Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره ششم، شهریور ۹۵
صفحه ۲۴ الی ۳۱

مقاله پژوهشی
(Original Article)

جداسازی، بهینه سازی و بررسی تولید لینولنیک اسید در *آسپرژیلوس نایجر*

نوشین شفیعی[۱]، کیوان بهشتی مآل[۱*]، محبوبه مدنی[۱]

چکیده

زمینه و هدف: میکروارگانیسم‌هایی که قابلیت تجمع لیپید به میزان بیش از ۲۰٪ بیومس خود را دارند، تحت عنوان میکروارگانیسم‌های مولد چربی نامیده می‌شوند. در این تحقیق، بهینه‌سازی در تولید چربی و تولید لینولنیک اسید در *آسپرژیلوس نایجر* به‌عنوان قارچ رشته‌ای مولد چربی بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه ابتدا سویه‌های مختلف قارچ‌های رشته‌ای جداسازی شدند و پس از رنگ‌آمیزی جدایه‌ها به‌وسیله سودان سیاه، چربی آنها با استفاده از حلال کلروفرم/متانول استخراج گردید. سپس جدایه‌هایی‌که نسبت چربی به بیوماس خشک آنها بیش از۲۰٪ بود به‌عنوان جدایه‌های مولد چربی انتخاب شدند. پس از بررسی میکروسکوپی، جدایه شناخته‌شده ازنظر تولید چربی بهینه‌سازی شد. در نهایت، مقدار لینولنیک اسید با استفاده از کروماتوگرافی گاز بررسی گردید.

یافته‌ها: ابتدا ۲۰ سویه مختلف قارچ‌های رشته‌ای جداسازی شد. برطبق نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی سودان سیاه، دانه‌های چربی در همه آنها مشاهده گردید. همچنین مقدار چربی تولیدشده در همه جدایه‌ها نشان داد درصد تولید چربی در جدایه‌های ۴، ۵ و ۱۶ بیش از ۲۰٪ است. در بررسی میکروسکوپی؛ جدایه ۵، *آسپرژیلوس نایجر* بود. بهترین pH، دما، زمان و منبع کربن برای تولید چربی در *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۴/۵، ۳۰ درجه سانتیگراد، ۹۶ ساعت و فروکتوز تعیین شد. با استفاده از روش کروماتوگرافی گاز، میزان لینولنیک اسید در *آسپرژیلوس نایجر*، ۲۲/۴٪ گزارش شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد *آسپرژیلوس نایجر* یک قارچ رشته‌ای مناسب برای تولید لینولنیک اسید است.

کلید واژه‌ها: قارچ؛ اسید چرب؛ روغن میکروبی؛*آسپرژیلوس نایجر*.

[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم‌زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
کیوان بهشتی مآل، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم‌زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
beheshtimaal@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۲۷

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Shafiei N, Beheshti Maal K, Madani M. Isolation, optimization, and investigation of production of linoleic acid in *Aspergillus niger*. Qom Univ Med Sci J 2016;10(6):24-31.[Full Text in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

روغن میکروبی یا روغن تک‌یاخته، به محتوای لیپیدی در سلول‌های میکروبی اطلاق می‌شود. میکروارگانیسم‌هایی نظیر باکتری‌ها، جلبک‌ها، مخمرها و کپک‌ها که قابلیت تجمع لیپید به‌میزان بیش از ۲۰٪ بیومس خود را دارند، تحت عنوان میکروارگانیسم‌های مولد چربی نامیده می‌شوند (۲،۱). از بین میکروارگانیسم‌های تولیدکننده چربی، قارچ‌ها اهمیت ویژه‌ای دارند؛ زیرا محتوای چربی آنها بالا بوده، و قادر به استفاده از سوبسترای ارزان‌قیمت می‌باشند. به‌همین دلیل جداسازی و کشت قارچ‌های روغنی برای تولید اسید چرب، اهمیت ویژه‌ای دارد (۳). تجمع لیپید در میکروارگانیسم‌های مولد چربی با گرسنگی سلول در زمینه نیتروژن یا ماده غذایی دیگری غیر از کربن نظیر فسفر، روی، آهن یا منگنز اتفاق می‌افتد. پاسخ سلول‌ها به کمبود ماده غذایی کلیدی، با واردشدن به فاز تجمع لیپید صورت می‌گیرد. چنانچه سلول‌ها به شرایطی بازگردند که ماده غذایی نیتروژنی در دسترس باشد ذخایر چربی مصرف‌شده، به مواد سلولی تبدیل می‌شوند. تجمع لیپید یک پاسخ القاشده تحت استرس است که در آن روغن به‌عنوان یک ماده ذخیره‌ای داخل سلولی تجمع می‌یابد (۵،۴). از مهم‌ترین قارچ‌های رشته‌ای مولد چربی می‌توان به *آسپرژیلوس اریزیایی*، *کانینگهاملا اکینولاتا*، *هومیکولا لانوکیناز*، *مورتییرلا ایزابلینا* و *موکور موسدو* اشاره کرد (۱). روغن میکروبی، کاربرد پزشکی دارد برای مثال می‌توان از روغن میکروبی در تولید آراشیدونیک اسید که یک اسید چرب غیراشباع چندگانه است استفاده کرد. تعدادی کاربردهای فیزیولوژی آراشیدونیک اسید در درمان پسوریاسیس پوستی، کاهنده چربی کبد و کشنده سلول‌های تومری می‌باشد. قارچ رشته‌ای *مورتییرلا آلیاسه*، آراشیدونیک اسید را به فرم تری‌گلیسرید در میسلیوم‌های خود انباشته می‌کند. از میان میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آراشیدونیک اسید، *مورتییرلا آلپینا*، بهترین گونه تولیدکننده شناخته شده است (۷،۶). اسید چرب دوکوزا هگزانوئیک اسید برای سلامتی انسان، به‌خصوص طی دوره بارداری و تغذیه نوزادان اهمیت دارد. Martek در اواخر دهه ۱۹۸۰، تولید این اسیدچرب را در *کریپتوکودینیوم کوهنی* بررسی کرد.

اسیدهای چرب غیراشباع لینولنیک اسید و لینولئیک اسید، از اسیدهای چرب ضروری هستند. این اسیدهای چرب توسط بدن انسان ساخته نمی‌شوند، بنابراین از مواد غذایی حاوی آنها به دست می‌آیند. لینولنیک اسید مانع از تجمع پلاکت‌ها شده و بدین‌ترتیب مانع از انسداد عروق خونی می‌گردد، لذا این اسید چرب غیراشباع از پیشرفت بیماری‌های قلبی - عروقی جلوگیری می‌کند (۹،۸). Kumar میزان اولئیک اسید و لینولنیک اسید را در روغن استخراج‌شده از *گونه‌ای از مورتییرلا* به‌وسیله کروماتوگرافی گاز مورد آنالیز قرار داد. در این مقاله به بررسی میزان تولید لینولنیک‌اسید در *آسپرژیلوس نایجر* به‌عنوان قارچ رشته‌ای مولد چربی پرداخته شد.

روش بررسی

در این مطالعه نمونه‌گیری از خاک درختان مختلف، به‌ویژه درختانی‌که میوه چرب یا دانه روغنی دارند (خاک مزارع ذرت و آفتابگردان، خاک درختان توت و گردو، خاک آلوده به روغن‌های صنعتی در تعمیرگاه ماشین، خاک مغازه قصابی، خاک چمنزار، خاک مزرعه کلم و خاک مراتع) در مناطق مختلف استان اصفهان انجام شد. به‌منظور جداسازی کپک‌ها از خاک، سری رقت 10^{-3} از نمونه‌های خاک ساخته شد و به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به هر پلیت حاوی محیط کشت، پوتیتو دکستروز آگار (مرک، آلمان) تلقیح و به مدت ۵-۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. کلنی‌های کپکی مختلف در محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار جدید خالص‌سازی شدند. به‌منظور نگهداری قارچ‌ها به مدت چندین ماه از محیط کشت پوتیتودکستروز آگار، اسلنت تهیه و گونه‌های خالص‌شده با استفاده از آنس استریل به اسلنت منتقل و پس از رشد در یخچال نگهداری شدند (۱۰).

غربالگری کیفی قارچ‌های رشته‌ای مولد چربی به‌وسیله رنگ‌آمیزی با سودان سیاه انجام گرفت. جهت رنگ‌آمیزی با سودان سیاه، ابتدا از نمونه کپکی رشدیافته ۷۲ ساعته در محیط غربالگری جامد (گلوکز، عصاره مخمر و آگار به ترتیب ۳۰، ۵ و ۱۵ گرم برلیتر و آب مقطر ۱ لیتر)، اسمیر تهیه و بر روی شعله تثبیت شد.

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ سودان سیاه بر روی اسمیر ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. پس از شستن رنگ اضافه با آب، اجازه داده شد تا لام خشک شود. در ادامه، اسمیر مربوطه را با گزیلول شست‌وشو داده و اجازه داده شد تا خشک گردد. سافرانین به‌مدت ۱۰-۵ ثانیه روی اسمیر ریخته شد و پس از شست‌وشو با آب، خشک گردید. سپس اسمیر زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد (۱۱). قارچ‌های رشته‌ای حاوی دانه‌های سیاه قابل‌توجه، برای مرحله بعد انتخاب شدند. به‌منظور اندازه‌گیری چربی، ابتدا وزن خشک نمونه رشدکرده در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت با سرعت هوادهی ۱۶۰rpm در محیط غربالگری مایع (گلوکز ۳۰، عصاره مخمر ۱/۵، NaCL ۱۵، NH_4CL ۰/۵، Na_2HPO_4 ۵، KH_2PO_4 ۷ گرم برلیتر و ۱ لیتر آب) اندازه‌گیری شد. سپس داخل هاون ریخته و به‌صورت پودر درآمد. در ادامه، محلول کلروفرم/ متانول به نسبت ۱/۲ به این پودر اضافه گردید و مجدداً با استفاده از کاغذ صافی، صاف شد. به‌منظور تبخیرشدن کلروفرم، ظرف محتوی این محلول درون شیکر با سرعت ۲۰۰rpm قرار گرفت. در نهایت، مقدار چربی به‌دست‌آمده نسبت به وزن خشک بیوماس، به‌صورت درصد بیان گردید (۱۳،۱۲).

در این آزمایش، به‌منظور شناسایی قارچ‌های رشته‌ای، از روش میکروسکوپی اسلاید کالچر جهت بررسی بهتر و دقیق‌تر دستگاه‌های رویشی و زایشی قارچ‌های رشته‌ای استفاده گردید. بعد از حدود ۷-۵ روز، قارچ‌های رشته‌ای برای بررسی‌های میکروسکوپی آماده شدند.

در این تست از ۴ فاکتور زمان، pH، دما و منبع کربن (در هرمرحله از یک فاکتور به‌عنوان متغیر) استفاده شد. در مرحله اول از فاکتور زمان استفاده شد و زمانهای ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ روز در نظر گرفته شدند. در مرحله دوم با استفاده از متغیر pH، تولید چربی در pHهای ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵، ۶/۵ و ۷/۵ بررسی گردید. در مرحله سوم از متغیر دما (در محدوده دمایی ۲۵، ۲۸، ۳۰، ۳۵ درجه سانتیگراد) استفاده شد. در مرحله چهارم با استفاده از منابع کربن مختلف (گلوکز، ساکاروز، فروکتوز و لاکتوز) تولید چربی بررسی گردید (۸،۳). جهت تولید اسیدچرب استری‌شده، ۵۰ میکرولیتر نمونه چربی به همراه ۵۰۰ میکرولیتر هگزان و ۱۰ میکرولیتر محلول ۲ نرمال هیدرواکسید پتاسیم در متانول، در یک اپندرف ۲ میلی‌لیتری قرار گرفت. این ترکیب به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. این ترکیب از ۲ فاز (لایه زیرین حاوی گلیسرول و لایه فوقانی حاوی اسیدچرب استری‌شده) تشکیل شده است (۱۴).

دستگاه کروماتوگرافی گاز شامل ستون مویین به طول ۳۰ متر است. گاز حامل، شامل هلیم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر برثانیه است. طراحی دمایی این دستگاه ابتدا براساس دمای اولیه ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه بوده و سپس دما از ۱۷۰-۷۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۵ درجه سانتیگراد برثانیه افزایش می‌یابد و بدون توقف زمانی در دمای ۲۲۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۴ درجه سانتیگراد بر ثانیه، افزایش و ۱۵ دقیقه در این دما متوقف می‌شود. ابتدا استاندارد استری‌شده متیل لینولنات به همراه نمونه چربی استری‌شده به ستون GC تزریق گردید. سپس منحنی استاندارد متیل لینولنات با منحنی حاصله از چربی استری‌شده نمونه موردنظر در این دستگاه مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و درصد متیل لینولنات در چربی استری‌شده نمونه موردنظر در دستگاه کروماتوگرافی گاز مشخص گردید. در نهایت، میزان لینولنیک اسید در *آسپرژیلوس نایجر* طبق فرمول:

$$N_1V_1=N_2V_2$$

محاسبه شد (۱۵).

یافته‌ها

از خاک مناطق مختلف استان اصفهان، ۲۰ جدایه قارچ رشته‌ای جداسازی و خالص‌سازی شد. از خاک مزرعه ذرت، ۳ جدایه؛ از خاک مزرعه آفتابگردان، ۲ جدایه؛ از خاک درخت توت، ۴ جدایه؛ از خاک درخت گردو، ۳ جدایه؛ از چمنزار کنار زاینده‌رود، ۲ جدایه؛ از خاک مراتع قهدریجان، ۲ جدایه و از خاک تعمیرگاه ماشین، مزرعه کلم، مغازه قصابی و درختچه‌های شمشاد هرکدام، ۱ جدایه به دست آمد. این کلنی‌ها حالت پنبه‌ای یا پرزی شکل داشتند. این نمونه‌ها در اسلنت‌های حاوی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار در یخچال نگهداری شدند.

همه نمونه‌هایی که در محیط غربالگری جامد، در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند، به‌وسیله

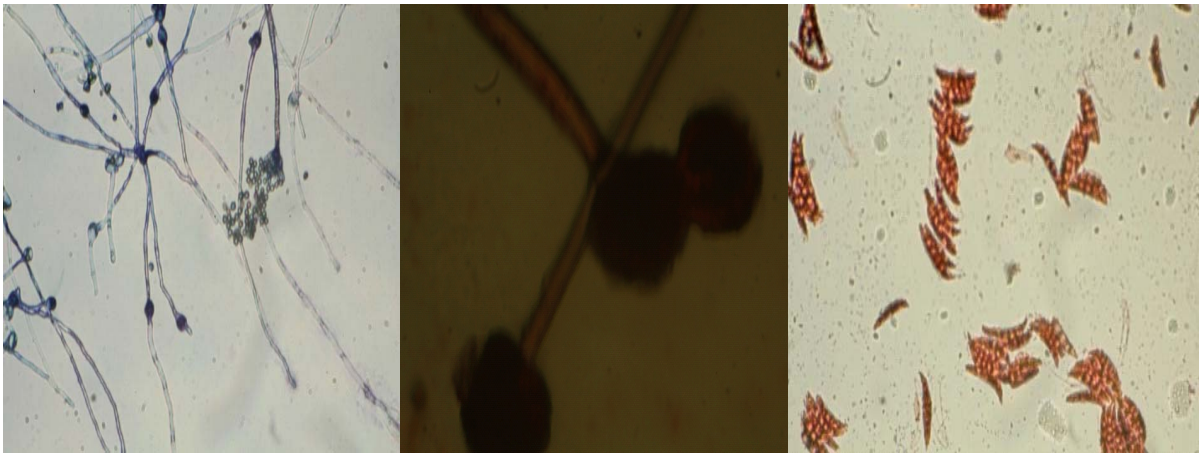
www.SID.ir

Archive of SID

سودان سیاه رنگ‌آمیزی شدند. دانه‌های چربی به‌صورت دانه‌های سیاه‌رنگ در سلول‌های قارچی زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۴۰، قابل‌رؤیت بودند. براساس نتایج حاصله همه جدایه‌ها کم و بیش دارای دانه‌های سیاه‌رنگ بودند.

با توجه به مشخص نبودن مقدار دقیق چربی تولیدشده در رنگ‌آمیزی سودان سیاه و بررسی دقیق‌تر تولید چربی، غربالگری کمّی در هر ۲۰ جدایه انجام شد؛ بدین ترتیب که از همه نمونه‌های کشت داده‌شده در محیط غربالگری مایع، استخراج چربی با استفاده از بیوماس خشک صورت گرفت و سپس نسبت وزن چربی به وزن خشک بیوماس اندازه‌گیری شد. مقدار چربی تولیدشده نسبت به وزن خشک بیوماس در جدایه ۲۰-۱ به ترتیب ۱۵، ۱۰، ۱۴/۵، ۲۶/۲، ۲۱/۴، ۱۳/۶، ۹، ۱۱، ۱۰،۱۸، ۸/۳، ۱۰/۵، ۱۵/۷، ۱۵، ۱۸، ۲۵/۴، ۱۱، ۹، ۸/۷ و ۱۲٪ بود. با توجه به نتایج حاصله، مقدار چربی تولیدشده نسبت به وزن خشک بیوماس در جدایه‌های ۴، ۵ و ۱۶ بیش از ۲۰٪ بود.

ابتدا خصوصیات جدایه‌های ۴، ۵ و ۱۶ از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی خصوصیات میکروسکوپی این قارچ‌ها، از روش اسلاید کالچر استفاده گردید. پس از رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها به‌وسیله سودان سیاه یا متیلن‌بلو در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۴۰ مشاهده شدند. براساس خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، جدایه ۴، *گونه‌ای از پنی‌سیلیوم*؛ جدایه ۵، *آسپرژیلوس نایجر* و جدایه ۱۶، گونه‌ای از *فوزاریوم* بود (شکل شماره ۱).

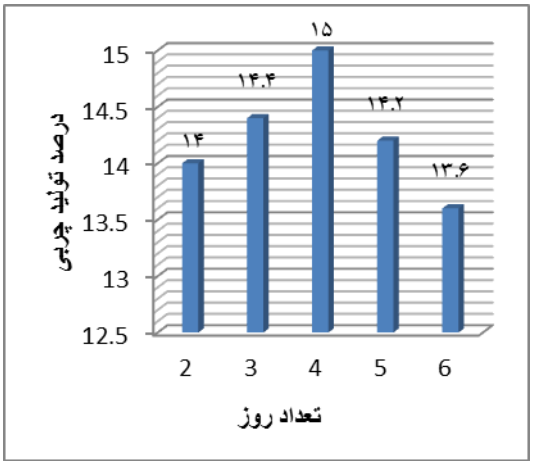


شکل شماره ۱: شکل میکروسکوپی *گونه‌ای از پنی‌سلیوم*، *آسپرژیلوس نایجر* و *گونه‌ای از فوزاریوم* به ترتیب از راست به چپ

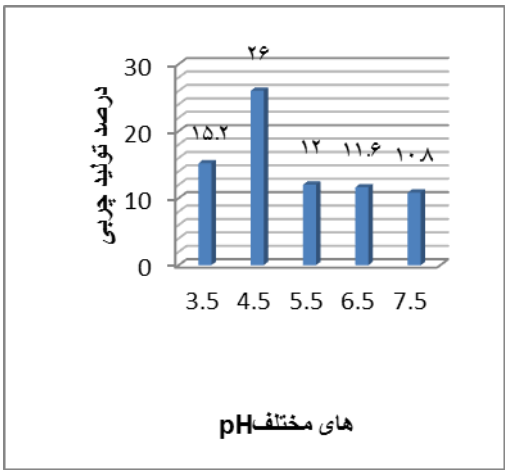
در مرحله اول بهینه‌سازی، تولید چربی در *آسپرژیلوس نایجر* در زمانهای ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ روز، (تحت شرایط یکسان pH، دما و منبع کربن) به ترتیب ۱۴، ۱۴/۴، ۱۵، ۱۴/۲ و ۱۳/۶٪ بود (نمودار شماره ۱). در مرحله دوم تولید چربی در pH مساوی ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵، ۶/۵ و ۷/۵ در *آسپرژیلوس نایجر* (تحت شرایط یکسان زمان، دما و منبع کربن) به ترتیب ۱۵/۲، ۲۶، ۱۲، ۱۱/۶ و ۱۰/۸٪ بود (نمودار شماره ۲). در مرحله سوم تولید چربی در دمای ۲۵، ۲۸، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد در *آسپرژیلوس نایجر* (تحت شرایط یکسان زمان، pH و منبع کربن) به ترتیب ۱۲/۴، ۱۳/۵، ۱۷ و ۱۰٪ بود (نمودار شماره ۳). تولید چربی در منابع کربن گلوکز، ساکاروز، فروکتوز و لاکتوز در *آسپرژیلوس نایجر* (تحت شرایط یکسان زمان، pH و دما) به ترتیب ۱۸، ۱۳/۲، ۲۱/۰۴و ۱۶/۶٪ بود (نمودار شماره ۴). این نتایج نشان می‌دهد بهترین pH، دما، زمان و منبع کربن برای تولید چربی در *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۴/۵، ۳۰ درجه سانتیگراد، ۹۶ ساعت و فروکتوز می‌باشد.

www.SID.ir

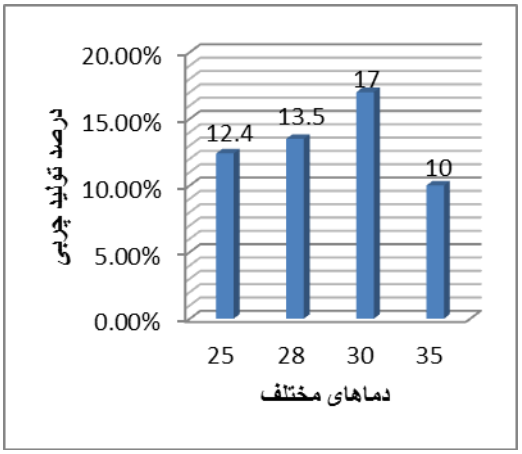
Archive of SID



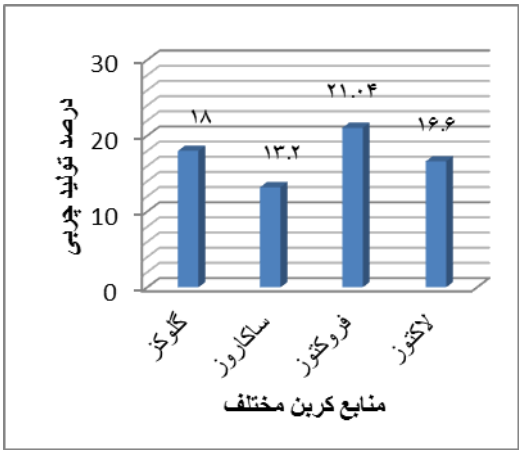
نمودار شماره ۱: مقایسه تولید چربی در زمانهای مختلف، pH=۵/۵، دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و منبع کربن گلوکز به‌وسیله *آسپرژیلوس نایجر*



نمودار شماره ۲: مقایسه تولید چربی در pHهای مختلف، پس از ٤ روز، دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و منبع کربن گلوکز به‌وسیله *آسپرژیلوس نایجر*

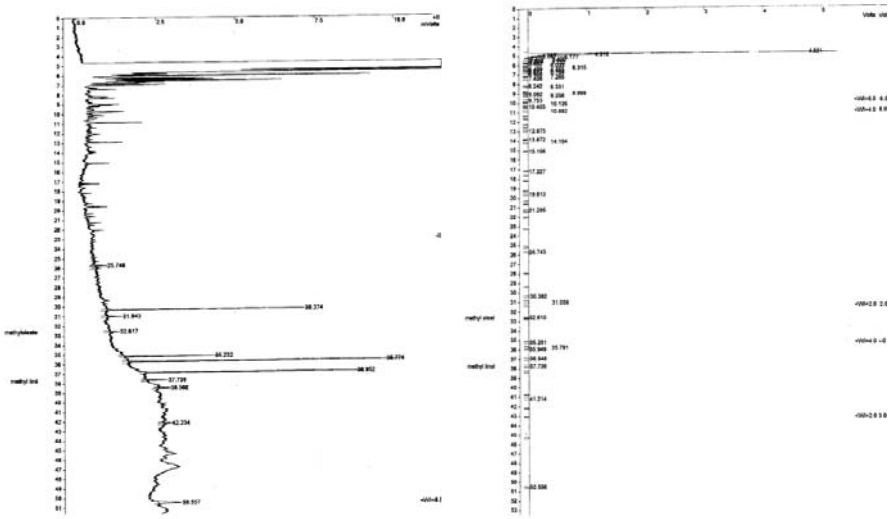


نمودار شماره۳:مقایسه تولید چربی در دماهای مختلف، پس از ٤ روز، pH= ۵/۵ و منبع کربن گلوکز به‌وسیله *آسپرژیلوس نایجر*



نمودار شماره ٤: مقایسه تولید چربی در منابع کربن مختلف پس از٤ روز pH= ۵/۵ و منبع کربن گلوکز به‌وسیله *آسپرژیلوس نایجر*

منحنی استاندارد متیل لینولنات به همراه منحنی حاصله از چربی استری‌شده *آسپرژیلوس نایجر* (شکل شماره۲)، در این دستگاه مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و درصد متیل لینولنات در چربی استری‌شده *آسپرژیلوس نایجر* در دستگاه GC به میزان ۳/۲٪ مشخص گردید. در نهایت، میزان لینولنیک اسید در *آسپرژیلوس نایجر* طبق فرمول به میزان ۲۲/۴۴٪ محاسبه شد.



شکل شماره ۲: منحنی استاندارد متیل لینولنات (سمت راست) و چربی استری‌شده *آسپرژیلوس نایجر* (سمت چپ) در دستگاه کروماتوگرافی گازی.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این مطالعه، قارچ‌های رشته‌ای مولد چربی (*گونه‌ای از پنی‌سیلیوم* و *آسپرژیلوس نایجر*)، از مزرعه آفتابگردان و گونه‌ای از *فوزاریوم* از خاک چمنزار جداسازی شدند. این نتایج نشان داد از بین منابع جداسازی؛ خاک مزرعه آفتابگردان به دلیل وجود منابع کربن و چربی مناسب، منبع خوبی برای جداسازی قارچ‌های رشته‌ای مولد چربی می‌باشد. Liu و همکاران (سال ۲۰۱۰) برای نگهداری قارچ رشته‌ای، از محیط کشت عصاره مخمر پپتون گلوکز (YPG) استفاده کردند (۸). Kumar و همکاران (سال ۲۰۱۱) نیز برای جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌های رشته‌ای از محیط پوتیتو دکستروز آگار (PDA) استفاده کردند (۹). در این تحقیق ابتدا از هر دو محیط کشت YPG و PDA استفاده شد. باتوجه به اینکه تنوع رنگ در کلنی‌های مختلف رشدیافته در محیط PDA بیشتر از YPG بود، در مراحل بعدی از محیط PDA استفاده شد. Kumar و همکاران (سال ۲۰۱۱)، همچنین Khot و همکاران (سال ۲۰۱۲) از بین قارچ‌های جداسازی‌شده، جدایه‌های مولد چربی را به‌وسیله رنگ‌آمیزی نایل رد به‌طور کیفی غربالگری کردند (۱۶،۹). Liu و همکاران (سال ۲۰۱۰) و Li و همکاران (سال ۲۰۱۱) نیز از بین قارچ‌های جداسازی‌شده، جدایه‌های مولد چربی را به‌وسیله رنگ‌آمیزی سودان سیاه، غربالگری کیفی کردند (۱۱،۸). در این مطالعه به دلیل کم‌هزینه بودن و سریع بودن مراحل آزمایش، از رنگ‌آمیزی سودان سیاه به جای نایل رد استفاده گردید. همچنین در تولید چربی در *آسپرژیلوس نایجر*؛ فاکتور زمان، pH، دما و منبع کربن به‌صورت تک فاکتوری به ترتیب ۴ روز، ۴/۵، ۳۰ درجه سانتیگراد و فروکتوز بود. Bajpai و همکاران (سال ۱۹۹۹)، شرایط بهینه در تولید اسید چرب دوکوزا هگزانوئیک اسید (DHA) را در قارچ *تراستوکیتریوم آرئوم* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بهترین زمان، pH، دما و منبع کربن در تولید این اسید چرب به ترتیب ۶ روز، ۶، ۲۸ درجه سانتیگراد و نشاسته می‌باشد (۱۷). بنابراین، در مطالعه حاضر تولید چربی در *آسپرژیلوس نایجر*، سریع‌تر و کم‌هزینه‌تر بود.

Liu و همکارن (سال ۲۰۱۰) به بررسی شرایط بهینه در تولید چربی در قارچ *تامنیدیم تنیدیم* پرداختند و به این نتیجه دست یافتند که بهترین pH، دما و منبع کربن در تولید این اسید چرب به‌ترتیب ۵/۶، ۳۰ درجه سانتیگراد و گلوکز می‌باشد (۸). بنابراین، در مطالعه حاضر تولید چربی در *آسپرژیلوس نایجر*، سریع‌تر و pH بهینه، پایین‌تر بود. Kumar و همکاران (سال ۲۰۱۱) با بررسی شرایط بهینه در تولید چربی در قارچ *مورتییرلا ایزابلینا* نشان دادند بهترین pH، دما و منبع کربن در تولید این اسید چرب به ترتیب ۵ روز، ۵/۶، ۳۰ درجه سانتیگراد و گلوکز می‌باشد (۹). بنابراین در مطالعه حاضر، تولید چربی در *آسپرژیلوس نایجر* سریع‌تر و pH بهینه پایین‌تر بود. در مطالعه حاضر درصد لینولنیک اسید در روغن به‌دست‌آمده از *آسپرژیلوس نایجر* به میزان ۲۲/۴۴٪ گزارش شد.

Li و همکاران (سال ۲۰۱۱) اسیدهای چرب استخراج‌شده از برخی قارچ‌ها را به‌وسیله کروماتوگرافی گازی آنالیز کردند که در نتیجه *گونه‌ای از فوزاریوم*، *تیلتیوپسیس آلبیسنس*، *گونه‌ای از پلکتوسپارا* و *بکوسلا تنیدیا* به ترتیب حاوی ۰/۶، ۲/۶، ۱/۷ و ۲/۴ درصد لینولنیک اسید بودند (۱۱). Kumar و همکاران (سال ۲۰۱۱)، مقدار لینولنیک اسید را در *گونه‌ای* از مورتییرلا، ۴/۸٪ اندازه‌گیری کردند (۹). در مطالعه حاضر نیز میزان لینولنیک اسید در *آسپرژیلوس نایجر* نسبت به قارچ‌های مطالعه شده، بیشتر بود . بنابراین، *آسپرژیلوس نایجر* قارچ رشته‌ای مناسبی برای تولید لینولنیک اسید می‌باشد.

نتیجه‌گیری

آسپرژیلوس نایجر با تولید ۲۱/۴٪ چربی، یک قارچ رشته‌ای مولد چربی است. این قارچ رشته‌ای از خاک مزرعه آفتابگردان در استان اصفهان جداسازی و از نظر تولید چربی بهینه‌سازی شد. درنهایت، *آسپرژیلوس نایجر* با تولید ۲۲/۴۴٪ لینولنیک اسید می‌تواند یک قارچ مناسب برای تولید لینولنیک اسید باشد. این اولین گزارش از تولید لینولنیک اسید به‌وسیله *آسپرژیلوس نایجر* در جهان است.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1. Shi S، Valle-Rodriguez JO، Siewers V. Prospects for microbial biodiesel production. Biotechnol 2011;(6):277-85.

2. Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, De Lucia M, Alan Leonardi A, et al. Production of single cell oil of cold adapted oleaginous yeast Rodotorula glacialis DBVPG 4785. Microb Cell Fact 2010;9:73.

3. Higashiyama K, Fujikawa S, Park EY. Production of arachidonic acid by Mortierella fungi. Biotechnol Bioprocess Eng 2002;(7):252-6.

4. Gao X, Liu Y, Chen Z. Rapid screening and cultivation of oleaginous microorganisms. Indian J Exp Biol 2012;50(4):282-9.

5. Zheng Y, Yu X, Zeng J, Chen S. Feasibility of fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. Biotechnol Biofuels 2012;5(1):50.

6. Schorken U, Kempers P. Lipid Biotechnology: Industrially relevant production processes. Eur J Lipid Sci Technol 2009;111(7):627-45.

7. Iassonova RD, Hammond EG, Beattie SE. Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerol's encapsulated in oleaginous yeast. J Am Oil Chemists' Soc 2008;85(8):55-62.

8. Liu G, Lin Q, Jin X. Screening and fermentation optimization of microbial lipid-producing molds from forest soils. Afr Microbial Res 2010;4(14):1462-8.

9. Kumar L, Ramalakshmi M, Sivakumar U. Production of microbial oils from Mortierella sp for generation of biodiesel livestock. Afr J Microbiol Res 2011;2(4):4105-11.

10. Xia C, Zhang J, Zhang W, Hu B. A new cultivation method for microbial oil production: Cell cell pelletization and lipid accumulation by Mucor circinelloides. Biotechnol Biofuels 2011;4:15.

11. Li SL, Feng SL, Li Z, Xu H, Yu YP, Qiao DR, et al. Isolation, identification and characterization of oleaginous fungi from the soil of Qinghai Plateau that utilize D-xylose. Afr J Microbiol Res 2011;(15):2075-81.

12. Murad AA, Karim AN, Hashim FN, Adnan A, Zainal Z, Hamid AA, et al. Identification and Characterisation of an Oleaginous Fungus Pro g-Linoleneic Acid. Int J Microbiol 2012(9):1-9.

13. Li SL, Lin Q, Li XR, Xu H, Yang YX, Qiao DR, et al. Biodiversity the oleaginous microorganisms in Tibetan plateau. Braz J Microbiol 2012;43(2):627-34.

14. Langueira E, Pineda J. Determination of fatty acid methyl esters (fames) in Olive Oil using automated samplev preparation. Agilent Technolo 2012;(24):1-7.

15. Lawrence M, Gurecki T. Selection Guide for Polar WAX GC Column Phases. Produc Guide1998;(15):1-16.

16. Khot M, Kamat S, Zinjarde. Single oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. Microb Cell Fact 2012;11:71.

17. Bajpai PK, Bajpai P, Ward OP. Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by Thraustochytrium aureum ATCC 34304. JAOCS 1991;68(7):509-14.

www.SID.ir

Archive of SID

Qom Univ Med Sci 2016 August

Original Article

Isolation, Optimization, and Investigation of Production of Linoleic Acid in Aspergillus niger

Noushin Shafiei[1], Keivan Beheshti Maal[1*], Mahboobeh Madani[1]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

[*]Corresponding Author:
Keivan Beheshti Maal,
Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Email:
beheshtimaal@iaufala.ac.ir

Received: 11 Aug, 2015

Accepted: 17 Nov, 2015

Abstract

Background and Objectives: Microorganisms that are capable of accumulating lipid up to 20% of their biomass are called oleaginous microorganisms. In this study, optimization in lipid and linolenic acid production was investigated in *Aspergillus niger* as an oleaginous filamentous fungi.

Methods: In this study, at first different strains of filamentous fungi were isolated, and after staining of the isolates with Sudan Black, their oil was extracted using chloroform/methanol. Then, the isolates with oil/dry biomass ratio of more than 20% were considered as oleaginous filamentous fungi. After microscopic examination, the identified isolate was optimized in terms of oil production. Finally, the amount of linolenic acid was evaluated using gas chromatography.

Results: At first, 20 filamentous fungi isolates were isolated. According to the results of Sudan Black staining, lipid inclusions were observed in all the fungal isolates. The amount of oil produced in all isolates, showed that the percentage of oil production in isolates 4, 5, and 16, was more than 20%. In microscopic examination, the isolate 5 was *Aspergillus niger*. The best pH, temperature, time, and carbon source for oil production by *Aspergillus niger* was 4.5, 30°C, 96 hours, and fructose, respectively. The amount of linolenic acid in *Aspergillus niger* was reported 22.4% using gas chromatography.

Conclusion: The results of this study revealed that *Aspergillus niger* is an appropriate filamentous fungi for linolenic acid production.

Keywords: Fungi; Fatty acid; Microbial oil; *Aspergillus niger.*

www.SID.ir