

بررسی اثر تفاله‌های روغن کشی زیتون، کنجد، آفتابگردان بر تولید اسیدهای چرب در کشت نیمه‌باز مخمر یاروویا لیپولیتیکا

هلیا رمضانی¹، محدثه لاری‌پور^{2*}، مینو صدقی³

1. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

2. استادیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

پست الکترونیک: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

3. دانشیار گروه علوم زیستی، مجتمع شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول:

m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

شماره ارجید: 0000-0002-2003-8343

پذیرش: 1400/7/7

دریافت: 1399/10/21

چکیده

در میان منابع روغن‌ها (گیاهی، حیوانی، میکروارگانیسمی)، روغن میکروبی توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. میکروارگانیسم‌های روغنی قادر به تجمع 20 تا 80 درصد لیپید در هر زیست‌توده خشک هستند. در میان میکروارگانیسم‌های مختلف (باکتری‌ها، میکرو جلبک‌ها، گونه‌های قارچی از جمله مخمرها) برخی از مخمرها به‌عنوان منبع برتر تولید روغن در نظر گرفته شده‌اند. *Yarrowia lipolytica* نمونه‌ای عالی از میکروارگانیسم‌های روغنی با بازده بالای تولید چربی است. با استفاده از تفاله‌های روغن کشی ارزان، بومی و در دسترس، به‌عنوان بستر تولید، می‌توان هزینه روغن تولیدشده به‌وسیله مخمرها را کاهش داد. روغن میکروبی تولیدی برای استفاده دارویی، غذایی و آرایشی-بهداشتی کاربرد دارد. در این مطالعه، پلنومورفیس *Yarrowia lipolytica* (ATCC 18942) در محیط‌های کشت مختلف به‌صورت میکروسکوپی بررسی شد. پس از کشت مخمر در محیط‌های حاوی تفاله‌های روغن کشی زیتون، کنجد و آفتابگردان، در شرایط کشت نیمه‌باز اسیدهای چرب تولیدشده، با استفاده از روش GC-MS و FTIR بررسی شدند. محیط حاوی تفاله زیتون پس از بررسی نتایج انتخاب شد و لیپید میکروبی تولیدی در این محیط استخراج شد. سپس وزن خشک زیست‌توده و چربی میکروبی اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشان داد که اسیدهای چرب استخراج‌شده از محیط حاوی تفاله زیتون، شامل اولئیک اسید، پالمیتیک اسید، لینولئیک اسید و استئاریک اسید بود که این محیط بهترین میزان تولید اسیدهای چرب را در بین تفاله‌ها داشت. مقدار چربی میکروبی و وزن خشک به ترتیب 4/07 و 7/83 گرم/لیتر و بازده تولید چربی میکروبی 51/97 درصد به دست آمد.

کلید واژگان: یاروویا لیپولیتیکا، تفاله روغن کشی، اولئیک اسید، کروماتوگرافی گازی، طیف‌سنجی جرمی.

مقدمه

اسیدهای چرب و مشتقات آنها از جمله مولکول‌هایی هستند که در صنایع مختلف غذایی، دارویی، بهداشتی و انرژی حایز اهمیت هستند [1]. چربی‌های تک‌سلولی (SCOs) ذخیره‌های لیپیدی داخل سلولی هستند [2]. تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها اسیدهای چرب بلند زنجیره‌ای هستند که از ترکیب‌های اصلی چربی‌های ذخیره‌شده تشکیل شده‌اند [3]. چربی‌های تک‌سلولی به‌وسیله گروهی از میکروارگانیسم‌ها که میکروارگانیسم‌های روغنی نامیده می‌شوند و قادر به تجمع لیپید بیش از 20 درصد وزن خود هستند، تولید می‌شوند. میکروارگانیسم‌های روغنی از مناسب‌ترین گزینه‌ها برای تولید روغن زیستی محسوب می‌شوند [4]. چربی‌های تک‌سلولی به‌وسیله تعدادی از میکروارگانیسم‌های روغنی مانند باکتری‌ها، مخمرها، میکرو جلبک‌ها و یا گونه‌های قارچی به مقادیر چشمگیری در زمان تخمیر بر منابع تجدیدپذیر مختلف تولید می‌شوند [5؛ 6]. منشأ استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای تولید روغن تک‌سلولی به اوایل قرن 20 برمی‌گردد. به‌منظور صرفه اقتصادی تولید چربی تک‌سلولی، باید از مواد اولیه کم‌هزینه استفاده شود [6]. استفاده از زیست‌توده برای تولید محصولات مشتق از لیپید تجدیدپذیر مانند هیدروکربن‌ها می‌تواند یک گزینه جایگزین برای آینده باشد. گرچه منابع سنتی روغن، هنوز منبع اصلی روغن تجدیدپذیر محسوب می‌شوند، اما میکروکروب‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار هستند، زیرا که چرخه عمر آنها کوتاه‌تر است؛ به زمین‌های زراعی وابسته نیستند و به‌طور لزوم با تولید مواد غذایی انسانی یا حیوانی رقابت نمی‌کنند [7]. بسته به نوع میکروارگانیسم (باکتری‌ها، مخمرها، میکرو جلبک‌ها و یا گونه‌های قارچی) مشخصات اسیدهای چرب میکروبی تولیدشده می‌توانند متفاوت باشند و سبب می‌شود که این ماده برای کاربردهای متنوع صنعتی مناسب باشد [3]. در میان

میکروارگانیسم‌های روغنی، مخمرهای روغنی به دلیل توانایی بالا در تجمع مقدار چربی (تا 70 درصد وزن خود)، سرعت رشد بالا، تحمل غلظت‌های بالای قند و استفاده از طیف وسیعی از منابع کربن، میکروارگانیسم‌های صنعتی مطلوبی محسوب می‌شوند. مخمرهای روغنی به‌عنوان تولیدکنندگان روغن تک‌سلولی طبیعی، در نظر گرفته می‌شوند [4؛ 6]. مخمر *Yarrowia lipolytica* نمونه‌ای از مخمرهای روغنی است [8]. مخمرهای روغنی تک‌سلولی، عاری از اندوتوکسین و مناسب برای تخمیر در مقیاس بزرگ هستند که به دلیل این ویژگی‌ها در بیوتکنولوژی بسیار جذاب می‌باشند [9]. مخمرها می‌توانند محصولات آلی صنعتی ارزان‌قیمت و در دسترس را به پروتئین و لیپیدهای با کیفیت بالا تبدیل کنند که برای خوراک دام و همچنین برای مصرف انسان کارآمد هستند. مخمرها به‌عنوان یک گروه از قارچ‌های تک‌سلولی که بدون شک نقش مهمی در کاربردهای بیوتکنولوژیکی مانند فرایند تخمیر، غذا، دارو و مواد شیمیایی دارند، به‌خوبی شناخته شده‌اند. مخمرها می‌توانند برخی از ترکیب‌های مهم مانند کارتنوئیدها، لیپیدها [10] و آنزیم‌های مهم صنعتی مانند لیپاز، فیتاز، پروتئاز و برخی از انواع آنزیم‌های اکسیداز و پراکسیداز را تولید کنند [11]. مخمر *Yarrowia lipolytica* یک میزبان صنعتی برای تولید کارتنوئیدها و لیپیدها محسوب می‌شود و در حال حاضر به یک کارخانه سلول میکروبی تبدیل شده است. این مخمر غیرمعمول، هوازی و دیمورفیک به‌طور معمول در محیط‌های دارای سوبستراهای آبگریز، غنی از آلکان‌ها و چربی‌ها دیده می‌شود. این مخمر را می‌توان از انواع پنیر، ماست، کفیر، سویا سس، گوشت و سالاد میگو جداسازی کرد [6]. این مخمر از سوی سازمان غذا و دارو (FDA) به‌طور بی‌خطر (Generally Recognized As Safe (GRAS)) شناخته شده است. بیشتر پژوهش‌های انجام‌شده بر مخمر *Yarrowia lipolytica* نشان می‌دهد

که این مخمر غیر بیماری‌زا است [12؛ 13]. مایکوبیوم انسان شامل تمام گونه‌های قارچی شناسایی شده است که یک جزء فراموش شده از میکروبیوتای انسانی است [14]. در حال حاضر 390 گونه مختلف قارچی در میکروبیوتای انسانی متعلق به شاخه‌های آسکومایکوتا، بازیدیومایکوتا و زیگومایکوتا شناسایی شده است [15]. *Yarrowia lipolytica* یک میکروبیوتای انسانی است [16].

سالانه هزاران تن ضایعات کشاورزی و بقایای کشت و صنعت تولید می‌شود. تبدیل زیستی این بقایا برای تولید آنزیم لیپاز، اسیدهای چرب و همچنین سایر محصولات با ارزش، موقعیت مناسبی ایجاد می‌کند. در تحولات آینده بیوتکنولوژی، تفاله‌های حاصل از استخراج روغن دانه‌های مختلف، بستری مناسب برای تخمیر، تولید لیپازها و اسیدهای چرب خواهند بود. این تفاله‌ها به دلیل محتوای روغنی باقیمانده در آنها، به عنوان القاکنده تولید لیپاز عمل می‌کنند. تفاله‌های روغنی به عنوان مواد اولیه تجدیدپذیر، فراوان و ارزان برای تولید محصولات سودمند، کاربرد دارند و همچنین تأثیر انسان بر محیط‌زیست را نیز کاهش می‌دهند [17]. از بسترهای استفاده شده برای تولید اسید چرب به کمک *Yarrowia lipolytica* می‌توان به تفاله کارخانجات روغن کشی کنجد، زیتون و تخمه آفتابگردان اشاره کرد [18]. دیمورفیس، توانایی بعضی از قارچ‌ها برای رشد به عنوان سلول مخمری یا رشته‌ای را نشان می‌دهد. بعضی از قارچ‌های به اصطلاح دیمورفیک، انواع مختلف سلول را تولید می‌کنند و درواقع پلئومورفیک هستند [19]. قارچ‌ها موجوداتی هستند که توانایی بالایی در اتخاذ مورفولوژی‌های مختلف برای سازگاری با محیط‌های جدید دارند. یک ویژگی مورفولوژیکی مشترک برخی از قارچ‌ها، توانایی تغییر از حالت مخمری به حالت رشته‌ای در پاسخ به نشانه‌های محیطی است و این پدیده برگشت‌پذیر دیمورفیس نامیده می‌شود [20]. *Yarrowia lipolytica* به عنوان یک الگوی مناسب برای مطالعات

دیمورفیس مخمرها در نظر گرفته شده است زیرا باعث تولید رشته‌های هیف کاذب در شرایط محدود ازت می‌شود [12؛ 13]. این مخمر در شرایط طبیعی از راه جوانه‌زنی و تشکیل سلول‌های کوتاه رشد می‌کند، اما در شرایط خاص ممکن است ایجاد هیف کاذب کند. از عواملی که در ایجاد هیف کاذب به وسیله *Yarrowia lipolytica* نقش دارد، می‌توان به منبع کربن و نیتروژن اشاره کرد [20]. *Yarrowia lipolytica* با ایجاد هیف‌های کاذب می‌تواند حداقل شرایط زنده ماندن را برای خود فراهم کند [17]. ارزیابی مورفولوژیکی سلول‌های مخمر در طی تخمیر در راکتورهای زیستی صنعتی، زمانی که سلول‌ها در معرض استرس‌هایی مانند فشار، محدودیت‌های اکسیژن و آسیب مکانیکی قرار می‌گیرند و منجر به تغییرات مورفولوژیکی می‌شوند، بسیار حایز اهمیت است [21].

مواد و روش‌ها

تهیه مخمر

از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، مخمر *Yarrowia lipolytica* (ATCC 18942) خریداری شد. سویه مخمر براساس پروتکل دریافت شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران در محیط PDA (مرک، آلمان) کشت داده شد و سپس در انکوباتور (ممرت؛ آلمان) 25 درجه سانتیگراد تا کامل شدن زمان رشد، گرماگذاری شد و در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شد [22].

تهیه مایه تلقیح

برای تهیه کشت تازه و فعال‌سازی مخمر از محیط PDA استفاده شد و سویه مخمر پس از کشت در دمای 25 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت، انکوبه شد. سپس به 20 میلی‌لیتر محیط پیش‌تولید (حاوی گلوکز 15 گرم بر

استریل شدن با فیلتر غشایی 0/45 میکرومتر (ممبران سولوشن؛ آمریکا) به محیط پایه استریل افزوده شد، pH محیط بر 7 تنظیم شد [24].

تهیه محیط تولید اسید چرب

ترکیبات محیط تولید شامل تفاله روغن کشتی جمع آوری شده از مغازه های روغن گیری از سطح تهران، به مقدار 30 گرم در لیتر، پپتون 1 گرم در لیتر، عصاره مخمر 1 گرم بر لیتر، سولفات منیزیم 1/5 گرم بر لیتر، فسفات دی هیدروژن پتاسیم 7 گرم بر لیتر، فسفات دی هیدروژن پتاسیم 2 گرم بر لیتر می باشد که در آب مقطر حل و به وسیله اتوکلاو (اکتوتک CS 21، ایران تولید؛ ایران) استریل شد [25]. مایه تلقیح تهیه شده در مرحله قبل، با لام نئوبار شمارش و سوسپانسیون استاندارد مخمر با غلظت 10^7 سلول در میلی لیتر محیط کشت [26] تهیه و به محیط تولید تلقیح شد.

استخراج لیپید میکروبی

5 میلی لیتر از مخلوط محیط کشت و مخمر پس از 72 ساعت انکوباسیون در شرایط استریل به فالكون 15 میلی لیتری منتقل شد و در سانتریفیوژ یخچال دار (KS-30، سیگما؛ آلمان) با سرعت 4000 دور در دقیقه، دمای 4 درجه سانتیگراد و مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. 7 میلی لیتر از محلول اسید کلریدریک و آب با نسبت 60:80 به رسوب حاصل اضافه و جوشانده شد. بعد از جوشیدن، بلافاصله ارلن درون آب یخ قرار گرفت. سپس 30 میلی لیتر محلول مخلوط کلروفرم- متانول با نسبت 2:3 اضافه شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای 37 درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از گذشت یک ساعت دو فاز شامل فاز بالایی آبی و فاز زیرین آلی تشکیل شد که محلول زیرین جداسازی گردید و در آن 80 درجه سانتیگراد به منظور خشک شدن تا رسیدن به وزن

لیتر، پپتون 1 گرم بر لیتر، عصاره مخمر 0/5 گرم بر لیتر، پتاسیم دی هیدروژن فسفات 1 گرم بر لیتر و سولفات منیزیم 0/5 گرم بر لیتر) که در ارلن مایر 100 میلی لیتری تهیه شده بود، منتقل شد و به مدت 24 ساعت با دمای 25 درجه سانتیگراد و 200 دور در دقیقه در انکوباتور شیکردار (ایران خودساز؛ ایران) گرماگذاری شد [23]. تمام مواد شیمیایی و ترکیبات محیط از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند.

بررسی مخمر *Yarrowia lipolytica* در محیط های کشت مختلف

مخمر *Yarrowia lipolytica* در محیط های کشت مختلف که عبارتند از محیط ترکیبی مایع (شامل 30 گرم گلوکز در لیتر، پپتون 1 گرم در لیتر، عصاره مخمر 1 گرم در لیتر، سولفات منیزیم 1/5 گرم در لیتر، فسفات دی هیدروژن پتاسیم 7 گرم در لیتر، فسفات دی هیدروژن سدیم 2 گرم در لیتر)، SDA، SDB، PDA، PDB، YEA و YEB کشت داده شده و طی 3 روز پیاپی از هر کدام لام تهیه و رنگ آمیزی گرم انجام شد و تغییر شکل مخمر و پلئومورفیسم در زیر میکروسکوپ (YS2، نیکون؛ ژاپن) بررسی شد. تمامی محیط های کشت از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند.

بررسی کیفی آنزیم لیپاز

از کشت تازه قارچ بر محیط واجد سوبسترا توئین 80 (مرک؛ آلمان) کشت داده شد. پلیت ها به مدت 2 تا 5 روز در دمای 25 تا 30 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از این مدت، مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم لیپاز بود. ترکیبات محیط کشت برای بررسی وجود آنزیم لیپاز عبارتند از پپتون 10 گرم در لیتر، کلرید کلسیم 0/1 گرم در لیتر، کلرید سدیم 5 گرم در لیتر، آگار 15 گرم در لیتر، توئین 80، 10 میلی لیتر در لیتر بعد از

ثابت قرار داده شد. سپس اختلاف وزن ارلن، قبل و بعد از خشک شدن محلول اندازه‌گیری شد که مقدار حاصل، میزان چربی تولیدی را نشان داد [27].

تعیین نسیم رخ اسید چرب با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی طیف سنجی جرمی

برای تعیین پروفایل اسیدهای چرب سازنده لیپید میکروبی به‌دست‌آمده، از روش کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی استفاده شد. لیپید میکروبی استخراج‌شده در بنزن حل شد و به آن متانولیک کلرید هیدروژن پنج درصد (95 میلی‌لیتر متانول سرد + 5 میلی‌لیتر استیل کلرید) اضافه و به‌خوبی تکان داده شد. به مدت دو ساعت رفلکس شد. سپس محلول کلرید سدیم پنج درصد به محلول اضافه شد و متیل استرهای اسیدهای چرب با هگزان استخراج شد. لایه حاوی هگزان با محلول پتاسیم بی‌کربنات دو درصد شسته شده و به‌وسیله سولفات سدیم بی‌آب، خشک شد. یک میکرولیتر از متیل استر اسید چرب تهیه شد و به دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی مدل B7890 ساخت شرکت اجیلنت آمریکا با ستون (EZ-30 10 m $\times$ 0.25mm $\times$ 0.50 μ m Guard) VF-5ms و دتکتور FID با برنامه دمایی 130 تا 180 درجه سانتیگراد با سرعت 3 °C/min تزریق شد. طیف‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار و کتابخانه Wiley Registry® 10th Edition/NIST MassSpectral 2014 و استانداردهای لازم برای اسیدهای چرب تجزیه و تحلیل شد [28].

بررسی لیپید میکروبی با طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

نوع پیوندهای لیپید میکروبی حاصل با دستگاه FTIR (اسپکتروم RXI، پرکین المر؛ آمریکا) بررسی شد و نتایج به‌دست‌آمده بررسی شد [25].

اندازه‌گیری وزن خشک زیست‌توده

وزن خشک زیست‌توده با روش وزن‌سنجی تعیین شد. 5 میلی‌لیتر از محیط کشت به لوله‌های آزمایش از قبل وزن‌شده منتقل و به مدت 5 دقیقه با چرخش 4000 دور در دقیقه با دمای 4 درجه سانتیگراد، سانتریفیوژ شد. رسوب به‌دست‌آمده با آب مقطر یک بار شستشو داده شد و به مدت 24 ساعت در آون (ایران خودساز؛ ایران) 105 درجه سانتیگراد تا رسیدن به وزن ثابت قرار داده شد. لوله‌ها بعد از 24 ساعت دوباره وزن شدند که اختلاف وزن به‌دست‌آمده نشان‌دهنده مقدار زیست‌توده بر حسب گرم در لیتر بود [27].

یافته‌ها

تهیه بانک میکروبی

از مخمر *Yarrowia lipolytica* (ATCC 18942) تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، براساس شیوه نامه دریافت‌شده از این مرکز کشت انبوه تهیه و در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شد [22].

نتایج تهیه مایه تلقیح

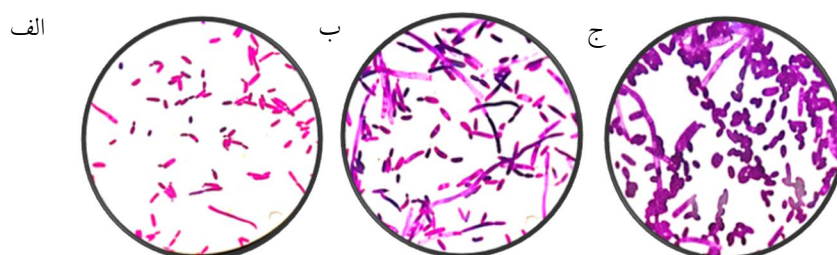
براساس روش کار ذکرشده در بالا، مایه تلقیح آماده‌سازی شد و پس از شمارش با لام نئوبار سوسپانسیون استاندارد مخمر با غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر محیط کشت تهیه شد [26] و در تمام مراحل بعدی آزمایش از سوسپانسیون استاندارد استفاده شد.

نتایج بررسی پلئومورفیسم مخمر *Yarrowia lipolytica* در محیط‌های کشت مختلف

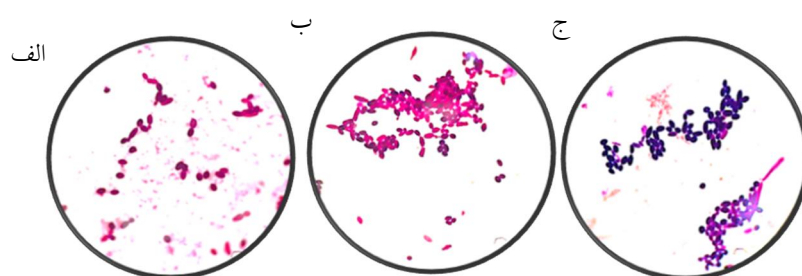
براساس بررسی‌های انجام‌شده بر ترکیبات موجود در محیط کشت‌های استفاده‌شده (که عبارتند از محیط ترکیبی مایع، SDA، SDB، PDA، PDB، YEA و YEB) و همین‌طور بررسی میکروسکوپی سلول‌های مخمر از نظر

بودند و در ضمن در این محیط می‌توان به جای گلوکز (که منبع کربن است) از تفاله‌های روغن‌کشی به‌عنوان منبع کربن استفاده کرد که بسیار سودآورتر بوده و مقصود اصلی این پروژه است. نتایج حاصل در شکل‌های 1-7 نمایش داده شده است.

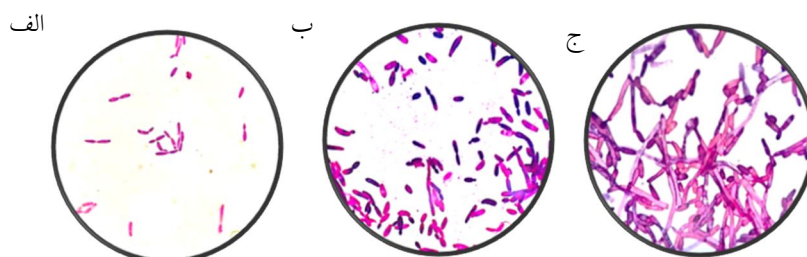
ایجاد شکل مخمری و یا هیف کاذب، بهترین محیط تولید برای مخمر *Yarrowia lipolytica* (که برای گام بعدی این طرح مناسب بود) محیط ترکیبی بود، زیرا براساس بررسی‌های میکروسکوپی انجام‌شده در این محیط سلول‌های مخمر دارای نسبت سطح به حجم مناسبی



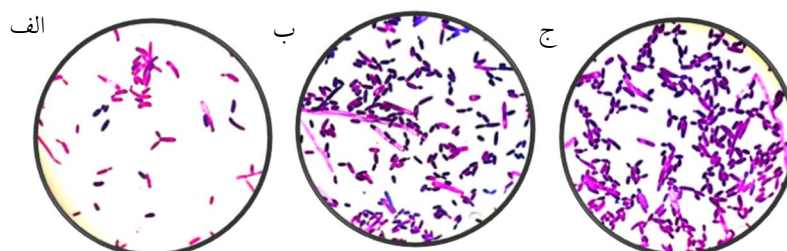
شکل 1 رنگ‌آمیزی گرم مخمر *Yarrowia lipolytica*، محیط PDA؛ الف) 24 ساعت؛ ب) 48 ساعت؛ ج) 72 ساعت بعد از کشت



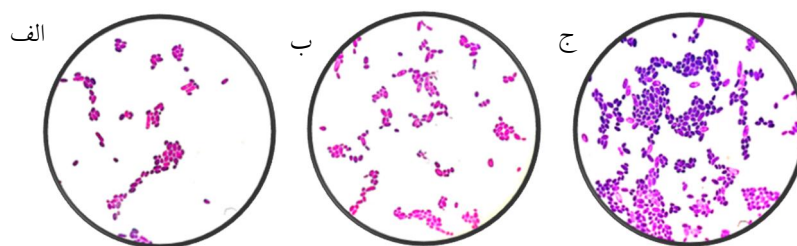
شکل 2 رنگ‌آمیزی گرم مخمر *Yarrowia lipolytica*، محیط PDB؛ الف) 24 ساعت؛ ب) 48 ساعت؛ ج) 72 ساعت بعد از کشت



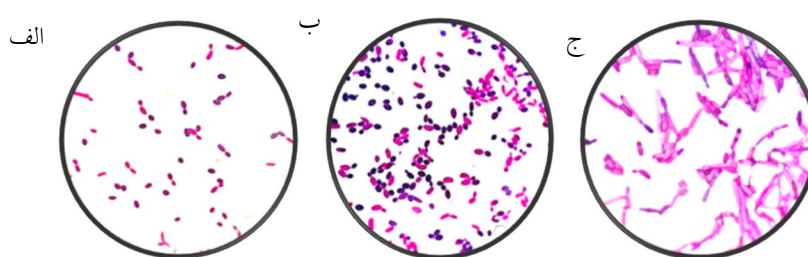
شکل 3 رنگ‌آمیزی گرم مخمر *Yarrowia lipolytica*، محیط SDA؛ الف) 24 ساعت؛ ب) 48 ساعت؛ ج) 72 ساعت بعد از کشت



شکل 4 رنگ‌آمیزی گرم مخمر *Yarrowia lipolytica*، محیط SDB؛ الف) 24 ساعت؛ ب) 48 ساعت؛ ج) 72 ساعت بعد از کشت



شکل 5 رنگ‌آمیزی گرم مخمر *Yarrowia lipolytica*، محیط YEA؛ الف) 24 ساعت؛ ب) 48 ساعت؛ ج) 72 ساعت بعد از کشت



شکل 6 رنگ‌آمیزی گرم مخمر *Yarrowia lipolytica*، محیط YEB؛ الف) 24 ساعت؛ ب) 48 ساعت؛ ج) 72 ساعت بعد از کشت



شکل 7 رنگ‌آمیزی گرم مخمر *Yarrowia lipolytica*، محیط ترکیبی؛ الف) 24 ساعت؛ ب) 48 ساعت؛ ج) 72 ساعت بعد از کشت

نتایج بررسی کیفی وجود آنزیم لیپاز

بررسی کیفی حضور آنزیم لیپاز انجام شد. به دلیل حضور آنزیم لیپاز، چربی‌های موجود در محیط (شامل اسیدهای چرب اشباع مانند پالمیتیک اسید، میریستیک اسید، استئاریک اسید، پنتادکانوئیک اسید و اسیدهای چرب

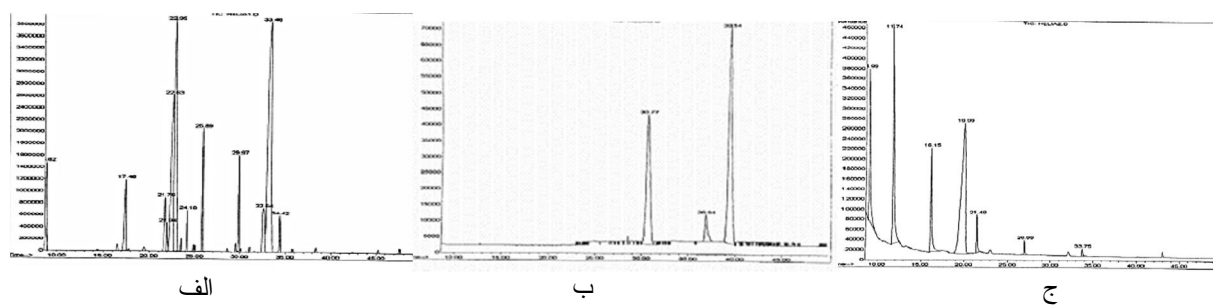
غیراشباع مانند اولئیک اسید، پالمیتوئیک اسید و لینوئیک اسید) هیدرولیز و اسیدهای چرب آزاد تولید شد؛ به دنبال آن pH کاهش پیدا کرد. در نتیجه در اطراف کلنی مخمر هاله شفاف (شکل 8) ایجاد شد.



شکل 8 ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی مخمر به دلیل تولید آنزیم لیپاز به وسیله مخمر

نتایج تعیین نیم رخ اسید چرب با استفاده از روش گروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی

چربی تولیدشده برای بررسی اسیدهای چرب موجود، متیله شد و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی بررسی شد که نتایج حاصل در شکل 9 و در جدول 1 نشان داده شده است.



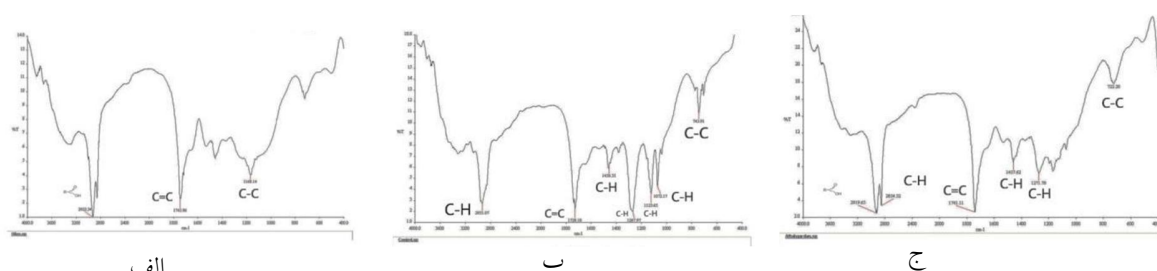
جدول 1 اسیدهای چرب موجود در تفاله روغن‌کشی زیتون، کنجد و آفتابگردان

تفاله روغن‌کشی زیتون	ترکیبات موجود	
	نام علمی اسید چرب	نام عمومی اسید چرب
	Hexadecanoic acid ethyl ester	اسید پالمیتیک
	9-octadecenoic acid methyl ester	اسید اولئیک
	9,12-Octadecadienoic acid	اسید لینولئیک
تفاله روغن‌کشی کنجد	Octadecanoic acid	اسید استئاریک
	Cis-2,3- methylenedioxy	2و3-سیس متیل دی‌اکسی
تفاله روغن‌کشی آفتابگردان	Squalene	اسکوآلن
	9,12-Octadecadienoic acid	اسید لینولئیک

اسید چرب موجود در تفاله روغن‌کشی آفتابگردان براساس کروماتوگرام شکل 9، قسمت ج و جدول 1 اسید لینولئیک می‌باشد.

نتایج بررسی لیپید میکروبی با طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه
لیپید میکروبی استخراج‌شده با طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه نیز بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده در شکل 10 آورده شده است.

ترکیبات موجود در تفاله روغن‌کشی کنجد براساس کروماتوگرام شکل 9، قسمت ب و جدول 1، اسکوآلن و 2و3-سیس متیل دی‌اکسی می‌باشد. اسکوآلن‌ها ترکیبات آلی طبیعی هستند که در برخی روغن‌های گیاهی مانند کنجد، سبوس برنج، جوانه گندم و همچنین کبد کوسه و برخی از ماهی‌ها موجود هستند. 2و3-سیس دی‌متیل دی‌اکسی، جزئی از ترکیبات اصلی روغن‌های ضروری موجود در برخی گیاهان مانند مریم گلی و کنجد است.



شکل 10 الف) گراف FTIR تفاله روغن‌کشی زیتون؛ ب) گراف FTIR تفاله روغن‌کشی کنجد؛ ج) گراف FTIR تفاله روغن‌کشی آفتابگردان

نتایج FTIR چربی‌های تولیدشده به‌وسیله مخمر *Yarrowia lipolytica* در حضور تفاله روغن‌کشی زیتون در شکل 10، قسمت الف آورده شده است. باند در $2922/34\text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده گروه عاملی کربوکسیل در اسیدهای چرب است. باند در $1745/96\text{ cm}^{-1}$ به پیوند دوگانه $\text{C}=\text{C}$ در اسیدهای چرب لینولئیک اسید و اولئیک اسید است. باند در $1168/14\text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند $\text{C}-\text{C}$ در زنجیره کربنی اسیدهای چرب است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در GC-MS، تست تأییدی FTIR نشان‌دهنده حضور اسیدهای چرب عنوان‌شده در نتایج کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی می‌باشد.

نتایج FTIR چربی‌های تولیدشده به‌وسیله مخمر *Yarrowia lipolytica* در حضور تفاله روغن‌کشی کنجد در نمودار شکل 10، قسمت ب آورده شده است. باند در $2931/07\text{ cm}^{-1}$ به پیوند $\text{C}-\text{H}$ اختصاص پیدا می‌کند که مربوط به ساختار اسکوالن است. باند در $2923/03\text{ cm}^{-1}$ به ارتعاش کششی CH_2 اختصاص پیدا می‌کند که مربوط به پیوند CH_2 در اسکوالن است. باند دوگانه در $1728/18\text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند $\text{C}=\text{C}$ در ساختار 2 و 3-سیس متیل دی اکسی است. باندها در $1458/35\text{ cm}^{-1}$ و $1123/65\text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوندهای $\text{C}-\text{H}$ در ساختار اسکوالن و همچنین ساختار 2 و 3-سیس متیل دی‌اکسی است. باند $1267/97\text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند CH_2 در ساختار اسکوالن می‌باشد. باند $1072/17\text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند CH_3 در ساختار اسکوالن است. باند $743/91\text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند $\text{C}-\text{C}$ حلقه بنزنی ساختار 2 و 3-سیس متیل دی‌اکسی است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در GC-MS، تست تأییدی FTIR نشان‌دهنده حضور ترکیبات عنوان‌شده در نتایج کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی می‌باشد.

نتایج FTIR چربی‌های تولیدشده به‌وسیله مخمر *Yarrowia lipolytica* در حضور تفاله روغن‌کشی آفتابگردان در نمودار شکل 10، قسمت ج آورده شده است.

باند در $2919/65\text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده گروه عاملی کربوکسیل در لینولئیک اسید است. باند در $2854/32\text{ cm}^{-1}$ به پیوند $\text{C}-\text{H}$ در لینولئیک اسید اشاره دارد. باند در $1741/11\text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند دوگانه $\text{C}=\text{C}$ در لینولئیک اسید است. باندها در $1457/62\text{ cm}^{-1}$ و $1271/78\text{ cm}^{-1}$ به پیوندهای $\text{C}-\text{H}$ در اسید چرب ارتباط دارد. باند در $722/20\text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند $\text{C}-\text{C}$ در زنجیره کربنی لینولئیک اسید است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در GC-MS، تست تأییدی FTIR نشان‌دهنده حضور لینولئیک اسید عنوان‌شده در نتایج کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی می‌باشد.

همان‌طور که در بالا ذکر شد، با بررسی نتایج به‌دست‌آمده محیط حاوی تفاله روغن‌کشی زیتون برای ادامه این پژوهش انتخاب شد.

نتایج اندازه‌گیری وزن خشک زیست‌توده، مقدار چربی میکروبی تولیدی و محاسبه بازده میکروبی

مقدار وزن خشک کشت مخمر (ATCC 18942) *Yarrowia lipolytica* در محیط حاوی تفاله روغن‌کشی زیتون برابر $7/83$ گرم در لیتر به دست آمد. مقدار تولید چربی میکروبی در محیط حاوی تفاله روغن‌کشی زیتون برابر با $4/07$ گرم در لیتر تعیین شده و مقدار بازده تولید یا محتوی چربی میکروبی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$100 \times (\text{وزن خشک} / \text{وزن چربی میکروبی}) = \text{محتوی چربی بازده تولید چربی میکروبی در محیط حاوی تفاله روغن‌کشی زیتون برابر با } 51/97 \text{ درصد برآورد شد که نشان‌دهنده توانایی بالای مخمر } Yarrowia lipolytica \text{ برای تولید چربی میکروبی در محیط حاوی تفاله روغن‌کشی زیتون است.}$$

بحث

استفاده از سوبستراهای بی مصرف، ارزان‌قیمت و در دسترس به‌منظور ایجاد ترکیبات مفید و کاربردی از اصول مهم در

بیوتکنولوژی می‌باشد. به‌این‌منظور از تفاله‌های روغن‌کشی که کاربردی به غیر از خوراک دام و طیور ندارند، به‌عنوان سوبسترای طبیعی، ارزان‌قیمت و در دسترس به‌عنوان منبع کربن برای تولید اسیدهای چرب به‌وسیله *Yarrowia lipolytica* استفاده شد. براساس بررسی‌های انجام‌شده تاکنون، کمتر از 5 درصد مخمرهای مولد چربی، توانایی تجمع لیپید به میزان بیش از 25 درصد را دارند [29]. در پژوهش حاضر بازده تولید چربی میکروبی *Yarrowia lipolytica* 51/97 درصد به دست آمد که بازده بسیار مناسبی برای تولید چربی میکروبی می‌باشد.

Yarrowia lipolytica دارای قابلیت استفاده از منابع کربنی مختلف موجود در محیط کشت است و می‌تواند با جایگزین کردن اسیدهای چرب موجود در محیط، ترکیب چربی خود را تغییر دهد. *Yarrowia lipolytica* یک سوش بومی است که قابلیت جداسازی از محیط را دارد. مخمرها دارای فوایدی نسبت به سایر منابع زیستی مولد چربی هستند، برای مثال مدت زمان دو برابر شدن آنها به‌طور معمول کمتر از یک ساعت است، نسبت به گیاهان کمتر تحت تأثیر فصل و یا شرایط آب‌وهوایی قرار می‌گیرند و کشت آنها نسبت به جلبک‌ها به‌راحتی افزایش پیدا می‌کند. تولید لیپید به‌وسیله این سویه، نویدبخش تأمین لیپید مورد نیاز برای استفاده صنعتی از مخمرهای مولد چربی است. با توجه به مواردی که در بالا ذکر شد، *Yarrowia lipolytica* قابلیت تجاری‌سازی دارد و این مسئله در صنعت بسیار حایز اهمیت است. بنابراین استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی، سوبستراهای ارزان‌قیمت نه‌تنها از نظر اقتصادی در جامعه بسیار اهمیت دارد، بلکه نیاز کشور ما را نسبت به کشورهای دیگر برآورده می‌سازد.

دومینگز و همکاران سال 2003، در محیط کشت مایع *Yarrowia lipolytica* از روغن‌های زیتون و آفتابگردان به‌عنوان منبع کربن استفاده کردند. نتایج حاصل نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم لیپاز در این محیط‌ها در مقایسه با

محیط کشت شاهد حاوی گلوکز بود و میزان چربی تولیدی نیز افزایش پیدا کرد [30]. در پژوهش حاضر نیز از تفاله روغن‌کشی زیتون و آفتابگردان به‌عنوان منبع کربن استفاده شد و بازده 51/97 درصدی تولید چربی را به همراه داشت. بنابراین نتایج هر دو پژوهش باهم تطابق دارند.

کاتره و همکارانش سال 2012، توانایی سویه‌های مخمر *Yarrowia lipolytica* را برای تولید چربی میکروبی ارزیابی کردند. آنها پنج سویه با توانایی تولید چربی میکروبی به میزان بیشتر از 20 درصد وزن خشک را گزارش کردند [31]. نتایج حاصل از این مطالعه نیز با نتایج کاتره و همکارانش مطابقت دارد.

راکیکا و همکارانش سال 2015، با مخمر *Yarrowia lipolytica* (JMY4086) در شرایط مختلف، استفاده از ملاس و گلیسرول خام به‌عنوان محصولات جانبی صنایع مختلف، چربی میکروبی تولید کردند که بیشترین مقدار آن 31 درصد وزن خشک گزارش شد [32]. نتایج حاصل از این مطالعه نیز با نتایج راکیکا و همکارانش همخوانی دارد.

Yarrowia lipolytica به‌عنوان یک الگوی مناسب برای مطالعات در مورد پلی‌مورفیسم مخمرها در نظر گرفته شده است، زیرا باعث تولید رشته‌های هیف کاذب در شرایط محدود ازت می‌شود [12؛ 13]. این مخمر در شرایط طبیعی از راه جوانه‌زنی و تشکیل سلول‌های کوتاه رشد می‌کند، اما در شرایط خاص ممکن است ایجاد هیف کاذب کند. از عواملی که در ایجاد هیف کاذب به‌وسیله *Yarrowia lipolytica* نقش دارد، می‌توان به منبع کربن و منبع نیتروژن اشاره کرد [20]. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که چندین محرک مختلف بر پلئومورفیسم *Yarrowia lipolytica* تأثیر می‌گذارند و نشان‌دهنده پاسخ این مخمر در محیط‌های طبیعی به‌منظور بهره‌برداری بهتر از هر جایگاه زیست‌محیطی می‌باشد [33]. از فواید بررسی پلئومورفیسم در صنعت می‌توان به مواردی همچون فراهم کردن حداقل شرایط ادامه حیات به‌وسیله

حاوی اولئیک اسید از مناسب‌ترین محیط‌ها برای تولید آنزیم لیپاز خارج سلولی است [34]. در پژوهش حاضر نیز، تفاله روغن‌کشی زیتون که براساس نتایج GC-MS و FTIR حاوی اولئیک اسید بود، مناسب‌ترین منبع برای تولید اسیدهای چرب و آنزیم لیپاز گزارش شد.

نتیجه‌گیری

با استفاده از مخمر بومی *Yarrowia lipolytica* به روش بیولوژیک در صنعت می‌توان از تفاله‌های روغن‌کشی، اسیدهای چرب و آنزیم لیپاز، تولید کرد که این ترکیبات در صنایع مختلف نظیر صنایع غذایی، دارویی، آرایشی-بهداشتی و شیمیایی کاربرد فراوان دارد. استفاده از سوبستراهای ارزان و بی‌مصرف، باعث کاهش هزینه‌های تولید، حذف ضایعات و تولید ترکیبات باارزش و با استفاده کاربردی می‌شود که موارد ذکرشده در اقتصاد و صنعت حایز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از دریافت کمک از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال را اعلام می‌دارد. هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

میزان همکاری

محدثه لاری‌پور ایده و طرح اصلی، آنالیز داده‌ها و مطالعه مفهوم و طراحی نوشتن و بازنگری انتقادی نسخه چاپ‌نشده را ارائه داد و هلیا رمضانی و مینو صدری در انجام طرح و ارائه داده‌ها و نگارش متن کمک کردند.

منابع

[1] Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Lee, D. J., and Chang, J. S. (2013). Microalgae-based biorefinery—from biofuels to natural products. *Bioresource technology*, 135, 166-174.

میکروارگانیزم با ایجاد هیف‌های کاذب اشاره کرد [17]. مورد دیگر اینکه سلول‌های مخمر در طی تخمیر در راکتورهای زیستی صنعتی، زمانی‌که سلول‌ها در معرض استرس مانند فشار، محدودیت‌های اکسیژن و آسیب‌های مکانیکی قرار می‌گیرند، منجر به تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها می‌شود. ارزیابی مورفولوژیکی سلول‌های مخمر در طی تخمیر در راکتورهای زیستی صنعتی، به‌منظور بررسی شرایط سلول‌ها و روند پیشرفت تخمیر بسیار حایز اهمیت است [21]. در این پژوهش تغییرات شکلی *Yarrowia lipolytica* بر محیط کشت با منابع کربن مختلف نشان داده شد. عوامل مختلفی مانند دما، میزان اکسیژن، غلظت محیط کشت و نوع منابع کربن و نیتروژن استفاده‌شده در محیط کشت در تغییر شکل مخمر و ایجاد فرایند پلئومورفیسم دخالت دارد. آنچه از تغییر شکل مخمر نتیجه‌گیری می‌شود، این است که این مخمر به دلیل ایجاد پلئومورفیسم فراوان بر محیط‌های کشت مختلف براساس منابع کربن، توانایی سازگاری بیشتری را در شرایط صنعتی دارد. به دلیل تشکیل شکل رشته‌ای بر محیط‌های مختلف و تبدیل فرم مخمری به رشته‌ای (که به دلایل مختلف در برخی از قارچ‌ها از جمله مخمر *Yarrowia lipolytica* اتفاق می‌افتد) نسبت سطح به حجم در این مخمر افزایش پیدا کرده و در نتیجه مقادیر بیشتری از اسیدهای چرب را تولید می‌کند. این پدیده در تولید محصولات صنعتی بسیار ارزشمند است [17؛ 20؛ 21؛ 33].

آنزیم لیپاز به‌وسیله بسیاری از میکروارگانیزم‌ها مانند باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها تولید می‌شود. در این میان به *Yarrowia lipolytica* به علت توانایی رشد در لایه‌های آبگریز مانند روغن، اسیدهای چرب و در نتیجه ظرفیت تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده چربی (لیپاز) در سال‌های گذشته توجه شده است. فیکرز و همکاران در سال 2003 با بررسی منابع مختلف کربنی و نیتروژنی در تولید آنزیم لیپاز به‌وسیله مخمر *Yarrowia lipolytica*، به این نتیجه رسیدند که محیط

- [11] Yang, Q., Zhang, H., Li, X., Wang, Z., Xu, Y., Ren, S., ... and Wang, H. (2013). Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems. *Bioresource technology*, 129, 264-273.
- [12] Zieniuk, B., and Fabiszewska, A. (2019). *Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 10.
- [13] Gonçalves, F. A. G., Colen, G., and Takahashi, J. A. (2014). *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *The Scientific World Journal*, 2014.
- [14] Cui, L., Morris, A., and Ghedin, E. (2013). The human mycobiome in health and disease. *Genome medicine*, 5, 63.
- [15] Ott, S. J., Kühbacher, T., Musfeldt, M., Rosenstiel, P., Hellmig, S., Rehman, A., and Schreiber, S. (2008). Fungi and inflammatory bowel diseases: alterations of composition and diversity. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 43, 831-841.
- [16] Gouba, N., and Drancourt, M. (2015). Digestive tract mycobiota: a source of infection. *Medicine et maladies infectieuses*, 45, 9-16.
- [17] Farias, M. A., Valoni, E., Castro, A., and Coelho, M. A. (2014). Lipase production by *Yarrowia lipolytica* in solid state fermentation using different agro industrial residues. *Chemical engineering transactions*, 38, 301-306.
- [18] Moftah, O. A., Grbavčić, S. Ž., Moftah, W. A., Luković, N. D., Prodanović, O. L., Jakovetić, S. M., and Knežević-Jugović, Z. D. (2013). Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78, 781-794.
- [19] Domínguez, A., Ferminan, E., and Gaillardin, C. (2000). *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. In *Dimorphism in human pathogenic and apathogenic yeasts* (Vol. 5, pp. 151-172). Karger Publishers.
- [2] Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., and Syldatk, C. (2016). Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in microbiology*, 7, 1539.
- [3] Tchakouteu, S. S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A. A., Aggelis, G., and Papanikolaou, S. (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 911-927.
- [4] Maina, S., Pateraki, C., Kopsahelis, N., Paramithiotis, S., Drosinos, E. H., Papanikolaou, S., and Koutinas, A. (2017). Microbial oil production from various carbon sources by newly isolated oleaginous yeasts. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 333-344.
- [5] Thevenieau, F., and Nicaud, J. M. (2013). Microorganisms as sources of oils. *Ocl*, 20, D603.
- [6] Gajdoš, P., Nicaud, J. M., and Čertík, M. (2017). Glycerol conversion into a single cell oil by engineered *Yarrowia lipolytica*. *Engineering in Life Sciences*, 17, 325-332.
- [7] Hackenschmidt, S., Bracharz, F., Daniel, R., Thürmer, A., Bruder, S., and Kabisch, J. (2019). Characterization of three *Yarrowia lipolytica* strains in respect to different cultivation temperatures and metabolite secretion. *bioRxiv*, 645242.
- [8] Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., and Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 1219-1227.
- [9] Mattana, P., Rosa, P., Poli, J., Richards, N., Daboit, T., Scroferneker, M. L., ... and Valente, P. (2014). Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese. *Revista Brasileira de Biociências*, 12, 121.
- [10] Beiranvand, Sh., Larypoor, M., and Norozi, J. (2019). Optimization of beta-carotene production of *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from the waste leather factory. *Journal of Microbial World*, 12, 39-52.

biodiesel. *Bioresource technology*. 2014 Dec1;173:324-33.

[28] Rao, A. R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T. R., and Ravishankar, G. A. (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource technology*, 98, 560-564.

[29] Dey, P., and Maiti, M. K. (2013). Molecular characterization of a novel isolate of *Candida tropicalis* for enhanced lipid production. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1357-1368.

[30] Domínguez, A., Deive, F. J., Sanromán, M. A., and Longo, M. A. (2003). Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology: International Research in Process, Environmental and Clean Technology*, 78, 1166-1170.

[31] Katre, G., Joshi, C., 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. *Amb Express*, 2, 36.

[32] Rakicka, M., Lazar, Z., Dulermo, T., Fickers, P., and Nicaud, J. M. (2015). Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnology for biofuels*, 8, 104.

[33] Ruiz-Herrera, J., and Sentandreu, R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology*, 178, 477-483.

[34] Fickers, P., Nicaud, J. M., Gaillardin, C., Destain, J., and Thonart, P. (2004). Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of applied microbiology*, 96, 742-749.

[20] Morales-Vargas, A. T., Domínguez, A., and Ruiz-Herrera, J. (2012). Identification of dimorphism-involved genes of *Yarrowia lipolytica* by means of microarray analysis. *Research in microbiology*, 163, 378-387.

[21] Braga, A., Mesquita, D. P., Amaral, A. L., Ferreira, E. C., and Belo, I. (2016). Quantitative image analysis as a tool for *Yarrowia lipolytica* dimorphic growth evaluation in different culture media. *Journal of biotechnology*, 217, 22-30.

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

[23] Carsanba, E., Papanikolaou, S., Fickers, P., and Erten, H. (2020). Lipids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose in batch cultures. *Microorganisms*, 8, 1054.

[24] Rajan, A., Kumar, D. S., and Nair, A. J. (2011). Isolation of a novel alkaline lipase producing fungus *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 from aged and crude rice bran oil and quantification by HPTLC. *International journal of biological chemistry*, 5, 116-126.

[25] 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, 68-75.

[26] Pénicaud, C., Landaud, S., Jamme, F., Talbot, P., Bouix, M., Ghorbal, S., and Fonseca, F. (2014). Physiological and biochemical responses of *Yarrowia lipolytica* to dehydration induced by air-drying and freezing. *PloS one*, 9, e111138.

[27] Nambou K, Zhao C, Wei L, Chen J, Imanaka T, Hua Q. Designing of a “cheap to run” fermentation platform for an enhanced production of single cell oil from *Yarrowia lipolytica* DSM3286 as a potential feedstock for

Evaluation of the effect of olive, sesame and sunflower pulp for fatty acids production in semi-open culture *Yarrowia lipolytica*

Helia Ramezani¹, Mohaddeseh Larypoor^{*2}, Minoo Sadri³

1-M.Sc of Microbial Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran.

2-Assistant Professor of Mycology, Department of Biological Science, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran.

Email: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

3-Associate Professor Organic Chemistry, Faculty of Chemistry and Chemical engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

* Corresponding author: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

Orcid Number:0000-0002-2003-8343

Received: 2020/1/10

Accepted: 2021/9/29

Abstract

Among the sources of oils (vegetable, animal, microorganism), microbial oil has attracted the attention of many researchers. Oily microorganisms are able to accumulate 20 to 80% of lipids in each dry biomass. Among various microorganisms (bacterias, microalgae, fungal species including yeasts), some yeasts are considered to be the superior source of oil production. *Yarrowia lipolytica* is an excellent example of oily microorganisms with high fat production efficiency. By using cheap, native and available pulp as a production medium, the cost of oil produced by yeasts can be reduced. The microbial oil produced is used for medicinal, food and cosmetic purposes. In this study, the pleomorphism of *Yarrowia lipolytica* (ATCC 18942) was examined microscopically in different culture media. After culturing the yeast in media containing olive, sesame and sunflower pulp, in semi-open culture conditions, the fatty acids produced were analyzed using GC-MS and FTIR techniques. After reviewing the results, the medium containing olive pulp was selected and the microbial lipid produced in this medium was extracted. Then dry weight of biomass and microbial fat were measured. The results showed that the fatty acids extracted from the medium containing olive oli cake included oleic acid, palmitic acid, linoleic acid and stearic acid, which had the best production of fatty acids among the pulp. The content of microbial fat and dry weight were 4.07 and 7.83 g/l, respectively, and microbial fat production efficiency was 51.97%.

Keywords *Yarrowia lipolytica*; Pulp; Oleic acid; Gas Chromatography Mass Spectrometry