



Optimization of fatty acids produced by *Candida glabrata* isolated from soil

Elahe Tajdini¹, Mahboobeh Madani², Masoud Fuladgar³, Rasoul Mohammadi⁴, Ali Zarei Mahmoudabadi⁵

¹Ph.D. student, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. ²Associate Professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. ³Associate Professor, Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. ⁴Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ⁵Professor, Department of Medical Mycology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Oils extracted from microorganisms (SCO) are preferable to vegetable oils due to containing more gamma-linolenic acid, more stability against oxidation, and less content of residual pesticides. The oils can be used as dietary supplements. The aim of this study was molecular identification of lipid-producing yeasts and molds in soil and optimization of fat production by *Candida glabrata* using the Taguchi design.

Materials & Methods: Several yeasts and molds were isolated from the soil samples of groves and near oil change shops and restaurants. Molecular identification was performed by polymerase chain reaction (PCR). Among them, the highest lipid producers were selected and using the Taguchi design. The best conditions in terms of carbon and nitrogen sources as well as pH for maximum lipid production were determined. The fat obtained was examined by gas chromatography with a mass spectrometer detector (GC-MS).

Results: Among the identified species, *C. glabrata* had the highest lipid production. Production of palmitoleic, palmitic, linoleic, linolenic, and stearic acid was proven in this study. Lipid production in *C. glabrata* and *Mortierella alpina* was 6.9 and 10.8 grams per litre, respectively.

Conclusion: Due to the rapid reproduction in yeasts and their ability to produce fatty acids, *C. glabrata* is a suitable option for fat production.

Keywords: Fatty acids, *Candida glabrata*, Yeast, Microbial species, GC-MS.

Received: 10 September 2022

Revised: 11 December 2022

Accepted: 4 February 2023

Correspondence to: Mahboobeh Madani

Tel: +98 3136273427

E-mail: m.madani66@gmail.com

Journal of Microbial World 2023, 15(4): 245-258

DOI:10.30495/jmw.2022.1954786.2014



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



بهینه‌سازی تولید اسیدهای چرب توسط جدایه‌ی کانیدیدا گلابراتا از خاک

الهه تاجدینی^۱، محبوبه مدنی^{۲*}، مسعود فولادگر^۳، رسول محمدی^۴، علی زارعی محمودآبادی^۵

^۱ دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. ^۲ گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. ^۳ گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و طب گرمسیری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. ^۴ گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: روغن حاصل از میکروارگانیسم‌ها (SCO) نسبت به روغن‌های گیاهی ارجحیت دارد زیرا حاوی مقادیر بیشتری گامالیئولئیک اسید است، پایداری بیشتری در برابر اکسیداسیون و محتوای کمتری از باقیمانده آفت‌کش‌ها دارد. این روغن‌ها به عنوان مکمل‌های غذایی قابل استفاده هستند. هدف از مطالعه حاضر شناسایی مولکولی مخمرها و کپک‌های مولد چربی موجود در خاک و بهینه‌سازی تولید چربی توسط کانیدیدا گلابراتا با طراحی تاگوچی است.

مواد و روش‌ها: از خاک باغات و مناطق نزدیک به مغازه‌های تعویض روغن و رستوران، نمونه‌گیری و شناسایی مخمرها و کپک‌های تولید کننده‌ی چربی با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. سپس جدایه قارچ با بیشترین میزان تولید لیپید انتخاب و با استفاده از طراحی تاگوچی، بهترین شرایط از نظر میزان منبع کربن و نیتروژن و pH برای تولید حداکثری تعیین گردید. چربی حاصل توسط کروماتوگرافی گازی با آشکارساز طیف‌سنج جرمی (GC-MS) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در بین گونه‌های شناسایی شده، *Candida glabrata strain DHP14-2* بیشترین مقدار چربی را تولید کرد. تولید پالمیتولئیک، پالمیتیک، لینولئیک، لینولئیک و استئاریک اسید در این بررسی ثابت شد. تولید لیپید در کانیدیدا گلابراتا معادل ۹/۶ گرم در لیتر و در مورتیرلا آلیپنا معادل ۱۰/۸ گرم در لیتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: با توجه به سرعت تکثیر مخمرها و توانایی تولید اسیدهای چرب توسط آن‌ها، کانیدیدا گلابراتا گزینه مناسبی برای تولید چربی می‌باشد.

کلمات کلیدی: اسیدهای چرب، کانیدیدا گلابراتا، مخمر، گونه‌های میکروبی، GC-MS.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۱۵

ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۹/۲۰

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱۹

مقدمه

تحقیقات نشان داده‌اند که برای تولید حداکثری این لیپیدها باید در محیط کشت منبع کربن و منبع نیتروژن به نسبت مناسب وجود داشته باشد (۳۷).

روغن حاصل از تک‌یاخته نسبت به روغن‌های گیاهی به دلیل محتوای بیشتر گامالیئولئیک اسید، استواری بیشتر در برابر اکسیداسیون، عدم حضور سطح بالای اسیدهای چرب رقیب نظیر گاما لینولئیک اسید (linolenic acid Gamma) و محتوای

روغن حاصل از تک‌یاخته (Single Cell Oil) یک منبع جدید برای تولید اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشد. این لیپیدها توسط قارچ‌ها مخمرها جلبک‌ها و برخی باکتری‌ها تولید می‌شوند. برای تولید این لیپیدها شرایط باید محیا باشد.

* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
پست الکترونیک: m.madani66@gmail.com تلفن: ۰۳۱۳۶۲۳۴۲۷



پالمیتیک اسید، ۱۸/۲۸ درصد و استئاریک اسید ۱۷/۶۴ درصد است (۱۳).

استفاده از اسیدهای چرب غیر اشباع و جذب آن‌ها در روده در صورت ایجاد نکردن حساسیت و فعال نکردن لنفوسیت و مونوسیت می‌تواند به عنوان مکمل غذایی استفاده شود. تولید میکروبی روغن‌های غنی از اسید چرب غیر اشباع خوراکی یکی از جنبه‌های مهم تولید روغن تک‌یاخته است. بهینه‌سازی فرایند تولید می‌تواند بازده لیپید میکروبی را بالا ببرد. شناسایی سویه‌ها و روش‌هایی برای تولید بیشتر روغن تک‌یاخته بسیار حائز اهمیت است. با توجه به اهمیت غذایی اسیدهای چرب غیر اشباع چند زنجیره و بلند زنجیره و نبود منبع گیاهی یا حیوانی مناسب، توجه به روغن میکروبی حائز اهمیت است. میکروارگانیزم‌های مولد این لیپیدها اکنون اهمیت زیادی یافته‌اند زیرا منبع مناسبی برای تولید این روغن‌ها محسوب می‌شوند. هدف از بررسی حاضر شناسایی مولکولی قارچ‌های مولد چربی و بهینه‌سازی روغن تک‌یاخته میکروبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی و غربالگری اولیه مخمرها و کپک‌های مولد چربی: از خاک‌های اطراف رستوران‌ها و تعمیرگاه‌های ماشین، میوه‌ها و خاک باغ‌های گردو، بادام و آفتابگردان نمونه‌ها جمع‌آوری و به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در آب خیس‌انده شدند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون‌ها، به ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط غنی‌کننده شامل ۱۰۰ گرم در لیتر گلیسرول، ۱ گرم در لیتر آمونیوم سولفات، ۱ گرم در لیتر پتاسیم هیدروژن فسفات، ۱ گرم در لیتر منیزیم سولفات و ۱ گرم در لیتر عصاره مخمر اضافه شد و ارلن‌ها به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۰ °C در شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. در ادامه ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع به محیط کشت جامد حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز، ۲ گرم در لیتر آمونیوم سولفات، ۰/۵ گرم در لیتر پتاسیم هیدروژن فسفات، ۲ گرم در لیتر منیزیم سولفات، ۰/۱ گرم در لیتر کلسیم کلراید و ۲ درصد آگار اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه

کمتر باقیمانده‌های حشره‌کش و آفت‌کش، ارجحیت دارند (۱ و ۲).

دوکوزاهگزانوئیک اسید (Docosahexaenoic acid) در روغن ماهی وجود دارد، اما استفاده از روغن ماهی به عنوان مکمل دوکوزاهگزانوئیک اسید مشکل ساز است، زیرا ماهی نظیر تمام حیوانات دیگر دارای میزان زیادی از اسیدهای چرب است و این موضوع نشان دهنده جذب این اسیدهای چرب طی رژیم غذایی آن‌ها می‌باشد. ایکوزاپنتانوئیک اسید به صورت آنتاگونیست روغن غنی ایکوزاپنتانوئیک اسید (Eicosapentaenoic acid) از آراشیدونیک اسید در غذای نوزادان عمل می‌کند و منجر به عقب‌افتادگی رشد در نوزادان می‌گردد (۳-۵). آراشیدونیک اسید (Arachidonic acid) در عملکرد آنزیم‌های غشایی نقش دارد و می‌تواند به‌عنوان یک پیام‌رسان شیمیایی در پاسخ‌های ایمنی و التهابی عمل کند (۶ و ۷). این قبیل مشکلات باعث توجه بیشتر به روغن میکروبی شده است. نکته جالب در مورد تری‌اسیل‌گلیسرول‌های میکروبی، بالا بودن میزان اسیدهای چرب غیر اشباع با ۱۶ و ۱۸ اتم کربن سری ω است که اهمیت غذایی دارند (۸ و ۹).

ماتولا و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش دادند که میکروسیالات قطره‌ای مانند لیپید تک‌یاخته در عملکرد و ترشح آنتی‌بادی‌ها، سیتوکین‌ها و متابولیت‌ها در بدن موجودات زنده تاثیر دارد (۱۰). در میان میکروارگانیزم‌ها، قارچ‌ها بیشتر برای تولید لیپیدهای ویژه‌ای نظیر دکوزاهگزانوئیک اسید، ایکوزاپنتانوئیک اسید، گامالینوئیک اسید و آراشیدونیک اسید مورد بررسی قرار گرفته‌اند. آن‌ها امکان جایگزین شدن برای لیپیدهای غذایی و استریفیکاسیون داخلی را دارند. زلاتانو و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که تری‌اسیل‌گلیسرول از کاندیدا/گیلرموندی بسیار شبیه روغن زیتون است (۱۱). ملونگو و همکاران گزارش دادند که قارچ رشته‌ای اسپرژیلوس قادر به تولید لیپید تک‌یاخته می‌باشد (۱۲). ساجیا و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند تریکوسپورون مایکوتوکسینورانس قادر به تولید روغن تک سلولی شامل اولئیک اسید ۳۰/۸۴ درصد

فازهای آبی (در بالا) و آلی (در پایین) جدا شوند. فاز پایینی با پیپت پاستور جداسازی و در خلأ با دستگاه دسیکاتور خشک گردید. وزن حاصله نشان دهنده چربی تولید شده توسط سویه مورد نظر می‌باشد (۱۶ و ۱۵).

د) شناسایی مخمرها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: سویه مخمر برتر، به کمک تعیین توالی قطعه‌ای از ژنوم ریبوزومی شناسایی گردید. به منظور استخراج ماده‌ی ژنتیکی ابتدا مخمر مورد نظر در محیط YPD آگار کشت داده شد. سپس سلول‌ها جداسازی و با آب مقطر شستشو شدند. در ادامه سلول‌ها با بافر لایز کننده، دانه‌های شیشه‌ای (۶۰۰-۴۲۵ میکرون)، محلول فنل-کلروفرم-ایزوامیل الکل (۱:۲۴:۲۵) به مدت ۳ تا ۵ دقیقه ورتکس شدند. در این مطالعه بافر لایزکننده حاوی تریتون X-100 (۲ میلی‌لیتر)، سدیم دودسیل سولفات (۱ گرم)، کلرید سدیم (۰/۴ گرم)، تریس-اسید کلریدریک (۱ میلی‌لیتر) و اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید (۰/۲ میلی‌لیتر) بود که با آب دیونیزه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد (۱۷). سپس به منظور انحلال DNA از بافر Tris-EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) استفاده گردید. پس از سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، به محلول بالایی جدا شده به میزان دو برابر حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و به آرامی مخلوط گردید. بعد از سانتریفوژ مجدد، محلول فوقانی دور ریخته شد و پس از تبخیر شدن ایزوپروپانول در زیر هود به رسوب باقی مانده ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE اضافه و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۸). برخی از مخمرها نیز به روش دقیقه سکانس ژن الانگیشن و برخی نیز به روش بتا توبولین شناسایی شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از قطعه مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی فاصله بین رونویسی داخلی (ITS1'5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3) آغازگر رفت و (ITS4'5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3) آغازگر برگشت انجام شد. ابتدا درجه خلوص و اندازه نسبی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد تعیین

سلسیوس قرار داده شد. پس از آن کلنی‌های به دست آمده بر روی پلیت بر اساس مورفولوژی متفاوت خالص‌سازی و کلنی‌ها بر روی محیط کشت YPD آگار (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) (مرک، آلمان) نگهداری شدند. سپس با استفاده از رنگ سودان سیاه B (مرک، آلمان) تولید چربی توسط کلنی‌های مخمر و کپک تایید شد. کلنی‌هایی که پس از رنگ‌آمیزی و مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری، دارای گرانول‌های سیاه رنگ درون سلولی بودند به‌عنوان کلنی‌های مولد چربی انتخاب شدند (۱۵ و ۱۴).

ب) تهیه محیط کشت فعال سازی و تولید لیپید: در ابتدا سویه مورد نظر به محیط کشت پیش تولید یا محیط فعال سازی حاوی ۱۵ گرم در لیتر گلوکز، ۵ گرم در لیتر پتاسیم سولفات، ۱ گرم در لیتر پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم در لیتر منیزیم سولفات و ۰/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر با pH = ۵ انتقال داده شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در شیکر با میزان ۱۸۰ دور در دقیقه نگهداری گردید. در ادامه سویه مورد بررسی به محیط کشت تولید که دارای ۳۵ گرم در لیتر گلوکز، ۲ گرم در لیتر آمونیوم سولفات، ۷ گرم در لیتر پتاسیم هیدروژن فسفات، ۲ گرم در لیتر سدیم هیدروژن فسفات، ۱ گرم در لیتر منیزیم سولفات و ۱ گرم در لیتر عصاره مخمر با pH = ۶ بود، انتقال داده شد. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با میزان ۱۸۰ دور در دقیقه قرار گرفت (۱۵).

ج) استخراج لیپید طبق روش تغییر یافته: *Bligh and Dyer* از روش اصلاح شده بالای‌ودایر استفاده گردید. در این روش ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه کشت داده شده، در محیط کشت YPD در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و با آب مقطر استریل شست و شو داده شد. به زیست‌توده حاصل ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۴ مولار اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از آن ۲۰ میلی‌لیتر متانول-کلروفرم ۱:۱ به زیست‌توده هیدرولیز شده با اسید، اضافه شد و به مدت ۲ تا ۳ ساعت مخلوط گردید. سپس در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد تا

آنالیز کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی شامل ردیاب جرمی Agilent 5975 C با منبع یونیزاسیون الکترونی (EI) کوپل شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent 7890 که از ستون HP_5MS با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. ترانس استریفیکاسیون با استفاده از سولفوریک اسید به عنوان کاتالیزور با نسبت ۸۰٪/ وزن روغن مورد استفاده و متانول با نسبت ۱: ۳۰ در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۵/۵ ساعت در ۶۰ دور در دقیقه صورت گرفت. روغن تولید شده در فاز بالایی با کمک پترولیوم اتر، جداسازی شد. سپس آنالیز نمونه با استفاده از کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی انجام شد. دمای محل تزریق بر روی ۲۰۰ درجه سلسیوس، دمای منبع یونیزاسیون ردیاب جرمی روی ۱۵۰ درجه سلسیوس و دمای آنالیز روی ۲۳۰ درجه سلسیوس تنظیم گردید. نمونه‌ی تهیه شده توسط سرنگ مخصوص دستگاه به میزان ۱۰ میکرولیتر داخل ستون دستگاه آشکار کننده‌ی FID تزریق شد. بلافاصله بعد از تزریق نمونه توسط نرم‌افزار هم تایید شد و توسط دستگاه خوانش شد. نتایج به صورت منحنی در نرم افزار دستگاه ثبت شد (۲۳-۲۰).

(و) تعیین میزان تولید لیپید: به منظور تعیین درصد تولید لیپید از فرمول زیر استفاده شد: درصد لیپید تولیدی (محتوای لیپیدی) = $100 \times$ بیومس خشک/ وزن روغن استخراج شده. به منظور اندازه‌گیری میزان روغن تولیدی، ابتدا روغن استخراج شده توزین شد و به منظور ارزیابی بیومس خشک، ۵ میلی لیتر از محیط تولید شده جدا و در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. از اختلاف وزن لوله آزمایش ثانویه و اولیه، بیومس خشک در ۵ میلی لیتر به دست آمد (۲۴).

یافته‌ها

(الف) جداسازی مخمرها و بررسی میزان تولید لیپید در آن‌ها: پس از رنگ‌آمیزی با سودان سیاه و مشاهده با میکروسکوپ

گردید. سپس توسط شرکت فزا پژوه تعیین توالی شد. در نهایت توالی به دست آمده در سایت NCBI جستجو شد تا نام جنس و گونه مخمر مورد نظر مشخص گردد. واکنش زنجیری پلی‌مرازی حاوی سه مرحله‌ی واسرشت اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، دوره سی‌گانه که شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ می‌باشد (۱۹).

(ه) بهینه‌سازی به روش تاگوچی با استفاده از نرم‌افزار Qualitek-4: با کمک نرم افزار Qualitek-4 در ابتدا برنامه‌ریزی برای طراحی تاگوچی صورت گرفت. فاکتور شامل غلظت گلوکز، غلظت سولفات آمونیوم، کلرید منیزیم، دما، هوادهی، pH و مدت زمان انکوباسیون در نظر گرفته شدند. جدول ۱ سطوح عوامل مورد بررسی را نشان می‌دهد. بر این اساس طراحی L16 توسط نرم‌افزار انتخاب گردید. بدین معنی که با ۱۶ آزمایش برنامه‌ریزی شده و با مشخص بودن برنامه کار تا انتها، بهترین حالت برای تولید بهینه، به دست می‌آید. چنانچه حالت بهینه در بین ۱۶ آزمایش انجام نشده باشد باز هم توسط نرم‌افزار بهترین حالت انتخاب و مقدار تولید در شرایط بهینه پیش‌بینی گردید (جدول ۵).

جدول ۱: سطوح در نظر گرفته شده برای هر یک از پارامترهای مورد بررسی.

پارامترها	سطح اول	سطح دوم	سطح سوم	سطح چهارم
دما	۲۰	۲۵	-	-
Rpm	۱۰۰	۱۸۰	-	-
Mgcl2	۱	۳	-	-
گلوکز	۳۰	۵۰	۷۰	۹۰
سولفات آمونیوم	۰/۵	۱	۵/۱	۲
pH	۵	۵/۵	۶	۶/۵
مدت زمان (ساعت)	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰

(و) آنالیز روغن مخمری با روش آنالیز کروماتوگرافی گازی طیف سنج جرمی (GC-MS): در این تحقیق از دستگاه

گونه‌هایی که مورد آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و بررسی مورفولوژیک قرار گرفتند، ذکر شده است. نام نمونه‌های جدا شده از کشت خاک جمع‌آوری شده در بخش نامبر عدد پلیت‌های کشت آمده است. در این جدول نشان داده شده است که چه گونه‌هایی و به چه روشی شناسایی شده‌اند.

جدول ۳: نمونه‌های جدا شده از خاک.

شماره	شناسایی	Multiplex واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز	ITS سکانس	سکانس بتا توبولین	Elongation factor سکانس
۱	<i>Penicillium spp.</i>	NR	<i>Penicillium polonicum</i>	NR	NR
۲	NR	NR	<i>Penicillium polonicum</i>	NR	NR
۳	<i>Penicillium spp.</i>	NR	<i>Penicillium polonicum</i>	NR	NR
۴	<i>Aspergillus spp.</i>	NR		<i>Aspergillus niger</i>	NR
۵	<i>Penicillium spp.</i>	NR	<i>Penicillium chrysogenum</i>	NR	NR
۶	<i>Aspergillus niger</i>	NR		<i>Aspergillus niger</i>	NR
۷	NR	NR	<i>Penicillium expansum</i>	NR	NR
۸	NR	NR	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	NR	NR
۹	<i>Fusarium spp.</i>	NR	NR	NR	<i>Fusarium proliferatum</i>
۱۰	NR	NR	<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	NR	NR
۱۱	<i>Penicillium spp.</i>	NR	<i>Penicillium solitum</i>	NR	NR
۱۳	<i>Aspergillus niger</i>	NR		<i>Aspergillus niger</i>	NR
۱۶	<i>Penicillium spp.</i>	NR	<i>Penicillium expansum</i>	NR	NR
۱۷	<i>Penicillium spp.</i>	NR	<i>Penicillium chrysogenum</i>	NR	NR
۲۱	<i>Penicillium spp.</i>	NR	<i>Penicillium chrysogenum</i>	NR	NR
۲۲	<i>Aspergillus spp.</i>	NR		<i>Aspergillus niger</i>	NR
۲۶	<i>Penicillium spp.</i>	NR	<i>Penicillium olsonii</i>	NR	NR
۲۷	NR	NR	<i>Auxarthron alboluteum</i>	NR	NR
۳۰	<i>Penicillium spp.</i>	NR	<i>Penicillium expansum</i>	NR	NR
۳۱	<i>Fusarium spp.</i>	NR		NR	<i>Fusarium proliferatum</i>
۳۲	<i>Fusarium spp.</i>	NR	NR	NR	<i>Fusarium proliferatum</i>
۳۳	<i>Rhizopus spp.</i>	NR	<i>Rhizopus oryzae</i>	NR	NR
۳۴	<i>Penicillium spp.</i>	NR	<i>Penicillium polonicum</i>		NR
۴۱	Yeast cells	<i>Candida lusitanae</i>	NR	NR	NR
۴۳	NR	NR	<i>Basidium lisinofilum</i>	NR	NR
۴۲	Yeast cells	<i>Candida glabrata</i>	NR	NR	NR
۴۷	NR	NR	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	NR	NR

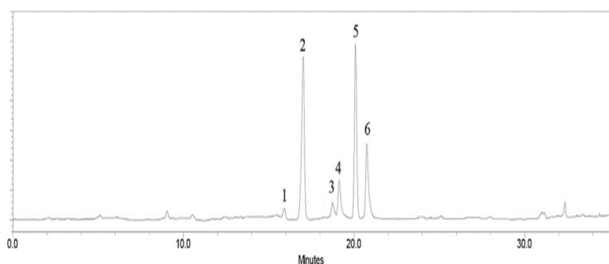
NR: Not Recognized

نوری، مخمرهای دارای گرانول‌های سیاه رنگ چربی شناسایی شدند. مخمرهای جداسازی شده از طبیعت به صورت ۱X تا ۱۵X نام‌گذاری شدند. نمونه‌های ۱X تا ۵X از خاک‌های اطراف رستوران‌ها و تعمیرگاه‌های ماشین، نمونه‌های ۶X تا ۱۰X از میوه‌ها و نمونه‌های ۱۱X تا ۱۵X از خاک باغ‌های گردو، بادام، و آفتابگردان بودند (جدول ۲).

جدول ۲: میزان چربی تولیدی در مخمرهای جداسازی شده.

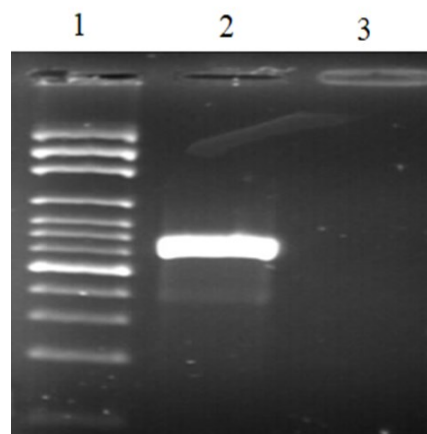
نام نمونه	وزن لیپید (گرم در لیتر)	وزن بیومس خشک (گرم در لیتر)	درصد تولید لیپید نسبت به وزن خشک (درصد)
X1	۱/۹۸	۸/۸	۲۲/۵
X2	۳/۲۴	۱۲/۶۵	۲۵/۶
X3	۳/۴۲	۱۰/۱۲	۳۳/۷
X4	۱/۹۸	۱۲/۰۶	۱۶/۴
X5	۲/۴۳	۸/۱۳	۲۹/۸
X6	۱/۴۵	۸/۲۱	۱۷/۶
X7	۲/۲۴	۷/۷۸	۲۸/۷
X7	۲/۲۵	۶/۸۶	۳۲/۷
X9	۳/۶۷	۱۰/۷	۳۴/۲
X10	۴/۴۳	۱۴/۰۲	۳۱/۵
X11	۱/۲۳	۸/۰۷	۱۵/۲
X12	۱/۶۷	۸/۰۴	۲۰/۷
X13	۳/۳	۱۰/۶	۳۱/۱
X14	۲/۹۸	۱۱/۷۶	۲۵/۳
X15	۱/۰۷	۸/۸	۱۲/۱
سویه استاندارد	۵/۴۵	۱۵/۶۷	۳۴/۷

ب) شناسایی مخمر دارای بیشترین میزان تولید لیپید: پس از تعیین توالی و مقایسه در سایت NCBI، جدایه ۹X به عنوان کاندیدا گلابراتا (*Candida glabrata* strain DHP-۱۴-۲) شناسایی گردید. میزان هم‌پوشانی و یکسان بودن توالی با این گونه هر دو در بلاست نمونه‌ها ۹۹ درصد بود. شماره‌ی ثبت توالی مربوط به این سویه در بانک ژن JF825465.1 می‌باشد. LOT:10619H20042 و شناسایی گونه‌ها توسط ژن‌های بتا توبولین و توالی ITS و ژل ال‌انگیشن انجام شد. شناسایی مورفولوژیک و ژنتیکی برای گونه‌ها انجام گردید. در جدول ۳



کاندیدا گلابراتا (پس از بهینه‌سازی)

شکل ۲: کروماتوگرام تولید لیپید در کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده‌ای.



شکل ۱: تصویر الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مخمر جداسازی شده؛ چاهک ۱: نشانگر با طول ۱۰۰ جفت باز، چاهک ۲: کاندیدا گلابراتا با ۸۸۱ جفت باز، چاهک ۳: کنترل منفی.

در جدول ۴ ترکیب لیپید استری شده و درصد لیپیدهای تولیدی در مخمرهای مورد بررسی ذکر شده است. ترکیب لیپید تولید شده در مخمر کاندیدا گلابراتا در مقایسه با لیپید مورتیرالا آلیپنا که به عنوان گونه استاندارد تلقی می‌شود، آورده شده است.

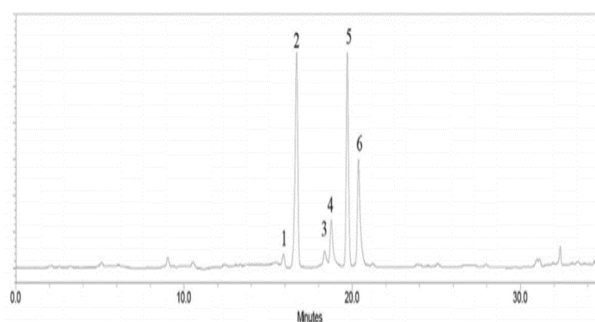
ج) آنالیز روغن مخمر توسط کروماتوگرافی گازی اسپکترومتری توده‌ای: در این کروماتوگرام، سطح زیر، بیک شماره ۱ میزان تولید پالمیتولئیک اسید، شماره ۲ میزان تولید پالمیتیک اسید، شماره ۳ میزان تولید لینولئیک اسید، شماره ۴ میزان تولید لینولنیک اسید، شماره ۵ میزان تولید اولئیک اسید و شماره ۶ میزان تولید استئاریک اسید را نشان می‌دهد.

جدول ۴: ترکیب اسیدهای چرب موجود در روغن مورد بررسی.

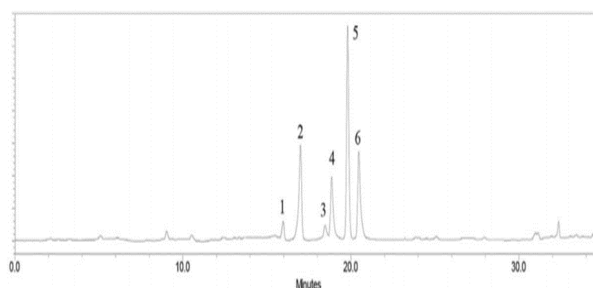
سویه مخمري	۰:۱۶C	۱:۱۶C	۰:۱۸C	۱:۱۸C	۲:۱۸C	۳:۱۸C
کاندیدا گلابراتا	۳۹/۴۸	۰/۹۸	۱۴/۹۸	۳۸	۴/۶	۰/۴۵
مورتیرالا آلیپنا	۱۸/۱۳	۲/۴۳	۱۸/۲۳	۴۹	۸/۴۸	۰/۶۸
کاندیدا گلابراتا (پس از بهینه‌سازی)	۳۷/۴۳	۱/۰۲	۱۲/۷۸	۳۹	۴/۸	۱

د) بهینه‌سازی به روش تاگوچی با استفاده از نرم افزار Qualitek-۴: با کمک نرم افزار Qualitek-۴ در ابتدا برنامه‌ریزی برای طراحی تاگوچی صورت گرفت. ۷ فاکتور غلظت گلوکز، غلظت سولفات آمونیوم، کلرید منیزیم، دما، هوادهی، pH و مدت زمان انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت (۲۵).

نتایج تولید لیپید دو سویه مورد بررسی (سویه استاندارد و سویه بومی) تعیین شد. میزان تولید در حالت بهینه پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار تاگوچی در کاندیدا گلابراتا معادل ۹/۶ گرم در لیتر و در مورتیرالا آلیپنا معادل ۸/۱۰ گرم در لیتر به دست آمد که به میزان پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار نزدیک است (جدول ۵).



کاندیدا گلابراتا



مورتیرالا آلیپنا

جدول ۵: نتایج تولید لیپید در طراحی تاگوچی.

آرایه‌ها	تولید لیپید (گرم در لیتر) در کاندیدا گلابراتا	تولید لیپید (گرم در لیتر) در موریتیرلا آلپینا
آرایه‌ی ۱	۴/۷۵	۵/۹
آرایه‌ی ۲	۴/۵	۶/۴
آرایه‌ی ۳	۴/۱۵	۵/۶۳
آرایه‌ی ۴	۴/۵۲	۵/۹
آرایه‌ی ۵	۴/۳	۹/۳
آرایه‌ی ۶	۴/۸۵	۸/۴۱
آرایه‌ی ۷	۴/۸	۹/۱
آرایه‌ی ۸	۳/۷۵	۶/۶
آرایه‌ی ۹	۵/۸۵	۷/۶۲
آرایه‌ی ۱۰	۷	۹/۰۱
آرایه‌ی ۱۱	۵/۱۵	۵/۹
آرایه‌ی ۱۲	۴/۹	۵/۷
آرایه‌ی ۱۳	۶/۱	۸/۴
آرایه‌ی ۱۴	۴/۴۵	۶/۲
آرایه‌ی ۱۵	۴/۷	۶/۲۸
آرایه‌ی ۱۶	۵/۲۵	۶/۶۱

بحث

با رشد علم و تکنولوژی در حیطه نیازهای غذایی انسان، در سالیان اخیر توجه دانشمندان به غذاهای فراسودمند و بی‌ضرر که از میکروبیها، بخصوص مخمرها تولید می‌شوند افزایش یافته است (۲۵). در مطالعاتی که انشائیه (Enshaeieh) و همکاران در ایران (۲۰۱۴) در ایران انجام دادند، تولید لیپید توسط مخمرهای یارویا لیپولیتیکا (70562DSM) (*Yarrowia lipolytica*) و ژئوتریکوم BL (*Geotrichum*) پس از بهینه‌سازی شرایط به ترتیب معادل ۷/۳۵ و ۵/۳۵ گرم در لیتر بود. این عامل در مورد مخمر استاندارد و بومی به ترتیب دارای میزان تاثیر ۴۱/۳۷ درصد و ۳۶/۵۷ درصد بود. همچنین نتایج حاصل از آنالیز لیپید با روش طیف سنجی مادون قرمز نشان داد که تشابه قابل توجهی بین روغن جداسازی شده از سویه‌های مخمری و استاندارد (تری اولئین) وجود داشت. در مطالعه حاضر مخمرهای جداسازی شده از طبیعت به صورت ۱X تا

۱۵X شناسایی شدند. در این بررسی بیشترین میزان وزن لیپید (۴/۴۳ گرم در لیتر) مربوط به نمونه مخمر ۱۰X بود که از میوه‌ها جدا شده بود. وزن بیومس خشک در این نمونه ۱۴/۰۲ گرم در لیتر و درصد تولید لیپید نسبت به وزن خشک ۳۱/۵ درصد بود که از نتایج مطالعه انشائیه و همکاران کمتر بود. بر اساس مطالعه انشائیه و همکاران موثرترین عامل در روند بهینه‌سازی در مخمرهای مورد بررسی غلظت منبع کربن است. بنابراین اختلاف در میزان کربن و همچنین نوع گونه مخمر از دلایل اختلاف در میزان تولید چربی در مخمرهای مختلف است (۲۶). همچنین میکروارگانیسم‌هایی که قابلیت تجمع لیپید به میزان بیش از ۲۰ درصد بیومس خود را دارند، تحت عنوان میکروارگانیسم‌های مولد چربی نامیده می‌شوند. در این بررسی تنها دو جدایه X و ۶X درصد تولید لیپید نسبت به وزن خشک آن‌ها به ترتیب ۱۶/۴ و ۱۷/۶ درصد بود و تولید میزان کمتری از لیپید در آن‌ها شناسایی شد. وزن لیپید در این دو نمونه به ترتیب ۱/۹۸ و ۱/۵۴ گرم در لیتر بود. روغن‌های میکروبی شباهت زیادی با روغن‌های گیاهی دارند، اندک تفاوت بین آن‌ها غنی بودن روغن میکروبی از اسیدهای چرب غیر اشباع است. لیپیدهای سنتز شده توسط مخمرها قابلیت استفاده در صنایع دارویی برای مقاصد تکنیکی و یا به عنوان مکمل غذایی را دارند (۲۶ و ۲۷). طی تحقیقی که قاسمی (Ghasemi) و همکاران در ایران (۲۰۱۷) انجام دادند، نمونه‌های مخمری از ماهی سوف جدا و ماده ژنتیکی ریوزومی گونه‌هایی از مخمر که توانایی تولید بالای ۲۰ درصد روغن را داشتند برای تشخیص گونه مخمری استفاده شد. گونه مخمر جداسازی شده از آبشش ماهی سوف کاندیدا اورتوفیسالیس (*Candida orthopsilosis*) و بیشترین مقدار لیپید تولید شده از آن ۳/۲۶ گرم در لیتر بود (۲۸). طبق نتایج حاضر جدایه‌ی ۱۰X با بیشترین میزان لیپید گونه کاندیدا گلابراتا (*Candida glabrata* strain DHP) (۱۴-۲) بود. قادر به تولید لیپید بودند. همانند سایر گونه‌های میکروبی روغنی، میزان روغن تولیدی آسپرژیلوس (*Aspergillus*)، پنی سیلیوم (*Penicillium*)، فوراریوم (*Fusarium*)، و رایزوپوس

گلوکز، غلظت سولفات آمونیوم، کلرید منیزیم، دما، هوادهی، pH و مدت زمان انکوباسیون با تولید اسید چرب مرتبط بود. نصیریان (Nasirian) و لوین (Levin) طی تحقیقی در ایران (۲۰۱۸)، نشان دادند که دو منبع کربنی گلوکز و گلیسرول بر تولید توده سلولی و محتوای لیپید موثر است و روند تولید لیپید با استفاده از گلوکز توسط مخمر رودوسپوریادیوم *دایوسواتوم* در زمان‌های مختلف، اختلاف معنی داری (در سطح ۵ درصد) نسبت به گلیسرول دارد و پس از ۱۲۰ ساعت نیز محتوای لیپید آن کمی بالاتر از مخمرهای رشد کرده در محیط گلیسرولی بود. استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن باعث افزایش تولید به میزان ۵/۱۱ درصد در اسیدهای چرب دارای یک زنجیره‌ی اشباع و ۳/۷ درصد در میزان اسیدهای چرب با چند زنجیره‌ی اشباع شد، در محیط حاوی گلیسرول ۲۱/۸ درصد اسیدهای چرب اشباع بیشتری مشاهده گردید (۳۴). در تحقیق دیگر که توسط بریکتن (Berikten) و همکاران (۲۰۲۱) در ترکیه انجام شد؛ تولید لیپیدها با استفاده از مخمرها از گلیسرول خام مورد بررسی قرار گرفت. کاندیدا *گلابراتا* (*Candida glabrata*) و همچنین دو گونه جدید *پیچیا کاکتوفیلا* (*Pichia cactophila*) و کاندیدا *لوسیتانیا* (*Candida lusitanae*) به عنوان تولید کننده لیپید شناسایی شدند (۳۵). در طی تحقیق که توسط هیتور (*Heitor*) و همکاران (۲۰۲۰) انجام شد، کپک‌هایی مورد بررسی قرار گرفتند که در محیط‌هایی با مواد اولیه ارزان قیمت بتوانند رشد کنند. کپک *موکور سیرسیلوئیدس* (*Mucorcircinelloides*) در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت و توانست به میزان ۲۲ درصد از وزن خشک خود لیپید تولید کند (۳۸). تحقیقی توسط شیوانی چاتورودی (*Shivani Chaturvedi*) و همکاران (۲۰۱۸) از مخمر *ردوتورولا گلوتنیس* (*Rhodotorula glutinis*) و قارچ رشته ای *گانودرما ویرونس* (*Ganoderma wiiroense*) برای تولید لیپید استفاده کردند. در این تحقیق از پوست موز به عنوان منبع کربن استفاده شد. بر اساس نتایج این تحقیق این دو گونه به میزان ۰/۲۰ گرم در لیتر توانستند لیپید تولید کنند (۳۹). در طی تحقیقی که توسط مومردمیر (*Muammer Demir*) و همکاران

(*Rhizopus*) تحت تاثیر شرایط محیطی کشت می‌باشد. میزان تولید روغن در قارچ‌ها در سطوح حدواسط گلوکز بیشترین میزان است که همانند سایر گونه‌های میکروبی روغنی می‌توان این مشاهده را به تاثیر فشار اسمزی و اثر بازدارندگی سطوح بالای گلوکز در تولید روغن نسبت داد. عصاره مخمر به عنوان منبع پروتئینی تاثیر قابل توجهی در تولید روغن دارد به طوری که اکثر تحقیقات در این زمینه، آن را به عنوان منبع پروتئینی تولید روغن در گونه میکروبی گزارش کرده‌اند (۲۹). همچنین دما نیز نقش مهمی در تولید میزان مختلف لیپید از مخمرها دارد. کاهش دما باعث افزایش اسید چرب غیراشباع بلندزنجیره تا سطح ۲۴٪ در روغن این گونه میکروبی شد. نتایج نشان داد در شرایطی که دما در انتهای فرایند تخمیر کاهش یافته اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره بالای ۲۰ کربن افزایش می‌یابد در حالیکه کاهش دما از ابتدای فرایند باعث افزایش غیراشباع اسیدهای چرب ساختاری مانند لینولئیک و لینولنیک است (۲۹ و ۳۰). روش کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری توده‌ای تولید پالمیتوئیک اسید، پالمیتیک اسید، لینولئیک اسید، لینولنیک اسید، تولید اولئیک اسید و استئاریک اسید را در تحقیق حاضر نشان داد. در تحقیقی که توسط ماتسوزاوا (*Matsuzawa*) و همکاران (۲۰۲۰) در ژاپن انجام شد، تولید اسید اولئیک، لینولئیک، پالمیتوئیک در گونه‌های مخمرهای *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) و *لیپومایسس استارکی* (*Lipomyces starkeyi*) ثابت شد (۳۱). همچنین مطالعه نووکورو (*Nwokoro*) و همکاران (۲۰۱۸) در نیجریه نشان داد که بیشترین میزان رشد مخمرهای تولید کننده چربی به طور متوسط در pH ۶-۴ است. در این بررسی عمده‌ترین مخمر تولید کننده لیپید *کاندیدا تروپیکالیس* (*Candida tropicalis*) اسید چرب غالب؛ اسید لینولئیک بود (۳۲). طی بررسی انجام شده توسط ماسکول (*msakul*) و همکاران (۲۰۲۱) در تایلند، ارزیابی مخمرهای تولید کننده چربی نشان داد که رشد بهینه مخمر و تولید چربی در محدوده pH ۵/۵ تا ۷/۵، دمای ۳۰ درجه سلسیوس، وجود ماده اولیه گلوکز و محیط مناسب آزمایشگاهی است (۳۳). بر اساس نتایج تحقیق حاضر غلظت

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه تهران بخش قارچ‌شناسی و مسئولین محترم آزمایشگاه بهداشتی شهید ترکیان دانشگاه علوم پزشکی البرز برای در اختیار قرار دادن امکانات جهت این تحقیق قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

وجود ندارد.

(۲۰۲۰) ارئه شد، نشان داده شد که مخمر *Mortierella isabellina DSM 1414* می‌تواند از منابع مختلفی از کربن استفاده و لیپید تولید کند. در این تحقیق از قندهای مختلفی استفاده شد که بیشترین میزان تولید لیپید در حضور لاکتوز به عنوان منبع کربن و به میزان ۱۰/۸ گرم در لیتر بود (۴۰). در تحقیقی که توسط منصور شاه (*ManzoorShaha*) و همکاران (۲۰۲۰) ارائه شد لیپید تولید شده توسط مخمر *Gilbertella persicaria DSRI: A* به میزان ۳۴/۵ درصد از وزن خشک خود لیپید تولید نمود (۴۱). پژوهشی توسط رسولی (*Rasouli*) و همکاران (۲۰۲۱) ارائه شد که در آن تولید لیپید توسط باکتری *Kocuria Y205* مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج این تحقیق، بیشترین میزان تولید در طول ۴۸ ساعت و به میزان ۲۴/۵۷ درصد از وزن خشک این باکتری بود (۴۲). نتایج حاصل از مطالعات مختلف، تاثیر فاکتورهای متفاوتی را در تولید بهینه لیپید از مخمر تایید کرده‌اند (۳۶ و ۳۷). در این تحقیق تولید اسیده‌های چرب ضروری توسط مخمرها نشان داده شد. همچنین میزان لیپید تولیدی از مخمرهای مختلف با یکدیگر متفاوت بود. منبع جداسازی این مخمرها، جزیی از منابع در دسترس بود و جداسازی آن‌ها از خاک انجام شد. با توجه به ارزش تغذیه‌ای، دارویی و بی‌ضرر بودن لیپیدهای تولید شده توسط مخمرها، همچنین مقرون به صرفه بودن این چربی‌ها، توجه به این میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان کارخانه‌های تولید چربی حائز اهمیت است.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق نشان داده شده که مخمر *کاندیدا گلابراتا* توانایی بالایی در تولید لیپید دارد و می‌توان از این مخمر به‌عنوان یک تولید کننده لیپید مخمر استفاده کرد. این مطالعه در مقیاس آزمایشگاهی انجام شد که با استفاده از آن می‌توان تولید لیپید در مقیاس صنعتی را مورد مطالعه قرار داد. *کاندیدا گلابراتا* می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای بالقوه برای تولید لیپید در نظر گرفته شود.

References

1. Madani M, Enshaeieh M, Abdoli A. Single cell oil and its application for biodiesel production. *Process Saf Environ Prot.* 2017; 111:560-747.
2. Bento HB, Carvalho AK, Reis CE, De Castro HF. Single cell oil production and modification for fuel and food applications: assessing the potential of sugarcane molasses as culture medium for filamentous fungus. *Ind Crops Prod.* 2020; 145:113-141.
3. Taati M, Habibi Rezaei M, Keihan A H. Omega-3 Fatty Acids: Anti-Inflammatory Effects to Ensure the Health. *J Mar Med.* 2020; 2 (3):135-149.
4. Christie WW, Harwood JL. Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators. *Essays Biochem.* 2020; 64(3):401-21.
5. Konur O. Algal biomass production for biodiesel production: A review of the research. *Biodiesel Fuels Based on Edible and Nonedible Feedstocks, Wastes, and Algae.* 2021; 5:695-717.
6. Rohr M, Narasimhulu CA, Hamid S, Parthasarathy S. The dietary peroxidized lipid, 13-HPODE, promotes intestinal inflammation by mediating granzyme B secretion from natural killer cells. *Food Funct.* 2020; 11(11):9526-34.
7. Czumaj A, Śledziński T. Biological Role of Unsaturated Fatty Acid Desaturases in Health and Disease. *Nutrients.* 2020 Jan 29; 12(2):356.
8. Zajonc DM. The CD1 family: serving lipid antigens to T cells since the Mesozoic era. *Immunogenetics.* 2016; (8):561-76.
9. Rashidi, S., Shahsavandi, S. Immunologic adjuvants: An overview of Toll-like receptors mechanism of action in triggering the immune responses. *mjms.*2018; 61(3): 1061-1070.
10. Mała K, Rivello F, Huck WT. Single-cell analysis using droplet microfluidics. *Adv Biosyst.* 2020; 4(1):1900188.
11. Zlatanov, M; Pavlova, K; Grigorova, D. Composition of some yeast strains from Livingston Island, Antarctica. *Folia Microbiologica.* 2001; 46 (5): 402-6.
12. Mhlongo S, Ezeokoli OT, Roopnarain A, Ndaba B, Sekoi PT, Habimana O, Pohl CH. The potential of single-cell oils derived from filamentous fungi as alternative feedstock sources for biodiesel production. *Front Microbiol.* 2021; 12:57.
13. Sagia S, Sharma A, Singh S, Chaturvedi S, Nain PK, Nain L. Single cell oil production by a novel yeast *Trichosporon mycotoxinivorans* for complete and ecofriendly valorization of paddy straw. *Electron J Biotechnol.* 2020; 1:44:60-8.
14. Frederiks WM, Slob A, Frank JJ, Tas J. (Histo)chemical aspects of Sudan Black B in various solvents. *Acta Histochem Suppl.* 1981; 24:259-65. PMID: 6785833

15. Pan LX, Yang DF, Shao L, Li W, Chen GG, Liang ZQ. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. *Food Technol Biotechnol*. 2009; 47 (2):215-20.
16. Manirakiza P, Covaci A, Schepens P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roesse-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *J Food Compos Anal*. 2001; 14(1):93-100.
17. Leite LN, Lelis FJ, de Sousa Xavier MA, dos Santos J, Cardoso L, Barbosa FS, dos Santos RF, Dias SA, de Oliveira Xavier AR. Molecular identification and characterization of filamentous fungi and yeasts isolated in a pharmaceutical industry environment. *J Appl Pharm Sci*. 2020 Jul; 10(7): 27-37.
18. Castoria R, Miccoli C, Barone G, Palmieri D, De Curtis F, Lima G, Heitman J, Ianiri G. Molecular Tools for the Yeast *Papiliotrema terrestris* LS28 and Identification of Yap1 as a Transcription Factor Involved in Biocontrol Activity. *Appl Environ Microbiol*. 2021; 87 (7):e02910-20.
19. Mahmoudi SB, Saffarian Abbaszadeh M, Abbasi S, Farrokhinejad R. Genetic diversity and pathogenic variability among *Cercospora beticola* Sacc. Isolates causing leaf spot of sugar beet in Iran. *J Crop Prot*. 2018; 7 (2): 207-217.
20. Ghanavati H, Abdoli A, Nahvi I, Enshaeieh M, Madani M. Application of statistical processes in improving lipid production by native oleaginous yeast *Rhodotorula* spp. strain Yr2. *ABJ*. 2013; 5(1): 129-144.
21. Gui -you L, Sheng SY, Dai C. Factors affecting γ -linolenic acid content in fermented glutinous rice brewed by *Rhizopus* sp. *Food Microbiol*. 2004;21(3):299-304.
22. Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technol*. 2006; 97(6):841-6
22. Dai C, Tao J, Xie F, Dai Y, Zhao M. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afr J Biotechnol*. 2007; 6(17): 2130-2134.
23. Li Y, Ghasemi Naghdi F, Garg S, Adarme-Vega TC, Thurecht KJ, Ghafor WA, Tannock S, Schenk PM. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microb Cell Fact*. 2014; 13:14.
24. Homayouni-rad A, Oroojzadeh P, Abbasi A. The Effect of Yeast *Kluyveromyces marxianus* as a Probiotic on the Microbiological and Sensorial Properties of Set Yoghurt during Refrigerated Storage. *J Ardabil Univ Med Sci*. 2021; 20 (2):254-268.
25. Enshaeieh M, Abdoli A, Nahvi I, Madani M. Production and optimization of microbial oil from oleaginous yeasts *Yarrowia lipolytica* DSM & native yeast *Geotrichum* Bl. *NCMBJ*. 2014; 3 (12):57-64.

26. Bandhu S, Srivastava A, Ghosh D, Chaudhuri TK. Yeast Single Cell Oils from Bioresources: Current Developments in Production and Applications. *Current Sustainable/Renewable Energy Reports*. 2020 Oct 7:1-2.
27. Ghasemi L, Samadlouie HR, Jalali H, Gharanjik SH. Isolation and identification of *Candida Orthopsilosi* SAGSGC as oleaginous yeast in perch fish by using ribosomal gene and optimization of oil and biomass production. *JFST*. 2017; 70(14): 1-12.
28. Gema H, Kavadia A, Dimou D, Tzagou V, Komaitis M, Aggelis G. Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. *Microbiol Biotechnol*. 2002; 58(2002), 303–307.
29. Liszkowska W, Berlowska J. Yeast Fermentation at Low Temperatures: Adaptation to Changing Environmental Conditions and Formation of Volatile Compounds. *Molecules*. 2021 Jan; 26(4):1035.
30. Matsuzawa T, Maehara T, Kamisaka Y, Ayabe-Chujo Y, Takaku H, Yaoi K. Identification and characterization of *Pseudozyma antarctica* $\Delta 12$ fatty acid desaturase and its utilization for the production of polyunsaturated fatty acids. *J Biosci Bioeng*. 2020; 130(6):604-609.
31. Nwokoro O. Effects of the pH on the growth, lipid and fatty acid production of *Candida utilis* and *Candida tropicalis* grown in cane molasses. *Ann. Food Sci Technol*. 2018; 19:128-34
32. Ngamsirisomsakul M, Reungsang A, Kongkeitkajorn MB. Assessing oleaginous yeasts for their potentials on microbial lipid production from sugarcane bagasse and the effects of physical changes on lipid production. *Bioresource Technology Reports*. 2021; 14:100650.
33. Nasirian N, Levin D. Evaluation of In Vitro Lipid and Carotenoid Synthesis by Yeast, *Rhodospiridium Diobovatum*. *Iranian J Nutr Sci Food Technol*. 2018; 13 (1): 85-94.
34. Berikten D, Hoşgün EZ, Otuzbiroğlu AG, Bozan B, Kıvanç M. Lipid Production from Crude Glycerol by Newly Isolated Oleaginous Yeasts: Strain Selection, Molecular Identification and Fatty Acid Analysis. *Waste and Biomass Valor*. 2021; 12: 5461–5470.
35. Thangavelu K, Sundararaju P, Srinivasan N, Muniraj I, Uthandi S. Simultaneous lipid production for biodiesel feedstock and decontamination of sago processing wastewater using *Candida tropicalis* ASY2. *Biotechnol Biofuels*. 2020; 13(1):1-4.
36. Tang S, Dong Q, Fang Z, Cong WJ, Zhang H. Microbial lipid production from rice straw hydrolysates and recycled pretreated glycerol. *Bioresour Technol*. 2020; 312:123-580.
37. Katrin Ochsenreither¹, Claudia Glück, Timo Stressler, Lutz Fischer and Christoph Syldatk. Production Strategies and Applications of Microbial Single Cell Oils. *Front. Microbio*. 2016.volume7.article1539.
38. Heitor B.S.Bento, Ana K.F.CarvalhoCristiano, E.R.ReisHeizir, F.De Castro. Single cell oil production and modification for fuel and food applications: Assessing the potential of sugarcane molasses as a medium for *filamentus fungus*. 2020. *Industrial Crops and Products* .Volume 145, 11241.

39. Shivani Chaturvedi, Arti Kumari, Amrik Bhattacharya, Anamika Sharma, Lata Nain & Sunil K. Khare . Banana peel waste management for single-cell oil production. 2018. Energy, Ecology and Environment volume 3, pages296–303.
40. Muammer Demir, Aysen Güher Gündes.. Single-cell oil production by *Mortierella isabellina* DSM 1414 using different sugars as carbon source. 2020. Biotechprog. volum 36. issue6.
41. Aabid Manzoor Shaha Hassan Mohamed ab Zichen Zhanga Yuanda Songa. Isolation, characterization and fatty acid analysis of *Gilbertella persicaria* DSR1: A potential new source of high value single-cell oil. 2021. Biomass and Bioenergy. Volume151.106156.
42. Alireza Rasouli, Seyyed Soheil Aghae, Mohsen Zargar, Single-cell Oil Production Using Low-Cost Carbon Sources by Newly Isolated *Kocuria* Y205. 2021. Archive of Hygene Science. Volume 10. Number 2.