DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.5.0
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۳-۲۷۹

تولید اسید های چرب غیر اشباع با استفاده از قارچهای زیگومایست رشد داده شده بر روی روغن‌های گیاهی

مریم السادات میرباقری*

ایران، یزد، دانشگاه یزد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۲

چکیده

کاربرد لیپیدهای میکروبی و انواع اسیدهای چرب غیر اشباع مخصوصاً انواع امگا۳ و ۶ در زمینه‌های درمان و صنعت روبه افزایش است. در این تحقیق تولید بیومس، لیپید و آنالیز اسیدهای چرب ۴ سویه از زیگومایست‌ها شامل *Cunninghamella echinulata*، *Mucor rouxii*، *Mucor circinillioides* و *Rhizopus stolonifer* مورد بررسی قرار گرفت، روغن‌های گیاهی زیتون، نارگیل، کنجد و بادام به میزان ۲ درصد به عنوان منبع کربن به محیط کشت تولید اضافه شد. نتایج نشان داد تمامی سویه‌ها بیش از ۲۵ درصد تولید لیپید را دارند و بیشترین بازده تولید لیپید در انواع روغن‌ها مربوط به *C.echinulata* است. این سویه در محیط حاوی روغن زیتون تا ۶۳ درصد لیپید را در خود ذخیره می‌کند. GLA و لینولئات از انواع اسیدهای چرب غیر اشباع امگا-۶ با ارزشی بودند که توسط تمامی سویه‌های کشت داده شده روی روغن‌های گیاهی ظاهر شدند. *M.rouxii* حدود ۹/۶۹ درصد GLA را با استفاده از روغن زیتون تولید نمود. آراشیدونات از امگا۶ ها و آلفالینولنات از انواع امگا۳ دیگر مواردی بودند که توسط این قارچ‌ها تولید شدند. نکته قابل توجه افزایش ۲ تا ۱۰ برابری در نسبت تولید اسیدهای چرب امگا-۳و۶ درلیپیدهای قارچی تولید شده نسبت به روغن‌های گیاهی نامبرده بود در نتیجه استفاده از سویه‌های زیگومایست می‌تواند لیپیدهای میکروبی با غنای بالا را تولید نماید که استفاده‌های دارویی و غذایی موثری داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: لیپید میکروبی- امگا۳ و ۶- قارچ زیگومیست- روغن گیاهی- اسیدهای چرب غیر اشباع

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۵۳۱۲۳۲۲۹۳ ، پست الکترونیکی: M.Mirbagheri@yazd.ac.ir

مقدمه

اسیدهای چرب غیر اشباع که دارای باندهای دوگانه در طول زنجیره کربنی خود هستند به وسیله انسان سنتز نمی‌شوند بنابراین ضروری‌اند تا از طریق منابع غذایی تامین شوند. خانواده امگا (۵و۸) از انواع اسیدهای چرب با ارزش هستند که نقش به سزایی در سلامت و درمان انواع بیماری‌ها ایفا می‌کنند. لینولئات(C18:2)، گاما لینولنات (GLA, C18:3) و آراشیدونات (C20:4) از انواع امگا-۶ و آلفا لینولنات (C18:3)، ایکوزا پنتانوات (EPA, C20:5) و دوکوزا هگزانوات (DHA, C22:6) از انواع امگا-۳ می‌باشند. GLA پیش‌ساز پروستاگلاندین هاست و در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت، سرطان، روماتوئید آرتریت، تنگی عروق و فشار خون به کار می‌رود (۳). انواع امگا-۶ کاهنده سطح کلسترول خون هستند و مانعی برای ایجاد ترومبوز و تجمع پلاکت‌های خونی‌اند. آراشیدونیک اسید در اندام‌ها، خون و بافت ماهیچه‌ای وجود دارد و اصلی‌ترین امگا-۶ در مغز هست که همراه با دوکوزاهگزانوئیک اسید برای توسعه مغز کودکان اهمیت دارد. این دو اسید چرب برای غنی‌سازی شیر خشک نوزادان در بسیاری از نقاط دنیا نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. ایکوزا پنتانوئیک

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.5.0
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۳-۲۷۹

اسید دارای اثر مثبتی بر روی سیستم عروق و قلب است (۴).

اسیدهای چرب غیر اشباع توسط منابع مختلف گیاهی، حیوانی و میکروبی تولید می‌شوند. منبع اولیه امگا۶ در رژیم غذایی از روغن‌های دانه‌ای و علوفه‌ای است که شامل انواع روغن‌های دانه‌ای گل مغربی، گل گاوزبان و گل زرد می‌باشند. از میوه‌ها آووکادو بیشترین فیبرمحلول و چربی را داراست که قسمت عمده‌ای از چربی آن لینولئیک اسید می‌باشد (۵). منبع اولیه امگا۳ در غذاها به طور عمده برگ‌های سبز می‌باشد اما اکثر روغن‌های حیوانی حاوی اسیدهای چرب ضروری امگا۳ از ماهی‌ها به دست می‌آید که می‌توانند محل ذخیره بسیاری از آلودگی‌های زیست محیطی مانند فلزات سنگینی چون جیوه، ترکیبات سمی دی اکسان‌ها و یا پساب‌های صنعتی و نفتی باشند. علاوه بر آن نگرانی‌هایی در مورد آلودگی ویروسی و یا پریون‌ها در استفاده از این ترکیبات وجود دارد (۶). از آنجا که عمده منبع اسیدهای چرب غیراشباع گیاهان دارویی است و مراحل کاشت، برداشت و استخراج اسیدهای چرب از آن‌ها طولانی و هزینه‌بر است و از طرف دیگر استخراج روغن از آن‌ها به فصلی خاص محدود می‌شود لذا استفاده از میکروارگانیسم‌ها جهت تولید اسیدهای چرب این مشکلات را نداشته و مراحل تولید سریع، آسان و کم هزینه‌تر است (۷).

مخمرهایی چون کاندیدا، رودوترولا، یاروویا، کریپتوکوکوس و تریکوسپورون تولید کننده این چربی ها هستند. از این میان یاروویا لیپولیتیکا از بهترین منابع تولید لیپید به حساب می‌آید که قادر است انواع اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباعی چون پالمتیک، استئاریک و اولئیک اسید را به میزان قابل توجهی تولید نماید. امروزه استفاده از این مخمرها برای تولید بیودیزل بسیار مورد توجه محققین واقع شده است (۸). تعداد کمی از باکتری‌ها خصوصاً باکتری‌هایی که در اعماق دریا با فشار بالا و درجه حرارت پائین وجود دارند، اسیدهای چرب غیر اشباع EPA و DHA را تولید می‌کنند. از این دسته می‌توان فوتوباکتریوم و شوانلا را نام برد. با توجه به این که این باکتری‌ها برای رشدشان به فشار بالا و درجه حرارت پائین نیاز دارند، تولید اسیدهای چرب از آن‌ها در مقیاس صنعتی مقرون به صرفه نیست. قارچ‌ها به خصوص خانواده زیگومایست‌ها تولید کننده لیپیدهای میکروبی با درصد بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباعند که آن‌ها را در هیف‌های خود ذخیره می‌نمایند (۹) .یک مطالعه بر روی کاربرد لیپید میکروبی با استفاده از مخمر نانوایی توسط Nageli و Loew در سال ۱۸۷۸ انجام شد، اما مورد توجه قرار نگرفت تا این که چند دهه بعد لیپید میکروبی جلب توجه کرد. بعدها آزمایشات برای تجاری سازی تولید روغن میکروبی توسط گروه Lindner در طول جنگ جهانی اول در آلمان به منظور کاهش کمبود مواد غذایی انجام شد (۱۰). انواع قارچ‌های *Mucor rouxii*، *Mortirella isabellina*، *Mortirella alpina* *Mucor circinolloid* در تحقیقات جهت تولید انواع امگا مخصوصاًGLA به کار رفته‌اند (۱۱و۱۲). ترکیب محیط کشت از نظر نوع منبع کربن تاثیر به سزایی در تولید و تجمع لیپید و ترکیب اسیدهای چرب در قارچ‌ها دارد. Somashekar گزارش داد که گلوکز بهترین منبع برای تولید لیپید از *Mucor ruxii* است و تولید ۳ تا ۱۷ درصد GLA می‌کند. مطالعه بر روی *Mortirella ramanniana* نشان داد که تولید GLA با استفاده از محیط پایه‌ای حاوی ۵ درصد دکستروز و ۱٪ عصاره مخمر افزایش می‌یابد (۱۳). Tauk-Tornisielo در سال ۲۰۰۷ تولید اسیدهای چرب در روغن‌های گیاهی و کربوهیدرات‌ها را توسط ۴ سویه از موکور هیمالیس با هم مقایسه کرد. در تولید صنعتی فراورده‌های میکروبی استفاده از منابع کربنی ارزان قیمت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و مطالعات فراوانی برای کاهش هزینه تولید لیپیدهای میکروبی با استفاده از ملاس، آب پنیر، ضایعات کشاورزی، پساب روغن زیتون و ضایعات میوه صورت گرفته است. در تولید

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.5.0
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۳-۲۷۹

امگا۳ و ۶ توسط قارچ‌ها میزان هوادهی بالا، pH اولیه، مرفولوژی قارچ و نوع محیط کشت از اهمیت خاصی برخوردار است (۶-۳).

در این مطالعه تولید لیپید و اسیدهای چرب توسط قارچ-های زیگومایست شامل *Cunninghamell echinulata*، *Mucor rouxii*، *Mucor circinillioidess* و *Rhizopus stolonifer* که از قارچ‌های شاخص تولید کننده امگا-۳و ۶ هستند با استفاده از منابع مختلف روغن‌های گیاهی بررسی شد. منابع کربنی مورد استفاده شامل روغن زیتون، کنجد، نارگیل و بادام خود جزء روغن‌های با ارزش موجود در بازار به شمار رفته و مقایسه پروفایل اسید چرب این روغن‌ها به صورت خام و در تیمار با انواع قارچ‌های ذکر شده صورت پذیرفت.

مواد و روشها

میکروارگانیسم و شرایط محیط کشت: سوبه‌های قارچی شامل *Cunninghamella echinulata DSM 1905*، *Mucur oruxii DSM 1194*، *Mucor circinillioides* DSM 1175 و *Rhizopus stolonifer DSM 2194* از کلکسیون میکروبی DSM آلمان خریداری شدند. جهت تولید اسپور بر روی محیط PDA به مدت ۷ روز کشت داده شدند و پس از شمارش تعداد ۱×۱۰۷ اسپور داخل محیط تولید تلقیح شد. محیط کشت تولید پایه شامل VKH2PO4، Na2HPO4 ۲/۵، MgSO4 ۱/۵، CaCl2 ۰/۲، FeCl3 ۰/۲، ZnSO4 ۰/۰۲، MnSO4 ۰/۰۶، (NH4)2SO4 ۰/۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر بود و ۲ در صد روغن به عنوان منبع کربن پس از بررسی با روش تک فاکتوریل اضافه شد. محیط کشت تولید به میزان ۵۰ میلی‌لیتر در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری تهیه و پس از تلقیح در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و دور ۴ g (۱۸۰ rpm) قرار داده شدند (۱۴).

روغن‌ها از انواع زیتون، کنجد، نارگیل و بادام از بازار ایران تهیه و مواد و نمک‌های مورد نیاز همه از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. اندازه‌گیری بیومس خشک: بیومس به دست آمده پس از ۷۲ ساعت از طریق کاغذ واتمن شماره ۱ جداسازی شد. چندین بار شستشو با آب و سپس الکل جهت خارج شدن روغن و مواد باقیمانده از اطراف هیف‌ها انجام پذیرفت و پس از آن در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. وزن خشک نمونه‌ها محاسبه شد. استخراج لیپید: بر اساس روش اصلاح شده Bligh&Dyer انجام پذیرفت بدین ترتیب که پس از جداسازی سلول‌ها و شستشو، به هر نمونه میزان ۱۰ میلی‌لیتر HCl 4 مولار اضافه شد و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ تا ۲ ساعت قرار گرفت. پس از هیدرولیز اسیدی، ۲۰ میلی‌لیتر محلول کلروفرم: متانول به نسبت ۱:۱ به هر نمونه اضافه شد و در دمای محیط به مدت ۲ تا ۳ ساعت شیک شدند. با سانتریفیوژ با دور g 2000 به مدت ۵ دقیقه فازها از هم جدا شدند. با پیپت پاستور لایه زیرین که شامل لیپید محلول در کلروفرم بود جدا شده و پس از تبخیر لیپید حاصله وزن شد. بازده تولید لیپید بر حسب گرم لیپید بر گرم وزن خشک محاسبه شد (۱۵و۱۴). آنالیز اسید چرب: ابتدا اسیدهای چرب موجود در لیپید متیل استره شدند بدین ترتیب که به ۵۰ میلی‌گرم از نمونه لیپید میزان ۱ میلی‌لیتر تولوئن و ۲ میلی‌لیتر از محلول ۱٪ سولفوریک اسید در متانول اضافه شده و نمونه‌ها یک شب در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۵ میلی‌لیتر از NaCl پنج درصد و ۵ میلی‌لیتر n-هگزان اضافه شد. نمونه‌ها خوب به هم زده شده و فاز رویی جدا گردید. شستشو با بی‌کربنات پتاسیم انجام شده و سپس در مجاورت سولفات سدیم بدون آب، آبگیری شد. اسیدهای چرب متیل استر به دستگاه گاز کروماتوگرافی جهت آنالیز نهایی تزریق شدند. شناسایی ترکیب اسیدهای چرب با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی ((GC مدل J-19091413 از شرکت Agilent آمریکا مجهز به آشکارساز FID صورت گرفت و از نیتروژن به عنوان گاز حامل استفاده شد. ستون دستگاه از نوع HP-5

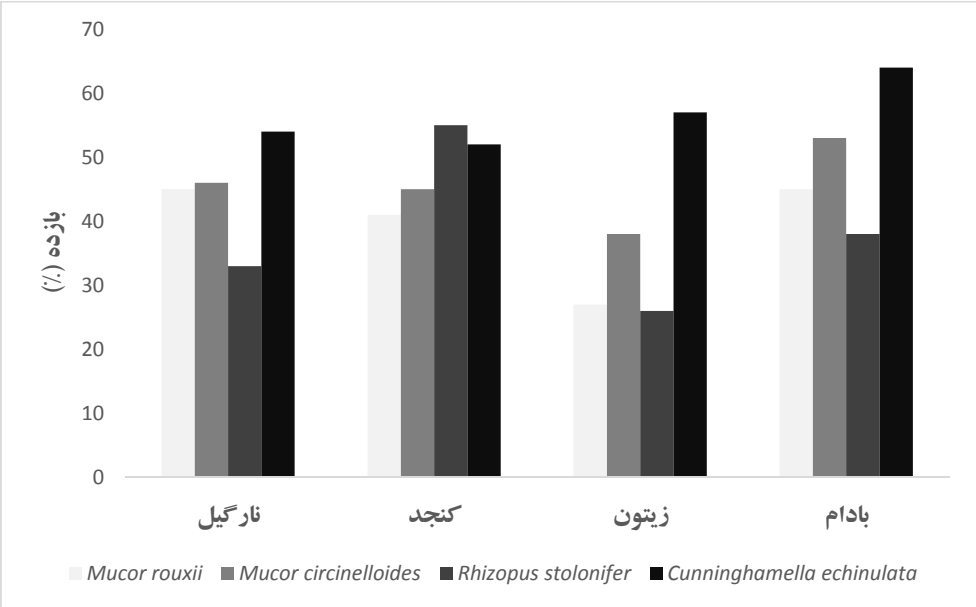
DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.5.0

(طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن آن ۰/۲۵ میکرومتر) بود. از دمای ثابت C260° برای ستون و فشار گاز psi12/6 در محل خروجی سیلندر برای گاز حامل، استفاده شد. مقدار ۱ میکرولیتر از نمونه به دستگاه تزریق گردید، زمان‌های خروج اسیدهای چرب از ستون مشخص شد و نمودار آن توسط دستگاه رسم شد. با مقایسه این زمان‌ها با زمان خروج اسیدهای چرب استاندارد، تک تک اسیدهای چرب نمونه مشخص شدند استانداردهای اسید چرب به صورت متیل استره و جداگانه از شرکت سیگما آمریکا تهیه شد و تعیین غلظت هر اسید چرب با مقایسه با نمودار استاندارد به دست آمد (۱۶).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله با استفاده از نرم افزار IBM SPSS Statistics 22 انجام شد. برای داده‌های با توزیع نرمال با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه ANOWA و آزمون تکمیلی توکی اختلاف میانگین‌ها بررسی شد و لازم به ذکر است برای کاهش خطا، آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام گرفت. در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل، خطای مجاز برای رد فرض صفر (H0)، ۵ درصد در نظر گرفته شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ رسم گردید.

نتایج

بررسی میزان تولید لیپید در سویه‌های قارچی کشت داده شده برروی انواع روغن‌های گیاهی انجام پذیرفت. بهترین زمان تولید لیپید ۷۲ ساعت تعیین شد و با توجه به میزان لیپید و بیومس به دست آمده در این زمان بازده تولید لیپید در هر نمونه تعیین شد. نتایج نشان داد که سویه *C.echinulata DSM 1905* دارای بیشترین بازده تولید لیپید در انواع محیط‌های حاوی روغن بین ۵۴ تا ۶۷ درصد را نشان داد. کمترین بازده در مورد *R.stolonifer DSM 2194* بین ۲۵ تا ۳۳ درصد گزارش شد (شکل۱).



شکل ۱- مقایسه میزان بازده تولید لیپید(بیومس/لیپید) بر حسب w/w٪ در روغن های گیاهی نارگیل،کنجد، زیتون و بادام به عنوان منبع کربن تیمار شده با قارچهای زیگومایست. نتایج حاصل ۳ بار تکرار آزمایش است.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.5.0 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۳-۲۷۹

با بررسی پروفایل اسیدهای چرب در روغن‌های گیاهی با استفاده از سویه‌های قارچ مورد استفاده مشخص شد این قارچ‌ها دارای توانایی تولید انواع اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع بر روی منابع روغن‌های گیاهی را دارا می‌باشند. با توجه به جدول ۱ مشخص می‌شود در استفاده از روغن زیتون به عنوان منبع کربن اسیدهای چرب امگا-۶ مانند GLA، لینولئات و آراشیدونات تولید شدند که GLA درتیمار با تمام سویه‌ها به میزان قابل توجهی تولید شد ۷/۹۴٪ در تیمار با ریزوپوس و ۷/۳۶ در تیمار با *M.circinelloid* همین دو سویه به ترتیب ۹/۶۳ و ۱۱/۹ درصد لینولئات را تولید کردند در حالی که این دو اسید چرب در شاهد وجود نداشتند. از انواع امگا-۳ تنها در این روغن و آن هم به میزان کم (حدود۲٪) لینولنات تولید شد اما نکته قابل توجه در درصد تولید اسیدهای چرب امگا۳و۶ و مقایسه آن با ترکیبات شاهد بود که افزایشی بین ۲ تا ۹ برابری مشاهده شد این نسبت در استفاده از روغن کنجد نیز بین ۲ تا ۱۰ برابر در تیمار با قارچ‌ها افزایش نشان داد (جدول۲).

جدول ۱- بررسی درصد پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در روغن زیتون و مقایسه آن با لیپید تولید شده از قارچ‌های زیگومایست رشد داده شده بر روی این روغن به عنوان منبع کربن. ($p<0.05$)

	C10:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2 n-6	C18:3 GLA n-6	C18:3 ALA n-3	C20:0	C20:4 ARA n-6	درصد امگا۳ و ۶
شاهد روغن زیتون	–	±۱ ۰،۰۸	±۱۲/۹۵ ۰/۸۲	±۳/۹۳ ۰/۰۲	±۷۹/۱۳ ۲/۰۲	–	–	۲/۱۳ ۰/۱۶±	±۰/۴۷ ۰/۰۲	–	۲/۴ ۰/۰۶±
تیمار با *C.echinulata*	۰/۲۵	±۰/۷۳ ۰/۰۲	±۱۱/۹۳ ۱/۰۲	۴/۰۵	±۷۱/۸۳ ۳/۰۶	±۶/۷۶ ۰/۰۲	۰/۳۲±۱/۳۷	۰/۰۹±۲/۰۴	±۰/۴۷ ۰/۰۲	±۰/۲۷ ۰/۰۱	۱۰/۱۰ ۰/۸۶±
تیمار با *M.rouxii*	–	۰۱±۰/۵ ۰/	–	۱/۰۳ ۰/۰۲±	۱۰/۴۸	±۲/۴۲ ۰/۰۲	۲/۳۶	–	–	–	۰/۱±۴/۷۸
تیمار با *M.circinelloides*	۰/۶۹	±۰/۷۷۵ ۰/۰۳	±۱۳/۷۷ ۱/۱۲	±۴/۱۱ ۰/۰۲	±۶۰/۰۲ ۲/۲۲	۹/۶۳	۰/۵۳±۷/۳۶	۰/۰۴±۱/۶۸	–	–	۱۸/۶۷
تیمار با *R.stolonifer*	۰/۷	±۱/۷۷ ۰/۰۲	±۱۳/۷۳ ۱/۰۲	۴/۱ ۰/۰۲±	۵۸/۴۰ ۱/۰۱±	۱۱/۶۰	۷/۹۴ ۰/۲۷±	۱/۶۸ ۰/۰۷±	–	–	۰/۰۴±۲۱

جدول ۲- بررسی پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در روغن کنجد و مقایسه آن با لیپید تولید شده از قارچ‌های زیگومایست رشد داده شده بر روی این روغن به عنوان منبع کربن. ($p<0.05$)

	C10:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2 n-6	C18:3 GLA n-6	C20:0	C22:0	درصد امگا۶
شاهد روغن کنجد	–	۰/۴۲±۱۱	–	۴/۶۷ ۰/۲۲±	۳۱/۰۴	۲/۰۲±۵۲	–	۰/۳۶ ۰/۰۱±	۰/۶۹ ۰/۳۲±	۲/۰۲±۵۱
تیمار با *C.echinulata*	۰/۴۶ ۰/۰۱±	۱/۲۳ ۰/۰۱±	۱۳/۲۶ ۰/۱۲±	۵/۱۵ ۰/۱۳±	۰/۰۲±۳۱/۱۴	۴۷/ ۳۹	۰/۰۳ ±۱/۱۸	۰/۴۲ ۰/۰۲±	۰/۷۱ ۰/۱۲±	۴۸/۵۷ ۱/۰۸±
تیمار با *M.rouxii*	۱/۷۸ ۰/۰۳±	۰/۸۳ ۰/۰۵±	۱۵/ ۹۳	۵/۸۲ ۰/۱۳±	۲۳/۷	۴۲/۲۷ ۱/۰۲±	۹/۶۹	–	–	۵۱/۹۶ ۲/۰۸±
تیمار با *M.circinelloides*	۰/۳۶ ۰/۰۱±	۰/۴۵ ۰/۰۲±	۱۳/۱ ۰/۶۲±	۵/۷۲ ۰/۶۲±	۳۱/۳۵ ۰/۰۲±	۴۶/۳۷ ۲/۰۲±	۲/۱۲	–	–	۴۸/۴۹ ۱/۰۲±
تیمار با *R.stolonifer*	۰/۹۶ ۰/۰۴±	–	۱۵/۳۴ ۰/۴۲±	۵/۴۳ ۰/۲۲±	۲۴/۵۶ ۰/۰۲±	۴۴/۳۳	۰/۳ ±۹/۳۷	–	–	۲/۰۳±۵۳

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.5.0

در حالی که در مورد روغن نارگیل چندان تغییر نکرد و در استفاده از روغن بادام به عنوان منبع کربن تنها در تیمار با دو سویه *C. echinulata* و *M. rouxii* اسید چرب GLA ظاهر شد، در این روغن در تیمار با *R. stolonifer* هیچ نوع امگا۶ و ۳ ای ایجاد نشد و تنها اسیدهای چرب C16:1, C18:1 تولید شدند. (جدول ۴و۳) لینولئات در استفاده از روغن کنجد و نارگیل و بادام به مقدار قابل ملاحظه‌ای تولید شد، این در حالی بود که اسیدچرب امگا۳ با استفاده از این روغن‌ها نمایان نشد.

جدول ۳- بررسی پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در روغن نارگیل و مقایسه آن با لیپید تولید شده از قارچ‌های زیگومایست رشد داده شده بر روی این روغن به عنوان منبع کربن. ($p<0.05$)

	C10:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2 n-6	C18:3 GLA n-6	درصد امگا-۶
شاهد روغن نارگیل	۱/۳۵± ۵۴/۳۴	۱۹/۷۴ ۰/۸±	–	۰/۳۸ ±۱۰/۲	۰/۹۸±۳/۱۱	۱۰/۳۷ ۰/۸۷±	۲/ ۲۳ ۰/۰۸±	-	۲/۲۳ ۰/۵±
تیمار با *C.echinulata*	۰/۳۸±۹/۲۹	۱۷ ۰/۵۸±	۰/۰۸±۰/۳۴	۱/۹±۲۱/۵۰	۰/۲۸ ±۷/۴۲	۳۱/۱۲ ۲/۰۸±	۸/۵۶ ۰/۰۸±	۴/۳۷ ۰/۴۲±	۱۲/۹۳ ۰/۸۹±
تیمار با *M.rouxii*	۰/۶۲±۱۱/۲۵	۱۳/۳۸ ۰/۲۸±	۰/۰۵ ±۰/۲۳	۲/۰۸±۲۵/۲۵	۰/۳۵ ±۶/۶۵	۳۲/۵۰ ۲/۴۸±	۷/ ۲۱ ۰/۰۸±	۶/۷۵ ۰/۱۷±	۱۷/۸۵ ۰/۴۵±
تیمار با *M.circinelloides*	۰/۳±۱۲/۴۵	۱۴/۸۳ ۰/۱۸±	۰/۰۷ ±۰/۴۹	۲/۰۸ ±۱۸/۷۶	۰/۲۳ ±۵/۸۸	۲۹/۰۷ ۰/۳۲±	۱۱/۲۲ ۰/۰۸±	۷/۳۶ ۰/۲۳±	۱۲/۵۸ ۰/۱۸±
تیمار با *R.stolonifer*	۰/۱۷±۱۱/۰۱	۱۳/۸۲ ۰/۷۸±	۰/۰۸ ±۰/۵۴	۱/۰۸±۱۹/۲۸	۰/۱۸±۵/۲۱	۲۹/۷۴ ۲/۱۸±	۱۲/۷۹ ۰/۰۸±	۷/۵۹ ۰/۳۲±	۲۰/۳۸ ۲/۰۸±

جدول ۴- بررسی پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در روغن بادام و مقایسه آن با لیپید تولید شده از قارچ‌های زیگومایست رشد داده شده بر روی این روغن به عنوان منبع کربن. ($p<0.05$)

	C10:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2 n-6	C18:3 GLA n-6	درصد امگا۶
شاهد روغن بادام	–	۰/۲۱±۶	–	–	۲/۳۱ ±۶۶/۱۳	۲۷/۱۶	–	۰/۱۲ ±۲۷/۱۶
تیمار با *C.echinulata*	۰/۱ ±۴/۰۷	–	۱/۰۷ ±۲۱/۲۶	۰/۰۱ ±۱۰/۱۹	۱/۰۱ ±۳۲/۱۵	۰/۹ ±۲۴/۶۵	۱/۰۱ ±۷/۶۷	۲ ±۳۲/۳۲
تیمار با *M.rouxii*	۰/۰۸ ±۷/۴۰	–	۰/۹۱±۲۵	۱۴	۳۱/۶۴	۰/۳ ±۱۴/۴۱	۰/۰۷ ±۷/۴۲	۰/۹۷ ±۲۱/۵۵
تیمار با *M.circinelloides*	۰/۱۱ ±۸/۰۹	–	۰/۸ ±۲۶/۹۹	۰/۰۱ ±۱۴/۳۹	۲/۰۳ ±۳۵/۰۲	۰/۲۱ ±۱۵/۵	–	۰/۳۴ ±۱۵/۵
تیمار با *R.stolonifer*	۱/۰۱ ±۳۲/۲۱	–	۲/۰۱ ±۳۶/۳۶	–	۱/۰۶ ±۳۲/۵۷	–	–	–

بحث

باتوجه به افزایش تقاضا و ارزش اقتصادی روغن‌های حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع و کابرد فراوان آنها تمایل به تولید روغن‌های میکروبی در حال افزایش است. از جهت دیگر لیپید میکروبی قابلیت استفاده به عنوان بیودیزل را داراست (۱۷). روغن‌های مورد استفاده در این تحقیق خود از روغن‌های باارزش بالای چربی نام برده می‌شوند بنابراین پروفایل اسید چرب آنها مورد بررسی قرار گرفت و پس از کشت قارچ بر روی آن‌ها مقایسه اسیدهای چرب غیر اشباع با شاهد انجام شد. لیپیدهای میکروبی از نظر ساختار و ترکیب با روغن‌های گیاهی مشابهند. این موضوع از این نظر اهمیت دارد که روغن‌های گیاهی کاربردهای

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.5.0
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۳-۲۷۹

متفاوتی دارند. به عنوان مثال لیپیدها به عنوان مواد خام برای تولید پلی‌مرهای عملکردی نظیر پلی‌آرتان‌ها، پلی‌آمیدها و پلی‌استرها می‌باشند که این عمل با کمک فرآیندهایی بر روی روغن‌های گیاهی غیراشباع صورت می‌گیرد و یا مونومرهای اسیدهای چرب به واسطه افزودن گروه‌های عملکردی به پلی‌مرهای به خصوصی نظیر پلی استر و پلی آمید تبدیل می‌شوند (۱۸). ثابت شده است که تولید لیپید و امگا-۶ به وسیله قارچ *C.echinulata* (۱۸) و *Mortierella isabelline* (۱۱) و *Mortierella alpina* (۷) و *Mucor rouxii* و *Mucor circinelloides* (۲۰و۱۹) صورت می‌گیرد. این مطالعه نشان داد تمامی سویه‌های مورد استفاده توانایی تولید GLA را داشتند در حالی که این اسید چرب در هیچ کدام از روغن‌های گیاهی خام وجود نداشت. بر طبق گزارشات Ratledge و Wynn در سال ۲۰۰۵، بازده تولید لیپید در *Rhizopus arrhizus* ٪۵۷ بود. از آسکومیست‌ها هم بررسی تولید لیپید در آسپرژیلوس نایجر با استفاده از منبع کربن گلیسرول در فلاسک ارلن مایر در pH حدود ۵ تا ۶ توسط Abe و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد و بازده لیپید این قارچ ۳۹٪ گزارش شد همچنین Mamatha در سال ۲۰۱۰ با بررسی قارچ‌های *Mucor hiemalis* و *Mucor rouxii* به بازده ۲۴/۳۵٪ و ۲۷/۱۲٪ در تولید لیپید (به ترتیب) رسید. Aleksei در سال ۲۰۱۸ با استفاده از قارچ *Mortierella alpina* به مقدار ۲۵,۲ ٪ لیپید را با منبع کربن گلیسرول تولید کردند. Peng و همکارانش در سال ۲۰۱۰ تولید مقادیر بالای ARA را از قارچ *Mortierella alpina* با استفاده از منابع کربن مختلف و تغییر نسبت کربن به نیتروژن گزارش نمودند (۲۱و۲۲و ۲۳). در این بررسی مشاهده شد C. echinulata با رشد بر روی روغن زیتون به میزان ۲/۲۷ درصد آراشیدونیک اسید را تولید نمود. گزارش شده است انواع امگا۳ از نوع EPA و DHA توسط قارچ *Candida guilliermondii* تولید می‌شود اما در این مطالعه هیچ کدام از قارچ‌ها قادر به تولید این دو اسید چرب نبوده و تنها لینولنات آن هم با استفاده از منبع کربن روغن زیتون به میزان حدود ۲ درصد حاصل شد. استفاده ازگلیسرول به عنوان منبع کربن در تولید لیپید توسط قارچ‌ها به وسیله Papanikolaou و همکارانش در سال ۲۰۰۴ گزارش شده است. Tauk-Tornisielo و همکارانش از روغن‌های گیاهی آفتابگردان، سویا، کنولا و نارگیل به عنوان منبع کربن برای تولید لیپید از ۴ سویه مختلف از قارچ *M. circinelloid* استفاده کردند نتایج آن‌ها نشان داد این قارچ‌ها در حضور روغن به میزان زیادی لیپید تولید کرده و بین ۴/۳ تا ۸/۵ درصد تولید GLA داشتند نتایج این تحقیق نیز تولید GLA بین ۱/۱۸تا ۹/۶۹ را نشان داد. از انواع امگا-۶ که توسط قارچ‌ها ظاهر شد لینولئات بود که به میزان قابل توجه با استفاده از منابع روغنی گیاهی تولید گردید (۲۲، ۲۳ و ۲۴).

نتیجه گیری

در این تحقیق با استفاده از کشت میکروارگانیسم‌ها بر روی منابع روغنی گیاهی جهت استفاده از پسماند آن‌ها به عنوان منبع کربن مشخص شد سویه‌های قارچی مخصوصا زیگومایست‌ها از بهترین تولید کنندگان لیپیدهای با ارزش حاوی اسیدهای چرب ضروری مخصوصا امگا-۶ به شمار می‌روند که با استفاده از منابع روغنی مختلف به عنوان منبع کربن و تولید این ترکیبات با ارزش راهی جهت استفاده مفید از پسماندهای این صنایع مخصوصا صنایع کنجدی باشد.

سپاسگزاری

نویسنده مقاله از مسئولین آزمایشگاه‌های زیست شناسی دانشگاه اصفهان و دانشگاه یزد که امکانات انجام چنین پروژه‌ای را فراهم آوردند نهایت سپاسگزاری را دارد این مقاله تحت حمایت مالی دانشگاه اصفهان و دانشگاه یزد قرار داشت.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.5.0 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۳-۲۷۹

منابع

۱ – درویشی، فرشاد، سلمانی، ناهیده. (۱۳۹۷). اثر روغن زیتون بر تولید اسیدهای چرب امگا در مخمر یاررووییا لیپولیتیکا، *پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)*(۳)۳۱: صفحه ۳۱۱-۳۰۲.

۲ – باقری، نیلوفر، پیرزاد، علیرضا. (۱۴۰۱). پاسخ آنزیمی، ترکیبات موسیلاژ و اسیدهای چرب گیاه بالنگوی شهری به منابع شیمیایی و بیولوژیک نیتروژن در شرایط تنش شوری، *مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)(علمی)*، *(۲)۳۵*: صفحه ۲۹۲-۲۷۵.

3. Abe, K., Araki, E., Suzuki, Y., Toki, S., and Saika, H. (2018). Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing. Plant Physiology and Biochemistry. 131, 58–62.
4. Baldoni DB, Coelho G, Jacques R JS, Silveira RMB, Grebenc T. and Antoniolli ZI, (2013). Brown rotting fungus closely related to *Pseudomerulius curtisii* (Boletales) recorded for the first time in South America. Mycosphere, 3, 533-541.
5. Beligon V, Christophe G, Fontanille, P, Larroche, C. (2016). Microbial lipids as potential source to food supplements. Current Opinion Food Science, 7, 35-42.
6. Bellou S, Triantaphyllidou I E, Aggeli, D, Elazzazy, A M, Baeshen, M N Aggelis, G. (2016). Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. Current Opinion Biotechnology, 37, 24-35.
7. Certik M, Shimizu S. 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. Journal of Bioscience and Bioengineering 87: 1-14.
8. Christie WW. (1993). Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: Christie WW (Eds.), Gas Chromatography and Lipids, Oily Press, pp. 69-111.
9. Dyal SD, Bouzidi L, Narine SS. (2005). Maximizing the production of gamma-linolenic acid in *Mortierella ramanniana* var. ramanniana as a function of pH, temperature and carbon source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation. Food Reserch International 38:815–829.
10. Fakas S, Papapostolou I, Papanikolaous S, Georgiou DC, Aggelis G. (2008). Susceptibilit to peroxidation of the major mycelia lipids of *Cunninghamella echinulata*. Euripian Journal of Lipid Science Technology 110:1062–1067.
11. Huang Ch, Chen Xue, Xiong L, Chen X, Ma L, Chen Y. (2012). Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. Journal of Biological Application 11-15.
12. Jang HD, Lin YY, Yang SS. (2005). Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. Bioresource Technology 99: 1633-1644.
13. Mirbagheri M, Nahvi I, Emamzadeh R. (2015). Reduction of chemical and biological oxygen demands from oil wastes via oleaginous fungi: An attempt to convert food byproducts to essential fatty acid. Iran J Biotechnol.; 13(2): 25–30.
14. Mirbagheri M, Nahvi I., Emtiazi, G, Mafakher L, Darvishi F. (2012) Taxonomic characterization and potential biotechnological applications of Yarrowia lipolytica isolated from meat and meat products. JJM; 5(1): 346-351.
15. Mirbagheri M, Nahvi I, Emamzadeh R, Emtiazi G, Shirani E, Oil wastes management: medium optimization for the production of alpha-linolenic acid in *Mucor circinelloides*. Int. J. Environ. Sci. Technol. 2016: 13: 31-38.
16. Pan L, Yang D, Shao L, Li W, Chen G, Liang Z. (2009). Isolation of oleaginous yeasts. Food technology and biotechnology 47: 215-220.
17. Papanikolaou S. Aggelis G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. Bioresource Technology 82: 43-49.
18. Papanikolaou S, Sarantou S, Komaitis M, Aggelis G. (2004). Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. Journal of Applied Microbiology 97:867–875.
19. Ratledge C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. Biochemistery 86: 807-815.
20. Tauk-Tornisielo S, Arasato1LS, Almeida1 A,

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۳-۲۷۹ DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.5.0

Govone JS, Malagutti EN (2009), lipid formation and g-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus* sp, grown on vegetable oil. Brazilian Journal of Microbiology 40:342-345.

21. Vamvakaki A, Kandarakis I, Kaminarides S, Komaitis M, Papanikolaou S (2010) Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. Engineering Life Science 10: 348-360.
22. Vicente G, Bautista LF, Rodriguez R, Gutierrez FJ, Sadaba I, Ruiz-Vazquez RM. (2009). Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. Biochemistry Engineering Journal 48: 22-27.
23. Wynn JP, Hamid AA, Ratledge C (1999) The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. Microbiology 145:1911-1917.
24. Jovanovic S, Dietrich D, Becker J, Kohlstedt M, Wittmann Ch (2021). Microbial production of polyunsaturated fatty acids — high-value ingredients for aquafeed, superfoods, and pharmaceuticals, Current Opinion in Biotechnology, 69:199-211

Unsaturated fatty acids production by Zygomycet fungi growth on plant oils

Mirbagheri Firoozabad M.S.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, I.R. of Iran

Abstract

The increasing application of microbial lipids and fatty acids in various fields of health and industry and their advantages to the proportion of animals and plant lipids has elicited much attention in some research. The aim of this study was the investigation of lipid, biomass, and fatty acid production in Zygomycet fungi including *Cunninghamella echinulat*a, *Mucor rouxii*, *Mucor circinillioides* and *Rhizopus stolonife*r in different media cultures containing plant oils (2% of coconut, sesame, olive, and almond oil) as carbon sources. Results showed all of the strains produced more than 25% lipid and *C. echinulata* is best lipid producer in 4 strains and the yield of lipid production in olive oil medium was 63% in this strain. Omega 6 fatty acids like GLA (gamma linoleic acid) and linoleate appeared in all of the media culture. *M. rouxii* created 9.69% GLA in olive oil medium. Arachidonic acid and linolenate was other omegas that produce in some oil media. An important point of this study was increased about 2 to 10 times in omega 3 and 6 production in plant oils treated by fungi rather than raw plant oils. It could be concluded that zygomycete fungi are good candidate for the production of valuable microbial oils and applied to improvement of quality in dietary and industrial crops.

Key words: Microbial oil, Omega3 and 6, Zygomycete fungi, Plant oil, Unsaturated fatty acid

.

مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) جلد ۳۶، شماره ۳، ۱۴۰۲
DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.3.5.0 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۳-۲۷۹