

بررسی سوخت و ساز قارچ مورتیرا آلپینا در شرایط بهینه تولید روغن و آراشیدونیک اسید با استفاده از روش سطح پاسخ

حمید رضا صمدلویی^۱، زهره حمیدی^{۲*}، سید مهدی علوی^۳، محمد علی سحری^۴،
سلیمان عباسی^۲

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی.
۲- دانشیار، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی.
۳- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه فیزیولوژی گیاهی
۴- استاد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی.
(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۸)

چکیده

در این تحقیق شرایط بهینه تولید روغن و آراشیدونیک اسید توسط گونه قارچی مورتیرا آلپینا CBS 754.68 از نظر میزان کربن (گلوکز) در پنج سطح (۴۵/۸، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۷۴/۱۴ گرم در لیتر)، منبع نیتروژنی (پودر سویا) در پنج سطح (۷/۹۲، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۲/۰۷ گرم در لیتر) به روش آماری سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که برای تولید حداکثری روغن (۵۰٪)، گلوکز باید ۷۰ و پودر سویا ۱۰ گرم در لیتر باشد و برای تولید بهینه آراشیدونیک اسید (۵۶/۴۰٪) گلوکز ۵۰/۳۵ و پودر سویا ۱۸/۳۰ گرم در لیتر باشد. در مرحله بعد تغییرات ترکیبات محیط کشت و توده زیستی در حین فرایند تخمیر در دو محیط کشت بهینه بررسی شد. نتایج نشان داد که تولید روغن و آراشیدونیک اسید به ترتیب با توقف رشد ریزسازواره و ذخیره روغن افزایش قابل توجه ای می یابد و ترکیبات فنولیک با رشد سلول و میزان روغن ریزسازواره ارتباط مستقیم دارد.

کلید واژگان: مورتیرا آلپینا، تخمیر، آراشیدونیک اسید، روغن، روش آماری سطح پاسخ

* مسئول مکاتبات: hamidy_z@modares.ac.ir

۱- مقدمه

امروزه مصرف غذاهای فراسودمند روند رو به افزایشی دارد. اسیدهای چرب ضروری از مهمترین مکمل های غذایی فراسودمند به شمار می رود که تاثیر قابل ملاحظه ای در سلامتی انسان دارد [۱]. اسیدهای چرب ضروری، در چرخه های بیوشیمیایی موجود زنده ساخته نمی شوند و باید از طریق رژیم غذایی تامین گردند. همه این اسیدهای چرب جزء گروه اسیدهای چرب بلند زنجیره چندغیراشباع^۱ تقسیم بندی می شوند [۲]. در بین اسیدهای چرب غیراشباع ضروری، آراشیدونیک اسید با توجه به تاثیر آن، در رشد مغز و قدرت بینایی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است و مصرف آن به عنوان مکمل غذایی در تغذیه نوزادان و کودکان رو به افزایش است [۳].

با توجه به اهمیت این اسید چرب، اگر چنین تصور شود که آراشیدونیک اسید بطور وسیعی به عنوان مکمل مورد استفاده قرار گیرند، میزان تولید سالیانه فعلی آن برای برآورده نمودن این تقاضا غیرکافی خواهد بود [۴]. با در نظر گرفتن این نکته تلاش برای بدست آوردن منابع مناسب تولید این اسید چرب در حال انجام است.

نتایج تحقیقات نشان داده که کشاورزی سنتی و روغن های حیوانی با توجه به پایین بودن اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیره توانایی پاسخ گویی به نیاز روز افزون به این ماده ضروری نمی باشد [۵]. منبع اصلی PUFA روغن ماهی است. اما جدا سازی و تخلیص PUFA ها از آن مشکل و پیچیده است. [۶].

بعد از اندکی تحقیق دانشمندان پی بردند که پروتوزوا، جلبک و قارچ منبع مناسبی برای تولید روغن با اسیدهای چرب چند غیراشباعی است. بنابراین ریزسازواره ها به عنوان منشأ PUFA در زنجیره غذایی مورد توجه قرار گرفتند.

گونه های ریزسازواره ای که می توانند بیشتر از ۲۰٪ وزن خشک توده زیستی شان روغن تولید کنند معروف به ریزسازواره های اولیگونوس^۲ یا گونه روغنی^۳ می باشند. در بین ریزسازواره های روغنی، کپک ها بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است توانایی تولید محدوده وسیع تری از اسیدهای چرب، استفاده از ضایعات

کشاورزی برای تولید محصول و رشد در محیط هایی با pH پایین از ویژگی های مثبت قارچ ها می باشد [۷].

در بین گونه های قارچی، گونه هایی از قارچ رشته ای *مورتیرلا*^۴ می توانند بیش از ۴۰٪ چربی در خود ذخیره کنند که بیشتر از ۴۰٪ این میزان را آراشیدونیک اسید تشکیل می دهد [۸-۱۰].

با توجه به اهمیت قارچ *مورتیرلا آلپینا*^۵ به علت تولید بالای آراشیدونیک اسید تحقیقات وسیعی در زمینه بررسی شرایط مناسب کشت موثر در تولید آراشیدونیک اسید به عمل آمده است [۱۱-۱۶]. با مروری به مقالات انجام شده چنین نتیجه می شود که با بهینه کردن شرایط فیزیکی شیمیایی کشت، میزان تولید آراشیدونیک اسید و روغن افزایش می یابد. از این رو در این تحقیق با استفاده از روش آماری سطح پاسخ تاثیر دو گوهرمایه^۶ کلیدی کربن (گلوکز) و نیتروژن (پودر سویا) موثر در تولید روغن و آراشیدونیک اسید بهینه شد. و در نهایت با بدست آمدن شرایط کشت بهینه تغییرات محیط کشت از نظر میزان گلوکز و نیتروژن و تغییرات توده زیستی، ترکیبات فنولیک، روغن و آراشیدونیک اسید در روزهای ۲، ۳، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ بررسی شد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

در این تحقیق قارچ *مورتیرلا آلپینا* CBS^۷۷۵۴/۶۸ از مجموعه میکروبی کشور هلند^۸ خریداری شد. نمونه قارچ *مورتیرلا آلپینا* خریداری شده به صورت میسلیم در لوله آزمایش آگار شیب دار^۹ بود که بر روی محیط کشت مالت آگار در بشقابک^{۱۰} و لوله آزمایش آگار شیب دار در درجه حرارت ۲۲°C و مدت زمان ۷ روز کشت داده شد و تا انجام آزمون نمونه ها در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد همچنین مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق همگی از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

4. *Mortierella*5. *Mortierella alpine*

6 Substrate

7. *Mortierella alpine* CBS 754.68

8. Centraalbureau voor Schimmelcultures

9 Slant agar

4 Petri dish

1. Poly Unsaturated Fatty Acid (PUFA)

2. Oleagious species

3. single cell oil

۲-۲- مایه تلقیح و کشت‌های اصلی

از سوسپانسیون میسلومی برای تلقیح کشت‌های تولید محصول استفاده شد [۱۸]. برای تهیه سوسپانسیون میسلومی، ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت شامل گلوکز تک آبه (۳۰ g/L) و عصاره مخمر (۱۰ g/L) در یک ارلن ۵۰۰ میلی لیتری تهیه شد، در درجه حرارت 121°C و ۱۵ دقیقه سترون گردید. سپس بوسیله آنس سترون ریزسازواره تلقیح شده و در درجه حرارت 26°C به مدت ۷۲ ساعت و ۱۷۰ دور بر دقیقه^۱ گرمخانه‌گذاری شد [۱۹]. ۳ تا ۱۰٪ از کشت‌های توسعه تلقیح به‌عنوان مایه تلقیح به محیط کشت تولید محصول افزوده شد. محیط کشت تولید محصول با بهینه کردن میزان گوهرمایه کربنی و نیتروژنی محیط کشت با استفاده از روش سطح پاسخ به دست آمد. در این تحقیق دما (۲۱ درجه سانتی گراد)، pH (۶) و دورهمزن (۱۸۵ دور در دقیقه) از ثابت‌های آزمون می‌باشد.

۲-۳- اندازه‌گیری وزن خشک توده زیستی

برای جداسازی توده زیستی از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱، بر روی قیف بوختر مجهز به پمپ خلاء استفاده شد. سپس برای اندازه‌گیری وزن خشک سلولی^۲ آنها را بر روی شیشه‌های ساعت قرار داده و به مدت ۲ ساعت در آن با درجه حرارت 105°C خشک شد [۲۰].

۲-۴- استخراج چربی

برای استخراج چربی‌ها توده زیستی خشک شده در هاون چینی خرد شد. چربی پودر حاصله با حلال نرمال هگزان در دستگاه سوکسله استخراج گردید [۲۱].

۲-۵- اندازه‌گیری اسیدهای چرب

برای تعیین و اندازه‌گیری اسیدهای چرب، با توجه به عدم فراریت اسیدهای چرب بایستی مشتق‌های متیل استر آنها را تهیه نمود. بعد از مشتق‌سازی، اسیدهای چرب متیله به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق شد [۲۲]. سپس با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (Unicam 4600, England)، نوع اسید چرب براساس مقایسه زمان بازداری^۳ با زمان بازداری استاندارد

پنتادوکونوئیک اسید تعیین گردید. مقدار اسیدچرب آنها براساس روش استاندارد داخلی اندازه‌گیری شد [۲۲].

۲-۶- اندازه‌گیری قند احیا به روش DNS^۴

نمونه محیط کشت در روزهای ۲، ۳، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ 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 [۲۳].

۲-۷- اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک

ابتدا نمونه‌های حاوی توده زیستی فارچی مورتیرلا در روزهای ۲، ۳، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ تخمیر برداشت شده، توده زیستی با سانتریفوژ کردن در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه از محیط کشت جدا شده و خشک شد، سپس نمونه‌های خشک شده با استفاده از هاون چینی خرد گردید. سپس یک گرم نمونه توزین شد به آن چهار میلی لیتر حلال (هشتاد قسمت متانول به بیست قسمت آب) اضافه شد به مدت ۳ ساعت در دستگاه فراصوت (Transsonic Tp 690/H, Germany) در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. نمونه‌ها سانتریفوژ شده و محلول شفاف رویی برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک برداشته شد. برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک از روش واترهوس^۵ در سال ۲۰۰۲ استفاده شد [۲۴].

۲-۸- طرح آزمایشی

بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ انجام شد. در این مرحله عوامل کلیدی منبع کربنی (گلوکز) و منبع نیتروژنی (پودر سویا) در ۵ سطح در نظر گرفته شد (جدول ۱). از طرح مرکب مرکزی^۶ با ۱۰ آزمایش که شامل ۲ آزمایش در نقطه مرکزی است (هدف از تکرار در نقطه مرکزی، بررسی خطای آزمایش در طرح است) استفاده شد. آزمون‌ها در دو تکرار انجام گرفت (جدول ۲). ضریب‌های رگرسیون و منحنی‌های سطح پاسخ و کنتور توسط نرم‌افزار (Design expert, USA) محاسبه و رسم شد.

4. Dinitrosalicylic acid

5. Waterhouse

6. Response surface methodology (RSM)

7. Central composite design (CCD)

1. Revolution per minute (rpm)

2. Dry cell weight (DCW)

3. Retention time

۳- نتیجه و بحث

۳-۱- بهینه سازی به روش آماری سطح پاسخ

آزمایش های بهینه سازی، بدست آوردن یک مدل ریاضی برای پیش بینی رفتار فرایند می باشد [۲۵]. طرح های بهینه سازی از عوامل کمتری برخوردار بوده ولی این عوامل شدیداً تاثیر گذار می باشند. از آنجائی که هدف از این مرحله تحقیق افزایش میزان آراشیدونیک اسید و روغن می باشد، دو ترکیب کلیدی کربن (گلوکز) و نیتروژن (پودر سویا) با توجه به مطالعات و کارهای تحقیقاتی انجام شده انتخاب گردید و میزان این دو ترکیب به منظور افزایش تولید روغن و آراشیدونیک اسید به روش آماری RSM بهینه شد. طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ به همراه میزان واقعی و پیش بینی شده داده ها در جدول ۲ گزارش شده است.

معادله (۲ و ۱) مدل رگرسیون را برای روغن و مقدار آراشیدونیک اسید در توده زیستی پس از تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم افزار Desing expert نشان می دهد. مقدار عددی ضریب تعیین (R^2) برای دو فرمول آراشیدونیک اسید و روغن به ترتیب ۰/۹۵ و ۰/۹۷ نشان دهنده میزان انحراف داده ها از مدل رگرسیون می باشد و می توان چنین نتیجه گرفت که مدل های رگرسیون بخوبی توانسته اند رابطه بین شرایط کشت (گلوکز و پودر سویا) و میزان آراشیدونیک اسید و روغن در توده زیستی را نشان داده و پیش بینی کنند. همچنین مدل نهایی دارای عدم تطابق^۱ غیر معنی دار است که نشان دهنده برازش خوب مدل می باشد. جدول ۳ ضریب های رگرسیون و مقادیر P را برای مدل های رگرسیون نشان می دهد.

همانطور که از جدول ۳ مشخص است اثرات خطی پودر سویا و گلوکز در میزان روغن و آراشیدونیک اسید در محیط کشت، معنی دار می باشند ($P < 0.01$). اثرات متقابل گلوکز-پودر سویا برای مقدار آراشیدونیک اسید و روغن در توده زیستی معنی دار نمی باشند ($P > 0.01$). در مورد اثرات درجه دوم بر تولید روغن تمام عوامل معنی دار نمی باشد ($P > 0.01$). ولی اثر درجه دوم منبع کربنی برای تولید آراشیدونیک اسید معنی دار می باشند

($P < 0.05$). ضرایب مدل چند جمله ای درجه دوم پس از تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار و حذف عبارت های غیر معنی دار توسط روش Forward در نرم افزار بدست آمد و نتیجه حاصل معادله (۱) و (۲) می باشد.

$$Y_1 = 78.49318 - 6.67638 \times A - 0.13588 \times B + 0.030000 A \times B + 0.088571 \times A^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = 25.71204 + 4.64248 \times A - 0.059987 \times B - 0.025000 A \times B - 0.084286 \times A^2 \quad (2)$$

میزان Y_1 و Y_2 به ترتیب مربوط به درصد روغن در وزن خشک سلولی و درصد آراشیدونیک اسید در روغن می باشد. A و B به ترتیب مربوط به میزان گلوکز و پودر سویا بر حسب گرم در لیتر است.

۳-۲- نتایج میزان روغن

شکل ۱ تاثیر سطوح مختلف گلوکز و پودر سویا را بر روی میزان روغن نشان می دهد. مشاهده می شود که نمودار کنتور روغن بصورت ماکزیمم ساده^۲ و شکل سطح پاسخ آن بصورت صفحه ای می باشد. بنابراین بیشترین مقدار روغن در بالای صفحه بدست می آید و هر چه به سمت پائین حرکت کنیم، روغن کاهش می یابد. در واقع کنتور نشان می دهد که هر چه میزان کربن افزایش و پودر سویا کاهش می یابد میزان روغن افزایش می یابد. بیشترین مقدار روغن در غلظت گلوکز (۶۰-۷۰ g/L) و پودر سویا (۱۰ g/L) بدست می آید.

۳-۳- نتایج میزان آراشیدونیک اسید

شکل ۲ تاثیر سطوح مختلف گلوکز و پودر سویا را بر روی آراشیدونیک اسید نشان می دهد. منحنی کنتور آراشیدونیک اسید بصورت لبه بالارونده^۳ است. همانطور که در کنتور مشاهده می شود افزایش میزان نیتروژن تاثیر قابل توجه ای در تولید آراشیدونیک اسید دارد. به طوری که افزایش میزان پودر سویا (۱۵-۲۰ گرم در لیتر) و کاهش غلظت گلوکز (۴۵-۵۰ g/L) موجب افزایش آراشیدونیک اسید می شود.

2. Simple maximum
3. Rising ridge

1. Lack of fit

جدول ۱ میزان واقعی و کد شده متغیرهای غبروابسته در روش آماری RSM

عامل	سطح	کد شده	
		۱	۰
		۱	-۱
		۱	-۱/۴۱۴۲
		۱	-۱/۴۱۴۲
واقعی			
پودر سویا (گرم در لیتر)	۷/۹۳	۱۰	۱۵
گلوکز (گرم در لیتر)	۴۵/۸۵	۵۰	۶۰
		۲۰	۷۰
		۲۲/۰۷	۷۴/۱۴

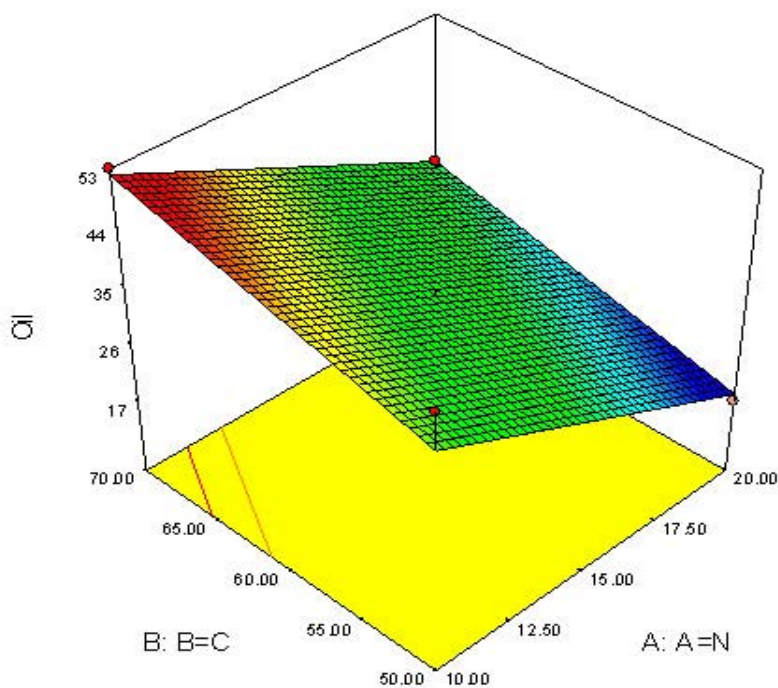
جدول ۲ جدول طراحی آزمایش ها و نتایج واقعی و پیش بینی شده از دو متغیر اعمال شده بر روی پاسخ در روش آماری RSM

نمونه	پودر سویا (B)	گلوکز (A)	میزان آراشیدونیک اسید (درصد)		میزان روغن (درصد)	
			پاسخ مشاهده شده	پاسخ پیش بینی شده	پاسخ مشاهده شده	پاسخ پیش بینی شده
۱	۱	-۱	۵۶±۰/۱	۵۶/۶۷	۱۷±۰/۵	۱۷/۴۲
۲	۰	۰	۵۱±۰/۱	۵۰/۹۹	۳۳±۰/۴	۳۲/۵۰
۳	۱	۱	۴۶±/۲	۴۵/۴۷	۳۰±۰/۵۶	۳۲/۱۳
۴	۰	۰	۵۱±۰/۱۵	۵۰/۹۹	۳۲±۰/۶	۳۲/۵۰
۵	۰	-۱/۴۱	۵۶±۰/۱۳	۵۵/۹۰	۲۴±۰/۳	۲۵/۸۴
۶	۰	۱/۴۱	۴۲±۰/۱	۴۳/۶۰	۴۳±۰/۵	۴۲/۴۱
۷	۱/۴۱	۰	۵۱±۰/۲	۵۰/۵۹	۲۴±۰/۴	۲۱/۹۳
۸	-۱	۱	۴۴±۰/۱۴	۴۱/۸۳	۵۳±۰/۶	۵۱/۳۳
۹	-۱/۴۱	۰	۴۰±۰/۱	۴۱/۹۱	۵۰±۰/۶	۵۳/۳۱
۱۰	-۱	-۱	۴۹±۰/۱۶	۴۸/۰۳	۴۶±/۵	۴۲/۶۱

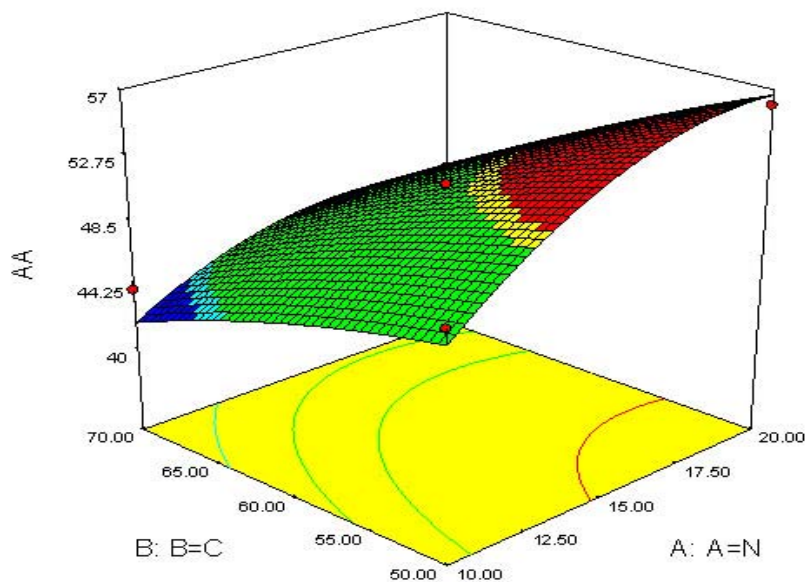
جدول ۳ پارامترهای ANOVA برای مدل آراشیدونیک اسید و روغن (A گلوکز و B پودر سویا)

مدل	مجموع مربعات		درجه آزادی		میانگین مربع		F	P
	آراشیدونیک روغن	آراشیدونیک روغن	آراشیدونیک روغن	آراشیدونیک روغن	آراشیدونیک روغن	آراشیدونیک روغن		
مدل	۱۲۹۶/۰۶	۲۵۷/۸۶	۴	۴	۳۲۴/۰۲	۶۴/۴۷	۳۹	۰/۰۰۰۶
A	۹۸۵	۷۵/۳۸	۱	۱	۹۸۵	۷۵/۳۸	۱۱۸/۵۷	۰/۰۰۳۸
B	۲۷۴/۶۰	۱۵۱/۳۷	۱	۱	۲۷۴/۶۰	۱۵۱/۳۷	۳۳/۰۵	۰/۰۰۰۸
AB	۹	۶/۲۵	۱	۱	۹	۶/۲۵	۱/۰۸	۰/۲۰۲۵
A ²	۲۷/۴۶	۲۴/۸۶	۱	۱	۲۷/۴۶	۲۴/۸۶	۳/۳۱	۰/۰۳۲۸
باقی مانده	۴۱/۵۴	۱۴/۵۴	۵	۵	۸/۳۱	۲/۹۱		
عدم تطابق	۴۱/۰۴	۱۴/۵۴	۴	۴	۱۰/۲۶	۳/۶۳	۲۰/۵۲	۰/۱۶۳۹
خطای خالص	۰/۵۰	۰/۰۰۰	۱	۱	۰/۵۰	۰/۰۰۰		
همبستگی	۱۳۳۷/۶۰	۲۷۲/۴۰	۹	۹				

میزان R² برای دو فرمول آراشیدونیک اسید و روغن به ترتیب ۰/۹۵ و ۰/۹۷ می باشد.

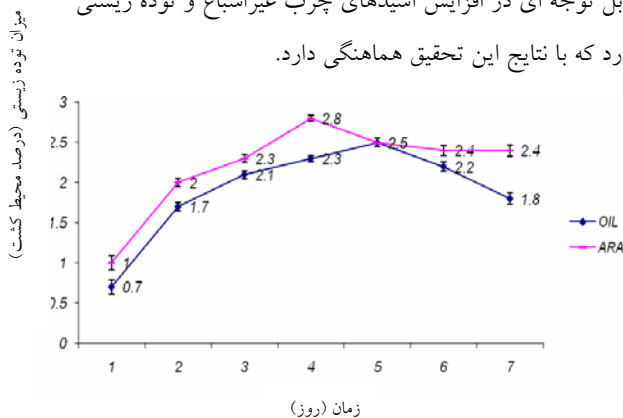


شکل ۱ منحنی RSM برای تولید روغن به وسیله قارچ *mortierella alpina* با متغیرهای پودر سویا (N) و گلوکز (C)



شکل ۲ منحنی RSM برای تولید آراشیدونیک اسید به وسیله قارچ *mortierella alpina* با متغیرهای پودر سویا (N) و گلوکز (C)

روغن تا روز ۵ افزایش پیدا کرده و از آن به بعد میزان توده زیستی در محیط کشت مناسب آراشیدونیک اسید و روغن کاهش می یابد. نکته قابل توجه اینکه در فاز رشد میزان توده زیستی محیط کشت مناسب تولید آراشیدونیک اسید بیشتر از محیط کشت تولید روغن می باشد (شکل ۳). در تحقیقی که راتلج^۱ در سال ۲۰۰۲ انجام شد (۲۶) نشان دادند که منبع نیتروژنی تاثیر قابل توجهی در افزایش اسیدهای چرب غیراشباع و توده زیستی دارد که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.



شکل ۳ تغییرات میزان توده زیستی در محیط مناسب تولید روغن و آراشیدونیک اسید

۳-۷- مصرف گلوکز در حین فرایند تخمیر

گلوکز به عنوان منبع کربنی از دو لحاظ قابل اهمیت می باشد اولاً به عنوان منبع انرژی به منظور فعالیت حیاتی ریزسازواره ضروری می باشند ثانیاً به منظور تبدیل به محصول که در اینجا روغن می باشد ضروری است. در محیط کشت مناسب تولید روغن بیشترین کاهش گلوکز از روز ۳ به ۴ و روزهای ۶ تا ۱۰ می باشد. در محیط کشت مناسب تولید آراشیدونیک اسید روند کاهش متفاوت است. در روزهای ۱ به ۲ ریزسازواره با شدت کمتری قند را مصرف می کند در حالیکه بیشترین مصرف گلوکز در روزهای ۲ به ۳ و روزهای ۴ تا ۶ می باشد. در روز ۶ قند احیاء در محیط کشت به کمترین سطح خود می رسد و تا آخر فرایند در همین سطح باقی می ماند. (شکل ۴).

۳-۴- مقادیر بهینه پیش بینی شده توسط مدل

درجه دوم برای متغیرها

مقادیر بهینه پیش بینی شده با استفاده از نرم افزار Design Expert برای متغیرهای گلوکز (A) و پودر سویا (B) به منظور تولید حداکثری روغن به ترتیب ۷۰ و ۱۰ گرم در لیتر می باشد میزان محصول ۵۰ درصد پیش بینی شد. در حالیکه مقادیر بهینه پیش بینی شده برای متغیرهای گلوکز و پودر سویا به منظور تولید حداکثری آراشیدونیک اسید (۵۶/۴۰٪) به ترتیب ۵۰/۳۵ و ۱۸/۳۰ گرم در لیتر می باشد.

۳-۵- ارزیابی مدل رگرسیون تولید روغن و

آراشیدونیک اسید

به منظور ارزیابی مدل، در آزمون هایی با دو تکرار شرایط پیش بینی شده مدل تولید روغن و آراشیدونیک اسید اعمال گردید. محیط کشت مناسب تولید آراشیدونیک اسید حاوی ۵۰/۳۵ گرم در لیتر گلوکز و ۱۸/۳۰ گرم در لیتر پودر سویا بوده pH اولیه ۶ تنظیم شد. محیط کشت مناسب تولید روغن به ترتیب حاوی ۷۰ و ۱۰ گرم در لیتر گلوکز و پودر سویا بود. پس از ۱۰ روز تخمیر میزان آراشیدونیک اسید ۵۶٪ و میزان روغن ۵۱٪ بدست آمد که با نتیجه پیش بینی شده از فرمول که آراشیدونیک اسید ۵۶/۴٪ و روغن ۵۰٪ می باشد نزدیکی قابل توجهی دارد. میزان خطا به ترتیب ۰/۰۰۷ و ۰/۰۲ برای محیط بهینه آراشیدونیک اسید و روغن بدست آمد.

۳-۶- بررسی میزان تغییرات وزنی توده زیستی

در حین فرایند تخمیر

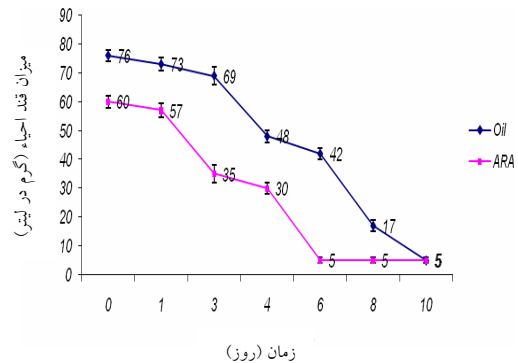
روند رشد توده زیستی تحت تاثیر مواد مغذی محیط کشت و مرحله رشد ریزسازواره می باشد. کاهش مواد مغذی از عوامل موثر در کاهش رشد توده زیستی و حتی از بین رفتن آن می باشد. نتایج نشان داد میزان توده زیستی در محیط کشت مناسب تولید آراشیدونیک اسید تا روز ۴ و در محیط کشت مناسب تولید

1. Ratledge

۸-۳ - بررسی تغییرات روغن در حین فرایند تخمیر

تخمیر

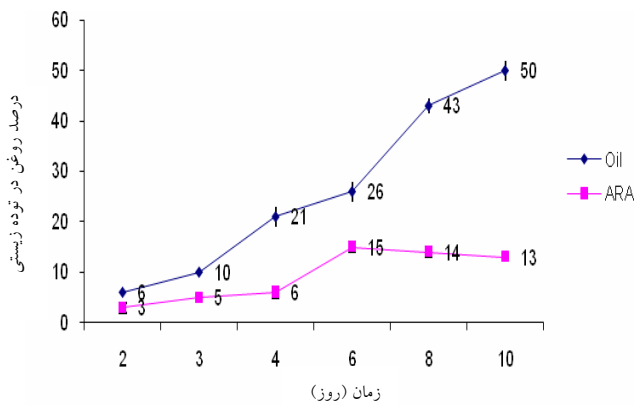
محصول اصلی قارچ موریتیرا روغن می باشد در واقع ریزسازواره منع کربنی را به روغن تبدیل می کند، در شرایط کاهش مواد مغذی از روغن به عنوان منبع انرژی استفاده می کند [۲۶]. در محیط مناسب تولید روغن بیشترین افزایش روغن از روز ۳ به ۴ و روز ۶ به ۸ می باشد. روند این افزایش در روزهای ۲ به ۳ و ۸ به ۱۰ کند تر می باشد. نتایج نشان داد که روغن در محیط کشت مناسب تولید آراشیدونیک اسید از روز ۴ به ۶ بیشترین افزایش را داشته و از روز ۶ به بعد روغن کاهش می یابد (شکل ۶).



شکل ۴ تغییرات میزان قند احیاء در محیط مناسب تولید روغن و آراشیدونیک اسید

۸-۳ - مصرف پروتئین در حین فرایند تخمیر

همانطور که مشاهده می شود در هر دو محیط کشت سریعاً منبع پروتئینی تخلیه نشده و تا روز ۶ در محیط باقی می ماند نتایج بدست آمد مشابه نتایج زو^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۶ می باشد (۲۷). با مقایسه روند مصرف پروتئین و تولید روغن چنین استنباط می شود که با کاهش پروتئین، روند تولید روغن در ریزسازواره افزایش یافته نکته قابل توجه اینکه در محیط بهینه تولید روغن در کمترین سطح پروتئین و در شرایطی که رشد ریزسازواره متوقف شده تولید روغن افزایش قابل توجه ای می یابد. نتایج بدست آمده با نتایج راتلج^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۲ هماهنگی دارد (۲۶) که گزارش کرده بودند کاهش پروتئین محیط کشت عامل اصلی تولید روغن می باشد

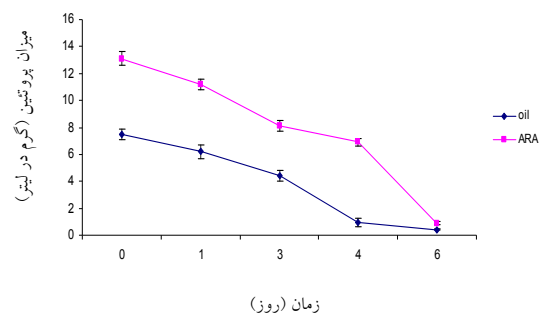


شکل ۶ تغییرات میزان روغن در محیط مناسب تولید روغن و آراشیدونیک اسید

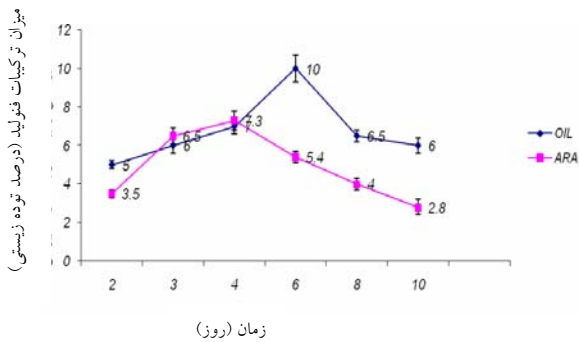
۹-۳ - بررسی تغییرات آراشیدونیک اسید در حین فرایند تخمیر

فرایند تخمیر

نتایج نشان داد که آراشیدونیک اسید در محیط مناسب تولید روغن یک روند افزایشی تند تا روز ۳ را داشته در این شرایط ریزسازواره آراشیدونیک اسید را در دیواره سلولی غشائی برای حفظ سیالیت غشائی ذخیره می کند و بعد از آن روند افزایشی کند و در انتها از روز ۸ به ۱۰ این روند تند شده در این شرایط آراشیدونیک اسید روغن ذخیره ای افزایش می یابد در تحقیقی که توسط سز-یونی^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد (۲۹) نشان دادند در ابتدای رشد، میزان آراشیدونیک اسید در فسفولیپیدها بالا بوده و با افزایش سن میزان آراشیدونیک اسید



شکل ۵ تغییرات میزان پروتئین در محیط مناسب تولید روغن و آراشیدونیک اسید



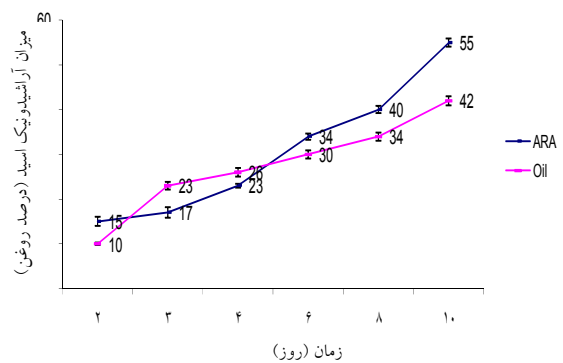
شکل ۸ تغییرات میزان ترکیبات فنولیک در محیط مناسب تولید روغن و آراشیدونیک اسید

۱۱-۳- بحث

نتایج حاصل از بهینه سازی به روش سطح پاسخ نشان داد که افزایش مصرف پودر سویا به عنوان منبع پروتئین باعث شده میزان روغن کاهش و آراشیدونیک اسید افزایش یابد در حالیکه افزایش میزان کربن در سطح بالای ۵۰ گرم در لیتر، میزان روغن و آراشیدونیک را به ترتیب افزایش و کاهش می دهد. در واقع گوهرمایه کلیدی در افزایش آراشیدونیک اسید و روغن به ترتیب منبع نیتروژنی و کربنی می باشد. نتایج بدست آمده مشابه نتایج کوکی^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۱ [۳۰] می باشد که گزارش کرده بودند با افزایش منبع کربنی و کاهش سطح نیتروژن میزان روغن افزایش و آراشیدونیک اسید کاهش می یابد. در تحقیقاتی که توسط راکی و همکاران [۱۶] انجام شد گزارش کردند کاهش میزان منبع قندی با ثابت ماندن منبع نیتروژنی تاثیر مثبتی در تولید آراشیدونیک اسید دارد که با نتایج بدست آمده از این تحقیق هماهنگی دارد. رتلج^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۰ اعلام کردند [۲۸] با افزایش میزان نیتروژن در محیط کشت تولید روغن کاهش می یابد که نتایج بدست آمده گزارشهای اخیر را تایید می کند. آزمون بهینه سازی انجام شده دو محیط بهینه مختلف برای تولید روغن و آراشیدونیک اسید پیش بینی کرد. که در مرحله بعد تغییرات ترکیبات محیط کشت و محصول در حین فرایند تخمیر در این دو محیط بررسی شد.

میزان توده زیستی در محیط کشت مناسب تولید آراشیدونیک اسید تا روز ۴ روند افزایشی داشته در حالیکه در محیط کشت مناسب تولید روغن افزایش توده زیستی تا روز ۵ می باشد و از

در فسفولیپیدها کاهش و در چربی خنثی افزایش می یابد. بیشترین میزان آراشیدونیک اسید در چربی خنثی ذخیره ای (۷۰ تا ۸۰٪) است که در حدود ۲ برابر فسفولیپیدها و ۱۰ برابر اسفنگولیپید-گلیکولیپید می باشد. روند تولید آراشیدونیک اسید در محیط مناسب تولید آراشیدونیک اسید همواره رو به افزایش است مخصوصا وقتی تولید روغن در محیط کشت متوقف می شود (شکل ۷).



شکل ۷ تغییرات میزان آراشیدونیک اسید در محیط کشت مناسب تولید روغن و آراشیدونیک اسید

۱۰-۳- بررسی تغییرات ترکیبات فنولیک در حین

فرایند تخمیر

از آنجایی که این گونه فارچی توانایی تولید روغن بالایی داشته چنین استنباط شد که سازو کار به منظور محافظت از این ترکیب حیاتی که مورد نیاز رشدش می باشد را داشته باشد. در همین راستا میزان ترکیبات فنولیک در حین فرایند رشد ریزسازواره اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که در محیط کشت مناسب تولید روغن روند افزایش ترکیبات فنولیک بیشتر از محیط کشت مناسب تولید آراشیدونیک اسید می باشد. ترکیبات فنولیک تا روز ۶ در محیط مناسب تولید روغن افزایش می یابد و از آن به بعد شروع به کاهش می کند. در محیط مناسب تولید آراشیدونیک اسید ترکیبات فنولیک تا روز ۴ افزایش می یابد و از آن به بعد کاهش می یابد. این روند با روند رشد توده زیستی هماهنگ می باشد (شکل ۸).

1. Koike
2. Ratlage

که معمولاً رابطه عکسی بین سرعت رشد و نرخ تجمع روغن در ریزسازواره‌ها وجود دارد. تحقیقات انجام شده نتایج بدست آمده از این تحقیق را تایید می‌کند.

در محیط بهینه تولید آراشیدونیک اسید روند کاهش پروتئین از روز ۱ به ۳ شدید بوده در این روزها روند افزایش توده زیستی نیز افزایش یافته است نکته قابل توجه اینکه از روز ۲ به ۳ مصرف گلوکز بالاست همزمان در این روز مصرف پروتئین نیز بالاست این افزایش مصرف با افزایش همزمان توده زیستی و روغن همراه است

در محیط کشت بهینه تولید روغن نیز بر همین ترتیب می‌باشد در شرایطی که مصرف گلوکز بالا است مصرف پروتئین نیز افزایش می‌یابد. در روز ۳ به ۴ که مصرف پروتئین و گلوکز بالا می‌باشد توده زیستی و روغن افزایش قابل توجه ای می‌یابند درحالیکه در روز ۶ به ۸ میزان مصرف قند احیاء بالا است در حالیکه پروتئین به پایین ترین حد خود رسیده و رشد توده زیستی متوقف شده است در این شرایط افزایش روغن قابل توجه می‌باشد. در محیط کشت بهینه تولید روغن کاهش پروتئین عامل اصلی توقف رشد می‌باشد.

نتایج آزمایشات نشان داد که روند تولید آراشیدونیک اسید نیز با توقف تولید روغن در محیط کشت مناسب تولید آراشیدونیک اسید افزایش قابل توجه ای می‌یابد. در حالیکه در محیط کشت مناسب تولید روغن همواره گلوکز مورد نیاز برای تولید روغن، در اختیار ریزسازواره می‌باشد و تا انتهای رشد تغییر منبع انرژی برای ریزسازواره بوجود نمی‌آید و همواره تولید آراشیدونیک اسید روند افزایشی کندتری نسبت به محیط کشت بهینه تولید آراشیدونیک اسید دارد.

در تحقیقی که توسط پنگ^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شده بود [۳۳] نشان دادند که میزان تولید آراشیدونیک اسید با تخلیه گلوکز و توقف ذخیره سازی روغن در محیط افزایش قابل توجه ای می‌یابد که با نتایج بدست آمده از این تحقیق هماهنگ می‌باشد. نتایج تحقیق اروشین^۴ و همکاران در سال ۲۰۰۰ [۱۷] حاکی از آن بود که افزایش رشد با افزایش تولید روغن همراه می‌باشد در حالیکه آراشیدونیک اسید در فاز ساکن افزایش یافته در واقع

آن به بعد توده زیستی در هر دو محیط کاهش می‌یابد. ریزسازواره به علت کاهش مواد مغذی محیط و تولید محصولات ثانویه، وارد فاز سکون و مرگ می‌شود. در این مرحله قارچ که در محیط به صورت گویچه می‌باشد، از هم گسیخته و شروع به خرد و شکسته شدن می‌کند. کاهش اندازه و خرد شدن ریشه به علت تجزیه آنزیمی داخل سلولی می‌باشد در عین حال ریزسازواره به نیروی مکانیکی حساس تر می‌شود و تحت تاثیر نیروی مکانیکی همزن شروع به تخریب می‌کند. تحقیقات نشان داده که کاهش گلوکز و نیتروژن محیط کشت از عوامل اصلی ضعیف شدن دیواره سلولی بوده و باعث شده تا ریشه‌ها تحت تاثیر نیروی همزدن آسیب ببینند (۳۰). از این رو چنین تحلیل می‌شود که در اواخر فاز رشد به علت کاهش گلوکز و نیتروژن ریزسازواره به نیروی مکانیکی ناشی از همزدن حساس شده و شروع به تخریب و کاهش وزن می‌کند.

در محیط کشت مناسب تولید آراشیدونیک اسید بعد از توقف رشد ریزسازواره، مصرف گلوکز شدت یافته و میزان قابل توجه ای روغن در ریزسازواره ذخیره می‌شود. روند کاهش گلوکز با افزایش روغن در مرحله که رشد ریزسازواره متوقف شده هماهنگ می‌باشد. در حالیکه در مرحله رشد ریزسازواره میزان کاهش گلوکز با میزان تولید روغن مطابقت ندارد. در محیط مناسب تولید آراشیدونیک اسید، از روز ۲ به ۳ کاهش شدید گلوکز با افزایش همزمان روغن و توده زیستی همراه می‌باشد درحالیکه در روز ۶ که رشد متوقف شده، کاهش شدید قند با افزایش شدید روغن همراه بوده است. در مورد محیط کشت مناسب تولید روغن نیز به همین شکل است تا روز ۶ که ریزسازواره رشد کرده تولید روغن روند افزایشی کندی داشته از روز ۶ به بعد که رشد متوقف شده است روند تولید روغن شدیداً تحت تاثیر مصرف گلوکز افزایش می‌یابد. زو^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۶ [۲۷] گزارش کردند که تجمع اصلی روغن با توقف رشد ریزسازواره صورت می‌پذیرد. همچنین نشان دادند که رشد ریزسازواره تحت تاثیر میزان گلوکز محیط کشت است و مقداری از گلوکز صرف افزایش توده زیستی می‌شود. در تحقیقی کیم^۲ و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام دادند [۳۲] نشان داده شده

3. Peng
4. Eroshin

1. Zhu
2. Kim

- and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Progress in Lipid Research*, 47: 107–126.
- [4] Streekstra, H. (1997). On the safety of *Mortierella alpina* for the production of food ingredients, such as arachidonic acid. *Journal of Biotechnology*, 56: 153–165.
- [5] Nisha, A., Rastogi, K. N. and Venkateswaran, G. (2011). Optimization of media components for enhanced arachidonic acid production by *Mortierella alpina* under Submerged Cultivation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16: 229–237.
- [6] Karl, H., Ruoff, U. and Blüthgen, A. (2002). Levels of dioxins in fish and fishery products on the German market. *Chemosphere*, 49: 765–773.
- [7] Papanikolaou, S., Papanikolaou, M. and Aggelis, G. (2004). Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology*, 95: 287–291.
- [8] Park, E. Y., Koike, Y., Higashiyama, K., Fujikawa, S. and Okabe, M. (1999). Effect of nitrogen source on mycelia morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88: 61–67.
- [9] Park, E. Y., Hamanaka, T., Higashiyama, K. and Fujikawa, S. (2002). Monitoring of morphological development of the arachidonic acid producing filamentous microorganism *Mortierella alpina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 706–712.
- [10] Radwan, S. S. and Soliman, S. S. (1988). Arachidonic acid from fungi utilizing fatty acids with shorter chains as sole source of carbone and energy. *Journal of Genetic and Microbiology*, 134: 387–393.
- [11] Jang, H. D., Lin, Y. Y. and Yang, S. S. (2005). Effect of culture media and condition on polyunsaturated fatty acid production by *Mortierella alpina*. *Bioresource Technology*, 96: 1633–1644.
- [12] Jin, M. J., Huang, H., Xiao, A. H., Zhang, K., Liu, X. and Peng, C. (2008). A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Biotechnol Letters*, 30: 1087–1091.
- [13] Sandra, D. D. and Suresh, S. N. (2005). Implications for the use of *Mortierella* fungi in

مرحله ساکن مرحله تبدیل اسیدهای چرب اشباع به غیراشباع می باشد.

در تحقیق که توسط زو^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد [۲۷] چنین گزارش کردند که هنگامی که ذخیره سازی روغن متوقف می شود میزان قابل توجه ای آراشیدونیک اسید افزایش می یابد. همچنین در گزارشات مشابه ای، نتایج مرجع ۱۷ و ۳۴ نشان داد، که در فاز مرگ ریزسازواره از منبع روغنی برای تولید محصول هایی مانند آراشیدونیک اسید استفاده می کند.

با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیقات انجام شده چنین تحلیل می شود که هنگامی ریزسازواره با کمبود گلوکز و مواد مغذی مواجه می شود از روغن به عنوان منبع انرژی استفاده کرده در واقع منبع کربنی از گلوکز به روغن تغییر می یابد و با توجه به اینکه روغن در اثر تجزیه، اسیدهای چرب بلند زنجیره در اختیار ریزسازواره قرار می دهد با انرژی کمتری نسبت به منبع کربنی گلوکزی آراشیدونیک اسید بوجود می آید از اینرو در اواخر فرایند، تولید آراشیدونیک اسید افزایش می یابد.

میزان ترکیبات فنولیک توده زیستی در محیط کشت تولید روغن به صورت قابل توجه ای بیشتر از محیط کشت مناسب آراشیدونیک اسید می باشد. با افزایش رشد توده زیستی میزان ترکیبات فنولیک افزایش و با کاهش رشد کاهش می یابد. با توجه به اینکه ترکیبات فنولیک از آنتی اکسیدان های اولیه به شمار می روند چنین می توان تحلیل کرد که با افزایش روغن میزان ترکیبات فنولیک برای جلوگیری از فساد اکسیداتیو روغن افزایش می یابد.

۴- منابع

- [1] Annunziata, A. and Annunziata, R. (2011). Functional foods development in the European market: A consumer perspective. *Journal of Functional Foods*, 3: 223–228.
- [2] Roncone, M., Bartlett, H. and Eperjesi, F. (2010). Essential fatty acids for dry eye: A review. *Contact Lens and Anterior Eye*, 33: 49–54.
- [3] Hikiji, H., Takato, T., Shimizu, T., Ishii, S. (2010). The roles of prostanoids, leukotrienes,

1. Zhu

- from lipid for gas chromatography analysis. *Analytical Chemistry*, 38: 514-518.
- [23] Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- [24] Waterhouse, A. L. (2002). Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957: 21-36.
- [25] Strobel, R. J. and Sullivan, G. R. (1999). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (second ed.), ASM press, Washington, DC. pp: 80-93.
- [26] Ratledge C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem Soc Transactions*, 30: 1047-1050.
- [27] Zhu, M., Yu, L., Li, L., Zhou, P. and Li, C. (2006). Optimization of arachidonic acid production by fed-batch culture of *Mortierella alpina* based on dynamic analysis. *Enzyme Microbiology Technology*, 38: 735-740.
- [28] Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. Y. and Okabe, M., (1999). Image analysis of morphological change arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *J. Bioscience and Bioengineering*, 87: 489-494.
- [29] Sze Yuen, H. (2008). Genetic, lipidic and proteomic characterization of an arachidonic acid producing fungus, *Mortierella alpina*. University of Hong Kong, pp: 348.
- [30] Koike, Y., Cai, J., Higashiyama, K., Fujikawa, S. and Park E. Y. (2001). Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. *Journal of Bioscience and Bioengrny*, 91: 382-389.
- [31] Prosser, J. I. (1979). A model for hyphal growth and branching. *Journal Gen Microbiol*, 111: 153- 164.
- [32] Kim, H. (1997). Lipid production in fungi. PhD. Thesis. Auburn University, Alabama, USA.
- [33] Peng, C., Huang, H., Ji, X., Liu, X., You, J., Lu, J. and Cong, L. (2010). A temperature-shift strategy for efficient arachidonic acid fermentation by *Mortierella alpina* in batch culture. *Biochemical Engineering Journal*, 53: 92-96.
- the industrial production of essential fatty acids. *Food Reserch Internatinal*, 38: 445-467.
- [14] Hou, C. T. (2008). Production of arachidonic acid and dihomo-gama-linolenic acid from glycerol by oil-producing filamentous fungi, *Mortierella* in ARS Culture Collection. *J Industrial Microbiol Biotechnology*, 35: 501-506.
- [15] Zhu, M., Yu, L. J., Li, W., Zhou, P. P. and Li, C.Y. (2005). Optimiztion of arachidonic acid production by fed-bath culture of *Mortierella alpina* based on dynamic analysis. *Enzyme Microbial Technology*, 38: 735-740.
- [16] Rocky-Salimi, K., Hamidi, Z. and Abbasi, S. (2011). Statistical optimization of arachidonic acid production by *mortierella alpina* CBS 754.68 in submerged fermentation. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9: 11-12.
- [17] Eroshin, V. K., Dedyukhina, E. G., Satroudinov, A. D. and Chistyakova, T. I. (2002). Growth-coupled lipid synthesis in *Mortierella alpina* LPM 301 a producer of arachidonic acid. *Microbiology*, 71: 169-72.
- [18] Zhu, M., Zhou, P. P. and Yu, L. J. (2003). Extraction of lipid from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technology*, 84: 93-95.
- [19] Singh, A. Ward, O. P. (1997). Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 1-5.
- [20] Sakuradani, E., Hirano, Y., Kamada, N., Nojiri, M., Ogawa, J. and Shimizu, S. (2004). Improvement of arachidonic acid production by mutants with lower n-3 desaturation activity derived from *Mortierella alpina* 1S-4. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66: 243-248.
- [21] Folsch, J., Lees, M. and Sloane-Stanely, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- [22] Metcalf, L. C., Schmitz, A. A. and Pelka, J. R. (1996). Rapid preparation of methyl esters

Investigation of metabolism of *Mortierella alpina* in optimal condition for oil and arachidonic acid production using response surface methodology (RSM)

Samad loui, H. R. ¹, Hamidi, Z. ^{2*}, Alavi, S. M. ³, Sahari, S. A. ⁴, Abbasi, S. ²

1. M.Sc. student of Faculty of Agriculture, Food Science and Technology Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Faculty of Agriculture, Food Science and Technology Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Assist. Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Plant Physiology Department, Tehran, Iran.
4. Professor, Faculty of Agriculture, Food Science and Technology Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: 89/5/23 Accepted: 89/10/8)

In this research, optimal condition on oil and arachidonic acid production by *mortierella alpina* CBS 754.68 was investigated using response surface methodology. Two factors which influencing arachidonic acid and oil production; including carbon source (glucose) in five levels (45.8, 50, 60, 70 and 74.14 g/l) and nitrogen source (soybean meal) in five levels (7.92, 10, 15, 20 and 22.07 g/l) were studied. Arachidonic acid and oil yield varied insignificantly in response to changes in concentration of soybean meal and glucose. The model predicted that, maximum production of AA (that is, up to %56.40) and oil (that is, up to %50.13) could be achieved using the medium containing (glucose 50.35 and soybean 18.30 g/l) and (glucose 70 and soybean 10 g/l), respectively. In the next stage change the medium composition and biomass during fermentation was investigated in two medium optimized. The results showed that oil and arachidonic acid production significant increase with fungi and storage oil stopped respectively. Phenolic compounds are directly related with cell growth rate and the amount of fungi oil.

Keyword: *Mortierella alpina*, Fermentation, Arachidonic acid, Oil, Response surface methodology

* Corresponding Author E-Mail Address: hamidy_z@modares.ac.ir