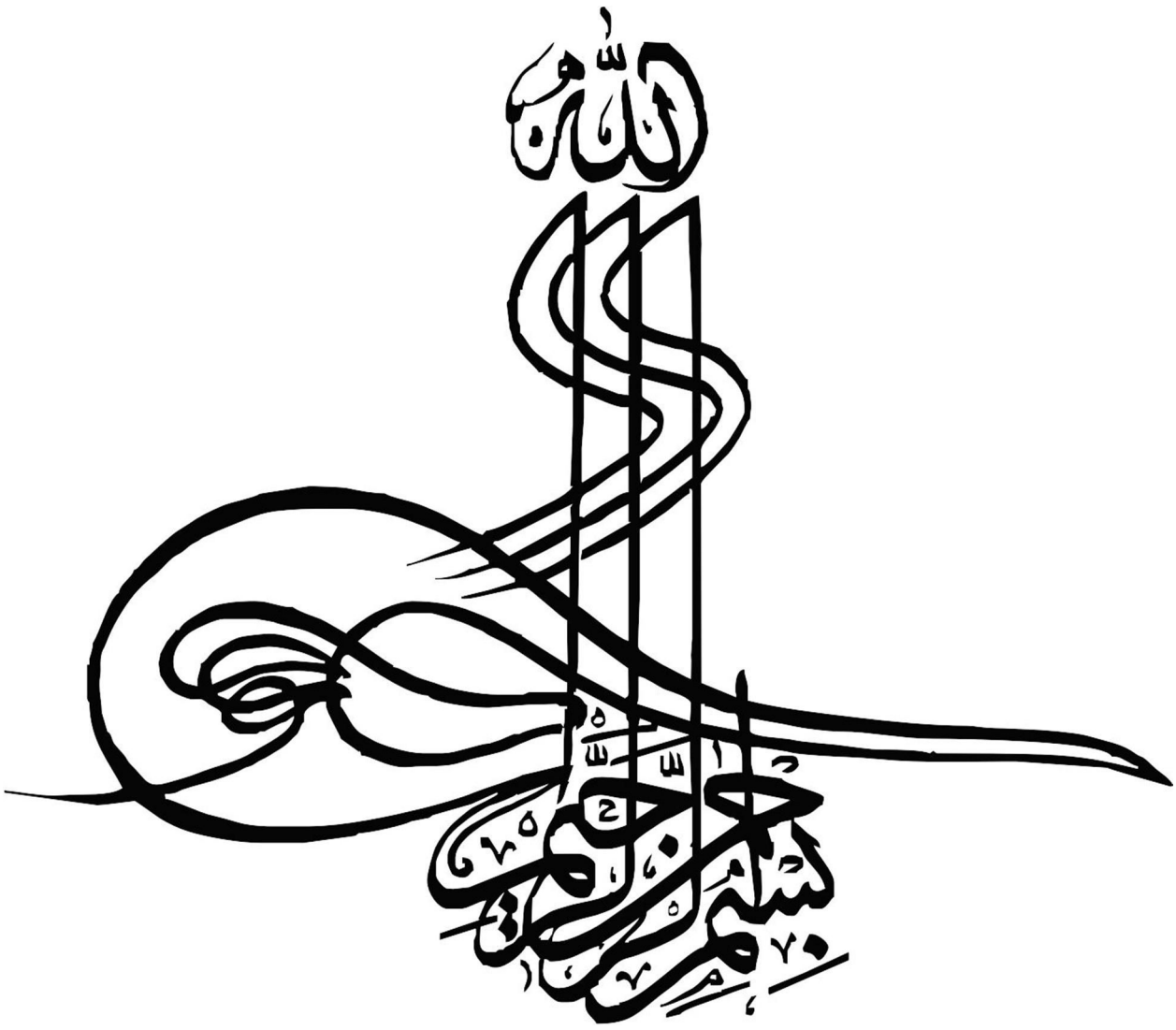

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی

گرایش شیمی مواد غذایی

بررسی میزان تولید روغن از گونه قارچی *Mortierella alpine* با استفاده از منبع کربنی آب پنیر

نگارنده:

سارا حسینعلی زاده

استاد راهنما:

دکتر حمیدرضا صمدلویی

بهمن ۱۳۹۶

تقدیم به پدر و مادرم دو فرشته ی زندگی ام که همیشه تمام کاستی هایم را بخشیدند و هرگز از من ناامید نشدند و خوب می دانم هیچ گاه نمی توانم عشق بی حدشان را پاسخ گویم.

به خانواده ام که ارزشمندترین دارایی ام هستند و آرامش لطف کوچکی است در میان الطافشان.

به استاد فرزانه ام جناب آقای دکتر صمدلوئی که راهنمای علمی و اخلاقی من در به ثمر رساندن این پایان نامه بودند و کمال تشکر را از کمک های بی دریغ و بی شائبه ی این استاد گرانقدر دارم.

تعهدنامه

اینجانب **سارا حسینعلی زاده** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی گرایش شیمی مواد غذایی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه (بررسی میزان تولید روغن از گونه قارچی Mortierella alpine با استفاده ازمنبع کربنی آب پنیر

تحت راهنمایی جناب دکتر دکتر حمیدرضا صمدلویی متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود است و مقالات مستخرج با نام **دانشگاه صنعتی شاهرود** و یا **Shahrood University of Technology** به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده(یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ :

امضاء دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن(مقالات، مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

با توجه به معایب استفاده از روغن های اشباع و اثرات منفی آن بر روی سلامتی، نیاز روزافزونی به یافتن منابع ارزان تولید روغن های غیر اشباع بویژه اسیدهای چرب ضروری احساس می شود. یکی از بهترین منابع مناسب برای تولید آراشیدونیک اسید قارچ مورتیرلا می باشند. در این تحقیق، تأثیر سوبستراهای متفاوت از قبیل پودر آب پنیر و گلوکز به عنوان منبع کربنی و اثر نانو ذرات منیزیم در تولید روغن و توده زیستی از قارچ مورتیرلا آلپینا سی بی اس ۷۵۴/۶۸[1] بررسی شد. در حضور نانو ذره سرعت رشد و در عین حال سرعت تخریب توده زیستی نسبت به نمونه شاهد افزایش قابل توجهی یافت به طوری در شرایط تخریب توده زیستی میزان کاهش توده زیستی به سطح ۳۰٪ شرایط تولید کاهش یافت. نتایج نشان دهنده تقویت روند تجمع روغن نسبت به نمونه فاقد نانو ذره بود به طوری که در محیط کشت فرموله شده حاوی گلوکز در روز دوم رشد حداکثر تجمع روغن به میزان ۲۲٪ وزن خشک توده زیستی مشاهده شد و از روز دوم به بعد روند تجزیه روغن تجمعی مشاهده گردید که نشان دهنده این واقعیت بود که در عین حال اینکه نانو ذره سرعت تجمع روغن در این گونه قارچی را تقویت کرده سرعت تخریب روغن نیز تقویت شده است. میزان روغن در محیط کشت فرموله شده آب پنیر تا روز دوم افزایش یافت و به سطح ۱۵٪ توده زیستی رسید و این میزان روغن تا روز چهارم ثابت بود در واقع با در نظر گرفتن افزایش توده زیستی چنین تحلیل می شود که روغن همواره در حال تولید و تجمع در داخل سلول بود. روند افزایش تولید روغن در محیط کشت آب پنیر دارای نانو ذره مانند محیط کشت ساده بسیار قابل توجه بود به طوری که در روز دوم رشد به بالاترین سطح روغن رسید (٪۲۰ توده زیستی) که نسبت به نمونه بدون نانوذره ۵٪ بالاتر بود. نکته قابل توجه روند کاهش روغن می باشد به طوری که روند کاهش روغن در این نمونه بالا بود و بعد از روز دوم روند مصرف روغن شدت پیدا کرد و در روز هفتم به سطح ۸٪ توده زیستی رسید. کاهش اندک توده زیستی در فاز

[1]- *Mortierella alpina CBS 754.68*

مرگ می تواند ناشی از مصرف روغن ذخیره ای باشد که تأمین کننده انرژی ریزسازواره می باشد. نانو ذره در محیط کشت آب پنیر محرک تولید اسید لینولنیک بوده و میزان این اسید چرب نسبت به نمونه شاهد فاقد نانو ذره بالاتر بدست آمد در حالیکه نانو ذره اثر کاهشی در تولید آراشیدونیک اسید حاصل از تجمع روغن در گونه قارچی مورتیرلا آلپینا داشت. افزایش تجمع اولئیک در روغن حاوی نانو ذره نشان می دهدکه فعالیت آنزیم های غیراشباع ساز در این تیمار کاهش یافته که با تجمع روغن ارتباط مستقیم دارد.

کلمات کلیدی : قارچ های میسلیومی، روغن تک یاخته، گلوکز، عصاره مخمر، پودر آب پنیر

فهرست مطالب

فصل اول کلیات ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- تاریخچه تولید روغن تک یاخته ۳

۱-۳- مکانیسم تجمع و تولید اسیدهای چرب توسط میکروارگانیسم های روغنی ۷

۱-۴- بیوشیمی تجمع روغن ها ۹

۱-۵- میکروارگانیسم ها برای تولید روغن تک یاخته ۱۶

۱-۵-۱- باکتری ها ۱۷

۱-۵-۲- جلبک ها ۱۸

۱-۵-۳- قارچ ها ۱۹

۱-۶- تخمیر برای تولید روغن تک یاخته ۱۹

۱-۷- ضایعات غذایی و کشاورزی به عنوان منابع تجدیدپذیر و اقتصادی جهت تولید روغن تک یاخته ۲۰

۱-۷-۱- ملاس ۲۱

۱-۷-۲- مواد خام صنعت غذا ۲۱

۱-۷-۳- گلیسرول ۲۱

۱-۷-۴- مواد لیگنوسلولزی ۲۲

۱-۷-۵- آب پنیر ۲۳

۱-۸- اهمیت روغن تک یاخته از منظر تغذیه ای ۲۵

۱-۹- فرآیندهای تجاری برای تولید روغن تک یاخته ۲۷

فصل دوم مروری بر مطالعات پیشین ۳۱

فصل سوم مواد و روش‌ها ۳۹

۳-۱- مواد شیمیایی و تجهیزات ۴۰

۳-۲- روش نگهداری میکروارگانیسمها ۴۱

۳-۳- مایه تلقیح و کشت‌های اصلی ۴۱

۳-۴- تهیه محیط کشت توسعه تلقیح ۴۲

۳-۵- تهیه محیط کشت تولید محصول ۴۲

۳-۶- استخراج توده زیستی ۴۲

۳-۷- اندازه‌گیری وزن خشک سلولی ۴۳

۳-۸- استخراج لیپید ۴۳
۳-۹- مشتق‌سازی اسیدهای چرب ۴۳
۳-۱۰- تعیین و اندازه‌گیری اسیدهای چرب ۴۴
فصل چهارم نتایج و بحث ۴۷
۴-۱- بررسی تأثیر نانو ذرات منیزیم بر میزان تولید توده زیستی و روغن ۴۸
۴-۲- بررسی اثر نور و نانو ذره بر تولید روغن و توده زیستی در محیط کشت تعریف شده ۵۰
۴-۳- بررسی پروفایل اسید چرب ۵۳
۴-۴- بررسی اثر نور و نانو ذره بر تولید روغن و توده زیستی در محیط کشت آب پنیر ۵۴
۴-۵- بررسی تغییرات میزان توده زیستی در محیط کشت نیتروژن آلی ۵۵
۴-۶- بررسی تغییرات میزان روغن در محیط کشت نیتروژن آلی ۵۶
۴-۷- بررسی تغییرات میزان توده زیستی در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم ۵۸
۴-۸- بررسی تغییرات میزان روغن در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم ۵۹
۴-۹- بررسی تغییرات توده زیستی در محیط کشت نیتروژن معدنی بدون نانو ذره ۵۹
۴-۱۰- بررسی تغییرات میزان روغن در محیط کشت نیتروژن معدنی بدون نانو ذره ۶۱
۴-۱۱- بررسی تغییرات توده زیستی در محیط کشت نیتروژن معدنی حاوی نانو ذره ۶۲
۴-۱۲- بررسی تغییرات روغن در محیط کشت نیتروژن معدنی حاوی نانو ذره ۶۳
۴-۱۳- بررسی تغییرات توده زیستی در محیط کشت آب پنیر فرموله شده ۶۴
۴-۱۴- بررسی تغییرات روغن در محیط کشت آب پنیر فرموله شده ۶۵
۴-۱۵- بررسی تغییرات توده زیستی در محیط کشت آب پنیر فرموله شده حاوی نانو ذره منیزیم ۶۵
۴-۱۶- بررسی تغییرات روغن در محیط کشت آب پنیر فرموله شده حاوی نانو ذره منیزیم ۶۶
۴-۱۷- بررسی پروفایل اسید چرب روغن در محیط کشت آب پنیر فرموله شده با و بدون نانو ذره منیزیم ۶۷
۴-۱۸- نتیجه گیری ۶۷
۴-۱۹- پیشنهادات ۶۹
منابع ۷۰

فهرست اشکال

شکل ۱-۱- روند مصرف منابع کربن و نیتروژن محیط توسط میکروارگانیسم و تجمع روغن (Cohen and Ratledge, 2015). ۸

شکل ۱-۲- نمودار چگونگی فعالیت چرخه سیترات/مالات و چرخه ترانس هیدروژناز سیتوزولی برای تأمین مقادیر کافی پیش‌سازهای استیل کوآنزیم A و نیکوتین آمین آدنین فسفات احیاء شده برای تولید زیستی لیپید در ریزسازواره‌های روغنی. آنزیم‌ها عبارتند از: ۱. پیروات دکربوکسیلاز ۲. مالات دهیدروژناز ۳. آنزیم مالیک ۴. پیروات دهیدروژناز ۵. سیترات سینتاز (Ratledge, 2004). ۱۴

شکل ۱-۳- نمودار روند پیشنهادی برای تولید زیستی لیپیدهای میکروبی (Ratledge, 2004). ۱۶

شکل ۴-۱- میزان وزن خشک توده زیستی در نمونه های با سطوح مختلف نانو ذره منیزیم ۴۸

شکل ۴-۲- میزان روغن در نمونه های با سطوح مختلف نانو ذره منیزیم ۴۹

شکل ۴-۳- میزان وزن خشک توده زیستی در محیط کشت فاقد عناصر معدنی با و بدون نانو ذره ۵۰

شکل ۴-۴- میزان وزن روغن تولیدی در محیط کشت فاقد عناصر معدنی با و بدون نانو ذره ۵۰

شکل ۴-۵- بررسی میزان توده زیستی تولیدی تحت تأثیر واکنش نوری ۵۲

شکل ۴-۶- بررسی میزان روغن تولیدی تحت تأثیر واکنش نوری ۵۳

شکل ۴-۷- پروفایل اسیدهای چرب ۵۳

شکل ۴-۸- بررسی میزان توده زیستی تولیدی تحت تأثیر واکنش نوری و نانو ذره منیزیم ۵۴

شکل ۴-۹- بررسی میزان تولید روغن تحت تأثیر واکنش نوری و نانو ذره منیزیم ۵۵

شکل ۴-۱۰- میزان مصرف قند احیا در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی ۵۶

شکل ۴-۱۱- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی ۵۶

شکل ۴-۱۲- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی ۵۷

شکل ۴-۱۳- میزان مصرف قند احیا در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم ۵۸

شکل ۴-۱۴- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم ۵۹

شکل ۴-۱۵- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم ۵۹

شکل ۴-۱۶- میزان مصرف قند احیا در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی بدون نانو ذره ۶۰

شکل ۴-۱۷- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی بدون نانو ذره ۶۱

شکل ۴-۱۸- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی بدون نانو ذره ۶۲

شکل ۴-۱۹- میزان مصرف قند احیا در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی حاوی نانو ذره ۶۳

شکل ۴-۲۰- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی حاوی نانو ذره ۶۳

شکل ۴-۲۱- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی حاوی نانو ذره ۶۴

شکل ۴-۲۲- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت آب پنیر فرموله شده ۶۴
شکل ۴-۲۳- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت آب پنیر فرموله شده ۶۵
شکل ۴-۲۴- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت آب پنیر فرموله شده حاوی نانو ذره منیزیم ۶۶
شکل ۴-۲۵- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت آب پنیر فرموله شده حاوی نانو ذره منیزیم ۶۶
شکل ۴-۲۶- پروفایل اسیدهای چرب روغن در محیط کشت آب پنیر فرموله شده با و بدون نانو ذره منیزیم ۶۷

فهرست جداول و نمودارها

جدول ۱-۱- تولید روغن میکروبی با استفاده از عصاره هیدرولیز شده مواد لیگنوسلولزی مختلف ۲۳

جدول۱-۲- سهم آبپنیر از اجزای شیر (Smithers, 2008). ۲۴

جدول ۱-۳-ترکیب اسیدهای چرب (درصد وزنی/وزنی) روغن‌های تک یاخته که اکنون تولید می‌شوند ۲۸

(Ratledge, 2004). ۲۸

جدول ۱-۴- اسامی برخی شرکت‌های فعال در زمینه تحقیق، توسعه، تولید و بازاریابی روغن تک یاخته و محصولات غنی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه (Ward and Singh, 2005). ۳۰

فصل اول

کلیات

فصل اول: کلیات

۱-۱- مقدمه

اسیدهای چربی که پیوندهای بین کربنی آن ها خطی و یا دوگانه باشد به ترتیب اشباع و غیراشباع نامیده می شوند. مصرف زیاد روغن های اشباع می تواند سبب بیماری های قلبی و عروقی شود. در حالیکه اسیدهای چرب غیراشباع تأثیر قابل توجهی بر سلامتی انسان می گذارد. تعداد پیوند دوگانه و محل قرار گیری آن بر ویژگی های تغذیه ای و عملکردی روغن تأثیر دارد. افزایش پیوند های دوگانه باعث شده ارزش تغذیه ای روغن افزایش قابل توجهی یابد که به آن اسیدهای چرب چند غیراشباع[۲] (PUFA) گویند. آراشیدونیک اسید (ARA: 5,8,11,14-cis-eicosatetraenoic acid)، از مهمترین اسید های چرب غیراشباع بلند زنجیره است که نقش قابل توجهی در ویژگی های عملکردی غشاء سلولی انسان دارد. پس از تحقیقات اولیه دانشمندان پی بردند که پروتزوا، جلبک و قارچ منبع مناسبی برای تولید روغن و اسیدهای چرب چند غیراشباعی است. بنابراین ریزسازواره‌ها به عنوان منشاء PUFA در زنجیره غذایی مورد توجه قرار گرفتند و بهره برداری تجاری از روغن تک یاخته و اختصاص آن به مصرف انسان آغاز گردید.

روغن تک یاخته

استفاده از ریزسازواره ها به منظور تولید محصول به دوران باستان باز می گردد. قارچ ها اولین ریزسازواره هایی بودند که بشر به منظور تولید محصول از آن ها استفاده کرد و تولید الکل توسط گونه های قارچی اولین فعالیت بیوتکنولوژی بشر بود. (Hayes and Nair, 1978). در تحقیقی که توسط Roland و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام شد نشان داد که روغن منبع انرژی مورد استفاده از ریزسازواره در مواقع کمبود انرژی است به عنوان مثال می توان به تجزیه روغن در اسپور به منظور رشد و جوانه زنی ریسه اشاره کرد. گونه هایی که می توانند بیشتر از ۲۰٪ وزن خشک توده زیستی شان روغن تولید کنند معروف به ریزسازواره های oleaginous می باشند. (Dyal and Narvine,

[2]- Polyunsaturated fatty acids

2005; Ratledge, 2004). اسیدهای چرب غیراشباع روغن های ریزسازواره ای بدلیل عملکردهای ارزشمندشان مورد توجه زیادی قرار گرفته اند.

با توجه به اهمیت آراشیدونیک اسید در چرخه تغذیه ای انسان و با توجه به اینکه تولید این اسیدچرب ضروری امگا ۶ به علت کمبود منابع مناسب تولید، با مشکل جدی مواجه است، دانشمندان گونه‌هایی از کپک پست *Mortierella* را جدا کردند که توانایی تولید مقادیر زیادی آراشیدونیک اسید را داشته و می تواند به عنوان منبع مناسبی، مورد توجه قرار گیرد. بطوری که گونه‌هایی از قارچ رشته‌ای *Mortierella* می‌توانند بیش از ۴۰٪ چربی در خود ذخیره کنند که بیشتر از ۴۰٪ این میزان را آراشیدونیک اسید تشکیل می‌دهد (Kavadia *et al*., 2001; Kawashima *et al*., 2000). از مهمترین نکات مورد توجه برای تولید محصول روغنی از گونه های قارچی، ارزان و در دسترس بودن منابع کربنی می باشد تا قیمت نهایی محصول کاهش یابد. از این رو در این تحقیق از آب پنیر به عنوان منبع کربنی استفاده شده و میزان تولید روغن از گونه قارچی *Mortierella alpine* بررسی می شود.

۱-۲- تاریخچه تولید روغن تک یاخته

علاقه زیادی برای تولید لیپیدهای میکروبی در طی ۱۲۵ سال گذشته و بهره‌برداری از آنها به عنوان منابع جایگزین روغن‌ها و چربی‌ها برای مصرف بشر احتمالا از سال‌های اولیه قرن بیستم وجود داشته است. به نظر می‌رسد پول لیندر[۳] که در برلین آلمان فعالیت می‌کرد اولین کسی باشد که یک فرآیند در مقیاس کوچک برای تولید چربی با استفاده از گونه مخمر اندومایسس ورنالیس[۴] که در حال حاضر به‌عنوان تریکوسپورون پولولانس[۵] شناخته می‌شود، توسعه داده باشد (Ratledge, 2005).

[3]- Paul Linder
[4]- *Endomyces vernalis*
[5]- *Trichosporon pullulans*

تحقیقات برای استفاده از ریزسازواره‌ها به عنوان منابع جایگزین روغن‌ها و چربی‌ها در طی ۴ دهـه اول قرن بیستم توسط گروه‌های مختلف در سرتا سر دنیا ادامه یافت و نه تنها فرآیند تولید زیسـتی لیپیـد را مورد مطالعه قرار دادند بلکه عوامل تأثیرگذار بر تجمع لیپید را هم بررسی کردند.

توسعه تولید کارآمد و در مقیاس زیاد روغن‌های میکروبی بدلیل نبود فرمانتورهای بزرگ مناسب بـرای تولید توده زیستی با دانسیته زیاد (بیش از ۵۰ گرم بر لیتـر) محـدود شـد. فرمانتورهـای آزمایشـگاهی تقریبا تا دهه ۱۹۵۰ میلادی ساخته نشده بودند و فرمانتورهای صنعتی دارای همـزن[۶] نیـز بسـیار کـم بودند. پس از اینکه فرآیندهای تخمیر غوطه‌وری برای تولید پروتئین تک یاخته[۷] در اواخر دهـه ۱۹۵۰ میلادی توسعه داده شد و موجب تولید فرمانتورهای صنعتی همزن‌دار شد، بار دیگر تولیـد روغـن‌هـای میکروبی در اواسط دهه ۱۹۶۰ میلادی مورد توجه قرار گرفـت. اگرچـه اشـتیاق بـرای تولیـد اینگونـه محصولات بدلیل اینکه روغن‌های گیاهی بسـیار ارزان شـده بودنـد، بـه مقـدار زیـادی از بـین رفـت و احتمال کمی می‌رفت که بتوان هر گونه چشم انداز خوبی برای روغن‌های تولیـدی از سـایر منـابع کـه بتوانند با روغن‌های گیاهی از لحاظ قیمت رقابت کنند، تصور کرد. با این حـال بـه نظـر مـی‌رسـد کـه چشم‌انداز خوبی برای تولید برخی روغن‌های میکروبی کـه بسـادگی از طریـق منـابع متـداول گیـاهی بدست نمی‌آید، وجود دارد (Ratledge, 2005).

شایان ذکر است که بررسی ریزسازواره‌ها توسط روبرت شاو در اوایل دهه ۱۹۶۰ میلادی بـرای تعیـین منابع ممکن تولید آراشیدونیک اسید البته نه برای مصرف انسانی بلکه به عنـوان مـاده معطـر گوشـت مرغ[۸] صورت گرفت. بعد از انجام تحقیق مشخص شد که ماده معطر گوشت مـرغ مربـوط بـه ترکیبـات دیگری غیر از آراشیدونیک اسید می‌باشد. تحقیق شاو بسیار بـا ارزش بـود زیـرا کـه موجـب مشـخص شدن ریزسازواره‌هایی شد که ممکن بود برای تولید اسیدهای چرب غیراشـباع بـا چنـد پیونـد دوگانـه مختلف مورد استفاده قرار گیرند. پیشرفت بزرگ دیگـری کـه در اوایـل دهـه ۱۹۶۰ مـیلادی صـورت

[6]- Industrial-scale stirred tank fermenters
[7]- Single cell protein (SCP)
[8]- Chicken-flavor material

گرفت و برای مطالعه روغن‌های میکروبی بسیار اهمیت داشت، توسعه دستگاه گاز کروماتوگرافی بود زیرا تجزیه اسیدهای چرب تا قبل از توسعه دستگاه گاز کروماتوگرافی بسیار سخت و نیازمند استفاده از مقادیر زیاد مواد بود. دستگاه گاز کروماتوگرافی موجب برطرف شدن این مشکلات گشت. بدین صورت که تجزیه تعداد زیادی نمونه‌های روغن و چربی به سرعت انجام پذیر شد و علاوه بر این، تنها مقادیر کم (در حد میلی‌گرم) مورد نیاز بود (Ratledge, 2005).

برنامه‌هایی که برای توسعه فرآیند تولید روغن تک یاخته[9] در مقیاس صنعتی وجود دارد بایستی از تجربه‌ای که برای تولید صنعتی پروتئین تک یاخته بدست آمده است، استفاده کنند. در سال‌های ۱۹۶۰ میلادی تا نیمه دهه ۱۹۸۰ میلادی فعالیت اساسی برای توسعه و اقتصادی کردن فرآیندهای تولید پروتئین از ریزسازواره‌ها به‌عنوان منبع غذایی انسان و خوراک حیوانات انجام شد. برنامه تولید پروتئین تک یاخته توسط عملیات تخمیر به علت هزینه کمتر پروتئین‌های گیاهی، ثبات بیشتر قیمت‌های کشاورزی نسبت به قیمت‌های صنعتی و ارزش پایین پروتئین غذایی و بویژه پروتئین‌های خوراک دام، بصورت تأسف باری شکست خورد. استفاده از مواد هیدروکربنی در محیط کشت تولید همچنین مسئله ساز بود زیرا که منجر به عملیات پایین دستی پیچیده‌تری برای جداسازی پروتئین‌ها از مواد آلوده کننده هیدروکربنی باقیمانده سمی می‌شد (Ward and Singh, 2005).

تولید روغن تک یاخته در دهه ۱۹۸۰ میلادی برای تولید معادل های کره کاکائو[10] مورد بررسی قرار گرفت زیرا که مقدار تولید کره کاکائو کم بود (Ratledge, 1993; 2005). مخمرهای انتخاب شده که دارای ترکیب اسید چرب مشابه با کره کاکائو بودند (تری آسیل گلیسرول با مقادیر جزئی برابر استئاریک[11]، اولئیک[12] و پالمیتیک اسید[13]) برای تولید معادل‌های کره کاکائو مورد استفاده قرار گرفتند. این مخمرها شامل رودوسپریوم تورولوئیدس[14] و کریپتوکوکوس کورواتوس[15] بودند. بهترین

[9]- Single cell oil (SCO)
[10]- Cocoa butter equivalent (CBE)
[11]- Stearic acid (18:0)
[12]- Oleic acid (18:1, ω-9)
[13]- Palmitic acid (16:0)
[14]- *Rhodosporidium toruloides*
[15]- *Cryptoccus curvatus*

روش برای افزایش مقدار استئاریک اسید، مستلزم متوقف کردن[16] جزئی فعالیت آنزیم غیراشباع کننده Δ9 (که استئاریک را به اولئیک اسید تبدیل می‌کند) بود که توسط جهش‌زایی کریپتوکوکوس کورواتوس صورت می‌گرفت. روغن تک یاخته بدست آمده شامل اولئیک، استئاریک و پالمیتیک اسید به ترتیب ۳۰:۳۱:۲۴ (درصد وزنی) بود که نسبتاً مشابه کره کاکائو (۳۵:۳۵:۲۸) است. اما این روغن بسیار ارزشمند که در مقدار زیاد تولید می‌شد، سرگذشتی مشابه پروتئین تک یاخته پیدا کرد. زیرا درست در همین زمان قیمت جهانی کره کاکائو از ۸۰۰۰ دلار به کمتر از ۲۵۰۰ دلار به ازای هر تن رسید (Ward and Singh, 2005).

تولید روغن‌های میکروبی که روغن تک یاخته نیز نامیده می‌شوند در حال حاضر یک واقعیت اقتصادی می‌باشد. اگرچه وجود آن ها به‌عنوان جایگزین‌های مناسب روغن‌های گیاهی و چربی حیوانی برای مدت زمان طولانی پیشنهاد شده بود ولی اولین مرحله تولید صنعتی روغن تک یاخته در سال ۱۹۸۵ میلادی در بریتانیا شروع شد که به مدت ۶ سال به فعالیت خود ادامه داد و سپس بدلیل اینکه نمی‌توانست از لحاظ قیمت با روغن‌های گیاهی رقابت کند، متوقف شد. این روغن با استفاده از قارچ موکور سیرسینللوئیدس[17] تولید می‌شد و به گونه‌ای طراحی شده بود که غنی از اسید چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه گاما لینولنیک اسید[18] باشد که به‌عنوان جایگزین روغن پامچال[19] که بسیار گران بود، استفاده شود. این فرآیند با استفاده از قارچی که در فرمانتورهای دارای همزن با ظرفیت ۲۲۰ متر مکعب رشد می‌کرد و مستلزم عملیات برداشت و خشک کردن توده زیستی، استخراج روغن تک یاخته، تصفیه و خالص سازی نهایی نیز بود، انجام می‌شد (Ratledge, 2004; 2005).

اگرچه فرآیند تولید این روغن تک یاخته برای چند سال بیشتر طول نکشید ولی موجب اثبات این مدعا شد که می‌توان از ریزسازواره‌ها به‌عنوان جایگزین مناسب و اقتصادی برای تولید بعضی از روغن‌های گیاهی استفاده کرد و همچنین روغن تک یاخته میکروبی را می‌توان توسط روش‌های

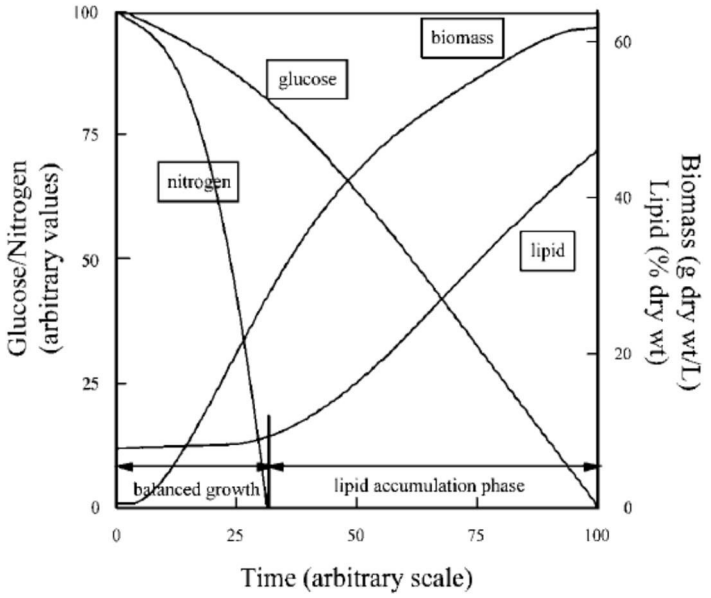
---

[16]- Blocking
[17]- *Mucor circinelloides*
[18]- λ-Linolenic acid (GLA; 18:3, ω-6)
[19] - Evening primrose oil (*Oenothera biennis)*

متداول، استخراج و خالص‌سازی نمود و نیاز به تولید واحدهای گران‌قیمت و مخصوص استخراج نمی‌باشد. علاوه بر این، روغن‌های میکروبی دارای اسیدهای چربی می‌باشند که براحتی بوسیله کشاورزی قابل تولید نیستند و گران قیمت نیز می‌باشند. البته روغن‌های میکروبی از ارزش افزوده زیادی برخوردار بوده و از عهده هزینه تولید آن برمی‌آیند. اکنون مشخص شده است که این اسیدهای چرب از ارزش تغذیه‌ای زیادی برای نوزادان و مادران برخوردار بوده و بنابراین بازار بزرگی برای اطمینان از فروش آن ها وجود دارد (Ratledge, 2004; 2005).

۱-۳- مکانیسم تجمع و تولید اسیدهای چرب توسط میکروارگانیسم های روغنی

به منظور تجمع روغن بهتر است که میکروارگانیسم روغنی در محیط کشتی با مقدار کربن زیاد و نیتروژن کم رشد داده شود، پس از فاز ابتدایی رشد، زمانی که مواد غذایی در محیط کشت به مقدار زیاد هست، میکروارگانیسم منبع نیتروژن را تمام می کند اما به هضم منبع کربن ادامه می دهد. پس از اتمام منبع نیتروژن، سلول تقسیم خود و ادامه رشد خود را متوقف می کند. ادامه ی جذب منبع کربن مستقیماً به سوی سنتز لیپید هدایت می شود و تری آسیل گلیسرول در داخل سلول به صورت قطره های روغن ساخته می شود. تجمع لیپید در حقیقت پاسخ میکروارگانیسم به تنش وارد شده به آن می باشد که موجب تولید روغن به عنوان یک منبع ذخیره ای درون سلولی می شود. روند تجمع روغن در گونه های روغنی هنگامی که بصورت غیر مداوم کشت داده می شوند در شکل ۱-۱ نشان داده شده است (Huang et al., 2013).



شکل ۱-۱- روند مصرف منابع کربن و نیتروژن محیط توسط میکروارگانیسم و تجمع روغن (Cohen and Ratledge, 2015).

بیوسنتز اسیدهای چرب در اکثر موجودات سبب تشکیل اسیدهای چرب اشباع پالمیتیک اسید و استئاریک اسید می گردد، سپس این اسیدهای چرب توسط یک سری واکنش های متوالی توسط آنزیم های غیراشباع ساز و طویل کننده، اصلاح شده و دسته ی وسیعی از اسیدها چرب چند غیر اشباع را تولید می کنند. در میکروارگانیسم های روغنی، لیپید در فاز سکون از فازهای چهارگانه رشد سلول تجمع یافته و بازده آن با توجه به خواص ژنتیکی میکروارگانیسم، شرایط کشت و ترکیب محیط کشت، متفاوت است (Ratledge et al., 2005). میکروارگانیسم های مولد روغن باید دارای دو ویژگی ضروری جهت تبدیل به روغن تک یاخته باشند. اولاً دارا بودن توانایی تولید و ذخیره مداوم استیل کوآنزیم A در سیتوسول سلول به عنوان پیش ماده ضروری برای سنتز اسیدهای چرب و ویژگی دوم، توانایی تولید و ذخیره کافی NADPH به عنوان احیاکننده ضروری مورد استفاده در بیوسنتز اسید چرب. به منظور دست یابی به روغن تک یاخته، میکروارگانیسم مورد نظر ابتدا باید در یک محیط کشت با کربن اضافی و نیتروژن محدود (معمولاً به شکل نمک آمونیوم) کشت داده شود. میکروارگانیسم به هنگام رشد سریعاً نیتروژن موجود در محیط را به اتمام می رساند اما همچنان به مصرف منبع کربن که به شکل گلوکز و یا دیگر کربوهیدرات های جایگزین است، ادامه می دهد. این

منبع کربن برای بیوسنتز لیپیدها استفاده می شود. با اتمام نیتروژن و ادامه مصرف گلوکز، نهایتاً میکروارگانیسم گلوکز را به تری آسیل گلیسرول تبدیل می نماید. محدودیت نیتروژن باعث جلوگیری از تکثیر سلول شده و در نتیجه لیپید تولیدی درون سلول ها ذخیره و میکروارگانیسم متورم می شود (Ratledge et al., 2005).

طی واکنش های متوالی که پس از محدودیت نیتروژن در محیط منجر به تولید روغن تک یاخته می شود، حضور آنزیم سیترات ATP لیاز (ACL) برای تجمع لیپید ضروری است. این آنزیم در گونه های غیر روغنی وجود ندارد. به هر حال، این آنزیم ظرفیت های متفاوت گونه های روغنی در تجمع لیپید را توجیه نمی کند. این موضوع توسط آنزیم مالیک (ME) که منبع انحصاری NADPH برای سنتز اسید چرب است، کنترل می شود. با ممانعت از فعالیت آنزیم مالیک یا غیر فعال شدن آن، منبع دیگری برای استفاده در سنتز اسید چرب وجود نخواهد داشت و تجمع لیپید متوقف خواهد شد. تحقیقات نشان داده است که واکنش ایجاد استیل کوآنزیم A یک واکنش کلیدی برای بیوسنتز اسیدهای چرب است و بدون حضور آنزیم سیترات لیاز، واحدهای استیل COA چندانی تولید نمی شود (Ratledge et al., 2005).

۱-۴- بیوشیمی تجمع روغن ها

فهمیدن این مطلب که چگونه ریزسازواره‌ها اسیدهای چرب مورد نیاز خود را تولید کرده و قادر به تجمع مقادیر زیادی روغن می‌باشند از اهمیت حیاتی برای توسعه فرآیندهای تولید روغن تک یاخته برخوردار می‌باشد (Ratledge, 2004). تولید کارآمد اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه میکروبی نیازمند دانستن سازوکارهایی است که توسط آنها تولید زیستی اسید چرب در درون سلول انجام می‌شود. اگرچه جنبه‌های اساسی تجمع اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه شناخته شده‌اند ولی این سازوکارها به میزان کمی شناسایی شده‌اند (Certik and Shimizu, 1999).

تعدادی مسیرهای مجزای متابولیکی وجود دارد که می‌توانند در فرآیند تولید زیستی اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه نقش داشته باشند (Certik and Shimizu, 1999):

۱) تولید مجدد[۲۰] اسیدهای چرب از گلوکز (مسیر متابولیکی طبیعی تولید اسیدهای چرب در تمام موجودات).

۲) الحاق یا اضافه شدن مستقیم اسیدهای چرب خارجی به ساختارهای لیپیدی.

۳) غیراشباع سازی و طویل شدن متوالی منابع لیپیدی.

علاوه براین، فرایندهای هیدروژناسیون زیستی (اشباع سازی) و تجزیه جزئی یا کلی را می‌توان در این فرآیند در نظر گرفت.

در بعضی از ریزسازواره‌ها میزان روغن بیشتر از ۷۰٪ توده زیستی آنها را تشکیل می دهد. علاوه بر این روغن تجمع یافته بصورت تری آسیل گلیسرول می‌باشد که دقیقا به همان صورتی است که در روغن‌های گیاهی وجود دارد. با توجه به این اطلاعات، اهمیت شناسایی ژن‌هایی که آنزیم‌های کلیدی در تولید اسید چرب و تجمع آن هستند و از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشند، مشخص می‌شود. بنابراین می‌توان ریزسازواره‌ها را بگونه‌ای دست‌ورزی نمود که منجر به افزایش لیپید آنها شود یا اینکه سطح اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه عمده را در لیپید آنها افزایش داد. پذیرفته شده است که ارزان‌ترین روش برای تهیه روغن‌های غیراشباع استفاده از گیاهان می‌باشد. اما با توجه به اینکه هیچ گیاهی اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه بلندتر از ۱۸ کربن را تولید نمی‌کند، بنابراین برای تولید این گونه اسیدهای چرب، دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان ضروری به نظر می‌رسد. اما با توجه به اعتراض عمومی نسبت به گیاهان مهندسی ژنتیکی شده، علاوه بر مدت زمان زیادی که برای تولید آنها لازم است، مدت زمان بیشتری برای اجازه و مقبولیت فروش آن ها وجود خواهد داشت (Ratledge, 2004).

در اولین بررسی‌ها مشخص شد که مسیر تولید زیستی اسید چرب در اغلب ریزسازواره‌های روغنی همانند گونه‌های غیر روغنی مانند ساکارومایسس سرویزیه می‌باشد، هر چند که تفاوت اساسی بین ریزسازواره‌های روغنی و غیر روغنی وجود دارد. به منظور دست‌یابی به تجمع روغن در یک

[20]- *de novo*

ریزسازواره، نیاز به رشد آن در محیط کشتی است که مقادیر زیادی از منابع کربنی و مقدار محدودی از منابع نیتروژنی را دارا باشد (اگرچه سایر مواد مغذی نیز می‌توانند به‌عنوان عامل محدودکننده باشند ولی نیتروژن معمول‌تر است). بنابراین هنگامی‌که ریزسازواره رشد می‌کند سریعا منبع نیتروژنی را مصرف می‌کند ولی به جذب منبع کربنی ادامه می‌دهد (معمولا گلوکز یا یک منبع کربوهیدراتی جایگزین دیگر)، این پدیده منجر به هدایت شدن ریزسازواره به مسیر تولید لیپید شده، موجب تولید تری آسیل گلیسرول‌ها درون سلول بصورت قطره‌های روغنی مجزا از یکدیگر می‌شود. تجمع روغن می‌تواند تا بیشتر از ۷۰٪ توده زیستی سلولی باشد که البته در تمامی ریزسازواره‌های روغنی اینگونه نیست. با توجه به تعریف، تجمع لیپید در ریزسازواره‌های غیر روغنی صورت نمی‌گیرد. هنگامی‌که در محیط کشتی مشابه از نظر نیتروژن محدود شده کشت داده می‌شوند، تکثیر سلولی آنها متوقف می‌شود و اگر که به جذب منابع کربنی ادامه دهند آن ها را به سایر پلی ساکاریدهای گوناگون مانند گلیکوژن و گلوکان‌های متفاوت، مانان‌ها و غیره تبدیل می‌کنند. تجمع روغن نیز مگر در مقادیر کم (معمولا کمتر از ۱۰٪ توده زیستی) صورت نمی‌گیرد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که توانایی ریزسازواره‌ها برای تجمع روغن بایستی ماورای مسیر تولید اسید چرب باشد که به‌عنوان ماشین تولید زیستی لیپید در سایر ریزسازواره‌ها وجود دارد (Ratledge, 2004).

روغنی بودن ریزسازواره‌ها را می‌توان به دو مورد زیر مربوط دانست (Ratledge, 2002; 2004):

۱) توانایی ایجاد جریان مداومی از استیل کوآنزیم A [۲۱]در سیتوزول سلول به‌عنوان پیش‌ساز اصلی کمپلکس اسید چرب سنتاز[۲۲]

۲) توانایی تولید مقادیر کافی از نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده[۲۳] به‌عنوان احیاء کننده ضروری مورد استفاده در تولید زیستی اسید چرب.

[21]- Acetyl-CoA
[22]- Fatty acid synthase (FAS)
[23]- Nicotine amine dinucleotide phosphate (NADPH)

تشکیل استیل کوآنزیم A در ریزسازواره‌های روغنی به وجود آنزیم آدنوزین تری فسفات-سیترات لیاز[۲۴] مربوط می‌باشد که در اکثر گونه‌های غیر روغنی این پدیده اتفاق نمی‌افتد (واکنش شماره ۱). برای فعالیت کارآمد این واکنش بایستی سوبسترای آن یعنی سیتریک اسید براحتی در دسترس باشد، همچنین بایستی در سیتوزول سلول جائی‌که تولید اسید چرب رخ می‌دهد، حضور داشته باشد.

$$\text{Citrate} + \text{CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{acetyl-CoA} + \text{oxaloacetate} + \text{ADP} + P_i \quad \text{(واکنش شماره ۱)}$$

سیتریک اسید به‌عنوان جزئی از چرخه تری کربوکسیلیک اسید[۲۵] داخل میتوکندری سلول تولید می‌شود (همانطور که در بالا اشاره شد تمامی ریزسازواره‌های روغنی یوکاریوت هستند و بنابراین دارای میتوکندری می‌باشند). ویژگی که در ریزسازواره‌های روغنی منحصربفرد است و به آنها اجازه تجمع سیتریک اسید می‌دهد، فعالیت آنزیم ایزوسیترات دهیدروژناز[۲۶] به‌عنوان یک جزء چرخه تری کربوکسیلیک اسید وابسته به حضور آدنوزین منو فسفات است که این وابستگی در ریزسازواره غیر روغنی دیده نشده است (Kim, 1997; Ratledge, 2002 and 2004). میزان آدنوزین منو فسفات نیز توسط آدنوزین منو فسفات- دآمیناز[۲۷] تنظیم می‌شود (واکنش شماره ۲).

$$\text{AMP} \longrightarrow \text{inosine } 5' - \text{monophosphate} + NH_3 \quad \text{(واکنش شماره ۲)}$$

فعالیت این آنزیم در ابتدای شروع محدودیت منبع نیتروژنی در محیط کشت ریزسازواره‌های روغنی تشدید می‌شود که وسیله‌ای برای به دام انداختن یون‌های آمونیوم اضافی از مواد درون سلولی است.

[24]- ATP-citrate lyase (ACL)
[25]- Tricarboxylic acid (TCA)
[26]- Isocitrate dehydrogenase (IDH)
[27]- AMP-deaminase

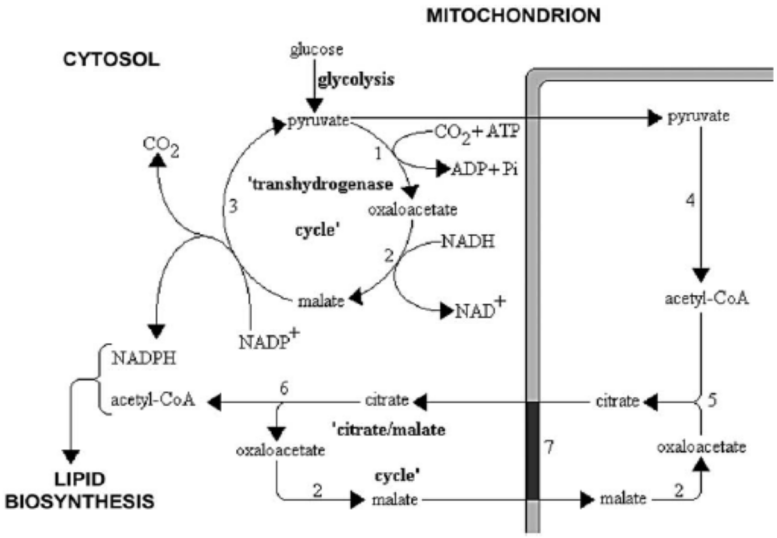
محدودیت منبع نیتروژنی در محیط کشت ریزسازواره‌های روغنی موجب القاء یک سری واکنش‌هایی می‌شود که منجر به تولید استیل کوآنزیم A می‌شود (Ratledge, 2004):

- ✓ در ابتدای کاهش منبع نیتروژنی، سلول‌های روغنی فعالیت بیشتر آدنوزین منو فسفات- دآمیناز از خود نشان می‌دهند که ۵ برابر زمانی است که سلول‌ها در شرایط محدودیت نیتروژنی نمی‌باشند.
- ✓ افزایش فعالیت آدنوزین منو فسفات- دآمیناز موجب کاهش مقدار سلولی آدنوزین منو فسفات می‌شود که شامل مقادیر موجود در میتوکندری نیز می‌شود.
- ✓ مقدار کاهش یافته آدنوزین منو فسفات در میتوکندری باعث متوقف شدن فعالیت آنزیم ایزوسیترات دهیدروژناز می‌شود که فعالیت آن در سلول‌های روغنی کاملا وابسته به آدنوزین منو فسفات است.
- ✓ در نتیجه ایزوسیترات متابولیزه نمی‌شود، بنابراین تجمع می‌یابد و به سهولت با سیترات به تعادل می‌رسد (توسط آنزیم آکونیتاز[۲۸]).
- ✓ بنابراین سیترات در میتوکندری تجمع می یابد.
- ✓ بوسیله سامانه کارآمدی که در غشای میتوکندری وجود دارد، سیترات به خارج از میتوکندری فرستاده می‌شود (در تبادل با مالات).
- ✓ سیترات وارد سیتوزول می‌شود و توسط آنزیم آدنوزین تری فسفات-سیترات لیاز به اگزالواستات و استیل کوآنزیم A تجزیه می‌شود.
- ✓ استیل کوآنزیم A برای تولید زیستی اسید چرب بکار می‌رود.
- ✓ اگزالواستات توسط مالات دهیدروژناز[۲۹] به مالات تبدیل می‌شود که به‌عنوان یون مخالف[۳۰] در سامانه انتقال سیترات استفاده می شود.

---

[28]- Aconitase
[29]- Malate dehydrogenase
[30]- Counter ion

توالی انجام این واکنش‌ها بصورت نمودار در شکل ۱-۲ نشان داده شده است.



شکل ۱-۲- نمودار چگونگی فعالیت چرخه سیترات/مالات و چرخه ترانس هیدروژناز سیتوزولی برای تأمین مقادیر کافی پیش‌سازهای استیل کوآنزیم A و نیکوتین آمین آدنین فسفات احیاء شده برای تولید زیستی لیپید در ریزسازواره‌های روغنی. آنزیم‌ها عبارتند از: ۱. پیروات دکربوکسیلاز ۲. مالات دهیدروژناز ۳. آنزیم مالیک ۴. پیروات دهیدروژناز ۵. سیترات سینتاز (Ratledge, 2004).

اگرچه این روند سوخت و ساز گلوگز به استیل کوآنزیم A را می‌توان برای جریان سوبسترای کربنی برای استفاده در تولید زیستی اسید چرب تحت شرایط محدودیت نیتروژنی در نظر گرفت ولی این تمام ماجرا نیست. مشاهده شده است که هر چند فعالیت آنزیم آدنوزین تری فسفات-سیترات لیاز در بعضی از ریزسازواره‌ها مشاهده شده است ولی این سلول‌ها قابلیت تجمع لیپید را ندارند. البته عکس این حالت مشاهده نشده است یعنی اینکه هیچ ریزسازواره روغنی تاکنون گزارش نشده است که فاقد فعالیت آنزیم آدنوزین تری فسفات-سیترات لیاز باشد. بنابراین بایستی آنزیم‌های دیگری نیز برای اطمینان از تجمع لیپید وجود داشته باشند (Kim, 1997; Ratledge, 2002; 2004).

شایان ذکر است که اسیدهای چرب موادی بسیار احیاء شده بوده و برای تولید آن ها وجود ذخیره کافی از یک ماده احیاء کننده مانند نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده بسیار ضروری است. برای تولید یک مولکول اسید چرب نیاز به ۱۶ مول نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء

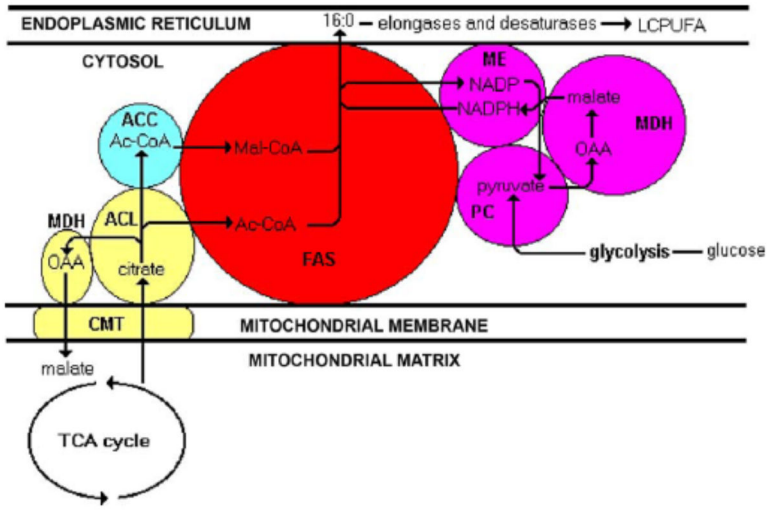
شده می‌باشد که دو مول نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده برای احیاء گروه ۳- کتو- آسیل چرب[۳۱]، نیاز است که در طی هر واکنش تراکمی استیل کوآنزیم A و مالونیل کوآنزیم A[۳۲] ایجاد می‌شود و به‌عنوان بخش مهمی از کمپلکس اسید چرب سنتاز می‌باشد که به زنجیره آسیل چرب اشباع کمپلکس شده که بعدا چرخه های طولانی شدن زنجیر را طی می‌نماید (Ratledge, 2004).

در حال حاضر عمده‌ترین منبع تأمین کننده نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده برای تولید زیستی اسید چرب، آنزیم مالیک است (واکنش شماره ۳) (Ratledge, 2002; 2004):

$$\text{Malate} + \text{NADP}^{+} \longrightarrow \text{Pyruvate} + CO_2 + \text{NADPH} \qquad \text{(واکنش شماره ۳)}$$

فعالیت آنزیم مالیک در بسیاری از ریزسازواره‌های روغنی مشاهده شده است و به نظر می‌رسد که به همراه آنزیم آدنوزین تری فسفات-سیترات لیاز و کمپلکس اسید چرب سنتاز تشکیل یک مجموعه سوخت و سازی یکپارچه را برای اطمینان از هدایت یافتن و تبدیل شدن استیل کوآنزیم A به اسیدهای چرب می‌دهد که این اسیدهای چرب نهایتا توسط گلیسرول بصورت تری آسیل گلیسرول استریفیه شده و بوسیله دستگاه رتیکولوم اندوپلاسمی به شکل قطره‌های اسید چرب تشکیل می‌شوند (شکل ۱-۳) (Wynn and Ratledge, 1997; Wynn *et al.*, 2001).

[31]- 3-Keto-fatty acyl group
[32]- Malonyl-CoA



شکل ۱-۳- نمودار روند پیشنهادی برای تولید زیستی لیپیدهای میکروبی (Ratledge, 2004).

ولی فعالیت آنزیم مالیک در تمام ریزسازواره‌های روغنی دیده نشده و حتی ممکن است در بعضی از مخمرهای روغنی مانند گونه‌های لیپومایسس[۳۳] و برخی گونه‌های کاندیدا[۳۴] وجود نداشته باشد. در این حالت این احتمال وجود دارد که یک آنزیم جایگزین تولیدکننده نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده مانند ایزوسیترات دهیدروژناز وابسته به نیکوتین آمید دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده سیتوزولی[۳۵]، هر چند که وجود آنزیم های دیگری نیز محتمل است، یافت شود که به تولید زیستی اسید چرب در همان مسیری که مانند آنزیم مالیک بصورت عملکردی با متابولیت اسید چرب مرتبط است، اختصاص داشته باشد (Ratledge, 2004; Kim, 2007).

۱-۵- میکروارگانیسم ها برای تولید روغن تک یاخته

تمام ارگانیسم های زنده باید حداقل مقداری چربی برای غشاها و سایر نقش های ساختمانی و عملکردی شان تولید نمایند. میکروارگانیسم ها از نظر تئوریکی توانایی تولید هر محصولی که در سلول های زنده یافت می شود را دارا می باشند و آن ها را سریع تر و سالم تر از گیاهان و حیوانات تولید می نمایند. همچنین روند تولید محصولات را می توان در تمام طول سال بدون وابستگی به تغییرات اقلیمی و آب و هوایی انجام داد. آن ها مانند هر سیستم سلولی زنده دیگر، لیپید تولید می

[33]- *Lipomyces*
[34]- *Candida*
[35]- NADPH-dependent isocitrate dehydrogenase

کنند و تمام سلول ها توسط غشاهای لیپیدی که به سنتز اسیدهای چرب نیاز دارند، احاطه شده اند. البته تنها تعداد نسبتاً کمی از میکروارگانیسم ها تحت عنوان گونه های روغنی شناخته شده اند. باکتری ها و مخمرهای روغنی تولیدکنندگان خوبی برای این نوع روغن نبوده و تنها در قارچ ها و میکروجلبک ها مقدار اسیدهای چرب چند غیراشباع بیش از ۲۲٪ کل اسیدهای چرب را تشکیل می دهد و از نظر تجاری بیشترین مقدار اسیدهای چرب چند غیر اشباع را تولید می کنند. میکروجلبک ها منابع بالقوه اسیدهای چرب چند غیر اشباع امگا ۳ هستند، گونه های *Schizochytrium* و *Crypthecodinium* منابع غنی از دوکوزاهگزانوئیک اسید بوده و میکروجلبک هایی مانند *Phaeodactylum* و *Monodus* منبع مناسبی از ایکوزاپنتانوئیک اسید می باشند (Ratledge et al., 2005).

در سال های اخیر افزایش چشمگیری در استفاده از کپک ها به عنوان تولید کننده های اسید های چرب ضروری در مقیاس صنعتی صورت گرفته است. برخی از کپک ها، ترکیبات اسیدهای چرب منحصر به فردی دارند که حاوی مقادیر نسبتا بالای اسیدهای چرب چند غیر اشباع می باشند. در این عرصه، گونه های متعلق به جنس قارچ *Mortierella* به علت قابلیت تولید طیف وسیعی از اسیدهای چرب از جمله آراشیدونیک اسید، ایکوزاپنتاانوئیک اسید، گامالینولنیک اسید، دی هموگامالینولنیک اسید تحت تأثیر عوامل مختلف محیط کشت، توجه بسیاری را به خود جلب کرده است.

۱-۵-۱- باکتری ها

در مورد باکتری‌ها، گونه‌های کمی وجود دارد که تولید لیپید قابل استخراج می‌کنند. جنس‌های مایکوباکتریا، کرینه‌باکتریا و نوکاردیا گروهی از باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند که مقادیر قابل توجهی لیپید تولید می‌کنند ولی این لیپیدها در ارتباط با عوامل سمی و حساسیت‌زا می‌باشند. درحقیقت لیپیدهای تولید شده کمپلکس بوده و همانند روغن‌های گیاهی از تری آسیل گلیسرول‌ها تشکیل نمی‌شوند. همچنین این ریزسازواره‌ها سرعت رشد کمی دارند. بنابراین نمی‌توان آن ها را برای تولید روغن‌های میکروبی برای مصرف انسان و حیوانات در نظر گرفت (Ratledge, 1982). البته نشان داده

شده است که می‌توان گلیکولیپید، دی مایکولیل تری هالوز[۳۶] که از این ریزسازواره‌ها جداسازی شده است را به‌عنوان سورفکتانت بکار برد. این ترکیب شامل ۲ اسید چرب کمپلکس ۸۸ کربنه است که به دی‌ساکارید تری هالوز متصل شده و فرآورده لیپیدی مشخصه این گروه از باکتری‌ها می‌باشد (Ratledge, 1984).

با این وجود، گونه‌ای از آرتروباکتر[۳۷] گزارش شده که می‌تواند تا بیش از ۸۰٪ توده زیستی خود را هنگامی‌که بر روی گلوکز یا دی اکسید کربن تولید شده توسط ارگانیسم نورتولیدی[۳۸] که بصورت همزیستی[۳۹] با این باکتری رشد می‌کند، لیپید تجمع کند. این باکتری با سرعت نسبتا کمی رشد می‌کند و بیشترین مقدار توده زیستی و ۷۰٪ لیپید را به ترتیب پس از ۴ و ۷ روز تولید می‌کند. این لیپید شامل ۵۰-۲۸٪ تری آسیل گلیسرول، ۵۶-۳۰٪ مونو آسیل گلیسرول و کمتر از ۵٪ فسفولیپید است. هدف اساسی تولید این لیپید استفاده از آن به‌عنوان سوخت و امکان استفاده از دی اکسید کربن اتمسفر به عنوان سوبسترا است (Ratledge, 1982).

۱-۵-۲- جلبک ها

جلبک‌های مختلفی که بیش از ۳۰٪ و تعداد کمتری از آنها ۵۰٪ از توده زیستی آنها را لیپید تشکیل می‌دهد، شناخته شده‌اند. شرایط رشد جلبک‌ها مانند نیاز به محیط‌های گرم و نور زیاد استفاده از آن ها را برای تولید روغن‌های میکروبی محدود می‌کرد (Ratledge, 1981; 1982; 1984).

البته اکنون وجود فرمانتورهای نوری[۴۰] موجب برطرف شدن این مشکل شده است. از جلبک‌ها مانند گونه‌های نیتزشیا[۴۱]، گونه نانوکلروپسیس[۴۲]، گونه ناویکولا[۴۳]، گونه فائوداستیلوم[۴۴] و گونه پورفیریدیوم[۴۵]

---

[36]- Dimycolyltrehalose
[37]- *Arthrobacter*
[38]- Photosynthetic
[39]- Symbiotic
[40]- Photobioreactors
[41]- *Nitzschia*
[42]- *Nannochloropsis*
[43]- *Navicula*
[44]- *Phaeodactylum*
[45]- *Porphyridium*

بطور گسترده‌ای برای تولید ایکوزاپنتانوئیک اسید استفاده می‌شود (Ward and Singh, 2005; Barclay *et al.*, 2005; Cohen and Khozin-Goldberg, 2005).

۱-۵-۳- قارچ ها

قارچ *Mortierella* به عنوان عضوی از خانواده *Mortierellaceae*، راسته *Mucorales*، شاخه *Zygomycota* طبقه بندی شده است و دارای دو زیر جنس *Mortierella* و *Micromucor* می باشد. گونه های متعلق به زیر جنس *Mortierella* از جمله گونه های *M. elongata*، *M. alpina* و *M. hyalina* قادر به سنتز اسیدهای چرب چند غیراشباع ۲۲ کربنی از جمله دی هموگامالینولنیک اسید و آراشیدونیک اسید می باشند، اما گونه های متعلق به زیرجنس *Micromucor* از جمله *M. vinacea* ، *M. isabellina* و *M. ramanniana* قادر به سنتز اسیدهای چرب چند غیراشباع هجده کربنی هستند (Muniglia et al., 2004). قارچ *M. alpina* از بهترین میکروارگانیسم های بررسی شده برای تولید اسیدهای چرب چند غیر اشباع معرفی شده است. برخی مزایای آن شامل بیماری زا نبودن، توانایی روغن زایی بالا، ساده و منظم، توانایی در استفاده از اسیدهای چرب موجود در محیط کشت، وجود انواعی از آنزیم های طویل کننده و غیراشباع ساز در قارچ رشته ای *M. alpina*، می باشد و تحت شرایط خاص کشت آن منجر به تولید انواعی از اسیدهای چرب چند غیر اشباع می شود. به عنوان مثال کاهش دمای رشد به زیر ۲۲ °C با افزودن هم زمان اسید آلفالینولنیک به محیط کشت، منجر به تولید ایکوزاپنتاانوئیک اسید می شود (Muniglia et al., 2004).

۱-۶- تخمیر برای تولید روغن تک یاخته

دو نوع تخمیر برای تولید روغن میکروبی ارائه شده است: تخمیر غوطه وری و تخمیر در بستر جامد. در طی دهه گذشته، تخمیر در بستر جامد یعنی کشت میکروارگانیسم‌ها بر روی سوبسترای جامد در غیاب و یا تقریباً نبودن آب آزاد، به علت مزایای آن در مقایسه با تخمیر غوطه وری قابل توجه می باشد. از جمله مزایای این روش، حجم کوچکتر بیوراکتور، کاهش هزینه ی فرآیندهای پایین دستی، تکنیک ساده تر، کاهش انرژی و خروجی کم فاضلاب می باشد، همچنین با این روش تخمیر می توان

از منابع طبیعی کم هزینه و تجدیدپذیر مانند باقیمانده های کشاورزی، محصولات زراعی و فرآورده های جانبی صنایع غذایی استفاده کرد. یکی از اصلی ترین پارامترهای تأثیرگذار در قیمت روغن تک یاخته مواد خام است. برای کاهش قیمت تولید می بایست، مواد اولیه ارزان قیمت استفاده شود. ضایعات کارخانجات مواد غذایی، مناسب ترین مواد اولیه از لحاظ صرفه اقتصادی می باشند، بویژه اگر روغن تولیدی را بخواهیم جهت مصارف انسانی استفاده کنیم. در تخمیر حالت جامد، قارچ ها نقش کلیدی ایفا می کنند، زیرا با گسترش میسلیوم و نفوذ به درون سوبسترا میتوانند از آب محصور شده در سوبسترا استفاده و در غیاب آب آزاد رشد کنند. بدلیل اینکه قارچ ها موجب کاهش ترکیبات ضدتغذیه ای مانند اسید فیتیک و آبکافت جزئی پلیمرهای زیستی سوبسترا می شوند، می توان از توده تخمیر شده که مقدار زیادی اسیدهای چرب چند غیراشباع دارد به عنوان مکمل خوراکی انسان یا حیوان استفاده نمود. بنابراین محصول تخمیری حالت جامد را می توان مستقیما بدون تیمار استخراج اضافی، خشک و مصرف کرد. از محدودیت های تخمیر در بستر جامد، بویژه در مقیاس بزرگ، دو فاکتور مهم از جمله انتقال مواد مغذی و حذف گرمای تولید شده در طی واکنش تخمیر می باشد، با وجود این مشکلات تولید اسیدهای چرب چند غیر اشباع توسط تخمیر حالت جامد می تواند روش مفیدی برای تولید و ارائه این محصول به بازار باشد، زیرا انتظار می رود هزینه سرمایه گذاری و خطر آن برای تولیدکنندگان کم باشد (Huang et al., 2013).

۱-۷- ضایعات غذایی و کشاورزی به عنوان منابع تجدیدپذیر و اقتصادی جهت تولید روغن تک یاخته

گرچه هزینه های تولید روغن تک یاخته هنوز بالاست اما اخیراً تلاش های زیادی صورت گرفته است تا این هزینه ها به حداقل برسد. مهم ترین و رایج ترین تمهیدی که به این منظور اندیشیده می شود، استفاده از ضایعات با ارزش صفر یا حتی منفی (اغلب ضایعات کشاورزی) به عنوان سوبسترا چه در سیستم های غوطه وری و چه سیستم های جامد تخمیر می باشد (Papanikolaou et al., 2004). در این قسمت به برخی از تلاش های صورت گرفته در زمینه استفاده از ضایعات کشاورزی به منظور

تولید روغن تک یاخته اشاره می شود. در ادامه به برخی از کاربردهای ضایعات غذایی و کشاورزی برای تولید روغن تک یاخته اشاره می گردد.

۱-۷-۱- ملاس

مدت زیادی تخمیر روی قندهای مختلفی انجام شده است. به طور کلی مواد ارزان قیمت حاوی قندهای متفاوت می توانند جهت تولید روغن تک یاخته مورد استفاده قرار گیرند. ملاس چغندرقند یا نیشکر یک محصول جانبی صنعت است، که عمدتاً حاوی فروکتوز، ساکارز و گلوکز می باشد، بنابراین ملاس می تواند بعنوان یک ماده خام ارزان قیمت ایده آل جهت فرمولاسیون محیط کشت مورد استفاده قرار گیرد. اخیراً از ملاس به خاطر محتوای قند مناسب آن، بعنوان پیش ساز تولید روغن برای میکروب های روغنی استفاده شده است. البته میزان نیتروژن موجود در ملاس زیاد بوده و این امر در مسیر تولید روغن مطلوب نبوده و باید مورد توجه قرار گیرد (Fadaly et al., 2009).

۱-۷-۲- مواد خام صنعت غذا

در بسیاری از محصولات جانبی صنعت غذا، قندهای مختلف قابل تخمیر وجود دارند که به جهت اهمیت بالای منبع کربن موجود در محیط برای تولید روغن، پیش ساز مناسبی برای میکروارگانیسم های روغنی می باشند. بعنوان مثال راندمان تولید آراشیدونیک اسید توسط قارچ *Mortierella alpine* در محیط نشاسته هیدرولیز شده ۱/۴۷ گرم در لیتر می باشد (Economou et al., 2010). از موارد دیگری که امکان استفاده به عنوان سوبسترا را دارند می توان به ضایعات گوجه فرنگی، موز، روغن زیتون و ... اشاره نمود. بعنوان مورد دیگر، از پسماند مونوسدیم گلوتامات جهت تولید روغن استفاده شده است که این روغن به عنوان پیش ساز تولید بیودیزل می‌باشد (Shinmen et al., 1989).

۱-۷-۳- گلیسرول

گلیسرول به طور سنتی به وسیله تخمیر میکروبی و یا سنتز شیمیایی تولید می شود. در طول فرآیند بیودیزل، روغن با متانول و کاتالیست قلیایی مخلوط شده و استرهای اسیدچرب تولید می شوند، و در

این فرآیند، گلیسرول اولین محصول جانبی می باشد. نهایتاً اینکه مقدار زیادی گلیسرول در صنعت بیودیزل تولید می شود که گزینه ارزان و ایده آلی جهت تخمیر می باشد که نقش گلیسرول به عنوان منبع کربن در بسیاری از منابع ذکر شده است. به عنوان مثال از این ماده می توان به عنوان پیش ساز تولید روغن تک یاخته برای *Yarrowia lipolitica* استفاده کرد و همچنین تحقیقات گسترده تری در رابطه با تولید روغن تک یاخته، ا و ۳- پروپان دی ال و اسید سیتریک به وسیله *Mortierell isabellina* صورت گرفته است (Armenta et al., 2013).

۱-۷-۴- مواد لیگنوسلولزی

بیش از نیم قرن است که مواد سلولزی به عنوان ماده خام دارای پتانسیل خوب جهت تولید سوخت های زیستی شناخته شده اند و به دلیل در دسترس بودن زیاد این مواد، قیمت کمتر و نیز داشتن نقش های رقابتی کمتر نسبت به سوبستراهای دیگر بسیار مورد توجه می باشند. در تحقیقات زیادی از انواع مختلف این مواد مانند کاه گندم، پوسته برنج، ضایعات ذرت و ... استفاده شده است. نکته حائز اهمیت در این رابطه پیچیده بودن ساختار شیمیایی این مواد می باشد که جهت مصرف توسط میکروارگانیسم ها باید به نحوی به ترکیبات ساده تر تجزیه شوند. تیمار اسیدی همراه با حرارت در بسیاری از موارد استفاده شده و پلی ساکاریدهای مذکور از این طریق به قندهای ساده جهت مصرف میکروارگانیسم تبدیل شده اند. در یک پژوهش با استفاده از اسید توأم با حرارت، کاه برنج را هیدرولیز کرده و پس از سم زدایی و جداکردن مواد سمی حاصل از هیدرولیز به عنوان پیش ساز تولید روغن برای میکروب روغنی *Trichosporon fermentans* مورد استفاده قرار گرفت. در جدول زیر چند پژوهش بر روی سوبستراهای لیگنوسلولزی آورده شده است (Fadaly et al., 2009).

جدول ۱-۱- تولید روغن میکروبی با استفاده از عصاره هیدرولیز شده مواد لیگنوسلولزی مختلف

پیش ماده مورد استفاده	میکروب مورد استفاده
کاه گندم	تریکوسپورون فرمنتانس
کاه برنج	کریپتوکوکوس کارواتوس
چوب ذرت	تریکوسپورون درماتیس
پوسته برنج	مورتیرلا ایزابلینا

۱-۷-۵- آب پنیر

یکی از محصولات جانبی صنعت غذا که می توان از آن به عنوان یک منبع برای تولید روغن تک یاخته استفاده نمود آب پنیر می باشد که در ادامه توضیحاتی در ارتباط با آن ارائه می گردد.

در صنعت لبنیات مواد مایع دورریز زیادی تولید می‌شود که بیشترین سهم آن را آب‌پنیر به خود اختصاص داده است (Dragon et al., 2009). آب‌پنیر محصول جانبی حاصل از فرآیندهای پنیرسازی و تولید کازئین می‌باشد که بر اساس چگونگی تشکیل، به دو نوع آب‌پنیر شیرین و اسیدی دسته‌بندی می‌شود. در تولید پنیرهای رنتی همچون پنیر چدار و سوییسی، افزودن مایه پنیر[۴۶] به عنوان جزئی از فرآیند، منجر به از بین رفتن اثر کاپاکازئین در حفظ حالت سوسپانسیونی کازئین‌ها شده، بین آن ها شبکه میسلی ایجاد می‌شود که بخش عمده‌ای از چربی و بخش کوچکی از سایر اجزای شیر به درون آن راه می‌یابند، لخته تشکیل شده را پنیر و مایع باقیمانده را آب‌پنیر شیرین می‌گویند. در فرآیندهای تولید کازئین یا پنیرهایی مثل کاتیج، از اسیدهای آلی یا معدنی جهت کاهش درجه pH تا رسیدن به نقطه ایزوالکتریک [۴۷] کازئین‌ها (۴/۶) استفاده می‌شود که این امر منجر به رسوب پروتئین‌های کازئینی شده، مایع برجای مانده آب‌پنیر اسیدی نام دارد (Smithers, 2008).

[46]- Rennet
[47]- Isoelectric Point

چیزی حدود ۹۰-۸۵ درصد حجم شیری که برای پنیرسازی استفاده می‌شود به صورت آب‌پنیر بر جای می‌ماند که البته بیش از ۹۰٪ آن را آب تشکیل می‌دهد ولی با این حال بخش عمده‌ای از اجزای اصلی شیر مثل لاکتوز، پروتئین‌های محلول در آب، ویتامین‌های محلول در آب، مواد معدنی، بخش کوچکی از چربی و ویتامین‌های محلول در چربی به آب‌پنیر راه می‌یابند (Pescuma et al., 2010) که جزئیات آن در جدول زیر قابل مشاهده است.

جدول۱-۲- سهم آب‌پنیر از اجزای شیر (Smithers, 2008).

اجزا	مقادیر(وزن بر حجم ٪)	
	شیر	آب پنیر
کازئین	۲/۸	کمتر از ۰/۱
پروتئین آب پنیر	۰/۷	۰/۷
چربی	۳/۷	۰/۱
خاکستر	۰/۷	۰/۵
لاکتوز	۴/۹	۴/۹
ماده جامد کل	۱۲/۸	۶/۳

سالانه در دنیا چیزی حدود $۱۰^{۸}$ تن آب‌پنیر تولید می‌شود که تا چند دهه‌ی قبل به عنوان مایعی دور ریز به طبیعت تخلیه می‌شد ولی با روشن شدن آلودگی‌های زیست‌محیطی که در اثر تخلیه آن به طبیعت اتفاق می‌افتد بسیاری از قوانین محدودیت یا منع دفع آب‌پنیر تیمار نشده به محیط زیست شکل گرفته است. با این حال هنوز هم در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، کارخانجات تولید-کننده آب‌پنیر به دلیل نداشتن سامانه‌های مناسب تیمار به دنبال راهی ارزان جهت دورریختن آن می‌باشندکه معمولا به روش‌های زیر صورت می‌گیرد (Dragon et al., 2009):

با پیشرفت فن‌آوری و فراهم شدن امکان شناسایی اجزای آب‌پنیر در اواخر قرن بیستم ناموجه بودن تخلیه آب‌پنیر به محیط زیست واضح‌تر شد چرا که مشخص شد بخش بزرگی از مواد مغذی شیر به آب‌پنیر راه می‌یابند و از این نظر تخلیه آب‌پنیر به محیط زیست به معنای هدررفت حجم وسیعی از

مواد ارزشمند غذایی می‌باشد. این رو و در این راستا پژوهش‌های بسیاری در جهت شناسایی هر چه بیشتر اجزای آب‌پنیر و بررسی امکان استفاده از آن‌ها در زنجیره غذایی انسان صورت گرفته است و توسعه فن‌آوری‌هایی مانند تغلیظ، جداسازی و خشک کردن حرکت در این مسیر را شتاب بخشیده است که نتیجه ی آن جداسازی اجزای مختلف آب‌پنیر مثل لاکتوز، پروتئین‌های آب‌پنیر، اسید لاکتیک و مواد معدنی و تولید فرآورده‌هایی مثل پودر آب‌پنیر، پودر افشره پروتئین آب‌پنیر[۴۸] (WPC)، پودر جدایه پروتئین آب‌پنیر[۴۹] (WPI) و ... بوده است (Djuric et al., 2004). تمامی این تلاش‌ها نشان‌گر این مهم هستند که آب‌پنیر را نه به دید مایعی دورریز که به زیر فرآورده‌ای باید نگریست که قابلیت بالایی را در جهت استفاده در زنجیره غذایی انسان دارا می‌باشد.

به دلیل در دسترس بودن زیاد و میزان مواد مغذی مناسب بویژه منبع کربن (که در تولید روغن بسیار مهم است) آب پنیر یک پیش ماده مناسب برای تولید روغن تک یاخته می باشد. در این رابطه نیز تحقیقات زیادی صورت گرفته است که به عنوان نمونه از آب پنیر به عنوان پیش ساز تولید روغن از *Mortierella isabellina* و سویه هایی از قارچ موکور استفاده شده است که نهایتاً از این ماده، گامالینولنیک اسید تولید شد. لاکتوز موجود، منبع کربن بوده و منبع ازت، پروتئین های باقیمانده و ازت غیرپروتئینی می باشد (Fadaly et al., 2009).

۱-۸- اهمیت روغن تک یاخته از منظر تغذیه ای

یکی از مسائل مهم در ارتباط با روغن تک یاخته که اهمیت آن را در بحث های تغذیه و رژیم های غذایی دو چندان می کند، ترکیب اسیدهای چرب آن است. یکی از مهم ترین موارد، اسیدهای چرب چند غیر اشباع (PUFA) هستند که در زنجیر کربنی، بیش از ۱۸ کربن دارند و به دلیل کمبود آنزیم های مورد نیاز به طور قابل توجهی توسط گیاهان پیشرفته سنتز نمی شوند. اهمیت روز افزون بحث سلامتی و رژیم غذایی و نقش مهم اسیدهای چرب چند غیر اشباع، لزوم شناخت و بکارگیری

[48]- Whey Protein Concentrate
[49]- Whey Protein Isolate

تکنولوژی ها و منابع جدید را توجیه می کند که یکی از مهم ترین موارد در این مقوله، بیوتکنولوژی و میکروارگانیسم های مفید به صورت روغن تک یاخته می باشد. این روغن ها به عنوان مکمل های رژیمی می توانند در فرمول غذای نوزاد به کار روند. یکی از مباحث مهم که در جوامع پزشکی و صنعت غذا دارای اهمیت قابل توجهی است، بحث لزوم این موضوع است که فرمول غذای نوزاد حتی الامکان ترکیبی مشابه شیر مادر را در خود داشته باشد. مهم ترین اسیدهای چرب در این خصوص آراشیدونیک اسید (ARA) و دکوزاهگزانوئیک اسید(DHA) هستند که هر دو فواید کاربردی و بیوشیمیایی مهمی در بحث سلامتی دارند. DHA اسید چرب ۲۲ کربنی از خانواده امگا سه است که نقش مهمی در رشد و کارکرد مناسب مغز و چشم نوزاد دارد و در بزرگسالان نیز فواید زیادی در کارکرد عروق و رگ های قلبی و سلامت مغز دارد. ARA نیز اسید چربی ۲۰ کربنی و از خانواده امگا ۶ است که نقش بسزایی در کارکرد سیستم عصبی مرکزی دارد. منابع متداول ARA، زرده تخم مرغ و جگر حیوانات و منبع متداول DHA، روغن ماهیان است (Ratledge et al., 2005). تلاش هایی در زمینه جایگزینی DHA و ARA موجود در شیر مادر با روغن های تک یاخته قارچی و جلبکی که حاوی این دو اسیدچرب هستند صورت گرفته است. جهت دستیابی به روغن تک یاخته حاوی دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHASCO) میکروارگانیسم هایی نظیر *Crypthecodinum cohnii* ابتدا تحت شرایط بسیار کنترل شده تخمیر، در محیطی شامل گلوکز و عصاره مخمر رشد کرده و پس از جداسازی، روغن حاصل به وسیله مخلوط کردن جلبک خشک با هگزان استخراج شده و سپس هگزان به طور کامل به وسیله تکنیک های تقطیر، جداسازی و حذف می شود. روغن تک یاخته حاوی آراشیدونیک اسید (ARASCO) نیز از گونه های قارچی مانند *Pythium insidiosum* یا *Mortierelle alpine* طی فرآیندی مشابه تولید DHASCO تولید می شود (Wen et al., 2003).

یکی از چالش هایی که در این خصوص وجود دارد، این است که مطالعات انجام گرفته حاکی از افزایش ۱۵ درصدی قیمت فرمول غذای نوزاد حاوی ARASCO و DHASCO نسبت به نمونه استاندارد آن است. مورد دیگر لزوم بررسی همه جانبه این فرمول ها جهت حاصل شدن اطمینان

کامل از ایمنی و سلامت آن ها بر نوزادان است. همچنین روغن ماهیان اغلب دارای عطر و طعم های نه چندان مطلوب و کیفیت به شدت متغیر هستند. بعلاوه حاوی کلسترول و مقادیر کمی ناخاصی های احتمالاً سمی دی اکسین ها و فلزات سنگین مانند مس هستند که باید حذف شوند. این عوامل می توانند توجیه دیگری از لزوم پرداختن به بحث روغن تک یاخته و جایگزین کردن آن باشند. از طرف دیگر اسیدهای چرب چندغیر اشباع بلندزنجیر به واکنش های اکسیداسیون حساس بوده که می تواند عامل اصلی فساد محصول طی فرآیند و انبارداری پودرهای حاوی آن ها شود. در یک بررسی، پایداری پودرهای شیر نوزادی که جهت تامین DHA و ARA، دارای مکمل های فسفولیپید زرده تخم مرغ و DHA و ARA سنتز شده به صورت روغن تک یاخته بودند، مورد مطالعه قرار گرفت. پایداری لیپید در هر دو مورد در سطح قابل قبولی بود اما نتایج مطلوب تری برای پودرهای دارای مکمل روغن تک یاخته حاصل شده است (Ratledge et al., 2005).

۱-۹- فرآیندهای تجاری برای تولید روغن تک یاخته

امروزه حداقل سه فرآیند تخمیری گوناگون که هر کدام از ریزسازواره‌های متفاوتی برای تولید دوکوزاهگزانوئیک اسید استفاده می‌کنند، وجود دارد. برای تولید آراشیدونیک اسید سویه‌های مختلفی از مورتیرلا آلپینا در فرآیندهای جداگانه‌ای در اروپا، چین و احتمالا ژاپن استفاده می‌شود. این فرآیندها به همراه میکروارگانیسم هایی که در آن ها بکار برده می‌شود در جدول۱-۳ آورده شده است.

جدول ۱-۳-ترکیب اسیدهای چرب (درصد وزنی/وزنی) روغن‌های تک یاخته که اکنون تولید می‌شوند

(Ratledge, 2004).

	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3 (n-6)	20:3 (n-6)	20:4 (n-6)	22:0	24:0	
(A) *ARA-SCO processes using M. alpina strains*											
DSM process [a]	0.4	8	11	14	7	4	4	49	–	1	
Wuhan Alking process [b]	0.2	6	2	4	4	2	–	70	3	5	
	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 (n-3)	20:3 (n-6)	22:5 (n-6)	22:6 (n-3)
(B) *DHA-SCO processes*											
Martek process [c] (DHASCO™)	4	20	18	2	0.4	15	0.6	–	–	–	39
Omega-Tech process [d] (DHASCO-S)	–	13	29	12	1	1	2	3	1	12	25
Nutri-nova process [e] (DHAc-tive)	–	3	30	–	1	–	–	–	–	11	46

a فرآیند DSM اکنون در کشور ایتالیا در فرمانتورهای با ظرفیت m^3 ۱۰۰ تولید می‌شود. مقدار روغن تولیدی بیش از ۴۰٪ وزنی سلول می‌باشد. این روغن منحصرا به شرکت Martek Bioscience Corp. فروخته می‌شود و در نسبت ۱:۲ (حجمی) با $DHASCO^{TM}$ مخلوط می‌شود و در فرمول شیر خشک کودکان تحت نام تجاری Formulaid بکار می‌رود. در سال ۲۰۰۳ میلادی ۴۸۰ تن از این روغن تولید شده است.

[b] این فرآیند در کشور چین در فرمانتورهایی با ظرفیت m^3 ۱۰۰-۵۰ توسط شرکت Wuhan Alking Engineering Co. Ltd. تولید می‌شود.

[c] از جلبک کریپتوکونیدیوم کوهنی[50] که بیش از ۴۰٪ توده زیستی خود را روغن تولید می‌کند، استفاده می‌شود. این فرآیند توسط شرکت Martek Bioscience Corp. در تعدادی فرمانتور با ظرفیت m^3 ۱۰۰ انجام می‌شود. این روغن به همراه آراشیدونیک اسید منحصرا در فرمول شیر خشک کودکان استفاده می‌شود. در سال ۲۰۰۳ میلادی ۲۴۰ تن از آن تولید شده است.

[50]- *Cryptoconidium cohnii*

[d] از جلبک گونه شیزوکیتریوم[51] استفاده می‌شود. این روغن قبلا به نام DHAGold شناخته می‌شد که توسط شرکت .OmegaTech Inc تولید می‌شد و اکنون جزو شرکت Martek می‌باشد. ۱۰ تن از این روغن در سال ۲۰۰۳ میلادی تولید شده است.

[e] از جلبک گونه آلکمیا[52] که در فرمانتورهای m^3 ۸۰ رشد می‌کند، استفاده می‌شود. این روغن در کشور آلمان توسط شرکت Nutrinova GmbH تولید می‌شود و تحت نام تجاری DHAActive به فروش می‌رسد.

برای استفاده در فرمول‌های غذای کودکان $ARASCO^{TM}$ و $DHASCO^{TM}$ با نسبت ۱:۲ با یکدیگر مخلوط شده و تحت نام تجاری Formulaid فروخته می‌شوند. این فرآورده در بیش از ۶۰ کشور در سرتاسر دنیا در فرمول‌های غذای کودکان استفاده می‌شود. حدود ۷۰۰ تن از این مخلوط روغنی در سال ۲۰۰۳ میلادی تولید شده و انتظار می‌رود که به بیش از ۱۰۰۰ تن در سال ۲۰۰۴ میلادی برسد (Ratledge, 2004).

این نکته مهم بایستی مد نظر قرار داده شود که ریزسازواره‌هایی که برای تولید روغن تک یاخته استفاده می‌شوند، اسید چرب مورد نظر را به عنوان اصلی‌ترین اسید چرب خود تولید می‌کنند. مثلا جلبک کریپتوکونیدیوم کوهنی که در فرآیند Martek استفاده می‌شود، تولید روغنی می‌کند که ۵۰-۴۰٪ تمام اسیدهای چرب آن دوکوزاهگزانوئیک اسید است که تنها اسید چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه نیز می‌باشد و در حقیقت تنها اسید چرب غیراشباع دیگر موجود در آن درصد کمی از اولئیک اسید می‌باشد. بنابراین این روغن‌ها ویژگی‌های منحصربفرد داشته و کاملا با روغن‌های بدست آمده از گیاهان و جانوران که معمولا شامل هر دو دسته از اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع می‌باشند، متفاوت است. بنابراین هنگامی‌که نیاز به مکمل غذایی یک اسید چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه داشته باشیم تنها از طریق منابع میکروبی قابل تهیه می‌باشد (Ratledge, 2004). موفقیت نسبی در تولید اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه میکروبی منجر به افزایش علاقه برای

---

[51]- *Schizochytrium sp.*
[52]- *Ulkemia sp.*

سرمایه‌گذاری و توسعه فرآیندهای تخمیری شده است و موجب شده برخی از فرآیندها به تولید تجاری برسند (Gill and Valivety, 1997; Yuan *et al.,* 2002). با این حال هنوز هم دو مشکل اساسی یعنی موانع اقتصادی و بازاریابی، وجود دارند. از طرف دیگر هزینه روغن میکروبی نسبت به مزایای سلامتی بخش آن (از لحاظ عملکردی، تغذیه‌ای و درمانی) می‌تواند در درجه دوم اهمیت قرار بگیرد. با این حال بایستی روغن‌های میکروبی با بهترین و با ارزش‌ترین محصولات اقتصادی را تولید کنند و زمینه وسیع تولید در مقایسه با کالاهای دیگر از لحاظ رقابت‌پذیری داشته باشند.

اگرچه دست‌ورزی ترکیب روغن میکروبی یکی از زمینه‌های کاربردی بسرعت درحال رشد بیوتکنولوژی می‌باشد ولی منابع روغن میکروبی برای برطرف نمودن تقاضای صنعتی ناکافی می‌باشد. از اینرو روش‌های دیگری (مانند روش‌های جهش‌زایی، تکنیک‌های مهندسی مولکولی، استفاده از بازدارنده‌ها، تغییر ترکیب اسید چرب میکروبی با استفاده از آنزیم‌ها) بایستی با روش‌های کلاسیک همراه شوند (Certik and Shimizu, 1999; Sperling *et al.,* 2003; Kendrick and Ratledge, 1992a). نام برخی از شرکت‌هایی که در زمینه تولید روغن میکروبی فعالیت می‌کنند در جدول زیرنشان داده شده است.

جدول ۱-۴- اسامی برخی شرکت‌های فعال در زمینه تحقیق، توسعه، تولید و بازاریابی روغن تک یاخته و محصولات غنی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه (Ward and Singh, 2005).

Aventis S.A.
BASF A.G.
Friesland Brands A.G.
Gist-brocades
Heinz-Wattie's
Hoffmann-LaRoche A.G.
Jamieson
Laboratorios Ordesa
Maarbarot
Martek Inc.
Mead Johnson Nutritionals
Nagase and Co.
Nestle S.A.
Novartis
Nutricia
Nutrinova Celanese A.G.
Pronova
Ross Products (Div of Abbott)
Suntory Ltd.
Walmart
Wyeth

فصل دوم

مروری بر مطالعات پیشین

فصل دوم: مروری بر مطالعات پیشین

در ادامه به طور مختصر به مطالعات انجام شده در زمینه تولید روغن تک یاخته اشاره گردیده است.

حسینی و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی تولید روغن میکروبی به وسیله مورتیرلا آلپینا پرداختند. در این تحقیق 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. این محققین با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش خود نتیجه گیری نمودند که تولید روغن در میکروارگانیسم های چربی زا در واقع یک فرآیند دو مرحله ای است که زمانی آغاز می شود که ارگانیسم قادر به ساخت مواد ضروری سلول مثل پروتئین، اسید نوکلئیک و ... نمی باشد و یک ماده ضروری اصلی به غیر از کربن و اکسیژن در محیط به اندازه ی 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.

آب سالان و همکاران در سال ۱۳۹۱ به بررسی تولید روغن تک یاخته و گاما لینولنیک اسید توسط قارچ کونینگاملا اشینولاتا پرداختند. در این تحقیق تولید توده زیستی، روغن و گاما لینولنیک اسید از قارچ روغنی با استفاده از روش آماری سطح پاسخ از محیط کشت بهینه شده با گلوکز و پودر سویا در تخمیر غوطه وری مورد مطالعه قرار گرفت. منبع کربنی (گلوکز) و منبع نیتروژنی (پودر سویا) در ۵ سطح در نظر گرفته شد و از طرح مرکب مرکزی با ۱۳ آزمایش و ۲ تکرار که شامل ۲ آزمایش در نقطه مرکزی است، استفاده شد. بیشترین مقدار تولید روغن در غلظت گلوکز ۶۰ گرم بر لیتر و پودر سویا ۴/۳۱ گرم بر لیتر به مقدار ۲۵٪ و بیشترین مقدار تولید توده زیستی در غلظت گلوکز ۸۰ گرم بر لیتر و پودر سویا ۲۰ گرم بر لیتر به مقدار ۲/۵۳ درصد بدست آمد. سطح پاسخ نشان داد که با افزایش

میزان منبع کربنی تا سطح ۶۰ گرم بر لیتر و کاهش منبع نیتروژنی، میزان تولید روغن افزایش می یابد. اما با افزایش منبع کربنی از سطح ۶۰ گرم بر لیتر به بالا، به علت فشار اسمزی ایجاد شده، تولید روغن کاهش پیدا می کند. با افزایش میزان منابع کربنی و نیتروژنی، میزان تولید توده زیستی افزایش می یابد. بیشترین میزان گاما لینولنیک اسید در سطح گلوکز ۳۱/۷۲ گرم بر لیتر و پودر سویا ۱۳/۵ گرم بر لیتر به میزان ۶/۵ درصد به دست آمد.

انشاییه و همکاران در سال ۱۳۹۲ به تولید و بهینه سازی روغن میکروبی در مخمرهای مولد چربی یارویا لیپولیتیکا و مخمر بومی ژئوتریکوم پرداختند. این محققین عنوان نمودند که روغن جداسازی شده از این مخمرها تشابه قابل توجهی با استاندارد مربوطه (تری اولئین) داشته است.

قنواتی و نحوی در سال ۱۳۹۵ به بررسی تولید روغن تک یاخته از رودوترولا موسیلوژینوزا پرداختند. این محققین عنوان نمودند که جدایه بومی مخمری مورد استفاده در تحقیقشان دارای توانایی مناسبی جهت تولید روغن تک یاخته بوده است.

عبدلی و همکاران در سال ۱۳۹۵ به تولید روغنی غنی از اسیدهای چرب سری امگا توسط مخمرهای مولد چربی و میزان تأثیر پارامترهای مختلف بر فرآیند تولید پرداختند. در این پژوهش دو سویه ی مخمری استاندارد و چهار سویه ی بومی از نظر پتانسیل تولید لیپید مورد ارزیابی قرار گرفتند. بهینه سازی تولید لیپید در این سویه ها با استفاده از روش طراحی آزمایش ها صورت گرفت و عوامل موثر بر تولید لیپید در این سویه ها مورد مقایسه قرار گرفتند. آنالیز روغن به دست آمده با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری توده ای انجام شد. بین سویه های استاندارد، یارویا لیپولیتیکا و در بین سویه های بومی، کریپتوکوکوس آلبیدوس دارای بیشترین میزان تولید لیپید بودند. این محققین با آنالیز ترکیب لیپیدی به دست آمده عنوان نمودند که روغن تولیدی دارای شباهت زیادی به روغن گیاهی بوده که پتانسیل کاربرد آن را در صنایع غذایی مورد تأیید قرار می دهد.

در تحقیقی Hansson و Dostalek (۱۹۸۸) تأثیر درجه حرارت‌های °C ۳۰، ۲۵ و ۲۰ را بر بازدهی توده زیستی و ترکیب اسیدهای چرب در دو سویه مورتیرلا رامانیانا[۵۳]، مورتیرلا ویناسه‌آ[۵۴] و مورتیرلا ایزابلینا[۵۵] بررسی کردند. مشاهده شد که درجه حرارت °C ۲۵ بهترین دما برای تولید بیشترین مقدار توده زیستی می‌باشد. همچنین نشان داده شد که با توجه به درجه حرارت و مدت زمان تخمیر، ترکیب اسیدهای چرب تغییر می‌کند. بطور کلی درجه غیر اشباعیت با افزایش درجه حرارت، کاهش می‌یابد. درحقیقت درجه غیر اشباعیت تحت تاثیر میزان گاما لینولئیک اسید می‌باشد که با کاهش درجه حرارت افزایش می‌یابد.

در تحقیقی Totani و همکاران (۱۹۹۲)، از پپتون و سبوس گندم در محیط کشت غوطه‌وری مورتیرلا آلپینا استفاده کردند و بازدهی آراشیدونیک اسید زیاد یعنی ۱۱ گرم بر لیتر را بدست آورند. تنها مقدار کمی توده زیستی در کشت‌هایی که شامل نیترات آمونیوم، نیترات سدیم، استات آمونیوم یا سولفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژنی می‌باشند، بدست آمده است که موجب این پیشنهاد شده است که قارچ مورتیرلا منبع نیتروژنی معدنی را به سختی جذب نموده و به آمینو اسید و پروتئین برای بدست آوردن مقدار مناسبی توده زیستی نیاز دارند (Totani *et al.,* 2000).

در مطالعه‌ای که توسط Higashiyama و همکاران (۱۹۹۸) برای افزایش تولید آراشیدونیک اسید توسط قارچ مورتیرلا آلپینا 1S-4 صورت گرفت، مشخص شد که محیط کشت دارای عصاره مخمر نسبت به محیط کشتی که دارای کنجاله سویا می‌باشد، مناسب‌تر است ولی هنگامی‌که برخی املاح به محیط کشت پایه افزوده شد، محیط کشت دارای کنجاله سویا نسبت به محیط کشتی که دارای عصاره مخمر است، مناسب‌تر است.

در تحقیقی Totani و همکاران (۲۰۰۰)، املاح مورد نیاز در کشت مورتیرلا آلپینا را مورد بررسی قرار دادند. آن ها دریافتند که فسفر، پتاسیم، آهن و منگنز برای رشد سلولی ضروری می‌باشند و آهن و

---

[53]- *Mortierella ramanniana*
[54]- *Mortierella vinacea*
[55]- *Mortierella isabellina*

منگنز نقش مهمی در تولید لیپید ایفاء می‌کنند. اثر منفی بدلیل افزودن تنها آهن یا تنها منگنز نیز مشاهده شد.

Papapnikolaou و همکاران در سال ۲۰۰۴ به بررسی تولید روغن تک یاخته با استفاده از مورتیرلا ایزابلینا در محیط کشت حاوی شکر بالا پرداختند. در این مطالعه به ازای هر لیتر از محیط کشت، ۱۸/۱ گرم روغن تولید گردید. این محققین عنوان نمودند که روغن میکروبی تولید شده حاوی گامالینولنیک اسید (GLA) در غلظت ۳/۵ درصد وزنی وزنی بوده است.

Li و همکاران در سال ۲۰۱۰ به تولید روغن تک یاخته از هیدرولیزات نشاسته کاساوا با استفاده از مخمر دریایی رودوتورلا میوسیلاجینوزا پرداختند. در واقع در این مطالعه، محققین مخمر را از سطح ماهی دریایی جمع آوری نمودند که قابلیت تجمع لیپید از هیدرولیزات نشاسته را دارا می باشد. مقدار روغن در سلول ها در روش غیر پیوسته ۴۷/۹ درصد و در طی روش نیمه پیوسته ۵۲/۹ درصد بوده است. اسیدهای چرب روغن تولیدی نیز شامل پالمیتیک اسید، پالمیتولئیک اسید، استئاریک اسید، اولئیک اسید و لینولنیک اسید بوده است.

در تحقیقی Jang و همکاران (۲۰۰۵) تأثیر شرایط مختلف کشت را بر تولید اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه توسط مورتیرلا آلپینا بررسی کردند. نشان داده شد که وزن خشک سلولی با افزایش غلظت نشاسته و گلوکز افزایش می‌یابد. در غلظت نشاسته ۱۰٪ و غلظت گلوکز ۶٪ به‌ترتیب به بیشترین مقدار ۱۸/۴ گرم بر لیتر و ۱۴/۹ گرم بر لیتر می‌رسد. وزن خشک سلولی به آرامی در غلظت نشاسته بیشتر از ۱۲٪ و بسرعت در غلظت گلوکز بیشتر از ۸٪ کاهش می‌یابد.

در تحقیقی Zhu و همکاران (۲۰۰۶) بهینه‌سازی تولید آراشیدونیک اسید توسط مورتیرلا آلپینا M6 در کشت غیر مداوم خوراک‌دهی شده[۵۶] را مورد بررسی قرار دادند. نشان داده شد که گلوکز بسرعت در روزهای اولیه کشت مصرف می‌شود و در اواخر کشت این عمل به آرامی صورت می‌گیرد. این قارچ در دو روز اول کشت هنگامی‌که غلظت گلوکز ۳۰ گرم بر لیتر و ۵۰ گرم بر لیتر باشد با سرعت

[56]- Fed-batch cult ure

بیشتری نسبت به زمانی‌که غلظت گلوکز ۸۰ گرم بر لیتر، ۱۰۰ گرم بر لیتر و ۱۲۰ گرم بر لیتر باشد، رشد می‌کند و هر چه غلظت گلوکز اولیه بیشتر باشد، سرعت رشد قارچ کمتر است. هنگامی‌که غلظت گلوکز ۳۰ گرم بر لیتر، ۵۰ گرم بر لیتر و ۸۰ گرم بر لیتر باشد، تولید توده زیستی به بیشترین مقدار خود به ترتیب در روز سوم، چهارم و نهم می‌رسد و پس از آن کاهش می‌یابد. هنگامی‌که غلظت گلوکز ۱۰۰ گرم بر لیتر و ۱۲۰ گرم بر لیتر است، مقدار کافی از گلوکز در محیط کشت وجود دارد و بنابراین توده زیستی در تمام دوره کشت افزایش می‌یابد که در اوایل کشت با سرعت زیاد و در اواخرکشت با سرعت کم صورت می‌گیرد. اگرچه این قارچ در غلظت‌های گلوکز کم با سرعت بیشتری در اوایل دوره کشت رشد می‌کند، با این حال بیشترین میزان توده زیستی (۲۲/۵ گرم بر لیتر) در غلظت گلوکز اولیه ۱۲۰ گرم بر لیتر بدست می‌آید.

Economou و همکاران (۲۰۱۰) به تولید روغن تک یاخته از سورگوم شیرین با استفاده از تخمیر با حالت نیمه جامد پرداختند. میکروارگانیسم مورد استفاده در این مطالعه، مورتیرلا ایزابلینا بوده است که قادر به تبدیل قند به لیپید ذخیره ای بوده است. میکروارگانیسم مد نظر به طور همزمان قند و نیتروژن موجود در سورگوم را مصرف نموده و بعد از تمام شدن منبع نیتروژن، رشد بیومس کامل شده و تجمع روغن شروع گردیده است. بالاترین کارایی تشکیل روغن در رطوبت ۹۲٪ بوده که برابر با ۱۱ گرم روغن به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک سوبسترا می باشد. این محققین اعلام نمودند که تخمیر در حالت نیمه جامد در مقایسه با روش مایع یا روش تخمیر کاملاً جامد دارای مزایایی بوده و روغنی با کیفیت بالاتر را تولید می نماید.

Matsaks و همکاران در سال ۲۰۱۵ به تولید روغن تک یاخته با استفاده از میکروارگانیسم رودوسپیریدوم تورولوئیدس و ساقه های سورگوم خشک شده پرداختند. در این مطالعه سورگوم با استفاده از آنزیم های ساکاریفیکاسیون تبدیل به شربت مایع شد که میزان تولید روغن تک یاخته از آن ها ۱۳/۷۷ گرم در لیتر بوده است. که این محققین اعلام نمودند که این میزان از تولید روغن تک یاخته از یک ماده خام تجدیدپذیر استفاده شده، یکی از بالاترین میزان های گزارش شده بوده است.

Enshaeieh و همکاران در سال ۲۰۱۵ نیز به تولید روغن تک یاخته با استفاده از میکروارگانیسم رودوتورولا موسیلاژینوزا پرداختند. در این مطالعه ابتدا از ۱۳۸ جدایه از مخمر مورد بررسی قرار گرفتند که ۳۵ تای آن ها قادر به تولید لیپید بوده اند. بعد از استخراج لیپید، بهترین گونه انتخاب گردید که با استفاده از روش PCR شناسایی شد که گونه رودتورولا موسیلاژینوز بود. میزان روغن در این گونه در محیط های کشت شامل ساقه ذرت و ساقه گندم به ترتیب نیز برابر ۳۶/۹ و ۴۱/۸ درصد بوده است.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱- مواد شیمیایی و تجهیزات

مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق که از شرکت مرک آلمان تهیه شدند، عبارتند از: پودر آب پنیر، نانو پودر اکسید منیزیم (MgO،99+٪،20nm)، گلوکز تک آبه، لاکتوز تک آبه، عصاره مخمر، پپتون، مالت آگار، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۳ آبه، کلرید کلسیم ۲ آبه، سولفات منیزیم ۷ آبه، اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال، ان- هگزان، متانول، سود، سولفوریک اسید، محیط کشت PDA، ساکاروز، پپتون، اسیدلاکتیک ۹۰٪، K_2SO_4، $MgSO_4$، KH_2PO_4، $(NH_4)_2SO_4$، NaH_2PO_4.

همچنین سویای سبحان بدون چربی از فروشگاهی در سطح شهر تهران تهیه شد و پس از خرد و الک کردن مورد استفاده قرار گرفت.

تجهیزات مورد استفاده عبارتند از:

۱) آون مدل Memmert ساخت شرکت آلمان

۲) انکوباتور مجهز به سامانه همزن ساخت شرکت Pars Azma co(1597) ساخت کشور ایران

۳) اتوکلاو مدل RT-21 (۷۵ لیتری) ساخت شرکت ریحان طب کشور ایران

۴) دستگاه اولتراسوند Elmasonic E 30/H ساخت کشور آلمان

۵) دستگاه کروماتوگرافی گازی Unicam 4600 ساخت کشور انگلستان

۶) ترازو Jewelry balnce FX300 GD ساخت کشور ژاپن

۷) دستگاه pH متر Metrohm ساخت کشور سوئیس

۸) مخلوط‌کن Black & Decker ساخت کشور انگلستان

۹) سانتریفیوژ Eppendorf 5810 ساخت کشور آلمان

۱۰) هاون آزمایشگاهی

۳-۲- روش نگهداری میکروارگانیسم‌ها

در این تحقیق از قارچ *Mortierella alpine CBS 754.68* استفاده شد. پس از خریداری از مجموعه میکروبی کشور هلند[۵۷] بصورت میسلیوم در لوله آزمایش آگار شیب‌دار[۵۸]، روی محیط کشت مالت آگار در بشقابک[۵۹] و لوله آزمایش آگار شیب‌دار در درجه حرارت ۲۲°C و مدت زمان ۷ روز کشت داده شد و سپس در یخچال با درجه حرارت ۳°C نگهداری گردید. کشت مجدد ریزسازواره هر شش ماه یک بار برای حفظ فعالیت آن انجام شد.

۳-۳- مایه تلقیح و کشت‌های اصلی

از سوسپانسیون میسلیومی برای تلقیح کشت‌های اصلی استفاده شد (Zhu *et al.*, 2003). برای تهیه سوسپانسیون میسلیومی، ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت شامل گلوکز تک آبه (۳۰ گرم بر لیتر) و عصاره مخمر (۱۰ گرم بر لیتر) در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری تهیه شده و در درجه حرارت ۱۲۱°C و ۱۵ دقیقه سترون گردید. سپس به وسیله آنس سترون تلقیح و در درجه حرارت ۳۰°C به مدت ۴۸ ساعت و ۱۵۰ دور بر دقیقه[۶۰] گرمخانه‌گذاری گردید (Singh and Ward, 1997). پس از گرمخانه‌گذاری، محتویات ارلن، که شامل تعدادی کلونی گویچه‌ای بود، در یک بشر ۵۰۰ میلی لیتری سترون تخلیه کرده و توسط تیغه سترون مخلوط‌کن، به مدت ۵ دقیقه مخلوط کرده تا به راحتی توسط پیپت ۱۰ میلی لیتری قابل انتقال باشند. ۵٪ (۵ میلی لیتر) از حجم کشت‌های اصلی به عنوان مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفت. از ارلن‌های ۵۰۰ میلی لیتری که شامل ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت اصلی بود، استفاده شد. پس از تهیه کشت‌های اصلی، املاح سولفات منیزیم ۷ آبه (۰/۵ گرم بر

[57]- Centraalbureau voor Schimmelcultures
[58]- Slant agar
[59]- Petri dish
[60]- Revolution per minute (rpm)

لیتر)، کلرید کلسیم ۲ آبه (۰/۱ گرم بر لیتر) و دی پتاسیم هیدروژن سولفات ۳ آبه (۴ گرم بر لیتر) به تمامی ارلن‌ها افزوده شد. قبل از سترون کردن در اتوکلاو، pH محیط کشت توسط اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به ۷ رسانده شد (Zhu *et al.*, 2002; 2003).

۳-۴- تهیه محیط کشت توسعه تلقیح

محیطی شامل ۳۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۵/۲ گرم بر لیتر K_2SO_4، ۲/۰ گرم بر لیتر $MgSO_4$، ۵/۲ گرم بر لیتر KH_2PO_4، تهیه شد. محیط به ارلن بافل دار انتقال یافت و پس از استریل شدن در اتوکلاو، در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۵°C و با دور همزن ۴۰۰۰ rpm بمدت ۴ روز قرار گرفت. پس از دو روز توسط لوپ استریل از پلیت های حاوی مخمر نمونه در محیط تلقیح داده شد.

۳-۵- تهیه محیط کشت تولید محصول

محیطی شامل ۷۰ گرم بر لیترگلوکز، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲ گرم بر لیتر $(NH_4)_2SO_4$، ۳ گرم بر لیتر KH_2PO_4 و ۵/۱ گرم بر لیتر $MgSO_4$ تهیه شد. محیط به ارلن بافل دار منتقل و پس از استریل شدن در اتوکلاو، به میزان ۱۰-۳ درصد حجم محیط کشت به محیط تولید محصول اضافه گردید، سپس در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸°C و با دور همزن ۴۰۰۰ rpm به مدت ۴ روز قرار گرفت.

۳-۶- استخراج توده زیستی

ارلن های حاوی توده زیستی پس از ۴ روز از انکوباتور شیکردار خارج و به لوله فالکون منتقل گردیدند. سپس به وسیله سانتریفوژ توده زیستی از آب حاوی محیط کشت جداسازی شد.

۳-۷- اندازه‌گیری وزن خشک سلولی

جهت اندازه‌گیری وزن خشک سلولی[۶۱]، توده های سلولی را بر روی شیشه ساعت قرار داده و به مدت ۲ ساعت در آون با درجه حرارت ۱۰۵°C خشک گردید (Sakuradani *et al.*, 2004).

۳-۸- استخراج لیپید

کوچک شدن اندازه ذرات میسلیوم برای استخراج لیپیدها الزامی است. بنابراین با استفاده از هاون آزمایشگاهی توده میسلیومی خشک شده را آسیاب و به یک لوله آزمایش اضافه کرده و در نهایت، ۳ میلی لیتر حلال ان-هگزان به آن افزوده شد (Folsch *et al.*, 1957).

به منظور حداکثر بازده استخراج، لوله‌های آزمایش در دستگاه اولتراسوند به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند

(Jang *et al.*, 2005) و سپس به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور بر دقیقه) شدند. در مرحله بعد سوپرناتانت شامل لیپید و حلال ان-هگزان به یک لوله آزمایش تخلیه شده و توسط گاز نیتروژن، حلال آن تبخیر گردید. گاز نیتروژن یک گاز بی اثر بوده و از اکسیداسیون لیپید جلوگیری می‌کند.

۳-۹- مشتق‌سازی اسیدهای چرب

برای تعیین و اندازه‌گیری اسیدهای چرب، ابتدا باید چربی به اسیدهای چرب و گلیسرول تجزیه شود. سپس توسط عمل مشتق‌سازی، متیله شده و به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق گردد. با توجه به عدم فراریت اسیدهای چرب بایستی مشتق‌های متیل استر آن ها را تهیه نمود. مشتق‌سازی اسیدهای چرب به روش Metcalf و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. بدین منظور، ۵ میلی لیتر محلول سود متانولی ۲٪ به همراه یک میلی لیتر استاندارد داخلی پنتادوکونوئیک اسید (۲ میلی گرم بر میلی لیتر) به لوله‌های آزمایش درب دار حاوی لیپید افزوده و پس از اختلاط به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس لوله‌های آزمایش به وسیله آب خنک شدند. در مرحله بعد، ۲/۱۷۵ میلی لیتر محلول

[61]- Dry cell weight (DCW)

تری فلور بورات به لوله‌های آزمایش افزوده و پس از مخلوط سازی به مدت ۳ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شدند. پس از خنک شدن لوله‌ها، ۱ میلی لیتر حلال ان-هگزان و ۱ میلی لیتر محلول نمک اشباع به لوله‌های آزمایش اضافه و به شدت مخلوط شدند. پس از گذشت چند ثانیه، محلول موجود در لوله‌های آزمایش به دو فاز تفکیک شد. فاز بالایی که شامل اسیدهای چرب متیله شده و حلال بود، توسط سمپلر در یک میکروتیوب تخلیه گردید و مقداری از حلال آن به منظور تغلیظ توسط گاز نیتروژن تبخیر گردید. میکروتیوب‌ها تا زمان تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی در یخچال (۴ $^{\circ}C$) نگهداری شدند.

۳-۱۰- تعیین و اندازه‌گیری اسیدهای چرب

بدین منظور، از یک دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای[۶۲] (Unicam 4600, England) و روش Metcalf و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد. نوع اسید چرب براساس مقایسه زمان بازداری[۶۳] آن با زمان بازداری استاندارد پنتادوکونوئیک اسید تعیین گردید. همچنین مقدار هر اسید چرب براساس روش استاندارد داخلی اندازه‌گیری شد. گاز نیتروژن به‌عنوان گاز حامل استفاده شده و ستون مورد استفاده از نوع موئین[۶۴] به طول ۳۰ متر، قطر خارجی ۰/۲۵ میلی متر، قطر داخلی ۰/۲۲ میکرومتر و جنس Fused Silica بوده است. حجم تزریق نمونه برابر با ۰/۲ میکرولیتر بوده و برنامه دمایی اعمال شده نیز به صورت زیر بوده است:

- دمای اولیه ستون ۱۶۰ $^{\circ}C$ به مدت ۶ دقیقه،
- افزایش دمای ستون با سرعت ۲۰ $^{\circ}C$ در دقیقه تا رسیدن به دمای ۱۸۰ $^{\circ}C$ به مدت ۹ دقیقه،
- افزایش دمای ستون با سرعت ۲۰ $^{\circ}C$ در دقیقه تا رسیدن به دمای ۱۹۰ $^{\circ}C$ به مدت ۲۵ دقیقه،
- دمای آشکارساز ۳۰۰ $^{\circ}C$ و دمای محل تزریق ۲۵۰ $^{\circ}C$.

---

[62]- Flame ionization detector (FID)
[63]- Retention time
[64]- Capillary BPX70

در نهایت، میزان اسیدهای چرب (میلی گرم بر گرم) به وسیله رابطه زیر محاسبه گردید:

$$E = \frac{A \times \left(\frac{B}{C}\right)}{D}$$

A= مساحت پیک مجهول

B= غلظت استاندارد داخلی

C= مساحت پیک استاندارد داخلی

D= وزن نمونه (گرم)

E= مقدار اسید چرب

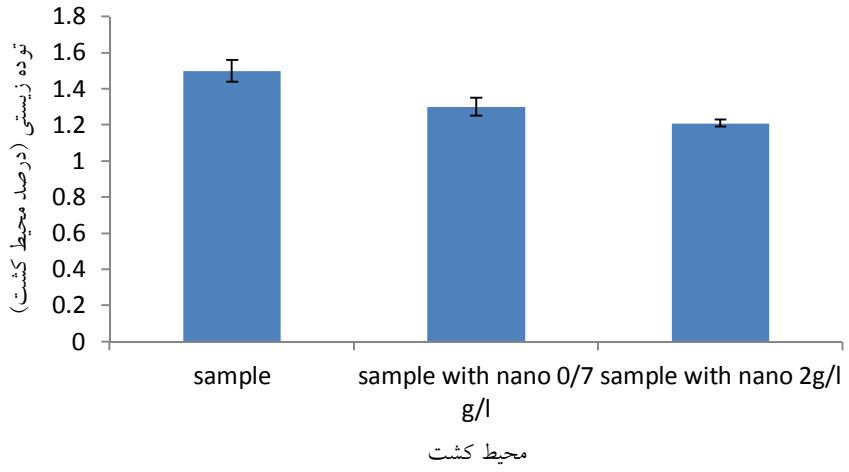
فصل چهارم

نتایج و بحث

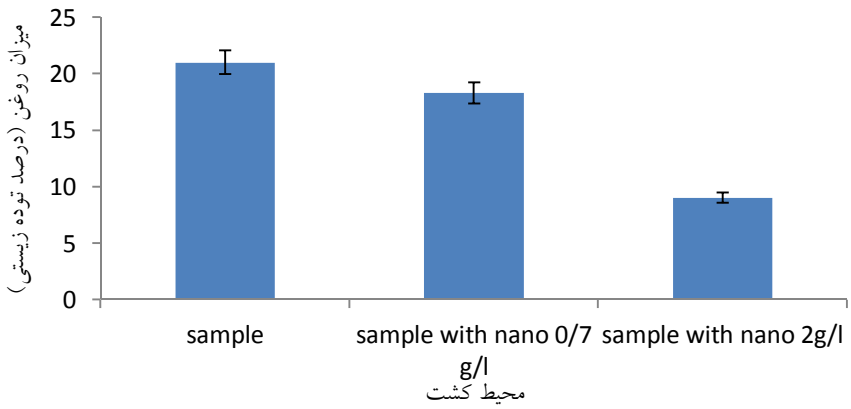
فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- بررسی تأثیر نانو ذرات منیزیم بر میزان تولید توده زیستی و روغن

در این مرحله از تولید روغن از گونه *Mortierella alpine* ۰/۷ گرم در لیتر و ۲ گرم در لیتر نانو ذره منیزیم به محیط کشت فرموله شده اضافه شد. نتایج نشان داد در شرایطی که ۲ گرم در لیتر نانو ذره استفاده شد میزان وزن خشک توده زیستی ۱/۲۱ درصد محیط کشت و میزان روغن ۹٪ ماده خشک توده زیستی تولید شد و از نمونه شاهد بدون نانو ذره کمتر بود در نمونه شاهد ۱/۵ درصد توده خشک زیستی و میزان روغن ۲۱٪ توده زیستی بدست آمد. میزان بازدارندگی رشد در شرایطی که ۲ گرم در لیتر نانو ذره استفاده شده ٪۲۰ بدست آمد. از این رو سطح نانو ذره به ۰/۷ گرم در لیتر کاهش یافت میزان توده زیستی ۱/۳ درصد محیط کشت و میزان روغن ۱۸/۳ درصد محیط کشت بدست آمد. در این شرایط میزان بازدارندگی رشد به سطح ٪۱۳ کاهش یافت و همچنان نانو ذره اثر بازدارندگی در تولید روغن داشت.



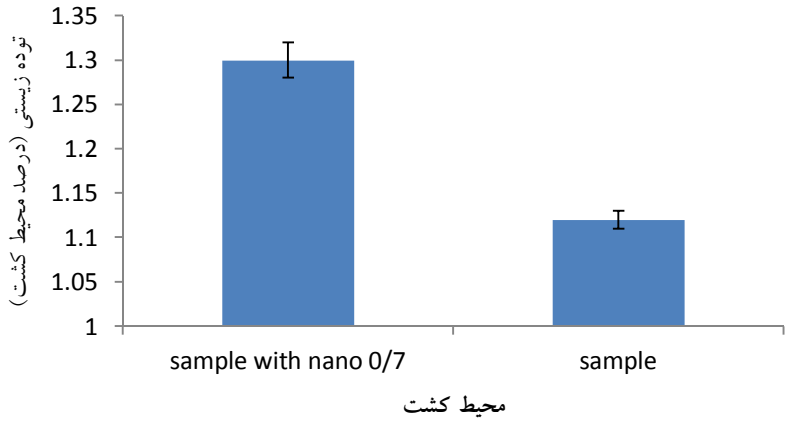
شکل ۴-۱- میزان وزن خشک توده زیستی در نمونه های با سطوح مختلف نانو ذره منیزیم



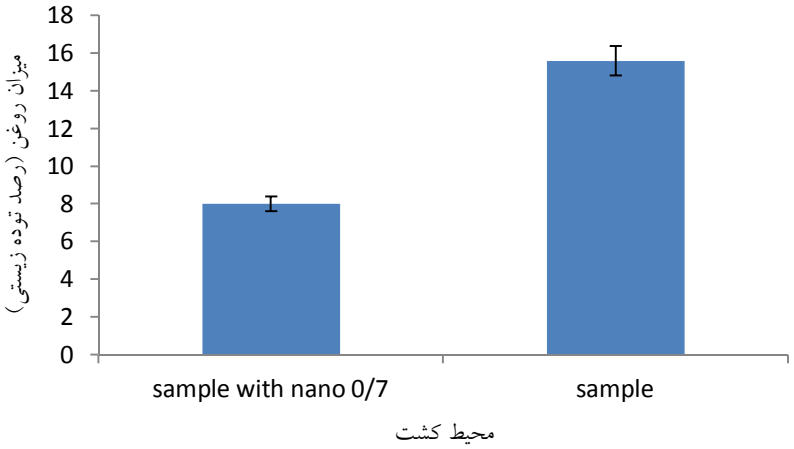
شکل ۴-۲- میزان روغن در نمونه های با سطوح مختلف نانو ذره منیزیم

برای بررسی بیشتر، عناصر معدنی از محیط کشت حذف شد در این شرایط میزان روغن و توده زیستی در نمونه شاهد کاهش یافته و به سطح ۱/۴ درصد محیط کشت رسید در عین حال تولید روغن نیز کاهش یافته و به سطح ۱۶٪ توده زیستی رسید. برای بررسی تأثیر نانو ذره در محیط کشت فاقد عناصر معدنی سطح ۰/۷ گرم در لیتر نانو ذره استفاده شد که تأثیر مثبتی در تولید توده زیستی نسبت به نمونه شاهد داشت. نانو ذره منیزیم در سطح ۰/۷ گرم در لیتر به صورت قابل توجهی باعث کاهش روغن به سطح ۸٪ شد. با توجه به موارد بیان شده می توان گفت که افزودن نانو ذره منیزیم می تواند سبب کاهش وزن خشک سلولی و روغن تولید شده گردد. در تحقیقی Choi et al. (2008) بیان داشتند که افزودن نانو ذره نقره می تواند به طور معنی داری سبب کاهش رشد میکروارگانیسم های مختلف از جمله اشرشیا کلی گردد. این محققین بیان داشتند که افزودن نانو ذره نقره، یون های نقره و نقره کلرید به ترتیب رشد اشرشیا کلی را به میزان ۵۵، ۱۰۰ و ۶۶ درصد کاهش می دهد. این محققین بیان داشتند که نانو ذرات معمولا مانع تشکیل غشای یکپارچه شده و از این طریق مانع رشد ارگانیسم ها می گردند. در تحقیقی دیگر Williams et al. (2006) به بررسی اثر نانو ذرات مختلف روی وزن خشک سلولی باکتری اشریشیا کلی پرداختند این محققین نتیجه مشابه با تحقیق حاضر را گزارش نمودند به طوری که بیان داشتند افزودن نانو ذرات نقره و آهن و طلا به طور معنی داری سبب

کاهش وزن خشک سلولی می گردد که این محققین نیز عدم تشکیل غشای یکپارچه را عامل کاهش رشد و در نتیجه کاهش وزن خشک سلولی گزارش نمودند.



شکل ۴-۳- میزان وزن خشک توده زیستی در محیط کشت فاقد عناصر معدنی با و بدون نانو ذره

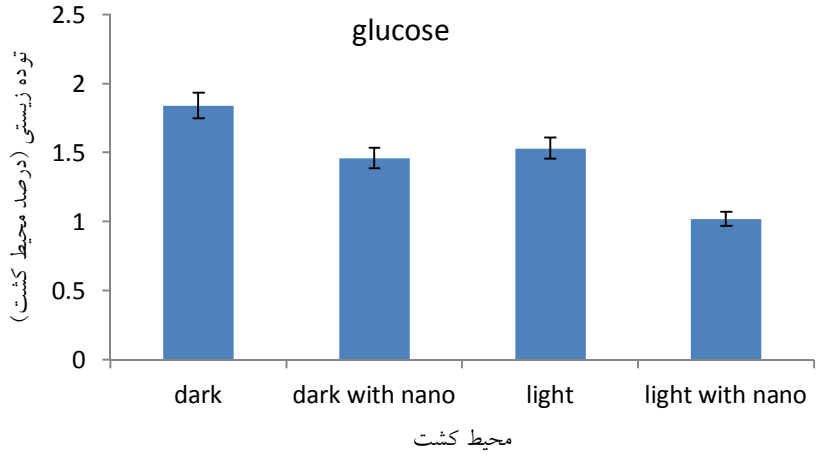


شکل ۴-۴- میزان وزن روغن تولیدی در محیط کشت فاقد عناصر معدنی با و بدون نانو ذره

۴-۲- بررسی اثر نور و نانو ذره بر تولید روغن و توده زیستی در محیط کشت تعریف شده

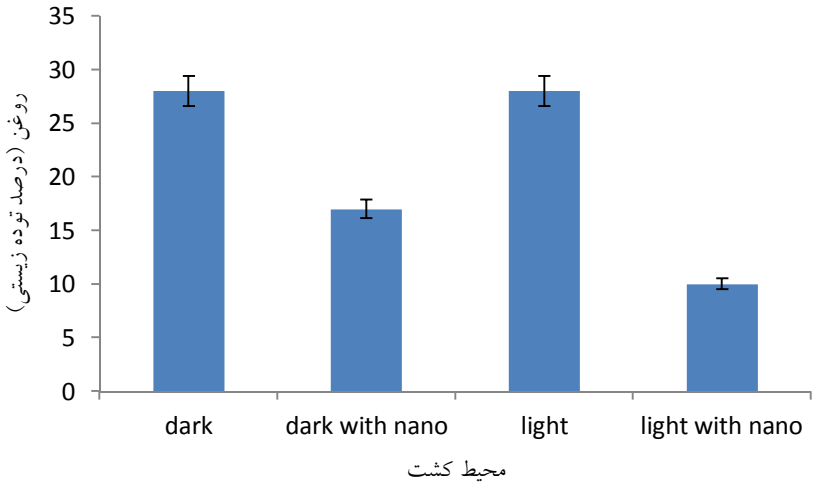
در این مرحله از تحقیق محیط کشت بهینه تولید روغن در مجاورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی قرار گرفته و میزان توده زیستی و روغن در نمونه ها بررسی شد. نتایج نشان داد که نور تأثیر

منفی در تولید روغن و توده زیستی داشت به طوری که نمونه ای که در مجاورت نور قرار داشت ۱/۵۳ درصد محیط کشت توده زیستی تولید کرد در حالیکه این میزان در شرایط تاریکی ۱/۸۴ درصد توده زیستی بود. حضور نور در نمونه های حاوی نانو ذره منیزیم در سطح ۰/۰۵ میلی گرم بیشترین تأثیر را در کاهش توده زیستی داشت به طوری که میزان توده زیستی به سطح ۱/۰۲ درصد محیط کشت رسید که نسبت به نمونه شاهد ۴۴٪ اثر بازدارندگی در تولید توده زیستی داشت که چنین نتیجه می شود اثر بازدارندگی نانو ذره در حضور نور به شدت افزایش می یابد. در نمونه های حاوی نانو ذره که در تاریکی تخمیر شده نیز نسبت به نمونه شاهد اثر منفی در تولید توده زیستی مشاهده شد و میزان بازدارندگی به سطح ۲۰٪ رسید. کاهش توده سلولی احتمالا به دلیل کاهش جذب سوبسترا در مقابل نور می باشد که مشاهدات در دیگر قارچ ها این فرضیه را حمایت می کند. در واقع پاسخ به نور می تواند مسیر رشد را به سمتی منحرف کند که آنزیم ها و متابولیت هایی که برای محافظت قارچ در مقابل آسیب ضروری است تولید شود (Herrera-Estrella and Horwitz, 2007). فعالیت یا مقدار بسیاری از آنزیم های تجزیه کننده داخل سلولی وابسته به نور گزارش شده است. مثلا فعالیت گلوگزآمیلاز میسلیوم های در معرض نور آسپرژیلوس نیجر در مقایسه با میسلیوم ها در تاریکی ۲/۵ برابر افزایش می یابد (Tisch and Schmoll, 2010).



شکل ۴-۵- بررسی میزان توده زیستی تولیدی تحت تأثیر واکنش نوری

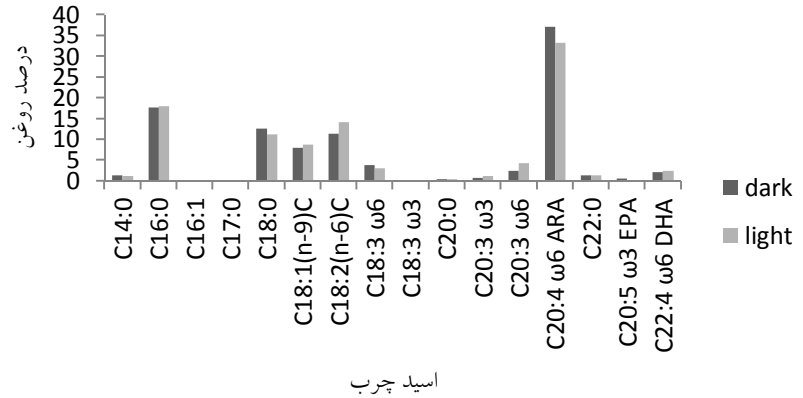
میزان روغن در هر دو نمونه که تحت تأثیر نور و تاریکی بود حاوی ۲۸٪ روغن در وزن خشک توده زیستی شد. چنین تحلیل می شود که نور تأثیری در تولید روغن در این گونه قارچی نداشته است. نمونه های حاوی نانو ذره منیزیم که در تاریکی و روشنایی قرار داشت نسبت به نمونه ی شاهد، کاهش میزان روغن را داشت. میزان روغن در نمونه حاوی نانو ذره که در مجاورت نور قرار داشت به سطح ۱۰٪ رسید که کمترین میزان روغن در نمونه ها بود. در عین حال میزان روغن در نمونه ای که حاوی نانو ذره بود و در تاریکی تخمیر شد حاوی ۱۷٪ روغن بود که نتایج اثر بازدارندگی نانو ذره در تولید روغن به ویژه در مجاورت نور را نشان می دهد. در حالی که در برخی تحقیقات نشان داده شده است که با استفاده از نور میزان تولید روغن افزایش می یابد (Tisch and Schmoll, 2010)، اما در مطالعه حاضر نور سبب افزایش تولید روغن نشده است، که این می تواند مربوط به آغاز تغییر مسیر متابولیکی به منظور اسپورزایی در حضور نور باشد (Benny, 2004).



شکل ۴-۶- بررسی میزان روغن تولیدی تحت تأثیر واکنش نوری

۴-۳- بررسی پروفایل اسید چرب

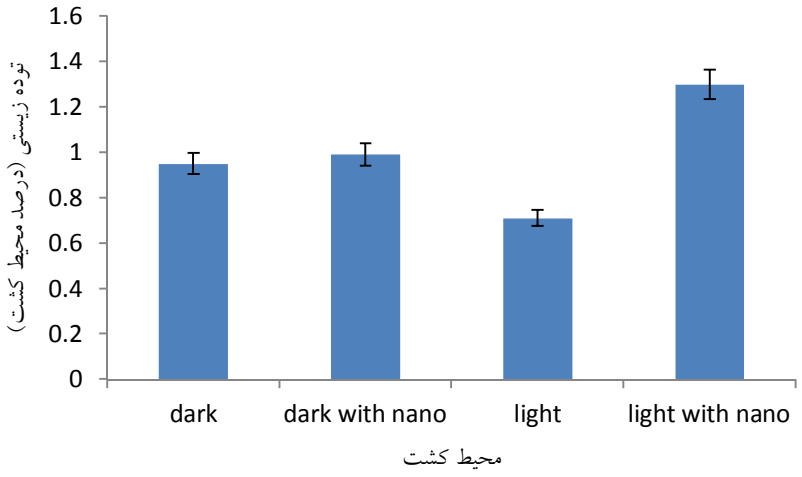
نتایج نشان داد که نور بر میزان اسید چرب آراشیدونیک اسید تأثیر منفی داشته به طوریکه نور باعث شده میزان اسید چرب آراشیدونیک اسید ۴٪ کاهش یابد. نور محرک تولید DHA و همچنین C20:3 شد. همانطور که مشاهده می شود میزان آراشیدونیک اسید در حضور نور به طور معنی داری کاهش یافته است. با توجه به اینکه تولید لیپید در مرحله سکون اتفاق می افتد می توان بیان داشت که نور سبب تغییر فاز رشد از مرحله رشد رویشی به رشد زایشی و در نتیجه کاهش فاز سکون و تولید لیپید می گردد (Lounds et al., 2007).



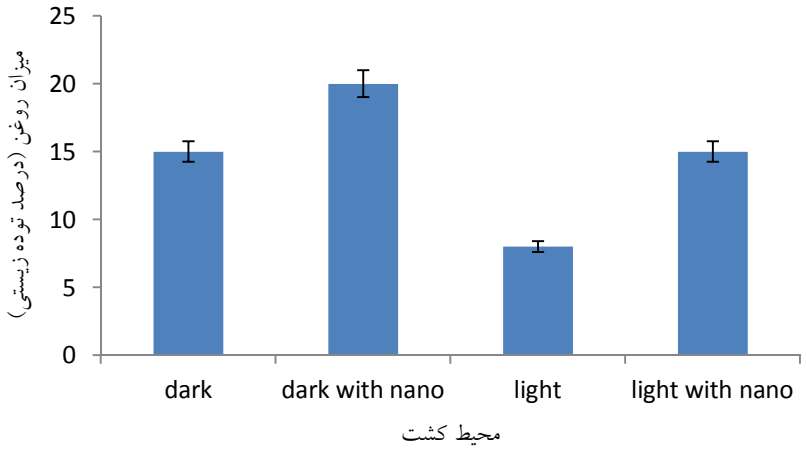
شکل ۴-۷- پروفایل اسیدهای چرب

۴-۴- بررسی اثر نور و نانو ذره بر تولید روغن و توده زیستی در محیط کشت آب پنیر

در این مرحله از تحقیق پودر آب پنیر به عنوان منبع کربنی و نیتروژنی در سطح ۱۰۰ گرم در لیتر استفاده شد. میزان وزن خشک توده زیستی ۰/۹۵ درصد محیط کشت بدست آمد و ۱۵٪ روغن تولیدی در این محیط کشت تخمیر شده در تاریکی بود. نمونه حاوی نانو در سطح ۰/۰۵ گرم در لیتر محرک تولید توده زیستی و روغن بود. میزان توده زیستی به سطح ۰/۹۹ درصد رسید که ۰/۰۵ درصد افزایش توده زیستی مشاهد شد. میزان روغن به سطح ۲۰٪ محیط کشت افزایش یافت که ۵٪ افزایش روغن مشاهده شد. این دو نمونه در مجاورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی قرار گرفت که در این شرایط در نمونه حاوی نانو ذره، نور محرک تولید توده زیستی بوده که میزان توده زیستی ۱/۴ درصد افزایش نشان داد در حالیکه تأثیر منفی در تولید روغن داشت و میزان تولید روغن به ۱۵٪ کاهش یافت. عامل نور در محیط کشت شاهد که فاقد نانو ذره می باشد باعث شد که هم تولید توده زیستی (۰/۷۱ درصد محیط کشت) و هم روغن (۸ درصد توده زیستی) کاهش یابد.



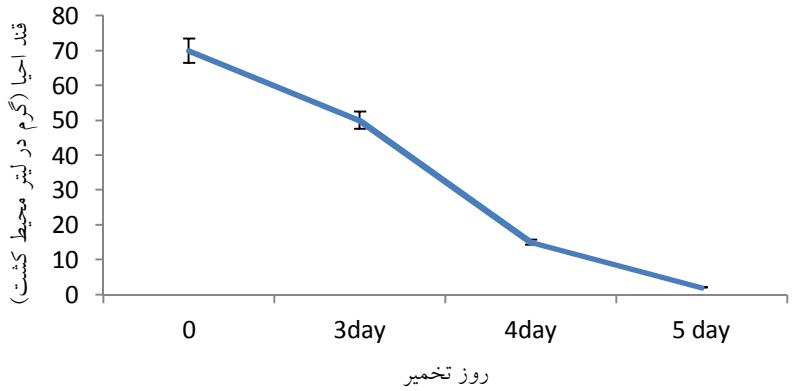
شکل ۴-۸- بررسی میزان توده زیستی تولیدی تحت تأثیر واکنش نوری و نانو ذره منیزیم



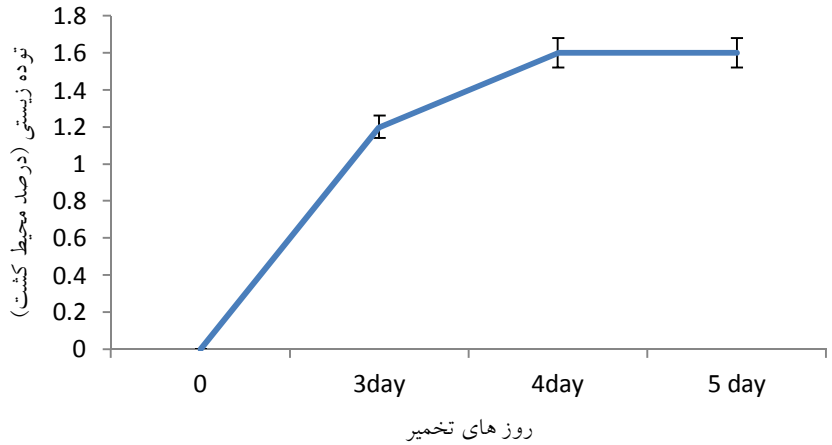
شکل ۴-۹- بررسی میزان تولید روغن تحت تأثیر واکنش نوری و نانو ذره منیزیم

۴-۵- بررسی تغییرات میزان توده زیستی در محیط کشت نیتروژن آلی

بیشترین میزان افزایش توده زیستی تا روز سوم تخمیر می باشد که میزان توده زیستی به سطح ۰/۹ درصد محیط کشت رسید از روز سوم به چهارم روند رشد متوقف شد و به سطح ۱٪ محیط کشت رسید از روز چهارم به بعد روند کاهشی توده زیستی مشاهده شد. روند کاهش گلوکز چنین نشان می دهد که گلوکز در روز پنجم به سطح ۵ میلی گرم در لیتر کاهش می یابد روند کاهش گلوکز با تجمع توده زیستی همزمان می باشد. علاوه بر منابع کربنی که در بالا اشاره شد، ضایعات مختلفی مانند سبوس برنج، سبوس گندم، ضایعات سیب زمینی، تفاله سیب، ملاس، آب پنیر، نشاسته سیب زمینی، کاه و کلش برنج بطور موفقیت آمیزی به‌عنوان سوبسترا برای تولید لیپید استفاده شده است. اگرچه ترکیب لیپید بصورت گسترده‌ای بسته به نوع سوبسترا تغییر می‌کند (Ahmed *et al.*, 2006; Stredansky *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2000). در تحقیقی دیگر Dyal and Narine (2005) از پروتئین آب پنیر به عنوان محیط کشت برای تولید روغن توسط قارچ مورتیرلا استفاده کردند نتایج بررسی این محققین نشان داد که این محیط می تواند بعنوان یک محیط بالقوه برای کشت و تولید روغن توسط این قارچ مطرح باشد.



شکل ۴-۱۰- میزان مصرف قند احیا در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی

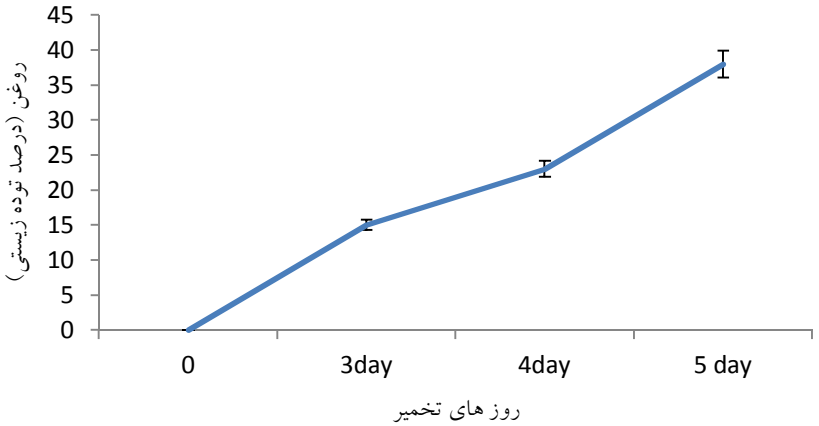


شکل ۴-۱۱- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی

۴-۶- بررسی تغییرات میزان روغن در محیط کشت نیتروژن آلی

نتایج نشان داد که در محیط کشت تعریف شده حاوی گلوکز به عنوان منبع کربنی و پودر سویا به عنوان منبع پروتئینی، بیشترین میزان افزایش روغن از روز سوم به چهارم بود که میزان روغن در وزن خشک توده زیستی از ۲۳٪ به ۳۸٪ افزایش یافت. از روز دوم تخمیر تا روز سوم روند افزایش روغن کند بوده و در این مدت میزان قابل توجهی توده زیستی تولید شد. در تحقیقی Park et al. (1999)

منابع مختلف نیتروژنی مانند عصاره مخمر، کنجاله سویا، شربت ذرت خیسانده[۶۵]، فارمامدیا[۶۶]، پروتئین ماهی و پروتئین گلوتن و تأثیر آنها را بر تولید آراشیدونیک اسید و ریخت‌شناسی میسلیومی مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند گویچه‌های نرم و صاف[۶۷] (یا گویچه‌های کروی[۶۸]) هنگامی‌که از عصاره مخمر، پروتئین گلوتن یا شربت ذرت خیسانده استفاده شود، بدست می‌آیند و گویچه‌های کرکی[۶۹] (یا گویچه‌های پر مانند، ریخت‌شناسی شعاعی) هنگامی‌که از کنجاله سویا، فارمامدیا یا پروتئین ماهی استفاده می‌شود، بدست می‌آیند. در اکثر نتایج بدست آمده از ارتباط بین تولید آراشیدونیک اسید و نوع ریخت‌شناسی، پیشنهاد شده است که ریخت‌شناسی گویچه‌ای کرکی برای تولید آراشیدونیک اسید نسبت به ریخت‌شناسی گویچه‌ای نرم و صاف، مناسب‌تر است. همچنین در تحقیقی دیگر Parker et al. (2000) گزارش نمودند که پودر سویا یک منبع نیتروژنی با ارزش در تولید روغن توسط قارچ ها می باشد. این نتیجه می تواند به این دلیل باشد که پروتئین سویا یک منبع نیتروژنی بوده و به آهستگی توسط میکروارگانیسم مصرف می شود و در نتیجه سبب افزایش تولید روغن می گردد.

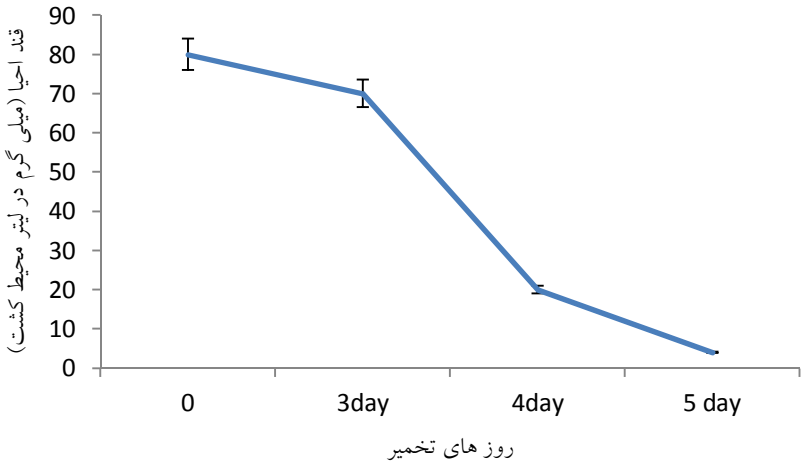


شکل ۴-۱۲- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی

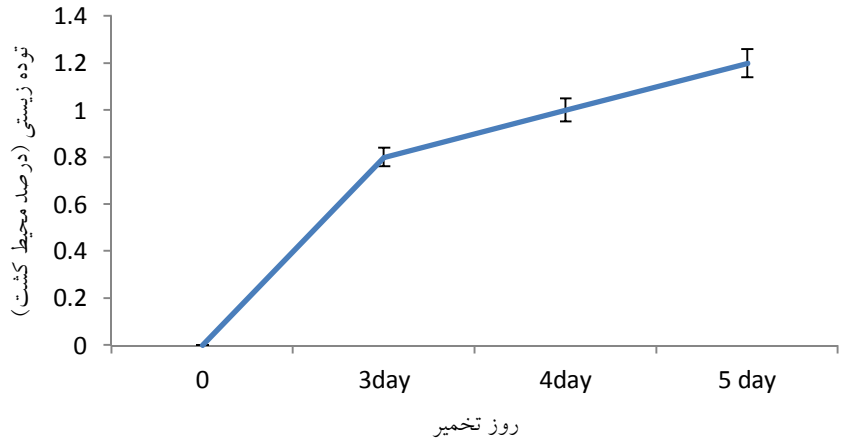
[65]- Corn steep liquor (CSL)
[66]- Pharmamedia
[67]- Smooth pellets
[68]- Circullar pellets
[69]- Fluffy pellets

۴-۷- بررسی تغییرات میزان توده زیستی در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم

در این مرحله از تحقیق تأثیر نانو ذره منیزیم در سطح ۰/۰۵ گرم در لیتر بر میزان تولید توده زیستی در حین فرایند تخمیر بررسی شد. نانو ذره باعث کاهش سرعت روند افزایش توده زیستی شد و برخلاف نمونه شاهد، افزایش توده زیستی در اواخر فرایند تخمیر اتفاق افتاد به طوری که به سطح ۱٪ محیط کشت رسید و افزایش توده زیستی از روز سوم به چهارم به میزان قابل توجهی افزایش یافت. روند این افزایش از روز دوم به سوم بسیار کند بود.



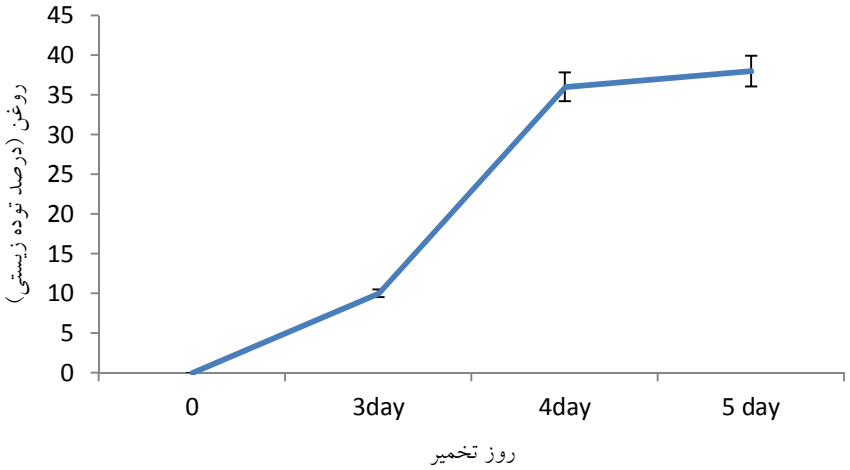
شکل ۴-۱۳- میزان مصرف قند احیا در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم



شکل ۴-۱۴- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم

۴-۸- بررسی تغییرات میزان روغن در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم

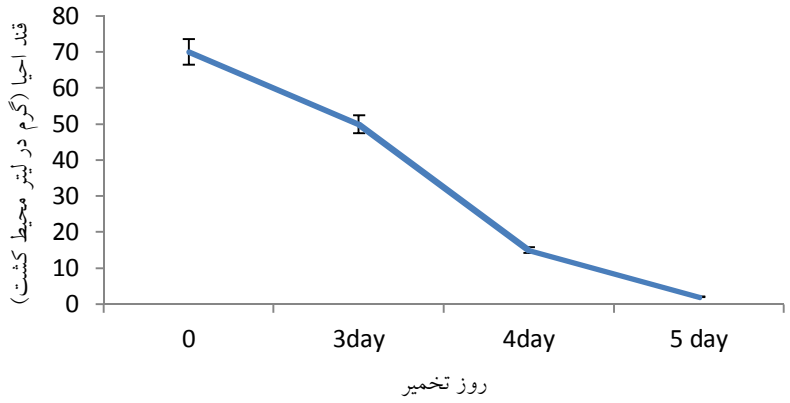
روند افزایش میزان روغن در این محیط کشت به طور قابل توجهی از روز اول تخمیر تا روز سوم بالا بوده به طوری که میزان روغن در توده زیستی به سطح ۳۶٪ وزن خشک توده زیستی رسید. از روز سوم به چهارم این روند بسیار کند بوده و به سطح ۴۰٪ توده زیستی رسید در این شرایط تولید توده زیستی به صورت قابل توجهی افزایش یافت.



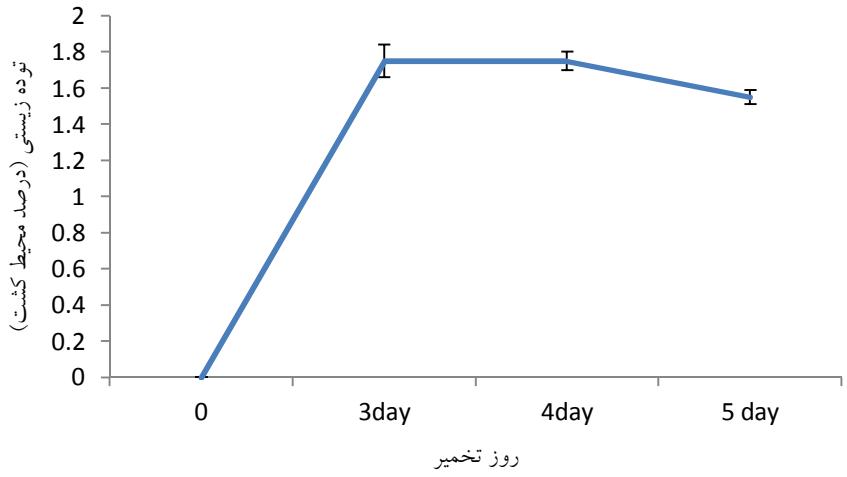
شکل ۴-۱۵- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم

۴-۹- بررسی تغییرات توده زیستی در محیط کشت نیتروژن معدنی بدون نانو ذره

رشد در روز دوم تخمیر به حداکثر مقدار خود یعنی ۱/۷۵ درصد محیط کشت رسید، سپس روند رشد متوقف شده و از روز سوم به چهارم روند کاهشی توده زیستی مشاهده شد. از روز دوم به سوم تغییرات توده زیستی مشاهده نشد که نشان دهنده رسیدن به فاز سکون ریزسازواره می باشد. Jang et al., (2005) در تحقیقی به بررسی تأثیر محیط کشت و شرایط کشت روی تولید آراشیدونیک اسید به وسیله قارچ مورتیرلا پرداختند این محققین بیان داشتند که بهترین منبع نیتروژنی معدنی در تولید روغن توسط این قارچ پتاسیم نیترات می باشد. Jin et al., (2009) در تحقیقی به بررسی تولید روغن توسط قارچ مورتیرلا آلپینا پرداختند. این محققین از نیتروژن های معدنی بعنوان منبع ازت استفاده کردند. نتایج بررسی این محققین نشان داد که میزان مصرف قند احیاء رابطه عکس با میزان توده زیستی دارد به طوری که با افزایش مصرف قندهای احیا مثل گلوکز میزان توده زیستی افزایش می یابد. اما با ادامه مصرف قندهای احیا توده زیستی تغییری نمی کند که نشان دهنده ورود به فاز سکون و تولید روغن می باشد. همچنین نتایج این محققین نشان داد زمانی که غلظت مصرف قند های احیاء پس از طی چند روز به میزان خاصی کاهش می یابد غلظت توده سلولی نیز کاهش می یابد که نشان دهنده ورود سلول ها به فاز مرگ می باشد.



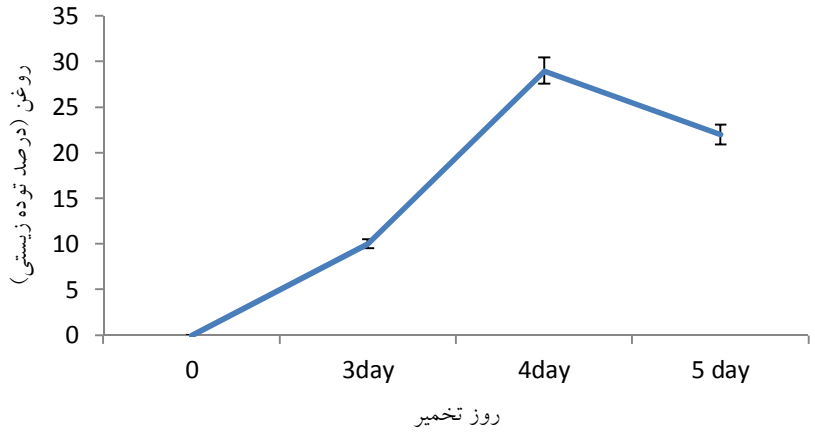
شکل ۴-۱۶- میزان مصرف قند احیا در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی بدون نانو ذره



شکل ۴-۱۷- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی بدون نانو ذره

۴-۱۰- بررسی تغییرات میزان روغن در محیط کشت نیتروژن معدنی بدون نانو ذره

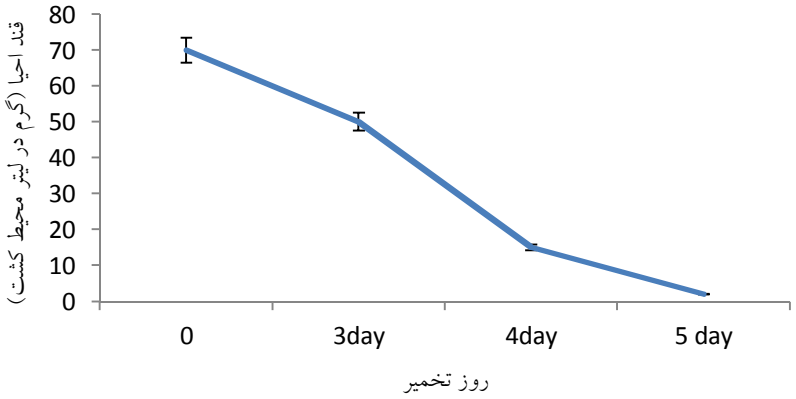
بیشترین افزایش روغن در شرایطی است که از روز دوم به سوم و زمان توقف رشد می باشد در این شرایط میزان تولید روغن به حداکثر میزان خود رسید و حداکثر میزان روغن در روز سوم مشاهده شد که به سطح ۲۹٪ روغن در توده خشک قارچ رسید از روز سوم تا روز چهارم روند کاهشی روغن مشاهده شد که نشان دهنده مصرف روغن توسط گونه قارچی می باشد. با درنظر گرفتن کاهش توده زیستی و روغن از روز سوم به چهارم نشان دهنده این واقعیت است که گونه قارچی در فاز مرگ قرار داشته و مواد مغذی محیط کشت تخلیه شده است. Jin et al., (2009) نیز در تحقیقات خود به نتایج مشابه دست یافتند این محققین نیز بیان داشتند که با ورود قارچ به فاز سکون (روز دوم به سوم در این تحقیق) میزان تولید روغن حداکثر خواهد شد که این امری طبیعی است چرا که روغن بعنوان یک متابولیت ثانویه مطرح بوده و در نتیجه بیشترین مقدار آن در فاز سکون تولید خواهد شد.



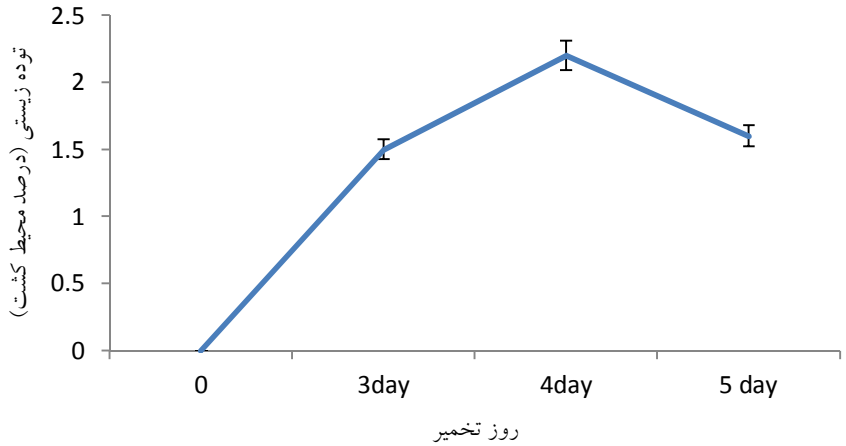
شکل ۴-۱۸- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی بدون نانو ذره

۴-۱۱- بررسی تغییرات توده زیستی در محیط کشت نیتروژن معدنی حاوی نانو ذره

حداکثر رشد از روز دوم به سوم رشد مشاهده شد که نشان دهنده این واقعیت می باشد که قارچ در مرحله فاز رشد می باشد از روز سوم به چهارم میزان توده زیستی کاهش قابل توجهی می یابد که نشان دهنده تجزیه بافت و فاز مرگ ریزسازواره می باشد. حضور نانو ذره نشان داد که سرعت رشد و در عین حال سرعت تخریب توده زیستی نسبت به نمونه شاهد افزایش قابل توجهی یافت به طوری که در روز سوم بیشترین میزان توده زیستی به میزان ۲/۲ درصد محیط کشت رسید و همچنین سرعت تخریب توده زیستی به شدت در مرحله مرگ تقویت شد به طوری که میزان توده زیستی به ۱/۶ درصد محیط کشت کاهش یافت.



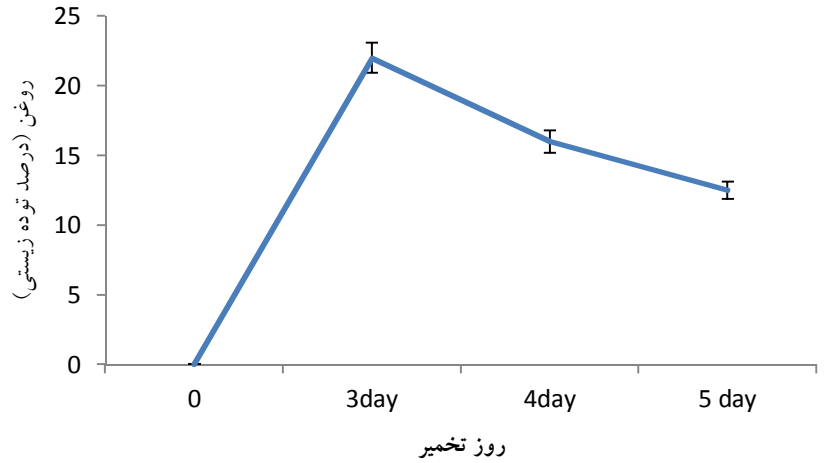
شکل ۴-۱۹- میزان مصرف قند احیا در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی حاوی نانو ذره



شکل ۴-۲۰- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی حاوی نانو ذره

۴-۱۲- بررسی تغییرات روغن در محیط کشت نیتروژن معدنی حاوی نانو ذره

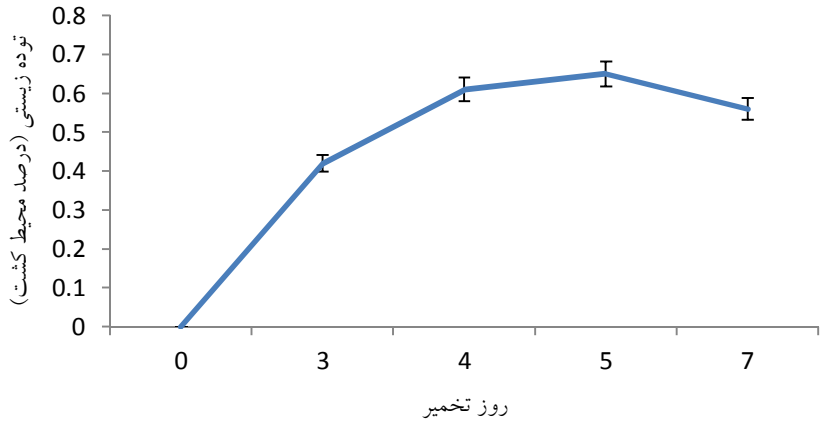
نتایج نشان داد که روند تجمع روغن نسبت به نمونه فاقد نانو ذره تقویت شد به طوری که در روز دوم رشد حداکثر تجمع روغن به میزان ۲۲٪ وزن خشک توده زیستی مشاهده شد و از روز دوم به بعد روند تجزیه روغن تجمعی مشاهده گردید که نشان دهنده این واقعیت بود که در عین حال اینکه نانو ذره سرعت تجمع روغن در این گونه قارچی تقویت کرده سرعت تخریب روغن نیز تقویت شده است.



شکل ۴-۲۱- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن معدنی حاوی نانو ذره

۴-۱۳- بررسی تغییرات توده زیستی در محیط کشت آب پنیر فرموله شده

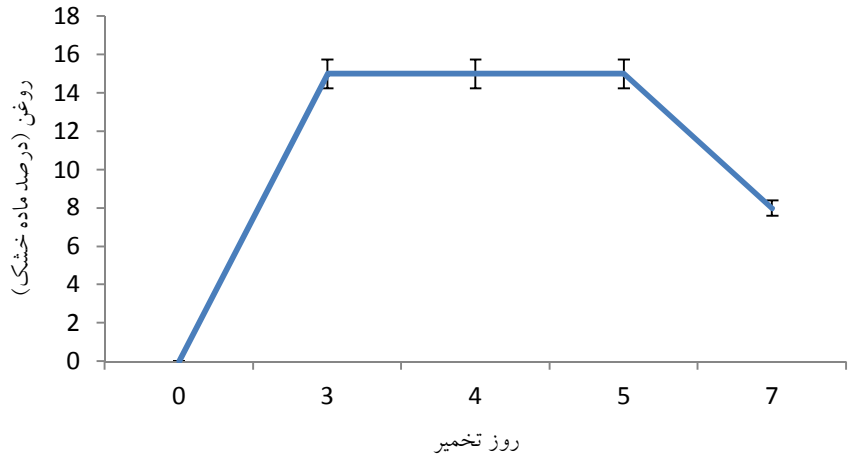
روند تغییرات توده زیستی نشان می دهد که میزان توده زیستی تا روز چهارم روند افزایشی داشته و بیشترین میزان افزایش از روز اول به دوم و در مرحله بعد از روز دوم به سوم می باشد، کمترین کاهش از روز سوم به چهارم می باشد که نشان دهنده کاهش مواد مغذی محیط کشت می باشد. در روز هفتم میزان توده زیستی کاهش یافته که نشان دهنده این واقعیت علمی می باشد که ریزسازواره وارد فاز مرگ شده است.



شکل ۴-۲۲- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت آب پنیر فرموله شده

۴-۱۴- بررسی تغییرات روغن در محیط کشت آب پنیر فرموله شده

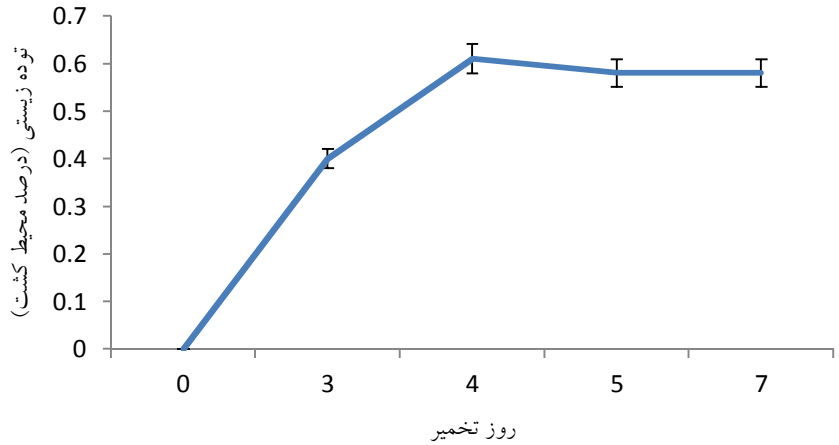
میزان روغن تا روز دوم افزایش یافت و به سطح ۱۵٪ توده زیستی رسید و این میزان روغن تا روز چهارم ثابت بود در واقع با در نظر گرفتن افزایش توده زیستی چنین تحلیل می شود که روغن همواره در حال تولید و تجمع در داخل سلول بوده با در نظر گرفتن افزایش توده زیستی میزان روغن در واحد وزنی توده خشک مورتیرلا در حین تخمیر ثابت باقی مانده است. از روز چهارم به روز هفتم میزان روغن کاهش قابل توجهی یافت که نشان دهنده مصرف روغن توسط این گونه قارچی می باشد.



شکل ۴-۲۳- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت آب پنیر فرموله شده

۴-۱۵- بررسی تغییرات توده زیستی در محیط کشت آب پنیر فرموله شده حاوی نانو ذره منیزیم

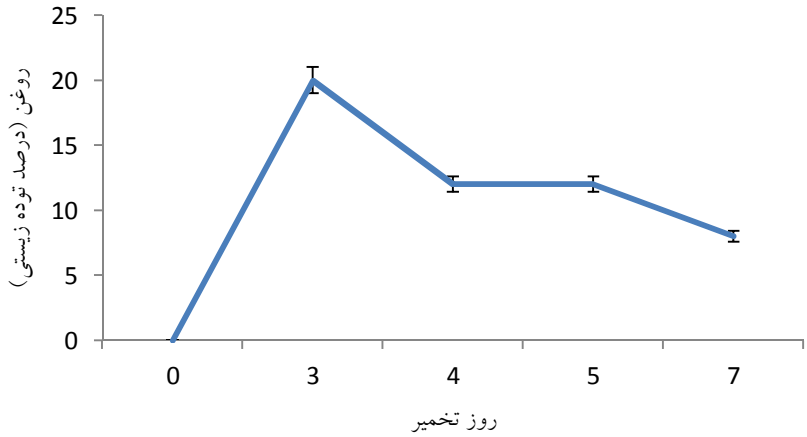
روند رشد توده زیستی نشان داد که تفاوت چندانی با نمونه فاقد نانو ذره در مرحله اولیه رشد ندارد به طوری که از روز سوم به بعد کاهش توده زیستی مشاهده شد، روند کاهش توده زیستی کند بود و در روز هفتم به کمترین سطح توده زیستی کاهش یافت. روند افزایش توده زیستی در روزهای اولیه رشد تا روز دوم قابل توجه بود و از روز دوم به سوم این روند افزایشی کند شد.



شکل ۴-۲۴- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت آب پنیر فرموله شده حاوی نانو ذره منیزیم

۴-۱۶- بررسی تغییرات روغن در محیط کشت آب پنیر فرموله شده حاوی نانو ذره منیزیم

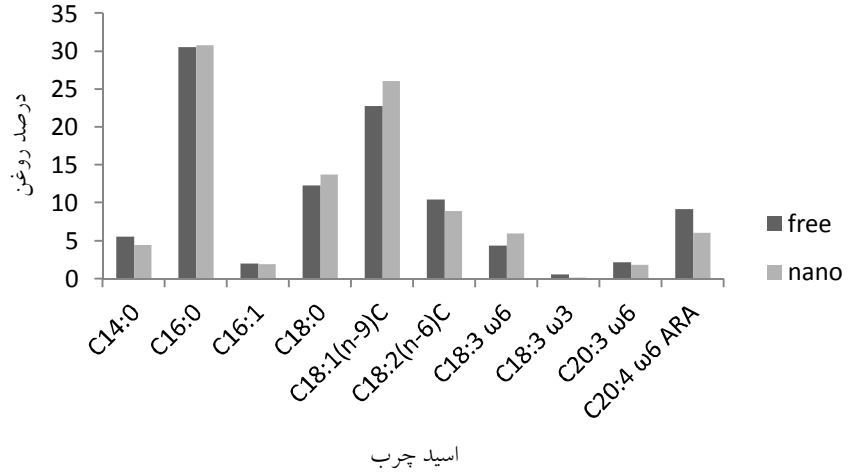
روند افزایش تولید روغن مانند محیط کشت ساده بسیار قابل توجه بود به طوری که در روز دوم رشد به بالاترین سطح روغن رسید که نسبت به نمونه بدون نانوذره ۵٪ بالاتر بود. نکته قابل توجه روند کاهش روغن می باشد به طوری که روند کاهش روغن در این نمونه بالا بود و بعد از روز دوم روند مصرف روغن شدت پیدا کرد و در روز هفتم به سطح ۸٪ توده زیستی رسید. کاهش کم توده زیستی در فاز مرگ می تواند ناشی از مصرف روغن ذخیره ای باشد که تامین کننده انرژی ریزسازواره می باشد.



شکل ۴-۲۵- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت آب پنیر فرموله شده حاوی نانو ذره منیزیم

۴-۱۷- بررسی پروفایل اسید چرب روغن در محیط کشت آب پنیر فرموله شده با و بدون نانو ذره منیزیم

شکل ۴-۲۶ نشان می دهد که نانو ذره محرک تولید اسید لینولنیک بوده و میزان این اسید چرب نسبت به نمونه شاهد بالاتر می باشد در حالیکه نانو ذره اثر کاهشی در تولید آراشیدونیک اسید حاصل از تجمع روغن در گونه قارچی مورتیرلا آلپینا داشت. افزایش تجمع اولئیک در روغن حاوی نانو ذره نشان دهنده کاهش فعالیت اسیدهای چرب غیراشباع ساز در این تیمار می باشد که با تجمع روغن ارتباط مستقیم دارد.



شکل ۴-۲۶- پروفایل اسیدهای چرب روغن در محیط کشت آب پنیر فرموله شده با و بدون نانو ذره منیزیم

۴-۱۸- نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق فوق چنین برداشت می شود که می توان از قارچ *Mortierella alpine* به عنوان منبع خوب تولید روغن های غیراشباع استفاده نمود. نتایج نشان داد که ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی تأثیر منفی در تولید روغن و توده ی زیستی در محیط فرموله شده داشت و بازدارندگی نانو ذره در حضور نور به طور قابل توجهی افزایش یافت. نتایج نشان داد که استفاده از نانو ذره منیزیم در مقادیر بالای ۰/۰۵ درصد در محیط کشت تأثیر منفی در رشد و تولید روغن در این گونه داشت، در حالیکه که استفاده از نانو ذره منیزیم در سطح ۰/۰۵ گرم در لیتر در

محیط کشت فرموله شده در محیط گلوکز و پودر آب پنیر محرک تولید توده زیستی و روغن می باشد. نتایج نشان داد که سطوح پایین نانو ذره، زمان تولید روغن از گونه قارچی مورتیرلا آلپینا را کاهش می دهد. زمان از عوامل مهم در تولید محصول در فرایند تخمیر می باشد کاهش زمان، هزینه تخمیر را کاهش می دهد با توجه به کاهش زمان با استفاده از نانو ذره در محیط های فرموله شده هزینه های تخمیر در فرایند تولید صنعتی کاهش می یابد که اهمیت استفاده از نانو ذرات در محیط کشت را نشان می دهد. سوبسترای آب پنیر به عنوان منبع کربنی در تولید روغن به عنوان یک منبع کربنی ارزان قیمت مورد توجه بود نتایج نشان داد که میزان تولید روغن در شرایط تخمیر اعمال شده پایین بود در حالیکه میزان قابل توجهی توده زیستی از این منبع کربنی تولید شد. استفاده از نانو ذرات منیزیم در محیط کشت، محرک تولید روغن در این تحقیق بود به طوری که سطح ۰/۰۵ گرم در لیتر نانو ذره باعث تحریک تولید روغن در این محیط کشت شد و در روز سوم میزان روغن به سطح ۲۲٪ توده زیستی افزایش یافت. ادامه تخمیر نشان داد که روغن تجمعی به صورت قابل توجهی توسط این گونه میکروبی مصرف شد. مقایسه پروفایل اسید چرب نمونه آب پنیر حاوی نانو ذره و نمونه فاقد نانو ذره نشان داد که نانو ذره تأثیر منفی در تولید آراشیدونیک اسید داشت. نتایج تحقیقات دانشمندان نشان داده که هر شرایطی که در تولید روغن تأثیر مثبت داشته باشد در تجمع آراشیدونیک اسید تأثیر منفی دارد چرا که میزان قابل توجهی از انرژی صرف تجمع روغن شده از اینرو انرژی اندکی صرف فعال سازی مسیر تولید اسیدهای چرب غیراشباع مانند آراشیدونیک اسید می شود (samadlouie et al., 2014).

۴-۱۹- پیشنهادات

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق پیشنهادهای زیر ارائه می شود:

- ✓ اثر دیگر نانو ذرات در سطوح متفاوت در تولید روغن و آراشیدونیک اسید از این گونه قارچی بررسی شود.
- ✓ از محیط های کشت ارزان دیگر بویژه استفاده از ضایعات کشاورزی و کارخانجات لبنی در توید محصول از این گونه قارچ تجاری استفاده شود.
- ✓ عوامل ژنتیکی موثر در کاهش زمان تخمیر در اثر استفاده نانو ذره منیزیم در محیط کشت آب پنیر بررسی شود.
- ✓ تحقیقات وسیعتری در تأثیر نانو ذرات بر محتوی اسیدهای چرب غیر اشباع انجام شود.

منابع

- آب سالان م، کابوسی ح، صمدلوئی ح، (۱۳۹۱)، "بهینه سازی تولید روغن تک یاخته و گامالینولنیک اسید توسط قارچ Cunninghamella echinulata"، فرآوری و تولید مواد غذایی، ۲ (۲)، ص ۳۵- ۴۳.
- انشاییه م، عبدلی آ، نحوی ا، مدنی م، (۱۳۹۲)، "تولید و بهینه سازی روغن میکروبی در مخمرهای مولد چربی یارویالیپولیتیکا *70562 DSM* و مخمر بومی ژئوتریکوم *BL*"، مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی، ۳ (۱۲)، ص ۵۸-۶۳.
- حسینی س، آذین م، قوامی م، مظهری ض، (۲۰۱۲)، "بررسی تولید روغن میکروبی به وسیله *Mortierella alpina*"، *Food Technology & Nutrition*، ۹ (۳)، ص ۵ -۱۴.
- عبدلی آ، انشاییه م، مدنی م، (۱۳۹۵)، "تولید روغن غنی از اسیدهای چرب سری امگا توسط مخمرهای مولد چربی و میزان تأثیر پارامترهای مختلف بر فرایند تولید"، علوم و صنایع غذایی، ۱۳ (۵۹)، ص۵۹ -۷۴.
- قنواتی ح، نحوی ا، (۱۳۹۵)، "بررسی تولید روغن تک یاخته در مراحل مختلف رشد *Rhodotoru-la Mvsylvzhynvza* سویه *UIMC35* توسط فلوسایتومتری"، مجله علمی پژوهشی دانشگاه الزهرا(س)/زیست شناسی کاربردی، ۲۹ (۲)، ص ۱۷۳-۱۹۲.

- Ahmed, S. U., Singh, S. K., Pandey, A., Kanjilal, S., & Prasad, R. B. N. (2006). Effects of various process parameters on the production of γ-linolenic acid in submerged fermentation. Food Technology and Biotechnology, 44(2), 283–287.
- Akpinar-Bayizit, A., Ozcan, T., Yilmaz-Ersan, L., & Basoglu, F. (2014). Single cell oil (SCO) production by Fusarium species using cheese whey as a substrate. Mljekarstvo/Dairy, 64(2).
- Armenta, R. E., & Valentine, M. C. (2013). Single-cell oils as a source of omega-3 fatty acids: an overview of recent advances. Journal of the American Oil Chemists' Society, 90(2), 167-182.
- Benny, G. L., & Blackwell, M. (2004). Lobosporangium, a new name for Echinosporangium Malloch, and Gamsiella, a new genus for Mortierella multidivaricata. Mycologia, 96(1), 143–149.
- Choi, O., Deng, K. K., Kim, N.-J., Ross, L., Surampalli, R. Y., & Hu, Z. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. Water Research, 42(12), 3066–3074.

- 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(4), 445–467.
- Economou, C. N., Makri, A., Aggelis, G., Pavlou, S., & Vayenas, D. V. (2010). Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. Bioresource technology, 101(4), 1385-1388.
- Enshaeieh, M., Abdoli, A., & Madani, M. (2015). Single Cell Oil (SCO) Production by Rhodotorula mucilaginosa and Its Environmental Benefits. Journal of Agricultural Science and Technology, 17(2), 387-400.
- Fadaly, H. A. E., N. E. A. E. Naggar, and E. S. M. Marwan. "Single cell oil production by an oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium." *Res J Microbiol* 4.8 (2009): 301-313.
- Gen, Q., Wang, Q., & Chi, Z. M. (2014). Direct conversion of cassava starch into single cell oil by co-cultures of the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides and immobilized amylases-producing yeast Saccharomycopsis fibuligera. *Renewable Energy*, *62*, 522-526.
- Hansson, L. and Dostalek. (1988). Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ–linolenic acid by the fungus Mortierella ramanniana. Applied Microbiology and Biotechnology, 28: 240-246.
- Herrera-Estrella, A., & Horwitz, B. A. (2007). Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. Molecular Microbiology, 64(1), 5–15.
- Huang, C., Chen, X. F., Xiong, L., Ma, L. L., & Chen, Y. (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. Biotechnology advances, 31(2), 129-139.
- Huang, Chao, et al. "Microbial oil production from rice straw hydrolysate by Trichosporon fermentans." *Bioresource Technology* 100.19 (2009): 4535-4538.
- Jang, H. D., Lin, Y. Y. and Yang, S. S. (2005). Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by Mortierella alpina. Bioresource Technology, 96: 1633-1644.
- Jang, H.-D., Lin, Y.-Y., & Yang, S.-S. (2000). Polyunsaturated fatty acid production with Mortierella alpina by solid substrate fermentation. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 41.

- Jang, H.-D., Lin, Y.-Y., & Yang, S.-S. (2005). Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by Mortierella alpina. Bioresource Technology, 96(15), 1633–1644.
- Jang, Hung-Der, and Shang-Shyng Yang. "Polyunsaturated fatty acids production with a solid-state column reactor." *Bioresource technology* 99.14 (2008): 6181-6189.
- Jin, M.-J., Huang, H., Xiao, A.-H., Gao, Z., Liu, X., & Peng, C. (2009). Enhancing arachidonic acid production by Mortierella alpina ME-1 using improved mycelium aging technology. Bioprocess and Biosystems Engineering, 32(1), 117.
- Li, M., Liu, G. L., Chi, Z., & Chi, Z. M. (2010). Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast Rhodotorula mucilaginosa TJY15a. Biomass and bioenergy, 34(1), 101-107.
- Lounds, C., Eagles, J., Carter, A. T., MacKenzie, D. A., & Archer, D. B. (2007). Spore germination in Mortierella alpina is associated with a transient depletion of arachidonic acid and induction of fatty acid desaturase gene expression. Archives of Microbiology, 188(4), 299–305.
- Matsakas, L., Bonturi, N., Miranda, E. A., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2015). High concentrations of dried sorghum stalks as a biomass feedstock for single cell oil production by Rhodosporidium toruloides. Biotechnology for biofuels, 8(1), 6.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology, 16(10), 2346.
- Muniglia, Lionel, et al. "Multicriteria optimization of a single-cell oil production." *European journal of operational research* 153.2 (2004): 360-369.
- Papanikolaou, S., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2004). Single cell oil (SCO) production by Mortierella isabellina grown on high-sugar content media. Bioresource Technology, 95(3), 287-291.
- Park, E. Y., Hamanaka, T., Higashiyama, K., & Fujikawa, S. (2002). Monitoring of morphological development of the arachidonic-acid-producing filamentous microorganism Mortierella alpina. Applied Microbiology and Biotechnology, 59(6), 706–712.

- 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. Journal of Bioscience and Bioengineering, 88(1), 61–67.
- Peng, Xiaowei, and Hongzhang Chen. "Single cell oil production in solid-state fermentation by Microsphaeropsis sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran." *Bioresource technology* 99.9 (2008): 3885-3889.
- Ratledge, C. (1981). Yeasts and moulds as sources of oils and fats. In: Pryde, E. H., Princen, E. H. and Mukherjee, K. D. (eds.). New Sources of Fats and Oils, American Oil Chemist's Society Press, Champaign, IL, USA.
- Ratledge, C. (1982). Single cell oil. Enzyme Microbiology and Technology, 4: 58-60.
- Ratledge, C. (1984). Microbial oils and fats-an overview. In Ratledge, C., Dawson, P. and Rattray, J. (eds.). Biotechnology for the Oils and Fats Industry, American Oil Chemist's Society Press, Champaign, IL, USA.
- Ratledge, C. (1993). Single cell oils-have they a biotechnological future? Trends in Biotechnology, 11: 278-284.
- Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In: Kamel, B. S. and Kakuda, Y. (eds.). Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids. Blackie Academic and Professional, London.
- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganism. Biochemical Society Transactions, 30: 1047-1049.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochemie, 86: 807-815.
- Ratledge, C. (2005). Single cell oils for 21st century. In: Cohen, Z. and Ratledge, C. (eds.). Single Cell Oil. American Oil Chemist's Society Press, Champaign, IL, USA.
- Ratledge, C., Sakuradani, E., Takeno, S., Abe, T., Shimizu, S., Barclay, W., & Press, C. R. C. (2005). Single Cell Oils.
- Sakuradani, E., & Shimizu, S. (2009). Single cell oil production by Mortierella alpina. Journal of biotechnology, 144(1), 31-36.

- Samadlouie, H. R., Hamidi-Esfahani, Z., Alavi, S. M., & 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.
- Shinmen, Y., Shimizu, S., Akimoto, K., Kawashima, H., & Yamada, H. (1989). Production of arachidonic acid by Mortierella fungi. Applied microbiology and biotechnology, 31(1), 11-16.
- Stredansky, M., Conti, E., Stredanska, S., & Zanetti, F. (2000). γ-Linolenic acid production with Thamnidium elegans by solid-state fermentation on apple pomace. Bioresource Technology, 73(1), 41–45.
- Tisch, D., & Schmoll, M. (2010). Light regulation of metabolic pathways in fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 85(5), 1259–1277.
- Totani, N. and Oba, K. (1988). A simple method for production of arachidonic acid by Mortierella alpina. Applied Microbiology and Biotechnology, 28: 135-137.
- Totani, N., Hyodo, K. and Ueda, T. (2000a). A study on new nitrogen source for cultivation of genus Mortierella. Journal of Japanese Oil Chemist's Society, 49: 479-485.
- Totani, N., Hyodo, K. and Ueda, T. (2000b). Minerals essential for growth of the filamentous fungus, Mortierella alpina. Journal of Japanese Oil Chemist's Society, 49: 487-493.
- Totani, N., Someya, K. and Oba, K. (1992). Industrial production of arachidonic acid by Mortierella. In: Kyle, D. J. and Ratledge, C. (eds.). Industrial Applications of Single Cell Oil, American Oil Chemist's Society Press, IL, USA.
- Wen, Zhi-You, and Feng Chen. "Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae." *Biotechnology advances* 21.4 (2003): 273-294.
- Williams, D. N., Ehrman, S. H., & Holoman, T. R. P. (2006). Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles. Journal of Nanobiotechnology, 4(1), 3.
- 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.

Abstract

Regarding to the harmful effect of saturated fatty acids on human health, a great demand for a cheap and reliable source of polyunsaturated fatty acid seems to attract more attention of the producer. Appropriate source of the arachidonic acid is *mortierella alpine*. In this research, the effect of the various substrates including whey, glucose as carbon resources and nano magnesium particle on lipid and biomass production by *mortierella alpine* was investigated. Magnesium nano-particles caused the *mortierella* growth to induce while subsequently raised deterioration of the biomass compared to the free Magnesium nano-particles substrate. It indicated that the biomass decreased by 30%. Like biomass production and deterioration after that in nano particle media, this component induced lipid production subsequently after reaching the maximum content of lipid in biomass it decrease dramatically after reaching to the tipping point. Lipid in biomass at the media content whey substrate was accumulated 15% lipid in dry biomass after 2 fermentation days, The lipid content reached to the stationery phase, regarding to the biomass production with constant amount of lipid content it could be said the organism produced lipid in more biomass content in this circumstances the lipid content seemed to reached to constant content while it produced more than past. Magnesium nano-particles in whey media induced lipid production, in this condition lipid reached to maximum content in the shorter time than whey media without nanoparticles. It reached to the 20% of biomass after 2 days. The deterioration step of lipid induced after that which it reached to the maximum content that was 8% of biomass. it seemed this reduction provide energy for hindering of the biomass reduction. Nanoparticle in this media caused more linoleic acid production while had deterred effect on arachidonic acid production. Accumulation of oleic in lipid indicated that nanoparticle repressed the unsaturated fatty acid enzyme involved in arachidonic acid production that caused to get the results.

Keywords: Mycelium fungus, Single cell fat, Glucose, Yeast extract, Whey.

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in food industry

Investigation of lipid production from *Mortierella alpine* fungi using whey as carbon resource

By: Sara Hosseinalizadeh

Supervisor:

Dr. Hamidreza Samadluee

January 2018