

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

مریم السادات میرباقری^۱، ایرج نحوی^{۲*}، داوود بی ریا^۳

۱- دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان.

۲- استاد گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان.

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان.

(تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲)

چکیده

اسید های چرب ضروری شامل خانواده امگا (۳ و ۶) به وسیله انسان سنتز نمی شوند، بنابراین ضروری اند تا از طریق منابع غذایی تامین شوند. این نوع اسید های چرب، پیش ساز انواع پروستاگلاندین ها و لوکوترین های مهمی در درمان انواع بیماری ها ایفا می کنند. گاما لینولینیک اسید (GLA) از مهمترین اسید های چرب امگا ۶ است که در درمان بسیاری از بیماری های قلبی و عروقی و سرطان مورد استفاده قرار می گیرد. سویه های قارچی مخصوصا زیگومایست ها از بهترین تولید کنندگان لیپیدهای با ارزش حاوی اسیدهای چرب ضروری به شمار می روند. 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 روکسی DSM1194 بود. ۵ پسماند روغنی مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان تولید لیپید، وزن خشک بیومس، اسیدهای چرب ضروری GLA، لینولنات از انواع امگا ۶ و آلفالینولنات از انواع امگا ۳ بررسی شد. از آنجا که میزان تولید GLA توسط این قارچ قابل توجه بود با استفاده از روش طرح آزمایشات به روش عاملی جزیی ۱/۲ 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 ۷۲ ساعت و دمای ۲۸ درجه در پسماند روغنی به دست آمده از رستوران (R1) صورت گرفت و میزان GLA با اعمال شرایط بهینه از ۵۶،۴ به ۸۲/۲۳ میلی گرم بر لیتر افزایش یافت. در ضمن منبع کربن و منابع نیتروژن مورد استفاده اثر متقابل معناداری در سطح ۵ درصد داشتند در حالی که دو منبع عصاره مخمر و سولفات آمونیوم نسبت به هم اثر تداخلی نشان ندادند.

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

* مسئول مکاتبات: i.nahvi@sci.ui.ac.ir

۱- مقدمه

آب پنیر، ضایعات کشاورزی، پساب روغن زیتون و ضایعات میوه صورت گرفته است. در تولید امگا ۳ و ۶ توسط قارچ‌ها میزان هوادهی بالا، pH اولیه، مرفولوژی قارچ و نوع محیط کشت از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۶-۱۳). 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. ۵ 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 گامالینولات و آلفالینولات با استفاده از روشهای فرکشنال و پاسخ سطح صورت گرفت و یک محیط کشت بهینه طراحی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- میکروارگانسیم و شرایط محیط کشت

سویه قارچی، *Mucor rouxii* DSM 1194 از کلکسیون میکروبی DSM آلمان خریداری شد. 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 1×10^7 اسپور توسط لام توما داخل محیط تولید، تلقیح شد. محیط کشت تولید پایه شامل $7 \text{KH}_2\text{PO}_4$ گرم بر لیتر، $2/5 \text{Na}_2\text{HPO}_4$ گرم بر لیتر، 4MgSO_4 گرم بر لیتر، $2/5 \text{CaCl}_2$ گرم بر لیتر، 3FeCl_3 گرم بر لیتر، $2/5 \text{ZnSO}_4$ گرم بر لیتر، $6/5 \text{MnSO}_4$ گرم بر لیتر، $5/5 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ گرم بر لیتر و $5/5$ 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 F1، F2، پساب روغنی کارخانه شیلان کیش اصفهان، F3 پسماند روغنی کارخانه ناز اصفهان، R1، 2 پسماندهای روغنی رستوران ها و فست فودهای سطح شهر اصفهان بود.

اسیدهای چرب ضروری شامل انواع امگا ۳ و ۶ 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 ۶ در درمان بیماری‌های دیابت، سرطان، روماتوئید آرتریت، تنگی عروق و فشار خون به اثبات رسیده است. (۴-۱). انواع امگا ۳ از الفالینولات به دست می‌آید که شامل ایکوزاپنتانوییک اسید (EPA) و دوکوزا هگزائونوییک اسید (DHA) است و نقش مهمی در بهبود بیماری‌های قلبی-عروقی دارند. آراشیدونیک اسید اصلی‌ترین امگا ۶ مغز است و همراه با DHA در توسعه مغز کودکان اهمیت دارد (۶ و ۵). انواع گیاهان مخصوصا دانه‌های روغنی و ماهی از منابع تولید اسیدهای چرب ضروری‌اند اما امروزه میکروارگانسیم‌های 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 میکروارگانسیم‌ها، 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 اسیدهای چرب غیر اشباع هستند که آنها را در هیف‌های خود ذخیره می‌نمایند. سویه های کائینگاملا^۱، موکور^۲، مورتیرالا^۳ و ریزوپوس^۴ در جهت تولید اسیدهای چرب ضروری به خصوص GLA مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۲-۷).

در تولید 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،

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

۲-۲- اندازه گیری وزن خشک

بیومس به دست آمده پس از ۷۲ ساعت از طریق کاغذ واتمن شماره ۱ 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 ۱۰۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد و سپس وزن خشک نمونه ها محاسبه شد (۱۷).

۲-۳- استخراج لیپید

بر اساس روش اصلاح شده Bligh&Dyer انجام پذیرفت بدین ترتیب که پس از جداسازی سلولها و شستشو، به هر نمونه میزان ۱۰ میلی لیتر HCl ۴ مولار اضافه شد و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ تا ۲ ساعت قرار گرفت. پس از هیدرولیز اسیدی، ۲۰ میلی لیتر محلول کلروفرم:متانول به نسبت ۱:۱ به هر نمونه اضافه شد و در دمای محیط به مدت ۲ تا ۳ ساعت شیک شدند. با سانتریفیوژ با دور ۲۰۰۰ g به مدت ۵ 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 (۱۳ و ۱۸).

۲-۴- آنالیز اسید چرب

ابتدا اسیدهای چرب موجود در لیپید متیل استره شدند بدین ترتیب که به ۵۰ میلی گرم از نمونه لیپید میزان ۱ میلی لیتر تولوئن و ۲ میلی لیتر از محلول ۱٪ سولفوریک اسید در متانول اضافه شده و نمونه ها یک شب در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس ۵ میلی لیتر از ۵٪ NaCl و ۵ 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.

۲-۵- شناسایی ترکیب اسیدهای چرب

شناسایی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) مدل ۴۱۳-۱۹۰۹۱J 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 ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فاز ساکن آن ۰/۲۵ میکرومتر) بود. از دمای ثابت ۲۶۰°C برای ستون و فشار گاز ۶/۱۲ psi در محل خروجی سیلندر برای گاز حامل، استفاده شد. مقدار ۱ 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 ۰/۹۹۹ رسم شد [۱۹].

۲-۶- بهینه سازی تولید اسیدهای چرب و لیپید با استفاده از روشهای طراحی آزمایش و آنالیز

آماري

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 جزئی ۱/۲ با ۳ تکرار در نقطه مرکزی مطالعه شد. این متغیرها در دو سطح بالا (+۱) و پایین (-۱) مورد بررسی قرار گرفتند. برای این کار ۴۸ 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 و آلفا

تشخیص داده شدند. جدول مقایسه 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 بنابراین 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/لیپید (w/w))، اسیدهای 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) آزمایشها در ۳ تکرار با انحراف معیار $+0.3$ انجام شده است.

لینولنیک اسید (ALA) و لینولنات 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 لینولنات از انواع امگا ۶ و لینولنات و DHA از مهمترین اسید چرب های ضروری تولید شده توسط این قارچ

میزان اسیدهای چرب ضروری در لیپید کل (میلی گرم بر گرم)

پسماند روغنی	وزن خشک بیومس (گرم بر لیتر)	لیپید کل (گرم بر گرم)	بازده (w/w %)	C18:2	C18:3	C 18:3	C22:6
				لینولنات (n-6)	گامالینولنات (GLA) (n-6)	آلفالینولنات (ALA) (n-3)	DHA (n-3)
F1	۸/۳	۳/۴۳	۴۱/۳۷	۱۰۴/۲۳	۴۰/۸۵	۲۸/۶	۵/۹۸
F2	۱۱/۸۹	۳/۸۸	۳۲/۶	۴۵/۱۵	۳۷/۳۵	۱۴/۵	-
F3	۹/۱	۴/۳۸	۴۸/۲۲	۹۴/۸	۲۳/۱۳	۳۴/۳	-
R1	۱۰/۱۱	۶/۳۶	۶۳	۱۰۸/۸۵	۵۶/۴	۳۸	۴/۴۳
R2	۹/۶۳	۳/۴۲	۳۵/۵	۷۰/۱۲	۴۲/۴۸	۳۳/۲	۸/۲۳

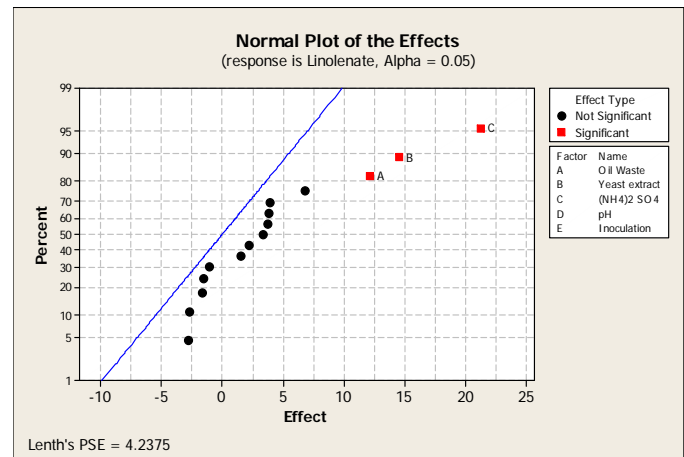
۳-۲- بهینه سازی

تولید GLA هستند که این معنادار بودن در نمودار شکل ۱ مشخص شده است $P-value < 0.05$. معنادار بودن آزمایش را نشان می‌دهد.

نتایج طرح فرکشنال به صورت ۱/۲ فرکشن با ۵ فاکتور مشخص نمود که به ترتیب سه فاکتور عصاره مخمر، سولفات آمونیوم و منع کربن (پسماند روغنی) دارای بیشترین تاثیر معنادار بر

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

شماره آزمایش	پسماند روغنی A	عصاره مخمر B	سولفات آمونیوم C
۱	۴	۰/۵۵	۰/۵۵
۲	۴	۱/۳۱	۰/۵۵
۳	۹/۰۵	۰/۵۵	۰/۵۵
۴	۴	۰/۵۵	۰/۵۵
۵	۷	۱	۱
۶	۴	۰/۵۵	۰/۵۵
۷	۴	۰/۵۵	۰/۵۵
۸	۱	۰/۱	۰/۱
۹	۴	۰/۵۵	۱/۳۱
۱۰	۴	۰/۵۵	-۰/۲۱
۱۱	۷	۰/۱	۰/۱
۱۲	۱	۱	۰/۱
۱۳	۱	۱	۱
۱۴	۱	۰/۱	۱
۱۵	۴	۰/۵۵	۰/۵۵
۱۶	۴	-۰/۲۱	۰/۵۵
۱۷	۷	۱	۰/۱
۱۸	-۱/۰۵	۰/۵۵	۰/۵۵
۱۹	۷	۰/۱	۱



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. جدول ۳ آنالیز واریانس نتایج پاسخ سطح را نشان می‌دهد. ارزش F طرح آزمایش ۷/۴۹ بود 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 برهم کنش بین آنها A, B و همین طور A, C برهم 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 ۳ آنالیز واریانس نتایج به دست آمده از آنالیز پاسخ سطح در تولید GLA با استفاده از *Mucur rouxii* DSM 1194

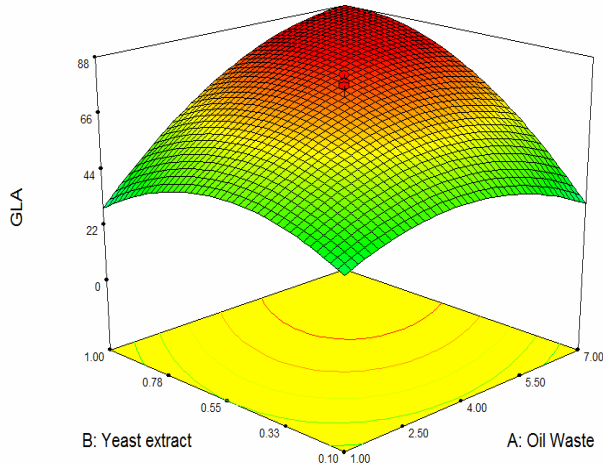
عوامل	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل	۱۶۱۸۸/۶	۹	۱۷۹۸/۰۱	۷/۴۹	۰/۰۰۳۱
A پسماند روغنی	۲۴۵۶/۰۶	۱	۲۴۵۶/۰۶	۱۰/۲۲	۰/۰۱۰۹
B عصاره مخمر	۲۱۴۶/۶۷	۱	۲۱۴۶/۶۷	۸/۹۳	۰/۰۱۵۲
C سولفات آمونیوم	۲۷۰۱/۸۳	۱	۲۷۰۱/۸۳	۱۱/۲۴	۰/۰۰۸۵
AB	۲۰۲۶/۱۳	۱	۲۰۱۶/۱۳	۸/۳۹	۰/۰۱۷۷
AC	۱۳۰۵/۶۱	۱	۱۳۰۵/۶۱	۵/۴۳	۰/۰۴۴۷
BC	۰/۰۲۰	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			

R²: ۰/۸۸ ; Adj R²: ۰/۷۶ ; Pred R²: ۰/۱۱; C.V.%: ۳۲/۵۱

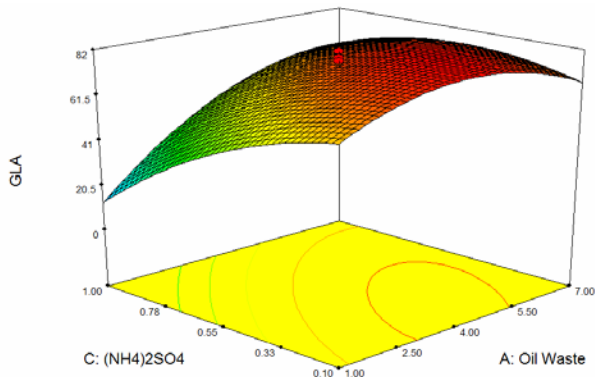
$$GLA = +75.26 + 13.41A + 12.54 B - 14.07C + 15.88AB + 12.78 AC - 0.050BC - 13.43A^2 - 15.90B^2 - 9.04C^2$$

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

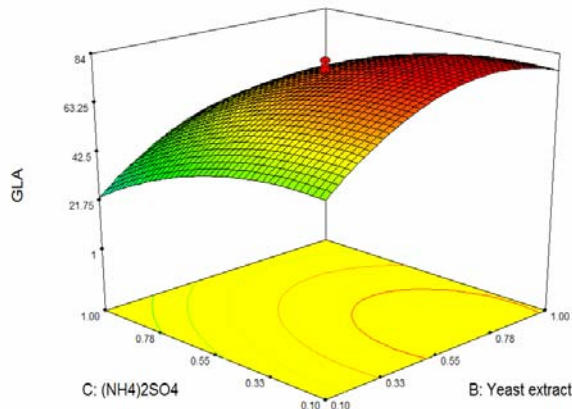
نرم افزار بر اساس داده‌های به دست آمده و روش‌های آماری ریاضی، معادله‌ای را برای مقدار تولید اسید چرب GLA پیشنهاد می‌کند. اعتبار کار آماری معادلات چند جمله‌ای به وسیله تحلیل واریانس است. معادله زیر ارتباط تولید با مقادیر غلظت منابع کربن و نیتروژن را نشان می‌دهد. اثر متقابل این عوامل نیز با ضریب مشخص شده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



شکل ۳ صفحه کانتور و رویه تولید GLA در سطوح متفاوت پسماند روغنی و عصاره مخمر در قارچ *Mucor rouxii* DSM 1194

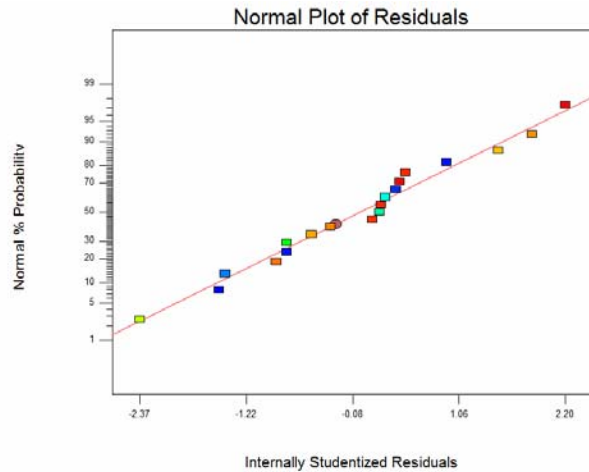


شکل ۴ صفحه کانتور و رویه تولید GLA در سطوح متفاوت پسماند روغنی و سولفات آمونیوم در قارچ *Mucor rouxii* DSM 1194



شکل ۵ صفحه کانتور و رویه تولید GLA در سطوح متفاوت عصاره مخمر و سولفات آمونیوم در قارچ *Mucor rouxii* DSM 1194

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).



شکل ۲ 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. شکل ۳ صفحه کانتور و تولید GLA در سطوح مورد مطالعه پسماند روغنی و عصاره مخمر را نشان می‌دهد و شکل ۴ صفحه کانتور و تولید GLA در سطوح مورد مطالعه پسماند روغنی و سولفات آمونیوم را نشان می‌دهد. شکل ۵ 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.

تداخل منابع کربن و نیتروژن و نوع منبع نیتروژن نیز 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. روش CCD 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 تولید گامالیونولیک اسید تنها به پایسختی ها در مورد این متغیر پرداخته شد اما در ضمن طبق پیشگویی و طراحی آزمایش این روش که در جدول ۴ آمده است برای تولید مقادیر مختلف لیپید، وزن خشک، GLA، لینولئات و لینولئات، آزمایشات صورت گرفت و نتایج به دست آمده نزدیک بودن پیشگویی انجام شده با نرم افزار را به واقعیت تایید نمود. نرم افزار مقادیر ۰/۵/۹۴٪ برای پسماند روغنی، ۰/۸۵ گرم بر لیتر برای عصاره مخمر و ۰/۰۳۹ برای سولفات آمونیوم را پیشنهاد نمود و مقادیر پیش بینی شده و واقعی به دست آمده نشان داد این پیش بینی از در مورد GLA ۸۷/۲۹ میلی گرم بر لیتر بود که طبق آزمایش صورت گرفته مقدار ۸۲/۲۳ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. این نوع طراحی آزمایش به روش RSM به وسیله Aminesh و همکاران (۲۰۰۶)، Mamatha و همکاران (۲۰۰۷)، Shivastava و همکاران (۲۰۰۸)، Ahmed و همکاران (۲۰۰۹)، Rocky-salimi و همکاران (۲۰۱۱) نیز در موزد بهینه سازی اسیدهای چرب و لیپید میکروبی در قارچ‌های متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است.

Papanikolaou و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن از قارچ مورتیرلا آلپینا^۱ تولید لیپید با بازده ۵۰٪ و همین محققین در سال ۲۰۰۷ تولید لیپید با استفاده از قارچ کایننگاملا اچی نولاتا را با استفاده از منبع کربن گلوکز^۲ با بازده ۳۵٪ گزارش نمودند (۲۰ و ۱۳). همچنین بر طبق گزارشات Ratledge در سال ۲۰۰۵، بازده تولید لیپید در ریزوپوس آرهیزوس^۳ ۵۷٪ بود. Mamatha در سال ۲۰۱۰ با بررسی قارچ-های موکور هیمالیس^۴ و موکور روکسی^۵، به ترتیب بازده ۲۴/۳۵٪ و ۲۷/۱۲٪ در تولید لیپید را گزارش نمود (۲۱ و ۲۲). استفاده از پساب روغن زیتون، آب پنیر، روغنهای گیاهی و ضایعات کشاورزی نیز در تولید لیپید میکروبی مورد توجه قرار گرفته است (۱۶-۱۳). 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 (۲۰ و ۱۷). در مقادیر بالای نیتروژن مهار تولید لیپید و تشکیل اسیدهای چرب مخصوصا GLA اتفاق می‌افتد. این واقعیت توسط Certik و Shimizu در سال ۱۹۹۹ و Ratledge در ۱۹۹۴ تایید شده است (۲۴ و ۲۳). یافته‌های حاصل از بهینه سازی در این پژوهش نیز این نکته را به اثبات رساند که

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

جدول ۴ مقادیر بهینه شده و تخمین زده شده توسط نرم افزار در روش RSM

عامل	لیبید(گرم بر لیتر)	وزن خشک(گرم بر لیتر)	GLA(میلی گرم بر لیتر)	لینولئات (میلی گرم بر لیتر)	لینولئات (میلی گرم بر لیتر)
پیش بینی	۴/۶۳	۵/۸	۸۷/۳۹	۸۰/۸۴	-
واقعی	۵/۰۱	۵/۳۴	۸۲/۲۳	۸۵/۱۲	۱۰۸/۷۵

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] Jeenor 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. Spherolipids Production by *Candida*

۴- سپاسگزاری

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

۵- 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 dihomog-linolenic acid in man. Br Med J. 2: 1441-44.
- [3] Vassilopoulos D, Zurier RB, Rossetti RG, Tsokos GC. 1997. γ -linolenic acid and dihomog-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

- 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.
- 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

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 roles 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.

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