# بررسی تولید آراشیدونیک اسید توسط *Mortierella alpina* در تخمیر حالت جامد با استفاده از تفاله خرما

سیده زینب اسدی[a*]، هوشنگ نیکوپور[b]، کیانوش خسروی دارانی[c]، حسین باخدا[d]

[a] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران
[b] دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران
[c] دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، گروه تحقیقات صنایع غذایی، تهران، ایران
[d] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مکانیزاسیون کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۲/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۶/۱۰



## چکیده

**مقدمه:** آراشیدونیک اسید از اسیدهای چرب ضروری چند غیر اشباع می‌باشد که نقش مهمی در سلامت انسان ایفا می‌کند. گونه‌هایی از قارچ جنس *Mortierella* قادر به تولید گستره‌ی وسیعی از اسیدهای چرب چند غیراشباع به ویژه آراشیدونیک اسید بوده و تحقیقات نشان داده‌اند عوامل متعددی بر تولید آنها موثر می‌باشند. امروزه تولید میکروبی آراشیدونیک اسید توسط قارچ *M. alpina* با بکارگیری تخمیر حالت جامد مورد توجه قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** تولید آراشیدونیک‌اسید توسط کشت جدایه *Mortierella alpina* CBS 528.72 بر تفاله خرما در تخمیر حالت جامد با استفاده از طرح پلاکت برمن انجام گرفت. به منظور تامین منبع نیتروژن، کنجاله سویا اضافه شد. تاثیر یازده متغیر شامل اندازه ذرات، میزان رطوبت، pH اولیه، نسبت کربن به نیتروژن سوبسترا، مکمل‌های روغن بزرک و سویا، سن تلقیح، دما و مدت زمان گرمخانه-گذاری، مدت زمان پیش تیمار حرارتی و مکمل نیتروژن بر میزان تولید آراشیدونیک‌اسید در دو سطح بررسی گردید.

**یافته‌ها:** در محدوده مورد بررسی متغیرها در این تحقیق، رطوبت اولیه ٪ ۷۵-۷۰ سوبسترا، افزودن (w.w$^{-1}$)٪ ۱۰ روغن بزرک، اندازه ۱/۷-۱/۲ میلی‌متر ذرات سوبسترا، افزودن (w.w$^{-1}$)٪ ۴ مکمل نیتروژن و سن تلقیح ۹۶ ساعت در افزایش تولید آراشیدونیک‌اسید تاثیر معنی‌دار داشتند. بیشترین مقدار آراشیدونیک اسید تولید شده در این تحقیق، ۴/۶۶ میلی‌گرم در گرم سوبسترای تخمیر شده خشک بود.

**نتیجه‌گیری:** با اصلاح تفاله خرما توسط عوامل ذکر شده، می‌توان به تولید روغن تک یاخته حاوی بیشترین مقدار آراشیدونیک‌اسید توسط قارچ *M. alpina* دست یافت.

***واژه‌های کلیدی:*** *آراشیدونیک اسید، تخمیر حالت جامد، تفاله خرما، Mortierella alpina*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: s.z.asadi@gmail.com



jftn.srbiau.ac.ir

## مقدمه

روغنی که از منابع میکروبی گونه‌های روغنی[1] بدست می‌آید به عنوان روغن میکروبی[2] یا روغن تک سلولی[3] شناخته شده است، همانند دیگر روغن‌ها و چربی‌های موجود در منابع گیاهی و حیوانی از دسته تری‌آسیل گلیسرول[4] می‌باشد (Fidler *et al.*, 1999) و به عنوان روغن حاوی اسیدهای چرب چند غیراشباع[5] از جمله آراشیدونیک اسید[6]، مورد توجه خاص محققین قرار گرفته است (Fakas *et al.*, 2009b). آراشیدونیک اسید عمده‌ترین اسید چرب چند غیراشباع در انسان است که در اندام‌ها، خون و بافت ماهیچه‌ای وجود دارد و همراه با فسفولیپیدها دارای نقش اساسی به عنوان لیپید ساختاری می‌باشد، اصلی‌ترین اسید چرب امگا۶ موجود در بافت مغز (Ratledge, 2004) و پیش‌ساز بسیاری از ایکوزانوئیدها از جمله ترومبوکسان‌ها[7]، لوکوترین‌ها[8] و پروستاگلاندین‌های سری۲ [9] می‌باشد. عملکردهای فیزیولوژی متنوعی از جمله حفاظت از مخاط معده[10]، کاهش چربی کبد[11]، از بین بردن سلولهای غده‌ای[12]، درمان پسوریازیس پوستی[13] و بهبود سوخت و ساز چربی در بیماران سیروزی[14] برای آراشیدونیک اسید گزارش شده است (Higashiama *et al.*,2002; Dyal & Narine, 2005). اخیرا تولید میکروبی آراشیدونیک اسید توسط قارچ رشته‌ای *Mortierella alpina* که مقادیر قابل توجهی از این اسید چرب را تحت شرایط مختلف محیط کشت تولید می‌کند، در بستر جامد مورد توجه قرار گرفته است (Sakuradani & Shimizu, 2009). تخمیر در بستر جامد[15] یعنی کشت ریزسازواره بر سوبسترای جامد در غیاب و یا تقریباً نبودن آب آزاد به علت مزایای آن در مقایسه با تخمیر غوطه‌وری[16]، قابل توجه می‌باشد؛ از مزایای این روش، کاهش هزینه‌ی فرآیندهای پایین‌دستی، تکنیک ساده‌تر، استفاده از منابع کربنی ارزان قیمت و در دسترس، کاهش انرژی و خروجی کم فاضلاب می‌باشد (Peng & Chen, 2008a). نسبت کربن به نیتروژن در سوبسترای جامد برای رشد میکروبی مناسب بوده (Sajbidor *et al.*, 1990) و تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع نیز به رشد میکروبی وابسته می‌باشد (Jang *et al.*, 2000). برخی از محققین اهمیت غلظت منابع کربن و نیتروژن سوبسترا در کیفیت و کمیت تولید لیپید توسط *Mortierella* را گزارش کردند (Jang *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2005; Sajbidor *et al.*, 1990). طراحی معین و مناسب برای آزمایشات فرآیند تخمیر، مهم و ضروری می‌باشد. طرح پلاکت برمن[17] یکی از طرح‌های عاملی کسری دو سطحی بوده که برای بررسی اثر متغیرهای فرآیندهای تخمیری به وفور استفاده می‌شود. مفید بودن این طراحی در واقع به دلیل معین کردن اثر تعداد متغیر زیاد بر پاسخ سیستم بطور مستقل می‌باشد. نوعی از این طراحی برای بررسی K فاکتور دو سطحی با N آزمایش مناسب می‌باشد (K=N-1)، که در آن N مضربی از ۴ است. با داشتن یازده متغیر در دو سطح و درجه آزادی ۱۱، نیاز به انجام دوازده آزمایش خواهد بود. با توجه به مقدار p محاسبه شده برای هر متغیر مستقل، میزان معنی‌دار بودن اثر آن متغیر روی متغیر وابسته (پاسخ) مشخص خواهد شد (Plackett & Burman, 1946).

تاکنون، بیشتر تحقیقاتی که بر روی *M. alpina* انجام شده است، تولید آراشیدونیک اسید در تخمیر غوطه‌ور را مورد ارزیابی قرار داده‌اند و تحقیقات بر روی کشت آن در محیط جامد، اخیرا در حال گسترش می‌باشد. برخی محققین تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع توسط جدایه *M. alpina* ATCC 32222 با تخمیر در سوبسترای جامد از جمله سبوس برنج، سبوس گندم، کنجاله‌ی بادام زمینی و سیب زمینی شیرین را مورد بررسی قرار دادند. بهترین شرایط برای تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع، سبوس برنج اضافه شده با ۲/۳ تا ۵ درصد نیتروژن، مقدار رطوبت اولیه ۶۵ تا ۶۸ درصد و محدوده‌ی pH ۶ تا ۷ با گرمخانه گذاری ۸ تا ۱۲ روز بود (Jang *et al.*, 2000). همچنین در پژوهش دیگری شرایط بهینه توسط همان

[1] Oleaginous Species [2] Microbial Oils [3] Unicellular oils/ Single cell oil (SCO) [4] Triacylglycerol
[5] Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) [6] Arachidonic Acid (AA)/ (ARA); (20:4 cis, 5, 8, 11, 14. ω-6)
[7] Thromboxanes (TX) [8] Leukotrienes (LT) [9] Series 2 Prostaglandins [10] Gastric Mucosa
[11] Reduction of Fatty Liver [12] Killing of Tumor Cells [13] Skin Psoriasis [14] Cirrhotic Patients
[15] Solid State Fermentation (SSF) [16] Submerged Fermentation (SmF) [17] Plackett-Burman Design(PBD)





jftn.srbiau.ac.ir

قارچ و بستر جامد سبوس برنج در راکتور ستونی[1] برای تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع با افزودن ۳/۷۵ درصد وزنی وزنی منبع نیتروژن، مقدار رطوبت اولیه ۵۷ درصد، pH اولیه ۷-۶، هوادهی ۱/۲ لیتر در دقیقه، گرمخانه گذاری در دمای ۲۰°C به مدت ۵ روز و سپس در دمای ۱۲ °C به مدت ۷ روز فراهم شد (Jang & Yang, 2008). تحقیق دیگری بر روی کنجاله آفتاب‌گردان، کنجاله سویا، کنجاله کلزا و کنجاله زیتون برای تولید آراشیدونیک اسید توسط جدایه قارچ *M. alpina* CBS 754.68در بستر جامد انجام گرفت. در این تحقیق کنجاله آفتاب گردان به عنوان بهترین سوبسترا برای تولید آراشیدونیک اسید به میزان ۱/۱۴ میلی‌گرم در هرگرم سوبسترای خشک با گرمخانه‌گذاری به مدت ۶ روز در دمای ۲۰°C و سپس به مدت ۶ روز دیگر در دمای ۱۲°C انتخاب گردید. سپس متغیرهایی از جمله اندازه ذرات و محتوای رطوبت سوبسترا، زمان و دمای گرمخانه‌گذاری، مکمل عصاره مخمر، مکمل گلوکز و مکمل گلوتامات مورد مطالعه قرار گرفتند و موثرترین متغیرها برای تولید آراشیدونیک اسید به ترتیب، زمان گرمخانه‌گذاری ۱۲ روز، اندازه ذرات سوبسترا ۱/۴- ۱ میلی‌متر و دمای ۲۰°C گزارش شدند (Ghobadi *et al.*, 2011).

با توجه به اینکه مقرون به صرفه‌ترین سوبستراها، ضایعات حاصل از کارخانجات صنایع غذایی هستند (Certik & Shimizu, 1999)، در این تحقیق از تفاله خرما، محصول جانبی تولید شیره خرما برای اولین بار به عنوان سوبسترای جامد و منبع کربن برای تولید روغن تک یاخته حاوی آراشیدونیک اسید استفاده شد و به منظور تامین منبع نیتروژن با توجه به مطالعه سایر محققین از کنجاله سویا استفاده گردید. همچنین با توجه به عوامل بررسی شده توسط سایر پژوهشگران، یازده متغیر در تولید آراشیدونیک اسید توسط جدایه *M.* CBS 528.72 *alpina* با طراحی پلاکت برمن مورد مطالعه قرار گرفت. بدیهی است که توسعه صنعت تبدیل ضایعات خرما به مواد با ارزش، کمک بسیار مهمی جهت حل مشکلات ضایعات خرمای کشور می‌کند.

## مواد و روش‌ها

**- مواد مصرفی**

مواد شیمیایی استفاده شده در این تحقیق از شرکت مرک آلمان خریداری شد. روغن سویا از شرکت صنعتی بهشهر، روغن بزرک از شرکت داروسازی باریج اسانس، تفاله خرما (محصول جانبی تولید شیره خرما متشکل از ارقام مختلف خرما) از شرکت خرما بن جنوب به صورت آسیاب شده و کنجاله سویا از شرکت پروتئین سویای بهپاک- سبحان خریداری گردید.

**- ریزسازواره**

ریزسازواره مورد استفاده در این تحقیق قارچ CBS *Mortierella alpina* 528.72 بود. پس از خریداری از مجموعه میکروبی کشور هلند توسط دانشگاه تربیت مدرس به منظور نگهداری آن، از مالت آگار[2] استفاده گردید. هر دو ماه یکبار، کشت مجدد بر روی محیط کشت مالت آگار انجام گرفت (Rocky Salimi *et al.*, 2011).

**- تهیه سوسپانسیون میسلیوم**

قارچ مورد نظر روی محیط حاوی ۱۰ گرم در لیتر گلوکز، ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر و ۲۰ گرم در لیتر آگار با pH ۶/۵±۰/۱، در مدت زمان ۹۶ و ۱۹۲ ساعت با توجه به طراحی آزمایش (جدول شماره ۱ و ۴) و دمای ۲۳ °C انکوبه شد. سپس میسلیوم‌ها با آب مقطر استریل به منظور تولید سوسپانسیون میسلیوم[3] هموژن گردید، تعداد قطعات میسلیوم[4] در هر میلی‌لیتر از آن $۱۰^{۶} \times ۲$- ۱/۵ برآورد شد (Jang *et al*., 2000; Jang & Yang, 2008).

**- آنالیزهای شیمیایی**

میزان رطوبت با خشک‌کردن در آون تحت خلا تا رسیدن به وزن ثابت و توسط آب دیونیزه تنظیم شد. pH سوبسترا با pH متر اندازه‌گیری و سپس تنظیم گردید (Jang *et al*., 2000; Jang & Yang, 2008). درصد کربن آلی با استفاده از روش اکسیداسیون مرطوب با دی‌کرومات پتاسیم و تیتر کردن با آمونیوم سولفات فرو نیم مولار برآورد شد (Nelson & Sommers, 1982). درصد نیتروژن کل با استفاده از دستگاه اتوماتیک کلدال Kjel.Tec$^{TM}$ 8400 اندازه‌گیری شد. استخراج روغن از

[1] Column Reactor [2] Malt agar [3] Mycelial Suspension [4] Mycelial Fragments



jfn.srbiau.ac.ir

سوبسترای خشک شده با حلال ان- هگزان[1] و دستگاه اولتراسونیک انجام گرفت (Ghobadi *et al.,* 2011). اندازه‌گیری درصد روغن با روش سوکسله انجام شد (Jacobs *et al.,* 2010). مشتق‌سازی اسیدهای‌چرب به روش Metcalf و همکاران، انجام گرفت (Metcalf *et al.,* 1996). به منظور اندازه‌گیری اسیدهای چرب از دستگاه گاز کروماتوگرافی Unicam 4600 ساخت کشور انگلستان در آزمایشگاه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس استفاده شد. نمونه‌ها به میزان ۰/۲ میکرولیتر به دستگاه گازکروماتوگرافی تزریق شد. گاز حامل نیتروژن و آشکارساز[2] مورد استفاده از نوع یونیزاسیون شعله‌ای[3] با دمای ۳۰۰ °C، دمای تزریق ۲۵۰ °C و ستون دستگاه از نوع مویین به طول ۳۰ متر، قطر خارجی ۰/۲۵ میلی‌متر، قطر داخلی ۰/۲۲ میکرومتر و از جنس Fused Silica بود.

## - انجام عملیات تخمیر با توجه به طراحی آماری آزمایش‌ها

در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری، مقدار مشخصی از تفاله خرما با مقدار مشخصی از کنجاله سویا با رعایت نسبت کربن به نیتروژن و با اندازه ذرات سوبسترا، درصد رطوبت، pH و افزودن روغن سویا و بزرک با توجه به طراحی آزمایش بر اساس جدول‌های ۱ و ۴ تنظیم و مخلوط گردیدند و پیش تیمار حرارتی توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ و ۶۰ دقیقه با توجه به طراحی آزمایش انجام گرفت. سپس با ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون میسلیوم با سن‌های ۹۶ و ۱۹۲ ساعت تلقیح و در درجه حرارت ۲۳ °C به مدت ۵ روز گرمخانه‌گذاری شدند، که در روز چهارم گرمخانه‌گذاری مکمل نیتروژن شامل نیترات پتاسیم و عصاره مخمر با نسبت ۲ به ۱ به برخی از ارلن‌ها اضافه شد. در روز ششم تغییر دما به ۲۰±۰/۵ °C و ۱۲ ± ۰/۵ °C در مدت زمان ۴ و ۷ روز دیگر با توجه به طراحی آزمایش انجام گرفت. سوبسترای تخمیر شده توسط خشک‌کن انجمادی خشک و توسط هاون آزمایشگاهی پودر شدند (Jang *et al*., 2000; Jang & Yang., 2008; Asadi *et al.,* 2013).

## - تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق، کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت. عوامل موثر برای تولید آراشیدونیک اسید با استفاده از تحلیل آماری طرح پلاکت برمن در دو سطح کم (-) و سطح زیاد (+)، بر مبنای تجزیه واریانس انتخاب شدند. بدین منظور از نرم افزار Design-Expert نسخه ۸ استفاده شد (Plackett & Burman, 1946).

## یافته‌ها

برخی ترکیبات اصلی سوبسترای استفاده شده در این تحقیق، در جدول ۲ و درصد اسیدهای چرب سوبسترا و روغن‌های افزوده شده به سوبسترا در جدول ۳ نشان داده شده است.

در جدول ۴ نتایج آزمایش‌های طرح پلاکت برمن برای آراشیدونیک اسید آورده شده است.

**جدول ۱- متغیرهای اولیه و سطوح آن‌ها**

| نماد | متغیر | +۱* | -۱** |
|---|---|---|---|
| A: | اندازه ذرات سوبسترا (میلی‌متر) | ۱/۲-۱/۷ | ۰/۱-۰/۶ |
| B: | مکمل روغن سویا ٪ ($w.w^{-1}$) | ۱۰ | ۱ |
| C: | مکمل روغن بزرک ٪ ($w.w^{-1}$) | ۱۰ | ۱ |
| D: | رطوبت اولیه سوبسترا ٪ | ۷۰-۷۵ | ۶۰-۶۵ |
| E: | pH اولیه سوبسترا | ۷ ± ۰/۱ | ۶ ± ۰/۱ |
| F: | مدت زمان پیش تیمار حرارتی (دقیقه) | ۶۰ | ۲۰ |
| G: | سن تلقیح (ساعت) | ۱۹۲ | ۹۶ |
| H: | نسبت کربن به نیتروژن سوبسترا | ۲۱ | ۱۷ |
| J: | دمای گرمخانه گذاری پس از ۵ روز (°C) | ۲۰±۰/۵ | ۱۲ ±۰/۵ |
| K: | زمان گرمخانه گذاری پس از ۵ روز (روز) | ۷ | ۴ |
| L: | افزودن مکمل نیتروژن در روز چهارم ٪ ($w.w^{-1}$) | ۴ | ۰ |

* ۱+؛ سطح زیاد متغیر، ** ۱-؛ سطح کم متغیر

[1] N- hexane [2] Detector [3] Flame ionization





jftn.srbiau.ac.ir

در شکل ۱، پارتو[1] متغیرها برای تولید آراشیدونیک اسید از بزرگترین تا کوچکترین بصورت گرافیکی نشان داده شده است و در جدول ۵ ضرایب عوامل تاثیر گذار آورده شده است که در آن ضرایب مثبت نمایان‌گر نسبت مستقیم بین مقدار متغیر و مقدار آراشیدونیک اسید تولید شده و ضرایب منفی ارتباطی معکوس بین مقدار آراشیدونیک اسید تولید شده و مقدار متغیر را نشان می‌دهند.

## بحث

### - ترکیبات اصلی سوبسترا

با توجه به کم بودن میزان نیتروژن تفاله خرما و نیاز قارچ *Mortierella* به نیتروژن برای رشد و همچنین به منظور ایجاد نسبت مناسبی از کربن به نیتروژن، از کنجاله سویا به عنوان منبع نیتروژن استفاده شد. نسبت کربن آلی به نیتروژن کل تفاله خرما ۰/۸±۳۵/۸۶ محاسبه شد. بنا به گزارش Koike و همکاران، در رابطه با *M. alpina* بهترین نسبت کربن به نیتروژن ۲۰ – ۱۵ گزارش شده است (Koike *at al.*, 2001).

با توجه به گزارشات Jang و همکاران، نسبت کربن به نیتروژن بین ۱۴/۵ و ۱۸/۵ برای تولید ایکوزاپنتاانوئیک اسید و نسبت کربن به نیتروژن بین ۱۹/۵ و ۲۱ برای تولید آراشیدونیک اسید مطلوب است (Jang *et al.*, 2000). لذا در این تحقیق با استفاده از کنجاله سویا نسبت کربن به نیتروژن سوبسترا در دو سطح ۱۷ و ۲۱ تنظیم شد. Park و همکاران، تاثیر برخی از منابع نیتروژنی را بر تولید آراشیدونیک اسید توسط *M. alpina* بررسی نمودند، نتایج نشان داد با استفاده از کنجاله سویا در نسبت کربن به نیتروژن ۵/۵۳، آراشیدونیک اسید به مقدار بیشتری تولید می‌گردد (Park *et al.*, 1999).

**جدول ۲- برخی ترکیبات اصلی سوبسترا**

| نوع سوبسترا | کربن آلی (٪) | نیتروژن کل (٪) | نسبت کربن آلی به نیتروژن کل | رطوبت (٪) | pH | روغن (٪) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| تفاله خرما | ۴۵/۲۸± ۰/۶۱ | ۱/۲۶± ۰/۰۴ | ۳۵/۸۶ ±۰/۸ | ۲۳/۳۶ ±۰/۱۸ | ۴/۳ ±۰/۰۲ | ۱/۳۲ ±۰/۲۷ |
| کنجاله سویا | ۴۳/۹۵± ۰/۰۵ | ۷/۹۵± ۰/۲۱ | ۵/۵۳±۰/۱۵ | ۶/۶۹ ±۰/۰۴ | ۶/۶۶ ±۰/۰۳ | ۱/۳۵ ±۰/۲ |

اعداد بصورت انحراف معیار ± میانگین آورده شده است.

**جدول ۳- مقادیر برخی از اسیدهای چرب موجود در تفاله خرما، کنجاله سویا، روغن بزرک و روغن سویا**

| سوبسترا | اسیدهای چرب | | | | واحد |
|---|---|---|---|---|---|
| | C18:1 (n-6) | C18:2 (n-6) | C18:3 (n-3) | C20:4 (n-6) | |
| تفاله خرما | ۱/۵۵±۰/۲۶ | ۰/۶۳±۰/۰۶ | ۰/۰۸±۰/۰۳ | ۰ | میلی‌گرم در گرم سوبسترای خشک |
| کنجاله سویا | ۰/۸±۰/۱۲ | ۲/۳۹±۰/۱۷ | ۰/۳±۰/۰۲ | ۰ | میلی‌گرم در گرم سوبسترای خشک |
| روغن سویا | ۱۶۶/۵۱±۰/۵۷ | ۳۸۴/۰۱±۰/۶۱ | ۴۵/۱۴±۰/۶۳ | ۰ | میلی‌گرم در گرم روغن |
| روغن بزرک | ۱۵۰/۹۸±۰/۲۲ | ۱۱۶/۵۸±۰/۵ | ۳۸۳/۵۳±۰/۶۷ | ۰ | میلی‌گرم در گرم روغن |

اعداد بصورت انحراف استاندارد ± میانگین آورده شده است.

**جدول ٤- طرح پلاکت برمن برای یازده متغیر، دوازده آزمایش و میزان آراشیدونیک اسید**

| شماره آزمایش | متغیر | | | | | | | | | | | C20:4(n-6) میلی‌گرم در گرم سوبسترای تخمیر شده خشک |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | J | K | L | |
| ۱ | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - | ۲/۹۵±۰/۰۸ |
| ۲ | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | ۰/۷۳±۰/۰۱ |
| ۳ | + | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - | ۲/۴۶±۰/۱۱ |
| ۴ | - | + | - | + | + | - | + | + | + | - | - | ۰/۱۲±۰/۰۱ |
| ۵ | - | - | + | - | + | + | - | + | + | + | - | ۰/۳۹±۰/۰۴ |
| ۶ | - | - | - | + | - | + | + | - | + | + | + | ۰/۵۹±۰/۰۶ |
| ۷ | + | - | - | - | + | - | + | + | - | + | + | ۰/۶۸±۰/۰۶ |
| ۸ | + | + | - | - | - | + | - | + | + | - | + | ۱/۳۹±۰/۰۴ |
| ۹ | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + | - | ۱/۲۴±۰/۰۱ |
| ۱۰ | - | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + | ۴/۳۸±۰/۴ |
| ۱۱ | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - | + | ۴/۶۶±۰/۴۷ |
| ۱۲ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ۰/۱۹±۰/۱۵ |

اعداد بصورت انحراف استاندارد ± میانگین آورده شده است، علامت‌های + و – به ترتیب نمایانگر سطح زیاد و کم متغیرها می‌باشند.

[1] Parto



jift.srbiau.ac.ir

با توجه به اینکه در این تحقیق روغن استخراجی از تفاله خرما و کنجاله سویا دارای آراشیدونیک اسید نبودند، بنابراین تولید این اسید چرب را می‌توان به تغییر سطوح متغیرها نسبت داد. البته تفاله خرما و کنجاله سویا همچنین مکمل‌های روغنی حاوی مقادیری از اسیدهای چرب غیر اشباع از جمله اولئیک اسید[1]، لینولئیک اسید[2] و آلفالینولنیک اسید[3] می‌باشند (جدول شماره ۳)، که سبب تحریک تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع به ویژه آراشیدونیک اسید در گونه‌های *Mortierella* مانند *M. alpina* می‌گردند (Weber & Tribe, 2003).

## - بررسی عوامل موثر در تولید آراشیدونیک اسید توسط *M. alpina*

### - مکمل نیتروژن

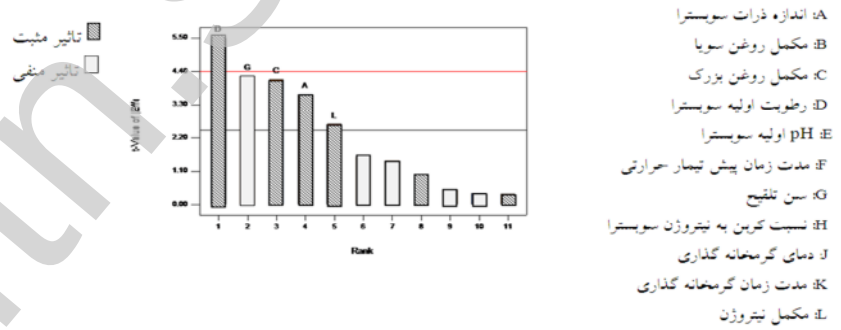
افزودن مکمل نیتروژن در روز چهارم یکی از عوامل موثر معنی‌دار در تولید آراشیدونیک اسید بود، به عبارتی افزودن ($w.w^{-1}$)٪ ۴ مکمل نیتروژن به سوبسترا باعث افزایش میزان آراشیدونیک اسید گردید. نتایج حاصله همراستا با مطالعات Jang و همکاران بود، آنها چند سوبسترای جامد تخمیر شده توسط *M. alpina* با منابع نیتروژن شامل عصاره‌مخمر و نیترات مکمل‌سازی کردند و دریافتند که اسیدهای چرب چند غیراشباع تولید شده به مقدار مکمل نیتروژن وابسته است (Jang *et al*., 2000).

### - مکمل روغن

نتایج حاصل از این تحقیق افزودن روغن بزرک به سوبسترا را به عنوان عامل موثر و معنی‌دار با اثر مثبت در تولید آراشیدونیک اسید نشان داد، که به میزان ($w.w^{-1}$) ٪ ۱۰ باعث افزایش تولید آراشیدونیک اسید توسط *M. alpina* گردید، این نتیجه با گزارش برخی محققین در سوبسترای جامد همخوانی داشت. طبق گزارش آنها افزودن ($w.w^{-1}$)٪ ۱۰ روغن بزرک باعث افزایش اسیدهای چرب چند غیراشباع در اغلب سویه‌های مورد مطالعه از *Mortierella* می‌شود (Jang *et al*., 2000; Jang & Yang, 2008; Jacobs *et al*., 2009; 2010).

همچنین نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با تحقیق Jang و همکاران در تخمیر غوطه‌وری هم راستا بود. این محققین با مقایسه‌ی تاثیر چند منبع روغن بر تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع، روغن بزرک را به عنوان بهترین و بعد از آن به ترتیب روغن سویا و روغن آفتابگردان معرفی کردند (Jang *et al*., 2005).

در این تحقیق روغن سویا که در دو مقدار ۱ و ۱۰ درصد ($w.w^{-1}$) استفاده شده بود که در میزان آراشیدونیک اسید تولید شده تاثیر معنی‌دار نداشت و هم‌راستا با نتایج Jang و همکاران در سال ۲۰۰۵ بود. آنها نشان دادند با افزایش غلظت روغن سویا توده‌ی سلولی افزایش می‌یابد و




**شکل ۱- پارتو متغیرها برای آراشیدونیک اسید**

**جدول ۵- ضرایب عوامل تاثیرگذار در تولید آراشیدونیک اسید**

| متغیرها | رطوبت اولیه سوبسترا | سن تلقیح | افزودن روغن بزرک | اندازه ذرات سوبسترا | افزودن مکمل نیتروژن در روز چهارم گرمخانه گذاری |
|---|---|---|---|---|---|
| ضرایب | ۰/۸۸+ | ۰/۶۸- | ۰/۶۶+ | ۰/۵۸+ | ۰/۴۲+ |

[1] Oleic acid (OA; 18:1, ω-9) [2] Linoleic acid (LA; 18:2. ω-6) [3] α -Linolenic acid (ALA; 18:3 cis, 9, 12, 15. ω-3)





jftn.srbiau.ac.ir

در ۱ ٪ به ثبات می‌رسد، مقدار آراشیدونیک اسید و غیر اشباعیت با افزایش بیشتر غلظت سویا کاهش می‌یابد (Jang *et al.*, 2005). Jang و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند افزودن ۱٪ روغن سویا و ۱٪ روغن بزرک بر بستر جامد سبوس برنج راندمان اسیدهای چرب چند غیراشباع کل، لینولئیک اسید، آراشیدونیک اسید و ایکوزاپنتاانوئیک اسید را افزایش می‌دهد. این تفاوت احتمال دارد ناشی از اختلاف در نوع سوبسترا و شرایط عملیات تخمیر باشد (Jang *et al.*, 2000; Asadi *et al.*, 2013).

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت افزودن روغن بزرک تا ۱۰ درصد $(w.w)^{-1}$ باعث افزایش آراشیدونیک اسید می‌شود. این امر نشان می‌دهد روغن بزرک توسط کشت این قارچ می‌تواند به نحو موثری متابولیزه شود و در تولید آراشیدونیک اسید نقش مثبتی داشته باشد، احتمالا به علت محتوای غنی این ماده از اولئیک اسید، لینولئیک اسید، آلفالینولنیک اسید و استفاده قارچ *Mortierella* از این پیش‌سازها برای تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع باشد. یافته‌های مذکور، تایید می‌کنند که *M. alpina*، قادر به استفاده از لیپیدهای افزوده شده به محیط کشت برای تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع، بوسیله غیر اشباع‌سازی و طویل‌سازی اسیدهای چرب می‌باشند (Certik *et al.*, 1998).

**- رطوبت اولیه سوبسترا**

در این تحقیق، ۷۵٪ رطوبت اولیه سوبسترا باعث افزایش تولید آراشیدونیک اسید شد و تاثیر معنی‌دار مثبت داشت. با نتایج گزارش شده توسط سایر پژوهشگران در رابطه با تولید آراشیدونیک اسید بر سبوس برنج توسط *M. alpina* هم‌راستا بود. آنها رطوبت ۷۵٪ را برای تولید آراشیدونیک اسید مطلوب گزارش کرده بودند (Jang *et al.*, 2000; Jang and Yang, 2008). همچنین تحقیق Zhang و Hu بر روی پوست سویا و Economou و همکاران بر روی سورگوم شیرین با استفاده از *M. isabellina* افزایش رطوبت اولیه به ترتیب به میزان ۷۵٪ و ۹۲٪ را باعث افزایش تولید روغن میکروبی گزارش کردند (Economou *et al.*, 2010; Zhang & Hu, 2012). علت این اختلاف تفاوت در نوع سوبسترا و تفاوت در میزان جذب رطوبت توسط آن می‌تواند باشد. Zandrazil و Brunert، نشان دادند که رطوبت پایین، حلالیت پذیری مواد مغذی و تورم سوبسترا را کاهش می‌دهد. در مقابل، رطوبت بالا، موجب از بین رفتن تخلخل و ایجاد چسبندگی[1] ذرات سوبسترا می‌گردد، همچنین مبادله گاز اکسیژن را کاهش می‌دهد (Zandrazil and Brunert., 1981). بنابراین رطوبت بسیار زیاد و بسیار کم برای تولید متابولیت مناسب نیست (Jang *et al.*, 2000).

**- اندازه ذرات سوبسترا**

در این تحقیق، اندازه ذرات سوبسترای درشت (۱/۷-۱/۲ میلی‌متر) در مقایسه با ذرات ریز (۰/۶-۰/۱ میلی‌متر) تاثیر مثبت معنی‌دار بر تولید آراشیدونیک اسید نشان داد و مانند نتایج Ghobadi و همکاران باعث افزایش تولید آراشیدونیک اسید گردید (Ghobadi *et al.*, 2011). اندازه ذرات درشت‌تر، از کلوخه شدن ذرات سوبسترا پیشگیری کرده و سبب جریان آزادانه‌تر هوا و نفوذ بهتر میسلیوم کپک در سوبسترا و تولید بیشتر محصول توسط کپک می‌گردد (Pandey *et al.*, 2000). بنابراین کنجاله متراکم شده با ذرات کوچکتر سوبسترا، عامل بازدارنده برای هوادهی و رشد مناسب قارچ و تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع بوده که با بزرگ کردن اندازه ذرات، این عامل بازدارنده کاهش می‌یابد. بنابراین، بافت متخلخل و دارای خلل و فرج امکان هوادهی مطلوب را فراهم خواهد کرد (Ghobadi *et al.*, 2011).

**- سن تلقیح**

سن تلقیح و یا به عبارت دیگر سن میسلیوم‌ها برای تلقیح که مدت زمان گرمخانه‌گذاری میسلیوم‌ها قبل از تلقیح است، در این مطالعه از عوامل مهم و تاثیرگذار با اثر منفی و معنی‌دار بر تولید آراشیدونیک اسید برآورد شد. به عبارتی تلقیح با میسلیوم‌های جوان با سن ۹۶ ساعت سبب افزایش تولید آراشیدونیک اسید در مقایسه با تلقیح میسلیوم‌های ۱۹۲ ساعت گردید، که با نتایج به‌دست آمده از تحقیق Fakas و همکاران مطابقت داشت. آنها دریافتند

[1] Stickiness



jftn.srbiau.ac.ir

میزان اسیدهای چرب چند غیراشباع در میسلیوم‌های جوان زیاد می‌باشد و با افزایش سن کاهش می‌یابد. بیوسنتز اسیدهای چرب چند غیراشباع در میسلیوم‌های جوان با رشد سریع بهتر صورت می‌گیرد، در حالی‌که سنتز آنها در میسلیوم‌های پیر به طور قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند (Fakas et al., 2009a).

**- مدت زمان پیش تیمار حرارتی سوبسترا**

تاکنون تاثیر مدت زمان پیش‌تیمار حرارتی سوبسترا بر روی اسیدهای چرب تولید شده توسط ریزسازواره‌ها بررسی نشده بود، بلکه به منظور سترون کردن و رهاسازی مواد مغذی سوبسترا از اعمال ۲۰ و ۳۰ دقیقه اتوکلاو استفاده شده بود. در این بررسی، این عامل بر آراشیدونیک اسید تاثیر معنی‌داری را نشان نداد که احتمال دارد تغییرات ایجاد شده در سوبسترا در فعالیت آنزیم‌های غیر اشباع ساز مربوط به آراشیدونیک اسید تاثیری نداشته باشد. به هر حال سوبسترای جامد به علت استریل کردن و رهاسازی مواد مغذی نیاز به تیمار دارد که قبادی و همکاران از هیدرولیز سوبسترا در دمای ۱۲۱°C به مدت ۳۰ دقیقه استفاده کرده بودند (Ghobadi *et al.*, 2011). بنابراین توصیه می‌شود به منظور صرفه جویی در انرژی از مدت زمان ۳۰-۲۰ دقیقه جهت اتوکلاوکردن در ارتباط با این قارچ استفاده گردد.

**- pH اولیه سوبسترا**

pH اولیه سوبسترا از جمله عوامل مهم برای رشد کپک می‌باشد و تاثیر کم در نوع اسیدچرب دارد (Asadi *et al.*, 2013). در این بررسی، با توجه به محدوده مناسب pH، ۶ و ۷ که نقاط بهینه برای تولید اسیدهای چرب چند غیر اشباع در بستر جامد هستند، عامل معنی‌دار برای تولید آراشیدونیک اسید شناخته نشد، Jang و همکاران نیز دریافتند pH بهینه برای تولید اسیدهای چرب چند غیر اشباع در بستر جامد توسط قارچ *M. alpina* ۶ تا ۷ است و در pH بیشتر از ۸ یا کمتر از ۵ تولید اسیدهای چرب چند غیر اشباع کاهش می‌یابد (Jang *et al.*, 2000).

**- دمای گرمخانه‌گذاری**

فاکتور دما در این تحقیق تاثیر معنی‌دار بر تولید آراشیدونیک اسید نداشت، در حالیکه توسط سایر محققین از عوامل موثر بر تولید زیست توده و پروفایل اسیدهای چرب گونه‌های روغنی به ویژه *M. alpina* گزارش شده بود (Jang *et al.*, 2000; Jang & Yang, 2008; Ghobadi *et al.*, 2011)، احتمال دارد بخاطر انتخاب محدوده مورد بررسی برای دما و اختلاف در دیگر شرایط عملیات تخمیر باشد. دمای لازم برای تولید زیست توده، معمولاً بیش از دمای مورد نیاز جهت تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع گزارش شده است. گونه‌های *Mortierella*، مانند *M. alpina* بهترین رشد را در دمای حدود ۲۵-۲۳ °C (Jang *et al.*, 2000) و بهترین میزان تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع را در محدوده ۲۰-۱۶°C نشان داده‌اند (Dyal & Narine., 2005).

**- مدت زمان گرمخانه‌گذاری**

مانند سایر فرایندهای تخمیری، زمان بهینه برای تولید متابولیت اهمیت دارد. گونه‌های *M. alpina* بهترین میزان تولید اسیدهای چرب چند غیر اشباع را در مدت زمان ۱۰ تا ۱۵ روز نشان می‌دهند. آنچه اهمیت دارد، این است که افزایش بیش از اندازه زمان تخمیر، از صرفه اقتصادی محصول تولید شده توسط ریزسازواره می‌کاهد. با توجه به این عامل بایستی مدت زمان تخمیر به گونه‌ای انتخاب گردد که بیشترین راندمان در کمترین زمان ممکن بدست آید (Dyal & Narine., 2005; Asadi *et al.*, 2013). اگر چه در مطالعه قبادی و همکاران، عامل زمان با تاثیر معنی‌دار و منفی برای تولید آراشیدونیک اسید گزارش شد (Ghobadi *et al.*, 2011)، اما در این تحقیق از جمله عوامل موثر معنی‌دار بر تولید آراشیدونیک اسید معرفی نشد. این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع سوبسترا و بازه زمانی انتخاب شده باشد. شاید اگر در مدت زمانی دیگر تولید آراشیدونیک اسید مورد بررسی قرار می‌گرفت، به عنوان عاملی با تاثیر معنی‌دار گزارش می‌شد.

**- نسبت کربن به نیتروژن سوبسترا**

در این مطالعه نسبت کربن به نیتروژن عامل موثر معنی‌دار برای تولید آراشیدونیک اسید نبود، هر چند برخی محققین گزارش کرده بودند که نسبت کربن به نیتروژن در رشد کپک و تولید لیپید اهمیت دارد (Sajbidor *et al.*, 1990; Jang *et al.*, 2005). احتمال دارد به علت





ifrn.srbiau.ac.ir

محدوده انتخاب شده برای این متغیر باشد. گزارش سایر پژوهشگران حاکی از رعایت نسبت کربن به نیتروژن سوبسترا در محدوده ۲۰-۱۵ می‌باشد که برای رشد قارچ *M. alpina* و تولید لیپید مطلوب بیان شده است و نسبت بسیار زیاد و یا بسیار کم آن نمی‌تواند باعث تولید مطلوب اسیدهای چرب چند غیر اشباع شود (Koike *at al.*, 2001; Asadi *at al.*, 2013).

## نتیجه‌گیری

در این تحقیق از بین یازده متغیر مستقل، رطوبت اولیه سوبسترا، افزودن روغن بزرک، اندازه ذرات سوبسترا و افزودن مکمل نیتروژن در روز چهارم دارای تاثیر مثبت و سن تلقیح دارای تاثیر منفی بر تولید آراشیدونیک اسید بودند. همانطور که مشاهده شد، محصول حاصل از آزمایش شماره ۱۱ دارای بیشترین مقدار آراشیدونیک اسید (۰/۴۷±۴/۶۶ میلی‌گرم در گرم سوبسترای تخمیر شده خشک) در میان دوازده آزمایش بود. در محدوده مورد بررسی متغیرها در این تحقیق، رطوبت اولیه ٪ ۷۵-۷۰ سوبسترا، افزودن ($w.w^{-1}$)٪ ۱۰ روغن بزرگ، اندازه ۱/۷-۱/۲ میلی‌متر ذرات سوبسترا و افزودن ($w.w^{-1}$)٪ ۴ مکمل نیتروژن و سن تلقیح ۹۶ ساعت در افزایش تولید آراشیدونیک اسید تاثیر معنی‌دار داشتند. بنابراین می‌توان بسته به هدف مورد نظر با اصلاح تفاله خرما توسط عوامل ذکر شده و کشت جدایه *M. alpina* CBS 528.72 بر روی آن بیشترین مقدار آراشیدونیک اسید را تولید کرد.

## سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولین دانشگاه تربیت مدرس به دلیل استفاده از امکانات آزمایشگاهی و حمایت‌هایشان، مسئولین انستیتو تحقیقات صنایع غذایی به دلیل استفاده بخشی از امکانات آزمایشگاهی، همچنین مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و مجتمع آزمایشگاهی واحد مربوطه به جهت تامین بخشی از مواد و وسایل آزمایشگاهی مورد نیاز و دیگر عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را مورد حمایت خود قرار دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

Asadi, S. Z., Khosravi-Darani, K., Nikoopour, H. & Bakhoda, H. (2013). Evaluation of the effect of process variables on the fatty acid profile of single cell oil produced by Mortierella using solid-state fermentation, Crit Rev Biotechnol, Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/07388551.2013.804805, Early Online: 1-9.

Certik, M. & Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. J. Biosci. Bioeng. 87, 1-14.

Certik, M., Sakuradani, E. & Shimizu, S. (1998). Desaturase-defective fungal mutants: Usefultools for the regulation and overproduction of polyunsaturated fatty acids. Trend in Biotechnol. 16, 500-505.

Dyal, S. D., Bouzidi, L. & Narine, S. S. (2005). Maximizing the production of γ-linolenic acid in *Mortierella ramanniana Var. ramanniana* as a function of pH, temperature and source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation. Food. Res. Int. 38, 815-829.

Dyal, S. D. & Narine, S. S. (2005). Implications for the use of Mortierella fungi in the industrial production of essential fatty acids. Food. Res. Int. 38, 445- 467.

Economou, Ch. N., Makri, A., Aggelis, G., Pavlou. S. & Vayenas, D. V. (2010). Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the bio technological production of single cell oil. Bioresour. Technol. 101, 1385-1388.

Fakas, S., Makri, A., Mavromati, M., Tselep, M. & Aggelis, G. (2009a). Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation. Bioresour. Technol. 100, 6118-6120.

Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos. A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchos, A. & Aggelis, G. (2009b). Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Gunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. J. biomass. Bioenergy. 33, 573- 580.

Fidler. N., Koletzko. B. & Sauerwald. T. (1999). Single cell oils production and application. Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika. 74, 37-45.

Ghobadi, Z., Hamidi Esfahani, Z. & Azizi, M. H. (2011). Determination of effective variables on arachidonic acid production by *Mortierella alpina* CBS 754.68 in solid-state fermentation using Plackett-Burman screening design. World Acad. Sin. Eng. Technol. 81, 678-680.



jfn.srbiau.ac.ir

Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. & Shimizu, S. (2002). Production of arachidonic acid by Mortierella fungi. J. Biosci. Bioeng. 7, 252-262.

Higashiyama, K., Yaguchi, T., Akimoto, K., Fujikawa, S. & Shimizu, S. (1998). Enhancement of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. . J. Am. Oil Chem. Soc. 75, 1501-1505.

Jacobs, A., Botha, A., Reddy, J. K. & Vanzyl, W. H. (2010). Sunflower press cake as a substrate for eicosapentaenoic acid production by representatives of the genus Mortierella. Bioresour. Technol. 5, 1232-1243.

Jacobs, A., Botha, A. & Vanzul, W. H. (2009). The production of eicosa pentaenoic acid by representatives of the genus Mortierella grown on brewers'spent grain. Biologia. 64, 871-876.

Jang, H. D., Lin, Y. Y. & Yang, S. S. (2000). Polyunsaturated fatty acid production with *Mortierella alpina* by solid substrate fermentation. Bot. Bull. Acad. Sin. 41, 41-48.

Jang, H.D., Lin, Y. Y. & Yang, S. S. (2005). Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. Bioresour. Technol. 96, 1633-1644.

Jang, H. D. & Yang, S. S. (2008). Polyunsaturated fatty acids production with a solid-state column reactor. Bioresour. Technol. 99, 6181-6189.

Koike, Y., Cai, H. J., Higashyiama, K., Fujikawa, S. & Park, E. (2001). Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 91, 382- 389.

Lekha, P. K. & Lonsane, B. K. (1994). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations**.** Process Biochem. 29, 497-503.

Metcalf, L. C., Schmitz, A. A. & Pelka, J. R. (1996). Rapid preparation of methyl esters from lipid for gas chromatography analysis. Analytical Chemistry, 38, 514-518.

Nelson, D. W. & Sommers, L. E. (1982). Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Page, A.L. (ed.): Methods of Soil Analyses. Chemical and Microbiological Properties. ASA Monograph, Madison, Wisconsin USA. 539–579.

Pandey, A., Soccol, C. R. & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. Process Biochemistry, 35, 1153-1169.

Park, E. Y., Koike, Y., Higashiyama, K., Fujikawa, S. & Okabe, M. (1999). Effect of nitrogen source on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. J. Bioscience and Bioengineering, 88: 61-67.

Peng, X. & Chen, H. (2008a). Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis sp*. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. Bioresour. Technol. 99, 3885-3889.

Peng, X. & Chen, H. (2008b). Rapid estimation of single cell oil content of solid-state fermented mass using near- infrared spectroscopy, Bioresour. Technol. 99, 8869-8872.

Plackett, R. L. & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multi factorial experiments, *Biometrika*, 33, 305.

Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. J. Biochim. 86, 807-815.

Rocky Salimi, K., Hamidi Esfahani, Z. & Abbasi, S. (2011). Statistical optimization of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* CBS 754.68 in submerged fermentation. Iran J Biotechnol, 9, 87-93.

Sajbidor, J., Dobronova, S. & Certik, M. (1990). Arachidonic acid production by *Mortierella sp. S-17*: influence of C/N ratio. Biotech. Lett. 12, 455-456.

Sakuradani, E. & Shimizu, S. (2009). Single cell oil production by *Mortierella alpina*. J. Biotechnol. 144, 31-36.

Stredanska, S. & Sajbidor, J. (1993). Influence of carbon and nitrogen sources on the lipid accumulation and arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. Acta Biotechnology, 13, 185-191.

Weber, R.W. S. & Tribe, H. T. (2003). Oil as a substrate for Mortierella species. Mycologist. 17, 134-139.

Zandrazil, F. & Brunert, H. (1981). Investigation of physical parameters important for solid-state fermentation of straw by white rot fungi. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11, 183-188.

Zhang, J. & Hu, B. (2012). Solid-state fermentation of *Mortierella isabellina* for lipid production from soybean hull, Appl Biochem Biotechnol. 166, 1034-1046.



jfnsrbiau.ac.ir