ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤
صفحه ٤٨٦-٤٧٧

جداسازی، شناسایی و افزایش تولید لیپید با استفاده از اشعه UV و روش رپلیکاپرینتینگ در مخمر رودوتورولا موسیلاژینوزا

Isolation, identification and increasing of lipid production by using UV radiation and replica-printing method in *Rhodotorula musilaginosa*

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

۱-به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان
۲- استاد، دانشگاه اصفهان

Enshaeieh M*[1], Madani M[2], Abdoli A[1], Nahvi I[2]

1.MSc Student, Assistant Professor, MSc Student, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2.Professor, Esfahan University, Esfahan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_enshaeieh@yahoo.com

(تاریخ دریافت:۹۲/٤/۲۲- تاریخ پذیرش:۹۳/۷/۳۰)

چکیده

روغن‌های میکروبی به دلیل غنی بودن از اسیدهای چرب غیر اشباع اهمیت زیادی دارند. علاوه بر این از روغن‌های میکروبی می توان در جهت تولید بیودیزل استفاده کرد. بنابراین جداسازی مخمرهای با قابلیت بالای تولید لیپید و تلاش برای افزایش تولید چربی در آن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. هدف از این پژوهش، افزایش میزان تولید لیپید در مخمر رودوتورولا موسیلاژینوزا با استفاده از موتاسیون با کمک اشعه UV می‌باشد. برای این منظور در ابتدا مخمر بومی مولد چربی رودوتورولا موسیلاژینوزا جداسازی شد. تجزیه روغن تولید شده نیز با تکنیک FTIR Spectroscopy و کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده‌ای (GC-MS) انجام شد. این مخمر با استفاده از تکنیک PCR و توالی‌یابی قسمتی از 5.8S rRNA و 28S rRNA که با استفاده از آغازگرهای ITS تکثیر شده بودند، شناسایی شده و پس از آن اثر جهش‌زایی تصادفی UV بر روی میزان تولید لیپید در این مخمر مورد بررسی قرار گرفت. جهت غربالگری کلنی‌های جهش‌یافته با قابلیت تولید بیشتر لیپید از تکنیک غربالگری رپلیکا پرینتینگ استفاده شد. طی موتاسیون‌های مختلف یکی از کلنی‌های غربال شده با این تکنیک دارای افزایش تولید لیپید از میزان ۳۳/۷۰ درصد به ۵۸/۶۲ درصد بوده که معادل ۳/۰۵ گرم بر لیتر افزایش تولید لیپید می‌باشد. این نتایج نوید بخش وجود سویه‌های بومی با ارزش با پتانسیل بالای تولید لیپید، جهت کاربرد در زمینه‌های مختلف صنعتی از جمله تولید سوخت زیستی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی
جهش
مخمر مولد چربی
روغن میکروبی
رودوتورولا موسیلاژینوزا

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.4.6]

مقدمه

روغن تک‌یاخته (Single cell oil) از نظر نوع و ترکیب به روغن حاصل از گیاهان و حیوانات شباهت داشته و به عنوان روغن میکروبی، می‌تواند تعریف شود (Karatay and Donmez 2010). ریزسازواره‌هایی وجود دارند که دارای قابلیت تولید و تجمع بالای لیپید خنثی (تری آسیل گلیسرول) در سلول‌های خود می‌باشند که در این بین مخمرها و قارچ‌ها توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Ratledge 2002; Katre et al. 2012; Khot et al. 2012). لیپید تجمع یافته در داخل مخمرها به صورت لیپید خنثی بوده و شامل تری آسیل گلیسرول بوده که پاسخ القاشده توسط تنش محیطی می‌باشد (Ratledge 2005). بسیاری از مخمرهای مولد چربی توانایی تجمع لیپید به میزان بیش از ۲۰ درصد زیست توده خود را دارند (Daum et al. 2009; Kraisintu et al. 2010). گونه‌های مخمری مولد لیپید شامل جنس‌های یاروویا، کاندیدا، رودوتورولا، رودوسپوریدیوم، کریپتوکوکوس، تریکوسپورون و لیپومایسس می‌باشند (Manuel et al. 2011). جلبک‌ها و میکروجلبک‌ها نیز دارای بازده فتوسنتتیک بالا، تولید بیومس زیاد و رشد سریعی هستند که آن‌ها را به عنوان موجودات مولد چربی برای تولید سوخت زیستی مطرح می‌کند، اما نیاز به مساحت زیاد برای کشت و مدت زمان تخمیر بیشتر نسبت مخمرها، استفاده از آنها را با محدودیت مواجه ساخته‌است؛ علاوه بر آن روغن میکروجلبک‌ها نسبت به روغن‌های گیاهی، دارای تعداد بیشتری پیوند دوگانه بوده که این ویژگی احتمال اکسیداسیون آن‌ها طی ذخیره را افزایش می‌دهد و بنابراین پذیرش آن‌ها برای استفاده در تولید سوخت زیستی را کاهش می‌دهد. ترکیبات لیپیدی ذخیره شده در باکتری‌ها نیز از نوع روغن خنثی نبوده و پلی هیدروکسی آلکانوات می‌باشند که به روغن‌های گیاهی شباهت ندارند (Meng et al. 2009). روغن‌های مخمری قابلیت تولید در مقیاس بالا داشته و به عنوان سوبسترای سوخت زیستی قابل استفاده هستند (Pan et al. 2009). مخمرها به علت چرخه زندگی کوتاه، امکان افزایش مقیاس و توانایی استفاده از منابع مختلف به عنوان منابع مناسبی برای تولید روغن میکروبی مطرح هستند (Li et al. 2010; Amaretti et al. 2008).

تشکیل ذرات لیپیدی در اواخر مرحله لگاریتمی شروع شده و طی مرحله سکون ادامه می‌یابد (Raschke and Knorr 2009). دو آنزیم مهم موثر بر تجمع لیپید شامل مالیک آنزیم و ATP-سیترات لیاز می‌باشند (Fidler et al.1999; Meng et al. 2009). تحت شرایط محدودیت نیتروژن، سلول به ایجاد انرژی خاتمه می‌دهد زیرا آنزیم کلیدی موجود در چرخه سیتریک اسید و ایزوسیترات دهیدروژناز، به محض فقدان نیتروژن غیر فعال می‌شوند (Wynn and Ratledge 2005)؛ علاوه بر آن بین فعالیت ATP- سیترات لیاز و توانایی تجمع لیپید در سلول‌های مخمری رابطه قوی وجود دارد (Fidler et al. 1999 ; Meng et al. 2009). آنزیم موثر دیگر مالیک آنزیم بوده که با تولید NADPH، مهم‌ترین تنظیم‌کننده تجمع لیپید می‌باشد. طی محدودیت نیتروژن آنزیم از ایزوفرم D به ایزوفرم E تبدیل می‌شود و NADPH را برای تجمع لیپید تامین می‌کند. سنتز اسیدهای چرب در مخمر توسط هگزامری از زیر واحدهای ۳α و ۳β صورت می‌گیرد که به ترتیب توسط Fas1 و Fas2 کد می‌شوند (Kosa and Ragauskas 2010). روغن‌های میکروبی شباهت ساختاری و ترکیبی زیادی به روغن‌های گیاهی دارند که این موضوع منجر به افزایش پتانسیل آن‌ها جهت کاربرد در تولید بیودیزل می‌شود (Karatay and Donmez 2010; Zheng et al. 2012). بیودیزل، اسید چرب متیل استریفیه شده می‌باشد که قابل تجدید، قابل تجزیه و غیرسمی است (Karatay and Donmez 2010; Liu et al. 2010).

دست یافتن به سویه‌های بومی با پتانسیل تولید لیپید به میزان بالا، از نظر صنعتی بسیار ارزشمند است. استفاده از موتاسیون جهت بالا بردن ظرفیت تولیدی مخمر به همراه بهینه کردن پارامترهای فیزیکی و شیمیایی، گامی موثر برای دست یافتن به سویه‌های با ارزش است. برای ایجاد موتاسیون می‌توان از عوامل جهش‌زا نظیر اشعه UV استفاده کرد. در این مسیر ممکن است با ایجاد جهش در آنزیم‌های مربوطه، تولید لیپید افزایش یابد. این موضوع با کمک غربالگری کلنی‌های جهش‌یافته و بررسی تولید لیپید در آن‌ها ارزیابی می‌شود. هدف از این پژوهش جداسازی سویه مخمری مولد لیپید، شناسایی آن با کمک روش PCR و بهینه‌سازی تولید لیپید با استفاده از جهش تصادفی بوده‌است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.4.6]

مواد و روش‌ها

جداسازی و انتخاب مخمرهای مولد چربی

به منظور جداسازی مخمرهای مورد نظر ابتدا نمونه‌هایی مانند برگ درختان، گل‌ها و میوه‌های روغنی نظیر گردو، بادام و... به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در آب خیسانده شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول فوق به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی-لیتر محیط غنی‌کننده شامل صد گرم بر لیتر گلیسرول، یک گرم بر لیتر $(NH_4)_2SO_4$، یک گرم بر لیتر KH_2PO_4، یک گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$ و یک گرم بر لیتر عصاره مخمر در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد و به مدت ۹۶ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر (۱۸۰ rpm) قرار گرفت.

پس از آن ۰/۱ میلی لیتر از محیط قبلی به محیط جامد حاوی ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، دو گرم بر لیتر $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۵ گرم بر لیتر KH_2PO_4، دو گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۱ گرم بر لیتر $CaCl_2$ و دو درصد آگار اضافه شد و به مدت ٤٨ ساعت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. کلنی‌های به دست آمده بر روی پلیت بر اساس مورفولوژی متفاوت آن‌ها خالص‌سازی شدند (Pan et al. 2009).

آماده سازی مایه تلقیح

برای این منظور یک لوپ پر از سویه‌های مخمری خالص‌سازی شده در مرحله قبل، به ارلن مایر صد میلی‌لیتری که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط پیش تولید است، انتقال داده‌شد. این محیط دارای ۱۵ گرم بر لیتر گلوکز، ۵ گرم بر لیتر $(NH_4)_2SO_4$، یک گرم بر لیتر KH_2PO_4، ۰/۵ گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$ و ۰/۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر با pH=۵ بوده و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ rpm قرار گرفت (Pan et al. 2009).

تهیه محیط تولید

۵ میلی لیتر از مایه تلقیح به ٤٥ میلی‌لیتر از محیط تولید در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری انتقال داده شد، این محیط دارای ۳۰ گرم بر لیتر گلوکز، یک گرم بر لیتر $(NH_4)_2SO_4$، ۷ گرم بر لیتر KH_2PO_4، دو گرم بر لیتر NaH_2PO_4، ۱/۵ گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$ و یک گرم بر لیتر عصاره مخمر با pH= ٦ بوده و به مدت ۹٦ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ rpm کشت داده شد (Pan et al. 2009).

تعیین میزان لیپید و زیست توده سلولی

به منظور تعیین میزان لیپید، استخراج لیپید درون سلولی به روش Bligh and Dyer اصلاح شده صورت گرفت (Pan et al. 2009). جهت تعیین زیست توده خشک سلول نیز ۵ میلی‌لیتر از محیط تولید، در g ×۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شد. پس از شستشو با آب مقطر برای دو مرتبه، در آون ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا به وزن ثابت رسیده و خشک شود. پس از آن بیومس خشک شده وزن شد (Kraisintu et al. 2010).

شناسایی مخمرها توسط تعیین توالی RNA ریبوزومی مخمر جدا شده از طبیعت از طریق تعیین توالی قطعه‌ای از ژنوم ریبوزومی شناسایی شد. آغازگرهای به کار رفته در این پژوهش از نوع فضا ساز نسخه‌برداری[1] بودند. طول قطعات حاصل از PCR با آغازگرهای ITS1 و ITS4 در مخمرهای مختلف متفاوت بوده و شامل قسمتی از 5.8S rRNA و 28S rRNA است. پس از استخراج DNA از مخمرها (Hoffman1997)، PCR قطعه مورد نظر با استفاده از آغازگرهای ITS1 با توالی 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' به عنوان آغازگر پیشرو و ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' به عنوان آغازگر برگشتی انجام شد (Deak et al. 2000). ابتدا درجه خلوص و اندازه نسبی محصول PCR به دست آمده بر روی ژل آگارز (۱/۵ درصد) تعیین شد و سپس توسط شرکت تکاپو زیست تعیین توالی شد و توالی به دست آمده در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی تولید روغن مخمری با تکنیک FTIR[2] spectroscopy

این روش جهت تایید نوع ترکیب یک محصول به کار گرفته می-شود و اصول آن ایجاد پیک در دامنه خاصی از طیف ایجاد شده بر اساس واحد cm^{-1} می‌باشد که هر گروه شیمیایی در نقطه خاصی در گستره مشخص شده پیک می‌دهد. تولید لیپید در سویه مخمری جداسازی شده با کمک تکنیک FTIR spectroscopy، با استفاده از دستگاه مدل JASCO FT/IR-6300, Japan بررسی شد. گستره مورد بررسی دستگاه از $400\ cm^{-1}$ تا $4000\ cm^{-1}$ تنظیم شد. استاندارد تری اولئین (خریداری شده از شرکت سیگما آلدریچ-

[1] Internal transcribed spacer (ITS)
[2] Fourier transform infrared

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.4.6]

آلمان) به عنوان شاهد و برای مقایسه با روغن مخمری مورد استفاده قرار گرفت (Elumalai et al. 2011; European Standard EN 14078; Lin-Vien 19991).

تجزیه با کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده‌ای (GC-MS)

در ابتدا ترانس استریفیکاسیون با استفاده از سولفوریک اسید به عنوان کاتالیزور با نسبت ۸۰ درصد وزن روغن مورد استفاده و متانول با نسبت ۱: ۳۰ در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵/۵ ساعت در ٦۰ دور در دقیقه صورت گرفت. بیودیزل تولید شده در فاز بالایی بوده که با کمک پترولیوم اتر جداسازی شد (Liu et al. 2004; Wu et al. 2006). پس از آن تجزیه با استفاده از GC-MS (HP 5972 mass selective detector, serie II gas chromatography, Hp) انجام گرفت.

تولید بیودیزل

ترانس استریفیکاسیون در فلاسک حاوی سولفوریک اسید به عنوان کاتالیزور با نسبت مولی ۱:۳۰ متانول به روغن استخراج شده از مخمرها در ۱۷۰ rpm به مدت ۵/۵- ۵ ساعت صورت گرفت. پس از آن دو لایه تشکیل شد. لایه بالایی که حاوی سوخت زیستی بود به واسطه پترولیوم اتر جداسازی شد (Dai et al. 2007).

امکان سنجی ایجاد جهش به منظور بهینه‌سازی تولید لیپید با استفاده از اشعه UV

در ابتدا سویه مورد بررسی به محیط فعال‌سازی انتقال داده شد. پس از ٤۸ ساعت ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط به مدت ۱۰ دقیقه در دور $g \times$ ۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. بعد از این مرحله به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات، جهت رقیق شدن اضافه شد. پس از آن ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمری، کف یک پلیت استریل ریخته شده و داخل دستگاه UV قرار داده شد. مدت زمان‌های در نظر گرفته شده جهت موتاسیون شامل ۱۵، ۳۰، ٤۵ و٦۰ ثانیه بودند. پس از آن ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جهش‌یافته به پلیت حاوی محیط فقر ازت انتقال و به صورت چمنی کشت داده شد. تنها تفاوت محیط فقر ازت در این بخش با قسمت‌های قبل، اضافه کردن آگار به میزان دو درصد است. انکوباسیون به مدت ۳ تا ٤ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (Evans 1985).

غربالگری کلنی‌های جهش‌یافته با روش Replica-printing

زمانی که کلنی‌ها به قطر ۳-۲ میلی‌متر رسیدند، کاغذ وات‌من شماره یک بر روی پلیت قرار داده شد. این کار به منظور ایجاد رپلیکا پرینتینگ می‌باشد. پس از آن کاغذ به مدت ۲۰ دقیقه در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود. در مرحله بعد فیلتر کاغذی در سودان سیاه (۰/۰۸ درصد سودان در اتانول ۹۵ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه غوطه ور شد. پس از آن کاغذ به پتری دیش حاوی اتانول ۹۵ درصد منتقل شد و به مدت سه دقیقه در آن قرار داده شد تا رنگ‌های اضافی شسته شود. نهایتا به یک پتری دیش دیگر حاوی اتانول ۹۵ درصد برای ۵ دقیقه منتقل شد. پس از خشک شدن کاغذ، جهت یافتن کلنی موتانت، بررسی شد. کلنی‌های موتانت که دارای تولید لیپید بیشتری هستند لکه‌های بزرگتر و پررنگ‌تر ایجاد می‌کنند (Evans 1985).

بررسی سایر فاکتورهای موثر بر تولید چربی

در این مرحله بهینه‌سازی تولید لیپید در مخمر جداسازی شده با استفاده از روش آماری تاگوچی انجام گرفت. برای این منظور اثر ٤ فاکتور مهم بر تولید روغن مخمری مورد بررسی قرار گرفت. این فاکتورها شامل مدت زمان جهش، pH، غلظت کربن و غلظت نیتروژن معدنی بودند. در بین پارامترهای فیزیکی نیز pH جهت بررسی انتخاب شد. جدول ۱ سطوح مختلف پارامترهای مورد بررسی را نشان می‌دهد. انتخاب سطوح پارامترهای مورد بررسی با توجه به ویژگی‌های مخمر مورد نظر انجام می‌شود. برای مثال بررسی اولیه در مورد این مخمر نشان داد که مدت زمان جهش بیش از ۱۵ ثانیه بیشتر کلنی‌ها را از بین می‌برد لذا بررسی این عامل در همین محدوده انجام شد. برنامه‌ی تاگوچی نیز به انتخاب سطوح متغیرها کمک می‌کند.

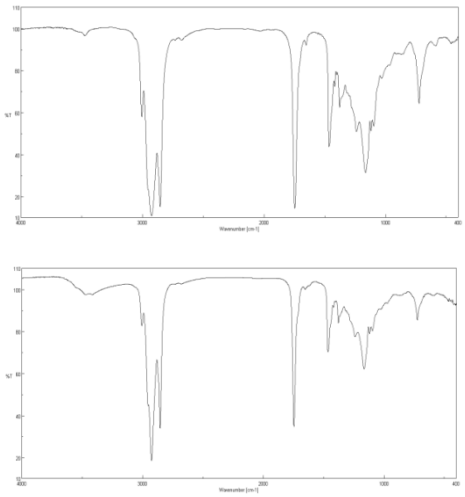
جدول۱- سطوح متغیرهای موثر بر تولید لیپید

متغیرها	سطح اول	سطح دوم	سطح سوم
مدت زمان جهش (s)	۱۰	۱۵	۲۰
pH	۵	٦	۷
غلظت گلوکز (g/l)	٤۰	٦۰	۸۰
غلظت سولفات آمونیوم(g/l)	۰/۵	۱	۱/۵

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.4.6]

نتایج و بحث

از بین ۵۳ مخمر جدا شده ۱۲ عدد از آنها مولد چربی بودند. مخمرهای مولد چربی پس از رنگ‌آمیزی با سودان سیاه دارای گرانول‌های چربی سیاه رنگ بوده که در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. این سویه‌ها برای استخراج چربی انتخاب شدند و مراحل استخراج لیپید بر روی آنها انجام گرفت. با توجه به نتایج جدول۲ ، نمونه ٤ به دلیل داشتن بیشترین میزان تولید لیپید در بین سایر مخمرهای جداسازی شده، برای مراحل بعدی انتخاب شد. تجزیه لیپید تولید شده با استفاده از تکنیک FTIR Spectroscopy انجام داده گرفت. گراف‌های حاصل از روغن مخمری استخراج شده و تری اولئین (استاندارد) در شکل ۱ (الف وب) نشان داده شده‌است. مقایسه دو گراف تشابه قابل توجهی بین روغن مخمری و استاندارد مربوطه، نشان می‌دهد. در نقاط بین $1670\ cm^{-1}$ تا $1820\ cm^{-1}$ (نوک پیک در $1745\ cm^{-1}$) پیک قابل توجهی ایجاد شده که نشان‌دهنده حضور گروه‌های کربونیل است. در حد فاصل بین $2850\ cm^{-1}$ تا $2929\ cm^{-1}$ نیز پیک‌های مشخص نشان‌دهنده گروه‌های متیلن می‌باشد. تمامی پیک‌ها در نقاط قید شده اثبات‌کننده نوع روغن قابل تبدیل به بیودیزل است. بررسی و تایید ترکیب بیودیزل به صورت یک روش شناسایی در استاندارد اروپایی به شماره EN 14078 آورده شده‌است (Elumalai et al. 2011; European Standard EN 14078; Lin-Vien 19991).



الف

ب

شکل۱- گراف FTIR مربوط به استاندارد تری اولئین (الف) و روغن سویه E (ب)

علاوه بر آن روغن استخراج شده از مخمر مورد نظر پس از متیلاسیون با کمک GC-MS مورد تجزیه قرار گرفت. ترکیب به دست آمده شامل ۱۸/٦۸ درصد پالمیتیک اسید، ٦۷/۲۹ درصد اولئیک اسید، ۱/۱۳ درصد میریستیک اسید، ۱/۲۵ درصد استئاریک اسید، ٤/۷٦ درصد لینولئیک اسید و غلظت پایینی از سایر متیل استرها بود. تولید سوخت زیستی به واسطه ترانس استریفیکاسیون با متانول صورت گرفت و بازده آن ۸۱ درصد بود. همان‌طور که گفته شد دلیل امکان استفاده از روغن میکروبی برای ترانس استریفیکاسیون مشابهت ساختاری آن به روغن‌های گیاهی است. شناسایی مخمر مورد بررسی توسط تعیین توالی RNA ریبوزومی انجام شد. قطعات به‌دست آمده از مخمر مورد بررسی بعد از PCR بر روی ژل آگارز انتقال تا خالص بودن و اندازه نسبی آن‌ها مشخص شود که بعد از تعیین توالی و تطابق در سایت NCBI دارای میزان صددرصد همولوژی و میزان ۹۸ درصد هم‌پوشانی با سویه YSC2 از گونه رودوتورولا موسیلاژینوزا بود؛ به این ترتیب ایزوله موردنظر، به عنوان ردوتورولا موسیلاژینوزا سویه YSC2 شناسایی شد. شماره ثبت توالی مربوط به این سویه در بانک ژن *KF*953903.1 می‌باشد. رودوتورولا موسیلاژینوزا دارای کلنی‌های نرم، صاف، موکوئیدی و به رنگ قرمز- نارنجی بر روی محیط PDA می‌باشد. نتیجه موتاسیون‌زایی نشان داد که مدت زمان تیمار تحت اشعه UV بر زنده ماندن و قابلیت رشد تاثیر معنی‌داری داشت و در زمان ۳۰، ٤۵ و ٦۰ ثانیه باعث عدم رشد سویه مورد تیمار شد اما در زمان ۱۵ ثانیه، سویه مورد نظر رشد کرده و کلنی برتر از نظر تولید لیپید با روش رپلیکا پرینتینگ انتخاب شد. پس از انتخاب این کلنی آن را در پلیت کشت داده و پس از آن به محیط فعال‌سازی انتقال داده شد. پس از ٤۸ ساعت مخمر مورد نظر به محیط فقر ازت انتقال داده شد. جدول۳ نتایج مربوط به غربالگری کلنی‌های با قابلیت بالاتر تولید لیپید در مدت زمان ۱۵ ثانیه را نشان می‌دهد. این کلنی‌ها با توجه به میزان و شدت رنگ ایجاد شده بر روی کاغذ وات‌من انتخاب شده و پس از طی مراحل مربوط به تولید لیپید، میزان چربی آنها به صورت کمی مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام شده است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.4.6]

جدول۲- نتایج میزان چربی تولیدی در مخمرهای جداسازی شده

نمونه	میزان لیپید (گرم بر لیتر)	وزن بیومس خشک (گرم بر لیتر)	درصد تولید لیپید نسبت به وزن خشک (٪)
۱	۲/۵۳ fgh	۹/۷۳ e	۲۶/۱۰ ab
۲	۱/۹۲ h	۸/۶۶ f	۲۲/۰۴ b
۳	۲/۸۷ efg	۱۱/۰۷ d	۲۵/۷۲ b
٤	٦/۰۲ a	۱۷/۸٤ a	۳۳/۷۰ a
٥	۲/۹۰ efg	۱۱/۸۰ d	۲٤/۷۷ b
٦	۳/۰۳ def	۱۲/۰۰ d	۲٥/٤۳ b
۷	٥/۱۸ ab	۱۷/۹۰ a	۲۸/۹۷ ab
۸	٤/۳۲ bc	۱٦/۰۱ b	۲٦/۹٥ ab
۹	۲/۰۲ gh	۸/٦۳ f	۲۳/٤۲ b
۱۰	۳/۸٥ cd	۱۳/۳۸ c	۲۸/۸۳ ab
۱۱	٤/۸۸ b	۱٦/۹۱ ab	۲۸/۹۸ ab
۱۲	۳/۷۰ cde	۱٤/۲۷ c	۲٦/۰۰ ab

* حروف کوچک انگلیسی متفاوت، نشانگر اختلاف معنی‌دار و حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف در سطح ۰/۰۵ می‌باشند.

جدول۳- نتایج تولید لیپید مربوط به کلنی‌های غربال شده با روش رپلیکاپرینتینگ

شرایط	میانگین مقدار لیپید (گرم بر لیتر)	بیومس خشک (گرم بر لیتر)	درصد تولید لیپید به وزن خشک
کلنی ۱	٦/۳۰ e	۱٦/٦٤ a	۳۷/۸٦ e
کلنی۲	٦/۳۲ e	۱٤/۸۸ bc	٤۲/٤۹ d
کلنی ۳	٦/۹۹ d	۱٤/٥۳ c	٤۸/۰۹ c
کلنی ٤	۷/٦۲ c	۱٤/۹۳ bc	٥۱/۰٥ bc
کلنی ٥	۸/۱٥ bc	۱٥/۱۹ bc	٥۳/٦۲ b
کلنی ٦	۸/٥۰ ab	۱٥/٦٦ b	٥٤/۳۱ b
کلنی ۷	۹/۰۷ a	۱٥/٤۸ bc	٥۸/٦۲ a

* حروف کوچک انگلیسی متفاوت، نشانگر اختلاف معنی‌دار و حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف در سطح ۰/۰۵ می‌باشند

با توجه به نتیجه تولید لیپید، جهش ایجاد شده در این سویه دارای اثر مثبت بوده و باعث افزایش تولید در آن به میزان حدود ۳/۰۵ گرم بر لیتر شده است. میزان تولید، قبل از ایجاد جهش معادل ٦/۰۲ گرم بر لیتر بوده و پس از ایجاد جهش در بهترین موتانت، به میزان ۹/۰۷ گرم بر لیتر رسیده‌است. تجزیه آماری و بهینه‌سازی با استفاده از روش تاگوچی انجام داده شد. جدول ٤ نتایج حاصل از بهینه‌سازی با استفاده از روش تاگوچی را نشان می‌دهد. برنامه-ریزی تاگوچی روش L9 را پیشنهاد داد که در آن ۹ آرایه (آزمایش) برای رسیدن به بهترین حالت انجام داده شد. جدول ٤ شرایط هر آزمایش به همراه نتیجه آن را نشان می‌دهد. میزان لیپید تولید شده بر اساس میانگین سه تکرار گزارش شده‌است. برنامه تاگوچی بر اساس میانگین حداقل سه تکرار آزمایش، نتایج را مورد بررسی قرار می‌دهد. جدول ٥ نتایج تجزیه واریانس را نشان می‌دهد. در این جدول درصد تاثیر پارامترهای مختلف بر میزان تولید لیپید در مخمر مورد بررسی مقایسه شده‌است. کاربرد طراحی آزمایش‌ها مانند روش تاگوچی منجر به افزایش میزان بازدهی، کاهش هزینه، صرف زمان کمتر و نتایج دقیق‌تر می‌شود. شکل ۳ میزان تاثیر فاکتورهای مختلف را که از برنامه تاگوچی به دست آمده، نشان می‌دهد. محور Y در این شکل نشان‌دهنده درصد تاثیر عوامل مختلف است و محور X نیز متغیرهای مختلف بررسی شده را نشان می‌دهد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.4.6]

جدول ٤- شرایط آرایه های L9 و نتایج حاصل از تولید لیپید

آرایه ها	مدت زمان جهش (s)	pH	غلظت گلوکز (گرم بر لیتر)	غلظت سولفات آمونیوم (گرم بر لیتر)	تولید لیپید (گرم بر لیتر)
آرایه ١	١٠	٥	٤٠	٠/٥	٨/٥٥ ^{bc}
آرایه ٢	١٠	٦	٦٠	١	٩/٣٧ ^{b}
آرایه ٣	١٠	٧	٨٠	١/٥	٥/٩٠ ^{e}
آرایه ٤	١٥	٥	٦٠	١/٥	٨/٧٩ ^{bc}
آرایه ٥	١٥	٦	٨٠	٠/٥	١٠/٨٩ ^{a}
آرایه ٦	١٥	٧	٤٠	١	٨/٠٨ ^{c}
آرایه ٧	٢٠	٥	٨٠	١	٦/٧٨ ^{d}
آرایه ٨	٢٠	٦	٤٠	١/٥	٦/٨١ ^{d}
آرایه ٩	٢٠	٧	٦٠	٠/٥	٨/٧٥ ^{bc}

* حروف کوچک انگلیسی متفاوت، نشانگر اختلاف معنی‌دار و حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف در سطح ٠/٠٥ می‌باشند.

جدول ٥- نتایج آنالیز واریانس در مورد شرایط بررسی شده

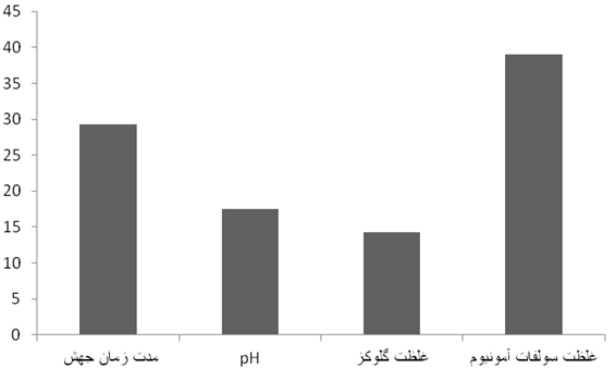
عامل	درجه آزادی	مجموع مربعات (S)	واریانس	مجموع خالص مربعات (S´)	درصد تاثیر عامل
مدت زمان جهش (s)	٢	٥/٦٠٥	٢/٨٠٢	٥/٦٠٥	٢٩/٢٥٨
pH	٢	٣/٣٤٣	١/٦٧١	٣/٣٤٣	١٧/٤٥٣
غلظت گلوکز (گرم بر لیتر)	٢	٢/٧٣٩	١/٣٦٩	٢/٧٣٩	١٤/٢٩٧
غلظت سولفات آمونیوم (گرم بر لیتر)	٢	٧/٤٧٠	٣/٧٣٥	٧/٤٧٠	٣٨/٩٨٩
مجموع	٨	١٩/١٥٧	----	١٩/١٥٧	١٠٠

بیشتر بررسی‌ها در مورد بهینه‌سازی تولید لیپید در مخمرها بر روی بهینه‌سازی شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت متمرکز شده‌است. تحقیقات کمی در زمینه اثر جهش بر روند بهینه‌سازی انجام داده‌شده و در اغلب پژوهش‌ها اثر سوبستراهای مختلف بر تولید لیپید و میزان نیتروژن معدنی و آلی سنجیده شده است. آن-چه در بین نتایج اکثر تحقیقات مشترک بود تاثیر منبع کربن و نیتروژن و یا به عبارتی نسبت کربن به نیتروژن موجود در محیط و سایر شرایط فیزیکی و شیمیایی حاکم بر محیط کشت بود. به این ترتیب در پژوهش حاضر گامی در جهت ارتقای توانایی تولید لیپید در مخمر، با استفاده از جهش تصادفی برداشته شد تا در کنار بهینه‌سازی شرایط کشت، قابلیت تولید لیپید در مخمر را بالا برده و در نتیجه سویه‌ای برتر برای مصارف صنعتی در دست داشت. جدول ٥ نشان می‌دهد که جهش می‌تواند به میزان ٢٩ درصد بر تولید لیپید اثر داشته باشد بنابراین توجه به این عامل در کنار شرایط محیطی می‌تواند بازدهی تولید لیپید را افزایش دهد.

نوع منبع کربن و غلظت آن و علاوه بر آن میزان نیتروژن موجود در محیط کشت که در کنار هم تحت عنوان نسبت کربن به نیتروژن مطرح می‌شوند تاثیر به سزایی بر تولید روغن مخمری دارند. تحقیقات نشان داده که غلظت گلوکز و نیتروژن و یا به عبارتی نسبت کربن به نیتروژن مهم‌ترین عامل در تولید روغن مخمری است (Enshaeieh et al. 2012; Enshaeieh et al. 2013 a, b; Enshaeieh et al. 2014). در پژوهش حاضر غلظت گلوکز به میزان ١٤/٢ درصد و غلظت سولفات آمونیوم به میزان ٣٨/٩ درصد یا به عبارتی مجموعا ٥٣/١ درصد بر تولید لیپید موثر بوده اند. البته افزایش غلظت گلوکز تا میزان مشخصی منجر به افزایش تولید لیپید می‌شود که این به نوع سویه مخمری و سایر شرایط محیطی بستگی دارد. Syed et al. (2006) گزارش دادند که افزایش غلظت گلوکز منجر به کاهش بیومس خشک می‌شود. این موضوع ممکن است به علت عدم تحمل سلول‌های مخمری به غلظت بالای گلوکز باشد زیرا پتانسیل اسمزی محیط را افزایش می‌دهد. Leesing et al. (2011) به بیشترین میزان تولید لیپید در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.4.6]

مخمر تورولاسپورا گلوبوسا در غلظت ۸۰ گرم بر لیتر گلوکز دست یافتند. افزایش غلظت گلوکز به بیش از ۸۰ گرم بر لیتر منجر به کاهش غلظت لیپید و بیومس شد که این نشان‌دهنده اثر ممانعت کننده گلوکز در غلظت های بالا بود. تحقیقات متعددی در مورد بهینه‌سازی شرایط محیطی جهت افزایش تولید لیپید در مخمرهای مولد چربی انجام شده‌است. مطالعات نشان داده که سولفات آمونیوم، منبع نیتروژنی است که برای تجمع لیپید ترجیح داده می‌شود. (2002) Papanikolaou and Aggelis; (2007) and Yong-Karatay and Hong et al. (2006); Li et al. میزان تجمع لیپید در سلول‌های مخمری با افزایش غلظت سولفات آمونیوم به بیش از ۱/۵ گرم بر لیتر کاهش می‌یابد.(Karatay and Donmez 2010) در مورد اثر pH Syed (2006) گزارش دادند که میزان تولید لیپید در pH=۸ و pH=٤ به صورت بر جسته‌ای کاهش می‌یابد. گزارش شده که توانایی تولید لیپید در pHهای مختلف محیط کشت تحت‌تاثیر قرار می‌گیرد و pH بهینه برای سلول‌های مخمری در محیط بین ٥ تا ٦ می‌باشد (2005) Li et al. ; Zhu et al (2008) Easterling et al.(2008). با بهینه‌سازی شرایط محیط کشت در گزارشی میزان تولید لیپید در مخمر مولد چربی رودوتورولا موسیلاژینوزا از ٣٤/٦٢ درصد به میزان ٥٨/٢ درصد افزایش یافت (Enshaeieh et al. 2013c). گزارشی دیگر از افزایش تولید لیپید با بهینه‌سازی شرایط محیطی در مورد مخمر یارویا لیپولیتیکا از میزان ٣١/٨١ درصد به میزان ٤٦/٢١ درصد داده شده‌است (Enshaeieh et al. 2013d). نتایج به دست آمده از این پژوهش‌ها ضمن مطابقت با نتایج پژوهش حاضر تاثیر بهینه‌سازی شرایط کشت بر تولید لیپید را نشان می‌دهد. این در حالی است که با انجام جهش می‌توان با صرف هزینه و زمان کمتر قابلیت تولید لیپید در مخمر را افزایش داد؛ علاوه بر آن، چنانچه موتاسیون با بهینه‌سازی شرایط محیط همراه شود تاثیر به سزایی در تولید لیپید خواهد داشت. در پژوهش حاضر میزان تولید لیپید در مخمر جداسازی شده معادل ٦/١٧ گرم بر لیتر بود که پس از انجام موتاسیون تصادفی به میزان ٩/٠٧ گرم بر لیتر در کلنی ٧ افزایش یافت. این در حالی است که زمانی که با استفاده از روش تاگوچی اثر جهش و عوامل موثر محیطی بررسی شد میزان تولید به ١٠/٩٩ گرم بر لیتر رسید. همانطور که مشخص است جهش به تنهایی عامل بسیار موثری در افزایش تولید لیپید بوده؛ هر چند شرایط محیط کشت بر بهینه‌سازی تولید لیپید موثر است ولی با کمک موتاسیون می‌توان ظرفیت و قابلیت مخمر را جهت تولید لیپید افزایش داد و بدین ترتیب موتاسیون و شرایط محیطی هر دو عواملی موثر در افزایش تولید روغن مخمری هستند.



شکل۳- نمودار میزان تاثیر متغیرهای مختلف بر میزان تولید لیپید

روش غربالگری استفاده شده نیز بسیار کاربردی است؛ چنانچه جهش منجر به افزایش تولید لیپید در کلنی‌های مورد بررسی شده باشد شدت رنگ و اندازه آن بر روی کاغذ وات‌من افزایش می‌یابد. این روش در برنامه‌های هیبریداسیون و موتاسیون جهت افزایش محتوای لیپیدی سویه مورد بررسی کاملا قابل استفاده است. همچنین این روش برای بررسی محتوای لیپیدی کلنی‌های منفرد کاربرد دارد. Evans and Ratledge (1985) به بررسی محتوای لیپیدی لیپومایسس استارکی، تریکوسپورون کوتانئوم، کاندیدا کرواتا و ساکارومایسس سروزیه با استفاده از روش رپلیکاپرینتینگ پرداختند و نشان دادند که سه سویه اول از مخمرهای مولد چربی بوده و دارای محتوای لیپیدی بالاتری نسبت به ساکارومایسس سروزیه بودند. علاوه بر انجام جهش تصادفی، با دستکاری ژن‌های موثر در مسیر و یا با استفاده از جهش های هدفمند می‌توان تولید لیپید در مخمرهای مولد چربی را افزایش داد. Beopoulos et al. (2011) در مقایسه ژنومی بین یارویا لیپولیتیکا و ساکارومایسس سروزیه به این نتیجه رسیدند که ژن *GUT2* که کد کننده گلیسرول ۳- فسفات دهیدروژناز است باعث هدایت مسیر کربن به سمت سنتز لیپید می‌شود. به این ترتیب با شناسایی آنزیم‌های موثر بر مسیر سنتز لیپید، می‌توان علاوه بر جهش‌های تصادفی نظیر موتاسیون UV، با کمک جهش-

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.4.6]

های هدفمند (Site directed) مستقیما بر روی ژن مربوطه اثر گذاشت و محتوای لیپیدی آن را افزایش داد.

نتیجه‌گیری کلی

موتاسیون به عنوان روشی موثر، منجر به افزایش میزان تولید لیپید در سویه‌های مخمری می‌شود. این روش در کنار سایر روش‌های بهینه‌سازی نظیر بهینه کردن پارامترهای فیزیکی و شیمیایی موثر بر تولید لیپید، می‌تواند منجر به افزایش بازدهی در پروسه‌های تولیدی و صنعتی شود. با دست‌کاری ژنتیکی می‌توان پتانسیل تولید در سویه مورد نظر را بالاتر برد. این سویه جهش‌یافته با میزان تولید حدود ۵۸/۶۲ درصد، قابلیت استفاده در زمینه‌های مختلف صنعتی را دارد. بازده تولید بیودیزل در این پژوهش معادل ۸۱ درصد بوده و بیشترین میزان اسید چرب موجود در آن اولئیک اسید بود. این سویه با قابلیت بالای تولید لیپید می تواند سوبسترای لازم برای تولید سوخت زیستی را فراهم نماید.

سپاسگزاری

این مقاله از طرح پژوهشی به کد ۹۲۰۶۲ (مربوط به باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان) استخراج شده و از کلیه عزیزانی که در انجام این پژوهش ما را یاری دادند، به ویژه مسئولین محترم باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، قدردانی و تشکر می‌نماییم.

منابع

Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, Lucia DM, Leonardi A, Rossi M (2010) Single cell oil of cold adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. Microbial Cell Factoties 23:59-73.

Angerbauer C, Siebenhofer M, Mittelbach M, Guebitz GM (2008) Conversion of sewage sludge in to lipids by *lipomyces starkeyi* for biodiesel production. Bioresource Technology 99: 3051-3056.

Beopoulos A, Mrozova Z, Thevenieau F, Dall MTL, Hapala I, Papanikplaou S, Chardot T, Nicaud JM (2008) Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. American Society for Microbiology 74: 7779-7789.

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 6: 2130-2134.

Daum G, Wanger A, Czabany T, Athenstaedt K (2009) Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. Biochimie 89: 243-248.

Deak T, Chen J, Beuchat LR (2000) Molecular characterization of *Yarrowialipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. Applied and Environmental Microbiology 66: 4340-4344.

Easterling ER, French WT, Hernandez R, Licha M (2009) The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rodotorula glutinis*. Bioresource Technology 100: 356-361.

Elumalai S, Sakthivel R, Ganesh Kumar S (2011) Ultra Structural and Analytical Studies of Biodiesel Producing Microalgae (*Chlorella vulgaris* and *Senedesmis* sp.) Collected from Tamil Nadu. Current Botany 2: 19-25.

Enshaeieh M, Abdoli A, Nahvi I, Madani M (2012) Bioconversion of different carbon sources in to microbial oil and biodiesel using oleaginous yeasts. Journal of Biology and Today's World 1: 82-92.

Enshaeieh M, Abdoli A, Nahvi I (2013a) Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using *Yarrowia lipolytica* M_7 and *Candida* sp. Journal of Cell and Molecular Research 5: 17-23

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 4: 1-10. (b)

Enshaeieh M, Abdoli A, Nahvi I (2013) (c) Isolation and identification of oleaginous yeast (*Rhodotorula musilaginosa*) and its potential for applications in biodiesel production. Journal of Microbial World 6: 15-23 (In Persian)

Enshaeieh M, Abdoli A, Nahvi I, Madani M (2013) (d) Production and optimization of microbial oil from oleaginous yeasts *Yarrowia lipolytica* DSM70562 and native yeast *Geotrichum* Bl, New Cellular and Molecular Biotechnology Journal 12:15-25. (In Persian)

Enshaeieh M, Nahvi I, Madani M (2014) Improving Microbial Oil Production with Standard and native Oleaginous Yeasts by using Taguchi Design. International Journal of Environmental Science and Technology 11: 597-604.

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

Evans CT, Ratledge C, Gillbert C (1985) A rapid screening method for lipid- accumulating yeast using replica- printing technique. Journal of Microbiological Methods 4: 203-210.

Fidler N, Koletzho B, Sauerwald TU (1999) Single cell oil production and application, Zootehnika, 37-45.

Hoffman CS (1997) Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons 115-119.

Karatay SE, Donmez G (2010) Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. Bioresource Technology 101: 7988-7990.

Katre G, Joshi Ch, Khot M, Zinjarde S, Ravikumar A (2012) Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.4.6]

marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel, AMB Express 2: 2191-0855.

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 11: 1-13.

Kosa M, Ragauskas AJ (2010) Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. Trends in Biotechnology 29: 53-61.

Kraisintu P, Yongmanitchai W, Limtong S (2010) Selection and optimization for lipid production of newly isolated oleaginous yeast, *Rdodosporidium toruloides* DMKU3-TK16. Kasetsart Journal (Natural Science). 44:436-445.

Leesing R, Baojungharn R (2011) Microbial oil production by isolated oleaginous yeast *Torulaspora globosa* YU5/2. Engineering and Technology 76: 799-803.

Li YH, Liu B, Sun Y, Zhao ZB, Bai FW (2005) Screening of oleaginous yeasts for broad-spectrum carbohydrates assimilation capacity. China Biotechnology 25: 39-43.

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

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

Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Grasselil JG (1991) The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. Academic Press, Inc. United Kingdom. p. 141.

Liu GY, Yuan S, Dai CC (2004) Factors affecting γ-linoleic acid content in fermented glutinous rice brewed by *Rhizopus sp.* Food Microbiology 21: 299-304.

Liu GQ, Lin QL, Jin XC, Wang XL, Zhao Y (2010) Screening and fermentation optimization of microbial lipid-producing molds from forest soils. African Journal of Microbiology 4: 1462-1468.

Manuel AJ, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG (2011) Oily yeasts as oleaginous cell factories, Applied Microbiology and Biotechnology 90: 1219-1227.

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

Pan LX, Yang DF, Shao L, Li W, Chen GG, Liang ZQ (2009) Isolation of oleaginous yeast from the soil and studies of their lipid-producing capacities. Food Technology and Biotechnology 47: 215-220.

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

Raschke D, Knorr D (2009) Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*, Journal of Microbiological Methods. 79: 178-183.

Ratledge C (2002) Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. Biochemical Society 6: 1047-1050.

Ratledge C (2005) Single cell oils. lipid research center. University of Hull. Department of biological sciences. 1-20.

Syed MA, Singh SK, Pandey A, Kanjilal S, Prasad RBN (2006) Effects of various process parameters on the production of α-Linolenic acid in submerged fermentation. Food Technology and Biotechnology 44:282-287.

Wu Q, Miao XL (2006) Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technology 97: 841-846.

Wynn PJ, Ratledge C (2005) Oils from microorganisms. Martek Bioscience Corporation, Columbia. 121-153pp.

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

Zheng Y, Yu X, Zeng J, Chen Sh (2012) Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. Biotechnology for Biofuels 5: 1750-54.

Zhu LY, Zhong MH, Wu H (2008) Efficient lipid production with Trichosporon fermentans and its use for biodiesel preparation. Bioresource Technology 99: 7881-7885.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.4.6]