

تولید نیمه پیوسته لیپید و کاروتنوئید با استفاده از مخمر رودوترولا گلوتینیسی از باگاس نیشکر پیش‌فرآوری شده

مریم بنی‌خالد^۱، نیما نصیریان^{۲*}، رویا ذکاوتی^۳

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس علوم و تحقیقات خوزستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران و گروه علوم و صنایع غذایی،

واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲. گروه مهندسی مکانیزاسیون کشاورزی و بیوسیستم، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

۳. گروه پرستاری و مامایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۵، تاریخ بازنگری: ۹۶/۹/۲۴، تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۶)

چکیده

تبدیل منابع ارزان و فراوان لیگنوسلولزی به مواد ارزشمندی مانند لیپید و کاروتنوئید در دهه گذشته مورد توجه فراوان قرار گرفته است. در این تحقیق پس از بهینه‌سازی فرایند پیش‌فرآوری باگاس نیشکر، تولید دو ماده با ارزش لیپید و کاروتنوئید در یک کشت نیمه‌پیوسته با استفاده از مخمر *Rhodotorula glutinis*، مورد ارزیابی قرار گرفت. در این پژوهش تأثیر دو عامل غلظت اسید نیتریک، ۱۰-۰/۵٪، و زمان نگهداری حرارتی، ۵-۱۸۰ min، بر فرایند پیش‌فرآوری و هیدرولیز باگاس نیشکر بررسی، و با استفاده از روش رویه پاسخ مقادیرهای بهینه تعیین گردیدند. سپس پتانسیل تولید لیپید و کاروتنوئید در بسترهای حاصل از پیش‌فرآوری و هیدرولیز، مقایسه شدند. آزمایش‌های فرایند تخمیر در سرعت چرخش ۱۵۰ rpm، دمای ۲۵°C و pH = ۵/۵ انجام گردید. مقدار بهینه غلظت اسید نیتریک و زمان نگهداری در فرایند پیش‌فرآوری به ترتیب، ۶/۶۷٪ و ۱۱۸/۷۵ min برآورد، و کاهش لیگنین در بخش جامد به میزان ۹۳/۴٪ اندازه‌گیری شد. هم‌چنین مقدار بهینه غلظت اسید نیتریک و زمان نگهداری حرارتی در فرایند هیدرولیز اسیدی به ترتیب، ۰/۵٪ و ۱۸۰ min برآورد گردید، که در نتیجه آن مقدار بیشینه ۱۵/۵۷ g/l قند آزاد گردید. محتوای لیپید در محیط‌های کشت حاوی گلوکز به‌عنوان مرجع، عصاره حاصل از هیدرولیز اسیدی و سامانه پیش‌فرآوری، هیدرولیز و تخمیر جداگانه، SHF، به ترتیب، ۲۷/۳۳±۱/۰۶، ۱۹/۵۲±۱/۳۴، ۱۵/۴۳±۰/۷۶ درصد وزن خشک سلولی برآورد شدند. علاوه بر آن، محتوای کاروتنوئید در محیط کشت‌های ذکر شده به ترتیب ۱۶۸±۶۷، ۹۹±۱۴ و ۱۸۹±۱۳ μg/g وزن خشک سلول، اندازه‌گیری شد. مهم‌ترین اسیدهای چرب تولیدی اسید اولئیک و پالمیتیک بودند. هم‌چنین از دیدگاه مهندسی، شاخص‌های فیزیکی لیپید تولیدی با استفاده از روابط استاندارد موجود، تعیین و ارائه گردیدند.

واژه‌های کلیدی: لیپید، کاروتنوئید، پیش‌فرآوری، باگاس نیشکر، هیدرولیز، رودوترولا گلوتینیسی.

۱- مقدمه

به دلیل وجود ساختمان پیچیده و خشبی در پسماندهای لیگنوسلولزی، تبدیل مستقیم آن‌ها به مواد با ارزش طی فرایند تخمیر مشکل می‌باشد. بنابراین نیاز به استفاده از روش‌های پیش‌فرآوری می‌باشد تا موجب شوند این مواد به آسانی توسط میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار گیرند [۲۳]. روش‌های پیش‌فرآوری مختلف، موادی با مشخصات متفاوت تولید می‌نمایند که مراحل بعدی هیدرولیز و تخمیر را تحت تأثیر قرار می‌دهند، همچنین انتخاب روش مناسب پیش‌فرآوری باید با در نظر گرفتن ملاحظات فنی، اقتصادی، زیست‌محیطی و جنبه‌های مؤثر بر کل فرایند صورت گیرد [۲۴]. بنابراین در سال‌های اخیر محققان زیادی سعی بر توسعه روش‌ها و تکنولوژی‌های اقتصادی‌تر با توجه به تولید حداکثر قندهای قابل تخمیر و کاهش لیگنین، حداقل مواد بازدارنده، انرژی مصرفی و هزینه‌های کم‌تر مربوط به بیوراکتور، آب و مواد شیمیایی داشته‌اند [۲۵].

پیش‌فرآوری با اسید رقیق قابلیت استفاده برای محدوده وسیعی از مواد لیگنوسلولزی مانند پسماندهای کشاورزی [۱۰، ۲۶] را دارا می‌باشد و باعث کاهش لیگنین، در دسترس قرار دادن سلولز به منظور هیدرولیز آنزیمی و هیدرولیز مؤثر همی‌سلولز و در نتیجه آزاد شدن بیش‌تر قندهای ساده مانند زایلوز در مایع پس از پیش‌فرآوری می‌گردد [۲۵]. اگرچه در فرایندهای پیش‌فرآوری از اسیدهای مختلفی مانند اسید کلریدریک [۲۷]، اسید فسفریک [۲۸]، اسید نیتریک [۲۲] استفاده شده، اما اسید سولفوریک به طور گسترده‌تری مورد تحقیق و آزمایش قرار گرفته است [۲۳، ۲۹-۳۲]. از میان آن‌ها اسید نیتریک با وجود بررسی‌های اندک انجام شده مخصوصاً در مورد باگاس [۳۳، ۳۴] نتایج قابل قبولی ارائه داده است. لذا تحقیقات بیش‌تری برای روشن شدن جنبه‌های مختلف این روش مورد نیاز می‌باشد.

با توجه به مشکلات موجود در زمینه مدیریت پسماند، حجم عظیم باگاس تولیدی در کشور و نیاز روزافزون منابع جدید غذا، انرژی و مواد شیمیایی سودمند، هم‌چنین تحقیقات اندک انجام شده با استفاده از باگاس به‌عنوان منبع تولید تک سلول لیپیدی و کاروتنوئید [۳۷-۳۵]، پژوهش حاضر قابلیت تولید این مواد با ارزش را از باگاس پیش‌فرآوری شده اسید نیتریک

باگاس نیشکر یکی از منابع با ارزش لیگنوسلولزی است که به‌عنوان پسماند یا یک محصول جانبی در صنایع کشاورزی و غذایی تولید می‌گردد [۱]. تقریباً تمامی باگاس حاصل از کارخانجات شکر کشور بیش از ۹۹٪ در استان خوزستان تولید می‌گردد. طبق اطلاعات ارائه شده توسط وزارت جهاد کشاورزی بالغ بر ۲۴۰۰۰۰ تن باگاس در سال زراعی ۹۴-۹۳ در استان خوزستان تولید گردید [۲]. با توجه به افزایش سالانه سطح زیرکشت نیشکر و ظرفیت تولید کارخانجات شکر، این میزان سالانه افزایش یافته و می‌تواند به‌عنوان یک منبع ارزشمند تولید مواد با ارزش افزوده مورد تحقیق و استفاده قرار گیرد.

تبدیل این منابع زیست‌توده فراوان و ارزان لیگنوسلولزی به مواد با ارزشی هم‌چون لیپید به‌عنوان ماده اولیه صنایع غذایی و سوختی و مواد شیمیایی مانند کاروتنوئیدها، در دهه گذشته مورد توجه قرار گرفته است [۳]. در این بین استفاده از تک سلول‌های لیپیدی که لیپیدهای خنثی، Natural Lipids، یا تری‌آسیل‌گلیسرول، Triacylglycerides، تولید شده توسط ریزسازواره‌ها می‌باشند، ارزش بسیاری پیدا کرده است [۴]. از میان آن‌ها، مخمرهای مولد لیپید، Oleaginous yeast، بیش از ۲۰ درصد محتوای لیپید سازگاری بیش‌تری با شرایط مختلف محیطی داشته و دامنه وسیع‌تری از زیست‌توده‌های تولیدی در سامانه‌های مختلف شامل پسماندها را می‌توانند به‌عنوان سوپسترا مصرف نمایند. هم‌چنین از میان انواع مختلف مخمرها، گونه‌های رودوترولا، *Rhodotorula*، رودوسپوریوم، *Rhodospiridium*، زانتوفیلومایسس، *Xanthophyllomyces*، کریپتوکوکوس، *Cryptococcus* و لیپومایسس، *Lipomyces* به دلیل رشد سریع، درصد بالای لیپید نسبت به وزن خشک سلولی، تولید همزمان ماده با ارزشی مانند کاروتنوئید، مقاومت بالا نسبت به مواد بازدارنده حاصل از عملیات پیش‌فرآوری بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند [۷-۵]. تحقیقات زیادی در این زمینه با استفاده از پسماندها مانند گلیسرول بازیافتی [۸]، عصاره هیدرولیزی مواد لیگنوسلولزی [۹، ۱۰]، هیدرولیز و تخمیر جداگانه مواد جامد پس از پیش‌فرآوری [۱۱-۱۳]، ملاس [۱۴-۱۶] و دیگر مواد پسماند [۲۲-۱۷] انجام شده است.

بعدی هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم سلولاز و تخمیر، عمل فیلتراسیون تحت خلاء صورت گرفته و بخش جامد از مایع جدا گردید. مواد جامد باقی‌مانده با آب مقطر داغ کاملاً شسته و در انکوباتور با دمای 60°C خشک و توزین گردیدند. سپس به منظور کاهش غلظت ممانعت‌کننده‌های موجود در عصاره هیدرولیز شده، فرایند سم‌زدایی عصاره انجام شد. بدین منظور هیدروکسید سدیم با غلظت 0.5 g/l آرام آرام به عصاره هیدرولیز شده اضافه شده تا pH آن به ۷ برسد. سپس با استفاده از اسید فسفریک غلیظ، pH ماده روی $5/5$ تنظیم گردید. پس از آن زغال فعال ۱۰ درصد وزنی به وزنی به عصاره هیدرولیزی اضافه و در 30°C و سرعت چرخش 200 rpm به مدت ۱ h در انکوباتور شیکردار مدل ۳۰۳۲، ساخت آلمان با فرکانس $50/60\text{ Hz}$ قرار داده شد. در پایان سوبسترای هیدرولیز شده با کاغذ واتمن 0.1 N فیلتر شده تا ذرات رسوب کرده جدا شده و در 121°C به مدت ۱۵ min اتوکلاو و استریل گردید [۳۹].

۲-۳- تولید لیپید و کاروتنوئید در شرایط نیمه پیوسته (Fed-batch)

ابتدا مخمر *Rhodotorula glutinis var. glutinis* (۵۲۵۸)، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران مرکز منطقه‌ای کلکسیون میکرواورگانیسیم‌های صنعتی، به صورت لیوفلیزه خریداری و در دمای 4°C تا زمان کشت اولیه نگهداری گردید. سوبیه مورد نظر به منظور فعال‌سازی بر روی محیط جامد YMA شامل: 20 g آگار، 10 g گلوکز، 5 g پیتون، 3 g عصاره مخمر، 3 g عصاره مالت، 1 lit آب دیونیزه و $\text{pH}=6/2$ ، کشت و در دمای محیط آزمایشگاهی 22°C نگهداری شد. سپس تک کلنی به‌دست آمده به یک فلاسک ارلن مایر 500 ml مخصوص کشت هوازی حاوی 100 ml محیط پیش‌تولید با محدودیت نیتروژن (GMY) شامل: 3 g/l عصاره مخمر، 8 g/l KH_2PO_4 ، 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و 20 g/l گلوکز، تلقیح و پس از تنظیم اسیدیته در مقدار $5/5$ در انکوباتور شیکردار در دمای 25°C و سرعت چرخش 180 rpm قرار داده شد. پس از 24 h مقدار لازم از محیط پیش‌تولید حاوی مخمر رشد داده شده برای رسیدن به چگالی نوری 0.2 به ارلن مایرهای 500 ml حاوی 100 ml از محیط کشت منتقل گردید. چگالی نوری

رقیق با استفاده از مخمر مولد لیپید رودوترولا گلوئینیس مورد ارزیابی و آزمایش قرار داد. به‌طور مشخص، بهینه‌سازی عملیات پیش‌فراوری باگاس خام در غلظت‌های متفاوت اسید و زمان‌های مختلف نگهداری حرارتی با استفاده از روش رویه پاسخ RSM انجام شد. سپس تولید لیپید و کاروتنوئید از عصاره هیدرولیزی سم‌زدایی شده و سامانه پیش‌فراوری، هیدرولیز و تخمیر، جداگانه SHF مواد جامد پیش‌فراوری شده، مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه و آزمایشگاهی

باگاس نیشکر از کارخانه تولید شکر امیرکبیر خوزستان تهیه و پس از شستشو، در دمای 45°C به مدت 48 h خشک شده، سپس در کیسه‌های پلاستیکی در دمای 4°C تا زمان استفاده نگهداری شدند [۳۸]. پیش از استفاده به‌وسیله آسیاب معمولی، ساخت شرکت آذر آسیاب، کشور ایران، مجهز به یک غربال 3 cm ، کاهش اندازه صورت گرفته و با استفاده از الک، ذرات بین 1 تا $1/5\text{ cm}$ جدا گردیدند.

آنزیم سلولاز مورد استفاده 4-1,3:1,4- β -D-Glucanase، از آسپرژیلوس نایجر حاصل شده و از شرکت سیگما آلدریج کشور آمریکا تهیه گردید. معرف ۳، ۵ دی نیترو سالیسیلیک اسید از شرکت آکروس آمریکا تهیه گردید. هم‌چنین محیط کشت‌های جامد YMA و مایع YMB از شرکت کیولب کانادا تهیه گردیدند. سایر مواد شامل تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم نمک راشل، اسید سولفوریک، اسید فسفریک، n-هگزان، استون، و اتانل، از نوع آزمایشگاهی بوده و از نمایندگی شرکت مرک آلمان در ایران تهیه شدند.

۲-۲- پیش‌فراوری با اسید نیتریک رقیق

پیش‌فراوری باگاس‌های اولیه با استفاده از اسید نیتریک رقیق در محدوده غلظت‌های 0.5 تا 1.0% وزنی به وزنی و زمان نگهداری 5 min تا 180 ، با نرخ بارگذاری مواد جامد 1.0% وزنی به وزنی و با استفاده از اتوکلاو در دمای ثابت 121°C و فشار 2 bar انجام گرفت. سپس به منظور تهیه مواد اولیه

۲-۴-۲ روش‌های آنالیز

۲-۴-۱- آنالیز مواد جامد اولیه

تعیین کل جامدات Total Solids، و مقدار مواد جامد فرار Volatile Solids، موجود در مواد جامد اولیه و پس از پیش‌فراوری طبق روش‌های آزمون استاندارد شماره ۱ و ۵ از سری استانداردهای سازمان انرژی تجدید پذیر آمریکا انجام گردید [۴۱].

۲-۴-۲- سنجش لیگنین محلول، نامحلول و کاهش در میزان لیگنین

براساس روش‌های آزمون استاندارد شماره ۴ و ۳ سازمان انرژی تجدید پذیر آمریکا [۴۱]، لیگنین محلول ASL و نامحلول AIL در اسید، به روش زیر اندازه‌گیری گردید. ابتدا ۳ ml اسید سولفوریک ۷۲٪ به W_1 ۰/۳ g، از ماده جامد کاملاً خشک شده اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در بن ماری شرکت بهداشت مدل ۳۴۳۰- ساخت ایران در دمای 30°C قرار داده شد. پس از آن با اضافه کردن آب مقطر غلظت اسید را به ۴٪ رسانده، و به مدت ۱ ساعت در اتوکلاو در دمای 121°C نگهداری گردید. پس از انجام فیلتراسیون تحت خلأ، ماده جامد به مدت ۲ h در دمای 105°C به وسیله آون خشک و وزن W_2 گردید. سپس مواد جامد خشک را در کوره و در دمای 575°C به مدت حداقل ۳ h قرار داده و وزن خاکستر باقی‌مانده W_3 را یادداشت شده و با استفاده از معادله زیر مقدار لیگنین نامحلول در اسید محاسبه گردید:

$$\text{AIL}(\%) = \left(\frac{W_2 - W_3}{W_1} \right) \times 100 \quad (1)$$

مایع حاصل از فیلتراسیون برای تعیین مقدار لیگنین محلول در اسید مطابق استاندارد مربوطه در طول موج ۲۰۵ nm توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت گردید. در تحقیق حاضر، در ماده اولیه، لیگنین محلول در اسید ۰/۱۲۲۷٪، لیگنین نامحلول در اسید ۰/۲۵/۶۹٪ گزارش شده است. در انتها پس از سنجش لیگنین نامحلول در اسید در ماده اولیه خشک LU و ماده جامد خشک پس از پیش‌فراوری LP درصد کاهش لیگنین LP محاسبه گردید:

با دستگاه اسپکتوفتومتر مدل PC2100-uv شرکت یونیکو آمریکا ساخت چین در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد. سپس مخمر رودوترولا گلوکوتینیس، از محیط پیش تولید به ارلن مایرهای حاوی عصاره هیدرولیزی سم زدایی شده، با مقدار قند احیاء $1.5/57 \pm 0.2$ g/l، عصاره مخمر، ۳ g/l، مقدار KH_2PO_4 ، 0.5 g/l، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ انتقال داده شد. شرایط محیطی در دمای 25°C ، ۱۸۰ rpm و $\text{pH} = 5.5$ تنظیم و نمونه برداری هر ۲۴ ساعت انجام گردید. با توجه به میزان مصرف قند در ریزسازواره رودوترولا گلوکوتینیس و تحقیقات گذشته، و همچنین بیشینه قند حاصل از سامانه های مورد بررسی، از سامانه نیمه پیوسته Fed-batch، به جای سامانه ناپیوسته Batch، که روند گذار به سامانه پیوسته Continuous، را در بعد تجاری بهتر نشان می‌دهد، استفاده گردید. بنابراین به منظور جلوگیری از کاهش قند موجود در محیط کشت، در ساعت‌های ۲۴ و ۴۸ به میزان ۳۰ ml از عصاره هیدرولیز شده با محتوای قندی به ترتیب 9.63 ± 0.5 و 6.34 ± 0.2 g/l، به فلاسک‌ها اضافه شد Fed-batch. نمونه برداری تا ۲۴ ساعت اول به منظور اندازه‌گیری وزن خشک سلولی، قند مصرف شده ۲ ml و در ۴۸ و ۷۲ ساعت دیگر علاوه بر آن به منظور اندازه‌گیری لیپید و کاروتنوئید میزان ۱۰ ml برای هر کدام انجام شد. نمونه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ ۱۶ شاخه ساخت ایران، با سرعت چرخش ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شده و فاز بالای شفاف از سلول‌ها جدا و برای بررسی‌های بعدی در دمای 20°C - نگهداری شدند.

همچنین پس از بهینه سازی درصد کاهش لیگنین در ماده جامد باقی‌مانده حاصل از فرایند پیش‌فراوری، در مرحله دوم با استفاده از هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم سلولاز، به میزان ۱۵ u بر هر گرم باگاس، در دمای 50°C با سرعت چرخش ۱۲۰ rpm در انکوباتور شیکردار مدل ۳۰۳۲، ساخت آلمان با فرکانس ۵۰/۶۰ HZ، روند شکستن ترکیبات سلولزی کامل گردید [۴۰]. مایع حاوی قند به‌عنوان سوبسترای اولیه استفاده شده و سپس از عصاره هیدرولیزی سم‌زدایی شده به میزان ۳۰ ml حاوی به ترتیب 6.68 ± 0.1 و 5.83 ± 0.5 g/l قند احیاء در ساعات ۲۴ و ۴۸ به فلاسک‌ها اضافه گردید.

مقدار ۱ ml از لایه زیرین که حاوی متیل استراسیدهای چرب FAME در کلروفرم است، برای آنالیز جدا گردید. متیل استر اسیدهای چرب به روش کروماتوگرافی گازی با استفاده از دستگاه GC 7890 MS 5975 مجهز به محفظه تزریق مدل Split/splitless و شناساگر نوع جرمی انجام گرفت. جداسازی نهایی مولکول‌ها به وسیله یک ستون کروماتوگرافی HP-88 با مشخصات $100\text{ m} \times 320\ \mu\text{m} \times 0.25\ \mu\text{m}$ ، Agilent, California, USA صورت پذیرفت. از گاز هلیوم با نرخ جریان ۱/۱ ml/min به عنوان گاز حامل استفاده گردید. دمای آون به مدت ۱۰ min پس از تزریق در 100°C نگاهداری و سپس با نرخ 10°C بر دقیقه به دمای نهایی 210°C رسیده و ۳۰ min در این دما باقی ماند. به منظور تشخیص پیک‌ها و تفکیک اسیدهای چرب مختلف از یک ترکیب استاندارد حاوی ۳۷ نوع اسید چرب Sigma-Aldrich، استفاده گردید. به منظور اندازه گیری محتوای لیپید، ابتدا ۵۰ ml از مایع محیط کشت برداشته و در سانتریفوژ به مدت ۱۰ min با سرعت چرخش ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. سلول‌ها مطابق بند ۲-۴-۴، خشک و وزن شدند. میزان 0.1 g تا 0.2 g از نمونه W_B با ۲ ml اسید هیدروکلریک ۴ مولار به مدت ۲ ساعت در دمای 60°C قرار داده شد. سپس به توده هیدرولیز شده با اسید، ۴ ml متانول-کلروفرم ۱:۱، اضافه و به مدت ۲ الی ۳ ساعت در شیکر در دمای محیط نگاهداری شد. پس از آن توسط سانتریفوژ فاز آبی بالایی از فاز آلی پایین جدا گردید. فاز آلی پایینی حاوی کل محتوای لیپید W_L توسط پیپت پاستور جدا و در دسیکاتور در دمای محیط خشک گردید. به منظور سنجش محتوای لیپید LC از معادله (۳) استفاده شد [۳۶].

$$LC\% = \left(\frac{W_L}{W_B}\right) \times 100 \quad (3)$$

۲-۴-۶- استخراج و اندازه‌گیری کاروتنوئید

جداسازی کاروتنوئید از محیط کشت بر اساس روش اصلاح شده، به صورت ذیل صورت گرفت: ۱۰ ml از مایع محیط کشت پس از عمل سانتریفوژ، شسته و پس از خشک شدن طبق بند ۲-۴-۴، میزان 10 mg الی 20 mg از سلول خشک شده با ترازو مدل سارتوریوس ساخت کشور آلمان، با دقت 0.001

$$LR(\%) = \left(\frac{LU - LU_0}{LU_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

۲-۴-۳- تعیین قندهای احیاء

بررسی غلظت قندهای احیاء با استفاده از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید DNS، انجام گرفت. به منظور آماده‌سازی محلول مورد نظر ابتدا 10 g از معرف DNS و 300 g تارتارات مضاعف سدیم-پتاسیم نمک راشل به 800 ml هیدروکسید سدیم 0.5 N اضافه گردید. محلول حاصل را به منظور حل شدن کامل مواد به آرامی حرارت داده و در انتها با استفاده از آب مقطر حجم کل آن به یک لیتر رسانده شد. به منظور بررسی غلظت قندهای احیاء، 1 ml از نمونه در 4 ml DNS کاری حل و به مدت 5 min درون بن ماری در دمای بین 90°C - 100°C قرار داده شد. پس از آن بلافاصله با استفاده از آب یخ، محلول را سرد کرده و سپس با قرار دادن آن در حمام آب 25°C دمای محلول به دمای محیط رسید. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج 540 nm با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت گردید. منحنی استاندارد گلوکز بعد از تهیه غلظت‌های مختلف از گلوکز، به همین روش به دست آمد [۴۲].

۲-۴-۴- وزن خشک سلولی

به منظور پایش رشد ریزسازواره‌ها، وزن خشک سلولی پس از نمونه برداری روزانه محاسبه و ثبت گردید. ابتدا نمونه‌ها سانتریفوژ شده و فاز بالای شفاف از سلول‌ها جدا و برای تعیین قندهای احیاء در دمای 20°C نگاهداری شدند. سلول‌ها بعد از دوبار شستشو با آب دیونیزه سانتریفوژ شده، و در دمای 60°C به مدت 24 h تا رسیدن به وزن ثابت، خشک گردیدند.

۲-۴-۵- استخراج و اندازه‌گیری لیپید

استخراج ترکیبات لیپید از نمونه میکروبی در محیط کشت اصلی با استفاده از روش بلای ودایر اصلاح شده انجام گرفت [۴۳]. برای این منظور 10 mg الی 20 mg از سلول خشک شده جدا و درون لوله آزمایش قرار داده، سپس 2 ml محلول 15% متانول در اسیدسولفوریک به همراه 2 ml از محلول کلروفرم به آن اضافه و به مدت 5 h جوشانده شدند. سپس 1 ml آب دیونیزه اضافه و پس از یک شبانه روز نگاهداری در دمای محیط،

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$$

در این رابطه، x_i مقدار کد گذاری شده متغیر کنترلی i و X_i مقدار حقیقی آن است. همچنین X_0 میانه بازه حقیقی متغیر کنترلی i و ΔX_i تغییر پله‌ای یا به عبارتی قدر مطلق اختلاف بین میانه و مقدار داده بعدی یا قبلی آن می‌باشد.

۲-۶- بررسی خواص لیپید تولیدی بر اساس پروفیل اسیدهای چرب

پارامترهایی که کیفیت لیپید تولیدی را برآورد می‌کنند، مانند درجه غیر اشباعی، اندیس یدی، اندیس صابونی شدن، گرانروی، و وزن مخصوص به ساختار مولکولی متیل استر اسیدهای چرب FAME، موجود در آن بسیار وابسته می‌باشند. این ساختار مولکولی با توجه به طول زنجیره کربنی، همچنین تعداد و موقعیت پیوندهای دوگانه موجود، می‌تواند بسیار متفاوت باشد. پس از استخراج مشخصات اسیدهای چرب تولیدی توسط کروماتوگرافی گازی، ساختار مولکولی، مقدار و نوع اسیدهای چرب به دست آمده به منظور تعیین خواص غذایی لیپید تولیدی به وسیله مخمر، مورد استفاده قرار گرفت. این خواص با روابط ارائه شده در منابع معتبر و جمع‌آوری و دسته‌بندی آن‌ها توسط نصیریان و همکاران مورد محاسبه قرار گرفتند [۴۳].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- پیش فراوری

۳-۱-۱- تأثیر پیش فراوری بر کاهش لیگنین

پس از عملیات پیش‌فراوری با اسید نیتریک رقیق، جداسازی بخش عصاره هیدرولیزی و جامد صورت گرفت. آزمایش طراحی شده، نتایج آزمایش‌ها و همچنین داده‌های حاصل از مدل درجه دو حاصل از روش رویه پاسخ در جدول (۱) ارائه شده است. مدل درجه دو حاصل از اثر مقادیر واقعی غلظت اسید (A) و زمان نگهداری (B) بر درصد کاهش لیگنین (LR) با معادله (Y) ارائه گردید:

$$LR(\%) = 0.17 + 17.91 A + 0.35 B - 1.115 A^2 - 0.001 B^2 - 0.001 AB \quad (Y)$$

وزن شد. ۲ ml از حلال n-هگزان-استون-اتانول با نسبت‌های ۵۰۰، ۲۵۰ و ۲۵۰، به نمونه اضافه گردید. سپس در هاون برای شکستن سلول‌های مخمر و آزاد شدن کاروتنوئیدها عمل سایش تا زمانی که سلول‌ها بی‌رنگ شدند ادامه یافت [۴۴-۴۶]. بعد از ۲۰ h توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج nm ۴۵۰ قرائت و طبق معادله (۴) محاسبه گردید.

$$\text{Carotenoid content}(\mu\text{g/g}) = \frac{(A \times V \times 10^4)}{(A_{1\text{cm}}^1)} \times 100 \quad (4)$$

که در رابطه فوق A: جذب، $A_{1\text{cm}}^1$: ضریب حلال، V: حجم حلال و W: وزن توده خشک سلولی مورد استفاده را نشان می‌دهد [۴۷].

۲-۵- طرح آزمایشی، روش‌های آنالیز آماری و بهینه سازی

با استفاده از طرح آزمایشی روش رویه پاسخ، اثر پیش فراوری اسیدی باگاس نیشکر توسط اسید نیتریک، در بازه غلظت ۰/۵ تا ۱/۰٪ و بازه زمانی ۵ تا ۱۸۰ min، بر متغیرهای واکنشی وابسته شامل: کاهش مقدار لیگنین نسبت به میزان اولیه و مقدار قند احیاء آزاد شده در عصاره هیدرولیزی، آزمایش‌هایی بر اساس روش رویه پاسخ چند عاملی طراحی و انجام شد (جدول ۱). تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۷ انجام و مقدار بهینه تعیین گردید. در این روش اولین گام، یافتن یک تابع تقریبی مناسب بین مجموعه متغیرهای کنترلی و واکنشی است. این تابع تقریبی به‌طور معمول یک چند جمله‌ای از متغیرهای کنترلی مانند فرمول ۵، است:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (5)$$

که در رابطه فوق متغیر y مقدار پاسخ، β_0 ، β_i ، β_{ii} ، β_{ij} ضرایب رگرسیون، K تعداد متغیرهای مستقل و ε مقدار خطا را نشان می‌دهد [۴۸]. در روش رویه پاسخ به منظور تخمین پارامترهای تابع، متغیرهای کنترلی باید دارای مقادیر کد گذاری شده باشند این کد گذاری با معادله (۶)، انجام می‌شود.

جدول (۱) طرح آزمایش و نتایج واقعی و پیش‌بینی مربوط به مقدار قندهای احیاء و درصد کاهش مقدار لیگنین نامحلول در اسید پس از پیش‌فراوری

Table 1 Experimental design, in addition to observed and predicted data of released reducing sugar amount and percentage of acid insoluble lignin reduction after pretreatment

تیمار	زمان حرارت دهی (دقیقه)	غلظت اسید	کاهش لیگنین نامحلول در اسید	داده‌های پیش‌بینی شده	قند احیاء	داده‌های پیش‌بینی شده	تیمار
Treatment	Heating retention time (min)	Acid concentration (%)	Acid insoluble lignin reduction (%)	Predicted data (%)	Reducing sugar (g/l)	predicted data (g/l)	Treatment
1	92.5	5.25	75.0648	84.85232	8.094	9.066	1
2	92.5	5.25	86.2942	84.85232	9.013	9.066	2
3	92.5	5.25	91.8679	84.85232	10.051	9.066	3
4	180	10	90.0778	90.0778	5.657	5.751	4
5	5	0.5	10.9352	10.9352	4.223	4.710	5
6	180	0.5	28.5286	31.60509	15.574	15.693	6
7	5	10	74.3314	69.19274	6.497	6.959	7
8	92.5	5.25	88.7378	84.85232	10.130	9.066	8
9	92.5	10	82.2482	88.48075	5.380	4.825	9
10	92.5	5.25	93.2753	84.85232	8.054	9.066	10
11	92.5	5.25	59.7953	65.10257	9.101	8.152	11
12	92.5	0.5	33.4848	30.57831	8.671	9.277	12
13	92.5	5.25	76.4001	84.85232	7.869	9.066	13
14	180	5.25	87.3983	85.41735	13.252	13.040	14

نمودار کاهش و تا حداکثر حدود ۹۳٪ ادامه می‌یابد. هم‌چنین با افزایش غلظت زمان نگهداری کم‌تری برای برداشت لیگنین مورد نیاز می‌باشد. نتایج حاصل نشان از اثر کم‌تر زمان نگهداری نسبت به غلظت دارد. کم‌ترین کاهش در محدوده غلظت ۰/۵٪ اسید و زمان ۵ min، حدود ۱/۹۳۵۲٪ و بیش‌ترین کاهش در محدوده غلظت بالای ۵/۲۵٪ اسید و زمان بین ۷۵ min تا ۱۸۰ min حدود ۹۳/۲٪ به‌دست آمد. با توجه به طرح آزمایشی، مقدار بهینه غلظت اسید، ۶/۶۷٪ در زمان ۱۱۸/۷۵ min با کاهش ۹۳/۴٪ لیگنین نامحلول در اسید مشخص گردید. چونگ و همکاران، با استفاده از پیش‌فرآوری اسیدی توانست ۲۳/۹٪ لیگنین موجود در باگاس نیشکر را کاهش دهند [۳۳]. کاپیچی و همکاران، کوماری و داس و هم‌چنین هانگ و همکاران، با استفاده از پیش‌فرآوری قلیایی باگاس نیشکر به‌ترتیب حدود ۲۶/۶، ۶۰ و ۶۵/۴ درصد کاهش لیگنین را برآورد کردند که نشان از مؤثر بودن روش به‌کار رفته در این تحقیق نسبت به سایر پژوهش‌های انجام شده است [۵۱-۴۹].

مقادیر مثبت ضرایب رگرسیون همگرایی و ضرایب منفی عدم آن را با نتایج حاصل از کاهش لیگنین نشان می‌دهند. مقادیر بالای ضریب تبیین ۰/۹۵۴ و ضریب تبیین تعدیل شده ۰/۹۲۵ نشان از تطابق خوب مقادیر واقعی و پیش‌بینی شده دارد. غیر معنی‌داری آزمون عدم برازش نشان دهنده معتبر بودن مدل به منظور پیش‌بینی اثر متغیرها بر پاسخ است. هم‌چنین جدول (۲)، خلاصه تجزیه واریانس اثر متغیرهای کنترلی مورد مطالعه روی درصد کاهش لیگنین را نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، مدل درجه دوم تأثیر متغیرهای کنترلی بر بازده کاهش لیگنین بسیار معنی‌دار ($p < 0.01$) بود. از میان متغیرهای مستقل اثرات اصلی غلظت اسید و زمان نگهداری، و عبارت درجه دوم غلظت اسید در سطح معنی‌داری ۵٪ و زمان نگهداری در سطح معنی‌داری ۱۰٪ معنی‌دار بودند، درحالی‌که اثر متقابل غلظت اسید و زمان نگهداری تأثیر معنی‌داری بر متغیر پاسخ نداشت. اهمیت نسبی هریک از جملات در ستون p بیان شده است.

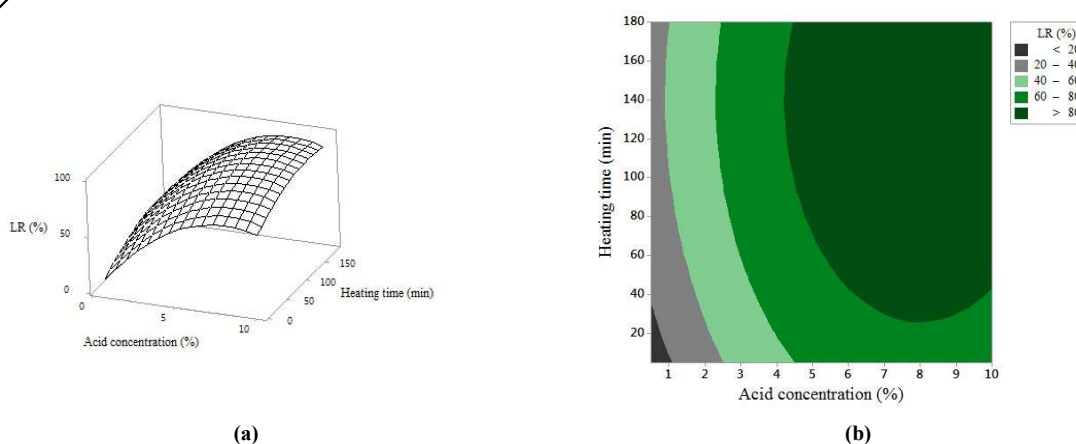
شکل (۱)، اثر بر هم‌کنشی بین متغیر کنترلی غلظت اسید و مدت زمان نگهداری بر درصد کاهش لیگنین، را نشان می‌دهد. همان‌طور که نمایان است ابتدا با افزایش غلظت اسید از ۰/۵ تا حدود ۵٪ برداشت لیگنین صعودی و از حدود ۱۰٪ تا بیش از ۸۰٪ ادامه پیدا می‌کند، اما پس از آن تا غلظت ۱۰٪

۳-۱-۲- تأثیر پیش‌فرآوری بر آزادسازی قندهای قابل تخمیر

به منظور ارزیابی راندمان عملیات پیش‌فرآوری، مطابق

جدول (۲) آنالیز واریانس اثر متغیرهای کنترلی (زمان نگهداری و غلظت اسید) بر درصد کاهش لیگنین
Table 2 ANOVA of quadratic response surface model and regression coefficient of control variables (heating retention time and acid concentration) effect on percentage of lignin reduction

ارزش P p-Value Prob>F	ارزش F Value- F	میانگین مربعات Mean squares	درجه آزادی Degrees of freedom	منبع source
0.000	33.3	1760.3	5	مدل model
0.000	95.3	5029.1	1	غلظت اسید Acid concentration (A)
0.009	11.7	619.00	1	زمان ماند حرارتی Heating retention time (B)
0.000	33.7	1793.3	1	A ²
0.06	74.7	251.8	1	B ²
0.902	0.02	0.85	1	AB
0.616	0.65	39.5	3	عدم برازش Lack of Fit



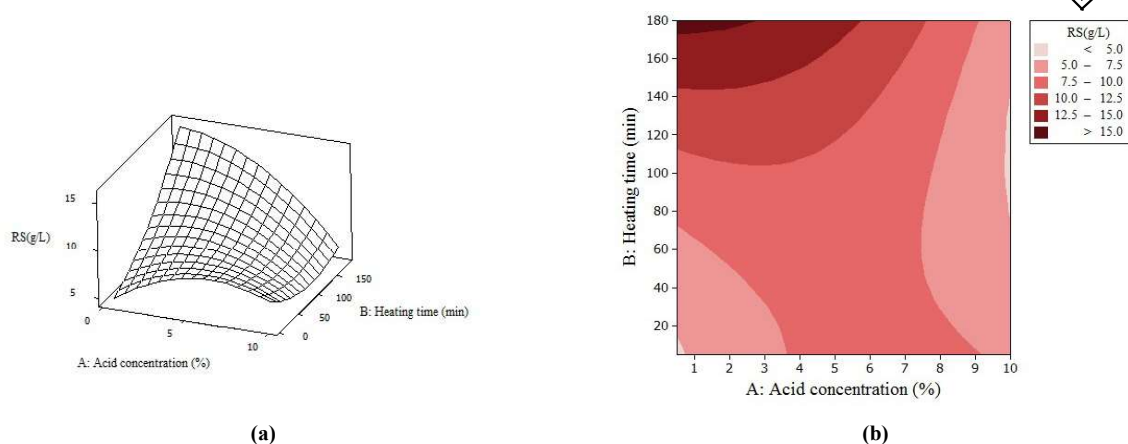
شکل (۱) (a) نمودار سه بعدی و (b) دوبعدی اثر متغیرهای زمان حرارت دهی (دقیقه) و غلظت اسید (درصد) بر درصد کاهش لیگنین در دمای ثابت 121°C **Fig. 1** a) Surface and b) contour plots for interactive effect of heating retention time (min) and acid concentration (%) on percentage of lignin reduction (LR) at 121°C

آزمایش‌های جدول (۱) قندهای احیاء در عصاره هیدرولیزی پس از هر عملیات با روش DNS مورد سنجش قرار گرفتند. بیش‌ترین مقدار قند قابل تخمیر در 0.5% اسید نیتریک و 180 min زمان نگهداری معادل $15/5\text{ g/l}$ و کم‌ترین مقدار معادل $4/2\text{ g/l}$ در غلظت 0.5% و 5 min به دست آمد. در جدول (۳) آنالیز واریانس مدل و متغیرهای تأثیرگذار بر پاسخ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود مدل درجه دو به دست آمده با روش رویه پاسخ در سطح احتمال ۱ درصد کاملاً معنی‌دار بوده و با ضریب تبیین 0.936 ، ضریب تبیین تعدیل شده 0.897 و معنی‌دار نبودن آزمون عدم برازش مدل، توانایی قابل قبول مدل در پیش‌بینی داده‌های پاسخ قند احیاء و تطابق خیلی خوب داده‌های واقعی و پیش‌بینی را نشان می‌دهد. مطابق جدول (۳) تأثیر غلظت اسید، مربع غلظت و زمان نگهداری و اثر متقابل غلظت اسید و زمان نگهداری معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و اثر اصلی زمان نگهداری معنی‌دار نبود. مدل به دست آمده به منظور استفاده در ترسیم رویه‌ها و بررسی تأثیر متغیرهای کنترلی غلظت اسید و زمان نگهداری بر آزادسازی قندهای احیاء به صورت زیر ارائه گردید:

وابسته قند احیاء در شکل (۲) با استفاده از نمودار دوبعدی و سه‌بعدی ترسیم شده نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، در محدوده غلظت اسید کم‌تر از 3% و زمان نگهداری بیش‌تر از 165 min بیش‌ترین مقدارهای قند به میزان بیش‌تر از 15 g/l آزاد گردید. مقدار بهینه غلظت اسید 0.5% و زمان نگهداری 180 min توسط مدل محاسبه گردید، که در این مقدار از غلظت اسید و زمان نگهداری حدود $15/57\text{ g/l}$ قندهای احیاء پیش‌بینی و اعتبارسنجی شد. چانگ و همکاران، با غلظت اسید نیتریک 6% و زمان نگهداری $9/3\text{ min}$ و دمای 122°C ، میزان $23/51\%$ قندهای احیاء موجود در باگاس نیشکر را جداسازی کردند [۳۳]. لاپیون و همکاران، باگاس نیشکر را با اسید هیدروکلریک 0.5% در 5 h و دمای 100°C پیش‌فراوری کرده و میزان قندهای احیاء را به $25/38\%$ رساندند [۲۷]. میزان قند تولید شده در تحقیق حاضر احتمالاً به دلیل زمان حرارت دهی بالا و نیز خطاهای آزمایشگاهی نسبت به مقالات دیگر کم شده است. حرارت دهی بالا خود یکی از عوامل مهم در از بین رفتن ساختارهای کلی سلولز و همی‌سلولز و به دنبال آن تخریب ساختارهای قندها می‌باشد. با توجه به طرح آزمایشی رویه پاسخ، این مقدار اسید و زمان نسبت به بقیه غلظت و زمان‌ها بیش‌ترین قند را تولید کرده است. به همین دلیل در این تحقیق از این غلظت استفاده شده است.

$$RS\left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = 3.92 + 1.35 A + 0.029 B - 0.102 A^2 + 0.0002 B^2 - 0.007 AB \quad (8)$$

اثر برهم کنشی غلظت اسید و زمان نگهداری بر متغیر



شکل (۲) (a) نمودار سه بعدی و (b) دوبعدی اثر متغیرهای زمان حرارتی (دقیقه) و غلظت اسید (درصد) بر آزاد سازی قندهای احیاء در دمای ثابت 121°C **Fig. 1** a) Surface and b) contour plots for interactive effect of heating retention time (min) and acid concentration (%) on reducing sugar release at 121°C

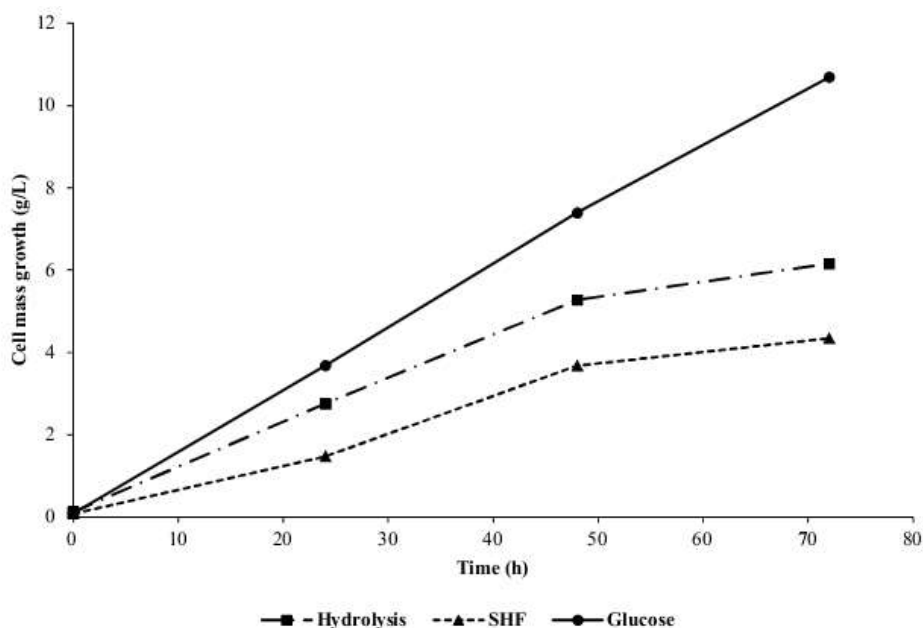
اول می‌تواند دلیل کم بودن رشد مخمرها نسبت به دو سامانه دیگر در این مرحله باشد. نرخ تولید توده سلولی در روز اول در این سامانه 0.061 g/L/h بود در حالی که در روز دوم به 0.091 g/L/h و در نهایت به 0.27 g/L/h رسید. با توجه به حضور کربن مازاد در محیط کشت گلوکزی و عصاره هیدرولیزی بیشینه نرخ تولید توده سلولی در روز دوم 0.155 g/L/h برای بستر گلوکزی و در روز اول برای بستر عصاره هیدرولیزی 0.114 g/L/h به دست آمد. انشائی و همکاران میزان تولید توده زیستی را با کشت ردوترولا موسیلاژینوسا در مایع هیدرولیز و سم‌زدایی شده چمن در مدت زمان گرمخانه‌گذاری معادل 96 h ، $12/36\text{ g/l}$ اندازه‌گیری کردند [۳۶]. برار و همکاران، این میزان را با کشت گونه‌های مخمر تریکوسپورون در محیط‌های حاوی گلوکز، گلیسرول و مایع هیدرولیز شده باگاس نیشکر غنی شده با زایلوز به ترتیب، $35/98 \pm 1/27$ ، $32/86 \pm 0/12$ و $25/28 \pm 0/25\text{ g/l}$ در مدت زمان انکوباسیون 120 h ، گزارش داده‌اند [۱].

۳-۱-۴- تولید لیپید و کاروتنوئید

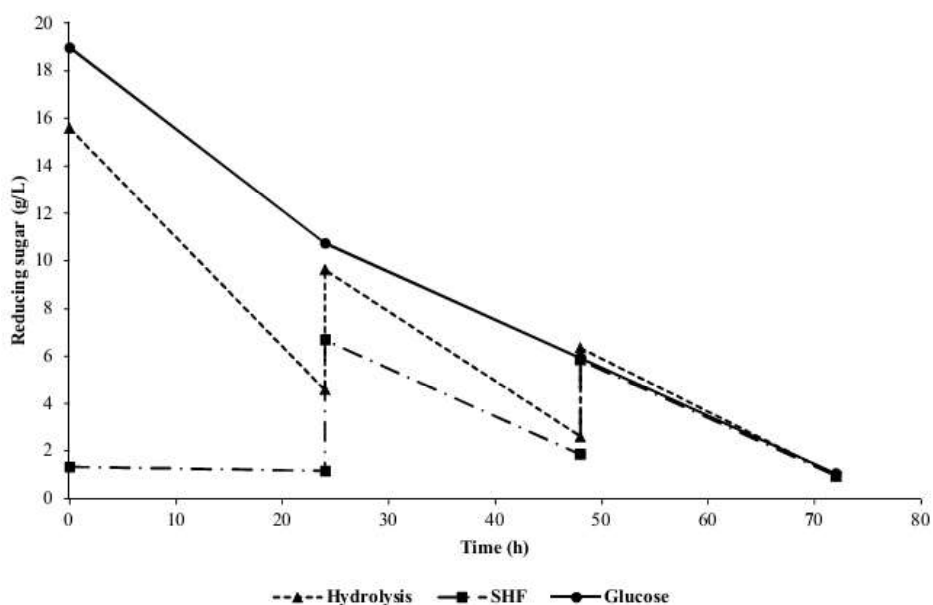
جدول (۴) محتوای لیپید و کاروتنوئید در سوبستراهای مختلف در روزهای دوم و سوم را نشان می‌دهد. مخمر ردوترولا گلوکزی در محیط گلوکزی با یک روند صعودی پس از ۳ روز به محتوای لیپید $27/33 \pm 1/06$ درصد وزن خشک سلولی دست پیدا کرد. در حضور قندهای احیاء حاصل از سامانه SHF

۳-۱-۳ رشد سلولی و مصرف سوبسترا

همان‌گونه که در شکل‌های ۳ و ۴ مشاهده می‌شود، روند رشد توده سلولی و مصرف سوبسترا در محیط کشت‌های حاوی گلوکز به عنوان شاهد، عصاره هیدرولیزی و قند حاصل از روش تخمیر و هیدرولیز جداگانه SHF، در مدت ۳ روز مورد پایش قرار گرفت. لازم به ذکر است با توجه به میانگین مصرف روزانه سوبسترا توسط مخمر ردوترولا گلوکزی مقدار لازم قند احیاء حاصل از هیدرولیز اسیدی باگاس به محیط‌های عصاره هیدرولیزی و SHF اضافه و به حجم اولیه رسانده شد. نمونه‌برداری هر ۲۴ ساعت انجام و مقدار رشد مخمر و مصرف قند ثبت گردید. همان‌طور که انتظار می‌رفت رشد مخمر در زمان مصرف بستر حاوی گلوکز به بیشینه خود $10/69 \pm 2/76$ پس از 72 h و مصرف کلی $17/91 \pm 0/14\text{ g/l}$ قند رسید. در محیط حاوی عصاره هیدرولیزی مخمرها با یک سیر صعودی با مصرف $23/38 \pm 0/04\text{ g/l}$ قند احیاء به $6/15 \pm 0/61\text{ g/l}$ رسیدند، در حالی که این مقدار برای سامانه SHF برابر $4/34 \pm 0/23\text{ g/l}$ در مقابل مصرف $9/86 \pm 0/01\text{ g/l}$ قند احیاء بود. پس از محاسبه راندمان رشد سلولی، در نهایت این شاخص برای بستر گلوکزی $0/59\text{ g}$ توده سلولی به گرم قند احیاء، عصاره هیدرولیزی $0/26\text{ g}$ توده سلولی به گرم قند احیاء و سامانه SHF، $0/44\text{ g}$ توده سلولی به گرم قند احیاء برآورد گردید. مقدار پایین قند احیاء در سامانه SHF و در ۲۴ ساعت



شکل (۳) رشد توده سلولی با استفاده از مخمر ردوترولا گلوتهینیس در بسترهای حاوی گلوکز و قند احیاء حاصل از هیدرولیز اسیدی و آنزیمی
Fig. 3 Cell mass growth of *Rhodotorula glutinis* on glucose and liberated reducing sugar from acid and enzyme hydrolysis processes



شکل (۴) روند مصرف و افزودن قندهای احیاء در تخمیر بسترهای حاصل از هیدرولیز اسیدی، سامانه SHF و گلوکز (بدون افزودن گلوکز) در شرایط نیمه پیوسته با استفاده از مخمر ردوترولا گلوتهینیس در ساعت‌های ۲۴ و ۴۸

Fig. 4 Trend of reducing sugar consumption and supplementation from *Rhodotorula glutinis* cultured with glucose (without supplementing), acid hydrolysis and SHF system through the fed-batch mode at 24 and 48 h post inoculation

این روند صعودی از $10/9 \pm 2/40$ در روز دوم به $15/43 \pm 0/76$ محیط کشت حاوی قندهای احیاء حاصل از هیدرولیز اسیدی درصد وزن خشک سلولی در روز سوم رسید. افزودن قند احیاء ابتدا با یک شیب مناسب به $22/14 \pm 1/03$ رسید اما پس از آن پس از ۲۴ ساعت به این روند صعودی کمک نمود، اما مخمر در با اندکی کاهش مقدار $19/52 \pm 1/34$ درصد وزن خشک سلولی

جدول (۳) آنالیز واریانس اثرمتغیرهای غلظت اسید و زمان نگهداری برآزاد سازی قندهای احیاء

Table 3 ANOVA of quadratic response surface model and regression coefficient of control variables (heating retention time and acid concentration) effect on reducing sugar release

ارزش p p-Value Prob>F	ارزش F F-Value	میانگین مربعات Mean squares	درجه آزادی Degrees of freedom	منبع source
0.000	23.6	22.3	5	مدل model
0.002	20.1	19	1	غلظت اسید Acid concentration (A)
0.101	3.4	3.2	1	زمان ماند حرارتی Heating retention time (B)
0.004	16.1	15.2	1	A ²
0.029	7.0	6.6	1	B ²
0.000	439.4	37.1	1	AB
0.572	0.7	0.7	3	عدم برازش Lack of Fit

جدول (۴) میزان تولید کاروتنوئید و لیپید توسط ردوترولا گلوتنیس در محیط کشت با محدودیت نیتروژن با استفاده از بسترهای حاوی گلوکز و قند حاصل از هیدرولیز اسیدی و سامانه پیش‌فراوری، هیدرولیز و تخمیر جداگانه (SHF) باگاس

Table 4 Lipid and carotenoid synthesis by *Rhodotorula glutinis* cultured with glucose, and reducing sugar from acid hydrolysis and SHF systems in limited-nitrogen medium

کاروتنوئید (میکرو گرم بر گرم وزن خشک سولی) (Carotenoid (µg/g dwt			لیپید (درصد وزن خشک سولی) (Lipid (% dwt			زمان (ساعت) (Time(h
SHF	عصاره هیدرولیزی Hydrolysis	گلوکز Glucose	SHF	عصاره هیدرولیزی Hydrolysis	گلوکز Glucose	ساعت Hour
237±43	131±3	131±18	10.90±2.40	22.14±1.03	23.05±0.08	48
189±13	99±14	168±67	15.43±0.76	19.52±1.34	27.33±1.06	72

همان‌گونه که در جدول (۴) مشاهده می‌شود، در محیط کشت حاوی گلوکز محتوای کاروتنوئید تولیدی به حداکثر (µg/g وزن خشک سولی) ۱۶۸±۶۷ پس از ۷۲ h رسید. درحالی‌که در حضور قندهای احیاء حاصل از هیدرولیز آنزیمی در محیط SHF پس از ۲۴ ساعت این ریزسازواره بیش‌ترین محتوای کاروتنوئید (µg/g وزن خشک سولی) ۲۳۷±۴۳ را در بین کل آزمایش‌ها تجربه کرد. این تولید بیشینه می‌تواند به دلیل قندهای مناسب حاصل از هیدرولیز آنزیمی در ۲۴ ساعت اول رشد باشد. که نشان دهنده قابلیت تولید بیش‌تر کاروتنوئید نسبت به لیپید توسط مخمر ردوترولا گلوتنیس در حضور قندهای احیاء می‌باشد. در این محیط در نهایت پس از ۷۲ ساعت (µg/g وزن خشک سولی) ۱۸۹±۱۳ کاروتنوئید

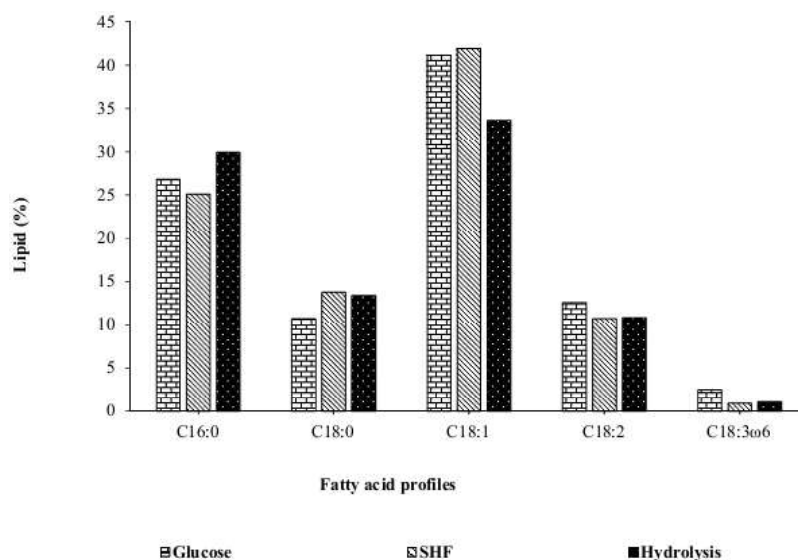
را نشان داد. احتمالاً حضور مقداری از مواد بازدارنده تخمیر باعث کاهش رشد و هم‌چنین تجمع کم‌تر لیپید در سلول‌ها نسبت به محیط شاهد شده است. لیو و همکاران، تولید چربی با استفاده از قند احیاء حاصل عصاره هیدرولیزی و سم‌زدایی شده به‌دست آمده از پیش‌فراوری ساقه ذرت با دو مرحله افزودن نیتروژن در یک بیوراکتور ۵ لیتری، توسط مخمر ردوترولا گلوتنیس، را ۷۰/۸ g/l و محتوای لیپید را ۴۲/۲٪ گزارش دادند [۱۰]. هم‌چنین زو و همکاران، بررسی تولید لیپید توسط ردوترولا گلوتنیس با استفاده از تخمیر فاضلاب به‌عنوان محیط کشت را مورد بررسی قرار داده و پس از افزودن گلوکز به محیط فاضلاب، توره سلولی و محتوای لیپید را به‌ترتیب، حدود ۲۵ g/l و ۲۰٪ اندازه‌گیری کردند [۱۷].

به ترتیب، ۵۰/۰۵، ۴۶/۴۸ و ۵۴/۶۶٪ گزارش دادند. اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک و اسید استئاریک نیز در بسترهای مذکور سهم بسزایی داشته‌اند [۱]. ترکیبات اسیدهای چرب تولیدی توسط ردوسپوریدیوم دیوبواتوم در تحقیق نصیریان، در غلظت‌های متفاوت گلوکز و گلیسرول به‌طور عمده شامل اسید اسید اولئیک، پالمیتیک و اسید لینولئیک گزارش شده است [۴۳]. هم‌چنین درصد اسیدهای چرب تک اشباع در بستر گلوکزی و تخمیر و هیدرولیز جداگانه از اسیدهای چرب اشباع بیش‌تر بود، اما این نسبت در بستر هیدرولیزی تغییر نمود. احتمالاً وجود ترکیبات حاصل از هیدرولیز اسیدی باگاس بر مکانیسم تولید لیپید تأثیرگذار بوده است. به همان نسبت درجه غیراشباع بودن لیپید تولیدی در عصاره هیدرولیزی پایین‌تر از بقیه قرار گرفت. اگرچه مقدار بالای اسید اولئیک از دیدگاه صنایع غذایی مطلوب است، اما افزایش اسید پالمیتیک نیز کاربرد لیپیدهای تولیدی در فرآورده‌هایی مانند مارگارین و شورتینگ را افزایش می‌دهد. مقدار بالای آن باعث شکل‌گیری کریستال‌های β می‌شود که در این محصولات اهمیت دارد و نیاز به استئارین در مارگارین و شورتینگ را کاهش و از نظر تغذیه‌ای نسبت به اسید استئاریک مشکلات کم‌تری دارد. هم‌چنین میزان بالای اسید لینولئیک کیفیت تغذیه‌ای مطلوب

تولید گردید. در محیط کشت حاوی عصاره هیدرولیزی ابتدا 131 ± 3 و سپس در انتهای آزمایش و پس از ۷۲ ساعت (99 ± 14 $\mu\text{g/g}$ وزن خشک سلولی) تولید گردید. موسوی و همکاران، بیش‌ترین میزان کاروتنوئید در محیط کشت حاوی ملاس نیشکر و عصاره مخمر و نیز Tween 80 پس از ۸ روز، توسط ردوترولا گلوتنیس $1670 \mu\text{g/g}$ وزن خشک سلولی گزارش داده است [۵۲].

۳-۱-۵- پروفایل اسیدهای چرب

پروفایل اسیدهای چرب شاخص، که بیش‌ترین سهم را در لیپید تولیدی توسط مخمر ردوترولا گلوتنیس داشتند، پس از سه روز در شکل (۵) ارائه شده است. در تمامی بسترها اسید اولئیک بیش‌ترین سهم را به خود اختصاص داده بستر گلوکزی ۴۱/۱۹، عصاره هیدرولیزی ۳۳/۶۵ و تخمیر و هیدرولیز جداگانه ۴۱/۹۷٪ است. پس از آن اسید پالمیتیک به ترتیب با ۲۶/۹۲، ۲۹/۹۵ و ۲۵/۱۶٪ قرار گرفته و اسید استئاریک و لینولئیک هم سهم قابل توجهی در تمامی بسترها داشته‌اند. برار و همکاران، با کشت گونه‌های مخمر تریکوسپورون در محیط‌های حاوی گلوکز، گلیسرول و مایع هیدرولیز شده باگاس نیشکر غنی شده با زایلوز بیش‌ترین مقدار اسید چرب، مربوط به اسید اولئیک



شکل (۵) پروفایل اسیدهای چرب شاخص تولیدی توسط مخمر ردوترولا گلوتنیس در محیط کشت با محدودیت نیتروژن با استفاده از بسترهای حاوی گلوکز و قندهای احیاء حاصل از هیدرولیز اسیدی و سامانه پیش‌فراوری، هیدرولیز و تخمیر جداگانه (SHF)

Fig. 5 Fatty acid profiles of *Rhodotorula glutinis* cultured with nitrogen-limited media on glucose, and reducing sugar from acid hydrolysis and SHF systems

جدول (۵) برخی خواص فیزیکی لیپید تولیدی توسط مخمر ردوترولا گلوتینیس در محیط کشت با محدودیت نیتروژن با استفاده از بسترهای حاوی گلوکز و قندهای احیاء حاصل از هیدرولیز اسیدی و سامانه پیش‌فراوری، هیدرولیز و تخمیر جداگانه (SHF)

Table 5 Selected physical properties of synthesized lipid from *Rhodotorula glutinis* cultured with nitrogen-limited media on glucose, and reducing sugar from acid hydrolysis and SHF systems

نوع بستر Substrate	خواص فیزیکی لیپید تولیدی Physical properties of synthesized lipid		
عصاره هیدرولیزی Acid hydrolysis	پیش‌فراوری، هیدرولیز و تخمیر جداگانه SHF	گلوکز Glucose	
43.32	38.95	37.62	اسیدهای چرب اشباع Saturated fatty acids
33.65	41.97	41.19	اسیدهای چرب تک اشباع Mono-unsaturated fatty acids
11.94	11.66	15.14	اسیدهای چرب چند اشباع Poly-unsaturated fatty acids
57.53	65.29	71.47	درجه غیر اشباعیت Non-saturation degree
4.83	4.78	4.73	گرانروی Viscosity (mm ² /s)
0.875	0.876	0.876	وزن مخصوص Specific gravity
56.29	61.95	67.74	اندیس یدی Iodine index
182	188	191	اندیس صابونی saponification Index

باشد مطلوب‌تر است [۵۳]. در تحقیق حاضر لیپید تولیدی با استفاده از بستر عصاره هیدرولیزی اندیس صابونی کم‌تری را نشان داد. در خصوص اندیس یدی میتوان گفت که شاخصی از تعداد پیوندهای دوگانه است. به‌طور معمول در دمای اتاق روغن‌های حاوی اسیدهای چرب اشباع نشده به صورت مایع هستند، بنابراین اندیس یدی با نقطه ذوب یا نرمی و سختی روغن ارتباط دارد. همچنین روغن‌ها و چربی‌های با پیوند دوگانه بالا در شرایط یکسان سریع‌تر اکسید شده و نسبت به فساد اکسیژنی حساس‌تر هستند.

۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق پیش‌فراوری اسیدی باگاس نیشکر با دو متغیر کنترلی غلظت اسید و زمان نگهداری حرارتی انجام و اثر آن‌ها بر کاهش لیگنین و آزادسازی قندهای احیاء با استفاده از روش رویه پاسخ بررسی گردیدند. همچنین چگونگی تولید لیپید و کاروتنوئید توسط مخمر ردوترولا گلوتینیس در

را ارائه می‌دهد، ولی مقدار بیش از حد آن عدم پایداری در روغن تولیدی را به‌وجود می‌آورد. از دیدگاه صنعت غذا محدود شدن پروفیل اسیدهای چرب به اسید پالمیتیک، استئاریک، اولئیک و لینولئیک اولویت دارد.

مقادیر مربوط به برخی خواص فیزیکی لیپید تولیدی مانند وزن مخصوص، گرانروی، اندیس صابونی و اندیس یدی محاسبه و در جدول (۵) ارائه شده است. وزن مخصوص به‌طور معمول فاکتوری است که برای شناسایی روغن یا چربی به‌کار میرود و هرچه نسبت اسیدهای چرب بلند زنجیر و اشباع افزایش یابد، وزن مخصوص نیز افزایش می‌یابد. اندیس صابونی شاخصی از وزن مولکولی نسبی تری‌گلیسریدهای تشکیل دهنده روغن است. هرچه اسیدهای چرب موجود در روغن وزن مولکولی کم‌تری داشته باشند، تعداد مولکول‌های گلیسیرید در هر گرم چربی بیش‌تر و اندیس صابونی بالاتر است. از آن‌جا که کاهش میزان اسیدهای چرب اشباع و افزایش غیر اشباعی بویژه ناشی از اسید اولئیک مطلوب می‌باشد، هرچه اندیس صابونی کم‌تر

پروفایل اسیدهای چرب به‌دست آمده، اسید اولئیک، اسید پالمیک، اسید استئاریک، و اسید لینولئیک بیش‌ترین درصد را نسبت به کل اسیدهای چرب موجود داشته‌اند. هم‌چنین خواص فیزیکی لیپید تولیدی با سایر منابع روغن و لیپید متداول قابل مقایسه و مطلوب بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده و قابلیت‌های مطلوب تولید لیپید و کاروتنوئید در این پژوهش، تحقیقات بیش‌تر در بخش پیش‌فراوری و هیدرولیز مواد لیگنوسلولزی، سم‌زدایی، گونه‌های دیگر مخمر مقاوم‌تر به مواد بازدارنده و سامانه‌های تولید پیوسته لیپید و کاروتنوئید پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

تحقیق انجام شده منتج از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته مهندسی صنایع غذایی بوده و نویسندگان از همکاری صمیمانه پرسنل آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز کمال تشکر و قدردانی را دارند.

در بسترهای حاوی گلوکز و هم‌چنین قندهای احیاء حاصل از هیدرولیز اسیدی و آنزیمی در یک سامانه Fed-batch مورد آزمون و تحلیل قرار گرفت. طبق نتایج به‌دست آمده از این تحقیق مقدار بهینه غلظت اسید نیتریک و زمان پیش‌فراوری برای تعیین درصد کاهش لیگنین به ترتیب $6/67\%$ و $118/75 \text{ min}$ با توجه به طرح آزمایشی رویه پاسخ تعیین گردید. مقدار درصد کاهش لیگنین به $93/4\%$ رسید. مقدار بهینه غلظت اسید نیتریک و زمان نگهداری در تعیین آزاد سازی قندهای احیاء به ترتیب، $0/5\%$ و 180 min ، به میزان $15/57 \text{ g/l}$ اندازه‌گیری شد. محتوای لیپید در محیط حاوی گلوکز $27/33 \pm 1/06$ ، عصاره هیدرولیزی $19/52 \pm 1/34$ و در محیط SHF $15/43 \pm 0/76$ درصد وزن خشک سلولی پس از ۳ روز به‌دست آمد. محتوای کاروتنوئید در ۷۲ ساعت رشد مخمر ردوترولا گلوتنیس، در محیط کشت حاوی گلوکز 168 ± 67 ، عصاره هیدرولیزی 99 ± 14 و در محیط کشت SHF 189 ± 13 میکروگرم بر گرم توده سلولی اندازه‌گیری گردید. با توجه به

منابع

- Masjuki, H., Mekhilef, S.A. (2012). Comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 16, 2070–2093.
- [5] Luna-Floresb, C.H., Ramírez-Cordovaa, J.J., Pelayo-Ortizb, C., Fematec, R., Herrera-López, E.J. (2010). Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using *Yucca fillifera* date juice as substrate. *Biochem. Eng. J.*, 53, 131-136.
- [6] Liang, Y., Jarosz, K., Wardlow, A.T., Zhang, J., Cui, Y. (2014). Lipid production by *Cryptococcus curvatus* on hydrolysates derived from corn fiber and sweet sorghum bagasse following dilute acid pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 173, 2086-2098.
- [1] Brar, K.K., Sarma, A.K., Aslam, M., Polikarpov, I., Chadha, B.S. (2017). Potential of oleaginous yeast *Trichosporon* sp. for conversion of sugarcane bagasse hydrolysate into biodiesel. *Bioresour. Technol.*, 242, 161-168.
- [۲] احمدی، ک.؛ فلیزاده، ح.؛ عبادزاده، ح.؛ حاتمی، ف.؛ فضل‌استبرق، م.؛ حسین پور، ر.، کاظمیان، آ.؛ و رفیعی، م. (۱۳۹۵). آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳. چاپ اول، وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات.
- [3] Alfenore, S., Molina-Jouvea, C. (2016). Current status and future prospects of conversion of lignocellulosic resources to biofuels using yeasts and bacteria. *Process Biochem.*, 51, 1747–1756.
- [4] Atabani, A., Silitonga, A., Badruddin, I., Mahlia, T.,

- (2016). Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29. *Renew. Energ.*, 99, 198-204.
- [16] Vieira, J.P.F., Ienczak, J.L., Cośta, P.S., Rossell, C.E.V., Franco, T.T., Pradella, J.G.C. (2016). Single cell oil production integrated to a sugarcane-mill: Conceptual design, process specifications and economic analysis using molasses as raw material. *Ind. Crop. Prod.*, 89, 478-485.
- [17] Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. (2008). Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresour. Technol.*, 99, 5923-5927.
- [18] Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., French, W.T., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W., Hetrick, M., Pham, P. (2013). Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*, 61, 34-44.
- [19] Kitcha, S., Cheirsilp, B. (2014). Bioconversion of lignocellulosic palm byproducts into enzymes and lipid by newly isolated oleaginous fungi. *Biochem. Eng. J.*, 88, 95-100.
- [20] Patel, A., Sindhu, D.K., Arora, N., Singh, R.P., Pruthi, V., Pruthi, P.A. (2015). Biodiesel production from non-edible lignocellulosic biomass of *Cassia fistula* L. fruit pulp using oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1. *Bioresour. Technol.*, 197, 91-98.
- [21] Jin, M., Slininger, P.J., Dien, B.S., Waghmode, S., Moser, B.R., Orjuela, A., Sousa, L.D.C., Balan, V. (2015). Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends Biotechnol.*, 33, 43-54.
- [22] Kim, I., Seo, Y.H., Kim, G.Y., Han, J.I. (2015). [7] Xavier, M.C.A., Coradini, A.L.V., Deckmann A.C., Franco T.T. (2017). Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. *Biochem. Eng. J.*, 118, 11-19.
- [8] Karamerou, E.E., Theodoropoulos, C., Webb, C. (2016). A biorefinery approach to microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass and Bioenerg.*, 89, 113-122.
- [9] Tsigie, Y.A., Wang, C.H.Y., Truong C.T., Ju, Y.H. (2012). Lipid Production from *Yarrowia lipolytica* P01g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour. Technol.*, 102, 9216-9222.
- [10] Liu, Y., Wang, Y., Liu, H., Zhang, J. (2015). Enhanced lipid production with undetoxified corncob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Bioresour. Technol.*, 180, 32-39.
- [11] Ruan, Z., Zanotti, M., Wang, X., Ducey, C.H., Liu, Y. (2012). Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, 110, 198-205.
- [12] Liang, Y., Tang, T., Umagiliyage, A.L., Siddaramu, T., McCarroll, M., Choudhary, R. (2012). Utilization of sorghum bagasse hydrolysates for producing microbial lipids. *Appl. Energ.*, 91, 451-458.
- [13] Wang, B., Rezenom, Y.H., Cho, K.C.H., Tran, J.L., Lee, D.G., Russell, D.H., Gill, J.J., Young, R., Chu, K.H. (2014). Cultivation of lipid-producing bacteria with lignocellulosic biomass: Effects of inhibitory compounds of lignocellulosic hydrolysates. *Bioresour. Technol.*, 161, 162-170.
- [14] Karatay, S.E., Donmez, G. (2010). Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresour. Technol.*, 101, 7988-7990.
- [15] Taski Ortucu, S., Aydogan, M.N., Arslan, N.P.

- [32] Sangyoka, S., Reungsang, A., Lin, C.Y. (2016). Optimization of biohydrogen production from sugarcane bagasse by mixed cultures using a statistical method. *Sustainable Environment Research*, 26, 235-242.
- [33] Chong, A.R., Ramirez, J.A., Garrote, G., Vazquez, M. (2004). Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *J. Food Eng.*, 61, 143-152.
- [34] David, G.F., Perez, V.H., Justo, O.R., Garcia-Perez, M. (2017). Effect of acid additives on sugarcane bagasse pyrolysis: Production of high yields of sugars. *Bioresour. Technol.*, 223, 74-83.
- [35] Cheng, Y.T., Yang, C.F. (2016). Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoid using food wastes. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 61, 270-275
- [۳۶] انشاییه، م؛ عبدلی، آ؛ نحوی، ا؛ و مدنی، م. ۱۳۹۱. تبدیل زیستی هیدرولیز چمن به روغن تک یاخته و بیودیزل با استفاده از رودوتورولا موسیلاژینوزا، مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی. دوره ۴، شماره ۱۳، ص ۴۴-۳۷.
- [37] Nemailla, B., Aline, C., Carvalho, V.A.J., Alves, M.E. (2017). Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain. *Process Biochem.*, 57, 16-25.
- [38] Rabelo, S.C., Amezquita Fonseca, N.A., Andrade, R.R., Maciel Filho, R., Costa, A.C. (2011). Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass Bioenergy.*, 35, 2600-2607.
- [39] Canilha, L., Almeida, J.B., Felipe, M.G.A., Carvalho, W. (2003). Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Candida guilliermondii* in a stirred tank reactor. *Biotechnol. Let.* 25, 1811-1814.
- [40] Martins, L.H.D.S., Rabelo, S.C., Costa, A.C. (2015). Effects of the pretreatment method on high sol-
- Co-production of bioethanol and biodiesel from corn stover pretreated with nitric acid. *Fuel*, 143, 285-289.
- [23] Nasirian, N., Almassi, M., Minaei, S., Widmann, R. (2011). Development of a method for biohydrogen production from wheat straw by dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 36, 411-420.
- [24] Rabelo, S.C., Andrade, R.R., Filho, R.M., Costa, A.C. (2014). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. *Fuel*, 136, 349-357.
- [25] Hu, F., Ragauskas, A. (2012). Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *Bioenerg. Res.*, 5, 1043-1066.
- [26] Yen, H.W., Chang, J.T. (2015). Growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an internal-loop airlift bioreactor by using lignocellulosic biomass hydrolysate as the carbon source. *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 580-584.
- [27] Laopaiboon, P., Thani, A., Leelavatcharama, V., Laopaiboon, L. (2010). Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresour. Technol.*, 101, 1036-1043.
- [28] Gamez, S., Gonzalez-Cabriales, J.J., Ramirez, J.A., Garrote, G., Vazquez, M. (2006). Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *J. Food Eng.*, 74, 78-88.
- [29] Zeng, J., Zheng, Y., Yu, X., Yu, L., Gao, D., Chen, S. (2013). Lignocellulosic biomass as a carbohydrate source for lipid production by *Mortierella isabellina*. *Bioresour. Technol.*, 128, 385-391.
- [30] Liu, W., Wang, Y., Yu, Zh., Bao, J. (2012). Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresour. Technol.*, 118, 13-18.
- [31] Kumar, S., Dheeran, P., Singh, S.P., Mishra, I.M., Adhikari, D.K. (2015). Kinetic studies of two-stage sulphuric acid hydrolysis of sugarcane bagasse. *Renew. Energ.*, 83, 850-858.

- of Experiments. 5th ed., John, Wiley and Sons, Inc, NewYork, pp 427–500.
- [49] Capecchia, L., Galbeb, M., Barbantia, L., Wallberg, O. (2015). Combined ethanol and methane production using steam pretreated sugar cane bagasse. *Ind. Crop. Prod.*, 74, 255–262.
- [50] Kumaria, S., Das, D. 2015. Improvement of gaseous energy recovery from sugarcane bagasse by dark fermentation followed by biomethanation process. *Bioresour. Technol.*, 194, 354–363.
- [51] Huang, Q., Yan, Q., Fu, J., Lv, X., Xiong, Ch., Lin, J., Liu, Z. (2016). Comparative study of different alcoholate pretreatments for enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.*, 211, 464–471.
- [۵۲] موسوی نسب، م؛ نصیری، م؛ نعمت الهی، ز. (۱۳۹۰). بررسی بازدهی تولید کاروتنوئید توسط *Rhodotorula glutinis* در سوپسترا حاوی ملاس نیشکر با استفاده از دستگاه HPLC. مجموعه مقالات هفتمین همایش ملی بیوتکنولوژی، تهران، ص ۳۶–۳۰.
- [۵۳] احمدزاده، ص؛ کدیور، م؛ سعیدی، ق. (۱۳۸۸). بررسی خصوصیات روغن و ترکیب دانه در تعدادی از لاین‌ها و واریته‌های گلرنگ. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی ایران، جلد ۵، شماره ۲، ص ۱۵۰–۱۳۶.
- ids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.*, 191, 312–32.
- [41] Ehrman, C.I., Himmel, M.E. (1994). Simultaneous Saccharification and Fermentation of Pretreated Biomass: Improving Mass Balance Closure. *Biotechnol. Techniques*. 8, 99-104.
- [42] Saqib, A.A.N., Whitney, P.J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugar. *Biomass Bioenerg.* 35, 47-50.
- [۴۳] نصیریان، ن. (۱۳۹۶). تولید ناپیوسته لیپید با استفاده از مخمر مولد لیپید *Rhodosporidium diobovatum* و محاسبه خصوصیات فیزیکی بیودیزل تولیدی با استفاده از پروفایل اسیدهای چرب، مجله مهندسی زراعی، دوره ۴۰، ص ۱۵۵–۱۶۸.
- [44] Wang, Y.C., Chuang, Y.C., Hsu, H.W. (2008). The flavonoid carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chem.*, 106, 277–284.
- [45] Lee, J.N., Lee, D.Y., Ji, I.H. (2001). Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 837-841.
- [46] Razavi, H., Marc, I. (2003). Isolation of a new strain of *Sporobolomyces ruberrimus* for the production of carotenoids, using technical glycerol as carbon source. In: Proceeding of the 11th Int. European Cong. on Biotechnol. (pp. 24-29), Basel, Switzerland.
- [47] Carvalho, L.M.J.D., Gomes, P.B., Godoy, R.L.D.O., Pacheco, Monte, P.H.F.D., Carvalho, J.L.V.D., Nutti, M.R., Neves, A.C.L., Vieira, A.C.R.A., Ramos, S.R.R. (2012). Total Carotenoid Content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A Preliminary study. *Food Res. Int.*, 47, 337-340.
- [48] Montgomery, D.C. (2001). Design and Analysis