بهینه سازی تولید میکروبی اسیدهای چرب ضروری تولید شده توسط موکور روکسی با استفاده از پسماندهای روغنی

مریم السادات میرباقری[1] ، ایرج نحوی[2*]، داوود بی ریا[3]

١- دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان.
٢- استاد گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان.
٣- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان.
(تاریخ دریافت: ٩٣/٧/٥ تاریخ پذیرش: ٩٣/١٢/٢)

چکیده

اسید های چرب ضروری شامل خانواده امگا (٣و ٦) به وسیله انسان سنتز نمی شوند، بنابر این ضروری اند تا از طریق منابع غذایی تامین شوند. این نوع اسید های چرب، پیش ساز انواع پروستاگلاندین ها و لوکوترین هامی‌باشند و نقش مهمی در درمان انواع بیماری ها ایفا می کنند. گاما لینولنیک اسید (GLA) از مهمترین اسید های چرب امگا ٦است که در درمان بسیاری از بیماری‌های قلبی و عروقی و سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. سویه های قارچی مخصوصا زیگومایست‌ها از بهترین تولید کنندگان لیپیدهای با ارزش حاوی اسیدهای چرب ضروری به شمار می‌روند. هدف از انجام این پژوهش آزمایشگاهی، استفاده از پسماندهای روغنی به عنوان یک منبع ارزان قیمت و قابل تجدید در تولید اسیدهای چرب ضروری توسط سویه زیگومایست موکور روکسیDSM1194 بود. ٥ پسماند روغنی مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان تولید لیپید، وزن خشک بیومس ، اسیدهای چرب ضروریGLA، لینولئات از انواع امگا٦ وآلفالینولنات از انواع امگا٣ بررسی شد. از آنجا که میزان تولید GLAتوسط این قارچ قابل توجه بود با استفاده از روش طرح آزمایشات به روش عاملی جزیی١/٢ و سپس پاسخ سطح بهینه سازی تولید آن صورت گرفت. عصاره مخمر، سولفات آمونیوم و غلظت منبع کربن، از مهمترین فاکتورهای موثر در تولید GLA بود که تداخل این عوامل نیز با استفاده از روش طرح مرکب مرکزی(CCD) به روش پاسخ سطح (RSM) ارزیابی شد. نتایج نشان داد بهترین شرایط تولید لیپید و اسیدهای چرب ضروری در زمان ٧٢ ساعت و دمای ٢٨ درجه در پسماند روغنی به دست آمده از رستوران (R1) صورت گرفت و میزان GLA بااعمال شرایط بهینه از٥٦,٤ به٨٢/٢٣ میلی گرم بر لیتر افزایش یافت. در ضمن منبع کربن و منابع نیتروژن مورد استفاده اثر متقابل معناداری در سطح ٥ درصد داشتند در حالی‌که دو منبع عصاره مخمر و سولفات آمونیوم نسبت به هم اثر تداخلی نشان ندادند.

کلید واژگان: اسیدهای چرب ضروری، پسماند روغنی، موکور روکسی، گامالینولنیک اسید

* مسئول مکاتبات:i.nahvi@sci.ui.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

اسیدهای چرب ضروری شامل انواع امگا۳ و ٦ می‌باشند، که برای رشد مناسب انسان ضروری اند ولی در بدن تولید نمی‌شوند و باید از منابع غذایی به دست آیند. نقش گاما لینولنیک اسید از انواع امگا ٦در درمان بیماری‌های دیابت، سرطان، روماتوئید آرتریت، تنگی عروق و فشار خون به اثبات رسیده است. (٤-١). انواع امگا۳ از الفا لینولنات به دست می‌آید که شامل ایکوزاپنتاانوییک اسید(EPA) و دوکوزا هگزاانوییک اسید(DHA) است و نقش مهمی در بهبود بیماری‌های قلبی-عروقی دارند. آراشیدونیک اسید اصلی‌ترین امگا ٦ مغز است و همراه با DHA در توسعه مغز کودکان اهمیت دارد(٦و٥).انواع گیاهان مخصوصا دانه‌های روغنی و ماهی از منابع تولید اسیدهای چرب ضروری‌اند اما امروزه میکروارگانیسم‌های تولید کننده روغن شامل انواع باکتریها و مخمرها، جلبکها و قارچ‌ها به عنوان منابع با ارزش تولید لیپید میکروبی در تولید Single cell oil(SCO)، بیودیزل و اسیدهای چرب ضروری مورد استفاده قرار می‌گیرند. از مزیت‌های مهم تولید لیپید میکروبی می‌توان به عرضه ثابت در سراسر سال به دلیل عدم تأثیر شرایط آب و هوایی، رشد سریع میکروارگانیسم‌ها، سوبسترای ارزان، محتوای لیپید با ارزش و تولید لیپید تغلیظ شده و با کیفیت کنترل شده برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی اشاره کرد. قارچها به خصوص خانواده زیگومایست ها تولید کننده لیپیدهای میکروبی با درصد بالایی از اسید های چرب غیر اشباع هستند که آنها را در هیف‌های خود ذخیره می‌نمایند. سویه های کانینگاملا[1]، موکور[2]، مورتیرلا[3] و ریزوپوس[4] در جهت تولید اسیدهای چرب ضروری به خصوص GLA مورد استفاده قرار گرفته‌اند(١٢-٧).

درتولید صنعتی فراورده‌های میکروبی استفاده از منابع کربنی ارزان قیمت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و مطالعات فراوانی برای کاهش هزینه تولید لیپیدهای میکروبی با استفاده از ملاس، آب پنیر، ضایعات کشاورزی، پساب روغن زیتون و ضایعات میوه صورت گرفته است. در تولید امگا۳ و ٦ توسط قارچها میزان هوادهی بالا، pH اولیه، مرفولوژی قارچ و نوع محیط کشت از اهمیت خاصی برخوردار است(١٦-١٣). استفاده از پسماندهای غذایی و روغن‌های به جامانده از صنایع روغنی و کارخانجات تولید روغن به عنوان منابع کربنی با ارزش در این تحقیق مورد توجه قرار گرفت. ٥ نوع پسماند روغنی جمع آوری شد و در تولید اسیدهای چرب ضروری توسط قارچ موکور روکسی به کار برده شد. بهینه سازی تولید اسیدهای چرب گامالینولنات و آلفالینولنات با استفاده از روشهای فرکشنال و پاسخ سطح صورت گرفت و یک محیط کشت بهینه طراحی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- میکروارگانیسم و شرایط محیط کشت

سویه قارچی ، *Mucor rouxii* DSM 1194، از کلکسیون میکروبی DSM آلمان خریداری شد.و جهت تولید اسپور بر روی محیط Potato dextrose agar به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه کشت داده شدند و پس از شمارش تعداد^{۷}۱×۱۰ اسپورتوسط لام توما داخل محیط تولید، تلقیح شد. محیط کشت تولید پایه شامل KH_2PO_4 ۷ گرم بر لیتر، Na_2HPO_4 ۲/۵ گرم بر لیتر ،$MgSO_4$ ۱/۵ گرم بر لیتر ، $CaCl_2$ ۰/۲ گرم بر لیتر ، $FeCl_3$ ۰/۲ گرم بر لیتر ، $ZnSO_4$ ۰/۰۲ گرم بر لیتر ، $MnSO_4$۰/۰٦ گرم بر لیتر ، $(NH_4)2SO_4$ ۰/۵ گرم بر لیترو ۰/۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر بود و ۲ در صد پسماند روغنی به عنوان منبع کربن اضافه شد. محیط کشت تولید به میزان ۵۰ میلی لیتر در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری تهیه و پس از تلقیح در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و دور ۱۸۰ rpm قرار داده شدند(۱۷). پسماندهای روغنی شامل F2 , F1 پساب روغنی کارخانه شیلان کیش اصفهان، F3پسماند روغنی کارخانه ناز اصفهان، R1,2 پسماندهای روغنی رستوران ها و فست فودهای سطح شهر اصفهان بود.

1. Cunninghamella
2. Mucor
3. Moriterella
4. Rhizopus

Archive of SID
www.SID.ir

٢-٢- اندازه گیری وزن خشک

بیومس به دست آمده پس از ٧٢ ساعت از طریق کاغذ واتمن شماره ١ جداسازی شد. چندین بار شستشو با آب مقطر و سپس الکل جهت خارج شدن روغن و موادباقیمانده از اطراف هیف‌ها انجام پذیرفت و پس از آن در دمای ١٠٥ درجه سانتیگراد به مدت ٤٨ ساعت قرار داده شد و سپس وزن خشک نمونه ها محاسبه شد(١٧).

٢-٣- استخراج لیپید

بر اساس روش اصلاح شده Bligh&Dyer انجام پذیرفت بدین ترتیب که پس از جداسازی سلول‌ها و شستشو، به هر نمونه میزان ١٠ میلی لیتر HCl ٤ مولاراضافه شد و در دمای ٦٠ درجه سانتیگراد به مدت ١ تا ٢ ساعت قرار گرفت. پس از هیدرولیز اسیدی، ٢٠ میلی لیتر محلول کلروفرم:متانول به نسبت ١:١ به هر نمونه اضافه شد و در دمای محیط به مدت ٢ تا ٣ ساعت شیک شدند. با سانتریفیوژ با دور g ٢٠٠٠ به مدت ٥ دقیقه فازها از هم جدا شدند. با پیپت پاستور لایه زیرین که شامل لیپید محلول در کلروفرم بود جدا شده و پس از تبخیر لیپید حاصله وزن شد. بازده تولید لیپید بر حسب گرم لیپید بر گرم وزن خشک محاسبه شد (١٨و١٣).

٢-٤- آنالیز اسید چرب

ابتدا اسیدهای چرب موجود در لیپید متیل استره شدند بدین ترتیب که به ٥٠ میلی گرم از نمونه لیپید میزان ١ میلی‌لیتر تولوئن و ٢ میلی‌لیتر از محلول ١٪ سولفوریک اسید در متانول اضافه شده و نمونه ها یک شب در دمای ٥٠ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس ٥ میلی‌لیتر از NaCl٥٪ و ٥ میلی لیتر n- هگزان اضافه شد. نمونه ها خوب به هم زده شده و فاز رویی جدا گردید. شستشوی فاز رویی با بی کربنات پتاسیم انجام شده و سپس در مجاورت سولفات سدیم بدون آب، آبگیری شد. اسیدهای چرب متیل استر به دستگاه گاز کروماتوگرافی جهت آنالیز نهایی تزریق شدند.

٢-٥- شناسایی ترکیب اسیدهای چرب

شناسایی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) مدل ١٩٠٩١J-٤١٣ از شرکت Agilent آمریکا مجهز به آشکارساز FID صورت گرفت و از نیتروژن به عنوان گاز حامل استفاده شد. ستون دستگاه از نوع HP-5 (طول ستون٣٠ متر، قطر داخلی ٠/٢٥ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن آن ٠/٢٥ میکرومتر) بود. از دمای ثابت ٢٦٠°C برای ستون و فشار گاز psi ٦/١٢ در محل خروجی سیلندر برای گاز حامل، استفاده شد. مقدار ١ میکرولیتر از نمونه به دستگاه تزریق گردید، زمان‌های خروج اسیدهای چرب از ستون مشخص شد و نمودار آن توسط دستگاه رسم شد. با مقایسه این زمان ها با زمان خروج اسیدهای چرب استاندارد، تک تک اسیدهای چرب نمونه مشخص شدند. استاندارد های اسید چرب به صورت متیل استره و جداگانه از شرکت سیگما آمریکا تهیه شد و تعیین غلظت هر اسید چرب با مقایسه با نمودار استاندارد به دست آمد لازم به ذکر است نمودار استاندارد با روش وزنی- وزنی در هر مورد با R^2 بالای ٠/٩٩٩ رسم شد[١٩].

٢-٦- بهینه سازی تولید اسیدهای چرب و لیپید با استفاده از روشهای طراحی آزمایش و آنالیز آماری

به منظور انتخاب متغیرهای موثر بر تولید، متغیرهای مستقل از جمله منبع کربن(پسماند روغنی)، نیتروژن آلی(عصاره مخمر) نیتروژن معدنی(سولفات آمونیوم)، pH و میزان تلقیح اولیه با استفاده از روش طراحی عامل جزئی١/٢ با ٣ تکرار در نقطه مرکزی مطالعه شد. این متغیرها در دو سطح بالا(١+) و پایین(١-) مورد بررسی قرار گرفتند. برای این کار ٤٨ آزمایش طراحی شد. بعد از طراحی فرکشنال فاکتورهای موثر در تولید شناسایی شد سپس با روش پاسخ سطح غلظت های بهینه سه فاکتور مستقل منبع کربن(A)، عصاره مخمر(B)و سولفات آمونیوم(C) و پاسخهای وابسته شامل لیپید کل، وزن خشک، GLA وآلفا

Archive of SID

www.SID.ir

لینولنیک اسید(ALA) ولینولئات مطالعه شدند. طراحی آزمایشات با روش CCD در جدول ۲ خلاصه شده است. آنالیز داده ها با نرم افزارهای Minitab V16 و Design expert V7 مورد بررسی قرار گرفت (۲۷).

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی تولید لیپید میکروبی و اسیدهای چرب ضروری

نتایج بررسی تولید لیپید نشان داد که R1 مناسب ترین سوبسترا در تولید اسیدهای چرب ضروری توسط موکور روکسی بعد از ۷۲ ساعت رشد در ۲۸ درجه سانتیگراد می‌باشد. علاوه بر آن GLA و لینولئات از انواع امگا ٦ و لینولنات و DHA از مهمترین اسید چرب های ضروری تولید شده توسط این قارچ تشخیص داده شدند. جدول۱مقایسه تولید لیپید، وزن خشک، بازده تولید (وزن خشک/لیپید) و اسیدهای چرب ضروری شاخص را در انواع پسماندهای مورد مطالعه نشان می‌دهد.

این تحقیق مشخص نمود که پسماند روغنهای غذایی منبع با ارزشی جهت تولید اسیدهای چرب ضروری به خصوص GLA توسط موکور روکسی است بنابر این بیشترین بهینه سازی بر روی تولید این اسید چرب متمرکز شد.

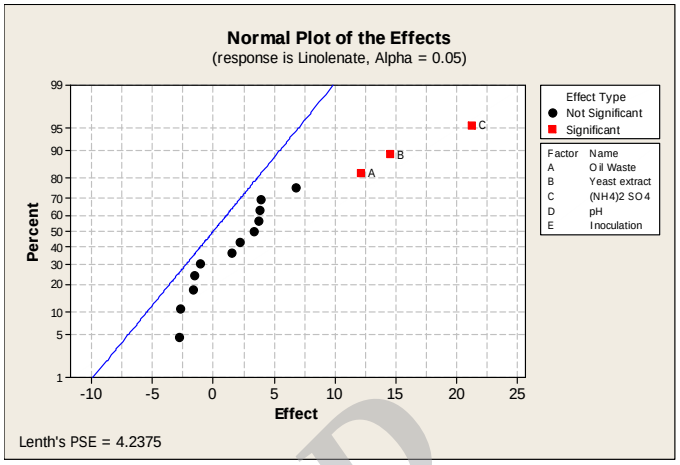
جدول ۱: مقایسه تولید لیپید($g.g^{-1}$)، بیومس($g.l^{-1}$)، بازده (بیومس/لیپیدw/w)، اسید های چرب ضروری($mg.g^{-1}$)تولید شده توسط *Mucor rouxii* DSM 1194 در محیط‌های شامل پسماندهای روغنی متفاوت (F1,2,3 پسماند کارخانه، R1,2 پسماند رستوران) آزمایش ها در ۳ تکرار با انحراف معیار +_۰/۳ انجام شده است.

پسماند روغنی	وزن خشک بیومس (گرم بر لیتر)	لیپید کل (گرم بر گرم)	بازده (w/w %)	میزان اسیدهای چرب ضروری در لیپید کل(میلی گرم بر گرم)			
				C18:2 لینولئات (n-6)	C18:3 گامالینولنات (GLA) (n-6)	C 18:3 آلفالینولنات (ALA) (n-3)	C22:6 DHA (n-3)
F1	۸/۳	۳/٤۳	٤۱/۳۷	۱۰٤/۲۳	٤۰/۸۵	۲۸/٦	۵/۹۸
F2	۱۱/۸۹	۳/۸۸	۳۲/٦	٤۵/۱۵	۳۷/۳۵	۱٤/۵	-
F3	۹/۱	٤/۳۸	٤۸/۲۲	۹٤/۸	۲۳/۱۳	۳٤/۳	-
R1	۱۰/۱۱	٦/۳٦	٦۳	۱۰۸/۸۵	۵٦/٤	۳۸	٤/٤۳
R2	۹/٦۳	۳/٤۲	۳۵/۵	۷۰/۱۲	٤۲/٤۸	۳۳/۲	۸/۲۳

۳-۲- بهینه سازی

نتایج طرح فرکشنال به صورت۲/۱ فرکشن با ۵ فاکتور مشخص نمود که به ترتیب سه فاکتور عصاره مخمر، سولفات آمونیوم و منبع کربن(پسماند روغنی) دارای بیشترین تاثیر معنادار بر تولیدGLA هستند که این معنادار بودن در نمودارشکل۱ مشخص شده است۰,۰۵. >P-value معنادار بودن آزمایش را نشان می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱ نرمال پلات فاکتورهای موثر در تولید GLA توسط قارچ *Mucor rouxii* DSM 1194 به دست آمده از روش طراحی عامل جزئی

در طی روش پاسخ سطح فاکتورهای مهم به دست آمده از روش فرکشنال بهینه سازی شدند تا درجه اهمیت برهم کنش آن‌ها مشخص شود. جدول ۲ فاکتورها و سطوح آنها را در آزمایش پاسخ سطح با روش CCD نشان می‌دهد. جدول۳ آنالیز واریانس نتایج پاسخ سطح را نشان می‌دهد. ارزش F طرح آزمایش ۷/٤۹بود که این خود نشان دهنده معنی دار بودن مدل است. آنالیز واریانس داده‌های حاصل از پاسخ سطح این مطالعه نشان داد که احتمال خطای این مدل ۱/۵ درصد است. ارزش گذاری P نشان داد که فاکتورهای A، B و C نقش معنی داری در تولید دارند و در بر هم کنش بین آنها A,B و همین طور A,C بر هم کنش معناداری داشتند اما بین B,C برهم کنش معناداری مشاهده نشد.. منبع کربن پسماند روغنی، عصاره مخمر و سولفات آمونیوم به ترتیب سه فاکتور A، B و C هستند.

جدول ۲ نوع طراحی آزمایش با روش سطح پاسخ نقطه مرکزی(CCD)

شماره آزمایش	پسماند روغنی A	عصاره مخمر B	سولفات آمونیومC
۱	٤	۰۰/۵۵	۰/۵۵
۲	٤	۱/۳۱	۰/۵۵
۳	۹/۰۵	۰/۵۵	۰/۵۵
٤	٤	۰/۵۵	۰/۵۵
۵	۷	۱	۱
٦	٤	۰/۵۵	۰/۵۵
۷	٤	۰/۵۵	۰/۵۵
۸	۱	۰/۱	۰/۱
۹	٤	۰/۵۵	۱/۳۱
۱۰	٤	۰/۵۵	-۰/۲۱
۱۱	۷	۰/۱	۰/۱
۱۲	۱	۱	۰/۱
۱۳	۱	۱	۱
۱٤	۱	۰/۱	۱
۱۵	٤	۰/۵۵	۰/۵۵
۱٦	٤	-۰,۲۱	۰/۵۵
۱۷	۷	۱	۰/۱
۱۸	-۱/۰۵	۰/۵۵	۰/۵۵
۱۹	۷	۰/۱	۱

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳ آنالیز واریانس نتایج به دست آمده از آنالیز پاسخ سطح در تولید GLA با استفاده از *Mucur rouxii* DSM 1194

عوامل	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل	۱۶۱۸۸/۶	۹	۱۷۹۸/۰۱	۷/۴۹	۰/۰۰۳۱
Aپسماند روغنی	۲۴۵۶/۰۶	۱	۲۴۵۶/۰۶	۱۰/۲۲	۰/۰۱۰۹
Bعصاره مخمر	۲۱۴۶/۶۷	۱	۲۱۴۶/۶۷	۸/۹۳	۰/۰۱۵۲
Cسولفات آمونیوم	۲۷۰۱/۸۳	۱	۲۷۰۱/۸۳	۱۱/۲۴	۰/۰۰۸۵
AB	۲۰۲۶/۱۳	۱	۲۰۱۶/۱۳	۸/۳۹	۰/۰۱۷۷
AC	۱۳۰۵/۶۱	۱	۱۳۰۵/۶۱	۵/۴۳	۰/۰۴۴۷
BC	۰/۰۲۰	۱	۰/۰۲۰	۰/۳۲۳	۰/۹۹۲
A^2	۲۴۶۱/۲۲	۱	۲۴۶۱/۲۲	۱۰/۲۴	۰/۰۱۰۸
B^2	۳۴۴۹/۰۱	۱	۳۴۴۹/۰۱	۱۴/۳۵	۰/۰۰۴۳
C^2	۱۱۱۶/۰۱	۱	۱۱۱۶/۰۱	۴/۶۴	۰/۰۵۹۵
باقیمانده	۲۴۴۲/۶۱	۹	۲۴۰/۲۹		
Lack of Fit	۲۰۴۳/۰۲	۵	۴۰۸	۱۳/۷۲	۰/۰۱۲۹
خطای خاص	۱۱۹/۱۸	۴	۲۹,۸	۱۱۹/۱۸	
تمام آزمایش	۱۸۳۵۱/۱۸	۱۸			

R^2:۰/۸۸ ; Adj R^2: ۰/۷۶ ; Pred R^2: ۰/۱۱; C.V.%: ۳۲/۵۱

نرم افزار بر اساس داده‌های به دست آمده و روش‌های آماری ریاضی، معادله‌ای را برای مقدار تولید اسید چرب GLA پیشنهاد می‌کند. اعتبار کار آماری معادلات چند جمله‌ای به وسیله تحلیل واریانس است. معادله زیر ارتباط تولید بامقادیر غلظت منابع کربن و نیتروژن را نشان می‌دهد. اثر متقابل این عوامل نیز با ضریب مشخص شده است.

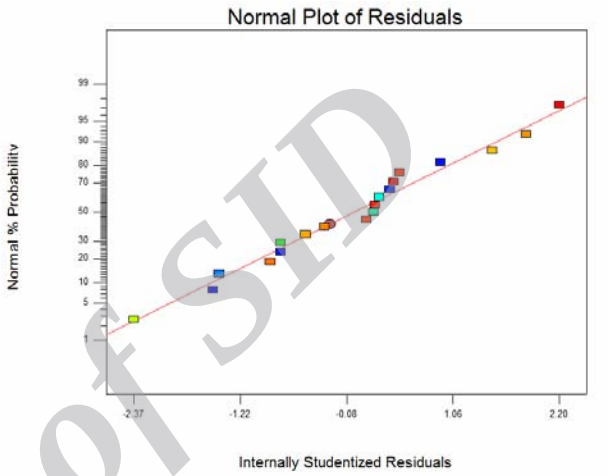
$$GLA = +75.26+13.41A+12.54\ B-14.07C+15.88AB+12.78\ AC-0.050BC-13.43A^2-15.90B^2-9.04C^2$$

منبع کربن و منابع نیتروژن مورد استفاده اثر متقابل معناداری در سطح ۵ درصد داشتند در حالی‌که دو منبع عصاره مخمر و سولفات آمونیوم نسبت به هم اثر تداخلی نشان ندادند.

Archive of SID

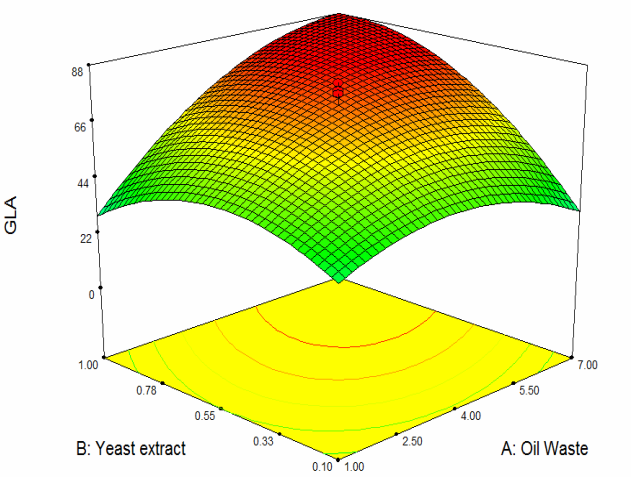
www.SID.ir

یکی از فرضیات کلیدی برای تجزیه و تحلیل آماری این است که داده‌ها به شکل نرمال توزیع شوند نرمال بودن داده‌ها را می‌توان با نمودار احتمال نرمال باقیمانده بررسی نمود. به طور کلی اگر داده‌ها از خط رسم شده در شکل ۲ دور نباشند توزیع به شکل نرمال بوده و داده‌ها به کمترین میزان خطا وارد شده‌اند (۲۹).

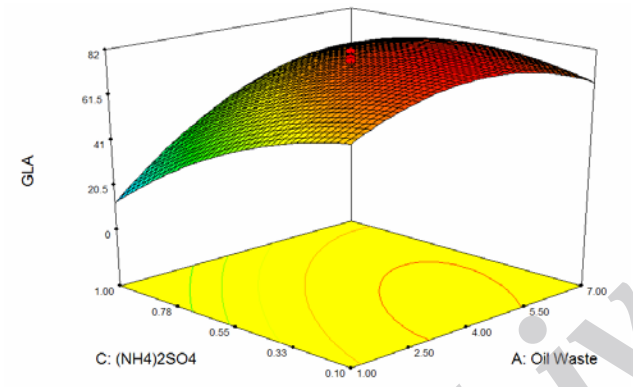


شکل۲ نمودار احتمال نرمال باقیمانده

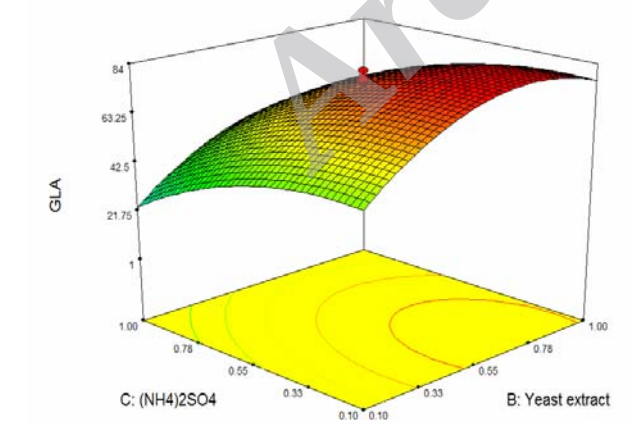
بر اساس تحلیل آماری انجام شده نمودار دو بعدی و سه بعدی برای توصیف اولیه پاسخ که ارتباط دو عامل بررسی شده را نشان می‌دهد.شکل۳ صفحه کانتور و تولید GLA در سطوح مورد مطالعه پسماند روغنی و عصاره مخمر را نشان می‌دهد و شکل ٤صفحه کانتور و تولیدGLA در سطوح مورد مطالعه پسماند روغنی و سولفات آمونیوم را نشان می‌دهد. شکل۵ نیز صفحه کانتور و تولید GLA در سطوح مورد مطالعه عصاره مخمر و سولفات آمونیوم را در قارچ *Mucor rouxii* DSM 1194 را نشان می‌دهد. در این اشکال سه بعدی مقادیر بهینه با شدت رنگ بیشتری نمایان می‌باشند.



شکل۳ صفحه کانتور و رویه تولیدGLA در سطوح متفاوت پسماند روغنی و عصاره مخمر در قارچ *Mucor rouxii* DSM 1194



شکل٤ صفحه کانتور و رویه تولیدGLA در سطوح متفاوت پسماند روغنی و سولفات آمونیوم در قارچ *Mucor rouxii* DSM 1194



شکل۵ صفحه کانتور و رویه تولیدGLA در سطوح متفاوت عصاره مخمر و سولفات آمونیوم در قارچ *Mucor rouxii* DSM 1194

Archive of SID

www.SID.ir

Papanikolaou و همکاران در سال ۲۰۰٤ با استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن از قارچ مورتیرلا آلپینا[1] تولید لیپید با بازده ۵۰٪ و همین محققین در سال ۲۰۰۷ تولید لیپید با استفاده از قارچ کانینگاملا اچی نولاتا را با استفاده از منبع کربن گلوکز[2] با بازده ۳۵٪ گزارش نمودند(۲۰ و ۱۳). همچنین بر طبق گزارشات Ratledge در سال ۲۰۰۵، بازده تولید لیپید در ریزوپوس آرهیزوس[3] ۵۷٪ بود. Mamatha در سال ۲۰۱۰ با بررسی قارچ-های موکور هیمالیس[4] و موکور روکسی[5]، به ترتیب بازده ۲٤/۳۵٪ و ۲۷/۱۲٪ در تولید لیپید را گزارش نمود (۲۱و۲۲). استفاده از پساب روغن زیتون،آب پنیر، روغنهای گیاهی و ضایعات کشاورزی نیز در تولید لیپید میکروبی مورد توجه قرار گرفته است(۱٦-۱۳). در این مطالعه با استفاده از ضایعات و پسماندهای روغنی ارزان قیمت، تولید لیپید میکروبی و اسیدهای چرب ضروری با درصد قابل توجه نسبت به تحقیقات صورت گرفته در این زمینه به دست آمد. نوع منبع کربن و میزان نیتروژن محیط و نسبت C/N محیط کشت در میزان تولید نقش به سزایی داشته و بیشترین تولید لیپید زمانی اتفاق می‌افتد که میزان نیتروژن محیط محدود شود(۲۰و۱۷). در مقادیربالای نیتروژن مهار تولید لیپید و تشکیل اسیدهای چرب مخصوصا GLA اتفاق می‌افتد. این واقعیت توسط Certik و Shimizu در سال ۱۹۹۹ و Ratledg در ۱۹۹٤ تایید شده است(۲٤و۲۳). یافته های حاصل از بهینه سازی در این پژوهش نیز این نکته را به اثبات رساند که تداخل منابع کربن و نیتروژن و نوع منبع نیتروژن نیر تاثیر به سزایی در میزان GLA دارد. استفاده از روش‌های طراحی آزمایش امکان به دست آوردن نتایجی جالب توجه با کمترین زمان و تعداد آزمایش محدود را فراهم می‌سازد. روشCCD در طرح RSM اطلاعات زیادی در مورد داخل متغیرهای مستقل و محدود کردن تعداد آزمایشات خاص مهیا ساخت. در این مقاله به علت بالاتر بودن میزان تولبد گامالینولنیک اسید تنها به پایسخ ها در مورد این متغبر پرداخته شد اما در ضمن طبق پیشگویی و طراحی آزمایش این روش که در جدول٤ آمده است برای تولید مقادیر مختلف لیپید، وزن خشک، GLA، لینولئات و لینولنات ،آزمایشات صورت گرفت و نتایج به دست آمده نزدیک بودن پیشگویی انجام شده با نرم افزار را به واقعیت تایید نمود. نرم افزار مقادیر ۵/۹٤٪برای پسماند روغنی، ۰/۸۵گرم بر لیتربرای عصاره مخمر و۰/۰۳۹ برای سولفات آمونیوم را پیشنهاد نمود و مقادیر پیش بینی شده و واقعی به دست آمده نشان داد این پیش بینی از در مورد GLA۸۷/۲۹ میلی‌گرم بر لیتر بود که طبق آزمایش صورت گرفته مقدار۸۲/۲۳میلی گرم بر لیتر به دست آمد.این نوع طراحی آزمایش به روشRSM به وسیلهAminesh و همکاران (۲۰۰٦)، Mamatha و همکاران (۲۰۰۷)، Shivastava و همکاران(۲۰۰۸)، Ahmed و همکاران (۲۰۰۹)، Rocky-salimi و همکاران (۲۰۱۱) نیز در موزد بهینه سازی اسید های چرب و لیپید میکروبی در قارچ‌های متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است.

1. *Mortierella alpina*
2. glucose
3. *Rhizopus arrhizus*
4. *Mucor hiemalis*
5. *Mucor rouxii*

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ٤ مقادیر بهینه شده و تخمین زده شده توسط نرم افزار در روش RSM

عامل	لیپید(گرم بر لیتر)	وزن خشک(گرم بر لیتر)	GLA(میلی گرم بر لیتر)	لینولئات (میلی گرم بر لیتر)	لینولنات (میلی گرم بر لیتر)
پیش بینی	٤/٦٣	٥/٨	٨٧/٣٩	٨٠/٨٤	–
واقعی	٥/٠١	٥/٣٤	٨٢/٢٣	٨٥/١٢	١٠٨/٧٥

٤- سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از دانشگاه اصفهان در حمایت مالی از این تحقیق و همچنین همکاری صمیمیانه سرکار خانم شیرانی مسئول گازکروماتوگرافی آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه اصفهان نهایت سپاسگزاری را داشته باشند.

٥- منابع

[1] Ratledge C. 1982. Single cell oil. Enzyme Microbial Technol. 4: 58-60.

[2] Kernoff PBA, Willis AL, Stone KJ, Davies JA, McNicol GP. 1977. Antithrombotic potential of dihomo-g-linolenic acid in man. Br Med J. 2: 1441-44.

[3] Vassilopoulos D, Zurier RB, Rossetti RG, Tsokos GC. 1997. γ-linolenic acid and dihomo-g-linolenic acid suppress the CD3-mediated signal transduction pathway in human T cells. Immunol Immunopathol. 83: 237-44.

[4] DeLuca P, Rothman D, Zurier RB. 1995. Marine and botanical lipids as immunomodulatory and therapeutic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am. 21: 759-77.

[5] Rossetti RG, Seiler C.M, DeLuca P, Laposata M, Zurier RB.1997. Oral administration of unsaturated fatty acids: Effects on human peripheral blood T lymphocyte proliferation. J Leukoc Biol.62: 438-43.

[6] Fan YY, Chapkin RS. 1998. Recent advances in nutritional science – Importance of dietary g-linolenic acid in human health and nutrition. J Nutr. 128: 1411-4.

[7] Dines KC, Cameron NE, Cotter MA. 1995. Comparison of the effects of evening primrose oil and triglycerides containing g-linolenic acid on nerve conduction and blood flow in diabetic rats. J Pharmacol Exp Ther. 273: 49-55.

[8] Ahmed SU, Singh KS, Pandey A, Kanjilal S, Prasad RBN. 2006. Effects of various process parameters on the production of g-linolenic acid in submerged fermentation. Food Technol Biotechnol. 44: 283-7.

[9] Jeennor S, Laoteng K, Tanticharoen M, Cheevadhanarak S. 2008. Evaluation of inoculum performance for enhancing gamma-linolenic acid production from *Mucor rouxii*. Lett Appl Microbiol. 46: 421-7.

[10] Tauk-Tornisielo SM, Arasato LS, Almeida AF, Govone JS, Malagutti EN. 2009. Lipid formation and γ-linolenic acid production by Mucor circinelloides and Rhizopus sp., grown on vegetable oil. Braz J Microbiol. 40: 342-5.

[11] Gill I, Valivety R. 1997. Polyunsaturated fatty acids, Part 1: Occurrence, biological activities and applications. Trends Biotechnol. 15: 401-9.

[12] Ratledge C. Microbial lipids: Commercial realities or academic curiosities. In: Kyle DJ, Ratledge C, editors. Industrial Applications of Single Cell Oils, USA: AOCS Press; 1992, p.1-15.

[13] Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Fakas S, Aggelis G. 2007. Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. Eur J Lipid Sci. Technol. 109: 1060-1070.

[14] Vamvakaki AN, Kandarakis I, Kaminarides S, Komaitis M, Papanikolaou S. 2010. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. Eng Life Sci. 10:348–360.

[15] Davery A, Pakshirajan K, Sangeetha P. 2009. Sophorolipids Production by Candida

Archive of SID

www.SID.ir

Bombicola using Synthetic Dairy Wastewater. IJCEE. pp. 1- 4.

[16] Sayadi S, Ellouz R. 1993. Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters. Chem Technol. Biotechnol. 57: 141–146.

[17] Papanikolaou S, Aggelis G.2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. Bioresource Technol. 82: 43-49.

[18] Pan L, Yang D, Shao L, Li W, Chen G, Liang Z. 2009. Isolation of oleaginous yeasts. Food Technol Biotechnol. 47: 215- 20.

[19] Christie WW. 1993. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: Christie W, editor. Gas Chromatography and Lipids, Scotland: Oily Press. p. 69 -111.

[20] Papanikolaou S, Sarantou S, Komaitis M, Aggelis G. 2004. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. J Appl Microbiol, 97: 867–875.

[21] Ratledge C. 2005. Microbial production of Gamma-linolenic acid, in Handbook of Functional Lipids, edited by C. Akoh, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p. 19.

[22] Mamatha SS, Halami PM, Venkateswaran G. 2010. Identification and characterization of the n-6 fatty acid-producing Mucor rouxii native isolate CFR-G15. Eur J Lipid Sci Technol. 112: 380-9.

[23] Certik M, Shimizu S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. J Biosci Bioeng. 87: 1-14.

[24] Ratledge C. Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipid. In: Kamel BS, Kakuda Y, editors. 1994. Technological advances in improved and alternative sources of lipids. London: Blackie. p. 235-91.

[25]Ahmed SU, Singh KS, Pandey A, Kanjilal S, Prasad RBN. Application of Response Surface Method for Studying the Role of Dissolved Oxygen and Agitation Speed on Gamma-Linolenic Acid Production. Appl Biochem Biotechnol. 2009; 152: 108-16.

[26] Aminah S, Aidil SA and Wan Mohtar W Y. 2006. Medium Optimization for the Production of Lipidless Biomass By *Cunninghamella* sp. 2A1 Using Response Surface Methodology. Malaysian J Microb.2:40-45.

[27] Mamatha SS, Ravi R, Venkateswaran, G. 2008.Medium Optimization of Gamma Linolenic Acid Production in *Mucor rouxii* CFR -G15 using RSM.Food Bioprocess Technol.1:405–409.

[28] Shrivastava A, Bajaj I, Saudagar P and Singhal R. 2008. Media Optimization for the Production of γ- Linolenic Acid by *Cunninghamella echinulata* var.elegans MTCC 552 Using Response Surface Methodology. Int J Food Eng. 4: 1-34.

[29] Rocky-Salimi,K, Hamidi-Esfahani H, Abbasi S. 2011. Statistical optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpine* CBS 754.68 in submerged fermentation. Iranian J Biotechnol. 9: 87-95.

Archive of SID

www.SID.ir

Optimization of microbial production of essential fatty acids by using of *Mucor rouxii* in oil wastes

Mirbagheri, M. [1], Nahvi, I. [1*], Biria, D. [2]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2. Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

(Received: 93/7/5 Accepted: 93/12/2)

Essential fatty acids (omega3/6) which are precursors of prostaglandins and leukotrienes and play an important rules in treatment of diseases. These fatty acids cannot be synthesized by human and should be obtained by nutritional dietary. Gamma linolenic acid (GLA) is one of the omega 6 fatty acids that is useful in cardiovascular and cancer diseases. Fungi especially zygomycetes are known as the best lipid producers containing essential fatty acids. The purpose of this research was using of several oil wastes as the renewable and cheap substrates to production of essential fatty acids by zygomycete fungi *Mucor rouxii* DSM1194.

Five oil wastes were studied and the production of lipids, biomass, essential fatty acids like GLA, linoleate (omega6) and alpha linolenate (omega3) were determined.

Since production of GLA was considerable, it was optimized by hierarchical experimental design, including a half fraction factorial and then design following by the response surface method (RSM). Yeast extract, ammonium sulphate and carbon source (oil wastes) were the significant factors on optimization of GLA production. Results showed after 72h growth of fungi in 28° C on R1 oil waste (obtained from restaurant), 56.4 mg/l GLA were produced which increased to 82.23 mg/l after optimization. The interaction of carbon and nitrogen sources was significant while yeast extract and ammonium sulphate didn`t have any interaction effects.

Keywords: Essential fatty acids, Oil waste, *Mucor rouxii*, Gamma linolenic acid.

Archive of SID

* Corresponding Author E-Mail Address: i.nahvi@sci.ui.ac.ir

www.SID.ir