Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۶۰- ۴۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۱۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۹

بررسی اثر شربت گلوکز و شکر قهوه‌ای به عنوان سوبسترا ارزان قیمت در تولید روغن توسط گونه قارچی *Mortierella alpina* CBS 754. 68

سعید منتظری: کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران، saeed.montazery7@gmail.com
حمیدرضا صمدلوئی [*]**:** استادیار صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران، hsamadlouie@yahoo.com
حامی کابوسی: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران، hkaboosi@gmail.com

چکیده

مقدمه: آراشیدونیک اسید یک اسید چرب ضروری مهم در رژیم غذایی است. قارچ رشته ای *مورتیرلا آلفینا* منبع مناسبی برای تولید آراشیدونیک اسید شناخته شده است. برخی از گونه‌هایی این قارچ می‌توانند بیش از ۴۰ درصد چربی در خود ذخیره کنند که بیشتر از ۴۰ درصد آن را آراشیدونیک اسید تشکیل می‌دهد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، از منابع کربنی ارزان قیمت گلوکز مایع، شکر قهوه‌ای و نشاسته برای تولید روغن و آراشیدونیک اسید از گونه قارچی *مورتیرلا آلپینا* سی بی اس ۷۵۴/۶۸ استفاده شد. قند احیا به روش دی‌نیتروسالسیلیک اسید (DNS)، روغن با استفاده از دستگاه سوکسله و نوع اسید چرب با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی اندازه‌گیری شد.

نتایج: منابع کربنی به جز منبع کربنی نشاسته بر اساس قند احیا در سطح ۷۰ گرم در لیتر و پودر سویا در همه نمونه‌ها در سطح ۱۰ گرم در لیتر تنظیم شد. نتایج نشان داد که میزان درصد روغن در توده زیستی به ترتیب در محیط‌های گلوکز مایع ۳۲، نشاسته ۲۵ و شکر قهوه‌ای ۱۳ و درصد آراشیدونیک اسید در روغن به ترتیب در محیط‌های گلوکز مایع ۳۷، نشاسته ۳۳ و شکر قهوه‌ای ۳۱ به‌دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: اجزای اسید چرب تشکیل دهنده روغن تحت تاثیر رشد میکروارگانیسم است. افزایش رشد توده زیستی، اسیدهای چرب ساختاری روغن مانند استئاریک اسید و اولئیک اسید را افزایش داد. شرایط نامناسب محیط کشت باعث شد بازده تولید توده زیستی و روغن کاهش یابد.

واژه‌های کلیدی: *مورتیرلا آلفینا*، روغن، آراشیدونیک اسید و محیط کشت

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, 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.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه با پیشرفت دانش بشری و با شناخت فواید غذاهای عملگرا، توجه دانشمندان به این نوع غذاها افزایش یافته است. اسیدهای چرب ضروری یکی از این نوع غذاهای عملگرا است که نقش بسزایی در سلامت انسان ایفا می‌کنند. از آنجا که این اسیدهای چرب در بدن انسان ساخته نمی‌شوند اهمیت وجود این ترکیبات در رژیم غذایی به شدت مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است (۱)

با توجه به اهمیت اسیدهای چرب ضروری و کم بودن منابع تولید این نوع از اسیدهای چرب به‌ویژه اسید آراشیدونیک، دانشمندان در پی آن هستند که منابع مناسبی را برای تهیه این اسید چرب ضروری فراهم سازند (۲ و ۳). با در نظر گرفتن اهمیت این اسید چرب در ویژگی‌های عملکردی غشای سلولی، تنظیم کننده سوخت و ساز لیپوپروتئین[1]، رئولوژی خون و فعال‌سازی پلاکت‌ها[2] تولید تجاری آن مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به نکات یاد شده، مشکل اصلی در زمینه تهیه یا تولید آراشیدونیک اسید برای استفاده تجاری آن است. منابع گیاهی از این نظر غنی نیستند و منابع دریایی به علت مشکلاتی مانند وجود آلاینده‌های زیستی و سختی استخراج روغن از بافت آن‌ها، کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۴ و ۵). پس از اندکی پژوهش، دانشمندان پی‌بردند که پروتزوا، جلبک و قارچ منبع مناسبی برای تولید روغن با اسیدهای چرب چند غیراشباعی هستند. از این رو، ریزاندامک‌ها به عنوان منشا اسیدهای چرب چند غیراشباعی در زنجیره غذایی مورد توجه قرار گرفتند.

در بین میکروارگانیسم‌های روغنی، کپک‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. توانایی تولید محدوده وسیع‌تری از اسیدهای چرب، امکان استفاده از ضایعات کشاورزی برای تولید محصول و رشد در محیط‌هایی با دامنه وسیع اسیدیته، از ویژگی‌های مثبت این نوع از میکروارگانیسم‌هاست. در بین گونه‌های قارچی، گونه‌هایی از قارچ رشته‌ای مورتیرلا به علت کم توقع بودن و سرعت رشد بالا، عدم تولید رنگدانه و همچنین، با توجه به اینکه بیش از ۴۰ درصد چربی ذخیره کرده و بیشتر از ۴۰ درصد این میزان را آراشیدونیک اسید تشکیل می‌دهد مورد توجه قرار گرفته است (۶- ۸).

از آنجا که محیط کشت برای رشد و تولید محصول توسط ریزسازواره‌ها بسیار اهمیت دارد پژوهش‌های وسیعی برای بهینه‌سازی این عوامل انجام شده است. در پژوهشی که توسط وین[3] و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۹) انجام شد نشان داده شد که ژن مؤثر در تولید روغن (مالیک آنزیم) در محیط کشت گلوکز میزان فعالیت آن ۱۰ برابر محیط کشت Tween 80 است در واقع وجود گلوکز بیان ژن مالیک آنزیم را تحریک کرده که عامل اصلی تجمع روغن در این ریزسازواره است. پارک[4] و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۱۰) تاثیر منابع مختلف نیتروژنی مانند عصاره مخمر، کنجاله سویا، شربت ذرت خیسانده، پروتئین ماهی و گلوتن بر تولید آراشیدونیک اسید و ریخت‌شناسی توده زیستی را بررسی کردند. نتایج نشان داد که منبع پروتئینی سویا و ماهی بیش‌ترین تاثیر در تولید آراشیدونیک اسید داشته است. در پژوهشی که توسط راکی[5] و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۱۱) بر روی گونه قارچی *Mortierella alpina* انجام شد، تأثیر عواملی مانند نوع منبع کربنی (گلوکز و گالاکتوز)، نوع منبع نیتروژنی (پپتون و عصاره مخمر) و مدت زمان تخمیر بر روی تولید آراشیدونیک اسید بررسی شد و نتایج نشان داد که گلوکز، عصاره مخمر و مدت زمان تخمیر باعث افزایش آراشیدونیک اسید

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود. همچنین، پژوهش‌های مشابه دیگری در سایر میکروارگانیسم‌ها در بهینه‌سازی محیط کشت در جهت افزایش میزان محصول انجام شده است (۱۲)

با توجه به پژوهش‌های اخیر انجام شده چنین به نظر می‌رسد که از مهم‌ترین نکات مورد توجه برای تولید محصول روغنی از گونه‌های قارچی *مورتیرلا آلفینا* شرایط محیط کشت است. از این رو در پژوهش حاضر، از منابع کربنی پیچیده، ارزان و بومی استفاده شد تا از یک سو روند تولید محصول بررسی شود و از سوی دیگر هزینه تولید کاهش یابد. در این پژوهش، تاثیر سه نوع منبع کربنی گلوکز مایع، شکر قهوه‌ای و نشاسته در تولید روغن و آراشیدونیک اسید بررسی شد. همچنین، در این پژوهش از سویا به عنوان منبع پروتئینی استفاده شده است. در نهایت، تغییرات محیط کشت از نظر میزان قند احیا، نیتروژن، تغییرات توده زیستی، روغن و آراشیدونیک اسید در روزهای ۲، ۵، ۷ و ۱۱ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد: در پژوهش حاضر، قارچ *مورتیرلا آلپینا* از مجموعه میکروبی کشور هلند[۶] خریداری شد. نمونه قارچ *مورتیرلا آلپینا* خریداری شده به شکل میسلیوم در لوله آزمایش آگار شیب‌دار[۷] بود که روی محیط کشت مالت آگار در بشقابک[۸] و لوله آزمایش آگار شیب‌دار در درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۷ روز کشت داده شد و تا انجام آزمون، نمونه‌ها در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. همچنین، مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

مایه تلقیح و کشت‌های اصلی: از سوسپانسیون میسلیومی برای تلقیح کشت‌های تولید محصول استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون میسلیومی، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت شامل گلوکز تک آبه[۹] (۳۰ گرم درلیتر) و عصاره مخمر (۱۰ گرم در لیتر) در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری تهیه و در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سترون شد. سپس، میکروارگانیسم تلقیح شده و در درجه حرارت ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت و ۱۷۰ دور بر دقیقه[۱۰] گرمخانه‌گذاری شد. ۳ تا ۱۰درصد از کشت‌های توسعه تلقیح به‌عنوان مایه تلقیح به محیط کشت تولید محصول افزوده شد (۱۳). در محیط کشت تولید محصول از منابع کربنی شربت گلوکز، شکر قهوه‌ای و نشاسته و منبع پروتئینی سویا استفاده شد. شکر قهوه‌ای با استفاده از سولفوریک‌اسید تبدیل به قند احیا شد که میزان قند احیای آن به ۱۷ درصد افزایش یافت. همچنین، میزان پروتئین شکر قهوه‌ای به روش استاندارد اندازه‌گیری شد و یک درصد به‌دست آمد (۱۴). به میزان ۵ درصد نشاسته در محیط کشت مصرف شده و از آنجا که نشاسته قند پلی‌ساکاریدی است که توسط این گونه قارچی قابلیت مصرف ندارد، در روزهای ۲، ۴ و ۷ تخمیر، میزان ۱۲۰ واحد بر میلی لیتر آنزیم آلفا آمیلاز به محیط کشت اضافه شد. با توجه به پژوهش‌های انجام شده توسط زو[۱۱] و همکاران، قند احیا به جز محیط کشت نشاسته در سطح ۷۰ گرم در لیتر و میزان سویا به عنوان منبع پروتئینی در همه محیط کشت‌های در سطح ۱۰ گرم در لیتر تنظیم شد. همچنین، دما (۲۱ درجه سانتی‌گراد)، اسیدیته ۶ و دور همزن (۱۸۵ دور در دقیقه) بود.

اندازه‌گیری وزن خشک توده زیستی: برای جداسازی توده زیستی از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱، بر قیف بوخنر مجهز به پمپ خلا استفاده شد. سپس،

www.SID.ir

Archive of SID

برای اندازه‌گیری وزن خشک سلولی[۱۲] روی شیشه‌های ساعت قرار داده و به مدت ۲ ساعت در آون با درجه حرارت ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند (۱۵).

استخراج روغن: برای استخراج روغن، توده زیستی خشک شده در هاون چینی خرد شد. روغن پودر به دست آمده با حلال نرمال هگزان در دستگاه سوکسله شیشه‌ای Isolab آلمان که با گرم کن مدل EV16 ساخت شرکت Gerhardt آلمان استخراج شد (۱۵).

اندازه گیری اسیدهای چرب: برای تعیین و اندازه‌گیری اسیدهای چرب، با توجه به عدم فراریت اسیدهای چرب باید مشتق‌های متیل استر آن‌ها را تهیه کرد. پس از متیلاسیون نمونه‌های روغن، ۰/۵ میکرولیتر نمونه به دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی (qoa- Gc system78)، ستون HP-5MS (کاپیلاری، طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و قطر فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) و دتکتور[۱۳] مدل Agilent Technology 5975C تزریق شد. گاز استفاده شده هلیوم به خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد با شدت جریان ۱ میلی‌متر در دقیقه استفاده شد. دمای آون از ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با شیب ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و به مدت ۱۰ دقیقه در این دما باقی ماند (۱۶).

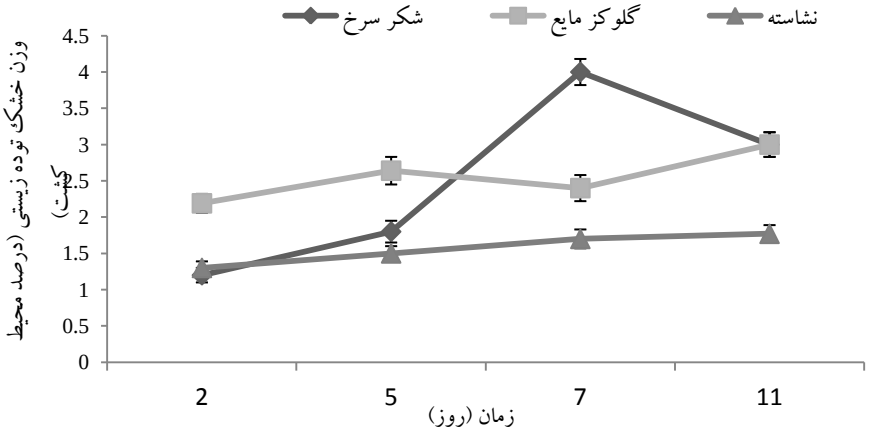
اندازه‌گیری قند احیا به روش DNS[۱۴]: نمونه محیط کشت درروزهای ۲، ۴، ۷ و ۱۱ تخمیر برداشت شده، توده زیستی از محیط کشت با سانتریفوژ کردن در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، از محیط کشت جدا شده و میزان قند محیط کشت به روش DNS اندازه‌گیری شد (۱۷). این طرح به شکل مشاهده‌ای انجام شد و همه آزمایش‌ها در سه تکرار اندازه گیری شد.

نتایج

بررسی میزان تغییرات وزنی توده زیستی در حین فرآیند تخمیر: روند رشد توده زیستی در اثر مواد مغذی محیط کشت و مرحله رشد میکروارگانیسم است (۹، ۱۸، ۱۱ و ۱۲). همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بیشتر میزان توده زیستی در روز هفتم در محیط کشت شکر قهوه‌ای و کم‌ترین میزان توده زیستی در محیط کشت نشاسته به‌دست آمد. با توجه به پژوهش‌های انجام شده (۱۸) پروتئین تأثیر زیادی در افزایش توده زیستی دارد و با در نظر گرفتن این نکته که شکر قهوه‌ای دارای ۱ درصد پروتئین بوده و در عین حال از پروتئین سویا نیز استفاده شده است، احتمالا مخلوط این دو نوع پروتئین اثر زیادی در رشد داشته و رشد ریزسازواره را تقویت کرده است. نشاسته جزو پلی ساکاریدهاست که این ریزسازواره توانایی شکستن این ترکیب را نداشته از این رو از آنزیم آلفا آمیلاز به منظور تولید قند احیا استفاده شد. رشد کم ریزسازواره در این محیط در اثر کم بودن منبع کربنی با قابلیت جذب بالاست. در محیط کشت شربت گلوکز همواره یک روند افزایش توده زیستی مشاهده شد و بیش‌ترین افزایش مربوط به روز هفتم تا یازدهم تخمیر است (شکل ۱).

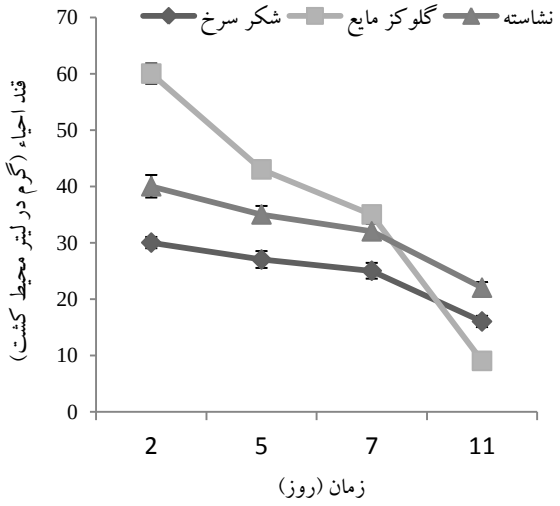
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تغییرات میزان توده زیستی در محیط کشت شکر قهوه ای، شربت گلوکز و نشاسته
نمودارها دارای خطای معیار (SE[۱۵]) در سه تکرار هستند.

مصرف گلوکز در حین فرایند تخمیر: گلوکز به عنوان منبع کربنی از دو لحاظ دارای اهمیت است. اول این‌که، به عنوان منبع انرژی به منظور فعالیت حیاتی میکروارگانیسم ضروری است و دوم، به منظور تبدیل به محصول که در اینجا روغن می‌باشد، ضروری است (۸). همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در محیط کشت محتوی شکر قهوه‌ای و نشاسته، میزان زیادی از قند احیا مصرف نشده باقی مانده است. از آنجا که مصرف شکر قهوه‌ای به منظور تنظیم منبع قند احیا در سطح ۷۰ گرم در لیتر، بالاست، فشار اسمزی محیط کشت افزایش زیادی یافته، در نتیجه توانایی قارچ برای مصرف حداکثری قند احیا کاهش می‌یابد و مقادیر زیادی از قند احیا در محیط کشت بدون استفاده باقی می‌ماند. نتایج به‌دست آمده مشابه پژوهش پاپانیکولو[۱۶] و همکاران (۱۹) است. در محیط کشت شربت گلوکز قند احیا نیز در سطح ۷۰ گرم در لیتر تنظیم شد. روند مصرف قند احیا در روزهای انتهایی تخمیر بالا و همواره کاهش گلوکز با افزایش تجمع روغن همراه بود. نتایج به‌دست آمده مشابه نتایج به‌دست آمده در پژوهش صمدلوئی[۱۷] و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۲۰) است. در محیط کشت گلوکز مایع، مصرف قند احیا گاهی تند و گاهی کند است. از روز ۵ به ۷ مصرف قند احیا کند است و در بقیه روزها، مصرف سوبسترا زیاد است. میزان نشاسته مصرفی در سطح ۵ درصد تنظیم، افزودن آنزیم باعث ایجاد قند احیا در محیط کشت و توسط ریزسازواره مصرف شد. از این رو مصرف گلوکز همواره یک روند ثابتی تا روز ۷ تخمیر داشت.



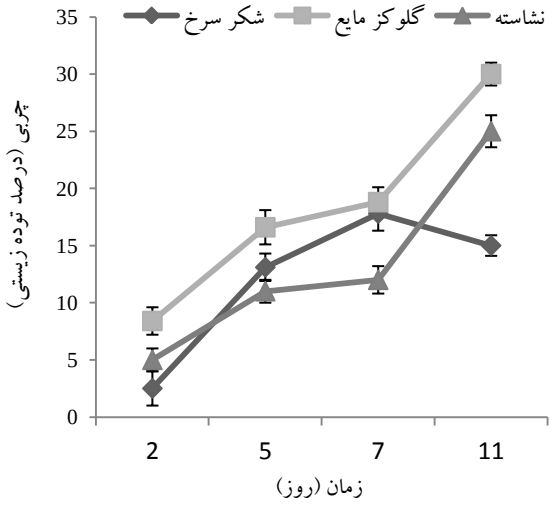
شکل ۲- تغییرات میزان قند احیا در محیط کشت شکر قهوه‌ای، شربت گلوکز و نشاسته. نمودارها دارای خطای معیار (SE) در سه تکرار هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی تغییرات روغن در حین فرآیند تخمیر:

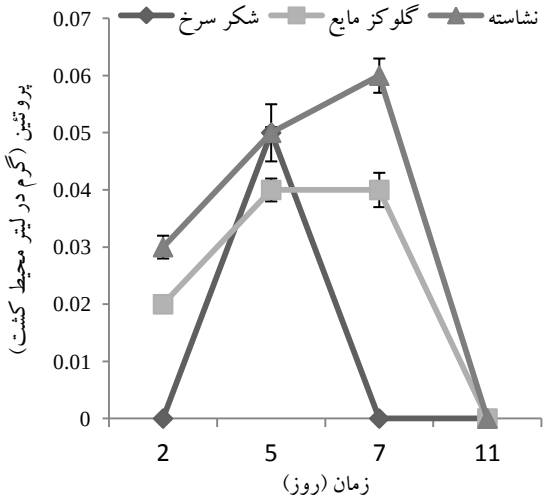
محصول اصلی قارچ مورتیرلا روغن است. در واقع میکروارگانیسم منبع کربنی را به روغن تبدیل می‌کند و در شرایط کاهش مواد مغذی از روغن به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند (۲۱). در محیط کشت شربت گلوکز تجمع روغن به میزان در خور توجهی بالاتر از بقیه محیط‌های کشت است. این افزایش از روز دوم به پنجم و روز هفتم به یازدهم بسیار بالاست. در این شرایط، مصرف قند احیا نیز به میزان زیادی افزایش یافته که نشان دهنده تبدیل گلوکز محیط کشت به روغن ذخیره ای توسط ریزسازواره است. روند افزایش روغن در محیط کشت نشاسته نشان می‌دهد که بیش‌ترین افزایش روغن از روز هفتم به یازدهم است. در محیط کشت شکر قهوه‌ای روند تجمع روغن متفاوت از سایر محیط‌های کشت بود به طوری‌که روغن از روز دوم به هفتم افزایش و سپس، کاهشی پیدا کرد (شکل ۳).



شکل ۳- تغییرات میزان روغن در محیط کشت شکر قهوه‌ای، شربت گلوکز و نشاسته. نمودارها دارای خطای معیار (SE) در سه تکرار هستند.

بررسی تغییرات پروتئین در حین فرآیند تخمیر:

پروتئین از ترکیبات کلیدی و مهم در تولید و رشد ریزسازواره است. از آنجا که همواره روند تولید توده زیستی تحت تأثیر میزان پروتئین است، چنین تحلیل می‌شود که در هر سه محیط، از روز صفر تا دوم تمام منابع نیتروژنی توسط سلول مصرف شده و به میزان زیادی توده زیستی افزایش می‌یابد. در ادامه، گاهی افزایش پروتئین در محیط کشت دیده شده که ناشی از تولید آنزیم‌های خارج سلولی توسط ریزسازواره بوده که به منظور تجزیه ترکیبات پیچیده محیط کشت تولید شده است. نتایج به‌دست آمده مشابه نتایج زان[18] و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۲۲) است. در محیط کشت نشاسته بیش‌ترین افزایش میزان پروتئین دیده شده که نشان دهنده اثر آنزیم افزوده شده درمحیط کشت است (شکل ۴).

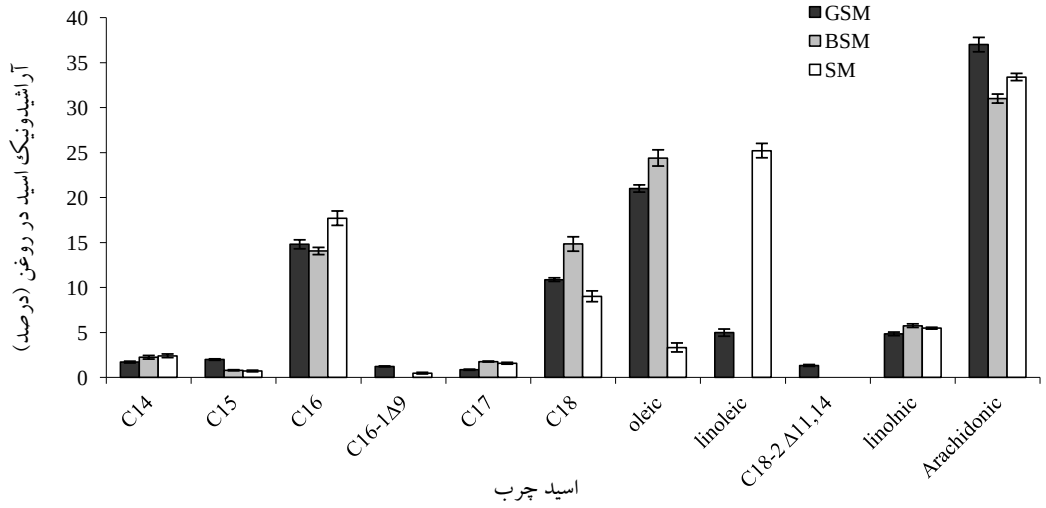


شکل ۴- تغییرات میزان پروتئین در محیط کشت شکر قهوه‌ای، شربت گلوکز و نشاسته. نمودارها دارای خطای معیار (SE) در سه تکرار هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

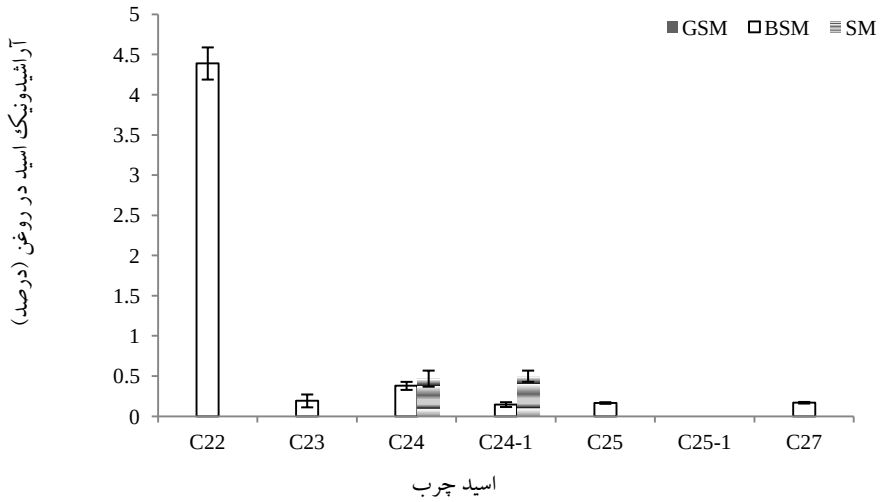
بررسی میزان تولید آراشیدونیک: همان‌طور که در شکل ۵ و ۶ دیده می‌شود اسیدهای چرب تشکیل دهنده روغن *مورتیرلا آلفینا* بسیار متنوع هستند و از ۱ کربنه شروع شده و تا ۲۷ کربنه ادامه دارند. اسیدهای چرب غالب روغن، اولئیک و آراشیدونیک اسید است. همچنین، تنوع اسیدهای چرب بلند زنجیره بسیار زیاد است. همان‌طور که در شکل ۵ و ۶ مشاهده می‌شود اسیدهای چرب تشکیل دهنده روغن هم زوج کربنه و هم فرد کربنه هستند. از آنجا که بیشتر طویل‌سازی به شکل دو کربنه است، سوبسترا آنزیم‌های طویل‌ساز زوج کربنه‌ها ۱۴ کربنه و فرد کربن‌ها ۱۵ کربنه است (۲۳). همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد آنزیم‌های غیر اشباع‌ساز بیشتر بر زوج کربنه‌ها موثر بوده است و اسیدهای چرب فرد کربنه به شکل غالب، اشباع هستند. اسیدهای چرب طویل بالای ۲۲ کربنه در محیط کشت شکر قهوه‌ای وجود دارد (شکل ۶). از آنجا که مطابق شکل ۳، در این محیط کشت در اواخر فرآیند تخمیر، روغن کاهش یافته است، افزایش اسیدهای چرب بلند زنجیره را در این نوع روغن می‌توان ناشی از تجزیه روغن دانست. بنابراین، چنین تحلیل می‌شود که با تجزیه روغن فعالیت آنزیم‌های طویل‌ساز که باعث شده طول زنجیره اسید چرب به بالای ۲۰ کربنه افزایش یابد، فعال شود. پروفایل اسیدهای چرب نشان می‌دهد که بهترین محیط کشت برای تولید آراشیدونیک اسید محیط کشت شربت گلوکز (۳۷ درصد آراشیدونیک اسید در روغن) است. کم‌ترین میزان اسید چرب آراشیدونیک اسید محیط کشت کربنه شکر قهوه‌ای بود که به ۳۱ درصد آراشیدونیک اسید در روغن کاهش یافته است. با توجه به این نکته که روغن در اواخر فرآیند تخمیر کاهش یافته، نتایج این پژوهش نشان داد که با کاهش میزان روغن اسید چرب آراشیدونیک اسید به سایر اسیدهای چرب بلند زنجیره تبدیل شده است.



شکل ۵- پروفایل اسیدهای چرب تشکیل دهنده روغن *مورتیرلا آلفینا*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- پروفایل اسیدهای چرب بالای ۲۰ کربنه تشکیل دهنده روغن *مورتیرلا آلفینا*

بحث و نتیجه‌گیری

در محیط کشت شکر قهوه‌ای از روز صفر تا دوم میزان توده زیستی افزایش یافته در حالی که تجمع روغن اندک بود. در این شرایط، با مصرف مقادیر زیادی از قند احیا ۴۰ گرم در لیتر و پروتئین ۶ گرم در لیتر، ۱/۲ درصد محیط کشت توده زیستی و ۲/۵ درصد توده زیستی روغن تولید شده است. با توجه به مصرف بسیار بالای سوبسترا و محصول کم تولیدی، چنین تحلیل می‌شود که به علت بالا بودن فشار اسمزی در روزهای اولیه تخمیر به میزان زیادی از سوبسترا صرف تولید انرژی برای سازگاری ریزسازواره شده است. از روز دوم تا پنجم میزان پروتئین محیط کشت اندکی افزایش یافته که نشان دهنده تولید آنزیم‌های خارج سلولی برای تجزیه ترکیبات کمپلکس محیط کشت است. در این دوره زمانی ۰/۶ درصد توده زیستی و ۱۰/۵ درصد از وزن خشک توده زیستی روغن تولید شده و در واقع ۶ گرم در لیتر محصول به ازای مصرف ۳ گرم در لیتر قند احیا تولید شده است. از این رو چنین تحلیل می‌شود که سوبسترای لازم برای تولید محصول از سایر منابع قندی پیچیده محیط کشت تامین شده است. این منابع می‌تواند ترکیبات قندی سویا و قندهای غیر احیا شکر قهوه‌ای باشد. از روز ۵ تا ۷ دوباره پروتئین خارج سلولی کاهش یافته که نشان دهنده مصرف این پروتئین توسط سلول است. در این شرایط تجمع روغن ۰/۱ درصد توده زیستی افزایش یافته در حالی که تولید توده زیستی تا ۲/۲ درصد محیط کشت افزایش یافته است. با در نظر گرفتن این‌که ۲۲ گرم در لیتر توده زیستی و روغن تولید و از آنجا که ۲/۵ گرم در لیتر سوبسترا مصرف شده چنین تحلیل می‌شود که سلول همچنان در حال تجزیه ترکیبات پیچیده محیط کشت بوده و ترکیبات ناشی از این تجزیه را صرف افزایش وزن خشک کرده است. روند افزایش توده زیستی و تولید روغن در محیط کشت شکر قهوه‌ای کاملا متفاوت با سایر منابع قندی با قابلیت جذب و مصرف بالاست که می‌تواند ناشی از فشار بالای اسمزی محیط کشت اولیه و همچنین، درصد بالای قندهای غیر احیا (۸۰ درصد شکر قهوه ای) باشد. در این محیط کشت با وجود مقادیر زیادی از قند احیا، روغن ذخیره‌ای توسط ریزسازواره مصرف شده که با توجه به

www.SID.ir

Archive of SID

تحقیقات هودس ورث[۱۹] و همکاران در سال ۱۹۸۸ (۲۴) می‌تواند ناشی از فعالیت آنزیم ایزوسیترات لیاز باشد. این آنزیم بیشتر در محیط‌های کشت که منبع کربنی روغن است و یا در شرایطی که گلوکز در محیط کشت تخلیه شده، فعال می‌شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، احتمالا فشار بالای اسمزی در روزهای اولیه تخمیر نیز می‌تواند این آنزیم را تحریک کرده و در شرایطی که قند احیا در محیط کشت وجود داشته و می‌تواند توسط میکروارگانیسم مصرف شود، احتمالا در اثر فعالیت این آنزیم، روغن ذخیره ای توسط سلول مصرف می‌شود.

در محیط کشت شربت گلوکز تا روز ۲ به میزان ۲/۲ درصد محیط کشت توده زیستی و ۸/۴ درصد وزن خشک توده زیستی روغن تولید شد. در این شرایط کاهش کم گلوکز، به میزان ۱۰ گرم در لیتر، و مصرف پروتئین بسیار بالا بوده و تمامی منبع پروتئینی مصرف شد. از روز دوم تا پنجم میزان تولید روغن تقریبا ۲ برابر و توده زیستی به کندی افزایش یافته است در این شرایط گلوکز به میزان زیادی مصرف شده و پروتئین محیط کشت به میزان اندکی افزایش یافته که نشان دهنده تولید آنزیم‌های خارج سلولی است. نتایج نشان داد که میزان توده زیستی ۰/۵ درصد افزایش یافته و حدود ۸ درصد روغن توده زیستی افزایش یافته است. نتایج به‌دست آمده مشابه نتایج راتلج[۲۰] در سال ۱۹۹۷ (۲۵) است. ایشان گزارش کردند در شرایطی که پروتئین در محیط کشت تخلیه شود تولید روغن تحریک می‌شود.

با توجه به متفاوت بودن دو محیط کشت از نظر میزان قندهای غیر احیا و ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت، مشاهده می‌شود که الگوی رشد و تولید روغن در این دو محیط کاملا با هم متفاوت است. در محیط کشت شکر قهوه‌ای و گلوکز مایع از روزهای دوم به پنجم مصرف قند احیا بالا سپس، از روز پنجم به هفتم کاهش می‌یابد. در روزهای اولیه تخمیر در شرایط محیط کشت شربت گلوکز میزان تولید روغن و توده زیستی بالاست در حالی‌که در محیط کشت شکر قهوه‌ای، تولید توده زیستی و تولید روغن بسیار پایین است. با توجه به نتایج چنین تحلیل می‌شود که در محیط کشت شکر قهوه‌ای، بالا بودن فشار اسمزی باعث شده میزان زیادی از سوبسترا، صرف تولید انرژی برای ایجاد مقاومت در سلول نسبت به شرایط بد محیط کشت شود. در حالی‌که در محیط کشت شربت گلوکز شرایط برای رشد میکروارگانیسم مناسب است. مصرف قند احیا در محیط کشت شکر قهوه‌ای بسیار بالاتر از محیط کشت شربت گلوکز است که می‌تواند ناشی از اهمیت گلوکز در تأمین انرژی برای سلول باشد. در محیط کشت شکر قهوه‌ای از روز دوم به بعد روند کاهش گلوکز کند شده است در حالی‌که در محیط کشت شربت گلوکز گاهی این روند تند و گاهی کند شده و در شرایطی که مصرف گلوکز بالاست تولید روغن نیز افزایش یافت.

نتایج به‌دست آمده از تحلیل اسیدهای چرب نشان می‌دهد در شرایطی که منبع کربنی نشاسته بود و از آنزیم آلفا آمیلاز به عنوان عامل ایجاد کننده قند احیا استفاده شد، تولید لینولئیک اسید به میزان زیادی افزایش یافته که کمابیش ۶ برابر محیط کشت شربت گلوکز بود و این اسید چرب در روغن تولیدی از منبع کربنی شکر قهوه‌ای تولید نشده است. وارد[۲۱] در سال ۲۰۰۵ (۲۶) گزارش کرد که استئاریک و اولئیک‌اسید از اسیدهای چرب غالب دیواره سلولی ریزسازواره‌هاست. با توجه به نتایج پژوهش ایشان، چنین تحلیل می‌شود که بالا بودن این دو اسید چرب در روغن که از محیط کشت شکر

www.SID.ir

Archive of SID

قهوه‌ای به‌دست آمده و بالاتر بودن میزان توده زیستی این محیط کشت نسبت به بقیه تیمارها این فرضیه را تقویت کرده که رشد ریزسازواره نقش زیادی در پروفایل اسیدهای چرب روغن دارد. این دو اسید چرب در محیط کشت نشاسته به میزان در خور توجهی پایین است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده چنین تحلیل می‌شود که محیط‌های کشت ارزان قیمتی مانند شربت گلوکز و شکر قهوه‌ای می‌تواند به عنوان منابع کربنی بالقوه در تولید روغن از گونه *مورتیرلا آلفینا* باشد. با در نظر گرفتن میزان آراشیدونیک اسید تولید شده در محیط‌های کشت پیچیده بررسی شده در پژوهش حاضر، منبع کربنی شربت گلوکز می‌تواند محیط کشت مناسبی برای تولید روغن با میزان زیادی آراشیدونیک اسید در نظر گرفته شود. با توجه به اهمیت تولید روغن از گونه قارچی *مورتیرلا آلفینا* چنین پیشنهاد می‌شود که منابع کربنی پیچیده دیگری که به عنوان ضایعات در صنایع وابسته به مواد غذایی سالیانه به میزان زیادی هدر می‌رود، در فرآیند تخمیر تبدیل به روغن با ارزش این گونه قارچی شود.

References

(1) Innis SM. Essential fatty acids in growth and development. *Progress in Lipid Research* 1991; 30 (1): 39- 103

(2) Seyberth H W., Kuhl PG. The role of eicosanoids in paediatrics. *European Journal of Pediatrics* 1988: 147 (4): 341- 49.

(3) Certik M., Shimizu S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience* and *Bioengineering* 1999: 87 (1): 1- 14.

(4) Dyal SD., Narine SS. Implications for the use *of Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Research International* 2005: 38 (4): 445- 67.

(5) Yuan C., Wang J., Shang Y., Gong G., Yao J., Yu Z. Production of arachidonic acid by Mortierella alpina I49-N18. *Food Technology and Biotechnology* 2002: 40 (4): 311- 15.

(6) Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochemistry*. 2004: 86: 807- 15.

(7) Jang HD., Lin YY., Yang S S. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. *Bioresource Technology* 2005: 96 (15): 1633- 44.

(8) Zhu M., Yu LJ., Li W., Zhou PP., Li CY. Optimization of arachidonic acid production by fed-batch culture of *Mortierella alpina* based on dynamic analysis. *Enzyme* and *Microbial Technology*. 2006: 38 (6): 735- 40.

(9) Wynn JP., Hamid AA., Li Y., Ratledge C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology* 2001: 147 (10): 2857- 64.

(10) Park EY., Koike Y., Cai HJ., Higashiyama K., Fujikawa S. Morphological diversity of *Mortierella alpina*: effect of consumed carbon to nitrogen ratio in flask culture. *Biotechnology* and *Bioprocess Engineering* 2001: 6 (3): 161- 6.

(11) Rocky-Salimi K., Hamidi-Esfahani Z., Abbasi., S. Statistical optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* CBS 754. 68 in submerged fermentation. *Iranian Journal of Biotechnology* 2011: 9: 12- 15.

www.SID.ir

Archive of SID

(12) Aminzade S., Farrokhi N. Product optimization, purification and characterization of a novel polygalacturonase produced by Macrophomina phaseolina. *Biological Journal of Microorganism* 2013: 1 (4): 21-34

(13) Jang HD., Lin YY., Yang SS. Effect of culture medium and condition on polyunsaturated fatty acid production by *Mortierella alpine. Bioresource Technology* 2005: 96 (15): 1633- 44.

(14) Lowry OH., Rosebrough N J., Farr AL., Randall R J. Protein measurement with the folin–phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry* 1951: 193 (1): 265- 75.

(15) Folch J., Lees M., Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 1957: 226 (1): 497- 509.

(16) Metcalfe LD., Schmitz AA., Pelka J R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry* 1996: 38 (3): 514- 15.

(17) Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959: 31 (3): 426- 8.

(18) Wynn JP., Ratledge C. Evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpina* is at the level of the 18:3 to 20:3 elongase. *Microbiology* 2000: 146 (9): 2325- 31.

(19) Papanikolaou S., Sarantou S., Komaitis M., Aggelis G. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal* of *Applied Microbiology* 2004: 97 (4): 867- 75.

(20) Samadlouie H R., Hamidi- Esfahani Z., Alavi SM., Soltani-Najafabadi M., Sahari MA., Abbasi S. Statistical approach to optimization of fermentative production of oil and arachidonic acid from *Mortierella alpine* CBS 754. 68. *African journal of microbiology research* 2012: 6 (7): 1559-67.

(21) Hou CT., Production of arachidonic acid and dihomo-gama-linolenic acid from glycerol by oil-producing filamentous fungi, *Mortierella* in ARS Culture Collection. *Journal of Industrial Microbiology* 2008: 35 (6): 501- 6.

(22) Zhan J., Lin H., Shen Q., Zhou Q., Zhao Y. Potential utilization of waste sweetpotato vines hydrolysate as a new source for single cell oils production by Trichosporon fermentans. *Bioresource Technology* 2013 (4): 135:622- 9

(23) Leonarda A E., Pereiraa S L., Sprecherb H., Huang Y S. Elongation of long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research* 2004: 43 (1): 36- 54.

(24) Holdsworth J E., Veenhuis M., Ratledge C. Enzyme activities in oleaginous yeasts accumulating and utilizing exogenous or endogenous lipids. *Journal of General Microbiology* 1988: 134 (11): 2907- 15.

(25) Ratledge C. Biotechnology. In: Rehm HJ., Reed G., Puhler A., Stadler P., editors. Microbial lipids. 2nd ed. Weinheim, Germany: VCH; 1997. p 133- 97.

(26) Ward OP., Singh A. Omega-3/6 fatty acid: alternative sources of production. *Process Biochemistry* 2005: 40 (12): 3627-52.

[1]- Lipoprotein
[2]- Placket
[3]- Wynn
[4]- Park
[5]- Rocky
[6]- Centraalbureau voor Schimmelcultures
[7]- Slant agar
[8]- Petri dish
[9]- Glucose monohydrate
[10]- Revolution per minute (rpm)
[11]- Zhu
[12]- Dry cell weight (DCW)
[13]- Mass Selective Detector (MSD)
[14]- Dinitrosalicylic acid
[15]- Standard error
[16]- Papanikolaou
[17]- Samadlouie
[18]- Zhan
[19]- Holdsworth
[20]- Ratledge
[21]- Ward

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

Investigation of the effect of glucose syrup and brown sugar as low-cost substrate for lipid production by *Mortierella alpine* CBS 754.68

Saed Montazeri
M.Sc. of Food science and technology, Ayatollah amol branch, Islamic azad unvirsity, Amol, Iran, hr_samadloiy@yahoo.com
Hamid Reza Samadlouie *
Assistant professor of Food science and technology, Shahrood university of technology, Iran, hsamadlouie@yahoo.com
Hami Kaboosi
Assistant Professor of Microbiology, Ayatollah amol branch, Islamic azad unvirsity, Amol, Iran, hkaboosi@gmail.com

Abstract

Introduction: Arachidonic acid is an important essential fatty acid in human nutrition. The filamentous fungus *Mortierella alpina* has been identified as a promising producer of arachidonic acid. *Mortierella alpine* can accumulate up to 40% (w/w) lipid, of which up to 40% can be arachidonic acid.

Materials and methods: *Mortierella alpina* CBS 754.68 was cultivated in low cost substrate such as glucose syrup, brown sugar and starch for lipid and arachidonic acid production**.** The reduced sugar, total lipids and content of ARA were determined by dinitrosalicylic acid method, soxhlet and Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) respectively.

Results: The carbon sources were applied at 70 g/l and nitrogen source (soybean powder) at 10 g/lit. The results showed that lipid in dry biomass in glucose syrup, starch and brown sugar media were obtained 32, 25 and 13 % w/w respectively. The arachidonic acid contents of lipid in the glucose syrup, starch and brown sugar media were 41, 33 and 31 % w/w respectively.

Discussion and conclusion: Lipid fatty acid compositions are affected by the growth of microorganism. Cell membrane fatty acids such as stearic acid and oleic acid increased substantially concomitant with increases in the amount of biomass. Biomass and oil production efficiency fell due to inappropriate brown sugar medium.

Key words: *Mortierella alpine,* Arachidonic acid, Lipid, Media

* Corresponding author
Received: July 7, 2014 / **Accepted:** February 18, 2015

www.SID.ir