Fayoum University

Faculty of Agriculture

Biodiesel Production By Yeasts

By

Laila Ramadan Abd Al Halim Bayomi

Thesis submitted in partial fulfillment

of the requirements for the degree of

Ph.D.

In Agricultural Science

(Agricultural Microbiology)

Department of Agricultural Microbiology

Faculty of Agriculture

FAYOUM UNIVERSITY

2019

Biodiesel Production By Yeasts

By

Laila Ramadan Abd Al Halim Bayomi

B.Sc. in Agric. (Food Sci. and Technol.) Fac. Agric., Fayoum University, 2010

M.Sc. Agric. (Agricultural Microbiology) Faculty of Agric., Fayoum University, 2015

THESIS

Submitted in partial fulfillment

of the requirements for the degree of

Ph.D. in Agricultural Science

(Agricultural Microbiology)

Supervisors:

1. Prof. Dr. Salem Abdel Fattah Mahfouz

Professor and Head of Agricultural Microbiology Department, Faculty of Agriculture, Fayoum University.

Signature …….

2. Dr. Yasser Fathy Abdelaliem Eied

Lecturer of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Fayoum University.

Signature …….

FAYOUM UNIVERSITY

2019

Approval Sheet

Biodiesel Production By Yeasts

By

Laila Ramadan Abd Al Halim Bayomi

Degree: Ph.D. in Agricultural Microbiology

This thesis for Ph.D. degree in Agricultural microbiology has been approved by:

1- Prof. Dr. Ahmed Refaat Abd Allah Mansour
Professor of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture,

El Menia University.
Signature……

2- Prof. Dr. Rabea Mohamed Ahmed El Shahawy
Professor of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture,
Fayoum University.
Signature……

3- Prof. Dr. Salem Abdel Fattah Mahfouz
Professor and Head of Agricultural Microbiology Department, Faculty of Agriculture,
Fayoum University.
Signature……

Date / /

2019

Abstract

A survey was undertaken for yeast isolates capable of producing lipids, which were used as a feedstock for biodiesel production. A number of 74 yeast isolates were isolated from different sources; soil, raw milk, local yoghurt, fruit juices, rotten fruits, honey bee, black honey, jam, petrol, and different pickles. Morphological characters of yeasts were examined using light microscope. These isolates were screened for their ability to accumulate lipids within the cells by culturing on nitrogen-limited medium (NLM) and using Sudan black B staining technique. Estimation of lipid content % was done for 59 yeast isolates. Five isolates LPI 68, LPI 65, LPI 54, LPI 51, and LPI 24 proved to be the more promising isolates depending on the biomass weight, lipid weight, and lipid content %. The effect of different glucose concentrations in NLM on three parameters; dry biomass, lipid weight, and lipid content % were determined and results showed that the best concentration of glucose was 70 g/L. Different 5 methods for lipid extraction were examined to choose the best method to complete the study. The results showed that the best method was modified Bligh and Dyer method (1959). The possibility of using different wastes such as sugar cane molasses, waste food oil and shortening, whey permeate, and waste motor oil as carbon sources for lipid production were determined, and the results showed that the best waste for lipid production are waste food oil and waste motor oil. Optimization of fermentation conditions such as effect of NLM composition, NLM pH, incubation temperature, and incubation period were also investigated and results of this test showed that yeasts can accumulate lipids at conditions differed between isolates, where NLM **5** at pH from 5.0 to 6.0, at 28 ºC and 35 ºC for 96 to 144 h were the best. The fatty acids profile analysis achieved that the lipids extracted from isolates LPI 68, and LPI 65 mainly contained the principal fatty acids (triacylglyceols, TAGs) which is similar to that of vegetable oils mainly oleic and linoleic acids. The isolates LPI 68 and LPI 65 which showed the most potential ability for producing lipids and had the similar fatty acid profile of plant oils, were identified by a molecular genetic technique. They were identified as *Pichia occidentalis* MH879824, and *Pichia kudriavzevii*.MH879825.

Keywords: Oleaginous yeasts, Biodiesel, Lipid extraction, Fatty acids analysis, 26S rDNA, Nitrogen-limited medium.

الخلاصة

أجرى حصر للخمائر التى لها القدرة على إنتاج الدهون, والتى تستخدم لإنتاج الديزل الحيوي, تم عزل عدد 74 عزلة من الخمائر من مصادر مختلفة مثل التربة, اللبن الخام, الزبادي البلدي, عصائر الفاكهة, بعض الفواكة الفاسدة, عسل النحل, العسل الأسود, المربى, البترول, و المخللات. اختبرت الصفات المورفولوجية للخمائر باستخدام الميكروسكوب الضوئي. اختبرت هذه العزلات لمعرفة قدرتها على إنتاج الدهون بتنميتها على بيئة محدودة النيتروجين ثم صبغها بصبغة أسود سودان. تم اختبار قدرة 59 عزلة على إنتاج الدهون كمياً بحساب محتواها من الدهون,وبناءً على ذلك اختيرت خمس عزلات أعطت أفضل النتائج لتكملة الدراسة عليها وهى LPI 68, LPI 65, LPI 54, LPI 51, LPI 24 . تم اختبار تأثير تركيز الجلوكوز فى بيئة الإنتاج على إنتاج الدهون ومنه اتضح أن أفضل تركيز كان 70 و 100جم/ لتر. تم اختبار خمس طرق مختلفة لاستخلاص الدهون من الخلايا لاختيار أفضلها وأعطت طريقة Bligh وDyer المعدلة (1959) أفضل النتائج. تم اختبار إمكانية استخدام المخلفات مثل مولاس قصب السكر, برمييت الشرش, مخلفات زيت الطعام والمسلي الصناعي, ومخلفات زيت السيارات كمصدر للكربون لإنتاج الدهون و أوضحت النتائج أن أفضل مخلف لإنتاج الدهون كان مخلفات زيت الطعام وزيت السيارات. لعمل ظروف تخمير مثلى تم اختبار تأثير اختلاف درجة حموضة البيئة ومدة التخمير ودرجة حرارة التخمير وأيضاً اختلاف تركيب بيئة الإنتاج على إنتاج الدهون و أوضحت النتائج أن أفضل ظروف تخمير كانت عند درجة حموضة تتراوح بين 5 إلى 6 عند درجة حرارة 28 أو 30 م لمدة تتراوح بين 96 إلى 144 ساعة واستخدام بيئة الإنتاج رقم 5 . عند تحليل الأحماض الدهنية للعزلتين LPI 68, LPI 65 أعطت جليسريدت ثلاثية تشبه الموجودة فى الزيوت النباتية وكان أهمها حمض الأوليك واللينوليك. تم تعريف العزلتين LPI 68, LPI 65 بالطرق الوراثية حيث أظهرتا أفضل النتائج لإنتاج الدهون والتى يتشابه تركيبها مع تركيب الزيوت النباتية و كانت نتيجة التعريف هى *Pichia occidentalis* MH879824 و MH879825 *Pichia kudriavzevii* على التوالى.

الكلمات الدالة: الخمائر الزيتية, الديزل الحيوي, استخلاص الدهون, تحليل الأحماض الدهنية, البيئة محدودة النيتروجين.