بررسی اسیدچرب غیر اشباع تولید شده از گونه قارچی CBS 754.68 *Mortierella alpine* در محیط های کشت پلی ساکاریدی هیدرولیز شده

حمیدرضا صمدلوئی [۱*]، ساناز نور محمدی [۲]، حامی کابوسی [۳]

۱- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود.
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت ا.. آملی ، آمل، ایران.
۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۰۹)

چکیده

با توجه به اهمیت آراشیدونیک اسید در تغذیه انسان، گونه کپکی *مورتیرلا آلفینا* به علت تولید مقادیر قابل توجه ای از آراشیدونیک اسید مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. از آنجایی که گونه قارچی *مورتیرلا آلفینا* توانایی مصرف منابع کربنی پلی ساکاریدی را ندارد، در این پژوهش پلی ساکاریدهای گیاهی با عصاره آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس لیکویی آمیلو فاسینس* تثبیت شده، هیدرولیز شدند و با فرموله کردن محیط کشت، روند تولید اسیدهای چرب غیراشباع و توده زیستی قارچی *مورتیرلا آلپینا* سویه ۷٥٤،٦٥ بررسی شد. در مرحله اولیه به منظور رشد گونه قارچی در محیط کشت پیچیده، پلی ساکارید ها با عصاره آنزیمی آلفا آمیلاز گونه باکتری تثبیت شده *باسیلوس لیکویی آمیلو فاسینس* هیدرولیز شدند. نتایج نشان داد که در اثر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، میزان قند احیای تولیدی از عصاره جوانه ی گندم، ارزن و گندم به ترتیب ۱۰۲/۵۷، ۵۷/۵۰ و ۵۱/٦۲ گرم بر لیتر بدست آمد. محیط هیدرولیز شده با منبع پروتئینی پودر سویا و پپتن فرموله شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان وزن خشک توده ی زیستی *مورتیرلا آلفینا* در محیط کشت فرموله شده جوانه ی گندم (۳/۷ درصد محیط کشت) و کمترین آن از محیط کشت برنج (۱/۷۲ درصد محیط کشت) بدست آمد. بررسی پروفایل اسید چرب مورتیرلا نشان داد که بیشترین درصد اسید چرب لینولئیک اسید(٤۱/۸۷ درصد روغن) در محیط کشتی با منبع کربنی ذرت، اولئیک در منبع کربنی برنج (۳۰/٦۱ درصد روغن) و آراشیدونیک اسید (۲۷/٥٤ درصد روغن) در منبع کربنی سیب زمینی بدست آمد.. نتایج نشان داد که منبع کربنی تاثیر قابل توجه ای در پروفایل اسید چرب و اسید چرب غالب روغن مورتیرلا دارد و از این رو تغییر منبع کربنی می تواند دامنه وسیعی از اسید های چرب چند غیراشباع را در این گونه میکروبی ایجاد کند.

کلید واژگان: *مورتیرلا آلفینا* ، تثبیت، آراشیدونیک اسید ، آلفا آمیلاز

[*] مسئول مکاتبات: hsamadlouie@yahoo.com

۱- مقدمه

آراشیدونیک اسید (۵،۸،۱۱،۱٤-سیس ایکوزاتترانوئیک اسید[1]) از مهمترین اسیدهای چرب ضروری است که در اندام ها، عضلات، بافت های خونی و همراه با فسفولیپیدها[2] به عنوان لیپید ساختمانی نقش مهمی در سلامتی انسان دارد. از آنجا که این اسید چرب در توسعه شبکه عصبی نوزادان نارس ضروری است بسیاری از سازمان ها از جمله سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد[3] و سازمان بهداشت جهانی[4] پیشنهاد کردند که از آن به عنوان مکمل غذای کودک استفاده شود[۱]. میزان پایین آراشیدونیک اسید در بافت های حیوانی و گیاهی، همچنین وجود آلاینده های محیطی در روغن های دریایی که منبع اصلی آراشیدونیک اسید می باشد تولید این اسید چرب ضروری را با مشکلات جدی مواجه کرده است[۳-۲] . بعد از اندکی پژوهش دانشمندان پی بردند که پروتزوا، جلبک و قارچ منبع مناسبی برای تولید روغن با اسیدهای چرب چند غیراشباعی است. در بین ریزسازواره های روغنی، کپک‌ها بعلت توانایی تولید محدوده وسیع‌تری از اسیدهای چرب مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. در بین گونه های قارچی، گونه‌هایی از قارچ رشته‌ای *مورتیرلا*[5] مورد توجه قرار گرفته که می‌توانند بیش از ٤۰ درصد چربی در خود ذخیره کنند و بیشتر از ٤۰ درصد این میزان را آراشیدونیک اسید تشکیل می‌دهد[٤-۵]. نتایج تحقیقات اخیر نشان داده که ترکیبات محیط کشت تاثیر قابل توجه ای بر رشد و پروفایل اسید های چرب قارچ *مورتیرلا آلفینا* دارد [۷-٤]. همچنین تحقیقات وسیعی در زمینه استفاده از منابع کربنی با توجه به اهمیت آن در تولید محصول از گونه قارچی *مورتیرلا آلفینا* شده است. از این رو منابع مختلف کربوهیدراتی عموما مونوساکاریدها مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است [۹-۸] . با در نظر گرفتن این نکته که منابع کربنی نشاسته توسط این گونه میکروبی قابل تجزیه نمی باشد تحقیقات اندکی در راستای استفاده از منابع نشاسته ای در تولید محصول از گونه قارچی *مورتیرلا آلفینا* صورت گرفته است[۱۱-۱۰] . از این رو با در نظر گرفتن اهمیت و کثرت منابع کربنی نشاسته ای در طبیعت در این پژوهش منابع نشاسته ای (جوانه گندم، گندم، ارزن، جوی دوسر، سیب زمینی، ذرت، برنج و چوبک[6]) با عصاره آنزیمی حاصل از گونه باکتریایی *باسیلوس آمیلو لیکویی فاسینس*[7] تثبیت شده در بستر آلژینات هیدرولیز شدند و سپس این محیط کشت با استفاده از منبع نیتروژنی و عناصر معدنی فرموله شد و تاثیر آن در تولید اسیدهای چرب غیراشباع و توده زیستی از گونه قارچی *مورتیرلا آلفینا*[8] بررسی شد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

موادشیمیایی مورد استفاده در این تحقیق همه ازشرکت مرک آلمان خریداری شدند .

۲-۲- فعال سازی میکروارگانیسم

پودر خشک شده انجمادی[9] باکتری *باسیلوس آمیلولیکویی فاسینس* از سازمان علمی پژوهشی و صنعتی ایران تهیه شد. پس از فعال سازی، برای آزمون های بعدی در دمای $٤^{\circ}C$ نگهداری شد. قارچ *مورتیرلا آلفینا* از مجموعه میکروبی کشور هلند[10] خریداری شد و به صورت میسلیوم در لوله آزمایش آگار شیب‌دار[11] ، در درجه حرارت $٢٢^{\circ}C$ و مدت زمان ۷ روز کشت داده شد و سپس در یخچال با درجه حرارت $٤^{\circ}C$ نگهداری شد. برای جلوگیری از ضعیف شدن میکروارگانیسم هر ٦ ماه گونه های پاساژ داده شده و مقدار از قارچ بر روی محیط کشت شیب دار که سطح آن با روغن معدنی پوشیده شده بود در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگه دار شد.

۲-۳- محیط کشت توسعه تلقیح

باکتری *باسیلوس آمیلولیکویی فاسینس* در محیط کشت نوترینیت براث[12] به مدت ۱۸ ساعت در دمای $٣٧^{\circ}C$ و ۱۵۰ دور بر دقیقه[13]

1. Eicosatetraenoic acid
2. *Phosph*olipids
3. Food and agriculture organization of the united nations (FAO)
4. World health organization (WHO)
5. *Mortierella*

6. *Acanthophyllum bracteatum*
7. *Bacillus amyloliquefaciens* PTCC1732
8. *Mortierella alpina* CBS 754.68
9. Lyophilized powder
10. Centraalbureau voor Schimmelcultures
11. Slant agar
12. Nutrient broth
13. Revolutions Per Minute (rpm)

توسعه تلقیح داده شد[١٢]. از سوسپانسیون میسلیومی قارچ *مورتیرلاآلفینا* برای تلقیح در محیط کشت‌های تولید محصول استفاده شد[١٣]. برای تهیه سوسپانسیون میسلیومی، به محیط کشت حاوی٤٠ گرم بر لیتر گلوکز و ٢٠ گرم بر لیتر عصاره مخمر ریسه قارچ که از سطح محیط کشت PDA کنده شده بود تلقیح شد در دمای ٢٥ درجه سانتی گراد ١٧٠ دور بر دقیقه به مدت سه روز کشت داده شد[١٤].

٢-٤- آماده سازی منابع کربنی

به منظور تهیه عصاره نشاسته ای، بافت سیب زمینی، چوبک، عصاره جوانه، عصاره گندم، ارزن، جوی دوسر و ذرت پس از خرد شدن در ٥٠٠ میلی لیتر از آب مقطر در حال جوش غوطه ور شد و در ١٠٠°c به مدت ٧ دقیقه پخته شدند. پس از صاف کردن عصاره ها میزان نشاسته با استفاده از روش تیوند[1] و همکاران ١٩٧٢ اندازه گیری شد و سطح نشاسته در تمامی نمونه ها برای هیدرولیز آنزیمی در سطح ١٥٠ گرم در لیتر تنظیم شد [١٥].

٢-٥- تهیه ژل جهت تثبیت و تولید گویچه های حاوی باکتری

٧ گرم از الکل پلی وینیل[2] و ١/٤ گرم از آلژینات سدیم[3] در ١٠٠ میلی لیترآب مخلوط شدند (pH توسط اسید بوریک روی عدد ٨ تنظیم شدند). پس از استریل محلول، ١٠ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی باکتری باسیلوس توسعه تلقیح داده شده، به مخلوط پلی وینیل الکل و آلژینات سدیم اضافه شد. مخلوط سلولهای باکتری، پلی وینیل الکل و آلژینات سدیم، قطره قطره به محلول حاوی کلریدکلسیم ٣٪ افزوده شد. دانه ٢ ساعت در کلریدکلسیم ٣٪ در دمای٤°c نگهداری شده و سپس شستشو با آب مقطر استریل به منظور تولید آلفا آمیلاز به محیط کشت فرموله شده آن که در ذیل آمده اضافه شد[١٧-١٦].

٢-٦- محیط تولید آلفا آمیلاز و استخراج آنزیم

به عصاره نشاسته ای برنج با غلظت ١٣٠ گرم بر لیتر، ٨٠ گرم بر لیتر پپتون[4] ، ١ گرم بر لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات[5]، ٠/٣ گرم بر لیتر منیزیم سولفات ٧ آبه[6]، ٠/١ گرم بر لیتر کلسیم کلرید[7] و ٠/٧ گرم بر لیتر سدیم کلرید[8] اضافه شد و pH محیط با سود[9] ١ نرمال روی ٥ تنظیم شد. پس از افزودن ٣٠٠ دانه از گویچه های که حاوی ١٠^١٢×٣/٣٣ سلول باکتری بوده در محیط تولید آلفا آمیلاز به مدت ١٨ ساعت در دمای ٣٧°c و ١٥٠ دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان واکنش محیط کشت در ٤٠٠٠ دور در دقیقه به مدت ١٠ دقیقه در٤°c سانتریفوژ شد. محلول رویی به عنوان منبع آنزیمی مورد استفاده قرارگرفت [١٨].میزان فعالیت آنزیم محلول رویی با استفاده روش میلر[10] و همکاران (١٩٥٩)، ٢٠٧ یونیت در میلی لیتر بدست آمد[١٩]. محلول آنزیمی به ١٠٠ سی سی از محیط با pH ٥/٩ حاوی نشاسته های١٥٠ گرم در لیتر گندم، جو، سیب زمینی، برنج، ذرت، ارزن و جوانه گندم اضافه شد و در دمای ٦٥°c به مدت ٣ ساعت و ١٥ دقیقه نگهداری گردید. در این تحقیق قندهای احیا شده با استفاده از معرف دینیتروسالسیلیک اسید (دی ان اس)[11] اندازه گیری شدند[٢٠].

٢-٧- محیط تولید محصول از گونه قارچی *مورتیرلا آلفینا*

با توجه به تحقیقات صمدلوئی و همکاران در سال ٢٠١٤ [٢١] و جنگ[12] و همکاران در سال ٢٠٠٥ [١١] برای تولید بیشترین میزان اسیدهای چرب غیر اشباع از گونه قارچی مورتیرلا آلفینا میزان قند احیا روی ٤٠ گرم بر لیتر به عنوان منبع کربنی، ٢٠ گرم بر لیتر پودرسویا، ٢/٥ گرم بر لیترپپتون به عنوان منبع نیتروژنی و ٣ گرم بر لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ٠,٢ گرم بر لیترسولفات منیزیم ٧ آبه و ٢/٥ گرم بر لیتر پتاسیم نیترات [13] به عنوان عناصر معدنی به محیط کشت افزوده شد. pH محیط روی ٦ تنظیم پس از تلقیح سوسپانسیون مسیلیومی قارچ به مدت ١٠ روز در دمای ٢١°c و ١٨٠ دور بر دقیقه تخمیر شد[١٣و١٦].

1. Thivend
2. PVA
3. Sodium alginate
4. peptone wather

5. KH2PO4
6. MgSO4.7H2O
7. CaCl2
8. NaCl
9. NaOH
10. Miller
11. 3,5-Dinitrosalicylic acid
12. Jang
13. KNO3

۲-۸- اندازه گیری وزن خشک سلولی

جداسازی توده میسلیومی توسط فیلتر کردن خلاء با استفاده از کاغذ صافی واتمن[1] شماره ٤١،بر روی قیف بوخنر[2] مجهز به پمپ خلاء صورت گرفت. سپس برای اندازه‌گیری وزن خشک سلولی آنها را بر روی شیشه‌های ساعت قرار داده و به مدت ۲ ساعت در آون با درجه حرارت$105^{\circ}c$ خشک شد[۲۲].

۲-۹- استخراج لیپید و اندازه گیری اسید چرب

استخراج چربی های توده زیستی خشک شده در دستگاه سوکسله با استفاده از حلال هگزان صورت گرفت[۲۳]. برای اندازه گیری اسیدهای چرب، چربی های استخراجی به روش سرد مشتق‌سازی، متیله و به دستگاه گاز کروماتوگرافی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به روش مت کالف و همکاران (۱۹۹٦) تزریق شد[٢٤].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تاثیر آنزیم خارج سلولی باسیلوس آمیلولیکویی بر محیط های کشت نشاسته ای

در این مرحله از تحقیق pH سوبستراهای نشاسته در سطح ۵/۹ تنظیم شده و به منظور دسترسی به فعالیت ۱۲ واحد در میلی لیتر آنزیم که بهترین تاثیر بر نشاسته دارد[۲۵]. ۵/۸ سی سی محلول آنزیم با فعالیت۲۰۷ واحد در میلی لیتر آنزیم به ۱۰۰ میلی لیتر از محیط سوبستراهای نشاسته ای ۱۵۰ گرم در لیتر، اضافه شد در دمای $٦٥^{\circ}c$ به مدت ٤ ساعت و ۱۵ دقیقه جهت تولید قند احیا، قرار گرفت[٢٦]. میزان قند احیا تولید شده در شکل(۱) آورده شده است.

نتایج نشان داد که در اثر فعالیت آنزیمی تولیدی از گونه باکتری باسیلوس *آمیلولیکویی فاسینس* بر روی منبع کربنی جوانه گندم میزان قند احیاء به ۱۰۰ گرم در لیتر در محیط کشت رسید که بالاترین سطح تولیدی قند احیاء در تیمارهای اعمالی بود که نشان دهنده حداکثر اثر این آنزیم بر ساختار پلی ساکاریدی نشاسته جوانه گندم می باشد. نتایج تحقیقات نشان داده که با توجه به عمل ترکیبی آلفا و بتا آمیلاز دانه ی جوانه زده، میزان آسیب دیدن ساختار گرانول های نشاسته جوانه گندم افزایش یافته [۲۷] و متعاقبا با توجه به نتایج این تحقیق اثرگذاری آلفا آمیلاز میکروبی تقویت شده است. قند احیای بدست آمده از هیدرولیز آنزیمی عصاره ی ارزن، بیش از عصاره ی گندم بدست آمد. در تحقیقاتی تستر[3] و کای[4] (۲۰۰٤) نشان دادند که نسبت سطح به حجم گرانول ها با میزان هیدرولیز آنزیمی گرانول رابطه ی عکس دارد [۲۸].

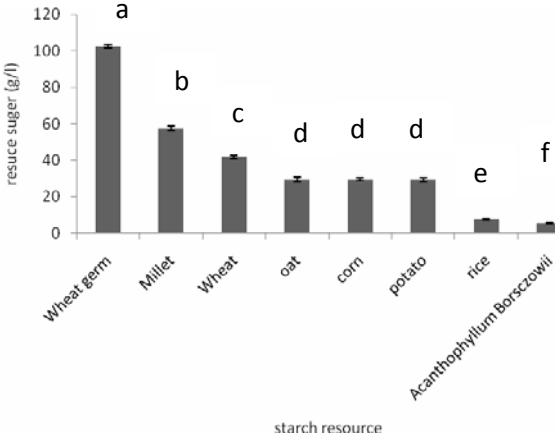

Fig 1 production of reduced sugar in different formulated starchy media

شکل گرانول های ارزن به صورت چند وجهی وگندم به صورت عدسی می باشد. از آنجایی که نسبت سطح به حجم گرانول های چند وجهی بیشتر از گرانول های عدسی می باشد [۳۰-۲۹]، بنابراین آنزیم برای هیدرولیز ارزن با پتانسیل سطحی بیشتری مواجه می شود. همچنین گزارش شده است که مقدار هیدرولیز آمیلازی نشاسته با محتوی آمیلوز رابطه ی عکس دارد و نشاسته های با آمیلوز بالا، نسبت به هیدرولیز آنزیمی مقاوم است [۳۱]. محتوای آمیلوز ارزن ۱۹/۸٪ و محتوای آمیلوز گندم ۲۸/۸٪ می باشد[۳۲]. از این رو ممکن است دلیل قند احیای تولیدی بیشتر ارزن در مقایسه با گندم علاوه بر نسبت سطح به حجم بالاتر گرانول ارزن به محتوای آمیلوز کم آن نیز مرتبط باشد. نتایج نشان داد که میزان قند احیای گندم بیشتر از جوی دوسر است. بخش های از نشاسته ای جوی دو سر اتصال های قوی با پروتئین بتاگلوکان (پلی ساکارید غیر نشاسته ای دیواره ی سلولی) و چربی دارد. از این رو چربی به صورت کمپلکس، قابلیت دسترسی زنجیره های آمیلوز را برای جایگاه های فعال آنزیم آلفا آمیلاز را کاهش می دهد[۳٤-۳۳]. در تحلیل دیگر گزارش شد برخلاف گرانول های گندم که به صورت مجزا است گرانول های

1. Whatman filter paper
2. Buchner funnel
3. Tester
4. Qi

مرکب بسته بندی شده جو دو سر [۳۵ و ۳۰] ظرفیت آمیلازها را برای اتصال به سطوح گرانول ها کاهش می دهد و به طور بالقوه هیدرولیز را محدود می کنند. گالانت[1] و همکاران (۱۹۹۲) و همچنین والنتودی[2] و همکاران (۱۹۹۳) دریافتندکه بخش های کریستالی گرانول ها نشاسته فقط کمی هضم می شوند و بیشترین میزان هضم در مناطق آمورف اتفاق می افتد[۵۰-۴۹].از آنجائیکه مناطق کریستالی ذرت بیشتر از گندم است [۳۷-۳٦] از این رو هیدرولیز ذرت نسبت به گندم کمتر می باشد. نتایج نشان داد که قند احیای تولید شده از سیب زمینی کمتر از گندم شد.. از آنجانیکه نشاسته های غده ای از نوع B بوده نسبت به نشاسته غلات که نوع A مقاومتر به هیدرولیز آنزیمی بوده [۳۸] همچنین گرانول های نشاسته ی سیب زمینی آمیلوز بالایی دارد[۳۹] این عوامل در کنار نتایج تحقیقات ساریکایا[3] و همکاران (۲۰۰۰) [٤۰] و همچنین هلبرت[4] و همکاران (۱۹۹٦) [٤۱] که نشان داند که هر دو نوع هیدرولیز گریز از مرکز یاسنترفوژال[5] (هیدرولیز مناطق و لایه ها) و هیدرولیز مایل به مرکز یا سنتریپتال[6] (هیدرولیز مستقیم سطح به هسته) در گرانول های نشاسته گندم اتفاق افتاد در حالی که تنها هیدرولیز گریز از مرکز در سیب زمینی ایجاد می شود می توان هیدرولیز کم آنزیمی نشاسته سیب زمینی را تحلیل کرد. مقدار قند احیای تولید شده توسط هیدرولیز نشاسته ی برنج ناچیز بوده است. این مطلب را می توان به محتوای آمیلوز و ساختار مرکب گرانول های آن نسبت داد. درصد آمیلوز نشاسته سیب زمینی ۲۳٪ و برنج ۳۷٪ می باشد[۳۲ و ۳۱] .همچنین قطر گرانول های مرکب برنج تا ۱۵۰ ماکرومتر نیز برسد که این مقدار، از قطر گرانول های سیب زمینی (حداکثر ۱۰۰ ماکرومتر) بیشتر است.گرانول های مرکب برنج ظرفیت آمیلازها را برای اتصال به سطوح گرانول ها به شدت کاهش می دهند و هیدرولیز به طور بلقوه محدود می شود که می توان آن را با نشاسته ی مقاوم به هیدرولیز مقایسه کرد [۳۰]. میزان نشاسته ی موجود در چوبک بسیار ناچیز است و زنجیره ی اصلی کربوهیدرات موجود در آن، دی-گالاکتوز هایی با اتصالات آلفا (۱-٦) می باشد[٤۲] از این رو قند احیاء اندکی در اثر هیدرولیز آنزیمی بدست آمد.

1. Gallant
2. Valentudie
3. 3Sarikaya
4. Helbert
5. centrifugal
6. centripetal

۳-۲- وزن خشک توده زیستی

به منظور بررسی رشد و تولید محصول از گونه قارچی *مورتیرلا آلفینا*، قند احیاء محیط کشت با استفاده از آب یا گلوکز در سطح ٤۰ گرم بر لیترتنظیم شد. نتایج نشان داد که میزان قابل توجه ای توده زیستی در محیط کشت فرموله شده، تولید گردید.

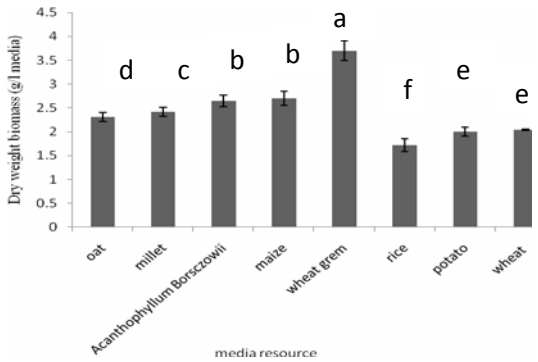

Fig 2 the amount of dry weight biomass in different starchy media

.با هیدرولیز شدن پلی ساکاریدهای انتخابی و فرموله کردن آن با منبع نیتروزنی شرایط برای رشد گونه قارچی *مورتیرلا آلفینا* فراهم شد. با بررسی میزان قند احیاء بدست آمده از فعالیت آنزیم گونه ریزسازواره باسیلوس چنین برداشت می شود که محیط جوانه گندم مناسبترین محیط برای تجزیه نشاسته و ایجاد قند احیاء می باشد با بررسی رشد گونه قارچی *مورتیرلا آلفینا* (شکل ۲) چنین نتیجه شد که بیشترین میزان توده زیستی در همین محیط کشت تولید شده است با در نظر گرفتن این نکته در این محیط میزان نشاسته باقیمانده به حداقل مقدار خود رسیده و حداکثر قند احیاء تولید شده و با توجه به تحقیقاتی که توسط جانگ[7] و همکاران در سال ۲۰۰۵ [۱۱] که گزارش کردند گلوکز از نشاسته تاثیر بیشتری در تولید توده زیستی دارد میزان تولید قابل توجه توده زیستی در این محیط کشت را به میزان بالای گلوکز و نشاسته حداقلی می توان نسبت داد. با بررسی میزان توده زیستی بدست آمده با نتایج سایر محققین که در سال های اخیر بر روی این گونه میکروبی در شرایط ارلن تکان خورنده انجام شده بود بالاترین درصد توده زیستی در این تحقیق بدست آمده است (جدول-۱)

7. Jang

Table 1 amount of dry weight biomass of *Mortierella alpina* in other researches

microorganism	Dry weight biomass (g/l)	references
Mortierella alpina CBS 754.68	37	This reaserch
Mortierella alpina LPM301	25.61	[43]
Mortierella alpina	31.2	[13]
Mortierella alpina SC9	30.51	[44]
Mortierella alpina M6	22.5	[1]
Mortierella alpina ATCC 32222	33.5	[14]
Mortierella alpina DSA-12	20-25	[45]
Mortierella alpina HK1	36.2	[46]
Mortierella alpina ZQ 9998	25	[47]

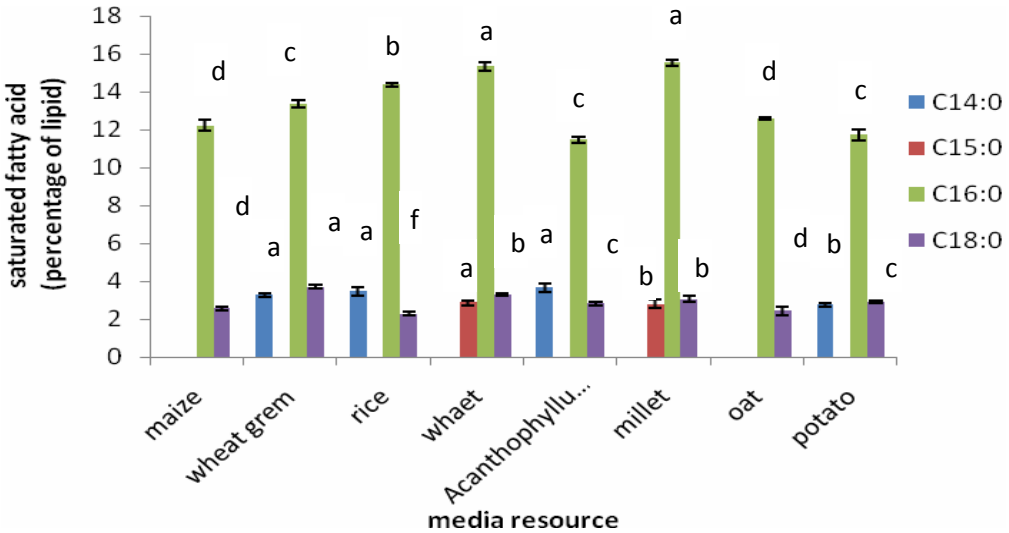

Fig 3 profile of saturated fatty acids in different media

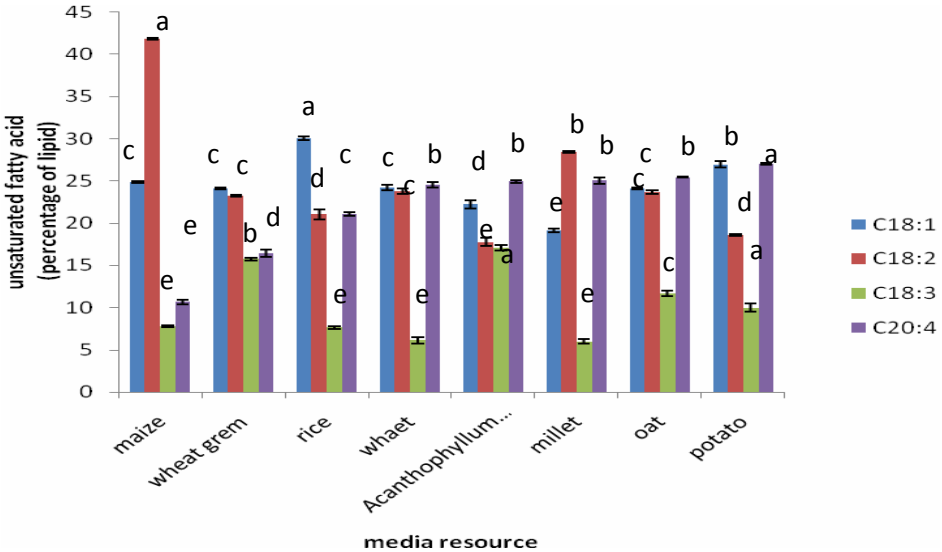

Fig 4 profile of unsaturated fatty acids in different media

محیط کشت ذرت محیط مناسبی برای تجزیه آنزیمی توسط گونه باسیلوس نمی باشد از این رو در محیط کشت میزان قند احیاء تولیدی کم در عین حال نشاسته تجزیه نشده بالاست در حالیکه میزان تولید توده زیستی به صورت قابل توجه ای از بقیه محیط کشت ها بالاتر می باشد با توجه به محتوی بالای پروتئین ذرت که حاوی اسید آمینه ضروری مهمی است که از آن شربت ذرت خیسانده تهیه می شود و با توجه به تحقیق اروشین[1] و همکاران در سال ٢٠٠٢ و صمدلوئی[2] و همکاران در سال ٢٠١٤ که گزارش کردن سطح پروتئین تاثیر قابل توجه ای در افزایش رشد توده زیستی دارد [٤٨ و ٢١]. چنین تحلیل می شود که محتوی پروتئین کامل این محیط کشت در افزایش توده زیستی موثر بوده است.

٣-٣- پروفایل اسیدهای چرب

همانطور که در شکل(٣ و ٤) دیده می شود میزان اسیدهای چرب روغن مورتیرلا تحت تاثیر محیط های کشت قرار گرفته است. اسیدهای چرب C_{15} فقط در روغن با منبع کربنی گندم و ارزن دیده شد همچنین اسید چرب C_{14} در منابع کربنی جوانه گندم، برنج و سیب زمینی مشاهده شد. مابقیه اسیدهای چرب اشباع در همه منابع کربنی مشاهده شد و اسید چرب غالب اشباع C_{16} می باشد (شکل ٣).

بالاترین اسید چرب غیراشباع به ترتیب مربوط به اسید چرب لینولئیک اسید(٤١,٨٧٣ درصد روغن) در منبع کرd ذرت، اولئیک در منبع کربنی برنج(٣٠,٠٦١ درصد روغن) ، آراشیدونیک اسید(درصد روغن ٢٧,٠٥٤) در منبع کربنی سیب زمینی و لینولنیک اسید (درصد روغن ١٨) در منبع کربنی چوبک d ت آمد (شکل ٤).

کمترین مقدار آراشیدونیک در محیط کشت ذرت با ١٠,٦٥٧ درصد و جوانه گندم با ١٦,٤٥٩ در صد بدست آمد. با بررسی پروفایل اسید چرب تشکیل دهنده روغن تشکیل دهنده مورتیرلا کشت داده شده در جوانه گندم چنین برداشت می شود که حضور بالای اولئیک اسید با رشد ریزسازواره در ارتباط می باشد با توجه به تحقیق گری[3] و همکاران [٤٩] در سال ٢٠٠٢ از آنجائیکه این اسید چرب یک اسید چرب ساختاری است با افزایش میزان توده زیستی این اسید چرب نیز افزایش قابل توجه ای یافته است. نکته قابل توجه دیگر در پروفایل این روغن درصد لینولنیک اسید (١٦٪) بالای آن می باشد.

با بررسی پروفایل اسید چرب روغن تشکیل دهنده مورتیرلا در محیط کشت ذرت شرایط کاملا متفاوت از محیط کشت گندم جوانه زده می باشد. در این محیط به صورت قابل توجه ای آراشیدونیک آن پایین (١٠٪) است و به صورت قابل توجه ای میزان لینولئیک آن بالا (٤٢٪) است. این اولین بار می باشد که در پروفایل اسید چرب روغن مورتیرلا در این میزان لینولئیک گزارش می شود. با بررسی این پروفایل و متفاوت بوده اسیدهای چرب تشکیل دهنده این محیط کشت چنین برداشت می شود که ساختار ژنتیکی ریزسازواره دستخوش تغییر قابل توجه ای شده که از هیچ مدل مشابه ای که در گذشته ارائه شده پیروی نمی کنند تنها این پروفایل شباهت قابل توجه ای به تحقیقات جارونکیتمانگکول[4] و همکاران در سال ١٩٩٣ [٥٠] دارد که با غیر فعال شدن ژن دلتا ٦ میزان قابل توجه ای لینولئیک در توده زیستی این گونه قارچ تجمع یافته است. با تغییر در این ژن مسیر تولید آراشیدونیک اسید غیر فعال شده و اسید های چرب حد واسط در محیط تجمع یافته اند. از این رو چنین برداشت می شود که در این محیط کشت احتمالا بازدارنده های وجود داشته که ژن دلتا ٦ مسیر تولید آراشیدونیک اسید را غیرفعال کرده و باعث شده اسید چرب لینولئیک در محیط تجمع یابد.

با بررسی پروفایل روغن محیط کشت چوبک چنین برداشت می شود که میزان قابل توجه آراشیدونیک اسید (٢٥٪) در روغن این محیط کشت وجود دارد. بالا بودن میزان آراشیدونیک اسید در محیط کشت چوبک می تواند به علت افزودن قند گلوکز در عین حال پایین بودن میزان نشاسته محیط باشد از این رو چنین تحلیل می شود که نشاسته هیدرولیز نشده می تواند تاثیر منفی در تولید

1. Eroshin
2. samadlouie
3. Gray
4. Jareonkitmongkol

آراشیدونیک اسید داشته باشد. در تحقیق که توسط جانگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام داند نشان دادن که نشاسته نسبت به گلوکز تاثیر کمتری در تولید آراشیدونیک اسید دارد[۱۱]. که با نتایج بدست آمده از این تحقیق هماهنگی دارد.

با بررسی پروفایل اسید چرب در محیط های کشت گندم، سیب زمینی، ارزن و جو دوسر چنین برداشت می شود که میزان آراشیدونیک اسید تولیدی در همه محیط های کشت ذکر شده یکسان و بالا می باشد. در این محیط های کشت هیچ قندی افزوده نشده و قند احیاء محیط کشت ناشی از هیدرولیز نشاسته توسط آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس می باشد. با بررسی میزان رشد توده زیستی آن با اختلاف اندک میزان توده زیستی حدود در یک سطح می باشد که نشان دهنده مشابهت عوامل محیطی این چهار محیط کشت و متناسب با آن تولید آراشیدونیک اسید تقریبا برابر می باشد.

نمونه برنج حداقل میزان تجزیه نشاسته را داشته و از این رو قند احیاء آن به طور قابل توجه ای با گلوکز غنی شده در این محیط کشت میزان آراشیدونیک اسید بسیار پایین است که نشان دهند اثر بازدارندگی نشاسته در تولید آراشیدونیک اسید و تایید نتایج گزارش شده می باشد.

٤-نتیجه گیری کلی

از آنجائیکه منبع اصلی کربنی رشد و تولید محصول از ریزسازواره مورتیرلا عموما گلوکز بوده بررسی سایر منابع کربنی در تولید محصول از این گونه میکروبی می تواند در فرموله کردن محیط و شناخت سایر منابع در تولید محصول از این گونه میکروبی گامی مهمی به حساب آید.. تاثیر فرایند هیدرولیز در تولید قند احیاء از منابع کربنی پلی ساکاریدی نشان داد که بهترین منبع کربنی پلی ساکاریدی که در فرایند هیدرولیز آنزیم میکروبی *باسیلوس لیکویی آمیلو فاسینس* می باشد جوانه گندم است که می تواند این منبع کربنی جایگزین اقتصادی مهمی برای تولید محصول از *مورتیرلا آلفینا* در نظر گرفته شود. در این پژوهش نشان داده شد که ترکیبات و پروفایل اسید چرب مورتیرلا آلفینا شدیدا تحت تاثیر نوع منبع کربنی قرار داشته و در عین حال تغییراتی زیادی در اسیدهای چرب میانی مسیر تولید اراشیدونیک اسید بوجود آمد که با در نظر گرفتن نتایج می تواند این گونه میکروبی در تولید این اسیدهای چرب میانی فرایند نیز مورد توجه قرار بگیرد. نتایج نشان داد که با تغییر منبع کربنی محیط کشت گونه قارچی *مورتیرلا آلفینا* می تواند به عنوان منبع مناسب تولید لینولئیک اسید نیز به شمار آید. در نهایت تاثیر رشد ریزسازواره در تغییر قابل توجه پروفایل اسید چرب و تولید اسیدهای چرب ساختاری مانند اولئیک اسید بیشتر در روغن می باشد

٥- منابع

[1] Zhu M., Yu L. J., Li W., Zhou P. P. and Li C. Y. 2006. Optimization of arachidonic acid production by fed-batch culture of *Mortierella alpina* based on dynamic analysis. Enzyme and Microbial Technology, 38: 735–740.

[2] Higashiyama K., Fujikawa S., Park E. and Shimizu S. 2002. Production of arachidonic acid by Mortierella fungi. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 7: 252–262.

[3] Sakuradani E., Ando A., Ogawa J. and Shimizu S. 2009. Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous *mortierella alpina* breeding. Applied Microbiology and Biotechnology, 84: 1–10.

[4] Yamada H., Shimizu S. and Shinmen Y. 1987. Production of arachidonic acid by *Mortierella elongata* IS-5. Agricultural Biology and Chemistry, 51: 785–790.

[5] Shinmen Y., Shimizu S., Akimoto K., Kawashima H. and Yamada, H. 1989. Production of arachidonic acid by Mortierella fungi: selection of a potent producer and optimization of culture conditions for large-scale production. Applied Microbiology and Biotechnology, 31: 11–16.

[6] Bajpai P., Bajpai P. and Ward, O. 1991. Arachidonic acid production by fungi. Applied and Environmental Microbiology, 57: 1255–1258.

[7] Totani N., Someya K. and Oba, K. 1992. Industrial production of arachidonic acid by Mortierella. pp. 52-60. In: D. J. Kyle, and C. Ratledge (eds.). Industrial Applications of Single Cell Oils. IL, USA, AOCS Press.

[8] Aki T., Nagahata Y., Ishihara K., Tanaka Y., Morinaga T., Higashiyama K., Akimoto K., Fujikawa S., Kawamoto S., Shigeta S,. Ono K. and Suzuki O. 2001. Production of arachdonic acid by filamentous fungus, *Mortierella alliacea* strain YN-15. Journal of American Oil Chemists Society, 78: 599-604.

[9] Janga H. and Yang, S. 2008. Polyunsaturated fatty acids production with a solid-state column reactor. Bioresource Technology, 99: 6181–6189.

[10] Papanikolaou S. Komaitis M. and Aggelis, G. 2004. Single cel oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. Bioresource Technology, 95: 287-291.

[11] Jang H., Lin Y. and Yang S. 2005. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina.* Bioresource Technology, 96: 1633–1644.

[12] Tanyildizi M. S., Ozer D. and Elibol, M. 2007. Production of bacterial α-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation. Biochemical engineering journal, 37(3): 294–297.

[13] Zhu M., Yu L. J. and Wu, Y. X. 2003. An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30: 75–79.

[14] Singh A. and Ward, O. 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.

[15] Thivend P. Mercier C. and Guilbot, A. 1972. Determination of starch with glucoamylase, Methods in Carbohydrate Chemistry (R.L. Whistler, and J.N. BeMiller, eds.) Academic press; New York, p. 100

[16] Bezbradica D., Obradovic B., Leskosek-Cukalovic I., Bugarski B. and Nedovic V. 2007. Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation. Process Biochemistry, 42: 1348–1351.

[17] Zhao C. H., Chi Z., Zhang F., Guo F. J., Li, M., Song W. B. and Chi Z. M. 2011. Direct conversion of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke into single cell oil by co-cultures of *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15 and immobilized inulinase-producing yeast cells. Bioresource Technology, 102: 6128–6133.

[18] Hashemi M., Razavi, H,. Shojaosadati, A. and Mousavi, M. 2010. The potential of brewer's spent grain to improve the production of a-amylase by Bacillus sp. KR-8104 in submerged fermentation system. New Biotechnology, 28(2): 165–172.

[19] Miller, G. L., 195. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry, 31: 426–428.

[20] Bernfeld P., 1955. Amylases, α and β In: Methods in enzymology, vol. 1. New York: Academic Press,149–54.

[21] Samadlouie H., Hamidi-Esfahani Z., Alavi S. M., and Varastegani B. 2014. .Expression analysis for genes involved in arachidonic acid biosynthesis in *Mortierella alpina* CBS 754.68, Brazilian Journal of Microbiology , 45(2): 439–445.

[22] Park E., Koike Y., Higashiyama K., Fujikawa S. and Okabe M., 1999. Effect of nitrogen source on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina.* Bioscience and Bioengineering, 88: 61–67.

[23] 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.

[24] Metcalf L. C., Schmitz A. A. and Pelka, J. R. 1996. Rapid preparation of methyl esters from lipid for gas chromatography analysis. Analytical Chemistry, 38: 514-518.

[25] Welker N. E. and Campbell, L. L. 1967. Comparison of the alpha-amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of Bacteriology, 94: 1131-1135.

[26] Kolusheva T. and Marinova A., 2007. A study of the optimal conditions for starch hydrolysis through thermostable α-amylase. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 42: 93-96

[27] Simsek S., Ohm J-B., Lu, H., Rugg M., Berzonsky W., Alamri S. and Mergoum, M. 2014. Effect of Pre-Harvest Sprouting on Physicochemical Properties of Starch in Wheat. Foods, 3: 194-207.

[28] Tester R.F. and Qi, X. 2004. Molecular basis of the gelatinisation and swelling characteristics of waxy barley starches grown in the same location during the same season. Part I. Composition and alpha-glucan fine structure. Journal of Cereal Science , 39: 47–56.

[29] Tester R. F., Karkalas J. and Qi, X. 2004. Starch—composition, fine structure and architecture. Journal of Cereal Science . 39: 151–165.

[30] Tester R.F., Qi X. and Karkalas, J. 2006. Hydrolysis of native starches with amylases. Animal Feed Science and Technology, 130: 39–54 BeMiller, J,. Whistler, R,. 2009, Starch: Chemistry and Technology, Third edition, Academic Press is an imprint of Elsevier, Boston, 879

[31] Li J. H., Vasanthan T., Hoover R. and Rossnagel, B.G. 2004. Starch from hull-less barley: V. *In vitro* susceptibility of waxy, normal, and high amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. Food Chemistry, 84: 621–632.

[32] Bemiller JN., Whistler R. and Starch, L. 2009. Starch Theory: chemistry and Technology, 3rd Ed. Academic Press, New York.

[33] MacArthur L. A. and D'Appolonia B. L. 1979. Comparison of oat and wheat carbohydrates. II. Starch. *Cereal Chemistry*, 56: 458–61.

[34] Karkalas J., Tester R.F. and Morrison, W.R. 1992. Properties of damaged starch granules. I. Comparison of a new micromethod for the enzymic determination of damaged starch with the standard AACC and Farrand methods. Journal of Cereal Science , 16: 237–251.

[35] Buttrose M.S. 1960. Submicroscopic development and structure of starch granules in cereal endosperms. Journal of ultrastructure research, 4: 231–257.

[36] Gallant D., Mercier C. and Guilbot, A. 1972. Electron microscopy of starch granules modified by bacterial-amylase. Cereal Chemistry, 49: 354–365.

[37] Valetudie J-C., Colonna P., Bouchet B. and Gallant, DJ., 1993, Hydrolysis of Tropical Tuber Starches by Bacterial and Pancreatic α-Amylases. Starch, 45, 270

[38] G´erard C., Colonna P., Bul´eon A. and Planchot V. 2001. Amylolysis of maize mutant starches. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81: 1281–1287.

[39] Planchot V., Colonna P., Gallant D.J. and Bouchet, B. 1995. Extensive degradation of native starch granules by alpha-amylase from Aspergillus fumigatus. Journal of Cereal Science, 21: 163–171.

[40] Sarikaya E., Higasa T., Adachi M. and Mikami, B. 2000. Comparison of degradation abilities of α- and β-amylases on raw starch granules. Process Biochem. 35: 711–715.

[41] Helbert W., Schulein M. and Henrissat B. 1996. Electron microscopic investigation of the diffusion of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase into corn starch granules. International Journal of Biological Macromolecules, 19: 165–169.

[42] Jahanbin K., Gohari A., Moini S., Emam-Djomeh Z. and Masi P. 2011. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a new water-soluble polysaccharide from *Acanthophyllum bracteatum* roots. International Journal Of Biological Macromolecules, 49: 567-572

[43] Eroshin V., Satroutdinov A., Dedyukhin E. and Chistyakova T. 2000. Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* with growth-coupled lipid synthesis. Process Biochemistry, 35: 1171–1175.

[44] Ho S. Y. and Chen, F. 2008. Lipid Characterization of *Mortierella alpina* Grown at Different NaCl Concentrations. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 7903–7909

[45] Hwang B., Kim J., Park C., Park C., Kim Y. and Ryu Y. 2005. High-level production of arachidonic acid by fed-batch culture of *Mortierella alpina* using NH_4OH as a nitrogen source and pH control. Biotechnology Letters, 27: 731–735.

[46] Ho S. Y., Jiang Y. and Chen F. 2007. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) content of the fungus *Mortierella alpina* isolated from soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 3960–3966.

[47] Lan W. Z., Qin W. M. and Yu L. J. 2002. Effect of glutamate on arachidonic acid

production from *Mortierella alpina*. Letters in Applied Microbiology, 35: 357–360.

[48] Eroshin VK., Dedyukhina E. G., Satroutdinov 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.

[49] Gray J., Groeschler S., Le T. and Gonzalez Z. 2002. "Membrane Structure"(SWF). Davidson College. "Membrane Structure" (SWF). Davidson College. Retrieved 2007-01-11.

[50] Jareonkitmongkol S., Shimizu S. and Yamada, H. 1993. Production of an eicosapen taenoic acid-containing oil by delta12 desaturase-defective mutant of *Mortierella alpina* 1S-4. Journal of the American Oil Chemists' Society, 70: 119–123.

Investigation of poly unsaturated fatty acid production from *Mortierella alpine CBS* 754.68 in hydrolyzation polysaccharide media

Samadlooe, H. R. [1*], Noor-mohammadi, S. [2], Kaboosi, H. [3]

1. Assistant Professor of food science and technology, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
2. MSc of food science and technology, Amol University, Amol, Iran
3. Assistant Professor, Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
(Received: 2015/11/15 Accepted: 2016/01/06)

According to important of arachidonic acid in food chain, *Mortierella alpine* as good resource of arachidonic acid was considered by many scientists. In this research, alpha amylase of immobilized *bacillus amyloliquefaciens* was used for hydrolyzing of polysaccharide in order to production reduces sugar. These substrates that hydrolyzed and have high content of reduce sugar were fermented for fatty acid and biomass production by *Mortierella alpine*. The highest levels of reduce sugar were obtained in wheat sprouts (102.57), millet (57.50) and wheat (51.62) respectively. Starch and reduce sugar together in media has great effect on dry biomass. The highest and lowest content of biomass was obtained in wheat sprouts (3.7) and rice (1.72) respectively. The analysis of profile of fatty acid showed that the highest content of commercial fatty acid such as linoleic acid (41.873), oleic acid (30.61) and archidonic acid (27.54) were obtained in corn, rice and potato medium respectively.

Key words: *Mortierella alpine;* immobilization; Arachidonic acid; *Bacillus amyloliquefaciens*; Alpha amylase

* Corresponding Author E-Mail Address: hsamadlouie@yahoo.com