بررسی تولید روغن میکروبی به وسیله *Mortierella alpina*

سپیده حسینی[a]، مهرداد آذین[b*]، مهرداد قوامی[c]، سید ضیاءالدین حسینی مظهری[d]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران
[b] دانشیار و معاون پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهشهای علمی صنعتی ایران
[c] استاد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، تهران
[d] دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، تهران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۵/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۹/۲۱

چکیده

مقدمه: با توجه به اثرات تغذیه ای و دارویی آراشیدونیک اسید در سیستم عصبی انسان مخصوصا نوزادان این اسید چرب در سال‌های اخیر به شدت مورد توجه قرار گرفته و توانسته است در ساختار فرمولاسیون غذای نوزادان قرار گیرد. در این تحقیق به بررسی تولید و استخراج این اسید چرب از اصلی ترین منبع تولید آن که *Mortierella alpina* است پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: جهت افزایش زیست توده از کشت در محیط مایع به روش ناپیوسته استفاده گردید. پس از طی مدت زمان تخمیر زیست توده تولید شده از محیط مایع جدا گشته و روغن آن استخراج گردید. روند رشد و تولید روغن در محیط جایگزین مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: مدت زمان رشد قارچ *M.alpina* را می‌توان به سه ناحیه تقسیم بندی نمود. بدین صورت که در طی دو روز اول رشد بیشترین بازده تولیدی زیست توده و کمترین نرخ تولید روغن وجود دارد. به این ترتیب روند کاهش گلوکز در این دو روز با شدت کمتری صورت می‌گیرد. از روز ۲-۶ با کاهش منبع نیتروژن شدت تولید زیست توده کاهش یافته و متعاقباً تولید روغن شدیدا افزایش و کاهش منبع کربن سریع تر می‌شود. از روز ۶ تا ۱۰ به تدریج تولید زیست توده به نزدیک صفر رسیده و تولید روغن نیز با شدت کمتری صورت می‌گیرد، پس روند تغییرات گلوکز نیز کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: تولید روغن در میکروارگانیسم‌های چربی زا نوعا یک فرایند دو مرحله‌ای است که زمانی آغاز می‌شود که ارگانیسم قادر به ساخت مواد ضروری سلول مثل پروتئین، اسید نوکلئیک و ... نمی‌باشد و یک ماده ضروری اصلی به غیر از کربن و اکسیژن در محیط به اندازه کافی وجود ندارد که معمولا این ماده منبع نیتروژن است. بنابراین باید منبع نیتروژن را در حدی در نظر گرفت که بعد از رسیدن به جمعیت مناسب شرایط برای تولید روغن مناسب گردد. با توجه به تولید روغن و قیمت تمام شده محصول، زمان ۱۲ روز را می توان به عنوان بهترین زمان انکوباسیون در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: *پودر ضایعات نان، روغن میکروبی، گلوکز ،Mortierella alpina*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: azinmehrdad@yahoo.com

jftn.srbiau.ac.ir

مقدمه

علاوه بر کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های میکروبی، روغن‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها نیز مورد توجه می باشد. معمولا برای روغن تولید شده به وسیله میکروب‌ها، اصطلاح روغن تک یاخته یا single cell oil را به کار می‌برند. مهم ترین خصوصیت این روغن‌ها تولید اسیدهای چرب چند غیر اشباعی طویل زنجیر است. تمامی تلاش محققین صنایع غذایی در سده‌های اخیر یافتن روش‌های نوین برای فرآیند تولید، تصفیه و خالص سازی روغن‌ها و چربی‌ها بوده است تا روغنی با خصوصیات صنعتی مطلوب‌تر و طعم و رنگ طبیعی‌تر تولید نمایند. افزایش جمعیت جهان از یک طرف باعث رشد تقاضا برای روغن و چربی‌ها می‌شود و از طرف دیگر جوامع امروزی با این سطح بالای دانش تغذیه ای، به دنبال روغن‌ها و چربی‌ها با ارزش سلامت بخشی بیشتر می باشند. به این ترتیب دیگر منابع رایج گیاهی و حیوانی جوابگوی نیازهای موجود نبوده و به این ترتیب بود که روغن های میکروبی به عنوان منبع جدیدی مطرح گردید. از جمله برتری هایی که باعث انتخاب میکروب به عنوان تولید کننده اسید چرب ضروری به جای منابع مرسوم گردید به شرح زیر است:

۱- به طور ذاتی روغن تولید شده به وسیله میکروب ها دارای اسید چرب مفید بالایی هستند.

۲- به راحتی می توان درصد یک اسید چرب را با تغییر محیط و شرایط کشت تغییر داد.

۳- امکان دستکاری ژنتیکی راحت‌تری نسبت به گیاهان دارند.

۴- نسبت به گیاهان به زمین و فضای کمتری نیاز دارند.

۵- برخلاف برخی از گیاهان ترکیبات سمی ناخواسته‌ای همراه با روغن تولید نمی‌کنند.

۶- آنتی اکسیدان کافی در روغن تولید می‌نماید.

۷- بر خلاف حیوانات و گیاهان دوره تولید کوتاهی دارند.

۸- الگوی بیوسنتز روغن در آن‌ها آشکار است و محیط مناسبی برای تحقیقات بیوشیمی و شناسایی آنزیم‌ها و مواد مورد نیاز در تولید اسید چرب چند غیراشباعی می‌باشند.

۹- بر خلاف گیاهان، آفتی نداشته و متعاقباً نیازی به سموم برای دفع آفات ندارند (Owen *et al.*, 2005; Sandra *et al.*, 2005).

در میان میکروب های تولید کننده اسیدهای چرب چند غیراشباعی در این بررسی از قارچ *Mortierella alpine* که تولید کننده اصلی آراشیدونیک اسید (ARA) است استفاده شده است. از جمله دلایل انتخاب آن می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱- توانایی چربی‌زایی بالا ۲- چربی زایی آسان و منظم ۳- زمان تکثیر کوتاه و سریع ۴- جذب قند بالا ۵- رشد در محیط‌های اسموفیل (دارای غلظت بالایی از قند) ۶- تولید مقادیر بالایی از تری گلیسیرید (تری گلیسیرید به طور مستقیم در محصولات تجاری مصرف می شود) ۷- توانایی در ساخت محدوده وسیعی از اسیدهای چرب ۸- توانایی در ساخت مقادیر بالایی از ARA (این اسید چرب در فرمولاسیون شیر خشک نوزاد، مکمل‌های بدنسازی و مکمل‌های مورد استفاده زنان بار دار و شیرده کاربرد دارد (Fukaya *et al*., 2007; Darios *et al.*, 2006; www.mercksource.com). ۹- در دست بودن موتان‌های متنوع از این قارچ ۱۰- مناسب بودن برای تولید در مقیاس صنعتی ۱۱- ایمن بودن برای مصارف انسانی و دامی (Cohen *et al.,1995; Miller et al.,)* 2007; Cohen *et al.*, 2005; Nes *et al.*, 2006).

گونه *Mortierella* نشان داده است که می‌تواند در محیط کشت‌های با منابع مختلف کربن (مالتوز، لاکتوز، گلوکز، نشاسته محلول، گلیسرول و سدیم استات) رشد نماید. اما بهترین بازده تولید مربوط به گلوکز (۴۶/۱ گرم به ازای هر ۱۰۰۰ گرم محیط کشت) است در حالیکه سدیم استات کمترین میزان تولید زیست توده (۰/۲ گرم به ازای هر ۱۰۰۰ گرم محیط کشت) را می دهد و سایر انواع محیط کشت بازده ای در حدود (۲۲/۳ تا ۳۷/۲ گرم به ازای هر ۱۰۰۰ گرم محیط کشت) را خواهند داشت. در رابطه با کل روغن تولیدی در هر روز از زیست توده، سدیم استات بالاترین میزان را داشته در حالیکه مالتوز کمترین میزان تولید روغن را داشته است. اما زمانی که به بازده تولید زیست توده و روغن با هم توجه شود گلوکز بهترین محیط‌کشت می باشد (Sakuradani *et al.*, 2009). بررسی تولید روغن گونه های مختلف قارچ Mortierella

jftn.srbiau.ac.ir

در دو محیط کشت حاوی گلوکز و عصاره نشان داد که اگر از عصاره مالت استفاده شود میزان تولید زیست توده و ARA نسبت به زمانی که از گلوکز استفاده گردد بیشتر خواهد بود (Barclay, 2003). بررسی‌های تکمیلی که به تاثیر منابع مختلف کربن و نیتروژن بر روی رشد میسلا و محتوای ARA گونه *M. alpina* پرداخت، تایید نمود که این گونه، در محیطی که حاوی گلوکز باشد سریعا رشد می‌کند. ولی در محیط های حاوی فروکتوز، مالتوز، نشاسته محلول و نشاسته ذرت نیز نرخ رشد مشابه ای دارند و تولید آراشیدونیک اسید آن مشابه زمانی است که از گلوکز در محیط استفاده گردیده است. همچنین مشاهده شد که زمانی که از ان- اکتا دکان یا ان- هگزا دکان استفاده شده است، بازده تولید آراشیدونیک اسید ۱/۲ تا ۱/۵ بار بیشتر از زمانی است که از گلوکز استفاده می شود. اگر چه در این حالت میسلا رشد کمتری دارد. در رابطه با منابع نیتروژن عصاره مخمر Corn steep liquor و تفاله سویا منابع مناسبی برای تولید ARA می‌باشد (Singh &Ward, 1997).

مواد و روش‌ها

- مواد شیمیایی مصرفی

کلیه مواد شیمیایی استفاده شده در این آزمایش از شرکت مرک آلمان[1] خریداری شده است. روغن سویای تصفیه شده از شرکت رعنا ایران، پروتئین سویا، تولیدی شرکت پروتئین سویای به پاک، کیت تشخیص کمی گلوکز از شرکت پارس آزمون تهیه گردید.

- میکروارگانیسم و شرایط کشت

قارچ *M. alpina CBS 343/66* از کلکسیون میکروبی هلند خریداری گردید. به منظور فعال سازی میکروارگانیسم *Mortierella alpina*، که در محیط کشت آگاردار عصاره جو (Oat Meal Agar) دریافت شده‌است، از محیط آگاردار عصاره سیب زمینی (Potato Dextrose Agar) استفاده شد. پس از تهیه محیط و استریل کردن آن در اتوکلاو و قبل از سفت شدن محیط آن را در پلیت‌هایی که قبلا در فور استریل شده‌اند ریخته و به آن زمان داده تا محیط سفت شود. سپس یک قطعه از میکروب رشد داده شده و آگار آن از محیط OMA به محیط PDA منتقل شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز در گرم خانه نگهداری گشت. در این مرحله پس از بستن درب پلیت با نوار پارافین باید آن را در سردخانه‌ای با دمای ۱۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد تا از رشد بیشتر آن جلوگیری شود. به منظور حفظ قابلیت حیات و تولید میکروارگانیسم باید هر ۳۰ روز یکبار این کار تکرار گردد (Zhu *et al*., 2006; Chen *et al*., 2005).

به منظور تهیه پیش کشت اولیه از محیط مایع عصاره سیب زمینی (Potato Dextrose Broth) استفاده گردید. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌لیتر از این محیط در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و پس از اتوکلاو و خنک‌شدن محیط، ۲ قطعه یک سانتی‌متری ازمحیط PDA (که حاوی قارچ رشد داده شده است) به آن اضافه گردید و به مدت ۳ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت گردش ۱۵۰ دور در دقیقه شیکر، نگهداری شد (Barclay, 2003). سپس ۱۰ درصد وزنی وزنی از آن به محیط اصلی منتقل گردید. محیط اصلی مورد بررسی به میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر در ارلن‌های ۱ لیتری بافل دار تهیه گردید. پس از ۲۸ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت گردش ۱۵۰ دور در دقیقه با pH اولیه ۶ دوره تخمیر تمام شد و زیست توده آن با استفاده از کاغذ صافی که قبلا توزین گشته بود جدا شد. سپس زیست توده ۲ بار با آب مقطر شسته شده و به منظور آماده سازی زیست توده برای مرحله بعد زیست توده جمع آوری شده بر روی کاغذ صافی به مدت ۴-۶ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد کرده، سپس در دستگاه خشک کن تحت خلا (با خلا ۲×۱۰^{-۱} اتمسفر) به مدت ۲۴ ساعت خشک می‌گردد. به منظور استخراج بهتر روغن، زیست توده بدست آمده با استفاده از هاون چینی پودر گردید. در نهایت با استفاده از دستگاه سوکسله در حداقل دما و زمان ممکنه (۴۰ درجه سانتی گراد/۳ ساعت) روغن استخراج شد.

- ترکیب اسید چرب

بدین منظور، آماده سازی مشتق متیل استر اسید چرب بر اساس استاندارد AOAC با شماره ۹۶۹/۳۳ صورت

[1] Merck

jftn.srbiau.ac.ir

گرفت (Fireston, 1990). سپس ترکیب، آن با دستگاه گازکروماتوگرافی با شناساگر جرمی تعیین گشت. که شرایط آن بدین شرح است: ستون مورد استفاده ستون موئینه به طول ۳۰ متر× ۰/۳۲ میلی متر، درجه حرارت برنامه ریزی شده ستون از ۱۸۰ تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه، دمای شناساگر و محل تزریق به ترتیب۲۶۰ تا۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت گاز هلیم یک میلی‌متر بر دقیقه، برخورد الکترون در شناساگر جرمی با سرعت ۷۰ الکترون ولت (Eroshin *et al*., 2000) .

- **تشخیص کمی گلوکز**

تعیین مقدار گلوکز در محیط کشت با روش فتومتریک صورت پذیرفت به این ترتیب که۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف مخلوط نموده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه‌گذاری شد و جذب نوری نمونه‌ها در برابر شاهد (۱۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف) در طول موج ۵۴۶ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گردید. میزان گلوکز با استفاده از فرمول زیر تعیین می‌گردد

(1)

$$Glu\cos e(mg/dl)=\frac{Abs\ Sample}{Abs\ Std/Cal}\times Conc.Std/Cal(mg/dl)$$

یافته ها

به منظور بررسی خصوصیات و رفتار قارچ در محیط کشت مایع و همچنین دست‌یابی به حداکثر میزان تولید روغن، ۵ محیط کشت ساده که در تحقیقات پیشین مورد استفاده قرار گرفته و تولید زیست توده و روغن قابل توجه‌ای داشته اند انتخاب گردید. سپس تلاش شد تا در شرایط مشابه آزمایشگاهی قارچ مذکور در هر یک از محیط‌های کشت انتخاب شده رشد داده شود که نتایج آن به شرح زیر است:

جدول ۱- میانگین تولید روغن و زیست توده در محیط‌های مورد بررسی

ترکیبات(gL^{-1}) / شرایط	محیط شماره۱	محیط شماره ۲	محیط شماره۳	محیط شماره٤
گلوکز	۱۰۰	۶۶	۱۸	۵۰
عصاره مخمر	۱۱	۲/۵	–	۵
KH_2PO_4	۳/۸	۲	۳	۱
$CaCl_2 . 2H_2O$	–	–	۵/۰	–
$MgCl_2 . 6H_2O$	–	–	۵/۰	–
Na_2SO_4	–	–	۱	–
KNO_3	–	۶	–	–
$MgSO_4 . 7H_2O$	۰/۵	۰/۵	–	۰/۵
$NaNO_3$	۳/۴	–	–	۳
KCl	–	–	–	۰/۵
$CuSO_4$	–	–	–	۰/۰۱
$MnCl_2 .4H_2O$	–	–	–	۴/۳
$FeCl_3$	–	–	–	۱/۴۵
$CoCl_2 . 6H_2O$	–	–	–	۰/۱۳
$ZnCl_2$	–	–	–	۰/۳
آرد سویا	–	–	۵۰	–
روغن سویا	–	–	۱	–
دما	۲۸	۲۸	۲۶	۲۵
pH	۶/۵	۶	۶	۶
منبع	Jie Jin *et al*, 2009	Eroshin *et al*, 2000	Higashiyama *et al*, 1999	Singh &Ward, 1997
میانگین زیست توده تولید شده در ۳تکرار gL^{-1}	۳۳/۶۱	۲۴/۱۷	۱۶/۷۶	۱۱/۴۹
میانگین روغن تولید شده در ۳ تکرار gL^{-1}	۱۶/۷۸	۵/۰۲	۹/۳۷	۵/۲۹

jftn.srbiau.ac.ir

با استفاده از روش ANOVA میانگین زیست توده و روغن تولید شده در محیط کشت‌های مختلف با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج نشان داد که تولید زیست توده و روغن در این ۴ محیط با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارد. البته میزان تولید در شرایط آزمایشگاهی (A) این تحقیق با میزان ذکر شده در مراجعی که از آنها محیط کشت انتخاب شده است (B)، نیز متفاوت می‌باشد. همان طور که در شکل ۱ مشخص است بازده تولید در همه محیط‌ها نسبت به آنچه در مراجع آورده شده است پایین‌تر می‌باشد. علت آن هم احتمالا این است که نوع قارچ *Mortierella alpina* که در هر یک از تحقیقات مورد استفاده قرار گرفته است متفاوت می‌باشد. در محیط شماره ۱ از قارچ *M. alpina* خریداری شده از مرکز ذخایر ژنتیکی ایالات متحده به شماره ATCC16266 استفاده شده است در صورتی که محیط‌های بعدی به ترتیب از قارچ‌های مرکز ذخایر ژنتیکی روسیه به شماره LPM 301، ژاپن از نوع *M. alpina 1S-4*، ایالات متحده به شماره ATCC42430 استفاده کرده‌اند. در حالی که قارچ مورد استفاده در این بررسی به شماره CBS 343.66 می‌باشد که توانایی تولید روغن و زیست توده این قارچ‌ها با یکدیگر متفاوت می‌باشد. در این بین تنها در محیط‌های شماره ۱ و ۲ نرخ بازده‌ای مشابه با آنچه در تحقیقات پیشین دیده شده بدست آمده است. از آنجایی که در این مرحله از تحقیق تنها به دنبال به دست آوردن بیشترین تولید روغن بوده و قیمت تمام شده روغن برایمان مطرح نبوده است، بین محیط شماره ۱ و ۲ محیط شماره ۱ انتخاب گردید. البته بعد از محیط شماره یک، بیشترین میزان روغن از محیط شماره ۳ بدست آمده است. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که از لحاظ رسیدن به حداکثر نرخ تولید زیست توده و روغن مناسب ترین محیط‌ها، محیط شماره۱ و ۳ می‌باشد.

حرف A نشان دهنده روغن و زیست توده تولید شده در این بررسی و حرف B نشان دهنده روغن و زیست توده تولید شده در تحقیقات پیشین در شرایط مشابه می‌باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده ۲ محیط شماره ۱ و ۳ در ۱۰ ارلن یک لیتری که هر کدام دارای۲۰۰ میلی لیتر از محیط کشت می‌باشد تهیه شد و ۱۰ درصد از پیش کشت آماده شده در محیط عصاره سیب زمینی که به مدت سه روز گرم خانه‌گذاری شده است و هم اکنون دارای سلول‌های تازه و فعال می‌باشند، به آن محیط کشت‌ها تلقیح گشت.

نتایج نشان می‌دهد که میانگین تولید روغن و زیست توده در محیط شماره ۱ به ترتیب ۳۵/۱۹ و ۱۹/۴۲ گرم در لیتر می‌باشد. در حالی که این میزان در محیط شماره ۳ به ترتیب ۲۲/۷۶ و ۱۰/۶۴ گرم در لیتر می‌باشد. بنابراین محیط شماره ۱ به عنوان محیط پایه برای این بررسی انتخاب شد.

تولید روغن در میکروارگانیسم‌های چربی زا نوعا یک فرایند دو مرحله‌ای است و زمانی آغاز می‌شود که میکروارگانیسم قادر به ساخت مواد ضروری سلول مثل پروتئین، اسید نوکلئیک و ... نمی‌باشد. به دلیل اینکه یک ماده‌ی ضروری اصلی دیگر به غیر از کربن و اکسیژن در محیط به اندازه‌ی کافی وجود ندارد. (معمولا این ماده منبع نیتروژن است (Singh & Ward, 1997). مغایرت با این اصل معمولا به ندرت اتفاق می‌افتد. حال به بررسی چگونگی رشد قارچ *M. alpine* پرداخته شده است. برای این کار از محیط شماره ۱ استفاده گردید.

- چگونگی تغییرات زیست توده، روغن و گلوکز با گذشت زمان

نمودار۲ روند تغییرات این عوامل را در طی ۱۰ روز کشت نشان می‌دهد. از آنجایی که در تمامی منابع موجود حداکثر بازده محصول (آراشیدونیک اسید) را با توجه به صرفه اقتصادی آن بین ۸ تا ۱۰ روز در نظر گرفته‌اند، در این بررسی نیز روند تغییرات در طول ۱۰ روز مطالعه گردید.

- چگونگی تغییرات pH در مدت زمان کشت

همانطور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود pH در طول مدت زمان کشت تغییرات چندانی نمی‌کند.

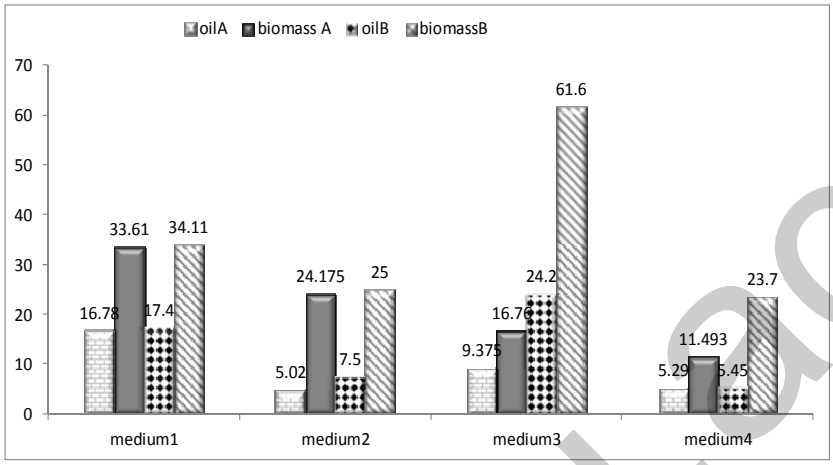
بحث

- انتخاب مناسبترین محیط برای بررسی‌های اولیه

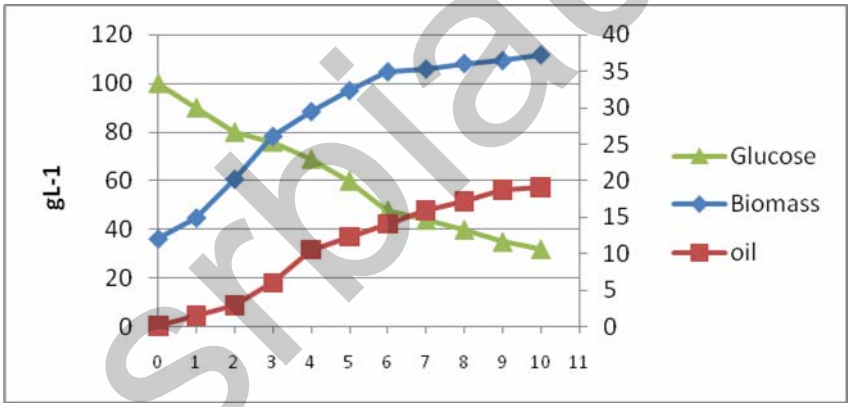
به این ترتیب می‌توان گفت که بازده تولید در محیط کشت شماره ۱ تفاوت معنی داری نسبت به محیط شماره ۳ دارد و میزان تولید آن (محیط شماره ۱) بیشتر از محیط دیگر است. با توجه به روغن تولیدی بیشتری که محیط

jfn.srbiau.ac.ir

شماره ۱ دارد این محیط به عنوان محیط کشت پایه و اصلی در این بررسی انتخاب شده است لازم به ذکر است که میانگین تولید زیست توده و روغن در این محیط کشت به ترتیب ۳۵/۱۹ و ۱۹/۴۲ گرم در لیتر می‌باشد که در مقایسه با میزان تولید در کار تحقیقاتیJie Jin و همکاران (مرجع انتخاب محیط کشت)، که ۳۴/۱۱ و ۱۸/۰۱ گرم در لیتر تفاوت معناداری ندارد. با وجود این که سویه‌های مورد بررسی متفاوت می‌باشند. که این نتایج در واقع تاییدی بر صحیح بودن روند انجام کار می‌باشد.



نمودار۱- مقایسه بازده تولید روغن و زیست توده در این بررسی و مراجع مرتبط با هریک از محیط کشت‌های مورد بررسی



نمودار۲- چگونگی مصرف گلوکز در مقایسه با تولید زیست توده و روغن در طول دوره‌ی رشد

نمودار۳- روند تغییرات pH در طول دوره‌ی رشد

jftn.srbiau.ac.ir

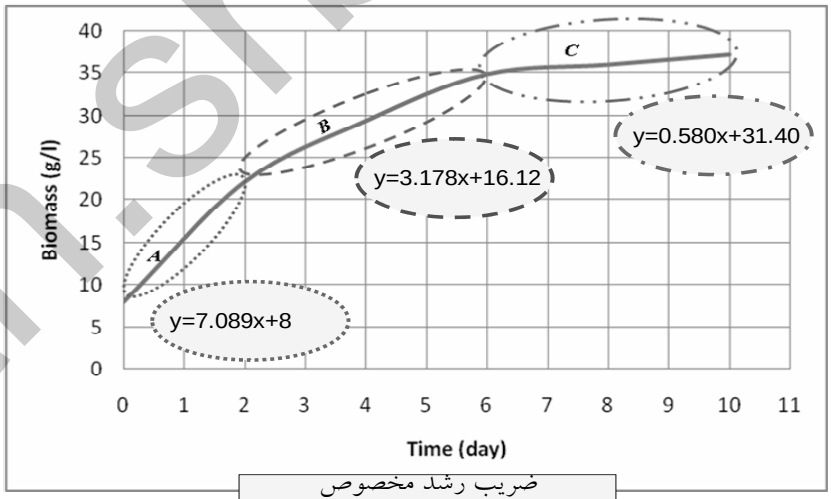
- چگونگی تغییرات زیست توده در طول مدت زمان رشد

با توجه به نمودار ۴ روند تغییرات زیست توده را می‌توان به سه ناحیه مجزا تقسیم بندی نمود. شیب خطوط منطبق بر هر یک از این نواحی (با استفاده از معادله خط رگرسیون در هر ناحیه بدست آمده است) نشان می دهد که نمودار در ناحیه A بیشترین روند سعودی را دارد و سپس به ترتیب در نواحی B و C بیشترین است اما این تغییرات چگونه توجیه می‌شود.

همانطور که از ضریب رشد مخصوص نیز قابل تشخیص است در ناحیه‌ی A میکروارگانیسم در مرحله لگاریتمی چرخه زندگی خود به سر می‌برد. (با تهیه‌ی پیش کشت و تلقیح مقدار مناسبی از آن به محیط کشت اصلی، میکروارگانیسم‌های زنده و فعال با شدت هرچه بیشتر در محیط جدید شروع به تکثیر می‌نماید.) به این ترتیب با نرخ رشد بسیار بالا (۰/۰۱۴) به تکثیر سلولی می‌پردازد و تولید زیست توده می‌نمایند. لازم به ذکر است که میکروارگانیسم زمانی که در محیطی قرار می‌گیرد که دارای نیتروژن کافی وجود دارد با حداکثر توان خود به تولید و تکثیر سلولی می‌پردازد یعنی زمانی که نسبت کربن به نیتروژن کمتر از ۷ است. اما با ادامه رشد و کاهش نیتروژن محیط (نسبت کربن به نیتروژن بین ۱۵ تا ۳۲) تکثیر سلولی کاهش یافته و میکروارگانیسم از فاز رشد وارد فاز تولید و تجمع روغن می‌شود و زمانی که نسبت کربن به نیتروژن محیط به بیشتر از ۳۲ می‌رسد قارچ با حداکثر توان خود به تولید و تجمع روغن می‌پردازد و تولید زیست توده در حداقل میزان خواهد بود (KoikeYasuhisa *et al*., 2001). با توجه به آنچه گفته شد در ناحیه B نیتروژن محیط کاهش یافته در نتیجه شدت افزایش جمعیت از ناحیه اول کمتر است (۰/۰۰۷). در ناحیه‌ی C تقریبا بیشتر نیتروژن موجود در محیط تمام شده است و در نتیجه افزایش جمعیت با نرخ بسیار کمتر نسبت به دو ناحیه قبلی (۰/۰۰۰۶۹) اتفاق می‌افتد. اگر زمان کشت ادامه پیدا کند به جایی می‌رسد که دیگر این رقم به صفر رسیده و از آن به بعد کاهش در جمعیت میکروبی وجود خواهد داشت.

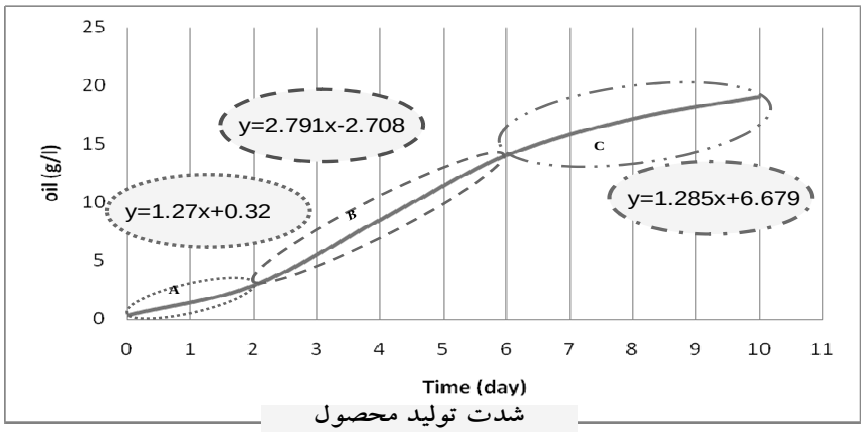
- چگونگی تغییرات روغن در زیست توده

نمودار۵ روند تولید روغن را در قارچ *M. alpina* در طول ۱۰ روز رشد در محیط شماره ۱ نشان می‌دهد. در این نمودار نیز ۳ ناحیه متمایز از نظر میزان تولید قابل تشخیص می‌باشد. شیب خطوط منطبق بر نمودار در هر یک از نواحی نشان می‌دهد که نمودار در ناحیه B و سپس در نواحی C و A بیشترین روند صعودی را دارد.



نمودار٤- روند تغییرات زیست توده با گذشت زمان

jftn.srbiau.ac.ir



شدت تولید محصول
۰.۰۵۲ < ۰.۰۵۸ < ۰.۱۱۶
A<C<B

نمودار ۵- روند تولید روغن در مدت زمان رشد

در ناحیه A میزان تولید روغن با افزایش زمان به طور خطی با شدت تولید۰/۰۵۲ افزایش می‌یابد، در ناحیه B میزان تولید با افزایش زمان باز هم به طور خطی ولی این بار با شدت۰/۱۱۶ افزایش می‌یابد، در ناحیه C میزان تولید به صورت خطی است ولی با ضریب کوچکتر از نواحی قبلی(شدت تولید ۰/۰۵۸) افزایش می‌یابد. اما چگونه این تغییرات توجیه می‌شود؟ در طی دو روز اول رشد از آنجائیکه تمام مواد مغذی به میزان کافی در محیط کشت وجود دارد میکروارگانیسم با تمام قوای خود تکثیر گشته و تولید سلول جدید می‌نماید. در این مرحله تولید روغن به موازات افزایش تعداد سلول‌ها، افزایش یافته ولی میزان افزایش آن بسیار کم است و در حداقل مقدار می‌باشد. تمام موجودات زنده باید حداقل مقدار چربی را برای غشاهایشان و سایر نقش‌های ساختاری و عملکردی خود بسازند، فرق میکروارگانیسم های چربی‌زا و غیره در مرحله دوم (B) است. میکروارگانیسم‌های چربی‌زا زمانی که در محدویت نیتروژن قرار می‌گیرد با حداکثر توان خود به تولید و تجمع چربی دست می‌زنند میکروارگانیسم‌های غیر روغنی وقتی که در همان محیط کشت محدود شده از نظر نیتروژن قرار گیرد هم تکثیر سلولی اضافی را متوقف می‌کند و هم اگر به هضم سوبسترای کربوهیدرات قابل دسترس ادامه دهند آن را به پلی‌ساکاریدهای مختلفی مانند گلیکوژن و گلوکانهای مختلف، مانانها و ... تبدیل می‌کنند و ذخیره روغن بیش از یک مقدار خیلی کم (کمتر از ۱۰ درصد زیست توده) روی نمی‌دهد (همان مقدار که در انتهای ناحیه اول تولید شده است). با این توضیحات از روز دوم تا روز ششم همزمان با افزایش تعداد سلول‌های میکروارگانیسم و کاهش مواد مغذی مخصوص به مرحله تکثیر مانند نیتروژن تکثیر سلولی کاهش می‌یابد. با توجه به این اصل که با کاهش تکثیر سلولی تجمع روغن افزایش پیدا می‌کند، در این مرحله نیز تولید روغن نسبت به ناحیهA با سرعت بیشتری افزایش پیدا می‌کند. از روز ششم تا دهمین روز کشت از یک طرف منبع کربن موجود در محیط کاهش می‌یابد و از طرف دیگر تعداد زیاد سلول‌ها باعث می‌شود که تولید و تجمع روغن با سرعت کمتری افزایش یابد. این رفتار تا جایی ادامه پیدا می‌کند که دیگر نگهداری میکروارگانیسم در محیط صرفه اقتصادی ندارد.

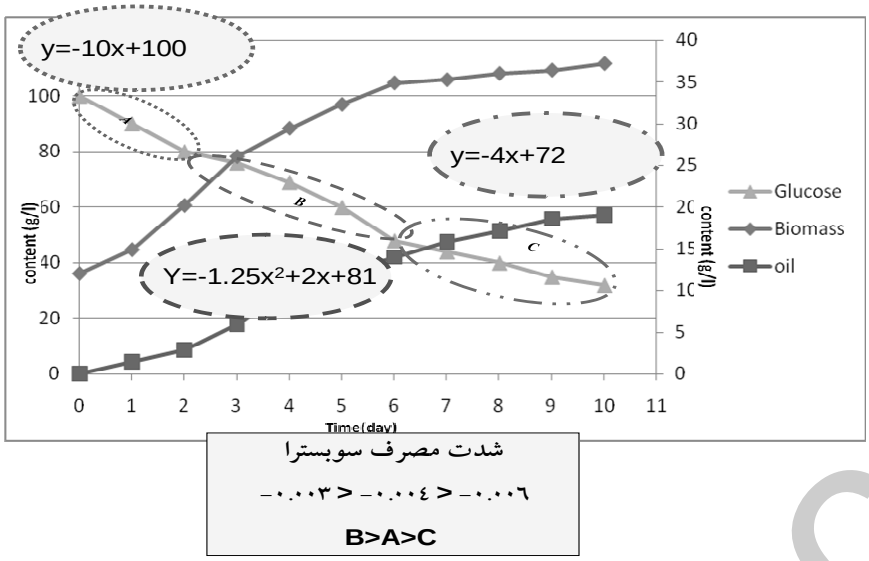
- چگونگی تغییرات pH در مدت زمان کشت

همانطور که در شکل ۳ مشاهده میگردد در چهار روز اول pH در حدود ۰/۱ افزایش می‌یابد. اما پس از آن از روز چهارم تا دهم به دلیل افزایش تولید روغن pH حدود ۰/۵ واحد کاهش یافته است. دلیل آن احتمالا نحوی به مصرف رسیدن منبع نیتروژن (که باعث تولید آمین‌ها و قلیایی کردن محیط می‌شود) و مصرف منبع کربن (که باعث تولید اسید آلی می‌شود) و همزمانی و هم‌پوشانی‌آنها به نظر می‌رسد در اینجا نقش مهمی در تغییرات مشاهده شده pH دارد.

- روند تغییرات گلوکز

گلوکز تنها منبع کربن محیط کشت می‌باشد. نمودار۶ روند کاهشی گلوکز را در مقابل تولید زیست توده و روغن

jfn.srbiau.ac.ir



نمودار٦- چگونگی مصرف گلوکز در مقایسه با تولید زیست توده و روغن در طول دوره‌ی رشد

نشان می‌دهد، همان طور که پیش بینی می‌شد سه ناحیه مختلف بر روی نمودار گلوکز نیز قابل تفکیک می‌باشد. شیب خطوط منطبق بر این نواحی نشان می‌دهد که نمودار به ترتیب در نواحی B و سپس در نواحی A و C بیشترین روند نزولی را دارد. در ناحیه B شدت مصرف گلوکز ۰/۰۰۳- می‌باشد در این مرحله تولید روغن به حداکثر میزان خود رسیده است، به موازات آن بیشترین کاهش در شدت گلوکز یا منبع کربن وجود دارد. در ناحیه A شدت کاهش گلوکز ۰/۰۰۴- می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی این است که به منظور تکثیر سلولی و همچنین تولید روغن مقدار گلوکز با شدت زیادی کاهش می‌یابد. ناحیه C به دلیل کاهش محتوای گلوکز موجود در مقابل تعداد زیاد میکروارگانیسم‌ها و به خاطر استرس محیطی که از طرف منبع کربن به آن‌ها می‌رسد میکروارگانیسم در مرحله مرگ سلولی به سر می‌برند و شدت تولید روغن‌شان کاهش می‌یابد. به این ترتیب واضح است که شدت مصرف قند هم کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

مدت زمان رشد قارچ *M. alpina* را می‌توان به سه ناحیه تقسیم بندی نمود. بدین صورت که در طی دو روز اول رشد بیشترین بازده تولیدی زیست توده و کمترین نرخ تولید روغن را دارد. به این ترتیب روند کاهش گلوکز در این دو روز با شدت کمتری صورت می‌گیرد. از روز ۲-۶ با کاهش منبع نیتروژن، شدت تولید زیست توده کاهش و متعاقباً تولید روغن شدیدا افزایش یافته و کاهش منبع کربن سریع‌تر می‌شود. از روز ۶ تا ۱۰ به تدریج تولید زیست توده به نزدیک صفر رسیده و تولید روغن نیز با شدت کمتری صورت می‌گیرد پس روند تغییرات گلوکز نیز کاهش می‌یابد.

تولید روغن در میکروارگانیسم‌های چربی زا نوعا یک فرآیند دو مرحله‌ای است که زمانی آغاز می‌شود که ارگانیسم قادر به ساخت مواد ضروری سلول مثل پروتئین، اسید نوکلئیک و ... نمی‌باشد و یک ماده ضروری اصلی به غیر از کربن و اکسیژن در محیط به اندازه‌ی کافی وجود ندارد. که معمولا این ماده منبع نیتروژن است. بنابراین باید منبع نیتروژن را در حدی در نظر گرفت که بعد از رسیدن به جمعیت مناسب شرایط برای تولید روغن مناسب گردد. با توجه به تولید روغن و قیمت تمام شده محصول ۱۲ روز را می توان به عنوان بهترین زمان انکوباسیون در نظر گرفت.

منابع

ایرانی، پ. (۱۳۸۲). بررسی علل و میزان ضایعات آرد و نان های مختلف. مجموعه مقالات سمینار ملی روشهای پیشگیری از اتلاف منابع در ایران. ص ۲۲۸-۲۱۷.

زارعی، م. و شکر فروش، ش. (۱۳۸۲). استفاده از ضایعات نان. تامین سلامت عمومی، صرفه جویی اقتصادی، مجموعه مقالات سمینار ملی روشهای پیشگیری از اتلاف منابع در ایران. ص ۲۶۹-۲۶۳.

شاهدی، م.(۱۳۸۲). تلفات نان و راه کارهای کاهش آن. مجموعه مقالات سمینار ملی روشهای پیشگیری از اتلاف منابع در ایران. ص ۱۸۲-۱۹۵

ifn.srbiau.ac.ir

Azain, M. J. & Dove, C. R. (2005). Use of bakery by-products innursery diets, http://www.ads.uga.edu/annrpt/1995/95_260.htm. Nutrition, 3, 5, 294-299.

Abdullatif, A., Al-Tulaihan, A., Hutail, N. & Al-Eid, S. M. (2004). The nutritional evaluation of locally produced dried bakery waste (DBW) in the broiler diets. Pakistan Journal of Nutrition, 3, 5.

Barclay, W. R. (2003). Method for production of arachidonic acid.United States Patent 6, 541, 049.

Chen, R. & Tsuda, S. (2005). Production of γ-linolenic acid in Lotus japonicus and Vignaangularis by expression of the Δ6-fatty-acid desaturase gene isolated from Mortierellaalpina. Plant Science, 169, 599–605.

Cohen, Z., Norman, H. A. & Heimer, Y. M. (1995). Microalgae as a source of omega-3 fatty acids. World Rev Nutr Diet, 77, 1–31.

Cohen, Z. & Ratledge, C. (2005). Single Cell Oil. AOCS Press .

Damron, B. L., Woldroup, P. W. & Harms, R. H. (1965). Evaluation of dried bakery products for usage in broiler diets. Poultry Sin., 44, 1122-1126.

Darios, F. & Davletov, B. (2006). Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. Nature 440 (7085) 813–817.

Day, E. J. & Dilworth, B. C. (1968). Dried bakery products in broiler diets. Mississipi State University Exp. Sta. Bull. 763.

Dyal, S. D. & Narine, S. S. (2005). Implications for the use of Mortierella fungi in the industrial production of essential fatty acids. Food Research International. 38.

Eroshin, V. K., Satroutdinov, A. D., Dedyukhina, E.G. & Chistyakova, T. I. (2000). Arachidonic acid production by Mortierella alpina with growth coupled lipid synthesis. ProcBiochem, 35, 1171–1175.

Firestone, D. (1994). Official Methods & Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4th edn., AOCS Press, Champaign.

Fukaya, T., Gondaira, T., Kashiyae, Y., Kotani, S., Ishikura, Y., Fujikawa, S., Kiso, Y. & Sakakibara, M. (2007). Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats. Neurobiology of aging, 28, 8, 1179–1186.

Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. Y. & Okabe, B. (1999). Image Analysis of Morphological Change during Arachidonic Acid Production by Mortierella alpha X3-4. Journal of Ioscience and Bioengineering, 87, 4, 489-494.

JieJin, M. & Huang, H. (2009). Enhancing arachidonic acid production by Mortierella alpina. Bioprocess BiosystEng , 32, 117–122.

Lipp, M. & Anklam, A. (1998). Review of cocoa butter and alternative fats foruse in chocolate-Part A. Compositional data. Food Chemistry, 62, 1, 73-97.

Lindberg, A. M. & Molin, G. (1993). Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by the fungus Mortierella alpina CBS 343.66 in fermentor cultures. Biotechnology, 39, 4-5. 450-455.

Miller, M. (2007). Replacement of fish oil with thraustochytridSchizochytrium sp. L oil in Atlantic Salmon Parr (Salmosalar L) Diets. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 148.

Nes, W. D. & Nichols, S. D. (2006). Phytosterol biosynthesis pathway in Mortierella alpine. Phytochemistry 67.

Owen, P. W. & Ajay, S. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. Process Biochemistry 40.

Potter, L. M., Shelton, J. R. & Kelly, M. (1971). Effects of zinc bactriacin, dried bakery product and different fish meal in diets of young turkeys. Poultry Sci., 50, 1109-1115.

Sakuradani, E. & Sakayu, S. (2009). Single cell oil production by Mortierella alpina. Journal of Biotechnology, 36.

Singh, A. & Ward, O. P. (1997). Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by Mortierella alpina ATCC 32222.ApplMicrobiolBiotechnol, 48, 1–5.

Yasuhisa, K. (2001). Effect of Consumed Carbon to Nitrogen Ratio on Mycelial Morphology and Arachidonic Acid Production in Cultures of Mortierella alpine. Journal of Bioscience and Bioengineering, 91.

Zhu, M. & Yu, L. J. (2006). Optimization of arachidonic acid production by fed-batch culture of Mortierella alpina based on dynamic analysis. Enzyme and Microbial Technology, 38.

http://www.mercksource.com

http://en.wikipedia.org/wiki/Maize

www.younreporters.org

www.foodethiscouncil.org

ifrsbiau.ac.ir