Bio-production of Single-cell Oil by Rhodococcus Erythropolis PTCC 1767 Bacterial using Low-cost Carbon Sources

Rasouli, Alireza
MSc in Biotechnology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
Aghaei, Seyyed Soheil*
Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
(*Corresponding Author Email: soheilaghaee@yahoo.com)
Zargar, Mohsen
Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran

Abstract

Introduction: Microorganisms that store lipids due to nutrient deficiencies (especially nitrogen) produce microbial oils following inhibition of growth. Based on the structure of fatty acids, microbial oils have industrial applications. The main purpose of this study, the first in Iran, was to evaluate the production of single-cell oil from *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 using low-cost materials.

Material and Methods: In the present study, *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 as bacterial strain, whey, wheat straw, glucose, and glycerol were used for carbon sources and yeast extract was used for the nitrogen source. The bacterial strain was cultured in the MSM medium. FTIR analysis was performed to confirm the presence of carbon groups, GC analysis for identifying fatty acids, and Sudan black staining and imaging with a Transmission Electron Microscope (TEM) for observing the lipid granules stored inside the cell.

Results: The highest lipid production in the presence of carbon sources was related to whey in 96 hours with 23.22% and the maximum lipid production was obtained using wheat straw in 72 hours with 20%.

Discussion and Conclusion: The results of the present study demonstrated that *Rhodococcus* strains have the ability of bioconversion of low-cost carbon sources wheat straw and the whey to microbial oils and this can serve as a platform for eco-friendly biotechnological processes.

Keywords: Bio-production, Single-cell Oil, Low-cost Carbon Sources, *Rhodococcus erythropolis* 1767 PTCC.

* Corresponding author
Received: March 15, 2020/ **Accepted:** July 5, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)
سال نهم، شماره ۳۵، پاییز ۱۳۹۹، صفحه ۷۱ - ۸۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۵
doi: 10.22108/BJM.2020.121878.1281

تولید زیستی روغن تک‌یاخته توسط باکتری *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 با استفاده از منابع کربنی ارزان

علیرضا رسولی: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، ar.rasouli1990@gmail.com
سید سهیل آقایی*: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، soheilaghaee@yahoo.com
محسن زرگر: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، zmohsen2002@yahoo.com

چکیده

مقدمه: ریزموجوداتی که در شرایط کمبود مواد مغذی (به‌ویژه نیتروژن) و به‌علت توقف رشد، اقدام به ذخیره‌کردن چربی می‌کنند، روغن‌های میکروبی را تولید می‌کنند. باتوجه‌به ساختار اسید چرب، روغن‌های میکروبی کاربردهای صنعتی دارند. هدف اصلی پژوهش حاضر، ارزیابی تولید روغن تک‌یاخته از باکتری *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 با استفاده از منابع خام ارزان‌قیمت است که برای نخستین‌بار در ایران انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها: در مطالعهٔ حاضر از باکتری *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767، از آب پنیر، ساقهٔ گندم، گلوگز و گلیسرول برای منابع کربنی و از عصارهٔ مخمر برای منبع نیتروژنی استفاده و باکتری در محیط MSM کشت داده شد. تحلیل FTIR به‌منظور اثبات وجود گروه‌های کربنی، تحلیل GC برای شناسایی اسید چرب و رنگ‌آمیزی با سودان سیاه و عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری برای مشاهدهٔ گرانول چربی ذخیره‌شده در سلول انجام شد.

نتایج: بیشترین حجم تولید چربی در تمام منابع کربنی به آب پنیر با ۲۳/۲۲ درصد در زمان ۹۶ ساعت مربوط بود و بیشترین حجم چربی با استفاده از منبع کربنی ساقهٔ گندم برابر ۲۰ درصد در زمان ۷۲ ساعت تولید شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان دادند سویهٔ *رودوکوکوس* توانایی تبدیل زیستی منابع کربنی ارزان‌قیمت ساقهٔ گندم و آب پنیر به روغن میکروبی را دارد و این امر می‌تواند به‌شکل برنامه‌ای برای فرایندهای زیست‌فناورانهٔ دوستدار محیط‌زیست به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: تولید زیستی، روغن تک‌یاخته، منابع کربنی ارزان، *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

روغن‌های میکروبی، روغن تک‌سلولی نامیده می‌شوند؛ زیرا ریزموجودات ذخیره‌کنندهٔ روغن این چربی را تولید می‌کنند. در چند دههٔ گذشته، ریزموجودات یادشده ازنظر توانایی منحصربه‌فرد و ویژگی‌های خاص خود توانسته‌اند توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کنند (۱). تولید روغن میکروبی به زمین برای کشت یا منابع دیگری که برای تولید مواد غذایی استفاده می‌شوند، نیاز ندارد و تحت‌تأثیر تغییرات اقلیمی قرار نمی‌گیرد (۲). ذخیرهٔ چربی زمانی اتفاق می‌افتد که ریزموجودات در محیط دارای کربن اضافی کشت شوند و رشد آنها در اثر کاهش سایر مواد مغذی به‌ویژه نیتروژن محدود شود؛ بنابراین، نسبت کربن به نیتروژن (C/N) نقش مهمی در تحریک ذخیرهٔ چربی دارد (۳ و ۴).

طی سال‌های گذشته، توجه پژوهشگران به استفاده از باکتری‌ها برای تولید چربی به‌منظور کاربردهای زیست‌فناوری و صنعتی معطوف شده است. چربی باکتری‌ها شامل تری‌آسیل‌گلیسرول[1] (TAG- اسید چرب بلندزنجیره) و واکس استرهای[2] (WE- اسید چرب بلندزنجیرهٔ اولیه و الکل بلندزنجیرهٔ اولیه) است که در تولید افزودنی‌های غذایی، محصولات آرایشی، روان‌کننده‌ها، روغن‌های شیمیایی، شمع‌ها و سوخت‌های زیستی کاربرد دارد (۵ و ۶). بیشتر گونه‌های باکتری توانایی تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات[3] (PHA) را به‌شکل ترکیبات ذخیره‌ای دارند (۷ و ۸)، اما توانایی ذخیرهٔ تری‌آسیل‌گلیسرول و واکس استر تنها در چند جنس باکتری گزارش شده است (۹). مقدار و ساختار چربی‌های باکتری‌ها به چندین عامل شامل نوع باکتری، ساختار منبع کربنی، زمان کشت و مقدار کربن و نیتروژن موجود در محیط‌کشت بستگی دارد (۷ و ۱۰-۱۲).

مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای، ریزموجودات ذخیره‌کنندهٔ چربی شناخته و برای تولید سوخت‌های زیستی استفاده می‌شوند (۱۳)؛ باوجوداین، رشد مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای ذخیره‌کنندهٔ روغن بسیار آهسته است و تعداد اندکی از اعضای آنها قابلیت ذخیرهٔ چربی را دارند (۱۴ و ۱۵).

در باکتری‌ها، ذخیرهٔ تری‌آسیل‌گلیسرول در اکتینومیست‌ها[4] شامل جنس‌های *مایکوباکتریوم*[5]، *استرپتومیسس*[6]، *نوکاردیا*[7] و *رودوکوکوس*[8] بررسی شده است (۹). در میان جنس‌های باکتریایی ذخیره‌کنندهٔ تری‌آسیل‌گلیسرول، جنس *رودوکوکوس* یکی از امیدوارکننده‌ترین جنس‌هاست؛ زیرا برخی از گونه‌های آن بیش از ۲۰ درصد وزن زیست‌تودهٔ خود تری‌آسیل‌گلیسرول ذخیره می‌کنند و باکتری‌های ذخیره‌کنندهٔ روغن در نظر گرفته می‌شوند (۱۶-۱۸). *رودوکوکوس*‌ها تری‌آسیل‌گلیسرول را در حضور چندین نوع پیش‌ماده (سوبسترا) کربنی و در شرایط محدودیت نیتروژن تولید و ذخیره می‌کنند که این منابع کربنی شامل گلوکز، گلیسرول، اسیدهای آلی، هیدروکربن‌ها (۷، ۱۹ و ۲۰) و منابع کربنی پیچیدهٔ حاضر در پسماندهای صنعتی می‌شوند (۲۱ و ۲۲).

رودوکوکوس‌ها، باکتری‌های هوازی و غیرمتحرکی هستند که به‌وفور در محیط طبیعی یافت می‌شوند. *رودوکوکوس*‌ها از محیط‌های مختلف مانند خاک‌های گرمسیری و استوایی، بیابان‌ها، دریا و رسوبات دریای عمیق گزارش شده‌اند؛ احتمالاً فرایند متابولیکی عظیمی

در این ریزموجودات از پراکندگی آنها در طبیعت و توانایی آنها برای انطباق با طیف وسیعی از شرایط محیطی پشتیبانی می‌کند. این موجودات می‌توانند مقادیر متنوعی از گلیکوژن، پلی‌هیدروکسی‌آلکونات، رنگدانه‌های کاروتنوئید و پلی‌فسفات‌ها را از منابع مختلف کربن تولید کنند؛ باوجوداین، تری‌آسیل‌گلیسرول ترکیب ذخیره‌ای اصلی *رودوکوکوس*‌هاست. به نظر می‌رسد این ریزموجودات توانایی تولید و تجمع تری‌آسیل‌گلیسرول را طی رشد در منابع مختلف کربن دارند. *رودوکوکوس*‌ها دارای توانایی صرفه‌جویی در انرژی متابولیکی مفید طی کاتابولیسم منابع کربن هستند؛ بنابراین، بخشی از انرژی حاصل برای رشد و تقسیم استفاده می‌شود و مازاد آن به مسیرهای ذخیره‌سازی انرژی مانند تولید تری‌آسیل‌گلیسرول هدایت می‌شود. انعطاف‌پذیری متابولیسم *رودوکوکوس*‌ها و توانایی آنها برای تولید ترکیبات ذخیره‌ای متنوع، ویژگی‌هایی هستند که توانایی چنین ریزموجوداتی را که در محیط‌زیست باقی می‌مانند و بازسازی می‌شوند، افزایش می‌دهد. تجمع چربی‌ها سبب استقلال باکتری از محیط‌زیست می‌شود و به بقای سلول هنگام دسترسی‌نداشتن به منابع انرژی در خاک کمک می‌کند. بررسی روند تجمع تری‌آسیل‌گلیسرول در *رودوکوکوس*‌ها نه‌تنها برای فهمیدن فیزیولوژی و زیست‌شناسی آنها اهمیت دارد، در کاربرد بالقوهٔ این ریزموجودات طبیعی برای تولید محصولات زیست‌فناورانه نیز مهم است. چربی‌های باکتریایی برای تولید مواد افزودنی غذایی، آرایشی و بهداشتی، روان‌کننده‌ها، روغن شیمیایی و سوخت‌های زیستی استفاده می‌شوند. مطالعه روی توانایی *رودوکوکوس*‌ها در بیوسنتز و تجمع تری‌آسیل‌گلیسرول و جنبه‌های اساسی آن، زمینهٔ تولید روغن‌های میکروبی را فراهم می‌کند (۲۳).

بازیافت ضایعات به کاهش آثار محیطی منفی و کاهش هزینه‌های کلی مرتبط با مدیریت زباله کمک می‌کند؛ باوجوداین، بازیافت زباله روش کافی مدیریت زباله در نظر گرفته نمی‌شود و امروزه به‌علت فشارهای محیطی، اقتصادی و دولتی، بازیافت زباله باید با تولید محصول دارای ارزش افزوده ترکیب شود. در حال حاضر، بخش بزرگی از زباله‌های تجزیه‌پذیر به‌آسانی سوزانده می‌شود (۲۴) یا به محصولات دارای ارزش افزودهٔ نسبتاً کم مانند بیوگاز (۲۵)، انرژی زیستی و سوخت‌های زیستی (۲۶ و ۲۷) تبدیل می‌شود؛ باوجوداین، برخی پیشرفت‌های فناوری سبب تولید محصولات دارای ارزش افزودهٔ زیاد از این مواد شده است (۲۸-۳۱). مطالعه‌های گسترده‌ای با تمرکز بر جستجو و یافتن مواد خام ارزان‌قیمت مانند پسماند کشاورزی، جنگل‌داری و صنایع غذایی و جایگزینی آنها به‌شکل بستری برای تولید چربی میکروبی انجام شده است (۲۲، ۳۲ و ۳۳).

آب پنیر جزو پسماند صنایع لبنیات است که در مقادیر عظیمی در سطح جهان تولید می‌شود (هر ۱ کیلوگرم پنیر، ۹ کیلوگرم آب پنیر تولید می‌کند). ترکیب اصلی آب پنیر عبارتست از: لاکتوز (۵ تا ۷ درصد) به همراه مقدار کمتری گلوکز، گالاکتوز و پروتئین (۰/۸ تا ۱/۲ درصد) و چربی (۰/۰۶ تا ۳ درصد) (۳۴). دفع نهایی آب پنیر، مشکل اصلی صنایع لبنی است؛ زیرا هنگام رهاسازی در محیط‌زیست، مقدار درخور توجهی آلودگی تولید می‌کند که هزینهٔ بسیار

زیادی برای پاک‌سازی آن نیاز است (۳۵). تبدیل زیستی آب پنیر به روغن میکروبی باارزش، روش جذاب و کارآمدی است که آثار زیست‌محیطی ناشی از رهاسازی پسماند صنعتی در محیط‌زیست را تا حد زیادی کاهش می‌دهد. جلوگیری از آلودگی محیط‌زیست و تولید هم‌زمان و کم‌هزینهٔ چربی پرکاربرد برای تولید بیودیزل، روان‌کننده‌های زیستی، روغن‌های شیمیایی، محصولات آرایشی و دیگر تولیدات زیستی ازجمله ویژگی‌های این روش است (۳۶-۳۸).

علاوه‌بر آب پنیر، ضایعات کشاورزی که جزو ترکیبات لیگنوسلولزی دسته‌بندی می‌شوند، منابع ارزان‌قیمتی هستند که برای تولید چربی میکروبی استفاده می‌شوند. ضایعات کشاورزی از سلولز، همی‌سلولز، لیگنین، پروتئین و خاکستر تشکیل شده‌اند. بسیاری از ضایعات کشاورزی از لیگنوسلولز تشکیل شده‌اند که پلیمر پیچیده‌ای از سلولز، همی‌سلولز و لیگنین است. درصد سلولز، همی‌سلولز، لیگنین و سایر ترکیبات در لیگنوسلولز به‌ترتیب در محدودهٔ ۳۵ تا ۵۰ درصد، ۲۰ تا ۳۵ درصد، ۱۵ تا ۲۰ درصد و ۱۵ تا ۲۰ درصد است (۳۹). تبدیل زیستی لیگنوسلولز به چربی باکتری شامل چند مرحله است: پیش‌تیمار زیست‌تودهٔ لیگنوسلولز، هیدرولیز ساختار کربوهیدارت به قند استفاده‌شونده، تولید چربی میکروبی، جداسازی و خالص‌سازی محصول (۴۰-۴۲).

یکی از مهم‌ترین زباله‌های زراعی، ساقهٔ ذرت است که اشاره به ساقه‌ها، برگ‌ها و کوب‌هایی دارد که پس‌از برداشت در مزرعه باقی می‌مانند. ساقهٔ ذرت یکی از نخستین منابع زیست‌توده است که برای تولید اتانول سلولزی در ایالات متحده استفاده می‌شود. نتایج مطالعه‌های پیشین نشان داده‌اند با استفاده از پیش‌پردازش پساب ساقهٔ ذرت حاوی لیگنین، *رودوکوکوس*‌ها می‌توانند لیپید تولید کنند (۴۳).

هدف اصلی پژوهش حاضر، ارزیابی توان باکتری *Rhodococcus erythropolis* PTCC[۹]1767 در تولید روغن میکروبی از منابع خام ارزان‌قیمت موجود در پسماندهای صنعتی و کشاورزی با قابلیت استفاده در مصارف صنعتی است که برای نخستین‌بار روی این جنس در ایران انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و کشت باکتری: در پژوهش حاضر، باکتری *رودوکوکوس* خریداری‌شده از بانک میکروبی سازمان ملی صنعتی ایران با نام علمی *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 استفاده شد. ساقهٔ گندم (ترکیبات لیگنوسلولزی) از مزارع کشاورزی اطراف شهر قم و آب پنیر (پسماند صنعتی) از صنایع لبنی شهر قم تهیه شد.

به‌منظور بررسی تولید چربی در باکتری از محیط‌کشت MSM[۱۰] حاوی گلوکز (۴۰ گرم‌برلیتر)، $(NH4)_2SO_4$ (۲ گرم‌برلیتر)، KH_2PO_4 (۷ گرم‌برلیتر)، NaH_2PO_4 (۲ گرم‌برلیتر)، $MgSO_4.7H_2O$ (۱/۵ گرم‌برلیتر) و عصارهٔ مخمر (۱ گرم‌برلیتر) (MERCK، آلمان) استفاده شد (۴۴ و ۴۵).

بررسی اولیهٔ تولید چربی: به‌منظور بررسی اولیهٔ تولید چربی، باکتری در محیط جامد تریپتیک‌سوی‌آگار[۱۱] و محیط جامد تریپتیک‌سوی‌آگار به همراه ۳ درصد (وزن/وزن) گلیسرول (منبع کربن اضافی) کشت و به‌مدت ۷ شبانه‌روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد

نگهداری شد؛ درنهایت، به‌منظور ارزیابی تولید چربی از رنگ‌آمیزی سودان سیاه استفاده شد (۴۶). آزمون یادشده در سه تکرار انجام شد.

آماده‌سازی مایهٔ تلقیح: میزان یک لوپ از کشت جامد سویهٔ *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع تریپتیک‌سوی‌آگار تلقیح و به‌مدت ۲۴ ساعت درون شیکرانکوباتور با دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و سرعت ۲۰۰ دوردردقیقه نگهداری شد؛ درنهایت، کدورت رشد (چگالی نوری[۱۲]) آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۴۷).

ارزیابی تولید چربی با استفاده از منابع کربنی مختلف

کشت با آب پنیر: به‌منظور پیش‌تیمار، ابتدا آب پنیر از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد تا ذرات معلق حذف شوند و سپس اسیدیتهٔ آن با سدیم‌گلوکونات به ۷/۵ که برای رشد باکتری *رودوکوکوس* مناسب است، افزایش یافت؛ سپس نمونه با اتوکلاو استریل و دوباره از کاغذ صافی عبور داده شد؛ درنهایت، چهار ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری برداشته و مقدار ۵۰ میلی‌لیتر آب پنیر به هرکدام افزوده و باکتری آماده، تلقیح شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در شیکرانکوباتور با سرعت ۱۵۰ دوردردقیقه و دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند (۴۷).

کشت با ترکیبات لیگنوسلولزی: به‌منظور پیش‌تیمار، ابتدا ساقهٔ گندم در اندازهٔ ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر خُرد و سپس ۲۰۰ گرم از آن به‌مدت ۲۰ دقیقه در ارلن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری جوشانده شد تا مراحل پیش‌تیمار کامل شوند. به‌منظور حذف ذرات معلق، نمونه از کاغذ صافی عبور داده شد و سپس با اتوکلاو استریل شد و برابر با محیط پایه (MSM) به چهار ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری (هرکدام ۵۰ میلی‌لیتر) افزوده و سپس باکتری آماده، تلقیح شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در شیکرانکوباتور با سرعت ۱۵۰ دوردردقیقه و دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند (۴۷).

کشت با منابع کربنی خالص: به‌منظور تولید چربی، محیط‌کشت پایه آماده و به‌جای گلوکز، از ۳ درصد (وزن/وزن) گلیسرول برای منبع کربن استفاده شد. محیط حاصل به چهار ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری (هرکدام ۵۰ میلی‌لیتر) افزوده و سپس باکتری آماده، تلقیح شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در شیکرانکوباتور با سرعت ۱۵۰ و دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد دوردردقیقه نگهداری شدند. آزمون‌های تولید چربی در سه تکرار انجام شدند (۴۸).

محاسبه وزن خشک و درصد چربی باکتری: محاسبهٔ وزن خشک با کمی اصلاحات نسبت به روش کار (زیر هود لامینار انجام و از دمای محیط برای خشک‌کردن نمونه‌ها استفاده شد) انجام شد. به‌منظور محاسبهٔ وزن خشک، ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از محیط‌کشت مایع با سرعت ۶۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد، سپس محلول رویی خارج و رسوب باقیمانده سه بار با آب مقطر شستشو شد، محتوای آن به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط یادشده قرار داده شد تا خشک شود و سپس وزن آن محاسبه شد (۴۷).

به‌منظور به‌دست‌آوردن وزن چربی از روش استخراج استاندارد فلوچ (۴۷) استفاده شد؛ به‌این‌ترتیب که ۳۰ میلی‌لیتر از محیط برداشته و درون لولهٔ فالکون ریخته و به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ

شد. محلول رویی حذف و حجم به‌دست‌آمده دو بار با آب مقطر شستشو شد. مقدار ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم به ۳/۷۵ میلی‌لیتر کلروفرم–متانول (۱:۲) اضافه و محلول ۱۵ دقیقه در دمای اتاق ورتکس شد، دوباره مقدار ۱/۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم افزوده و ۱ دقیقه ورتکس انجام شد؛ علاوه‌براین، ۱/۲۵ میلی‌لیتر NACL ۱ مولار به محلول اضافه و دوباره ۱ دقیقه ورتکس انجام شد؛ درنهایت، محلول ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی در پلیت ریخته و ۲۴ ساعت زیر هود لامینار قرار داده شد تا خشک شود (به‌جای حرارت‌دادن به‌منظور جلوگیری از تغییر ساختار اسید چرب) و پس‌از خشک‌شدن، وزن آن محاسبه شد (۴۷).

تحلیل کمّی تولید چربی به روش طیف‌سنجی FTIR[۱۳]: به‌منظور تأیید وجود چربی در نمونه‌ها از تحلیل FTIR (مدل TNSOR27، بروکر[۱۴]، آلمان) طبق روش استاندارد و با محدودهٔ طیف تجزیه‌وتحلیل دستگاه از ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ برسانتی‌متر (cm^{-1}) استفاده شد (۴۶). این آزمایش برای تمام منابع کربنی انجام شد.

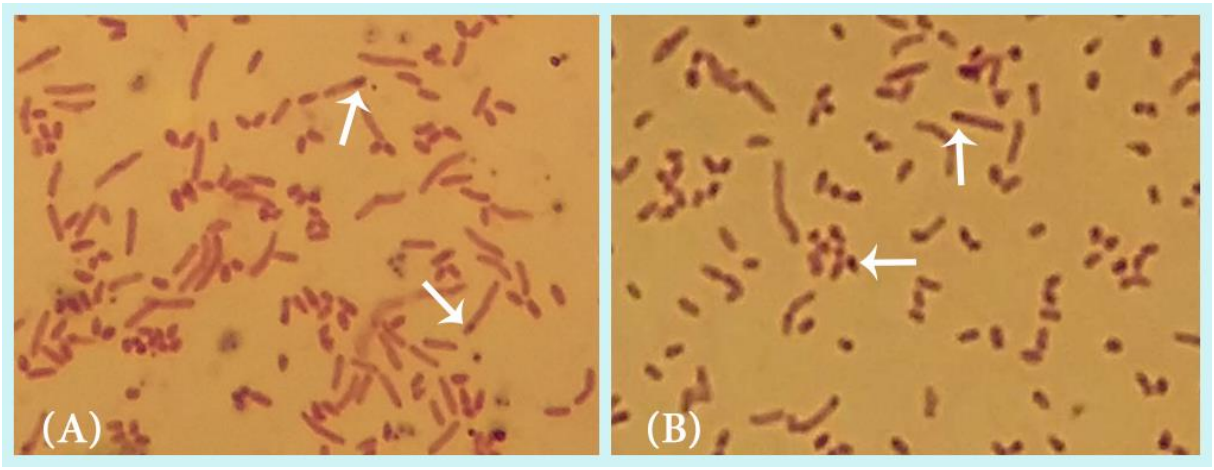
تحلیل کیفی تولید چربی با GC[۱۵]: ازآنجاکه تری‌آسیل‌گلیسرول ۹۸ درصد مجموع چربی‌های جنس *رودوکوکوس* را تشکیل می‌دهد، تحلیل GC (مدل 7890B، اجیلنت[۱۶]، آمریکا) برای شناسایی نوع اسیدهای چرب نمونهٔ چربی تولیدشده با منبع کربنی ساقهٔ گندم استفاده شد. این آزمایش مطابق روش استاندارد و با استفاده از ستون مویرگی به ابعاد ۳۰ در ۰/۵۳ در ۱ میکرومتر با نام InnoWAX و شعلهٔ آشکارساز یونیزاسیون انجام شد. حجم تزریق نمونه ۰/۵ میلی‌لیتر بود و از هیدروژن برای گاز حامل (۱۳ میلی‌لیتردردقیقه) استفاده شد. به‌منظور جداسازی کارآمد استرهای متیل[۱۷] از برنامهٔ زمانی و دمایی (ابتدا نمونه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد در دستگاه قرار گرفت و سپس در هر دقیقه، دما ۶ درجهٔ سانتی‌گراد افزایش یافت و نمونه در دمای ۲۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه تحلیل شد) در دستگاه استفاده شد. تحلیل یادشده با پنج تکرار انجام و نتایج با نرم‌افزار دستگاه بررسی شدند (۴۹).

مشاهدهٔ گرانول چربی با تحلیل عکس میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM[۱۸]: باکتری ابتدا شسته و به بافر ۰/۱ مولار پتاسیم‌فسفات (اسیدیتهٔ ۷/۵) منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت با گلسیرآلدئید ۳ درصد ثابت شد؛ سپس با محلول ساکارز ۰/۳۲ مولار در بافر فسفات و رزین با ویسکوزیتهٔ کم ثابت شد (۵۰). تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری (مدل EM900، زایس[۱۹]، آلمان) در انستیتو پاستور ایران انجام شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری: نتایج کمّی روش‌های تولید روغن تک‌یاخته با استفاده از تحلیل عاملی واریانس (ANOVA) و نرم‌افزار SPSS (نسخهٔ ۲۵) ارزیابی شدند و زمانی که P کمتر از ۰/۰۵ بود، نتایج معنادار در نظر گرفته شدند.

نتایج

بررسی اولیهٔ تولید چربی: پس‌از کشت باکتری در محیط تریپتیک‌سوی‌آگار و محیط تریپتیک‌سوی‌آگار با منبع کربن اضافی به‌مدت ۷ روز، عملکرد باکتری با استفاده از رنگ سودان سیاه بررسی شد. نتایج بررسی، توانایی باکتری *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 در ذخیرهٔ چربی را اثبات کردند (شکل ۱).



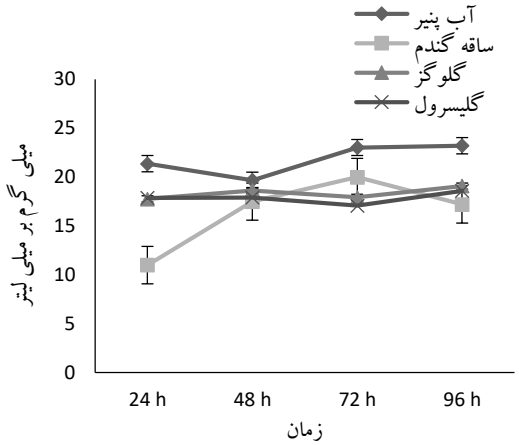
شکل ۱- توانایی سویهٔ *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 در تولید چربی؛ A. کشت ۷ روزهٔ باکتری، B. کشت ۷ روزهٔ باکتری به همراه منبع کربن اضافی گلیسرول

ارزیابی تولید چربی با استفاده از منابع کربنی مختلف: عملکرد باکتری *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 در چهار منبع کربنی مختلف نشان داد میانگین تولید چربی در منبع آب پنیر به‌طور معناداری ($P<۰/۰۵$) بیشتر از دیگر منابع کربنی است. میانگین تولید زیست‌تودهٔ سلولی در تمام بازه‌های زمانی کشت به‌طور معناداری ($P<۰/۰۵$) روی منبع گلیسرول بیشتر بود (جدول ۱).

مقایسهٔ تولید چربی در منابع کربنی مختلف: مقایسهٔ میانگین درصد چربی تولیدشده در باکتری نشان داد تولید در آب پنیر بیشتر از سایر منابع کربنی است (شکل ۲).

جدول ۱- مقدار عملکرد باکتری در منابع کربنی مختلف بر اساس میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر

ردیف	*Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
	پیش‌ماده	عملکرد بر حسب میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر				
۱	آب پنیر	وزن خشک باکتری	۱۵/۹	۱۹/۸	۲۰/۴	۲۱/۱
		میزان چربی	۳/۴	۳/۹	۴/۷	۴/۹
		درصد چربی	۲۱/۳۸	۱۹/۶۹	۲۳/۰۳	۲۳/۲۲
۲	ساقهٔ گندم	وزن خشک باکتری	۱۰	۱۲	۱۴	۱۸
		میزان چربی	۱/۱	۲/۱	۲/۸	۳/۱
		درصد چربی	۱۱	۱۷/۵	۲۰	۱۷/۲۲
۳	گلوکز	وزن خشک باکتری	۱۸	۲۲	۲۹	۳۳
		میزان چربی	۳/۲	۴/۱	۵/۲	۶/۳
		درصد چربی	۱۷/۷۷	۱۸/۶۳	۱۷/۹۳	۱۹/۰۹
۴	گلیسرول	وزن خشک باکتری	۱۹	۲۴	۳۱	۳۶
		میزان چربی	۳/۴	۴/۳	۵/۳	۶/۷
		درصد چربی	۱۷/۸۹	۱۷/۹۱	۱۷/۰۹	۱۸/۶۱

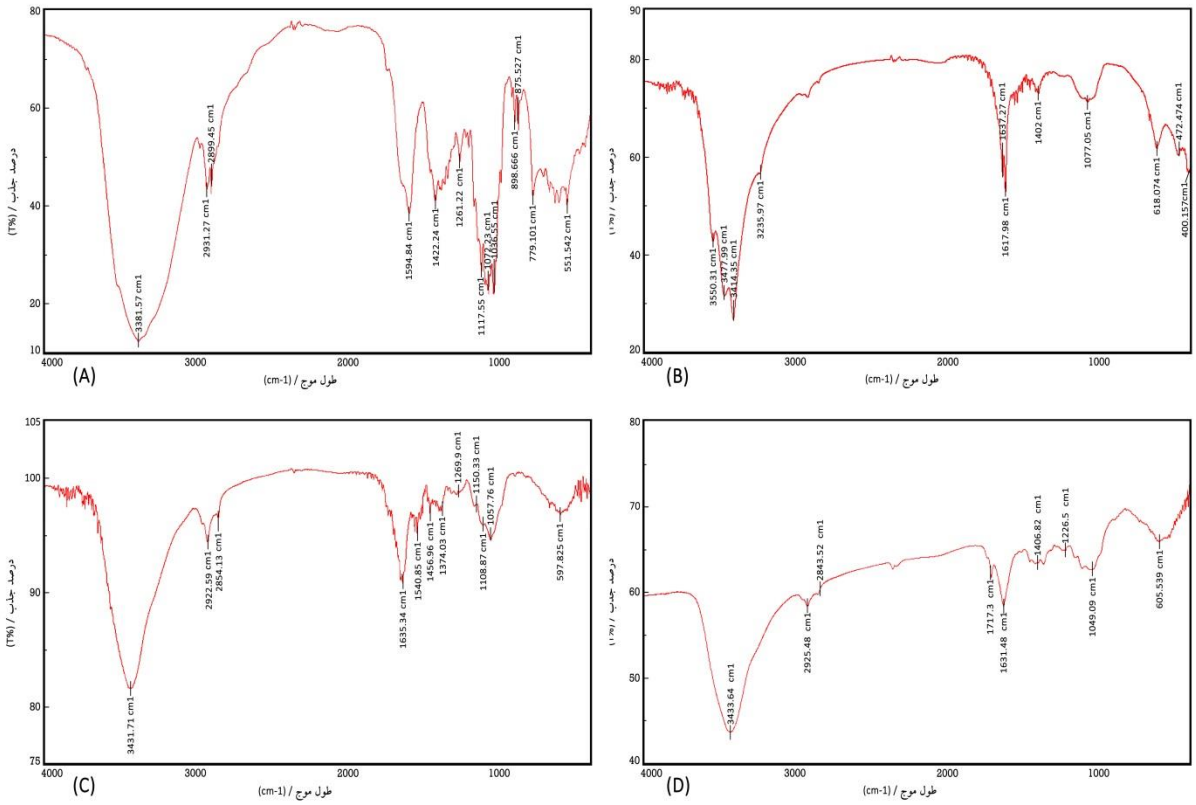


شکل ۲- نمودار مقایسهٔ درصد چربی در منابع کربنی مختلف

تحلیل کمّی تولید چربی به روش طیف‌سنجی: تحلیل FTIR برای اثبات تولید چربی در نمونه‌ها استفاده و تمام نمونه‌های تحلیل‌شده نشان‌دهندهٔ وجود گروه‌های کربنی و عاملی (چربی) بودند که وجود زنجیره‌های کربنی الیفاتیک (چربی) در نمونه‌ها را اثبات می‌کند. در تمام نتایج، پیوند کربن و هیدروژن مشاهده شد که پیش‌ساز ساختار چربی اولیه است و گروه متیل دیده شد که گروه عاملی آب‌گریز است و از یک مولکول متان (CH_4) با حذف یک هیدروژن به دست می‌آید. گروه کربونیل، الکان‌ها، الکیل‌ها و گلیسرول از دیگر گروه‌های لیپیدی موجود در نمونه‌ها بودند که وجود آنها نشان‌دهندهٔ اسید چرب غیراشباع در نمونه‌هاست و وجود تری‌آسیل‌گلیسرول در ترکیب حاصل از تحلیل چربی را اثبات می‌کند. تفسیر نتایج در جدول ۲ و نتایج تحلیل در شکل ۳ برای هر منبع کربنی مشخص شده است.

جدول ۲- تفسیر نتایج تحلیل FTIR با منابع کربنی مختلف

ردیف	منبع کربنی	طول موج (برسانتی‌متر)	گروه عاملی
۱	آب پنیر	3381.67	= C – H stretch
۲		2931.27 - 2899.46	$-CH_3$
۳		1694.84	Carbonyl groups
۴		1422.24	CH_2 binding
۵		1261.22	C – O – C stretching in esters
۶	ساقهٔ گندم	3550. 31 - 3477.99 – 3414.35 - 3235.97	= C – H stretch
۷		1637. 27 - 1617.98	Carbonyl groups
۸		1402	CH_2 binding
۹		1077. 05	C – O – C stretching in esters
۱۰	گلوکز	3546.45 – 3415.31	= C – H stretch
۱۱		2919.7 – 2848.35	$-CH_3$ (Methyl groups)
۱۲		1723.09 – 1636.3 – 1614.13	Carbonyl groups
۱۳		1447.31 – 1374.03	CH_2 binding
۱۴		1667.76	C – O – C stretching in esters
۱۵	گلیسرول	3433.64	= C – H stretch
۱۶		2925.48 , 2843.52	$-CH_3$ (Methyl groups)
۱۷		1717.3 , 1631.48 , 1631.48	Carbonyl groups
۱۸		1406.82	CH_2 binding
۱۹		1226.5 , 1046.09	C – O – C stretching in esters



شکل ۳- تصویر تحلیل FTIR برای باکتری *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 در منابع کربنی مختلف؛ A. منبع آب پنیر، B. منبع ساقهٔ گندم، C. منبع گلوکز، D. منبع گلیسرول

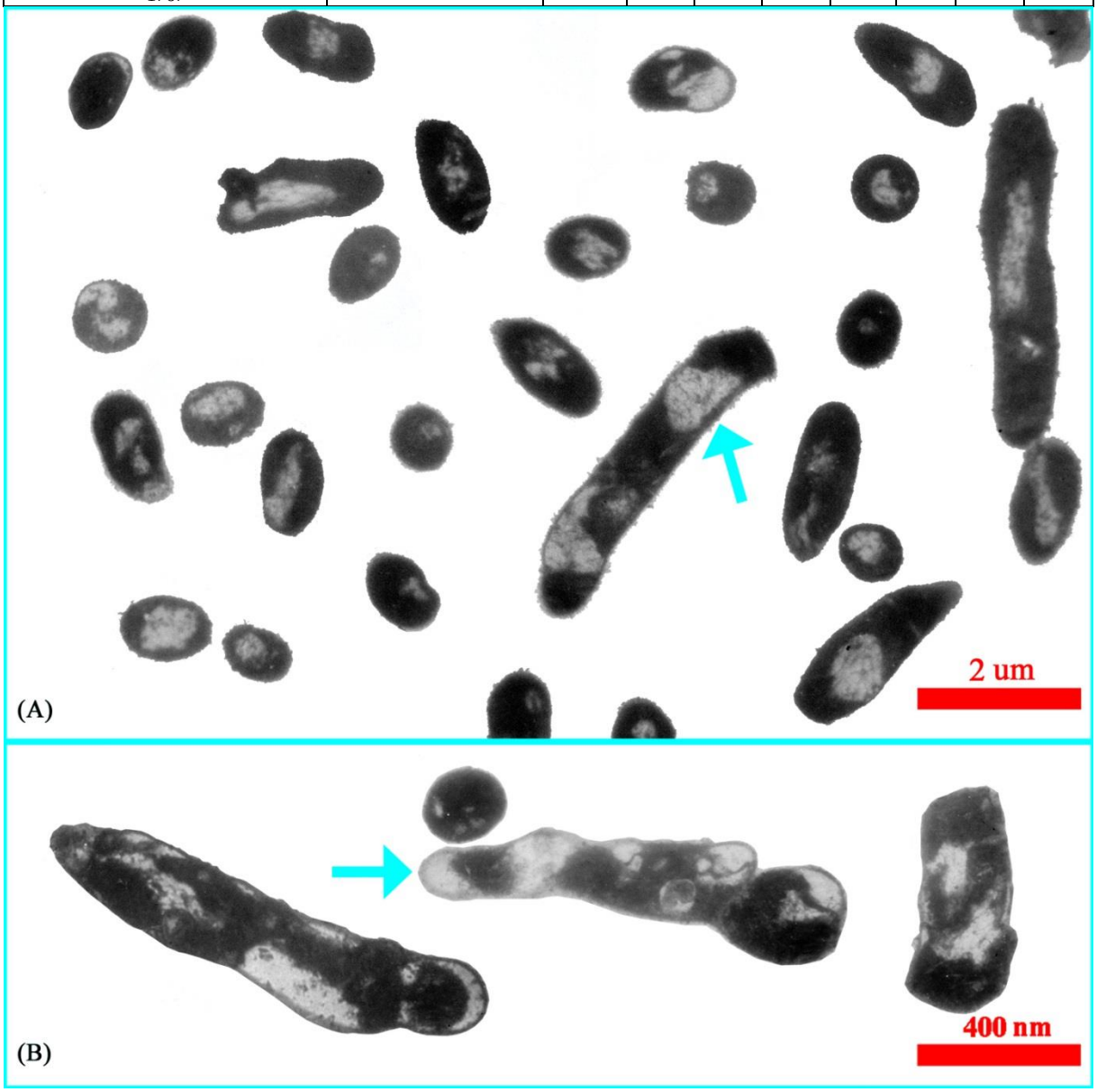
تحلیل GC: به‌منظور شناسایی نوع اسید چرب، آزمایش GC روی نمونهٔ چربی به‌دست‌آمده از کشت باکتری در منبع کربنی ساقهٔ گندم انجام شد. نتایج تحلیل GC بر اساس درصد کربن موجود در نمونه (جدول ۳) نشان دادند اسید چرب در ترکیب چربی به‌دست‌آمده از کشت باکتری در ترکیبات لیگنوسلولزی وجود دارد که توانایی باکتری در تبدیل ترکیبات لیگنوسلولزی به چربی طی زمان کاهش درخور توجه نیتروژن را اثبات می‌کند. ساختار کربن ۱۴ و ۱۵ هیدروکسی‌پنتادسیل‌گلیسرول و ساختار کربن ۱۶ تا ۱۹ دی‌هیدورکسیل‌گلیسرول و ساختار کربن ۲۰ تا ۲۱ ارکیول است.

تحلیل عکس الکترونی عبوری: به‌منظور مشاهدهٔ گرانول‌های ذخیره‌ای چربی از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد (شکل ۴). در شکل ۴، گرانول‌های ذخیره‌ای چربی‌های تولیدشده به رنگ روشن مشاهده می‌شوند.

جدول ۳- ترکیب اسید چرب تولیدشده طی کشت روی ترکیبات لیگنوسلولزی

نام سویه	مقدار کل اسید چرب	درصد نسبی اسید چرب (وزن/وزن)							
		C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21

Rhodococcus erythropolis PTCC 1767	۱۷/۲۲ درصد	3.13	1.16	5.86	13.44	6.89	7.94	23.8	37.71



شکل ۴- عکس الکترونی از باکتری *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 که روی محیط جامد تریپتیک‌سوی‌آگار به همراه گلیسرول (منبع کربنی اضافی) کشت شده است. گرانول‌های چربی به رنگ روشن در تصاویر مشاهده می‌شوند و پیکان‌های رنگی، گرانول‌های ذخیره‌ای چربی را مشخص می‌کنند. A. تصویر با بزرگ‌نمایی ۲ میکرومتر، B. تصویر با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ نانومتر

بحث و نتیجه‌گیری

هدف پژوهش حاضر، بررسی توان باکتری *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 در تولید روغن تک‌یاخته از منابع کربنی ارزان‌قیمت بود که باتوجه‌به تولید چربی از پسماندها محقق شد. نتایج مطالعهٔ حاضر نشان دادند این سویه توانایی تولید روغن تک‌یاخته از محیط‌کشت حاوی منابع کربنی خالص گلوکز و گلیسرول و همچنین محیط‌کشت حاوی منابع کربنی پسماندها شامل آب پنیر و ساقهٔ گندم را با کاهش سطح نیتروژن محیط دارد و میزان تولید چربی در منبع

آب پنیر بیشتر از تمام منابع کربنی استفاده‌شده است. به‌منظور بررسی کمّی تولید روغن تک‌یاخته از تحلیل FTIR استفاده شد و نتایج تمام نمونه‌ها اثبات‌کنندهٔ وجود گروه‌های کربنی و عاملی بودند که به معنای تولید و ذخیرهٔ چربی است؛ همچنین به‌منظور شناسایی ترکیب چربی از تحلیل GC استفاده شد که تشکیل تری‌آسیل‌گلیسرول در نمونهٔ آزمایش‌شده را اثبات کرد. به‌منظور مشاهدهٔ گرانول‌های ذخیره‌ای از عکس‌برداری الکترونی عبوری استفاده شد و گرانول‌های ذخیره‌ای در تصاویر مشاهده شدند. منابع کربنی مهم‌ترین عامل برای تعیین نوع اسید چربی است که سویه‌ها تولید می‌کنند و تفاوت اسید چرب تولیدشده در نمونه‌ها طی تحلیل FTIR، باتوجه‌به تشکیل گروه‌های مختلف کربنی مشاهده می‌شود؛ همچنین سازگاری باکتری با محیط زندگی اولیه و تنوع ژنتیکی و نوع کربن مصرفی در تنوع اسیدهای چرب تأثیر می‌گذارد.

در مطالعه‌ای که آنا ریتو کاسترو[۲۰] و همکاران در سال ۲۰۱۶ به‌منظور بررسی تولید روغن میکروبی انجام دادند، دو سویهٔ متفاوت باکتری *رودوکوکوس اوپاکوس*[۲۱] روی سه منبع کربنی گلوکز، استات و هگزادکان و عصارهٔ مخمر و پپتون به‌طور مشترک (منبع نیتروژن) کشت شدند و هر دو سویه توانستند بیشترین میزان چربی را طی ۷۲ ساعت ذخیره کنند. در مطالعهٔ یادشده، کاسترو برای بررسی کمّی تولید چربی از روش TLC[۲۲] استفاده کرد و نتایج، وجود چربی در نمونه‌ها را نشان دادند؛ همچنین به‌منظور بررسی کیفی چربی از تحلیل GC استفاده کرد که تولید تری‌آسیل‌گلیسرول در سویه‌های آزمایش‌شده را نشان داد که ساختار اسید چرب تقریباً مشابه به هم داشتند (۵۱). همسوبودن نتایج مطالعهٔ کاسترو و یافته‌های مطالعهٔ حاضر در تولید گروه‌های کربنی و اسید چرب، توانایی باکتری *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 در ذخیره و تولید تری‌آسیل‌گلیسرول با استفاده از منابع کربنی خالص و پسماندی را اثبات کرد.

در مطالعه‌ای که مارسیا و الوارز[۲۳] در سال ۲۰۱۶ به‌منظور بررسی تولید زیست‌توده و روغن میکروبی انجام دادند، ۵ سویهٔ باکتری *رودوکوکوس* روی آب پنیر کشت شدند و نتایج نشان دادند باکتری *رودوکوکوس* اوپاکوس بیش از ۴۵ درصد چربی تولید می‌کند و سایر باکتری‌ها ازجمله یک سویهٔ *رودوکوکوس اریتروپولیس* کمتر از ۵ درصد چربی تولید می‌کنند (۴۹). نتایج مطالعهٔ مارسیا و الوارز ناتوانی همهٔ باکتری‌های *رودوکوکوس* در استفاده از آب پنیر برای تولید چربی را نشان دادند؛ اما در مطالعهٔ حاضر، باکتری *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 توانست بیشترین میزان چربی را روی بستر آب پنیر تولید کند که نشان‌دهندهٔ توانایی سازگاری باکتری استفاده‌شده در پژوهش حاضر برای تولید چربی از آب پنیر است.

در مطالعه‌ای که هررو[۲۴] و همکاران در سال ۲۰۱۸ با استفاده از چندین سویهٔ *رودوکوکوس* روی ضایعات لیگنوسلولزی گیاه زیتون انجام دادند، توانستند چربی را با درصدهای مختلف تولید کنند که نشان‌دهندهٔ توانایی باکتری‌های یادشده در استفاده و تبدیل این نوع از منابع کربنی به چربی است؛ بررسی ترکیب چربی تولیدشده نشان‌دهندهٔ تشکیل تری‌آسیل‌گلیسرول در نمونه‌ها بود (۵۲). باتوجه‌به ساختار نزدیک به هم زیست‌تودهٔ لیگنوسلولزی منابع گیاهی که شامل سلولز، لیگنین و همی‌سلولز است و بسته به شرایط رشد و نوع گیاه

درصدهای متفاوتی دارد، مقایسهٔ مطالعهٔ حاضر و بررسی انجام‌شده روی ضایعات گیاه زیتون نشان‌دهندهٔ توانایی آنزیمی باکتری هر دو پژوهش در استفاده از ترکیبات لیگنوسلولزی برای تولید چربی است.

چربی‌های میکروبی کاربردهای بسیار زیادی ازجمله استفاده به‌شکل بیودیزل دارند که منبع دوستدار محیط‌زیستی جایگزین برای منابع هیدروکربنی آلی است؛ همچنین چربی‌های میکروبی توانایی استفاده به‌شکل مکمل‌های غذایی باتوجه‌به نوع اسید چرب تولیدشده در آنها و استفاده به‌شکل روغن‌های شیمیایی در صنایع دارویی و آرایشی را دارند. چربی تولیدشده در پژوهش حاضر باتوجه‌به نوع اسید چرب تولیدی، توانایی استفاده در کارهای صنعتی و به‌طور ویژه، استفاده به‌شکل بیودیزل را دارد.

نتایج مطالعهٔ حاضر که برای نخستین‌بار در ایران روی این سویه انجام شد، اثبات کردند *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 توانایی استفاده از منابع کربنی خالص و تبدیل زیستی پسماند صنعتی و کشاورزی (مادهٔ خام ارزان‌قیمت) به چربی را دارد. نتایج پژوهش حاضر سبب افزایش دانش نظری در زمینهٔ این باکتری و تولید روغن میکروبی خواهند شد.

سپاسگزاری

نویسندگان از کارمندان آزمایشگاه دانشگاه آزاد، واحد قم و همچنین از دکتر علی جوادی، مسئول آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد قم، برای آماده‌کردن وسایل لازم در پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند؛ همچنین از استاد زند منفرد، مسئول آزمایشگاه شیمی دانشگاه آزاد قم، و خانم مهیار زینی‌وند، دانشجوی دکترای میکروبیولوژی دانشگاه آزاد قم، برای همکاری در تفسیر نتایج تحلیل‌های GC و FTIR قدردانی می‌شود. پژوهش حاضر هیچ‌گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

References

(1) Ratledge C. Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnologica* 1991; 11(5): 429-438.

(2) Koutinas AA., Chatzifragkou A., Kopsahelis N., Papanikolaou S., Kookos IK. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel* 2014; 116: 566-577.

(3) Beopoulos A., Nicaud J-M., Gaillardin C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011; 90(4): 1193-1206.

(4) Papanikolaou S., Aggelis G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2011; 113(8): 1052-1073.

(5) Röttig A., Wenning L., Bröker D., Steinbüchel A. Fatty acid alkyl esters: Perspectives for production of alternative biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 85(6): 1713-1733.

(6) Holder JW., Ulrich JC., DeBono AC., Godfrey PA., Desjardins CA., Zucker J., et al. Comparative and functional genomics of Rhodococcus opacus PD630 for biofuels development. *PLOS Genetics* 2011; 7(9) :1-18.

(7) Alvarez HM., Kalscheuer R., Steinbüchel A. Accumulation of storage lipids in species of Rhodococcus and Nocardia and effect of inhibitors and polyethylene glycol. *Lipid/Fett* 1997; 99(7): 239-246.

(8) Steinbüchel A., Hein S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biopolyesters: Springer*; 2001: 81-123.

Microbiology and Biotechnology 2002; 60(4): 367-376.

(10) Wältermann M., Hinz A., Robenek H., Troyer D., Reichelt R., Malkus U., et al. Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: How bacteria fatten up. *Molecular Microbiology* 2005; 55(3): 750-763.

(11) Alvarez H., Pucci O., Steinbüchel A. Lipid storage compounds in marine bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1997; 47(2): 132-139.

(12) Packter NM., Olukoshi ER. Ultrastructural studies of neutral lipid localisation in Streptomyces. *Archives of Microbiology* 1995; 164(6): 420-427.

(13) Ryu B-G., Kim J., Kim K., Choi Y-E., Han J-I., Yang J-W. High-cell-density cultivation of oleaginous yeast Cryptococcus curvatus for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. *Bioresource Technology* 2013; 135: 357-364.

(14) Ageitos JM., Vallejo JA., Veiga-Crespo P., Villa TG. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011; 90(4): 1219-1227.

(15) Feofilova E., Sergeeva I., Ivashechkin A. Biodiesel-fuel: Content, production, producers, contemporary biotechnology (review). *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia* 2010; 46(4): 405-415.

(16) Heald SC., Brandão PF., Hardicre R., Bull AT. Physiology, biochemistry and taxonomy of deep-sea nitrile metabolising Rhodococcus strains. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001; 80(2): 169-183.

(17) Luz A., Pellizari V., Whyte L., Greer C. A survey of indigenous microbial hydrocarbon degradation genes in soils from Antarctica and Brazil. *Canadian Journal of Microbiology* 2004; 50(5): 323-333.

(18) Peng F., Wang Y., Sun F., Liu Z., Lai Q., Shao Z. A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, Rhodococcus sp. TW53. *Journal of Applied Microbiology* 2008; 105(3): 698-705.

(9) Alvarez H., Steinbüchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied*

(19) Alvarez HM., Mayer F., Fabritius D., Steinbüchel A. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by Rhodococcus opacus strain PD630. *Archives of Microbiology* 1996; 165(6): 377-386.

(20) Alvarez H., Kalscheuer R., Steinbüchel A. Accumulation and mobilization of storage lipids by Rhodococcus opacus PD630 and Rhodococcus ruber NCIMB 40126. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2000; 54(2): 218-223.

(21) Voss I., Steinbüchel A. High cell density cultivation of Rhodococcus opacus for lipid production at a pilot-plant scale. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001; 55(5): 547-555.

(22) Gouda MK., Omar SH., Aouad LM. Single cell oil production by Gordonia sp. DG using agro-industrial wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008; 24(9): 1703.

(23) Alvarez HM., Silva RA., Herrero M., Hernández MA., Villalba MS. Metabolism of triacylglycerols in Rhodococcus species: Insights from physiology and molecular genetics. *Journal of Molecular Biochemistry* 2013; 2(1): 69-78.

(24) Johnson DT., Taconi KA. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress* 2007; 26(4): 338-348.

(25) Kost C., Mayer JN., Thomsen J., Hartmann N., Senkpiel C., Philipps SP., et al. Levelized Cost of Electricity: PV and CPV in comparison to other technologies. *Fraunhofer Institute for Solar Energy Systems* 2013; 1-5.

(26) Browne J., Nizami A-S., Thamsiriroj T., Murphy JD. Assessing the cost of biofuel production with increasing penetration of the transport fuel market: A case study of

gaseous biomethane in Ireland. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2011; 15(9): 4537-4547.

(27) Lipinsky E. Chemicals from biomass: Petrochemical substitution options. *Science* 1981; 212(4502): 1465-1471.

(28) El-Bakry M., Abraham J., Cerda A., Barrena R., Ponsá S., Gea T., et al. From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2015; 45(18): 1999-2042.

(29) Finco AMdO., Mamani LDG., Carvalho JCd., de Melo Pereira GV., Thomaz-Soccol V., Soccol CR. Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. *Critical Reviews in Biotechnology* 2017; 37(5): 656-671.

(30) FitzPatrick M., Champagne P., Cunningham MF., Whitney RA. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology* 2010; 101(23): 8915-8922.

(31) Werpy T., Petersen G. Top value added chemicals from biomass: Volume I--results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. *National Renewable Energy Laborator*; 2004: 1-17.

(32) Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Marc I., Aggelis G. Single cell oil production by Yarrowia lipolytica growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; 58(3): 308-312.

(33) Cheirsilp B., Louhasakul Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. *Bioresource Technology* 2013; 142: 329-337.

(34) Christensen AD., Kádár Z., Oleskowicz-Popiel P., Thomsen MH. Production of bioethanol from organic whey using Kluyveromyces marxianus. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2011; 38(2): 283-289.

(35) Ghaly A., Rushton D., Mahmoud N. Potential air and groundwater pollution from continuous high land application of cheese whey. *American Journal of Applied Sciences* 2007; 4(9): 619-627.

(36) Castanha RF., Morais LASd., Mariano AP., Monteiro RTR. Comparison of two lipid extraction methods produced by yeast in cheese whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2013; 56(4): 629-636.

(37) Moon NJ., Hammond E., Glatz BA. Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single-cell protein. *Journal of Dairy Science*. 1978; 61(11): 1537-1547.

(38) Ykema A., Verbree EC., Kater MM., Smit H. Optimization of lipid production in the oleaginous yeastApiotrichum curvatum in wheypermeate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1988; 29(2-3): 211-218.

(39) Mood SH., Golfeshan AH., Tabatabaei M., Jouzani GS., Najafi GH., Gholami M., et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2013; 27: 77-93.

(40) Taherzadeh MJ., Karimi K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources* 2007; 2(3): 472-499.

(41) Taherzadeh MJ., Karimi K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources* 2007; 2(4): 707-738.

(42) Banerjee G., Car S., Scott-Craig JS., Hodge DB., Walton JD. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: Effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. *Biotechnology for Biofuels* 2011; 4(1): 16.

(43) Le RK., Wells Jr T., Das P., Meng X., Stoklosa RJ., Bhalla A., et al. Conversion of corn stover alkaline pre-treatment waste streams into biodiesel via Rhodococci. RSC Advances 2017; 7(7): 4108-15.

(44) Pan L-X., Yang D-F., Shao L., Li W., Chen G-G., Liang Z-Q. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. *Food Technology and Biotechnology*. 2009; 47(2): 215-220.

(45) Kraisintu P., Yongmanitchai W., Limtong S. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, Rhodosporidium toruloides DMKU3-TK16. *Kasetsart Journal* (Natural Science). 2010; 44(1): 436-445.

(46) Enshaeieh M., Abdoli A., Nahvi I., Madani M. Selection and optimization of single cell oil production from Rodotorula 110 using environmental waste as substrate. *Journal of Cell and Molecular Research* 2013; 4(2): 68-75.

(47) Sriwongchai S., Pokethitiyook P., Pugkaew W., Kruatrachue M., Lee H. Optimization of lipid production in the oleaginous bacterium Rhodococcus erythropolis growing on glycerol as the sole carbon source. *African Journal of Biotechnology* 2012; 11(79): 14440-14447.

(48) Herrero OM., Moncalián G., Alvarez HM. Physiological and genetic differences amongst Rhodococcus species for using glycerol as a source for growth and triacylglycerol production. *Microbiology* 2016; 162(2): 384-397.

(49) Herrero OM., Alvarez HM. Whey as a renewable source for lipid production by Rhodococcus strains: physiology and genomics of lactose and galactose utilization. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2016; 118(2): 262-272.

(50) Spurr AR. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 1969; 26(1-2): 31-43.

(51) Castro AR., Rocha I., Alves MM., Pereira MA. Rhodococcus opacus B4: A promising bacterium for production of biofuels and biobased chemicals. *Amb Express* 2016; 6(1): 35.

(52) Herrero OM., Villalba MS., Lanfranconi MP., Alvarez HM. Rhodococcus bacteria as a promising source of oils from olive mill wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2018; 34(8): 114.

---

[1]- Triacylglycerol
[2]- Wax Ester
[3]- Polyhydroxyalkanoate
[4]- Actinomycetes
[5]- *Mycobacterium*
[6]- *Streptomyces*
[7]- *Nocardia*
[8]- *Rhodococcus*
[9]- Persian Type Culture Collection
[10]- Mineral Salts Medium
[11]- Tryptic Soy *Agar*
[12]- Optical Density
[13]- Fourier-Transform Infrared Spectroscopy
[14]- Bruker
[15]- Gas Chromatography
[16]- Agilent
[17]- Methyl Esters
[18]- Transmission Electron Microscopy
[19]- Zeiss
[20]- Ana Rita Castro
[21]- *Rhodococcus opacus*
[22]- *Thin-layer chromatography*
[23]- Herrero and Alvarez
[24]- Herrero