بهینه سازی تولید روغن میکروبی و زایلیتول در مخمر مولد چربی *Rhodotorula mucilaginosa*

مرجان انشاییه*[۱] ، محبوبه مدنی[۲] ، آزاده عبدلی[۱]، ایرج نحوی[۳] ، فروغ عسگری کرچگانی[۱]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۸
تاریخ تصویب: ۹۴/۰۸/۲۰

چکیده

استفاده از میکروارگانیسم ها در زمینه ی تولید مواد با ارزش از نظر اقتصادی و کاربردی، در سال های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. از جمله این مواد با ارزش، روغن تک یاخته و پلی الکل ها با قابلیت کاربرد در عرصه های مختلف صنعتی می باشند. روغن تک یاخته در زمینه تولید سوخت زیستی و پلی الکل ها نظیر زایلیتول، در صنایع غذایی و دارویی بسیار ارزشمند هستند. در این پژوهش تولید بالای روغن میکروبی در مخمر Rhodotorula mucilaginosa بررسی شد و آنالیز روغن تولید شده با تکنیک FTIR Spectroscopy انجام شد. علاوه بر آن تولید زایلیتول توسط این مخمر در محیط دارای زایلوز و آنالیز

۱ کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان
(نویسنده مسئول m_enshaeieh@yahoo.com)
۲ استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان
۳ استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

(DOI): 10.22051/jab.2016.2466

زایلیتول به دست آمده با استفاده از تکنیک رنگ سنجی صورت گرفت. بهینه سازی شرایط تولید روغن میکروبی و زایلیتول با استفاده از روش تاگوچی انجام داده شد و نتایج با ارزشی فراهم آمد. این سویه در شرایط اپتیمم شامل ۱۰۰ g/L گلوکز، ۷۲ ساعت انکوباسیون، pH =۵، دمای ۲۵ °C و rpm =۱۸۰ به میزان بالای تولید لیپید معادل ۱۰/۲۱ g/L رسید. علاوه بر آن در محیط دارای ۱۴۰ گرم بر لیتر زایلوز، میزان بالای تولید زایلیتول معادل ۵۴/۹۹ g/L به دست آمد. از یافته های حاصل از این پژوهش می توان دریافت که مخمرهای بومی دارای پتانسیل بالای تولید مواد با ارزش بوده و با فراهم آوردن شرایط محیطی مناسب، می توان مخمر را به سمت تولید محصول مورد نظر هدایت کرد.

واژه های کلیدی: ***روغن تک یاخته، زایلیتول،***

Rhodotorula mucilaginosa

مقدمه

روغن تک یاخته (SCO[۱]) از نظر نوع و ترکیب اسیدهای چرب به روغن به دست آمده از گیاهان مشابهت دارد، این مشابهت پتانسیل کاربرد آن را در تولید سوخت زیستی فراهم کرده است (Karaty and Donmez, 2010, Ratledge 2002, Liu et al. 2010, Meng et al. 2009). میکروارگانیسم هایی که قابلیت تجمع لیپید به میزان بیش از ۲۰٪ بیومس خود را دارند، مولد چربی نامیده می شوند که در این بین مخمرها و قارچ ها توجه زیادی را به خود جلب کرده اند (Khot et al. 2012, Katre et al 2012, Fakas et al. 2008). علاوه بر آن، امکان استفاده ی این مخمرها در تبدیل مواد لیگنوسلولزی موجود در طبیعت به روغن میکروبی، اهمیت موضوع را دو چندان می کند (Zheng et al. 2012).

مخمرهای مولد چربی به علت سرعت رشد زیاد و توانایی آن ها در جذب منابع کربنی موجود در محصولات جانبی صنایع مختلف، به عنوان یک منبع روغنی جدید، مورد توجه هستند (Economou et al. 2010). مخمرهای مولد چربی، تری آسیل گلیسرول های غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع را تجمع می دهند (Papanikolaou et al. 2008, Raschke and Knorr, 2009). بنابراین مهم ترین جزء لیپیدی این مخمرها

۱ . Single Cell Oil

تری آسیل گلیسرول بوده که متشکل از C۱۶ و C۱۸ می باشد. این ترکیب مشابه روغن های گیاهی مثل دانه ی انگور و روغن سویا است (Vijayakumar et al. 2010). کارایی روغن بیوسنتزی تولید شده به مشخصات ژنتیکی سویه های مخمری، شرایط کشت و ترکیبات محیط کشت بستگی دارد (El-Fadaly et al. 2009).

الکل های قندی نظیر زایلیتول دارای مزایایی از قبیل مقدار کالری پایین، خاصیت آنتی اکسیدانی، شیرین کنندگی و کاهش قند خون می باشند و به همین دلیل در صنایع غذایی به عنوان مکمل و جایگزین قندی کاربرد دارند (Granstrom et al. 2007). زایلیتول دارای شیرینی مشابه سوکروز بوده اما مقدار کالری کمتری نسبت به سوکروز دارد که استفاده از آن را در صنایع غذایی مناسب می کند (Altamirano et al. 2000, EL- Batal et al. 2004). علاوه بر آن زایلیتول دارای متابولیسم غیر وابسته به انسولین بوده و بر خلاف سوکروز اسید تولید نمی کند و به همین دلیل به عنوان یک عامل موثر در جلوگیری از پوسیدگی دندان می باشد (LifHolgerson et al. 2006, Natah et al. 1997). خصوصیات برجسته ی این قند باعث استفاده از آن در محصولات غذایی مختلف می گردد (Baishan et al. 2003, Martan et al. 2006). از جمله مخمرهایی که قادر به تبدیل زایلوز به زایلیتول هستند میتوان *Pichia*، *Debaryomyces*، *Rhodotorola*، *Candida*، *Pachysolen* و *Saccharomyces* نوترکیب را نام برد (Cheng et al. 2010). D- زایلیتول به طور صنعتی از طریق احیای شیمیایی D- زایلوز حاصل می شود. از جمله معایب فرایند شیمیایی تولید زایلیتول نیاز به فشار و دمای بالا، استفاده از کاتالیزور و مراحل هوادهی و خالص سازی گران قیمت می باشد (Meinander et al. 1994)؛ در مقابل تولید زایلیتول با استفاده از روش های بیوتکنولوژی به علت عدم نیاز به کاتالیست سمی، از نظر زیست محیطی مورد تایید بوده و از اهمیت بالایی برخوردار است (Cheng et al. 2010). مخمرها برای تبدیل میکروبی زایلوز به زایلیتول بسیار با اهمیت هستند و مطمئن ترین منابع میکروبی برای کاربرد در صنایع مختلف می باشند و به علت عدم بیماری زایی بسیار با اهمیت هستند (Rao et al. 2007, Vakhlu et al. 2006). کاربرد مخمرهایی با قابلیت استفاده از منابع فراوان لیگنوسلولزی برای تولید مواد با ارزش، بسیار با اهمیت است (Saxena et al. 2009, Rao et al. 2008). مخمر رودوتورولا توانایی رشد بر روی این منابع کربنی را داشته و در شرایط فقر نیتروژن قادر به تولید SCO می باشد. این مخمر در شرایط مناسب، قادر به تولید زایلیتول از زایلوز نیز می باشد. رودوتورولا توانایی مصرف

ترکیبات نیتروژنی از محیط خود را دارد ولی در محیطی که فاقد هر گونه نیتروژن فیکس شده است نیز قابل رشد است (Easterling et al. 2009; Bura et al. 2012).

هدف از این پژوهش بررسی قابلیت تولید روغن تک یاخته و زایلیتول در مخمر بومی *Rhodotorula mucilaginosa* و بهینه سازی تولید روغن تک یاخته با استفاده از روش طراحی آزمایش ها بوده است. با استفاده از این روش و مقایسه نتایج به دست آمده می توان مخمر مورد نظر را به سمت تولید SCO و یا تولید زایلیتول هدایت کرد. این بررسی، نشان دهنده ی قابلیت بالای سویه های بومی برای کاربرد در مصارف صنعتی بوده و نیاز به خریداری سویه های خارجی برای مطالعه و کاربرد در زمینه های مختلف را بر طرف می سازد. پس از بهینه سازی شرایط تولید و بررسی ترکیبات تولید شده توسط این مخمر امکان استفاده از آن در زمینه های مختلف صنعتی وجود دارد.

مواد و روش ها

- سویه ی مخمری مورد استفاده

از مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* جداسازی و شناسایی شده در تحقیقات قبلی استفاده شد (Enshaeieh et al. 2015).

- بررسی تولید لیپید در مخمر Rhodotorula mucilaginosa

برای این منظور مخمر مورد بررسی در محیط پیش تولید تلقیح شد. این محیط حاوی ۱۵g/Lگلوکز، ۵g/L $(NH_4)_2SO_4$ ، ۱g/L KH_2PO_4، ۰/۵g/L $MgSO_4,7H_2O$ و ۰/۵g/L عصاره مخمر است. پس از آن که ۴۸ h در ۱۸۰ rpm و دمای ۲۸ °C در انکوباتور شیکردار قرار گرفت، به محیط تولید منتقل گردید. محیط تولید حاوی ۳۵g/L گلوکز، ۱g/L $(NH_4)_2SO_4$، ۳ g/L KH_2PO_4، ۰/۵g/L $MgSO_4,7H_2O$، ۱ g/L NaH_2PO_4 و ۱ g/L عصاره مخمر است. میزان تلقیح معادل ۵ mL از محیط پیش تولید داخل ۴۵ mL از محیط تولید می باشد. پس از ۹۶ ساعت میزان تولید لیپید به روش Bligh & Dyer اصلاح شده مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ml ۵۰ از نمونه محیط تولید در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آن بیومس به دست آمده دو مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. سپس به میزان ۱۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۴ مولار به نمونه مورد نظر اضافه کرده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ °C قرار داده شد. پس از آن به توده ی هیدرولیز شده با اسید، به میزان ۲۰ ml متانول- کلروفرم (۱:۱) اضافه گردید و به مدت ۲ الی ۳ ساعت در شیکر قرار داده شد. پس از آن با سانتریفوژ، فاز آبی بالایی و آلی پایینی جدا گردید. فاز آلی پایینی با کمک پیپت پاستور جدا شده و در خلا با دستگاه دسیکاتور خشک گردید، وزن

خشک به دست آمده میزان لیپید تولید شده را نشان می دهد (Pan et al. 2009).

- بررسی تولید روغن مخمری با تکنیک FTIR Spectroscopy [۱]

یکی از تکنیک هایی که جهت تایید نوع ترکیب یک محصول به کار گرفته می شود تکنیک FTIR Spectroscopy می باشد و اصول این روش ایجاد پیک در دامنه خاصی از طیف ایجاد شده بر اساس واحد بر سانتی متر می باشد که هر گروه شیمیایی در نقطه خاصی در گستره مشخص شده پیک می دهد. تولید لیپید در سویه مخمری جداسازی شده، در ابتدا به وسیله رنگ آمیزی با سودان سیاه مورد تایید قرار گرفت و به منظور تایید تکمیلی روغن تولید شده، تکنیک FTIR Spectroscopy، با استفاده از دستگاه مدل JASCO FT/IR-۶۳۰۰, Japan انجام داده شد. گستره مورد بررسی دستگاه از ۴۰۰ cm^{-1} تا ۴۰۰۰ cm^{-1} تنظیم شد. استاندارد تری اولئین (سیگما آلدریچ-آلمان) به عنوان شاهد و برای مقایسه با روغن تک یاخته تولیدی مورد استفاده قرار گرفت (Elumalai et al. 2011, European Standard EN 14078, Lin-Vien et al. 1991).

- بررسی تولید زایلیتول در مخمر رودوتورولا موسیلاژینوزا

یک لوپ از مخمر فعال شده به یک ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط پیش تولید زایلیتول (زایلوز ۶۰ g/L، سولفات آمونیوم ۵ g/L، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۲ g/L، سولفات منیزیم ۰/۵ g/L، عصاره مخمر ۵ g/L و پپتون ۱ g/L با pH= ۵/۵) انتقال داده شد و سپس ارلن در دمای ۲۵ °C در انکوباتور با ۱۵۰ rpm شیک گردید. بعد از ۴۸ ساعت از محیط فوق به نسبت ۵ درصد به ارلنهای حاوی محیط تولید (مشابه محیط پیش تولید) انتقال داده شد و در دمای ۲۵ °C با ۱۵۰ rpm شیک گردید و تولید زایلیتول، هر ۲۴ ساعت به مدت ۶ روز بررسی شد (Cheng et al. 2010).

- بررسی زایلیتول تولید شده با استفاده از تکنیک رنگ سنجی

زایلیتول تولید شده توسط سویه مخمری *Rhodotorula mucilaginosa* با استفاده از کیت شناسایی زایلیتول (شرکت مگازایم ایرلند) شناسایی و مورد تایید قرار گرفت. به منظور تشخیص کیفی و کمی زایلیتول تولید شده، از روش رنگ سنجی [۲] استفاده گردید. در این روش اکسیداسیون ملایم زایلیتول با استفاده از سدیم متا پریودات تحت شرایط ملایم اسیدی (کلریدریک اسید) به مدت ۱۰ دقیقه انجام می گردد و سپس با رامنوز مخلوط شده و در نهایت از معرف ناش (آمونیوم استات ۱۵۰ گرم بر لیتر، استیک اسید ۲ و استیل

۱ . Fourier Transform Infrared

۲ . Colorimetric method

استن ۲ (میلیلیتر بر لیتر) استفاده می شود. مخلوط فوق به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۵۳ ^{o}C حرارت داده شد و پس از سرد شدن، مقدار زایلیتول تولید شده در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازهگیری شد (Bok and Demain, 1997).

- تعیین بیومس میکروبی

محیط کشت تخمیری مربوط به تولید چربی و زایلیتول را (به صورت جداگانه) در ۶۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و با آب مقطر، ۲ بار شستشو داده شد. سپس در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، خشک گردید (Kraizintu et al. 2010; Altamirano et al. 2000).

- اندازه گیری قند باقیمانده در محیط تولید زایلیتول

در اندازه گیری قند زایلوز از معرف دی نیتروسالیسیلات استفاده شد. به محیط آبگوشت غذایی که با سانتریفوژ سلولهای آن جدا شده، معرف دی نیتروسالیسیلات (هیدروکسید سدیم g/L ۱۶، معرف دی نیتروسالیسیلات g/L ۱۰ و نمک تارتارات سدیم- پتاسیم g/L ۲۵) افزوده شده و بعد از حرارت دادن آن به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتیگراد، در آب سرد گردید و جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد (Millier, 1959).

- بهینه سازی تولید روغن تک یاخته و زایلیتول با کمک روش تاگوچی

جهت طراحی آزمایش ها از نرم افزار Qualitek-۴ استفاده شد. بهینه سازی در مورد ۵ فاکتور موثر بر تولید روغن میکروبی و زایلیتول صورت گرفت. برای هر فاکتور ۴ سطح متفاوت در نظر گرفته شد. چنانچه برای این بررسی از روش فاکتوریل استفاده شود، ۱۰۲۴ حالت متفاوت و یا به عبارتی ۱۰۲۴ آزمایش برای رسیدن به حالت بهینه لازم است. این در حالی است که با استفاده از روش تاگوچی می توان همین بررسی را به صورت کامل و تنها با ۱۶ آزمایش انجام داد. پارامترهای مورد بررسی شامل غلظت منبع کربن (در مورد روغن میکروبی منبع کربن گلوکز استفاده شد و در مورد زایلیتول از زایلوز استفاده گردید)، مدت زمان انکوباسیون، pH، دما و هوادهی بودند. این پارامترها هر کدام دارای ۴ سطح می باشند: منبع کربن: ۸۰- ۱۰۰-۱۲۰و ۱۴۰ گرم بر لیتر، مدت زمان انکوباسیون: ۴۸-۷۲-۹۶ و ۱۲۰ ساعت، pH: ۴-۵-۶ و ۷، دما: ۱۵-۲۰-۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد و rpm: ۱۲۰-۱۵۰-۱۸۰ و ۲۰۰ . بر این اساس طراحی M۱۶ توسط نرم افزار انتخاب گردید. بدین معنی که با ۱۶ آزمایش برنامه ریزی شده توسط نرم افزار، حالت بهینه برای تولید روغن میکروبی و زایلیتول به دست می آید. لازم

به توضیح است که M۱۶ یک بار برای تولید روغن تک یاخته و بار دیگر برای تولید زایلیتول به صورت جداگانه انجام داده شد. چنانچه حالت بهینه در بین ۱۶ آزمایش انجام داده شده نباشد، نرم افزار قابلیت پیش بینی و انتخاب بهترین حالت را دارد و مقدار تولید در شرایط بهینه نیز توسط نرم افزار پیش بینی می گردد. جدول ۱ طراحی M۱۶ را نشان می دهد. تمامی آزمایشات با سه تکرار کنترل شده و میانگین نتایج گزارش می گردد.

جدول ۱: طراحی M۱۶ تاگوچی برای بهینه سازی تولید لیپید

آرایه ها	منبع کربن (g/L)	مدت زمان(h)	pH	دما (°C)	rpm
آرایه ی ۱	۸۰	۴۸	۴	۱۵	۱۲۰
آرایه ی ۲	۸۰	۷۲	۵	۲۰	۱۵۰
آرایه ی ۳	۸۰	۹۶	۶	۲۵	۱۸۰
آرایه ی ۴	۸۰	۱۲۰	۷	۳۰	۲۰۰
آرایه ی ۵	۱۰۰	۴۸	۵	۲۵	۲۰۰
آرایه ی ۶	۱۰۰	۷۲	۴	۳۰	۱۸۰
آرایه ی ۷	۱۰۰	۹۶	۷	۱۵	۱۵۰
آرایه ی ۸	۱۰۰	۱۲۰	۶	۲۰	۱۲۰
آرایه ی ۹	۱۲۰	۷۲	۷	۲۵	۱۲۰
آرایه ی۱۰	۱۲۰	۷۲	۷	۲۵	۱۲۰
آرایه ی۱۱	۱۲۰	۹۶	۴	۲۰	۲۰۰
آرایه ی۱۲	۱۲۰	۱۲۰	۵	۱۵	۱۸۰
آرایه ی۱۳	۱۴۰	۴۸	۷	۲۰	۱۸۰
آرایه ی۱۴	۱۴۰	۷۲	۶	۱۵	۲۰۰
آرایه ی۱۵	۱۴۰	۹۶	۵	۳۰	۱۲۰
آرایه ی۱۶	۱۴۰	۱۲۰	۴	۲۵	۱۵۰

نتایج

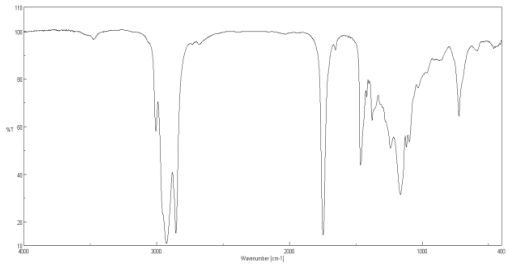
- نتایج بررسی تولید لیپید در مخمر مورد بررسی

تولید لیپید در مخمر مورد نظر در شرایط عادی (قبل از بهینه سازی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تولید لیپید در این مخمر در محیط فقر ازت به صورت میزان تولید لیپید معادل ۶/۵ گرم بر لیتر، بیومس خشک معادل ۱۸/۵۶ گرم بر لیتر و محتوای لیپیدی معادل ۳۵/۰۲٪ به دست آمد.

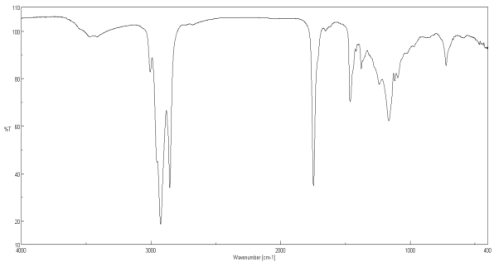
- آنالیز لیپید تولید شده با استفاده از تکنیک FTIR Spectroscopy

منحنی های حاصل از نمونه روغن تولیدی سویه مخمری *Rhodotorula*

mucilaginosa و تری اولئین استاندارد در شکل شماره ۱ (a,b) نشان داده شده است. مقایسه دو منحنی تشابه قابل توجهی بین روغن جداسازی شده از سویه مخمری و استاندارد مربوطه را نشان می دهد. در نقاط بین ۱۶۷۰ تا ۱۸۲۰ cm^{-1} (پیک در ۱۷۴۵ cm^{-1}) تشابه قابل توجهی ایجاد شده است که نشان دهنده حضور گروه های کربونیل است. در حد فاصل بین ۲۸۵۰ تا ۲۹۲۹ cm^{-1} نیز پیک های مشخص نشان دهنده گروه های متیلن می باشد. بررسی و تایید ترکیب بیودیزل با استفاده از FTIR Spectroscopy به صورت یک متود شناسایی در استاندارد اروپایی به شماره EN ۱۴۰۷۸ آورده شده است (European Standard EN 14078; Elumalai et al., 2011; Lin-Vien, 1991).



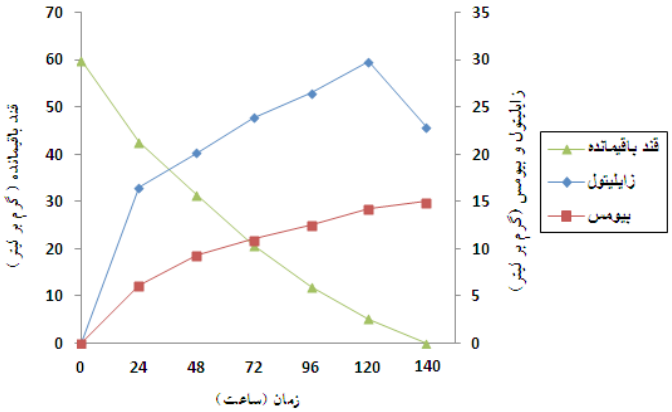
شکل شماره a۱:
منحنی FTIR مربوط به استاندارد تری اولئین



شکل شماره b۱:
منحنی FTIR مربوط به روغن سویه ی E

- بررسی تولید زایلیتول با استفاده از روش رنگ سنجی

مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* بعد از ۲۴ ساعت قادر به تولید زایلیتول میباشد. زایلیتول تولید شده توسط این مخمر با استفاده از کیت شناسایی زایلیتول شناسایی و تایید شد. همچنین مقدار تولید، با استفاده از روش رنگسنجی اندازهگیری گردید. همانطور که در شکل ۲ مشاهده میشود پس از ۱۲۰ ساعت تولید زایلیتول کاهش یافته است این موضوع به انتخاب محدوده ی بهینه سازی برای غلظت زایلوز کمک می کند. بیشترین تولید در روز پنجم و معادل ۲۹/۷۸ گرم بر لیتر می باشد. میزان قند اولیه نیز ۶۰ گرم بر لیتر (۶٪) بوده است. همچنین مقدار قند زایلوز باقیمانده و مقدار بیومس، طی این فرآیند تخمیر اندازهگیری شد (شکل ۲). این نتایج مربوط به قبل از بهینه سازی شرایط می باشد.



شکل ۲: منحنی تولید زایلیتول در مخمر رودوتورولا موسیلاژینوزا

– بهینه سازی تولید لیپید میکروبی و زایلیتول

جدول ۲ نتایج تولید لیپید میکروبی و زایلیتول را پس از انجام طراحی تاگوچی نشان می دهد. همان طور که جدول نشان می دهد در مورد لیپید میکروبی بیشترین میزان تولید در آرایه ی ۵ حاصل شده است که معادل ۸/۹۴ گرم بر لیتر بوده است. با مراجعه به جدول ۱ می توان شرایط انجام آزمون در آرایه ی ۵ را بررسی کرد. همچنین در جدول ۲ مشاهده می شود که بیشترین میزان تولید زایلیتول در آرایه ی ۱۶ حاصل شده و معادل ۵۴/۹۳ گرم بر لیتر گزارش شده است. قابل توجه است که در طراحی تاگوچی آرایه ای که در آن بهترین نتیجه به دست آمده است لزوماً بهترین شرایط برای بهینه سازی را ندارد بلکه ممکن است حالت بهینه در بین مواردی باشد که انجام داده نشده است. توانایی این نرم افزار در پیش بینی حالت بهینه به ما کمک می کند تا در موردی مثل بررسی انجام شده در این پژوهش که ۱۰۲۴ حالت طبق فاکتوریل وجود دارد آرایه ی بهینه توسط نرم افزار با توجه به نتایج به دست آمده از ۱۶ آرایه ی انجام شده، پیش بینی گردد.

جدول ۲: نتایج تولید لیپید و زایلیتول در طراحی تاگوچی

آرایه ها	میزان تولید لیپید(g/L)	میزان تولید زایلیتول(g/L)
آرایه ی ۱	۴/۸۴	۲۶/۳۰
آرایه ی ۲	۷/۹	۲۹/۷۰
آرایه ی ۳	۸/۰۱	۳۵/۶۲
آرایه ی ۴	۶/۰۰	۳۰/۸۳
آرایه ی ۵	۸/۹۴	۳۴/۲۱
آرایه ی ۶	۸/۸۰	۳۳/۳۰
آرایه ی ۷	۶/۳۴	۳۱/۴۱
آرایه ی ۸	۶/۷۵	۳۶/۸۵
آرایه ی ۹	۵/۷۴	۳۰/۸۰

آرایه ی۱۰	۶/۸۱	۳۳/۵۴
آرایه ی۱۱	۶/۲۱	۴۲/۶۱
آرایه ی۱۲	۶/۰۹	۴۴/۳۶
آرایه ی۱۳	۴/۳۴	۳۷/۸۰
آرایه ی۱۴	۵/۰۰	۳۹/۴۰
آرایه ی۱۵	۵/۷۰	۴۲/۸۱
آرایه ی۱۶	۵/۷۳	۵۴/۹۳

آن چه در بهینه سازی اهمیت زیادی دارد بررسی میزان تاثیر پارامترهای مختلف بر نتیجه نهایی می باشد. چون در مواردی که یک عامل تاثیر به سزایی نداشته باشد می توان به طور کلی آن را حذف کرد و این موضوع از لحاظ صنعتی بسیار مهم است. چون مثلاً ممکن است عاملی مانند دما تاثیر چندانی بر روند تولید نداشته باشد، بنابراین عدم نیاز به کنترل آن طی فرایند تولید می تواند سهم به سزایی در کاهش هزینه ها داشته باشد. جداول ۳ و ۴ میزان تاثیر عوامل مختلف به ترتیب بر تولید لیپید و زایلیتول را با استفاده از آنالیز واریانس توسط نرم افزار نشان می دهد. مقایسه نتایج دو جدول نشان می دهد که در هر دو مورد غلظت منبع کربن مهم ترین و بیشترین تاثیر را بر میزان تولید داشته است و عاملی مانند rpm در هر دو مورد کمترین میزان تاثیر را بر فرایند تولید داشته است. توجه به میزان تاثیر سایر پارامترها در مورد تولید این دو ماده قابل توجه است. در قسمت های بعدی توضیح داده خواهد شد که اطلاع از تفاوت میزان تاثیر پارامترهای مختلف، چگونه در هدایت مخمر به سمت تولید ماده ی نهایی مورد انتظار، موثر است.

جدول ۳: نتایج آنالیز واریانس در مورد تولید روغن تک یاخته

عامل	درجه آزادی	مجموع مربعات(S)	واریانس	مجموع خالص مربعات(S´)	درصد تاثیر عامل
منبع کربن (g/L)	۳	۱۳/۲۲۷	۴/۴۰۹	۱۳/۲۲۷	۴۷/۷۷۲
مدت زمان (h)	۳	۳/۱۹۷	۱/۰۶۵	۳/۱۹۷	۱۱/۵۴۶
pH	۳	۳/۳	۱/۱	۳/۳	۱۱/۹۲
دما (ºC)	۳	۶/۶۴۷	۲/۲۱۵	۶/۶۴۷	۲۴/۰۰۶
rpm	۳	۱/۳۱۶	۰/۴۳۸	۱/۳۱۶	۴/۷۵۴
عوامل محیطی/خطا	۰	-	-	-	۰
مجموع	۱۵	۲۷/۶۸۹	-	۲۷/۶۸۹	۱۰۰

جدول ۴: نتایج آنالیز واریانس در مورد تولید زایلیتول

عامل	درجه آزادی	مجموع مربعات(S)	واریانس	مجموع خالص مربعات(S´)	درصد تاثیر عامل
منبع کربن (g/L)	۳	۳۸۱/۲۲۹	۱۲۷/۰۷۶	۳۸۱/۲۲۹	۵۰/۵۱۷
مدت زمان (h)	۳	۲۱۶/۹۴۱	۷۲/۳۱۳	۲۱۶/۹۴۱	۲۸/۷۴۷
pH	۳	۷۸/۸	۲۶/۲۶۶	۷۸/۸	۱۰/۴۴۱
دما (ºC)	۳	۶۰/۲۲۶	۲۰/۰۷۵	۶۰/۲۲۶	۷/۹۸
rpm	۳	۱۷/۴۵۲	۵/۸۱۷	۱۷/۴۵۲	۲/۳۱۲
عوامل محیطی/خطا	۰	-	-	-	۰
مجموع	۱۵	۷۵۴/۶۴۹	-	۷۵۴/۶۴۹	۱۰۰

با کمک نرم افزار می توان حالت بهینه برای تولید لیپید میکروبی و زایلیتول را نیز به صورت جداگانه پیش بینی کرد. جداول ۵ و ۶ حالت بهینه ی پیش بینی شده توسط نرم افزار را نشان می دهد. در حالت بهینه ی پیش بینی شده توسط نرم افزار میزان تولید روغن تک یاخته معادل ۱۰/۳۷۲ گرم بر لیتر پیش بینی شده است. بررسی آزمون در این حالت این مسئله را تایید کرد و میانگین تولید حاصل از سه بار تکرار آزمایش در این حالت به میزان ۱۰/۲۱ گرم بر لیتر رسید. در مورد زایلیتول نیز، تولید در حالت بهینه میزان ۵۵/۹۸۷ گرم بر لیتر پیش بینی شده است که به میزان تولید زایلیتول در آرایه ی ۱۶ نزدیک است، علاوه بر آن میانگین تولید زایلیتول در حالت پیش بینی شده معادل ۵۴/۹۹ گرم بر لیتر رسید.

جدول۵: حالت بهینه ی پیش بینی شده توسط نرم افزار تاگوچی برای بیشترین تولید روغن تک یاخته

فاکتورهای مختلف	شماره سطح	مقدار سطح
منبع کربن (g/L)	۲	۱۰۰
مدت زمان (h)	۲	۷۲
pH	۲	۵
دما (ºC)	۳	۲۵
rpm	۳	۱۸۰

جدول ۶: حالت بهینه ی پیش بینی شده توسط نرم افزار تاگوچی برای بیشترین تولید زایلیتول

فاکتورهای مختلف	شماره سطح	مقدار سطح
منبع کربن (g/L)	۴	۱۴۰
مدت زمان (h)	۴	۱۲۰
pH	۱	۴
دما (ºC)	۳	۲۵
rpm	۳	۱۸۰

مزیت دیگری که نرم افزار تاگوچی دارد این است که بر همکنش های عوامل مختلف را نیز ارزیابی می کند و چنانچه برای مطالعه ای لازم باشد برهمکنش های فاکتورهای مورد نظر را بررسی کرد، نرم افزار اطلاعات لازم را در اختیار می گذارد. جداول ۷ و ۸ برهمکنش های عوامل مختلف را به ترتیب در مورد تولید روغن تک یاخته و زایلیتول ارائه می دهد. توجه به تاثیر متقابل عوامل بر روی یکدیگر قابل توجه است. ممکن است عاملی که به تنهایی تاثیر چندانی ندارد در تقابل با عامل دیگر موثر باشد؛ به عنوان مثال عاملی مثل rpm به تنهایی تاثیر به سزایی بر تولید زایلیتول نداشت ولی دقت در جدول ۸ نشان می دهد که این عامل در برهمکنش با pH دارای تاثیر ۷۲/۸۹٪ است.

جدول ۷: تاثیر متقابل عوامل مختلف در مورد تولید روغن تک یاخته

شماره	Interacting Factor Pairs	(%)SI	Opt
۱	Time ×pH	۵۴/۳۴	(۱و۲)
۲	Carbone source ×rpm	۳۷/۷۱	(۲و۴)
۳	Time × Temperature	۳۶/۹۵	(۱و۳)
۴	Carbone source ×Time	۳۴/۷۸	(۲و۱)
۵	Carbone source × pH	۳۱/۷۳	(۲و۲)
۶	Carbone source × Temperature	۲۸/۸۰	(۲و۳)
۷	pH ×rpm	۱۴/۷۸	(۲و۴)
۸	pH × Temperature	۴/۷۸	(۲و۳)
۹	Temperature × rpm	۳/۸۰	(۳و۴)
۱۰	Time× rpm	۲/۰۶	(۱و۳)

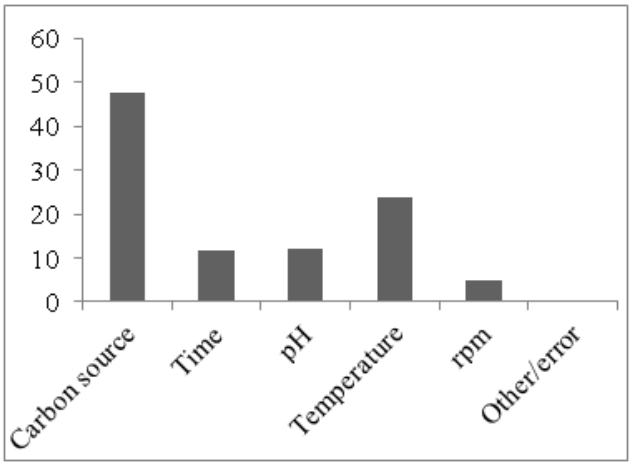
شاخص شدت برهمکنش برای پارامترهای مختلف =SI

نشان دهنده ی سطوح مطلوب فاکتور ها برای شرایط بهینه سازی = Opt

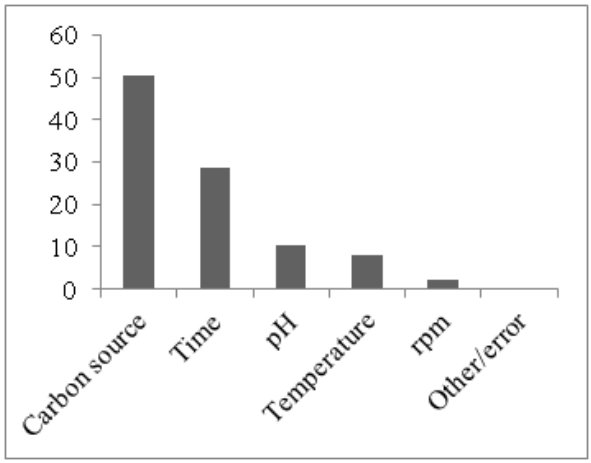
جدول ۸: تاثیر متقابل عوامل مختلف در مورد تولید زایلیتول

شماره	Interacting Factor Pairs	(%)SI	Opt
۱	pH ×rpm	۷۲/۸۹	(۱و۲)
۲	pH × Temperature	۵۴/۰۸	(۱و۳)
۳	Time × Temperature	۳۷/۰۲	(۴و۳)
۴	Temperature ×rpm	۲۱/۴۱	(۳و۲)
۵	Time× pH	۲۰/۱۰	(۴و۱)
۶	Carbone source × rpm	۱۵/۴۳	(۴و۲)
۷	Time ×rpm	۱۴/۵۶	(۴و۲)
۸	Carbone source × Time	۷/۵۲	(۴و۴)
۹	Carbone source × pH	۴/۳۴	(۴و۱)
۱۰	Carbone source × Temperature	۳/۵۶	(۴و۳)

مقایسه ی نمودارهای میله ای در مورد توزیع درصد تاثیر پارامترهای موثر بر تولید لیپید و زایلیتول قابل توجه است. شکل ۳ این نمودارها را نشان می دهد. مقایسه ی این دو نمودار نشان می دهد که مدت زمان در مورد تولید زایلیتول دارای تاثیر بیشتری در مقایسه با تولید لیپید میکروبی است و دما بر تولید لیپید میکروبی موثرتر از زایلیتول عمل کرده است.



شکل شماره a۳:
نمودار دایره ای مربوط به روغن تک یاخته



شکل شماره b ۳:
نمودار دایره ای مربوط به زایلیتول

بحث

در این پژوهش بهینه سازی تولید روغن تک یاخته و زایلیتول با استفاده از یک سویه ی مخمری بومی انجام داده شد. استفاده از لیپید های میکروبی به عنوان منبع جایگزین روغن و چربی برای مصارف انسان ها در سال های ابتدایی قرن ۲۰ مورد توجه قرار گرفت. این روغن قابلیت استفاده در صنایع مختلف از جمله تولید سوخت زیستی را دارد(Beopolus et al. 2008). تعیین سوبسترای موثر برای تجمع لیپید و شرایط بهینه با انجام آزمون در مورد میکروارگانیسم ها قابل تشخیص است (Fakas et al. 2008).

مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* دارای قابلیت بالایی در زمینه ی تولید لیپید بوده و میزان تولید آن به g/L ۱۰/۲۱ رسید که در مقایسه با گزارش های داده شده میزان تولید قابل توجهی است. در گزارش Leesing و همکارانش (۲۰۱۱) مخمر مولد چربی *torulaspora globosa* سویه ی YU۵ جداسازی شده و به میزان تولید معادل g/L ۴/۱۶ در محیط دارای محدودیت نیتروژن دست یافتند.

در زمینه بهینه سازی روغن میکروبی نیز پژوهش های زیادی توسط محققین انجام شده است. Fei و همکارانش (۲۰۱۰) گزارش دادند که بیشتر مطالعات بر تولید لیپید در میکروارگانیسم های مولد چربی روی گلوکز به عنوان منبع کربن انجام شده است. Vijayakumar و همکارانش (۲۰۱۱) اثر منابع کربنی مختلف نظیر گلوکز، فروکتوز و سوکروز را روی سویه های *Rhodotorula glutinis*، *Rhodosporidium toruloides* و *Lipomyces starkeyi* بررسی کردند. در بین منابع کربنی مختلف گلوکز میزان بیومس و محتوای لیپیدی بیشتری ایجاد کرده است. در بین سویه های مخمری مورد بررسی توسط آن ها نیز رودوتورولا گلوتینیس میزان لیپید بیشتری معادل g/L ۲/۴۳ (٪۲۳/۷۸) بر گلوکز تولید کرده است. در اکثر تحقیقات انجام شده بهینه سازی تولید لیپید میکروبی با استفاده از روش یک عامل در یک زمان انجام داده شده است. کاربرد روش طراحی آزمایش ها بر مبنای تاگوچی نقطه ی عطفی در بهینه سازی تولید لیپید میکروبی می باشد. پژوهش های انجام داده شده توسط Enshaeieh و همکارانش نشان دهنده ی موثر بودن روش تاگوچی در بهینه سازی تولید لیپید میکروبی در مخمرهای *Yarrowia lipolytica*، *Cryptococcus albidus* و جنس های *Rhodotorula* و *Geotrichum* بوده است(Enshaeieh et al. 2014, 2013a, 2012). بهینه سازی تولید لیپید توسط روش یک عامل در یک زمان نیز توسط همین محقق انجام داده شده است(Enshaeieh et al, 2013 b, c) مقایسه ی مراحل و نتایج این تحقیقات، توانایی روش طراحی آزمایش ها را در امر بهینه سازی نشان می دهد.

در پژوهش حاضر بهترین غلظت منبع کربنی در مورد مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* معادل g/L ۱۰۰ برای تولید لیپید میکروبی به دست آمد. در خصوص میزان منبع کربن مورد استفاده، Syed و همکارانش (۲۰۰۶) گزارش دادند که افزایش غلظت گلوکز منجر به کاهش بیومس خشک می شود. این موضوع ممکن است به علت عدم تحمل سلول های مخمری به غلظت بالای گلوکز باشد زیرا پتانسیل اسمزی محیط را افزایش می دهد. Lees-ing و همکاران (۲۰۱۱) بیشترین تولید لیپید را در غلظت معادل g/L ۸۰ گلوکز گزارش کرده و نشان دادند که افزایش غلظت گلوکز به بیش از این مقدار بر تولید لیپید اثر ممانعت کننده دارد.

بیشترین میزان تولید در مورد *Rhodotorula mucilaginosa* در دمای C° ۲۵، pH =۵ و مدت زمان h ۷۲ به دست آمد. Zhu و همکاران (۲۰۰۸)، An-gerbauer و همکاران(۲۰۰۸)، Easterling و همکاران(۲۰۰۹) و Li و همکاران (۲۰۰۵) گزارش داده اند که توانایی تولید لیپید

به واسطه pH های مختلف محیط کشت تحت تاثیر قرار می گیرد و بهترین pH برای سلول های مخمری بین ۵ تا ۶ می باشد. Dai و همکاران (۲۰۰۷) نیز شرایط فیزیکی برای مخمر *Rhodotorula glutinis* را به صورت دمای ۲۸ C° و ۵= pH به دست آوردند که در این حالت محتوای لیپیدی آن بر منبع کربن گلوکز به ۴۹/۲۵٪ رسیده است. همان طور که مشاهده می شود نتایج گزارش شده با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر همخوانی دارند.

تولید میکروبی زایلیتول با توجه به معایب روش شیمیایی جایگزین مناسبی است. معمولاً زایلیتول توسط میکروارگانیسم هایی که به طور طبیعی مصرف کننده زایلوز بوده و دارای آنزیم زایلوز ردوکتاز می باشند، تولید می شود (Saha and Bothast, 1999).

Cheng و همکاران (۲۰۱۰) اثر افزایش غلظت زایلوز را بر تولید زایلیتول توسط *Candida tropicalis* ، بررسی و بهترین غلظت قندی را g/L۱۲۰ با مقدار g/L ۸۷/۱ زایلیتول گزارش کردند. Bura و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که سویه مخمری *Rhodotorula mucilaginosa* PTD۳، قادر به تولید زایلیتول با بازدهی ۶۷ درصد در g/L ۱۵۰ زایلوز بوده است. در اکثر مطالعات، منبع کربنی زایلوز به عنوان سوبسترا و فراوانترین قند موجود در ترکیبات همی‌سلولزی هیدرولیز شده برای تولید زایلیتول مورد استفاده قرار گرفته است. Vajzovic و همکاران (۲۰۱۲) سویه ی *Rhodotorula mucilaginosa* PTD۳ II را بررسی کرده و توانایی آن در تبدیل مواد لیگنوسلولزی به زایلیتول و اتانول را نشان داده اند. تولید زایلیتول در این پژوهش در غلظت ۱۲۰ گرم بر لیتر زایلوز به بیشترین میزان خود رسید. آن چه در این بین قابل توجه است این است که شرایط بهینه ی تولید لیپید میکروبی و زایلیتول در این مخمر از نظر غلظت منبع کربن، مدت زمان انکوباسیون و pH با هم تفاوت دارد. علاوه بر آن تولید لیپید میکروبی در شرایط فقر ازت صورت می گیرد. با در نظر گرفتن این تفاوت ها و فراهم آوردن هر کدام از این شرایط بهینه می توان مخمر را به سمت تولید ماده ی مورد نظر هدایت کرد. این موضوع از دیدگاه تولیدی و بیوتکنولوژی بسیار حائز اهمیت است.

نتیجه گیری

آن چه در این تحقیق حائز اهمیت می باشد بهینه سازی تولید روغن تک یاخته و زایلیتول توسط سویه مخمری بومی با استفاده از روش طراحی آزمایش ها می باشد. این روش نقطه عطفی در مطالعات بیوتکنولوژی بوده و تعداد آزمایش های لازم جهت رسیدن به شرایط بهینه را

بسیار کم کرده و از نظر صرف زمان و هزینه بسیار اقتصادی است. این مخمر در محیط فقر نیتروژن دارای پتانسیل بالای تولید SCO می باشد و در محیط دارای زایلوز و بدون محدودیت نیتروژن امکان تولید زایلیتول دارد. هر دو ماده بسیار ارزشمند بوده و در زمینه های مختلفی قابلیت کاربرد دارد. این سویه قابلیت استفاده از مواد هیدرولیز لیگنوسلولزی که زایلوز جزء اصلی آن هاست را نیز دارد. بهینه سازی فاکتورهای محیطی می تواند باعث افزایش میزان تولید در این مخمر شده و با تغییر شرایط کشت می توان آن را به سمت تولید ماده ی مورد نظر هدایت کرد. وجود چنین مخمرهایی با پتانسیل بالای تولید مواد مختلف و با ارزش، از دیدگاه اقتصادی برای تولیدات زیستی بسیار ارزشمند است.

سپاس گزاری: از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان که در انجام این پروژه ما را حمایت نمودند، سپاسگزاریم.

منابع

Altamirano A., Vazquez F. and Figueroa L. (2000) Isolation and identification of xylitol- producing yeastsfrom agricultural residues. Folia Microbiological 45: 255-258.

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

Baishan F., Hongwen C., Xiaolan X., Ning W. and Zongding H. (2003) Using genetic algorithms coupling neural networks in a study of xylitol production: medium optimization.Process Biochemistry 38: 979-985.

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

Bok S.H. and Demain A. (1977) An improved colorimetric assay for polyols. Annual Review Biochemistry 81: 18-20.

Bura R., Vajzovic A. and Doty S.L. (2012) Novel endophytic yeast Rhodotorula mucilaginosa strain PTD3I: production of xylitol and ethanol. Journal of

Industrial Microbiology and Biotechnology 39(7): 1003-1011.

Cheng K.K., Ling H.Z., Zhang J.A., Ping W.X., Huang W., Ge J.P. and Xu J.M. (2010) Strain isolation and study onprocess parameters for xylose- to- Xylitol bioconversion. Food Biotechnology 24(1):1606- 1611.

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

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

Easterling E.R., French W.T., Hernandez R. and 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.

Economou C.N., Aggelis G., Pavlou S. and Vayenas D.V. (2010) Modeling of single cell oil production under nitrogen-limited and substrate inhibition condition. Biotechnology Bioengineering 108(5): 1049-1055.

Enshaeieh M., Abdoli A., Madani M. and Bayat M. (2015) Recycling of lignocellulosic waste materials to produce high-value products: single cell oil and xylitol. International Journal of Environmental Science and Technology 12:837–846.

Enshaeieh M., Nahvi I. and 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 (3): 597-604.

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

Enshaeieh M., Abdoli A. and Nahvi I., 2013, Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using Yarrowia lipolytica M_7 and

Candida sp. Journal of cell and molecular research 5(1):17-23.(b)

Enshaeieh M., Abdoli A., Nahvi I. and 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(2):1-10.(c)

Enshaeieh M., Abdoli A., Nahvi I. and Madani M. (2012) Bioconversion of grass hydrolyzate in to single cell oil and biodiesel using Rhodotorula mucilaginosa. Zist Fanavari microbi 4(13): 39-46.[In Persian]

EL- Batal A.I. and Khalaf S.A. (2004) Xylitol production from corn cobs hemicellulosie hydrolysate by Candida tropicalis immobilized cells in hydrogel copolymer carrier. Journal of Agricultural Biological 6: 1066-1073.

El-Fadaly, El-Ahmady N. and Marvan EM. (2009) Single cell oil production by an oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium. Research Journal of Microbiology 4(8): 301-313.

Elumalai S., Sakthivel R. and Ganesh Kumar S. (2011) Ultra Structural and Analytical Studies of Biodiesel Producing Microalgae (Chlorella vulgaris and Senedesmis sp.) Collected from Tamil Nadu. India. Current Botany 2(6): 19-25.

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

Fakas S., Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M. and Aggelis G. (2008) Biochemistry and biotechnology of Single Cell Oil. University of Patras 38-60 pp.

Fei Q., Chang H., Chang H.N., Shang L., Choi J.D.R., Kim N. and Kang J.W. (2010) The effect of volatile fatty acid as a sole carbon source on lipid accumulation by Cryptococcus albidus for biodiesel production. Bioresource Technology 102: 2695-2701.

Granstrom T.B., Izumori K. and Leisola M. (2007) A rare sugar xylitol PartI: the biochemistry and biosynthesis ofxylitol. Applied Microbiology and Biotechnology 2: 277-281.

Karatay S.E. and Donmez G. (2010) Improving the lipid accumulation proper-

ties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. Bioresource Technology 101(20): 7988-7990.

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

Khot M., Kamat S., Zinjarde S., Pant A., Chopade B. and 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.

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

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

Li Y.H., Liu B., Sun Y., Zhao Z.B. and Bai F.W. (2005) Screening of oleaginous yeasts for broad-spectrum carbohydrates assimilation capacity. Progress in Biotechnology 25: 39-43.

LifHolgerson P., StecksenBlicks C., Sjostrom I., Oberg M. and Twetman S. (2006) Xylitol concentration in salivaand dental plaque after use of various xylitol-containing products,Caries Research 40: 393-397.

Lin-Vien D., Colthup N.B., Fateley W.G. and Grasselil J.G. (1991) The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. Academic Press, Inc. United Kingdom 141pp.

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

Martan J.M., Felipe M.G.A., Silva A.J.B. and Junior P.A. (2006) Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. Journal of Chemical

and Engineering 23(1): 9-21.

Meinander N., Hahn-Hagerdal B., Linko M., Linko P. and Ojamo H. (1994) Fed-batch xylitol production with recombinant XYL-1 expressing Saccharomyces cerevisiae using ethanol asa co- substrate. Applied Microbiology and Biotechnology 42: 334-339.

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

Millier G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Annual Review Chemistry 31: 426-428.

Natah S.S., Hussien K.R., Tuominen J.A. and Koivisto V.A. (1997) Metabolic response to lactitol and xylitol inhealthy men. Journal of Clinical Nutrition 65: 947-950.

Pan L.X., Yang D.F., Shao L., Li W., Chen G.G. and Liang Z.Q. (2009) Isolation of oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities, ISSN, Food technol.Biotechnol 47: 215-220.

Papanikolaou S. (2008) 1,3-Propanediol and citric acid production from glycerol containing waste discharged after bio-diesel manufacturing process. Current Topics on Bioprocesses in Food Industry 2: 381-399.

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

Rao R.S., Bhadra B. and Shivaji S. (2007) Isolation and characterization of xylitol- producing yeasts from the gutofcolleopteran insects. Current Microbiology 5: 441-446.

Rao R.S., Jyothi C.P. and Rao L.V. (2008) Biotechnological production of xylitol by mutant Candida tropicalis OMV5: process optimization using statistical approach. Indian Journal of Biotechnology 7: 218-224.

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

Saha B.C. and Bothast R.J. (1999) Production of xylitol by Candida peltata. Jour-

nal of Industrial Microbiology and Biotechnology 22: 633- 636.

Saxena R.K., Anand P., Saran S. and Isar J. (2009) Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. Biotechnology Advances 27: 895-913.

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

Vajzovic A., Bura R., Kohlmeier K. and Doty S.L. (2012) Novel endophytic yeast Rhodotorula mucilaginosa strain PTD3 II: production of xylitol and ethanol in the presence of inhibitors. Journal of Industrial Microbial Biotechnology 39: 1453-63.

Vakhlu J. and Kour A. (2006) Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic Journal of Biotechnology 9: 69-85.

Vijayakumar S., Kumutha K., Santhana K.P. and Gopal H. (2010) Effect of carbon sources on lipid and biomass production by oleaginous yeast cultures. Tamil Nadu Agriculture university. Coimbatore 1-3pp.

Zagustina N.A., Rodionova N.A., Mestechkina N.M., Shcherbukhin V.D. and Bezborodov A.M. (2001) Xylitolproduction by a culture of Candida guilliermondii 2581. Applied Microbiology and Biotechnology 37(5): 489-492.

Zheng Y., Yu X., Zeng J. and Chen S.H. (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 L.Y., Zong M.H. and Wu H. (2008) Efficient lipid production with richosporon fermentans and its use for biodiesel preparation. Bioresource Technology 99: 7881-7885.