میزان لیپید تولید شده کاهش می یابد. سایر شرایط نظیر نوع منبع نیتروژن و غلظت کربن نیز بر حسب سویه میکروبی و توانایی آن متفاوت است. در مورد منبع نیتروژنی ترکیبات نیتروژنی آلی برای تجمع لیپید مناسبند و وجود آن ها لازم است و برای رشد سلولی نیز ترکیبات نیتروژنی معدنی مورد نیاز هستند(۳۳). به همین دلیل است که از عصاره مخمر و سولفات آمونیوم در کنار هم استفاده شده است. در پژوهش حاضر نیز عصاره مخمر تاثیر بهتری بر تولید لیپید در مقایسه با پپتون داشت. Syed و همکارانش نیز گزارش دادند که میزان تولید لیپید در محیط حاوی عصاره مخمر بیش تر از محیط حاوی پپتون است. آن ها گزارش دادند بهترین منبع نیتروژن برای بیومس و تولید لیپید عصاره مخمر است(۳۴). Li و همکارانش (۳۵) ، Yong- Hong و همکارانش (۳۶) و Papanikolaou و Aggelis (۳۷) نیز سولفات آمونیوم را به عنوان منبع نیتروژنی مناسب تر گزارش دادند. Xue و همکارانش به میزان ۲۰٪ محتوای لیپیدی در مورد *رودوتورولا گلوتینیس* در حضور ۲g/L سولفات آمونیوم پس از ۵ روز انکوباسیون دست یافتند (۳۸).

بهترین غلظت گلوکز نیز با توجه به نوع سویه متفاوت است. غلظت گلوکز مهم ترین فاکتور موثر بر تولید لیپید در سویه های مولد چربی است(۳۹)، زیرا منبع کربنی لازم برای تولید اسیدهای چرب را تامین می کند اما افزایش زیاد از حد آن به علت عدم تحمل سلول های میکروبی نسبت به پتانسیل اسمزی بالا، مناسب نیست و بستگی به نوع سویه دارد. Li و همکارانش غلظت زیاد سوبسترای گلوکز (بیش تر از g/L ۱۵۰) را همراه با اثر ممانعت کننده بر مخمر *رودوسپوریدیوم تورولوئیدس* Y4 گزارش دادند (۳۵). در پژوهش حاضر نیز افزایش منبع کربن به ۱۱۰ و ۱۳۰ گرم بر لیتر باعث کاهش تولید لیپید گردید.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که سویه های قارچی مولد چربی نیز همانند سویه های مخمری مولد چربی پتانسیل بالایی برای تولید لیپید دارند و کشت و استخراج چربی تولید شده در آن ها و در مقایسه با گیاهان بسیار آسان تر بوده و بسیاری از مشکلات موجود در زمینه محدودیت روغن گیاهی برای تولید بیودیزل را از میان بر می دارد. بررسی پروفایل اسید چرب روغن قارچی پتانسیل بالای آن جهت تبدیل به بیودیزل را نشان داد و با توجه به مزایای گفته شده برای بیودیزل، فراهم آوردن زمینه های صنعتی جهت تولید آن گامی موثر در جهت منافع اقتصادی و سلامتی انسان ها بوده و از نظر زیست محیطی نیز بسیار مسالمت آمیز است. با بهینه سازی شرایط محیطی می توان تولید روغن را بسیار بالا برد و با صرف هزینه های کم تر به میزان تولید بالاتر دست یافت.

تشکر و قدردانی

این مقاله از طرح پژوهشی به کد ۹۲۰۶۲ استخراج شده و از کلیه عزیزانی که در انجام این پژوهش ما را یاری دادند، به ویژه مسئولان محترم باشگاه پژوهشگران جوان واحد دانشگاه آزاد اسلامی فلاورجان، قدردانی و تشکر می نماییم.

منابع

1- Karatay, S.E., Donmez, G., 2010. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. Bioresource Technology, Vol. 101(20), pp.7988-7990.

2- Kosa, M., Ragauskas, A.J., 2010. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. Trends in Biotechnology, Vol. 29, pp. 53-61.

3- Liu, G.Q., Lin, Q.L., Jin, X.C., Wang, X.L., Zhao, Y., 2010. Screening and fermentation optimization of microbial lipid-producing molds from forest soils. African journal of microbiology Research, Vol. 4(14), pp.1462-1468.

4- Dai, C., Tao, J., Xie, F., Dai, Y.J., Zhao, M., 2007. Biodiesel generation oleaginous yeast Rhodotorula glutinis with xylose assimilating capacity. African Journal of Biotechnology, Vol. 6(18), pp. 2130-2134.

5- Balat, M., Balat, H., 2010. Progress in biodiesel processing. Applied Energy, Vol. 87, pp. 1815-1835.

6-Amaretti, A., Raimondi, S., Sala, M., Roncaglia, L., Lucia, D.M., Leonardi, A., Rossi, M., 2010. Single cell oil of cold adapted oleaginous yeast Rhodotorula glacialis DBVPG 4785. Microbial Cell Factories, Vol. 23, pp. 59-73.

7- Li, Q., Du, W., Liu, D., 2008. Perspective of microbial oils for biodiesel production. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.80, pp.749-756.

8- Smith, V.H., Sturm, B.S.M., DeNoyelles, F.J., Billings, S.A., 2009. The ecology of algal biodiesel production. Trends in Ecology and Evolution, Vol. 25, pp. 301-309.

9- Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., 2008. Medium Optimization for lipid production through co-fermentation of Glucose and Xylose by the Oleaginous Yeast Lipomyces Starkei. European Journal of Lipid Science and Technology, Vol. 110, pp.405-412.

10- Zlatanov, M., Pavlova, K., Grigrova, D., 2001. Lipid composition of some yeast strains from Livingston Island Antarctica, Folia Microbiology, Vol. 46(5), pp. 402-406.

11- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mistorioti, P., Onjaro, G., Aggelis, G., Papanikolaou, S., 2011. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species, Energy, Vol. 36, pp.1097-1108.

12- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M., 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy, Vol. 34(1), pp.1-5.

13- Katre, G., Joshi, C.H., Khot, M., Zinjarde, S., Ravikumar, A., 2012. Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast Yarrowia lipolytica NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. AMB Express, Vol. 2(36), pp.36-55.

14- Khot, M., Kamat, S., Zinjarde, S., Pant, A., Chopade, B., Ravikumar, A., 2012. Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. Microbial Cell Factories, Vol.11, pp.1-13.

15- Ratledge, C., 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. Biochemical society, Vol. 6, pp.1047-1050.

16- Zheng, Y., Yu, X., Zeng, J., Chen, S.H., 2012. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. Biotechnology for Biofuels, Vol. 5, pp.1750-54.

17- Muniraj, I.K., Xiao, L., Hu, Z., Zhan, X., Shi, J., 2013. Microbial lipid production from potato processing wastewater using oleaginous filamentous fungi Aspergillus oryzae. Water Research, Vol. 47(10), pp. 3477-83.

18- Sriwongchai, S., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Bajwa, P.K., Lee, H., 2013. Screening of selected oleaginous yeasts for lipid production from glycerol and some factors which affect lipid production by Yarrowia lipolytica strains. Journal of Microbilogy, Biotechnology and Food Sciences, Vol. 2(5), pp. 2344-2348.

19- Braunwald, T., Schwemmlein, L., Graeff-Hönninger, S., French, W.T., Hernandez, R., Holmes, W.E., Claupein, W., 2013. Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by Rhodotorula glutinis, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 97(14), pp. 6581-8.

20- Kraisintu, P., Yongmanitchai, W., Limtong, S., 2010. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, Rdodosporidium toruloides DMKU3-TK16. Kasetsart Journal of Science, Vol.44, pp. 436-445.

21- Kumar, I., Ramalakshmi, M.A., Sivakumar, U., Santhanakrishnan, P., Zhan, X., 2011. Production of microbial oils from Mortierella sp for generation of biodiesel livestock. Afriacan Journal of Microbiology Research, Vol. 5(24), pp.4105-4111.

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

23- El-Fadaly, H., El-Ahmady, N., Marvan, E.M., 2009. Single cell oil production by an oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium. Research Journal of Microbiology, Vol. 4(8), pp. 301-313.

24- Alexander V.G., Elena, G.K., Arkady P.S., 2011. Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. International Journal of Analytical Chemistry, Vol. 10, pp.1155-1168.

25- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Analytical Chemistry, Vol.31, pp.426-432.

26- Alvarez, F.A., Alvarez, M.H., Kalscheuer, R., Waltermann, M., Steinbuchel, A., 2008. Cloning and characterization of a gene involved in triacylglycerol biosynthesis and identification of additional homologous genes in the oleaginous bacterium Rhodococcus opacus PD630. Microbiology, Vol. 154(8), pp.2327-35.

27- Enshaeieh, M., Abdoli, A., Nahvi, I., 2013. Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using Yarrowia lipolytica M7 and Candida sp. Journal of cell and molecular research, Vol. 5(1), pp.17-23.

28- Enshaeieh, M., Abdoli, A., Nahvi, I., Madani, M., 2013. Selection and optimization of single cell oil production from Rodotorula 110 using environmental waste as substrate. Journal of cell and molecular research, Vol. 4(2), pp.1-10.

29- Enshaeieh M, Nahvi I, Madani M, 2013, Improving Microbial Oil Production with Standard and native Oleaginous Yeasts by using Taguchi Design, Int. J. Environ. Sci. Technol. Available on line with DOI 10.1007/s13762-013-0373-2 in http://jest.edmgr.com. pdf.8p.

30- Xia, C.H., Zhang, J., Zhang, W., Bo, H., 2011. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by Mucor circinelloides. Biotechnology for Biofuels, Vol.4, pp. 4-15.

31- Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G.M., 2008, Conversion of sewage sludge in to lipids by lipomyces starkeyi for biodiesel production. Bioresource Technology, Vol.99, pp. 3051-3056.

32- Leesing, R., Baojungharn, R., 2011. Microbial Oil production by isolated oleaginous yeast Torulaspora globosa YU5/2, World academy of science. Engineering and Technology, Vol. 76, pp. 799-803.

33- Huang, J.Z., Shi, Q.Q., Zhou, X.L., Lin, Y.X., Xie, B.F., Wu, S.G., 1998. Studies on the breeding of mortierella isabellina mutant high producing lipid and its fermentation conditions. Microbiology, Vol. 25(4), pp. 187-191.

34- Syed, M.A., Singh, S.K., Pandey, A., Kanjilal, S., Prasad, R.B.N., 2006. Effects of various process parameters on the production of α-Linolenic acid in submerged fermentation. Food technology and Biotechnology, Vol. 44, pp. 282-287.

35- Li, Y., Zhao, Z., Bai, F., 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides Y4 in fed-batch culture. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 41, pp. 312-317.

36- Yong- Hong, L., Zong-Bao, Z., Feng-Wu, B., 2006. Optimization of culture conditions for lipid production by Rhodosporidium toruloides. Chinese Journal of Biotechnology, Vol. 22, pp. 650-656.

37- Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2002, Lipid production by Yarrowia lipolytica growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. Bioresource Technology. Vol. 82, pp.43-49.

38- Xue, F.Y., Miao, J.X., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. W., 2008. Studies on lipid production by Rhodotorulla glutinis fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. Bioresource Technology, Vol. 99, pp.5923-5927.

39- Evans, C.T., Ratledg, C., 1984. Phosphofructokinase and the regulation of the flux of carbon from glucose to lipid in the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides. Journal of General Microbiology, Vol.130, pp. 3251-3264.