بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد مهندسی علوم مواد غذایی

اثر عوامل محیطی بر تولید روغن از گونه قارچی *Mortierella Alpina* در محیط کشت مایع و ارتباط آن با میزان بیان ژن مالیک آنزیم

نگارنده: عبدا... وطن دوست

اساتید راهنما

دکتر حمیدرضا صمدلویی

دکتر شاهرخ قرنجیک

تیرماه ۱۳۹۷

شماره: ۱۸۰/ک
تاریخ: ۱۳۹۷/۶/۲۰

باسمه‌تعالی

دانشگاه صنعتی شاهرود
مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای عبداله وطن دوست با شماره دانشجویی ۹۴۳۶۲۱۴ رشته مهندسی صنایع غذایی گرایش علوم مواد غذایی تحت عنوان اثر عوامل محیطی بر تولید روغن از گونه قارچی Mortierella alpina در محیط کشت مایع و ارتباط آن با میزان بیان ژن مالیک آنزیم که در تاریخ ۱۳۹۷/۴/۴ .. با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: بسیار خوب) ☑ **مردود** ☐

نوع تحقیق: **نظری** ☐ **عملی** ☑

عضو هیأت داوران	نام ونام خانوادگی	مرتبهٔ علمی	امضاء
۱ـ استادراهنمای اول	دکتر حمیدرضا صمدلویی	استادیار	
۲- استادراهنمای دوم	دکتر شاهرخ قرنجیک	استادیار	
۳- استاد مشاور			
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر رضایی	استادیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر احمد رجایی	استادیار	
۶ـ استاد ممتحن دوم	دکتر کامبیز جهان بین	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده:
دکتر محمدرضا عامریان
تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشکده کشاورزی

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تقدیم به :

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم . والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. تقدیم به پدر و مادر عزیز و مهربانم که در سختی ها و دشواری های زندگی همواره یاوری دلسوز و فداکار و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده اند.

تقدیر و تشکر

با تقدیر و تشکر شایسته از استاد فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر صمد لویی که با نکته های دلاویز و گفته های بلند، صحیفه های سخن را علم پرور نمود و همواره راهنما و راه گشای نگارنده در اتمام و اکمال پایان نامه بوده است.

تعهد نامه

اینجانب **عبداله وطن دوست** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته **علوم مواد غذایی** دانشکده **کشاورزی** دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **اثر عوامل محیطی بر تولید روغن از گونه قارچی Mortierella alpina در محیط کشت مایع و ارتباط آن با میزان بیان ژن مالیک آنزیم** تحت راهنمائی **دکتر حمیدرضا صمدلویی و دکتر شاهرخ قرنجیک** متعهد می شوم .

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 می باشد 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 می گردد.
- 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

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

میکروارگانیسم هایی که قابلیت تجمع لیپید به میزان بیش از ۲۰ درصد توده زیستی خود را دارند، تحت عنوان میکروارگانیسم های مولد چربی نامیده می شوند. گونه ی قارچی مورتیرلا آلپینا از گونه‌ی میکروارگانیسم های مولد چربی می باشد. مهمترین محصول تولیدی از گونه قارچی مورتیرلا آلپینا روغن تک یاخته ای می باشد و یکی از بهترین منابع مناسب برای تولید آراشیدونیک اسید همین قارچ می باشد. در این تحقیق اثر عوامل محیطی بر تولید روغن از گونه قارچی Mortierella alpine در محیط کشت مایع و ارتباط آن با میزان بیان ژن مالیک آنزیم، ژن های خانه دار و همچنین تاثیر نانو ذرات منیزیم بر تولید روغن و تولید توده زیستی بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان افزایش توده زیستی تا روز سوم تخمیر می باشد و از روز سوم به چهارم روند رشد کند شده و از روز چهارم به بعد روند کاهشی توده زیستی مشاهده شد. و همچین روند کاهش گلوکز با تجمع توده زیستی همزمان بود. نتایج بیان ژن خانه دار در روز سوم و پنجم تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی بدون نانو بدین صورت بود که در روز سوم و پنجم ژن translation elongation factor 1 alpHa حداکثر بیان ژن را بین ژن های انتخاب شده داشت. برای انتخاب ژن خانه دار ژنی مناسب می باشد که در مرحله رشد و مرگ کمترین تغییرات بیانی را داشته باشد. ژن dihydropteridine reductase در این مرحله به عنوان ژن کاندید به عنوان پایدار ترین ژن خانه دار تایید شود. در حضور نانو ذره سرعت رشد نسبت به نمونه شاهد افزایش قابل توجهی یافت. دو ژن dihydropteridine reductase و putative 60S ribosomal با شاخص BESTKEEPER مناسب، انحراف معیار ، CV پایین و فاکتور M زیر ۱/۵ ژن های کاندید در تخمیر محیط کشت حاوی نانوذره بودند. اما در هر دو حالت تخمیر ژن dihydropteridine reductase به عنوان ژن کاندید انتخاب شد از این رو این ژن به عنوان ژن مناسب خانه دار برای بررسی بیان ژن مالیک آنزیم انتخاب شد. از آنجائیکه ژن خانه دار

dihydropteridine reductase به عنوان ژن کاندید بین ژن های خانه دار انتخاب شد اختلاف بیان ژن مالیک با این ژن بررسی شد. میزان fold-chang ژن مالیک آنزیم در نمونه ی با نانو در روزهای تخمیر ابتدا روند افزایش سپس کاهش مجددا افزایش را داشت.

کلمات کلیدی: مورتیرلا آلفینا، روغن تک یاخته، گلوکز، مالیک آنزیم، آرشیدونیک اسید

فهرست مطالب

فهرست اشکال ن
فهرست جداول س

فصل۱: ۱

۱-۱- مقدمه..... ۲

۱-۲- چربی‌ها..... ۳

۱-۳-روغن تک یاخته..... ۴

۱-۳-۱- تاریخچه روغن تک یاخته..... ۵

۱-۳-۲- میکرواورگانیسم‌های تولید کننده روغن تک‌یاخته..... ۶

۱-۳-۳- خانواده مورتیرلاسه (Mortierellaceae)..... ۸

۱-۳-۳-۱-قارچ Mortierella alpine..... ۹

۱-۳-۳-۲-عوامل موثر بر تولید روغن تک‌یاخته در Mortierella alpine..... ۹

۱-۳-۴- عوامل فیزیکی و شیمیایی محیط کشت..... ۱۰

۱-۳-۴-۱-منابع کربنی..... ۱۰

۱-۳-۴-۲-منابع نیتروژنی..... ۱۱

۱-۳-۴-۳-اکسیژن..... ۱۲

۱-۳-۴-۴-دما..... ۱۲

۱-۳-۴-۵-p H..... ۱۳

۱-۳-۴-۶- دور همزن..... ۱۳

۱-۳-۴-۷-مدت زمان تخمیر ۱۳

۱-۴- آرشیدونیک اسید..... ۱۴

۱-۵- تولید میکروبی آرشیدونیک اسید..... ۱۶

۱-۶- مالیک آنزیم..... ۱۷

۱-۷- واکنش REAL- TIME PCR..... ۱۸

۱-۷-۱- تاریخچه و روش انجام Real- Time PCR..... ۱۸

۱-۷-۲- رنگ‌های فلورسنت متصل شونده به DNA..... ۱۹

۱-۷-۳- پروب‌های فلورسنت..... ۲۰

۱-۷-۴- تعیین غلظت DNA با استفاده از شاخص های الیگونوکلئوتیدی فلورسانس..... ۲۱

۱-۸- روش های کمی سازی آنالیزهای REAL TIME PCR..... ۲۱

۱-۸-۱- روش منحنی استاندارد (مقایسهٔ مطلق)..... ۲۱

۱-۸-۲- روش آستانه نسبی (مقایسهٔ نسبی)..... ۲۲

۱-۹- مزایای روش REAL- TIME PCR..... ۲۳

۱-۱۰- کاربردهای روش REAL- TIME PCR..... ۲۴

فصل ۲: مروری بر مطالعات پیشین..... ۲۵

فصل ۳: مواد و روشها..... ۴۳

۳-۱- مواد شیمیایی، نرم افزار، تجهیزات و روش کلی تحقیق..... ۴۴

۳-۱-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده در تخمیر..... ۴۴

۳-۱-۲- کیت استخراج RNA و ساخت cDNA..... ۴۴

۳-۱-۳- کیت مورد استفاده در دستگاه Real Time PCR..... ۴۴

۳-۱-۴- محلول ها و بافرهای مورد نیاز برای الکتروفورز ژل آگاروز..... ۴۴

۳-۱-۵- مواد شیمیایی مورد نیاز برای PCR..... ۴۵

۳-۱-۶- نرم افزارهای مورد استفاده..... ۴۵

۳-۱-۷- تجهیزات مورد استفاده..... ۴۵

۳-۱-۸- روش کلی تحقیق..... ۴۶

۳-۲- روش نگهداری ریزسازواره‌ها..... ۴۷

۳-۳- مایه تلقیح و کشت‌های اصلی..... ۴۷

۳-۴- اندازه‌گیری وزن خشک سلولی..... ۴۸

۳-۵- استخراج RNA از قارچ MORTIERELLA ALPINA..... ۴۸

۳-۵-۱- آماده سازی نمونه ها..... ۴۹

۳-۵-۲- استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت Bio Basic..... ۴۹

۳-۵-۳- بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده..... ۵۰

۳-۵-۳-۱-نانودراپ..... ۵۱

۳-۵-۳-۲-الکتروفورز ژل آگارز..... ۵۱

۳-۶- واکنش آرتی پی سی آر (RT-PCR)..... ۵۱

۳-۶-۱- سنتز cDNA ۵۲

۳-۶-۲- واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)..... ۵۲

۳-۷- طراحی پرایمر..... ۵۳

۳-۸- الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز..... ۵۴

۳-۹-REAL TIME PCR ۵۵

۳-۹-۱- کنترل های Real time PCR..... ۵۶

فصل ٤: نتایج و بحث..... ۵۷

۴-۱- بررسی تغییرات میزان توده زیستی در محیط کشت نیتروژن آلی..... ۵۸

۴-۲- بررسی تغییرات میزان روغن..... ۶۱

۴-۳- بررسی بیان ژن خانه دار در روز سوم تخمیر..... ۶۲

۴-۴- بررسی بیان ژن خانه دار در روز پنج تخمیر..... ۶۳

۴-۵- انتخاب ژن خانه دار مناسب در شرایط تخمیری رشد و مرگ..... ۶۵

۴-۶- بررسی تغییرات میزان توده زیستی در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانوذره منیزیم..... ۶۷

۴-۷- بررسی تغییرات میزان روغن در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم..... ۶۹

۴-۸- بررسی بیان ژن در روز سوم تخمیر..... ۷۰

۴-۸-۱- بررسی بیان ژن در روز چهارم تخمیر..... ۷۱

۴-۸-۲- روز پنجم تخمیر قارچی..... ۷۲

۴-۹- تعیین ژن خانه دار مناسب در فرایند رشد ریزسازواره..... ۷۳

۴-۱۰- تعیین ژن خانه دار مناسب با بررسی دو حالت تخمیر..... ۷۴

۴-۱۱- بررسی بیان ژن مالیک آنزیم..... ۷۵

۴-۱۲- مقایسه بیان ژن مالیک آنزیم در دو حالت تخمیر بی نانو و با نانو با استفاده از شاخص FOLD CHANGE... ۷۶

۴-۱۳- نتیجه گیری..... ۷۷

۴-۱۴- پیشنهادات..... ۷۹

فصل ۵: منابع ۸۱

فهرست اشکال

شکل ۱-۱- ساختار شیمیایی یک تری گلیسیرید(تری اسیل گلیسرول)..... ۴

شکل ۱-۲- ساختار فرمولی آرشیدونیک اسید..... ۱۴

شکل ۱-۳- مسیر بیوسنتز لیپیدها و نقش آنزیم مالیک در این مسیر.....۱۷

شکل ۱-۴- منحنی ذوب Real-Time PCR..... ۲۰

شکل ۱-۵- منحنی استاندارد و خط پایه در Real-Time PCR.....۲۱۸

شکل ۴-۱- میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی.....۵۸

شکل ۴-۲- میزان مصرف قند احیا در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی.....۶۰

شکل ۴-۳- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی.....۶۱

شکل ۴-۴- بررسی میزان Ct ژن ها در روز سوم تخمیر.....۶۳

شکل ۴-۵- بررسی میزان Ct ژن ها در روز پنجم تخمیر.....۶۴

شکل ۴-۶- میزان تولید توده زیستی طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانوذره منیزیم.....۶۸

شکل ۴-۷- میزان مصرف قند احیا در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانوذره منیزیم.....۶۹

شکل ۴-۸ - میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم.....۷۰

شکل ۴-۹- بررسی میزان Ct ژن ها در روز سوم تخمیر.....۷۱

شکل ۴-۱۰- بررسی میزان Ct ژن ها در روز چهارم تخمیر.....۷۲

شکل ۴-۱۱- بررسی میزان Ct ژن ها در روز پنجم تخمیر.....۷۳

شکل ۴-۱۲- میزانΔCt -40 در روزهای ۳، ۴ و ۵ تخمیر در نمونه بدون نانو.....۷۵

شکل ۴-۱۳- میزان ΔCt -40 در روزهای ۳، ۴ و ۵ تخمیر در نمونه با نانو.....۷۶

شکل ۴-۱۴ میزان fold change در روزهای متفاوت تخمیر.....۷۷

فهرست جداول

جدول ۳-۱توالی و مشخصات پرایمر ژن های مورد نظر و ژن مرجع..... ۵۴
جدول ۳-۲مواد لازم جهت انجام Real time PCR..... ۵۵
جدول ۳-۳برنامه دستگاه Real Time PCR..... ۵۶
جدول ۴-۱انحراف معیار و ضریب تنوع بیان ژن‌های خانه‌دار در روزهای متفاوت تخمیر فاز رشد و فاز مرک..... ۶۶
جدول ۴-۲انحراف معیار و ضریب تنوع بیان ژن‌های خانه‌دار در روزهای متفاوت تخمیر فاز رشد..... ۷۴

فصل ۱: مقدمه

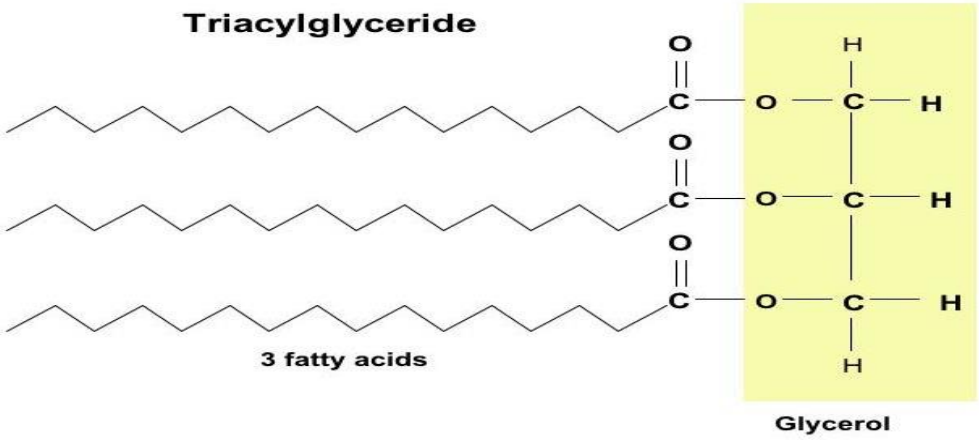
۱-۱- مقدمه

دانه‌های غلات که ۵۰٪ انرژی و ۵۰٪پروتئین مردم جهان را تشکیل می‌دهند، عموما از نظر اسیدهای چرب چند غیر اشباع ضروری فقیر هستند (Certik *et al*., 2006). اسیدهای چرب چند غیراشباع (PUFAs)، دو یا تعداد بیشتری از جفت‌های هیدروژن را در زنجیره‌های اسید چرب‌شان از دست می‌دهند. آنها باعث پایین آوردن کلسترول سرم خون و همچنین کاهش تولید HDL و LDL می‌شوند. روغن‌های گیاهی مانند ذرت، کنجد، آفتابگردان، گلرنگ، لوبیای سویا و همچنین در ماهی‌های چرب از مهمترین منابع غذایی اسیدهای چرب چند غیر اشباع به شمار می‌روند. این چربی‌ها معمولا در دمای اتاق مایع هستند. اسیدهای چرب امگا ۳ نیز چربی‌های چند غیراشباع هستند. این اسیدهای چرب عمدتا در غذاهای دریایی مانند ماهی خال مخالی پرچرب، ماهی تن آلباکور، ساردین، سالمون، قزل آلای دریاچه‌ای و همچنین روغن بذر کتان، گردو، روغن سویا و روغن کانولا یافت می‌شوند (Susanto *et al*., 2016). بدن انسان از آلفا لینولنیک اسید موجود در منابع غیر گوشتی استفاده می‌کند و آن را به سایر امگا ۳ تبدیل می‌نماید. امگا ۳ با بهبود ایمنی، آرتریت روماتوئید، بینایی، عملکرد مغز و سلامت قلب مرتبط هستند. به طور خاص، امگا ۳ها با کاهش سطوح تری‌گلیسیرید در بدن و سطوح کلسترول کل مرتبط هستند که باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری قلبی عروقی می شود. اگر چه آنها ممکن است سطوح HDL را نیز کاهش دهند. منابع اصلی برای امگا ۳ عبارتند از روغن‌های گیاهی و برخی محصولات غلات می باشد. اسید لینولئیک (w6) یکی از متداولترین اسیدهای چرب چند غیر اشباع است که معمولا در روغن‌های گیاهی نظیر آفتابگردان وجود دارد. اسیدهای چرب دکوزاهگزاننوئیک و ایکوزاپنتانوئیک (w3) بطور معمول در ماهی‌های چرب مانند ساردین، سالمون، هالیبوت، ماهی خال مخالی و قزل آلا وجود دارند. پس از تحقیقات اولیه دانشمندان پی بردند که پروتزوا، جلبک و قارچ منبع مناسبی برای تولید روغن و اسیدهای چرب چند غیراشباعی که به این روغن‌ها، روغن تک‌یاخته گفته می‌شود. بنابراین میکروارگانیسم‌ها 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 (Gerasimenko *et al.*, 2010). از مهمترین اسیدهای چرب چند غیراشباعی می‌توان آرشیدونیک اسید را نام برد، 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 تولید، مورد توجه قرار گیرد.

۱-۲- چربی‌ها

چربی‌های نقش‌های مهم ساختمانی، ذخیره‌ای و همچنین واسطه‌های متابولیکی در موجودات زنده ایفا می‌کنند (Sikorski and Kolakowska, 2003). لیپیدها بصورت اجسام چرب تقریبا در تمامی موجودات یوکاریوت در بعضی نقاط طی حیات آنها ذخیره می‌شوند. بخش اصلی لیپید، مولکول‌های تری آسیل گلیسرول می‌باشد. مولکول‌های تری آسیل گلیسرول شامل ۳ اسید چرب است که به یک مولکول گلیسرول متصل می‌باشند (شکل ۱-۱). ترکیب مولکول‌های تری‌آسیل گلیسرول و اسیدهای چرب در درون و میان موجودات می‌تواند متفاوت باشد (Fennema, 1996).



شکل ۱-۱-ساختار شیمیایی یک تری گلیسیرید(تری‌آسیل گلیسرول) (Fennema, 1996)

۱-۳- روغن تک یاخته

روغنی که از منابع میکروبی گونه‌های روغنی به دست می‌آید به عنوان روغن میکروبی یا روغن تک سلولی شناخته شده‌است، همانند دیگر روغن‌ها و چربی‌های موجود در منابع گیاهی و حیوانی از دسته آسیل گلیسرول می‌باشد (Fidler *et al*., 1999) و به عنوان روغن حاوی اسیدهای چرب چند غیراشباع از جمله آرشیدونیک اسید، مورد توجه خاص محققین قرار گرفته است (Fakas *et al*., 2009).

تولید روغن‌های میکروبی که روغن تک یاخته نیز نامیده می‌شوند در حال حاضر یک واقعیت اقتصادی می‌باشد. اگرچه وجود آنها 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 تولید می‌شد و بگونه‌ای محیط کشت طراحی شده بود که روغن غنی از اسیدچرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه گاما لینولنیک اسید می‌شود. که به‌عنوان جایگزین روغن

پامچال که بسیار گران بود، استفاده شود. تخمیر در فرمانتورهای دارای همزن با ظرفیت ۲۲۰ متر مکعب انجام شد و مستلزم عملیات برداشت و خشک کردن توده زیستی ، استخراج روغن تک یاخته، تصفیه و خالص‌سازی نهایی نیز (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 میکروارگانیسم ها به‌عنوان جایگزین مناسب و اقتصادی برای تولید بعضی از روغن‌های گیاهی باشد و همچنین روغن تک یاخته میکروبی را می‌توان توسط روش‌های 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 گیاهان قابل تولید نیستند و ماهیتاً گران قیمت نیز می‌باشند. روغن‌های چند غیراشباع میکروبی از ارزش افزوده زیادی برخوردار بوده و ارزش تجاری سازی دارند. اکنون مشخص شده است که این طیف وسیع اسیدهای چرب چند غیراشباع از ارزش تغذیه‌ای زیادی برای نوزادان و مادران برخوردار بوده و بنابراین بازار بزرگی برای آنها وجود دارد (Ratledge, 2004; 2005)

۱-۳-۱- تاریخچه روغن تک یاخته

علاقه زیادی برای تولید روغن های میکروبی در طی ۱۲۵سال گذشته و بهره برداری از آنها به عنوان منابع جایگزین روغن‌ها و چربی‌ها گیاهی و جانوری برای مصرف بشر وجود دارد. به نظر می‌رسد پول لیندر که در برلین آلمان فعالیت می‌کرد اولین محقیقی است که با استفاده از تخمیر در مقیاس کوچک از گونه مخمری Endomyces vernalis تولید چربی کرد (Ratledge, 2005).

تحقیقات وسیعی برای استفاده از ریزسازواره‌ها به عنوان منابع جایگزین روغن‌ها و چربی‌ها گیاهی در طی قرن بیستم توسط گروه‌های مختلف دانشمندان در سرتا سر دنیا انجام شده است نه تنها فرآیند تخمیر جهت تولید چربی را مورد مطالعه قرار دادند بلکه عوامل ژنتیکی تأثیرگذار بر تجمع لیپید را هم بررسی کردند (Ratledge, 2005).

توسعه تولید کارآمد و در مقیاس زیاد روغن‌های میکروبی بدلیل نبود فرمانتورهای بزرگ تحت کنترل محدود شد. فرمانتورهای صنعتی مناسب تقریبا تا دهه ۱۹۵۰میلادی مشکل اصلی تولید کنندگان بود.پس از اینکه فرآیندهای تخمیر غوطه‌وری برای تولید پروتئین تک یاخته در اواخر دهه ۱۹۵۰میلادی توسعه داده شد و موجب تولید فرمانتورهای صنعتی همزندار شد، بار دیگر تولید روغن‌های میکروبی در اواسط دهه ۱۹۶۰میلادی مورد توجه قرار گرفت. تولید روغن تک یاخته در دهه ۱۹۸۰میلادی برای تولید معادل‌های کره کاکائو مورد بررسی قرار گرفت زیرا که مقدار تولید کره کاکائو کم بود (Ward and Singh, 2005).

اولین مرحله تولید صنعتی روغن تک یاخته در سال ۱۹۸۵میلادی در بریتانیا شروع شد که به مدت شش 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 Mucor circinelloides تولید شد. اگرچه فرآیند تولید این روغن تک یاخته برای چند سال بیشتر طول نکشید ولی موجب اثبات این مدعا شد که می‌توان از میکروارگانیسم ها به عنوان جایگزین مناسب و اقتصادی برای تولید بعضی از روغن‌های گیاهی استفاده کرد اکنون مشخص شده است که این اسیدهای چرب از ارزش تغذیه‌ای زیادی دارد و بنابراین بازار بزرگی برای تولید آن ها وجود دارد (Ratledge, 2004).

۱-۳-۲- میکرواورگانیسم‌های تولید کننده روغن تک‌یاخته

تمام ارگانیسم‌های زنده باید حداقل مقداری چربی برای غشاها و سایر نقش‌های ساختمانی و عملکردی شان تولید نمایند. میکروارگانیسم‌ها از نظر تئوریکی توانایی تولید هر محصولی که در سلول‌های زنده یافت می‌شود را دارا می‌باشند و آن‌ها را سریع‌تر و سالم‌تر از گیاهان و حیوانات تولید می‌نمایند. همچنین روند تولید محصولات را می‌توان در تمام طول سال بدون وابستگی به تغییرات اقلیمی و آب و هوایی انجام داد. آن‌ها مانند هر سیستم سلولی زنده دیگر، لیپید تولید می‌کنند و تمام

سلول‌ها توسط غشاهای لیپیدی که حاوی اسیدهای چرب می باشد، احاطه شده‌اند. البته تنها تعداد نسبتاً کمی از میکروارگانیسم ها قادر به تجمع لیپید به میزان۲۰ درصد از جرم سلولی به عنوان منبع ذخیره‌ای می‌باشند که تحت عنوان گونه های روغنی شناخته شده اند(Higashiyama *et al.*, 2002). از باکتری‌ها، جلبک‌ها و قارچ‌ها می توانند روغن تک یاخته ای تولید کنند.

در میان باکتری‌ها، گونه‌های محدودی 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 همراه می‌باشند. همچنین این میکرواورگانیسم‌ها سرعت رشد کمی دارند. بنابراین نمی‌توان آنها را برای تولید روغن‌های میکروبی برای مصرف انسان و حیوانات در نظر گرفت (Ratledge, 1982). البته می‌توان گلیکولیپید، دی مایکولیل تری هالوز[1] که از این میکروارگانیسم‌ها جداسازی شده است را به‌عنوان سورفکتانت بکار برد. (Ratledge, 1984). با این وجود، گونه‌ای از آرتروباکتر[2] گزارش شده که می‌تواند تا بیش از ۸۰٪ توده زیستی خود را لیپید تجمع کند. این لیپید شامل ۵۰-۲۸٪ تری آسیل گلیسرول، ۵۶-۳۰٪ مونو آسیل گلیسرول و کمتر از ۵٪ فسفولیپید می باشد. هدف اساسی تولید این لیپید استفاده از آن به‌عنوان سوخت زیستی است (Ratledge, 1982).

در میان جلبک‌ها تعداد زیادی بیش از ۳۰٪ و تعداد اندکی از آنها بیش از ۵۰٪ از توده زیستی آنها را لیپید تشکیل می‌دهد. (Ratledge, 1981). از جلبک‌ها مانند گونه‌های نیتزشیا[3]، گونه نانوکلروپسیس[4]، گونه ناویکولا[5]، گونه فائوداستیلوم[6] و گونه پورفیریدیوم[1] بطور گسترده‌ای برای تولید ایکوزاپنتانوئیک

---

[1]- Dimycolyltrehalose
[2]- Arthrobacter
[3]- Nitzschia
[4]- Nannochloropsis
[5]- Navicula
[6]- Phaeodactylum

اسید استفاده می‌شود (Barclay *et al.*, 2005; Cohen and Khozin-Goldberg, 2005).

به طور کلی مخمرها و کپک‌ها نسبت به باکتریها و جلبک‌ها منبع مناسبتری برای تولید روغن می‌باشد (Li *et al.*, 2010). بهترین مخمرهای روغنی وابسته به گونه‌های کاندیدا[۲]، ریپتوکوکوس[۳]، ردوتورولا[۴]، ریزوپوس[۵]، تریکوسپورون[۶] و یاروویا[۷] هستند. به طور میانگین این مخمرها لیپید را تا حد ۴۰ درصد و در حالت بهینه تا ۷۰ درصد توده زیستی خود ذخیره می‌کنند (Beopoulos *et al.*, 2009). تحقیقات نشان داده است که بعضی از قارچ‌ها قادر به ذخیره‌سازی لیپید تا ۸۰ درصد توده زیستی خود می‌باشند در میان قارچ‌ها بسیاری از گونه‌های جنس Mortierella alpine توانایی تولید مقادیر زیادیPUFA را بر حسب شرایط محیط کشت دارند. قارچ Mortierella alpine می‌تواند تری‌آسیل گلیسرول‌های غنی از آراشیدونیک اسید را تا ۲۰ گرم در لیتر و آراشیدونیک اسید را تا ۷۰ درصد کل اسیدهای چرب تولید کند (Janga and Yang, 2008).

۱-۳-۳- خانواده مورتیرلاسه (Mortierellaceae)

این خانواده با ریسه‌های منشعب و اغلب تار عنکبوتی مشخص می‌شود و پرگنه‌های مداری سفید یا زردرنگ تشکیل می‌دهند. گونه‌های خانواده Mortierellaceae عموما از خاک جدا می‌شوند اما ممکن است در کود، چوب، برگ‌ها، قارچ‌ها ویا دیگر مواد آلی هم با آنها مواجه شد. افراد جنس Mortierella مخصوصا در خاک فراوانند و در اکولوژی خاک‌های جنگل‌های مناطق معتدل نقش چشم‌گیری بازی می‌کنند. بسیاری از افراد این جنس سرمادوست هستند و در نمونه‌های خاک با آنها برخورد نمی‌کنیم،

---

[1]- Porphyridium
[2] - *Candida*
[3] - Cryptococcus
[4] - *Rhodotorula*
[5] - *Rhizopus*
[6] - *Trichosporon*
[7] - *Trichosporon*

مگر اینکه دمای کشت پایین آورده شود (Dyal and Narvine, 2005) .

۱-۳-۳-۱- قارچ Mortierella alpine

جنس Mortierella alpine متعلق به راسته Mucorales، خانواده Zygomycota است این راسته شامل جنس Rizhopos و Mucor هم می‌شود. به طور معمول قارچ‌های درون این راسته گندخوارهایی هستند که منابع قندی ساده را بهتر از مولکول‌های پیچیده مصرف می‌کنند (Dyal and Narine, 2005). قارچ Mortierella alpine از بهترین میکروارگانیسم‌های بررسی شده برای تولید اسیدهای چرب چند غیراشباع معرفی شده است. برخی مزایای آن شامل بیماری‌زا نبودن، توانایی روغن‌زایی بالا، رشد سریع، عدم تولید رنگدانه، وجود انواعی از آنزیم‌های طویل کننده و غیراشباع ساز در قارچ رشته ای، Mortierella alpine می باشد و تحت شرایط کشت آن منجر به تولید انواعی از اسیدهای چرب چند غیر اشباع می‌شود. به عنوان مثال کاهش دمای رشد به زیر ۲۲ درجه سانتی‌گراد با افزودن نیتروژن به محیط کشت، منجر به تولید ایکوزاپنتاانوئیک اسید می‌شود (Muniglia *et al*., 2004).

۱-۳-۳-۲- عوامل موثر بر تولید روغن تک‌یاخته در Mortierella alpine

متابولیت‌های میکروارگانیسمی به دو قسمت متابولیت های اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. با توجه به اینکه روغن از اوایل رشد میکروارگانیسم در قارچ ذخیره می‌شود و در اواسط رشد میزان روغن ذخیره‌ای افزایش می‌یابد از این رو تولید روغن توسط میکروارگانیسم به اندازه‌ای که در دیواره سلولی و دیگر اجزاء ساختاری قرار می‌گیرد و کمک به رشد می‌کند را جزء متابولیت‌های اولیه در نظر گرفته شده و روغن ذخیره ای توسط میکروارگانیسم که بعد از توقف رشد و در ابتدای مرحله سکون بوجود می‌آیند جزئی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند که میزان قابل توجهی از روغن در گونه‌های روغنی در این مرحله ذخیره می‌شود. متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر دو عامل داخلی و خارجی میکروارگانیسم

است. عوامل داخلی خصوصیات ژنتیکی و عوامل خارجی شامل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی محیط کشت می‌باشد. مهمترین عوامل فیزیکی شامل دما، دور همزن و مدت زمان کشت و عوامل شیمیایی شامل کربن، نیتروژن، عناصر کم مقدار و pH محیط کشت می‌باشد. نیاز های غذایی میکروارگانیسم‌ها به دو قسمت کم مقدار و پرمقدار تقسیم‌بندی می‌شود کربن و نیتروژن از عناصر غذایی پرمقدار و بعضی از عناصر معدنی از مواد غذایی کم مقدار می‌باشد که برای رشد میکروارگانیسم مورد نیاز است وقتی از محیط کشت پیچیده استفاده می‌شود این عناصر از طریق گوهرمایه به محیط کشت وارد شده و نیاز به افزودن آن نیست (شجاع الساداتی و اسداللهی، ۱۳۸۷).

۱-۳-۴- عوامل فیزیکی و شیمیایی محیط کشت

۱-۳-۴-۱- منابع کربنی

از آنجایی که تولید روغن توسط میکروارگانیسم‌های روغنی با تولید انرژی مرتبط نیست منبع کربنی از سه مسیر در محیط کشت توسط ریزسازواره مصرف می‌شود اول اینکه۴۰ تا ۵۰ ٪ وزن خشک میکروارگانیسم را کربن تشکیل می‌دهد از این رو میزان قابل توجهی از این گوهرمایه وارد ساختار میکروارگانیسم شده دوم اینکه میزان قابل‌توجهی از منبع کربنی صرف رشد و فعالیت حیاتی میکروارگانیسم می‌شود در واقع منبع کربنی منبع اصلی تامین انرژی ریزسازواره، برای فعالیت‌های حیاتی است. نتایج تحقیقات نشان داده که میکروارگانیسم از مسیر Embden-parnas-parnas (EMP) و Pentose pHospHate (PP) کربن را برای تامین انرژی مصرف می‌کند که با توجه به نیاز میکروارگانیسم ناشی از تغییرات شرایط محیطی یکی از مسیرها انتخاب می‌شود. سوم اینکه روغن از متابولیت‌های غیر وابسته به انرژی می‌باشد بنابراین مقداری از منبع کربن نیز صرف تولید محصول می‌شود (Carter *et al*., 1971; Papagianni, 2004). از آنجایی که ساختار اصلی روغن کربن می‌باشد میزانی از گوهرمایه کربنی توسط میکروارگانیسم به روغن دگرگون سازی می‌شود. قارچ ها هتروتروف می‌باشد برای رشد نیاز به کربن آلی دارند و از آنجائیکه گونه قارچی مورتیرلا ساپروفیت می‌باشد

تمایل بیشتری به منابع کربنی ساده داشته تا به منابع کربنی پیچیده از این رو قندهای ساده‌ای مانند مونو ساکاریدی و دی ساکاریدی (گلوکز، فروکتوز و ساکاروز) به سرعت توسط این میکروارگانیسم مصرف شده و باعث رشد و تولید محصول بیشتری می‌شود. با توجه به تحقیقات وسیعی که روی قارچ مورتیرلا آلپینا انجام شده بهترین گوهرمایه کربنی برای رشد و تولید اسیدهای چرب چند غیر اشباعی، گلوکز بوده است. نشاسته نیز اثر مناسبی را بر تولید آراشیدونیک توسط این میکروارگانیسم نشان داده است (Jang *et al*., 2005).

۱-۳-۴-۲- منابع نیتروژنی

برای تولید روغن از منبع نیتروژنی به‌عنوان منبع محدود کننده رشد به منظور تولید روغن استفاده می‌شود. در شرایط کمبود منبع نیتروژنی، سلول‌ها وارد مرحله تجمع چربی می‌شوند و کربن اضافی که هنوز در محیط کشت مورد استفاده قرار نگرفته است را به چربی تبدیل می‌کنند. نتایج تحقیقات اخیر نشان داده که توانایی تجمع چربی در قارچ‌های روغنی بشدت تحت تاثیر ماهیت منبع نیتروژنی قرار می‌گیرد. منابع نیتروژنی مورد استفاده در محیط کشت شامل منابع نیتروژن آلی و معدنی می‌باشد که از آن جمله می توان به آمینواسیدها، پروتئین، ملاس چغندر و نیشکر، پودر آب پنیر، عصاره مخمر، کنجاله سویا و پپتون اشاره کرد که به طور گسترده‌ای در کشت‌های کپک‌ها به عنوان منبع نیتروژنی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Ratledge, 1993). منبع نیتروژنی در متابولیت و شکل مورفولوژی قارچ تاثیر قابل توجهی دارد. در شرایط کمبود نیتروژن فعالیت متابولیکی کاهش یافته و تا حدی ریسه خالی شده و انتهای آن می شکند. در فرایند تخمیر کاهش نیتروژن باعث شده تا ریسه ها از حالت گویچه‌ای خارج و ریسه‌ها به راحتی از هم جدا شوند در واقع گویچه ها کوچک شده و شرایط برای حساسیت مکانیکی آن فراهم می‌شود (Papagianni, 2004). تحقیقات نشان می‌دهد که منبع نیترژنی تاثیر قابل توجهی در تولید آراشیدونیک اسید توسط قارچ مورتیرلا آلپینا دارد به عنوان مثال هنگامی که از اوره به عنوان منبع نیتروژنی استفاده می‌شود باعث تغییر ژنتیکی دلتا ۵ شده و میزان

آراشیدونیک اسید کاهش قابل توجهی می‌یابد (Ratledge, 2005).

۱-۳-۴-۳- اکسیژن

بیشتر قارچ‌ها برای رشد نیاز به اکسیژن مولکولی دارند. نتایج تحقیقات نشان داده که کمبود اکسیژن در بعضی از گونه‌های قارچی باعث شده تا تولید محصول توسط میکروارگانیسم متوقف شود. تحقیقات نشان داده که الگوی مصرف اکسیژن برای رشد میکروارگانیسم با تولید محصول کاملا متفاوت می‌باشد. شرایط اکسیژن رسانی با توجه به روش تخمیر متفاوت می‌باشد. تخمیر در آزمایشگاه یا در ظروف تکان خورنده و یا در فرمانتور انجام می‌گیرد. همزدن روش مناسبی برای تامین اکسیژن در ظرف‌های تکان خورنده می‌باشد در مواردی که تولید محصول شدیدا تحت تاثیر میزان اکسیژن می‌باشد برای تامین اکسیژن کافی در ظروف تکان خورنده چنین پیشنهاد می‌شود که میزان محیط کشت بیشتر از یک دهم تا یک پنجم ظروف شیشه‌ای نباشد درحالیکه در فرمانتور از پاشش هوا یا اکسیژن خالص برای تامین اکسیژن مورد نیاز میکروارگانیسم استفاده می‌شود (شجاع الساداتی و اسداللهی، ۱۳۸۷). تولید بسیاری از اسیدهای چرب غیراشباع، مانند آراشیدونیک اسید نیاز به تامین اکسیژن کافی دارد زیرا اسیدهای چرب چند غیراشباع در مراحل غیراشباع‌سازی آنزیمی که شامل اکسیژن دار شدن[1] نیز می‌باشد، نیاز قابل توجهی به اکسیژن محلول دارد. (Higashiyama *et al.*, 2002; Kim, 1997).

۱-۳-۴-۴- دما

میزان **Q10** در قارچ ها بین ۲ تا ۳۰ متغییر می‌باشد. افزایش دما در محدوده دمایی رشد باعث افزایش رشد میکروارگانیسم می‌شود. حلالیت اکسیژن و اکسیژن در دسترس میکروارگانیسم تحت تاثیر شدید دما می‌باشد. نتایج تحقیقات نشان داده که با افزایش دما از ۲۳ به ۳۷ درجه سانتی‌گراد

[1] Oxygenation

میزان اکی‌والان اکسیژن مورد نیاز از ۱/۵۴ به ۳/۲۴ افزایش یافته است. تغییرات دمایی تاثیر قابل توجهی در تغییر مسیرهای بیوسنتز دارد (Bull and Bushell, 1976).

۱-۳-۴-۵- pH

از عوامل مهم و موثر دیگر در تولید محصول و رشد ریزسازواره pH اولیه محیط کشت می‌باشد. میزان pH تاثیر قابل توجهی در انتقال ترکیبات مغذی به ریزسازواره، حلالیت مواد مغذی در محیط کشت و فعالیت‌های آنزیمی دارد. قارچ ها در محدوده وسیعی از pH، رشد و تولید محصول می‌کنند. تغییرات pH تاثیر قابل‌توجهی در شکل ریسه قارچ نیز دارد. افزایش و کاهش بیش از حد تحمل pH باعث شده ریسه‌ها متورم شوند و نسبت به نیروی برشی حساس شوند (Bull and Bushell, 1976; Pirt and Callow 1959). از این‌رو تنظیم pH از عوامل مهم در تنظیم رشد و تولید محصول می‌باشد.

۱-۳-۴-۶- دور همزن

دور همزن و روش همزدن تاثیر قابل توجهی در مورفولوژی قارچ، میزان رشد ویژه قارچ و در عین حال تولید محصول دارد. سرعت بالای همزن به ساختار ریسه ریزسازواره که در مجاورت پره همزن قرار می‌گیرند آسیب بیشتری وارد کرده ولی عموما ریزسازواره خود را در این شرایط ترمیم می‌کند. البته این توانایی به سن ریزسازواره مرتبط می‌باشد و ریزسازواره‌های پیر توانایی کمتری در ترمیم بافت آسیب دیده دارند. دور همزن بالا، اکسیژن مورد نیاز برای رشد را فراهم کرده افزایش رشد با کاهش تولید محصول همراه است (Papagianni, 2004).

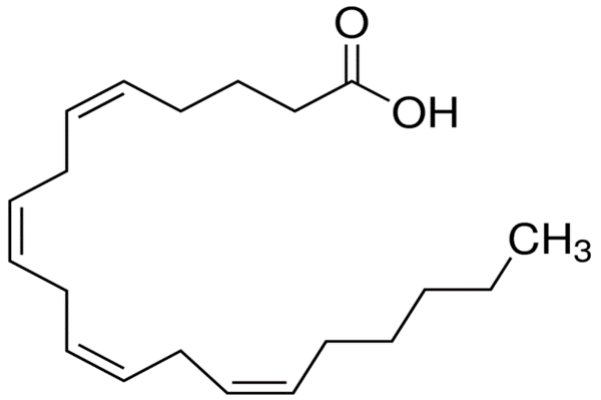
۱-۳-۴-۷- مدت زمان تخمیر

معمولاً افزایش مدت زمان تخمیر، سبب افزایش تولید روغن، توده زیستی و میزان آراشیدونیک اسید توسط قارچ مورتیرلا آلپینا می‌گردد. گونه‌های مورتیرلا آلپینا بهترین میزان تولید آراشیدونیک اسید را در مدت زمان ۱۰ روز نشان می‌دهند. آنچه در این میان اهمیت دارد، این است که افزایش بیش از

اندازه زمان تخمیر، از صرفه اقتصادی محصول تولید شده توسط ریزسازواره می‌کاهد. با توجه به این عامل، بایستی مدت زمان تخمیر به گونه‌ای انتخاب گردد که بیشترین راندمان در کمترین زمان ممکن به دست آید (Dyal and Narine, 2005).

۱-۴- آرشیدونیک اسید

اسید آراشیدونیک یک اسید چرب اشباع نشده ۲۰ کربنی است که دارای ۴ پیوند دوگانه است (شکل ۱-۲). این اسید چرب، زیرمجموعه اسیدهای چرب امگا ۶ به حساب می‌آید. آرشیدونیک اسید یکی از مهم‌ترین اسید چرب چند غیراشباع در بدن انسان می‌باشد، که عمدتاً از اسید لینولنیک موجود در غذا بدست می‌آید. در بدن، به عنوان یک جزئی از فسفولیپیدهای غشا سلول هست. آرشیدونیک اسیدها نقش‌های متنوعی در بدن ایفا می‌کنند از جمله حفاظت از مخاط معده، کاهش چربی کبد، از بین بردن سلول‌های غده‌ای، درمان پسوریازیس پوستی[1]، بهبود سوخت و ساز چربی در بیماران سیروزی[2]، کنترل حافظه، ادراک، احساس درد و حرکت نقش دارند (Higashima et al., 2002; Ward and Singh, 2005).



شکل ۱-۲-ساختار فرمولی آرشیدونیک اسید (Higashima et al., 2002)

[1]- Skin Psoriasis
[2] - Cirrhotic Patients

در بین اسیدهای چرب غیراشباع ضروری، آراشیدونیک اسـید بـا توجه به تاثیر آن، در رشد مغز و قدرت بینایی بیشتر مـورد توجـه قرار گرفته است.

آرشیدونیک اسید عمده ترین اسید چرب چند غیر اشباع در انسان است که در اندام‌ها، خون و بافت ماهیچه‌ای وجود دارد و همراه با فسفولیپیدها دارای نقش اساسی به عنوان لیپید ساختاری می‌باشد، اصلی‌ترین اسید چرب امگا ۶ موجود در بافت مغز (Ratlegdge, 2004) و پیش‌ساز بسیاری از ایکوزانوئیدها از جمله ترومبوکسان‌ها[1]، لوکوترین‌ها[2] و پروستاگلاندین‌های سری ۲[3]، می‌باشد. عملکردهای فیزیولوژی متنوعی از جمله حفاظت از مخاط معده، کاهش چربی کبد، از بین بردن سلول‌های غده‌ای، درمان پسوریازیس پوستی[4] و بهبود سوخت و ساز چربی در بیماران سیروزی[5] برای آراشیدونیک اسید گزارش شده است (Higashima et al., 2002; Dyal and Narine, 2005).Annunziata و Annunziata در سال ۲۰۱۱، آزمایش کلینیکی را روی نوزادان نابالغ که به آنها شیرهای خشک دارای مکمل DHA و آراشیدونیک اسید داده شده بود، انجام دادند و دریافتند که افزودن این مکمل‌ها در افزایش شاخص‌های تیزهوشی، توسعه حرکتی و برقراری ارتباط سودمند می‌باشند (Annunziata and Annunziata., 2011). Birch و همکاران در سال ۲۰۰۰، یک آزمایش کلینیکی روی نوزادان بالغ اجرا کردند و به آنها سه نوع فرمول شیر خشک دارای مکمل DHA و آراشیدونیک اسید، تنها مکمل DHA و بدون مکمل داده شد. شاخص توسعه روانی در گروهی از کودکان که شیر خشک دارای هر دو مکمل DHA و آراشیدونیک اسید به آنها داده شده بود، بالاتر بود (Brich *et al*., 2000). علاوه بر این، گزارش‌های مختلفی وجود دارد که PUFA ممکن است در توسعه

---

[1] Thromboanes (TX)
[2] Leukotrienes (LT)
[3] Series 2 Prostaglandins
[4] Skin Psoriasis
[5] Cirrhotic Patients

مغز نقش داشته باشند و توصیه شده که اگر ترکیب شیر خشک به گونه‌ای باشد که تا حد امکان مشابه شیر مادر باشد، بهترین تغذیه برای کودکان است (Higashiyama *et al.*, 1998).

۱-۵- تولید میکروبی آرشیدونیک اسید

تاکنون تلاش‌های بسیاری برای تولید آراشیدونیک اسید میکروبی انجام گرفته است. تعدادی از جلبک‌ها، از جمله Diatoms، CrysopHytes، CryptopHytes، Dinoflagellates و ... اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه تولید می‌کنند. به نظر میرسد تولید آراشیدونیک اسید در جلبک‌های فتواتوتروف[1] مثل Parietochloris incise و PorpHyridium cruentum تحت شرایط رشد آهسته در محیط کشت بدون نیتروژن یا با نیتروژن محدود، بهینه باشد که رشد آهسته از دیدگاه تولید صنعتی نامطلوب است. از طرفی روغن دراغلب جلبک‌ها به شکل تری آسیل گلیسرول تجمع نمی‌یابد و آنهایی که تری آسیل گلیسرول ذخیره می‌کنند فتوتروف اجباری هستند. برای مثال آراشیدونیک اسید تولیدی توسط پورفیریدیوم سرنتوم همراه گالاکتولیپیدها، لیپیدهای قطبی پیچیده که در شیر مادر وجود ندارد، است. اگرچه جلبک‌های هتروتروف مثل Nitzschia، Crypthe codinium، Pythium، PUFA را اغلب به شکل تری آسیل‌گلیسرول و فسفولیپید ذخیره می‌کنند (Ward and Singh, 2005).

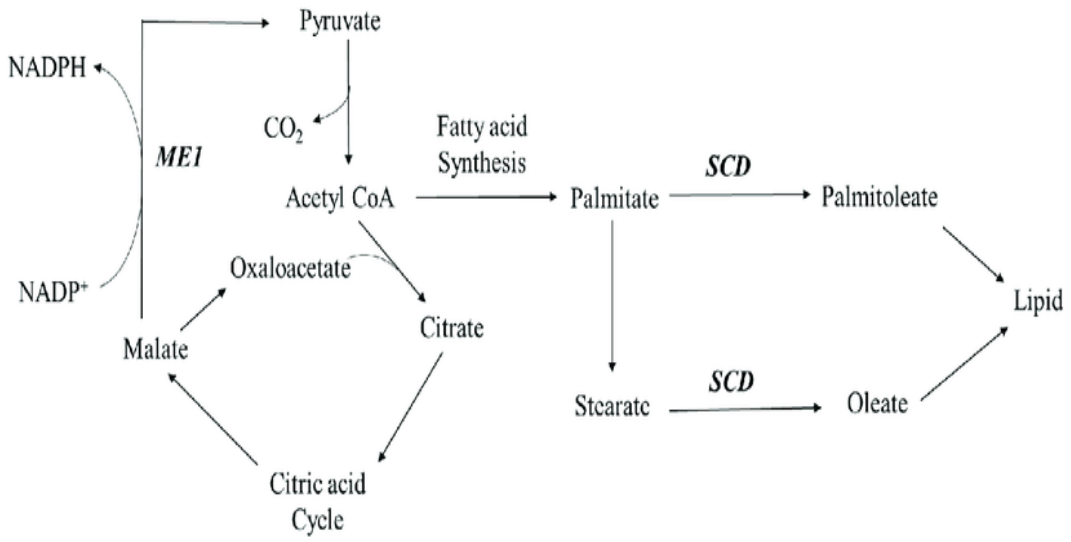
جلبک سبز پاریتوکلریز اینسیزه می‌تواند منبع بالقوهای برای تولید آراشیدونیک اسید باشد. در مقدار حداکثر تولید لیپید میزان آراشیدونیک اسید به ۵۰ درصد کل اسیدهای چرب و ۲۰ درصد توده سلولی میرسد و ۹۰ درصد آراشیدونیک اسید به شکل تری آسیل گلیسرول ذخیره می‌شود (Dyal and Narine, 2005).

---

[1]- Photoautotrophic

۱-۶- مالیک آنزیم

مالیک آنزیم (ME; EC1.1.1.40) یک آنزیم کلیدی در تجمع چربی می باشد. ME تنها آنزیم موثر در تولید NADPH مورد نیاز برای ساخت اسیدچرب می‌باشد (شکل ۱-۲). تنها یک فرم از هفت فرم



شکل ۱-۳-مسیر بیوسنتز لیپیدها و نقش آنزیم مالیک در این مسیر (Zhangy and Ratledge, 2008)

ME در تجمع چربی دخیل می باشد. شکل E مالیک آنزیم که از فرم D ساخته می‌شود توانایی سنتز چربی را دارد. نتایج تحقیقات نشان داد که یک ژن هر دو شکل آنزیمی D و E را کد می‌کند و به پروتئین حاصل از آن با هم مشابهت زیادی دارند. وقتی که ژن کد کننده این فرم از ME به گونه قارچیMucor circinelloides منتقل شد میزان روغن این گونه قارچی ۲/۵ برابر افزایش یافت. اگر این آنزیم غیرفعال شود یا فعالیتش کاهش یابد میزان ذخیره چربی به شدت کاهش می‌یابد. فعالیت آنزیم ME ارتباط مستقیمی با ذخیره شدن چربی در دو گونه قارچ رشته ای Mucor circinelloides و Mortierella alpina دارد (Zhangy and Ratledge, 2008). در تحقیقی که توسط Jin و همکاران درسال ۲۰۰۸ انجام شد نشان دادند که غلظت نیتروژن تاثیر قابل توجهی در فعالیت مالیک آنزیم و میزان آراشیدونیک اسید دارد. فعالیت این آنزیم شدیدا در مرحله رشد افزایش می‌یابد.

۱-۷- واکنش Real- Time PCR

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دارای انواع متعددی است. یکی از آنها Real Time PCR است که آن را (Assay Homogeneous) نیز می‌نامند. در این روش برخلاف روش الکتروفورز اجزای واکنش دهنده PCR از یکدیگر جدا نمی‌شوند. به طور کلی Real Time PCR تکنیکی برای مشاهده بی‌وقفه‌ی پیشرفت واکنش PCR در طول زمان است. همچنین با این روش می توان مقادیر تولیدات PCR DNA، cDNA یا RNA را نیز اندازه‌گیری کرد. این روش بر مبنای فلورسنت تولیدی از مولکول گزارشگر است که در طول واکنش افزایش می‌یابد. مولکول‌های گزارشگر فلورسنت یا به صورت رنگ-هایی هستند که به DNA دو رشته‌ای باند می‌شوند مانند SYBR Green و یا به صورت شناسه‌گرهای توالی‌های خاص مانند TaqMan Probes هستند. این تکنیک می تواند با حداقل اسید نوکلئیک آغاز شود و مقدار تولید نهایی را با دقت زیادی تعیین کند. محدود به زمان و ذخیره منابع نیست، به راحتی قابل اجرا است و دقت و حساسیت بالاتر از PCR معمولی دارد.

۱-۷-۱- تاریخچه و روش انجام Real- Time PCR

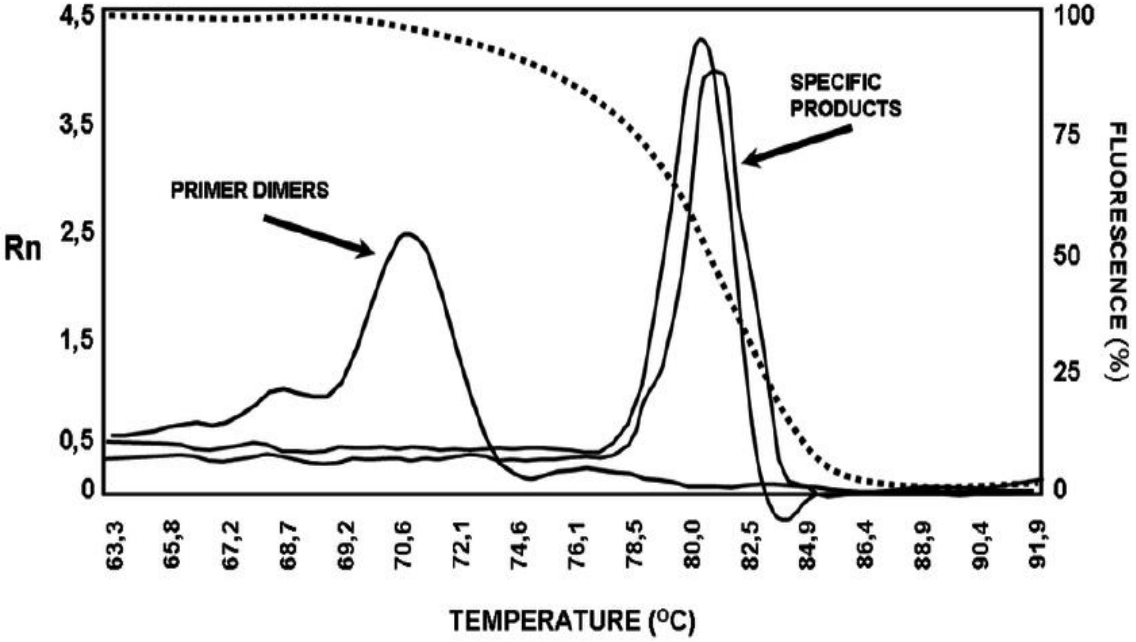
در سال ۱۹۹۲ توسط Higuchi و همکارانش معرفی شد و قادر است به منظور اندازه‌گیری تکثیر DNA در هر چرخه PCR، رنگ فلورسنت گزارشگری مثل سایبر گرین I را آشکارسازی کند در طول فاز خطی لگاریتمی تکثیر، فلورسنس تا نقطه ای افزایش می‌یابد که قابل سنجش می‌شود و به عنوان آنالیز بعدی ژن‌های هدفی است که به وسیله پرایمرهای ویژه ژن مورد استفاده در واکنش تک لوله‌ای جهت تشکیل و تکثیر cDNA، تکثیر نشده‌اند؛ بنابراین کسری RNA از نمونه‌های اصلی باید جهت آزمون بیشتر ذخیره شوند؛ اما انجام روش دو مرحله ای این مزیت را دارد که در این روش نمونه RNA در یک مرحله استفاده نمی‌شود و آنالیز بیشتر ژن هدف را امکان‌پذیر می‌سازد. آستانه چرخه (CT) یا نقطه تقاطع نامیده می‌شود؛ بنابراین با استفاده از رقت‌های متوالی DNA

استاندارد با مقدار مشخص، می‌توان مقدار DNA یا cDNA نمونه ناشـــناخته را به عنوان ارزش CT با استفاده از ترسیم منحنی استاندارد لگاریتم غلظت در مقابل CT محاسبه کرد. qPCR تکثیر و آشکارسازی نمونه را در یک مرحله انفرادی با هم انجام می دهد از این رو نیاز به هر فرآیند پـــس از تکثیری را از میان می‌برد. مزیت های دیگر RT-PCR، حساســـیت، تعیین پیشـــرفت واکنش در زمان واقعی، ســـرعت آنالیز و سنجش دقیق مواد مورد آزمون در نمونه است. این امـــر در نتیجه وجود رنگ های فلورســـنس یا پروپ های اولیگونوکلئوتیدی نشان‌دار با فلورسانس است که شدت آن ها با مقدار محصول DNA تولید شـــده، متناسب می‌باشد. جهت تسهیل انواع مختلف واکنش‌های qPCR ،انواع مختلف پلیمراز استفاده می‌شـــوند که این پلیمرازها دارای صحت باال، سرعت و مقاومت حرارتی باالیی هستند؛ بنابراین، تجهیزات PCR در زمـــان واقعی جهت انجام این واکنش ها طراحی می‌شـــوند که شـــامل ترمال ســـایکلر برای تکثیر DNA ،سیستم نوری برای برانگیختن فلوئور وفورها و گرفتن فلورســـنس نشری از شیمی آشـــکارسازی و نرم افزار ویژه برای جمع آوری و آنالیز داده‌های کمی تولید شده است (Hudecova, 2015).

۱-۷-۲- رنگ‌های فلورسنت متصل شونده به DNA

شاید متداول‌ترین رنگ مورد استفاده در این تکنیک سایبرگرین باشد. این رنـگ بـه شـیارهای کوچک DNA دو رشته ای متصل میشود و با جذب در طول موج ۴۹۸ نانومتر، نـور ۵۲۲ نـانومتری را ساطع میکند که توسط دستگاه ثبت می‌شود. در طی PCR که محصـول دو رشـته‌ای تولیـد میشـود، رنگ به آنها متصل می‌شود و بنابراین افـزایش شـدت فلورسـنت بـا غلظـت dsDNA متناسـب اسـت. سایبرگرین یک رنگ غیر اختصاصی است لذا برای تمامی آزمایشات قابل استفاده است و ایـن مسـئله یک مزیت به شمار می‌آید اگرچـه مهـم‌تـرین عیـب آن عـدم توانـایی در افتـراق DNA دو رشـته ای

اختصاصی از پرایمر دایمر ها است که برای حل این مشکل استفاده از منحنی ذوب[1] پس از انجام مراحل PCR توصیه شده است (Morison *et al.*, 1998). شکل ۱-۴ منحنی ذوب Real-Time PCR نشان می‌دهد.



شکل ۱-۴-منحنی ذوب Real-Time PCR (Morison et al., 1998)

۱-۷-۳- پروب‌های فلورسنت

پروب‌ها بر خلاف سایبرگرین بر اساس تشخیص اختصاصی توالی محصول کار می‌کنند. پروب‌ها معمولاً یک رنگ فلورسنت و یک رنگ خاموش کننده دارند. معمولاً دستگاه‌ها بازتابش رنگ فلورسنت را بررسی می‌کنند. حضور خاموش‌کننده در نزدیکی موقعیت فلورسنت موجب جذب نور آن و خاموش شدن آن می‌شود لذا در این حالت بازتابشی در دستگاه ثبت نمی‌شود. از جمله این پروب‌ها می‌توان به Taqman، scorpion و ... اشاره کرد (Marisa *et al.*, 2005).

[1] - Melting Curve

۱-۷-۴- تعیین غلظت DNA با استفاده از شاخص‌های الیگونوکلئوتیدی فلورسانس

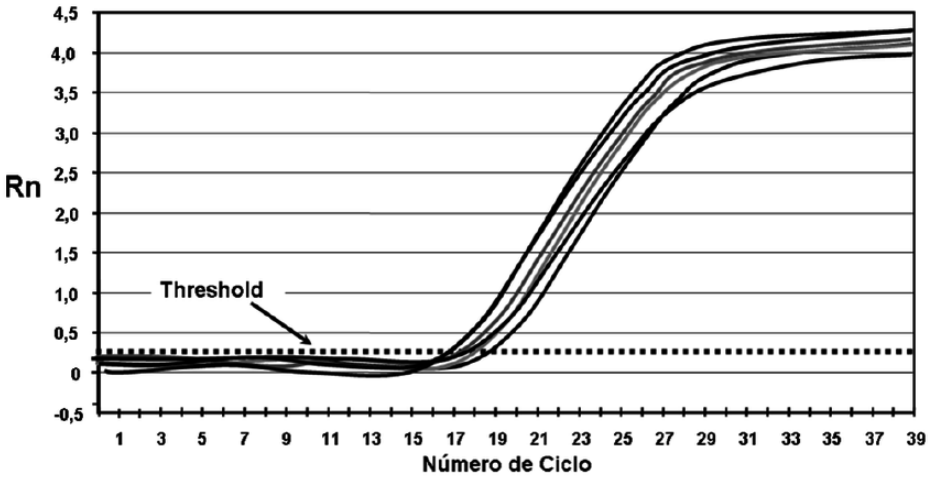
در تکنیک Real-time PCR، دقیق‌ترین و قابل اعتمادترین نتایج با استفاده از شاخص‌های گزارشگر فلورسانس به دست می‌آید که البته هزینه زیادی نیز در بردارد. در این روش از شاخص‌های DNA یا RNA ی اختصاصی (sequence specific RNA or DNA-based probe) استفاده می‌شود و در نتیجه در DNAی هدف، جستجو و تعیین غلظت برای سکانس‌های خاص امکان‌پذیر می‌شود. بنابر این حتی در حضور سایر انواع DNA، نتایج حاصل از نظر اختصاصی بودن، در حد بالائی است. در این شرایط، چنانچه از شاخص‌های اختصاصی با رنگ‌های مختلف استفاده شود، حتی می‌توان ژن‌های متعددی را در یک واکنش PCR، مورد بررسی قرار داد (Marisa *et al.*, 200).

۱-۸- روش های کمی‌سازی آنالیزهای Real time PCR

۱-۸-۱- روش منحنی استاندارد (مقایسهٔ مطلق)

به اولین چرخه‌ای که شدت فلورسنت بیشتر از خط پایه[1] باشد چرخهٔ آستانه یا CT گویند. عدد CT با مقدار الگوی اولیه رابطهٔ معنی داری دارد و از روی آن میتوان مقدار mRNA اولیه را تخمین زد. به عبارت دیگر در فاز اولیه مرحله تصاعدی مقدار فلورسنت افزایش می‌یابد تا به آستانه‌ای می‌رسد که به مقدارمشخصی از سطح background بالاتر است، این چرخه (سیکلی از PCR که قطعه تکثیر از حد آستانه عبور می کند) به عنوان CT شناخته می‌شود (شکل ۱-۵).

[1] - Threshold



شکل ۱-۵-منحنی استاندارد و خط پایه در Real-Time PCR (Vandesompele et al., 2002)

در این روش از نمونهٔ RNA یا DNA با غلظت مشخص برای رسم منحنی استاندارد استفاده می‌شود. غلظت RNA یا DNA استاندارد با اسپکتروفوتومتر (۲۶۰ نانومتر) تعیین می‌شود و سپس از روی وزن مولکولی نمونه به تعداد نسخه های آن تبدیل می‌شود. استانداردهای غلظتی ژن‌های معروف به صورت تجاری قابل خریداری است. نمونه‌های استاندارد رقیق شده‌ای را همراه با نمونه هدف در دستگاه Real-time PCR قرار می‌دهیم. ابتدا یک نمودار از نمونه‌های رقیق شده بدین صورت که محور X میزان رقیق‌سازی یا تعداد کپی ژن و محور Y میزان CT قرائت شده از دستگاه است، رسم می‌کنیم در ادامه عددCT نمونه هدف را با دستگاه محاسبه کرده سپس در نمودار رسم شده میزان کپی و یا غلظت آن را به دست می‌آوریم. سعی بر آن است که طول قطعه هدف و نمونه‌های استاندارد یکسان باشند (Vandesompele *et al*., 2002) .

۱-۸-۲- روش آستانه نسبی (مقایسهٔ نسبی)

برای حذف نوسانات مقادیر RNA وارد شده در واکنش و خطاهای عملکرد دستگاه‌ها و فرد از استانداردهای داخلی استفاده میشود. این استانداردها باید در همهٔ بافت‌ها بیان ثابت داشته باشند و آزمایش ما نباید بیان آن را نسبت به نمونهٔ کنترل تغییر دهد. بدین منظور از ژن‌هایی تحت عنوان

Housekeeping genes مانند actin و GAPDH استفاده میشود. بیان این ژن‌ها ثابت است و از مقایسه نمونه تیمار شده با شاهد و کنترل داخلی می‌توان کاهش یا افزایش بیان را مشاهده کرد.

به طور کلی Real time PCR چند مرحله دارد که عبارت است از:

Baseline rgion: در این مرحله هیچ گونه نوری قابل رویت نیست.

Exponential pHase: محصول دو رشته‌ای در هر چرخه دو برابر می‌شود و رشد تصاعدی مربوط به واکنش آغاز می‌شود.

The liner pHase: ترکیبات واکنش و کارایی آنها روبه اتمام است.

The plateau pHase : ترکیبات واکنش از بین می‌روند و افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده نمی‌شود (Vandesompele *et al*., 2002) .

۱-۹- مزایای روش Real- Time PCR

تکثیر در هر زمان قابل مشاهده می‌باشد. به عبارتی امکان ثبت لحظه به لحظه واکنش فراهم آمده و در هر سیکل امکان بررسی فرآیند تکثیر وجود دارد.

-امکان بهینه سازی واکنش به طوری که مناسب‌ترین غلظت DNA و پرایمر و همچنین تعداد سیکل لازم برای تکثیر مشخص می‌شود.

-امکان قطع واکنش در زمان دلخواه وجود دارد. از آنجایی که روند PCR قابل مشاهده می‌باشد، در صورت عدم تکثیر یا رفتن به فاز سکون می‌توان به واکنش خاتمه داد و از اتلاف وقت و انرژی پرهیز نمود.

-امکان انجام PCR کمی با استفاده از روش کمیت مطلق (Absolute Quantification) و کمیت

نسبی (Relative Quantification) جهت بررسی تعداد دقیق یا نسبی الگوی اولیه وجود دارد.

-معمولا واکنشها سریعتر اتفاق می‌افتد و زمان کمتری لازم است.

-محدوده تشخیص آن بالاتر از PCR معمولی است. حتی اختلاف کمتر از ۲ برابر را هم نشان می‌دهد (Marsia *et al*., 2005).

۱-۱۰- کاربردهای روش Real- Time PCR

از کاربردهای Real- Time PCR می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

تعیین تعداد دقیق کپی از هر ژن، سنجش میزان بیان ژن، سنجش ویروس‌ها، اندازه‌گیری میزان آسیب به DNA، بررسی میزان اثر بخشی داروها و ثبت داروها، تشخیص سریع آلودگی به بعضی عوامل بیماری‌زا، پیگیری نتایج پس از پیوند سلول‌های بنیادی خونساز، ژنوتایپینگ و تشخیص انواع جهش‌ها شامل الحاق، حذف، جهش نقطه‌ای و غیره را بررسی می‌کند (Marsia *et al*., 2005).

با توجه به نکات ذکر شده در ابتدا فاکتورهای محیطی میزان نیتروژن و کربن در تولید روغن بررسی می‌شود در شرایط بهینه تولیدروغن در حین فرایند تخمیر بیان ژن کلیدی تولید روغن بررسی می‌شود. در مورد بررسی سطح بیان ژن در سطح RNA، در این تحقیق قارچ مورتیرلا آلپینا با استفاده از روش کمیت نسبی میزان بیان ژن‌های داخلی در حین فرایند تخمیر بررسی و بهینه می‌شود. در تحقیق حاضر تغییرات تولید توده زیستی و روغن قارچ مورتیرلا آلفینا و بیان ژن‌های مالیک همزمان بررسی می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی بیان ژن مالیک گونه قارچی مورتیرلا که در حین رشد و تجمع روغن می‌باشد تا ارتباط بیانی این ژن ها تحت تاثیر ترکیبات محیط کشت و رشد بررسی شود.

فصل ۲: مروری بر مطالعات پیشین

با توجه به اهمیت قارچ Mortierella alpine به علت تولید بالای روغن غیر چند اشباعی تحقیقات وسیعی در زمینه بررسی شرایط مناسب فیزیکی و شیمیایی کشت و عوامل ژنتیکی موثر در تولید روغن غیر چند اشباعی به عمل آمده است. شرایط مناسب کشت باعث شده میزان تولید روغن افزایش یابد که در این زمینه تحقیقات فراوانی انجام شده است. از این رو به برخی از این تحقیقات که در زمینه بررسی تاثیر عوامل محیطی بر تولید روغن از گونه قارچی Mortierella alpine در محیط کشت‌های مختلف و ارتباط آن با میزان بیان ژن آنزیم مالیک اشاره خواهیم کرد:

در طی مطالعه‌ای مروری Rayaroth و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی منشا، تکامل و پیشرفت تولید آرشیدونیک اسید از گونه قارچی Mortierella alpine پرداختند، که در این مطالعه پیشرفت‌های کلی در جداسازی، شناسایی، مشخصه‌های مولکولی، تحولات بیوتکنولوژی و تولید چشم‌انداز آینده آرشیدونیک اسید از قارچ Mortierella alpine مورد بحث قرار گرفته است (Rayaroth *et al*., 2017).

در تحقیقی که توسط Malaiwong و همکاران (۲۰۱۶) برای بهینه سازی تولید آرشیدونیک اسید از Mortierella alpina PRAO7-10 با روش پاسخ سطحی انجام دادند که هفت پارامتر درجه حرارت، pH، درصد حجم متوسط و غلظت گلوکز، پتاسیم نیترات، دی‌پتاسیم فسفات و پودر ایزوله سویا بر تولید زیست توده و آرشیدونیک اسید در این قارچ مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که درجه حرارت و درصد حجم متوسط در تولید زیست توده و آرشیدونیک اسید نقش مهمی ایفا می‌کنند در حالی‌که گلوکز و پودر ایزوله سویا تنها بر تولید آرشیدونیک اسید تأثیر می‌گذارد (Malaiwong *et al*., 2016).

حسینعلی زاده در سال ۱۳۹۶ بررسی میزان تولید روغن از گونه قارچی Mortierella alpine با استفاده از منبع کربنی آب پنیر را مورد مطالعه قرار داد. 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. 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. کاهش اندک توده زیستی در فاز مرگ می‌تواند ناشی از مصرف روغن ذخیره ای باشد که تأمین کننده انرژی میکروارگانیسم می‌باشد. 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 می‌دهدکه فعالیت آنزیم‌های غیراشباع ساز در این تیمار کاهش یافته که با تجمع روغن ارتباط مستقیم دارد (حسینعلی زاده، ۱۳۹۶).

Sakuradani و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که آراشیدونیک اسید و EPA در قارچ ها عموما از مسیر n-6 و n-3 تولید می‌شوند. نتایج تحقیقات نشان داده که افزایش فعالیت و بیان ژن (DGAT2) باعث شده تا میزان تری گلیسیریدها در روغن افزایش و میزان کل اسیدهای چرب آزاد در روغن کاهش یابد. تحقیقات اخیر نشان داده که مقداری از PUFA به صورت تری گلیسیرید در سلول ذخیره شده و مقداری دیگر در فسفولیپیدهای غشائی ذخیره شده‌اند. در تحقیقی که توسط Sze-Yeen و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد نشان داده شد که قارچ مورتیرلا آلپینا، آراشیدونیک اسید را عموما به صورت تری گلیسیرید ذخیره می‌کند. در ابتدا رشد میزان ARA درفسفولیپیدها بالا بوده

و با افزایش سن قارچ میزان ARA در فسفولیپیدها کاهش و در چربی خنثی افزایش می‌یابد. بیشترین میزان ARA در چربی خنثی ذخیره ای (۷۰ تا ۸۰٪) است که حدود ۲ برابر فسفولیپیدها و ۱۰ برابر اسفنگولیپید-گلیکولیپید می‌باشد.در تحقیقی که توسط Rocky و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی گونه قارچی Mortierella alpina صورت گرفته تاثیر عواملی مانند نوع منبع کربنی (گلوکز و گالاکتوز)، نوع منبع نیتروژنی (پپتون و عصاره مخمر)، درجه حرارت، سرعت همزدن و مدت زمان تخمیر بر تولید آراشیدونیک اسید بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان آراشیدونیک اسید ۸۱/۸۵ میلی گرم در لیتر محیط کشت می‌باشد. گلوکز، عصاره مخمر و مدت زمان تخمیر باعث افزایش آراشیدونیک اسید شده در حالیکه افزایش درجه حرارت و سرعت همزدن باعث کاهش سطح *آراشیدونیک اسید* گردیده است (Rocky *et al*., 2011).

در مطالعه‌ای توسط صمدلویی و همکاران در سال ۱۳۹۳، به بررسی سوخت و ساز قارچ Mortierella alpine در شرایط بهینه تولید روغن و آراشیدونیک اسید با استفاده از روش سطح پاسخ پرداختند. در این تحقیق شرایط بهینه تولید روغن و آراشیدونیک اسید توسط گونه قارچی مورتیرلا آلپینا CBS 754.68 از نظر میزان کربن (گلوکز) در پنج سطح (۴۵/۸، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۷۴/۱۴ گرم در لیتر)، منبع نیتروژنی (پودر سویا) در پنج سطح (۷/۹۲، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۲/۰۷ گرم درلیتر) به روش آماری سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که برای تولید حداکثری روغن (۵۰٪)، گلوکز باید ۷۰ و پودر سویا ۱۰ گرم در لیتر باشد و برای تولید بهینه آراشیدونیک اسید (۴۰٪/۵۶) گلوکز ۳۵/۵۰ و پودر سویا ۳۰/۱۸ گرم در لیتر باشد. در مرحله بعد تغییرات ترکیبات محیط کشت و توده زیستی در حین فرایند تخمیر در دو محیط کشت بهینه بررسی شد. نتایج نشان داد که تولید روغن و آراشیدونیک اسید به ترتیب با توقف رشد میکروارگانیسم و ذخیره روغن افزایش قابل توجه‌ای می‌یابد و ترکیبات فنولیک با رشد سلول و میزان روغن میکروارگانیسم ارتباط مستقیم دارد

(صمدلویی و همکاران، ۱۳۹۳).

لاکتوز به عنوان منبع کربن بیشترین تأثیر را بر تولید لیپید دارد. علاوه بر این، لینولئیک اسید در حضور لاکتوز تولید می‌شود، بنابراین لاکتوز به عنوان بهترین منبع کربن است. پپتون و تریپتون به عنوان منبع نیتروژن به ترتیب برای تولید لینولئیک و لینولنیک اسید توسط Mortierella vinacea انتخاب شدند. تمام این یافته‌ها نشان می دهد که سویه Mortierella یک کاندید بالقوه برای افزایش محتوای لینولئیک اسید و لینولنیک اسید است. همچنین، این شرایط ساده محیط کشت می‌تواند برای تولید لینولئیک اسید و لینولنیک اسید در مقیاس بالاتر، برای اهداف صنعتی استفاده شود. در مطالعه‌ای که توسط Nasr و همکاران در سال ۲۰۱۷، با عنوان اثر منابع کربنی و نیتروژنی بر روی پروفایل اسیدهای چرب قارچ مورتیرلا وینشیا انجام شد، به تولید و بهینه‌سازی لیپیدها و اسیدهای چرب توسط قارچ Mortierella vinacea، با استفاده از محیط‌های کشت مختلف بود تا اسیدهای چرب با ارزش برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی به دست آید. همچنین، اثر چندین منبع کربن و نیتروژن بر روی بیومس، تولید لیپید و اسیدهای چرب بررسی کردند. نتایج نشان داد که، بیشترین میزان تولید لیپید در محیط کشت حاوی لاکتوز و عصاره مخمر یافت شد (۲۶/۶۶درصد). لینولئیک اسید تنها در حضور لاکتوز و عصاره مخمر (یا پپتون) تولید شد (۲۵/۷درصد). با این حال، قارچ Mortierella vinacea بیشترین سطح لینولئیک اسید (۵۲/۷۶درصد) را در محیط کشت حاوی پپتون تولید کرد، لینولنیک اسید تنها در حضور لاکتوز و تریپتون به دست آمد (Nasr *et al*., 2017).

با توجه به اهمیت آراشیدونیک اسید در تغذیه انسان، گونه کپکی مورتیرلا آلپینا به علت تولید مقادیر قابل توجه ای از آراشیدونیک اسید مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. از آنجایی که گونه قارچی Mortierella alpine توانایی مصرف منابع کربنی پلی ساکاریدی را ندارد. صمدلویی و همکاران در پژوهشی به بررسی اسید چرب غیراشباع تولید شده در قارچ Mortierella alpine در محیط‌های

کشت پلی‌ساکاریدی هیدرولیز شده پرداختند، در این پژوهش پلی ساکاریدهای گیاهی با عصاره آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکویی آمیلو فاسینس تثبیت شده، هیدرولیز شدند و با فرموله کردن محیط کشت، روند تولید اسیدهای چرب غیراشباع و توده زیستی قارچی مورتیرلا آلپینا سویه ۷۵۴ , ۶۵ بررسی شد. در مرحله اولیه به منظور رشد گونه قارچی در محیط کشت پیچیده، پلی‌ساکاریدها با عصاره آنزیمی آلفا آمیلاز گونه باکتری تثبیت شده باسیلوس لیکویی آمیلو فاسینس هیدرولیز شدند. نتایج نشان داد که در اثر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، میزان قند احیای تولیدی از عصاره جوانه‌ی گندم، ارزن و گندم به ترتیب ۱۰۲/۵۱، ۵۷/۵۰ و ۵۱/۶۲ گرم بر لیتر بدست آمد. محیط هیدرولیز شده با منبع پروتئینی پودر سویا و پپتن فرموله شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان وزن خشک توده‌ی زیستی مورتیرلا آلپینا در محیط کشت فرموله شده جوانه‌ی گندم (۳/۷ درصد محیط کشت) و کمترین آن از محیط کشت برنج (۱/۷۲درصد محیط کشت) بدست آمد. بررسی پروفایل اسید چرب مورتیرلا نشان داد که بیشترین درصد اسید چرب لینولئیک اسید(۴۱/۷۸ درصد روغن) در محیط کشتی با منبع کربنی ذرت، اولئیک در منبع کربنی برنج (۳۰/۶۱ درصد روغن) و آراشیدونیک اسید (۵۴/۲۷ درصد روغن) در منبع کربنی سیب زمینی بدست آمد. نتایج نشان داد که منبع کربنی تاثیر قابل توجه ای در پروفایل اسید چرب و اسید چرب غالب روغن مورتیرلا دارد و از این رو تغییر منبع کربنی می تواند دامنه وسیعی از اسید های چرب چند غیر اشباع را در این گونه میکروبی ایجاد کند (صمدلویی و همکاران، ۱۳۹۶).

در تحقیقی منتظری و همکاران به بررسی اثر شربت گلوکز و شکر قهوه‌ای به عنوان سوبسترا ارزان قیمت در تولید روغن توسط گونه قارچی Mortierella alpine پرداختند. در پژوهش حاضر، از منابع کربنی ارزان قیمت گلوکز مایع، شکر قهوه‌ای و نشاسته برای تولید روغن و آراشیدونیک اسید از گونه قارچی Mortierella alpine استفاده شد. قند احیا به روش دی‌نیتروسالسیلیک‌اسید (DNS)، روغن با

استفاده از دستگاه سوکسله و نوع اسید چرب با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی طیف سنج جرمی اندازه‌گیری شد. منابع کربنی به جز منبع کربنی نشاسته براساس قند احیا در سطح ۷۰ گرم در لیتر و پودر سویا در همه نمونه‌ها در سطح ۱۰ گرم در لیتر تنظیم شد. نتایج نشان داد که میزان درصد روغن در توده زیستی به ترتیب در محیط‌های گلوکز مایع ۳۲، نشاسته ۲۵ و شکر قهوه ای ۱۳ درصد آراشیدونیک اسید در روغن به ترتیب در محیط های گلوکز مایع ۳۷، نشاسته ۳۳ و شکر قهوه‌ای ۳۱ درصد به دست آمد. نتایج نشان داد که اجزای اسید چرب تشکیل دهنده روغن تحت تاثیر رشد میکروارگانیسم است. افزایش رشد توده زیستی، اسیدهای چرب ساختاری روغن مانند استئاریک اسید و اولئیک اسید را افزایش داد. شرایط نامناسب محیط کشت باعث شد بازده تولید توده زیستی و روغن کاهش یابد (منتظری و همکاران، ۱۳۹۵).

در مطالعه‌ای حسینی و همکاران (۱۳۸۹)، به بررسی تولید روغن میکروبی به وسیله Mortierella alpine پرداختند. 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. یافته‌ها نشان داد که مدت زمان رشد قارچ Mortierella alpine را میتوان به سه ناحیه تقسیم‌بندی نمود. بدین صورت که در طی دو روز اول رشد بیشترین بازده تولیدی زیست توده و کمترین نرخ تولید روغن وجود دارد. به این ترتیب روند کاهش گلوکز در این دو روز با شدت کمتری صورت می‌گیرد. از روز ۲-۶ با کاهش منبع نیتروژن شدت تولید زیست توده کاهش یافته و متعاقباً تولید روغن شدیدا افزایش و کاهش منبع کربن سریع‌تر می‌شود. از روز ۶ تا ۱۰ به تدریج تولید زیست توده به نزدیک صفر رسیده و تولید روغن نیز با شدت کمتری صورت میگیرد، پس روند تغییرات گلوکز نیز کاهش می‌دهد (حسینی و همکاران، ۱۳۸۹).

مطالعه دیگری توسط Grantina-Ievina و همکاران (۲۰۱۴)، برای بررسی تولید اسیدهای چرب توسط گونه‌های Mortierella و Umbelopsis جدا شده از خاک‌های آب و هوایی معتدل صورت گرفت. غربالگری اولیه برای تولید بالای آرشیدونیک اسید در محیط کشت آگار با عصاره مالت با ژلاتین و دکستروز سیب زمینی با آسپرین و بدون آسپرین انجام شد. نتایج نشان که پنج جدایه در محیط کشت آگار با آسپرین رشد کردند ولی حاوی آرشیدونیک اسید نبودند، اما دارای مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیر اشباع نشده مانند لینولئیک اسید و اولئیک اسید بودند. برخی از جدایه ها مقادیر بالایی اسید چرب و آرشیدونیک اسید را در محیط‌های حاوی مقادیر کمتری کربن و دمای پایین محیط کشت تولید کردند (Grantina-Ievina *et al*., 2014).

در تولید میکروبی آرشیدونیک اسید معمولا از کربوهیدرات‌ها به عنوان سوبسترا محیط کشت استفاده می‌شود. به کارگیری، محیط‌های حاوی گلیسرول توجه محققان را به عنوان جایگزین قابل اعتماد کربوهیدرات‌ها برای صنعت بیوتکنولوژی جلب کرده است. Dedyukhina و همکاران (۲۰۱۲)، اثر گلیسیرین خالص بر رشد و تولید آرشیدونیک اسید و سدیم لیپید در دو سویه Mortierella alpina LPM-301 و NRRL-A-10995 مورد مقایسه و بررسی قرار دادند. نتایج نشان دادکه مقدار آرشیدونیک اسید از ۲۲-۲۹ درصد و مقدار سدیم لیپید از ۶۳-۶۸ درصد بسته به غلظت اولیه گلیسرول در محیط کشت متغیر است. بعد از بهینه سازی غلظت گلیسرول در محیط کشت نشان داد که تولید آرشیدونیک اسید به ۴۰-۴۳ درصد از کل لیپیدها و ۱۱-۱۳ درصد در کل زیست توده افزایش پیدا کرد، که این نتایج ثابت کرد گلیسرول می تواند جایگزین مناسبی برای کربوهیدرات‌ها در محیط کشت برای تولید آرشیدونیک اسید باشد (Dedyukhina *et al*., 2012).

Hao و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای به بررسی افزایش اسید چرب غیراشباع و تولید آرشیدونیک اسید به وسیله بیان بیش از حد آنزیم مالیک میتوکندریای در Mortierella alpine

پرداختند. در این تحقیق، ژن میتوکندریایی آنزیم مالیک از گونه قارچی Mortierella alpine با بیان بیش از حد مورد مطالعه قرار گرفت. در مقایسه با گروه شاهد، مقدار آرشیدونیک اسید قارچی، به میزان ۶۰ درصد افزایش می‌یابد و تاثیری بر مقدار کل اسید چرب ندارد. یافته‌ها نشان داد که افزایش فعالیت مالیک آنزیم می‌تواند یک مؤلفه موثر برای افزایش تولید صنعتی آرشیدونیک اسید در Mortierella alpine باشد (Hao et al., 2014).

در سال ۲۰۱۲، Zeng و همکاران بهبود تجمع آرشیدونیک اسید در Mortierella alpine از طریق افزودن ویتامین‌های گروه ب بررسی کردند. که در این تحقیق با افزودن ویتامین‌های گروه ب، مقدار آرشیدونیک اسید ۱/۷ برار مقدار محیط کشت فاقد ویتامین ب شد. در عین حال، بالاترین فعالیت‌های اختصاصی آنزیم های کلیدی در متابولیسم آرشیدونیک اسید، از جمله آنزیم مالیک، گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز و سیترات لیاز، به ترتیب ۶۳/۳، ۳۸/۶ و ۵۳/۷ درصد بیشتر از شاهد بود. ویتامین‌ها ممکن است موجب بهبود مکانیزم انباشت آرشیدونیک اسید شود، بنابراین مشخص شد که ویتامین‌های گروه ب می‌توانند به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز آرشیدونیک اسید یا پیش‌سازهای تشکیل NADPH و استیل کوآنزیم آ که برای سنتز آرشیدونیک اسید حیاتی هستند، عمل کنند (Zeng *et al*., 2012).

در تحقیقی Zhu و همکاران (۲۰۰۶) بهینه‌سازی تولید آراشیدونیک اسید توسط مورتیرلا آلپینا M6 در کشت غیر مداوم خوراک‌دهی شده[1] 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 ۲ روز اول کشت هنگامی‌که غلظت گلوکز g/L ۳۰ و g/L ۵۰ باشد با سرعت بیشتری نسبت به زمانی‌که غلظت گلوکز g/L ۸۰، g/L ۱۰۰ و g/L ۱۲۰ باشد، رشد می‌کند و هر چه غلظت گلوکز اولیه

[1]- Fed-batch culture

بیشتر باشد، سرعت رشد قارچ کمتر است. هنگامی‌که غلظت گلوکز g/L ۳۰، g/L ۵۰ و g/L ۸۰ باشد، تولید توده زیستی به بیشترین مقدار خود به‌ترتیب در روز ۳، ۴ و ۹ می‌رسد و پس از آن کاهش می‌یابد. هنگامی‌که غلظت گلوکز g/L ۱۰۰ و g/L ۱۲۰ 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 (g/L ۲۲/۵) در غلظت گلوکز اولیه g/L ۱۲۰ بدست می‌آید (Zhu *et al*. 2006).

Nisha و Venkateswara در سال ۲۰۱۱ طی پژوهشی به بررسی اثر متغیرهای کشت بر تولید آراشیدونیک اسید در قارچ *Mortierella alpine* پرداختند. نتایج نشان داد که موثرترین محیط رشد و تولید اسید آراشیدونیک، عصاره گلوکز مخمر می‌باشد. pH بهینه و درجه حرارت به ترتیب ۶/۵ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد بود.گلوکز، کارآمدترین منبع کربن برای زیست توده و تولید لیپید در این سویه قارچی بود که پس از ۷ روز کشت، ۶/۸ گرم بر لیتر زیست توده خشک و ۴۰/۲ درصد لیپید به دست آمد. تولید حداکثر آراشیدونیک اسید ۴۰/۴۱ درصد در محیط حاوی رامنوز بود اما شامل زیست توده و تولید لیپید بالاتر نبود. در سویه Mortierella alpine CBS 528.72 بیشترین محتوای چربی در محیط پپتون مشاهده شد. علاوه بر این، مشخص شد که زیست توده و تولید آراشیدونیک اسید به شدت در یک محیط با روغن‌های گیاهی به عنوان منبع کربن منحصر به فرد کاهش یافته است، اما باعث ایجاد روند لیپوژنیک منجر به تجمع بیشتر لیپیدهای کل می‌شود. تحت شرایط ایده‌آل ذکر شده در بالا، حداکثر مقدار زیست توده، کل لیپیدها و اسید آراشیدونیک به ترتیب ۸/۶ گرم در لیتر، ۴۱/۶درصد و ۳۵/۲۸ درصد کل اسیدچرب در سیستم غوطه‌وری مشاهده شد (Nisha and Venkateswaran, 2011).

صمدلویی و مخبری در سال ۱۳۹۴ به بررسی بررسی بیان ژن‌های طویل ساز گونه Mortirella alpine در شرایط مناسب تولید آراشیدونیک اسید و روغن پرداختند. تولید توده زیستی، روغن، آراشیدونیک اسید توسط گونه قارچی Mortierella alpine CBS 754.68 در سطوح مختلف گلوکز و سویا بررسی شد تا ارتباط آن با بیان ژن‌های طویل ساز موثر در تولید آراشیدونیک اسید در این محیط‌های کشت مطالعه شود. نتایج نشان داد در سطح پایین گلوکز (۵۰ گرم در لیتر) و پودر سویا (۱۰ گرم در لیتر) میزان تولید روغن حداکثری (٪۴۷ توده زیستی) می‌باشد. بدون در نظر گرفتن ترکیبات محیط کشت آراشیدونیک اسید در کل فرایند تخمیر افزایش یافت. مشاهدات نشان داد که در سطوح پایین گلوکز (۵۰ گرم در لیتر) و بالای سویا (۲۰ گرم در لیتر) میزان تولید آراشیدونیک اسید (٪۵۶ روغن) قابل توجه بود. میزان بیان ژن GLELO وقتی میزان کربن به زیر ۵ گرم در لیتر در روز ششم رسید کاهش یافت. با بررسی میزان بیان ژن MALC1 و GLELO چنین مشخص شد که GLELO ژن محدود کننده تولید آراشیدونیک اسید می‌باشد (صمدلویی و مخبری، ۱۳۹۴).

محمدی‌نصر و همکاران در سال ۱۳۹۳، طی پژوهشی استفاده از منبع کربوهیدراتی و پسماندهای روغنی در تولید لیپید از قارچ Mucor hiemalis را برررسی کردند.که تعداد مشخص اسپور قارچ در محیط کشت با سه نوع منبع کربن شامل گلوکز یا پسماند روغنی مرغ و یا پسماند روغنی ماهی، کشت داده شد. محیط‌های تولید شامل دو نوع محیط بود که محیط "الف" منحصرا دارای منبع کربن و نیتروژن بوده و محیط "ب" محدودیت منبع نیتروژنی بیشتری نسبت به محیط "الف" داشت. نتایج نشان داد که بازده تولید لیپید در محیط "ب" در مقایسه با محیط "الف" افزایش نشان می‌دهد. زیرا محدودیت منبع نیتروژن در محیط "ب" سبب می‌شود که در فاز رشد لگاریتمی، میکروارگانیسم سریعتر به مرحله تولید لیپید برسد. همچنین یافته‌های این تحقیق نشان داد استفاده از پسماندهای

روغنی علاوه بر دسترسی آسان و کاهش هزینه، منجر به افزایش تولید لیپید در قارچ Mucor hiemalis می‌شوند (محمدی‌نصر و همکاران، ۱۳۹۳).

با توجه به اثرات تغذیه ای و دارویی آراشیدونیک اسید در سیستم عصبی انسان مخصوصا نوزادان این اسید چرب در سالهای اخیر به شدت مورد توجه قرار گرفته و توانسته است در ساختار فرمولاسیون غذای نوزادان قرار گیرد. در مطالعه‌ای حسنی و همکاران (۱۳۹۱)، به بررسی تولید و استخراج این اسید چرب از اصلی‌ترین منبع تولید آن که قارچ Mortierella alpine می‌باشد پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که، تولید روغن در میکروارگانیسم‌های چربی‌زا یک فرایند دو مرحله‌ای است که زمانی آغاز می‌شود که ارگانیسم قادر به ساخت مواد ضروری سلول مثل پروتئین، اسید نوکلئیک و ... نمی‌باشد و یک ماده ضروری اصلی به غیر از کربن و اکسیژن در محیط به اندازه کافی وجود ندارد که معمولا این ماده منبع نیتروژن است. بنابراین باید منبع نیتروژن را در حدی در نظر گرفت که بعد از رسیدن به جمعیت مناسب شرایط برای تولید روغن مناسب گردد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۱).

طی مطالعه‌ای اسدی و همکاران (۱۳۹۳) به بررسی تولید آراشیدونیک اسید توسط Mortierella alpine در تخمیر حالت جامد با استفاده از تفاله خرما پرداختند. تولیدآراشیدونیک اسید توسط کشت *جدایه* Mortierella alpine CBS 528.72 برتفاله خرما در تخمیر حالت جامد با استفاده از طرح پلاکت برمن انجام گرفت. به منظور تامین منبع نیتروژن، کنجاله سویا اضافه شد. تاثیر یازده متغیر شامل اندازه ذرات، میزان رطوبت، pH اولیه، نسبت کربن به نیتروژن سوبسترا، مکمل‌های روغن بزرک و سویا، سن تلقیح، دما و مدت زمان گرمخانه‌گذاری، مدت زمان پیش تیمار حرارتی و مکمل نیتروژن بر میزان تولید آراشیدونیک اسید در دو سطح بررسی گردید. یافته ها نشان داد که با اصلاح تفاله خرما توسط عوامل ذکر شده، می‌توان به تولید روغن تک یاخته حاوی بیشترین مقدار آراشیدونیک

-اسید توسط قارچ Mortierella alpine دست یافت (اسدی و همکاران، ۱۳۹۳).

در تحقیقی که توسط Hao در سال ۲۰۰۸ انجام شد نشان داده شد که قارچ Mortierella alpine، آراشیدونیک اسید را عموما به صورت تری گلیسیرید ذخیره می‌کند. در ابتدا رشد میزان ARA درفسفولیپیدها بالا بوده و با افزایش سن قارچ میزان ARA در فسفولیپیدها کاهش و در چربی خنثی افزایش می‌یابد. بیشترین میزان ARA در چربی خنثی ذخیره‌ای (۷۰ تا ۸۰٪) است که حدود ۲ برابر فسفولیپیدها و ۱۰ برابر اسفنگولیپید-گلیکولیپید می‌باشد (Ho, 2008).

فرمانبر و همکاران در سال ۱۳۹۶ به بررسی بررسی ویژگی‌های ساختاری، عملکردی و دامنه میزبانی آنزیم‌های مؤثر در تولید و تجمع لیپید در قارچ‌های روغنی پرداختند. در این تحقیق به منظور واکاوی مکانیسم‌های مولکولی مرتبط منجر به آشکارسازی آنزیم‌های مالیک کد شده از ژن‌های MAE11 ، mce23، mce22،mce21 و MAE12 به عنوان آنزیم‌های مؤثر در تولید و تجمع لیپید در گونه‌های مختلف قارچ‌های روغنی شد. پایش ویژگی‌های ساختاری این ژن‌ها، ضمن آشکارسازی طول و محتوی CG متفاوت، پیوسته بودن تمامی آن‌ها را آشکار نمود. بررسی ویژگی‌های ساختاری آنزیم‌های مذکور ضمن آشکارسازی موقعیت سلولی آن‌ها، حضور دمین‌های عملکردی MAO1_MF،Malic_M و malic را در تمامی آن‌ها با قابلیت تأثیرپذیری از تغییرات پس از ترجمه را نشان داد. تشابه‌یابی پروتئینی آنزیم‌های مذکور، منجربه معرفی گونه‌های قارچی با قابلیت احتمالی تولید چربی شد. از سویی دیگر مدلسازی ساختاری آنزیم‌ها و شبه آنزیم‌های مالیک انتخابی ضمن ایجاد مدل‌های ساختاری مناسب، کیفیت و کارایی مطلوب آن‌ها در اتصال به مالات را آشکار نمود. به طورکلی نتایج حاصل از این تحقیق ضمن معرفی گونه‌های قارچی مناسب در تأمین زیست توده بیودیزلی، منجربه آشکارسازی آنزیم‌های مؤثر با ویژگی‌های خاص شد که می‌تواند در ردیابی سویه‌های توانا در تولید بیودیزل و یا تراریخت‌سازی مفید واقع گردد (فرمانبر و همکاران، ۱۳۹۶).

Hao و همکاران در سال ۲۰۱۴ نقش آنزیم مالیک در مسیر سنتز اسیدهای چرب قارچ‌های شبه روغنی[1] Mortierella alpine را مورد بررسی قرار دادند. که در این مطالعه ایزوفرم E ژن آنزیم مالیک در قارچ Mortierella alpine بیان شد. بیان بیش از حد[2] آنزیم مالیک باعث افزایش اسید چرب نسبت به مقدار شاهد شد. نتایج نشان داد که آنزیم مالیک تنها آنزیم محدود کننده در طی تولید اسیدهای چرب در قارچ های شبه روغنی نیست (Hao *et al*., 2014).

آنزیم مالیک تنها آنزیم است که می‌تواند NADPH برای بیوسنتز اسیدهای چرب در ریز سازواره ها فراهم کند. با این حال، نقش های دیگری را نیز در میکروارگانیسم ها دارد و بنابراین ممکن است در اشکال مختلف وجود داشته باشد، که احتمالا توسط ژن های مختلف کد گذاری می شود. حداقل ۷ شکل ایزوفرم (A-G) از آنزیم مالیک در قارچ‌های روغنی Mortierella alpine شناسایی شده‌اند (Wang *et al*., 2011). Zhang و Ratledge در سال ۲۰۰۸، به بررسی ایزوفرم‌های چندگانه آنزیم مالیک در قارچ‌های روغنی Mortierella alpine پرداختند. فقط ایزوفرم E، که از ایزوفرم D بوجود می‌آید، با تجمع چربی همراه بود، که پس از تخلیه نیتروژن از محیط، آشکار می‌شود و در آن شرایط، تجمع چربی اتفاق می‌افتد. ایزوفرم های A، B، C، F و G با رشد محدود اکسیژن همراه بودند. ایزوفرم‌های D و E تحت شرایط رشد بی‌هوازی و هوازگی بیان می‌شوند. در طول ذخیره‌سازی کل سلول‌ها در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد، ایزوفرم E به تدریج به ایزوفرم G تبدیل می‌شود که بیانگر آن است که اصلاح پروتئین پساترجمه بیشتر رخ می‌دهد (Zhang and Ratledge, 2008).

با در نظر گرفتن تحقیقات انجام شده چنین به نظر می‌رسد که با ایجاد شرایط مناسب تخمیر برای ریزسازواره Mortierella alpine بیان ژن‌های موثر در تولید آراشیدونیک اسید و روغن تحت تاثیر

---

[1] Oleaginous Fungus.
[2] Overexpression

گوهر مایه محیط کشت قرار خواهد گرفت. از این رو در این رساله برای بررسی ژن مالیک انزیم ابتدا باید یک ژن خانه‌دار مناسب از میان ژن‌های انتخاب شده با پایداری مناسب مشخص گردد و میزان بیان ژن مالیک آنزیم نسبت به ژن خانه دار انتخاب شده در شرایط بهینه به روش Real time PCR در تولید محصول توسط قارچ Mortierella alpine بررسی شود. در واقع هدف نهایی از این تحقیق بررسی تاثیر عوامل محیطی بر تولید روغن از گونه قارچی Mortierella alpine در محیط کشت مایع و ارتباط آن با میزان بیان ژن مالیک آنزیم می‌باشد.در تحقیق‌های مشابه از ژن‌های خانه‌دار متفاوت برای گونه‌های باکتریایی و قارچی استفاده شد که تعدادی از آنها در زیر آورده شده است.

Bohle و همکاران در سال ۲۰۰۷ به انتخاب ژن‌های مرجع برای نرمال‌سازی داده‌های ژن خاصی در قارچ Aspergillus niger پرداختند. ده ژن کاندیدا احتمالی از کلاس‌های عملکردی مختلف انتخاب شدند و کاربرد آنها به عنوان ژن مرجع داخلی اعتبارسنجی شد. سطوح رونویسی این ژن‌ها در مجموعه‌های مختلف نمونه از کشت‌های مختلف Aspergillus niger مقایسه شد. تحت شرایط آزمایشی انتخاب شده، ژن‌های act، sarA و cox5 به عنوان ژن‌هایی با پایدارترین بیان معرفی شدند. سه ژن مرجع برای به‌سازی داده های RT-PCR برای بیان ژن گلوکوامیلاز استفاده شد که دارای همبستگی بالا با تولید گلوکوآمیلاز در کشت مداوم بودند (Bohle *et al*., 2007).

در مطالعه‌ی انجام شده توسط Teste و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد به اعتبارسنجی ژن‌های مرجع برای تجزیه بیان کمی توسط RT-PCR در Saccharomyces cerevisiae پرداختند. هدف از این تحقیق جستجو برای مجموعه‌ای از ژن های مرجع برای تجزیه و تحلیل قابل اعتماد بیان ژن در Saccharomyces cerevisiae بود. با استفاده از الگوریتم geNorm، شرایط رشد و سویه-های آزمایشی در این تحقیق ژن‌های ALG9، TAF10، TFC1 و UBC6 به عنوان ژن‌هایی که در

شرایط مختلف بیان یکسانی دارند به‌کار گرفته شدند. در انتها، استفاده از ACT1 را بجای دیگر ژن‌های مرجع معمول (PDA1، TDH3، RDN18، و غیره) را به عنوان کنترل‌های داخلی برای تجزیه بیان کمی ژن در مخمر نامناسب بیان کردند (Teste *et al*., 2009).

در تحقیق مروری، Kozera و Rapacz در سال ۲۰۱۳ به بررسی ژن‌های مرجع در real-time PCR پرداختند. در این مطالعه جنبه‌های مختلف استفاده از ژن‌های مرجع در روش real-time PCR انجام با توجه به مطالعات مختلف در این زمینه، بررسی شد (Kozera and Rapacz, 2013).

Zampieri و همکاران در سال ۲۰۱۴ اعتبار سنجی ژن‌های مرجع در قارچ Penicillium echinulatum برای مطالعه بیان ژن‌ها با استفاده از RT-PCR را مورد بررسی قرار دادند. مطالعات بیان ژن در قارچ‌های رشته‌ای اغلب از ژن β-actin (actb)، β-tubulin و glyceraldehyde-3-pHospHate dehydrogenase به عنوان ژن مرجع استفاده می‌کنند، زیرا آن‌ها سطوح بیان ثابتی دارند.Penicillium echinulatum strain S1M29 در شرایطی که دارای سلولز و قند و یا سرکوب بیان ژن گلوکز، به منظور تجزیه و تحلیل ۲۳ ژن نامزد برای بیان پایدار رشد داده شد. نتایج نشان داد که که ژن مرجع actb به صورت پایدارتر در Penicillium echinulatum بیان شد، در نتیجه این ژن به عنوان ژن مرجع برای بررسی بیان ژن سلولاز و همی‌سلولاز معرفی شد (Zampieri *et al*., 2014).

Zhou و همکاران در سال ۲۰۱۲ به انتخاب ژن مرجع مطلوب برای تجزیه بیان ژن‌ها در قارچ Beauveria bassiana در طول توسعه، تحت تغییر شرایط تغذیه‌ای و پس از قرار گرفتن در معرض تنش‌های بی رویه پرداختند. برای شناسایی ژن‌های مرجع مناسب در Beauveria bassiana، بیان ۱۴ ژن کاندید: 18S، 28S، β-Tub، GAPD، γ-Act، TEF، HGPT، His3، His2A، TBP، CypA، CypB، PP1 و CrzA، با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی در مراحل مختلف رشد و تحت شرایط

مختلف تغذیه و تنش اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که His2A، γ-Act و CrzA پایدارترین بیان را در طول توسعه داشتند، در حالی که 28S، PP1 ، CypA ، His2A، γ-Act و CypA بیشتر پایداری بیان را تحت انواع شرایط تغذیه‌ای و تنش را داشتند. به طور کلی، ژن‌های PP1، γ-Act و CypA بیشرین پایداری را در شرایط مختلف دارا بودند (Zhou *et al.*, 2012).

در مطالعه‌ای توسط Llanos و همکاران به منظور ردیابی بهترین ژن‌های مرجع برای نرمال کردن داده‌های RT-qPCR در قارچ رشته‌ای، ۱۲ ژن دارای عملکرد متفاوت توسط آزمون RT-qPCR در بیش از ۳۰ شرایط کشت مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ژن‌های ubcB، sac7، fis1 و sarA، TFC1 و UBC6 دارای تغییرات اندک بیان در شرایط مختلف بودند. در نهایت این شش ژن به عنوان ژن‌های مرجع در نرمال سازی داده RT-qPCR ارائه شدند (Llanos *et al.*, 2015).

Kim و Yun در سال ۲۰۱۱، ارزیابی ژن‌های مرجع برای تجزیه و تحلیل کمی RT-PCR در Fusarium graminearum تحت شرایط مختلف کشت را مورد بررسی قرار دادند، در این مطالعه، ۱۵ ژن به عنوان کاندیدا ژن مرجع، از جمله ژن‌هایی که قبلا به عنوان ژن خانه‌دار بودند و ژن‌هایی که از توالی یابی کل ترانسکتیکوم انتخاب شدند، مورد بررسی قرار گرفتند. بیان دو ژن GzFLO و GzUBH در شرایط رشد مسیلی ترجیی پایدار بودند و بیان دو ژن EF1A و GzRPS16 در شرایط مختلف محیط کشت نسبتا پایدار بود. در انتها دو ژن GzUBH و EF1A به عنوان ژن‌های مرجع مناسب برای نرمال سازی دقیق داده‌های qRT-PCR برای تحلیل بیان ژن Fusarium graminearum و دیگر قارچ‌های مرتبط انتخاب شدند (Kim and Yun, 2011).

فصل ۳: موادوروش‌ها

۳-۱- مواد شیمیایی، نرم‌افزار، تجهیزات و روش کلی تحقیق

۳-۱-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده در تخمیر

گلوکز تک آبه، مالت آگار، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۳ آبه، کلرید کلسیم ۲ آبه، سولفات منیزیم ۷ آبه، اسید کلریدریک، سود و نانو پودر اکسید منیزیم (MgO, 99+%, 20nm) که از شرکت مرک آلمان خریداری شد. از عصاره مخمر استفاده شد و همچنین پودر سویای سبحان که پس از خرد و الک شدن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

۳-۱-۲- کیت استخراج RNA و ساخت cDNA

برای استخراج RNA از کیت Bio Basic و ساخت cDNA شرکت TaKaRa استفاده شد.

۳-۱-۳- کیت مورد استفاده در دستگاه Real Time PCR

کیت TaKaRa استفاده شد.

۳-۱-۴- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز برای الکتروفورز ژل آگاروز

بافر(TBE (0.5x، محلول اتیدیوم برماید (۱۰ mg / ml)، آگارز یک درصد، بافر بارگیری (6X Loading dye)، نشانگر وزن مولکولی 1 kb (شرکت سیناکلون).

۳-۱-۵- مواد شیمیایی مورد نیاز برای PCR

MgCl به میزان 1µl، dNTP به میزان0.5 µl، Primer به میزان2 µl که از هر پرایمر (forward و Reverse) 1µl استفاده شد، cDNA به میزان 2µl، 10x PCR Buffer به میزان 2.5 µl، آب مقطر به میزان16.75 µl و Taq DNA pol به میزان 0.25 µl استفاده شده در نهایت حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید.

۳-۱-۶- نرم افزارهای مورد استفاده

۳-۱-۶-۱- طراحی پرایمر

با توجه به اینکه گزارشات متفاوتی از ژن‌های موثر در تولید روغن و آراشیدونیک اسید ارائه شده است برای طراحی پرایمر ابتدا با نرم افزار EditSeq و MegAlign ژن‌ها align شدند و با در نظر گرفتن مناطق مشترک ژن‌ها با استفاده از نرم افزار Gene Runner 1 برای آن ها پرایمر طراحی شد.

۳-۱-۷- تجهیزات مورد استفاده

۱) آون مدل JTOL200 ساخت شرکت ژال‌تجهیز کشور ایران؛

۲) انکوباتور مجهز به سامانه همزن ساخت شرکت ژال تجهیز و انکوباتور Gerhardt ساخت کشور آلمان؛

۳) اتوکلاو مدل F2000 (۷۵ لیتری) ساخت شرکت ریحان طب کشور ایران؛

۴) دستگاه اولتراسوند Transsonic TP 690/H ساخت کشور آلمان؛

۵) ترازو Sartorius TE124S ساخت کشور آلمان با دقت ۰/۱ گرم؛

۶) دستگاه pH متر Metrohm ساخت کشور سویس؛

۷) مخلوط‌کن Black & Decker ساخت کشور انگلستان؛

۸) سانتریفیوژ Hettich EBA 8S ساخت کشور آلمان؛

۹) هاون آزمایشگاهی؛

۱۰) سر سمپلر و میکرو تیوپ؛

۱۱) وسایل شیشه ای مورد نیاز، میکروپیپت وHot Plate ؛

۱۲) دستگاه PCR مدل eppendorf ساخت شرکت آلمان؛

۱۳) دستگاه Real time PCR مدل ABI step one ساخت کشور آمریکا؛

۳-۱-۸- روش کلی تحقیق

هدف اولیه این پژوهش، بررسی اثر عوامل محیطی بر تولید روغن از گونه قارچی Mortierella alpine در دو محیط کشت مایع متفاوت می‌باشد. در عین حال میزان بیان ژن مالیک آنزیم در دو تیمار اعمال شده در حین فرایند تخمیر اندازه‌گیری شد.

۳-۲- روش نگهداری ریزسازواره‌ها

در این تحقیق از قارچ مورتیرلا آلپینا سی بی اس ۷۵۴/۶۸[1] استفاده شد. پس از خریداری از مجموعه میکروبی کشور هلند[2] بصورت میسلیوم در لوله آزمایش آگار شیب‌دار[3]، روی محیط کشت مالت آگار در بشقابک[4] 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 شد.

۳-۳- مایه تلقیح و کشت‌های اصلی

از سوسپانسیون میسلیومی برای تلقیح کشت‌های تولید محصول استفاده شد (Zhu *et al.*, 2003). برای تهیه سوسپانسیون میسلیومی، ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت شامل گلوکز تک آبه (۳۰ g/L) و عصاره مخمر (۱۰ g/L) در یک ارلن ۵۰۰ میلی لیتری تهیه شد، در درجه حرارت ۱۲۱°C و ۱۵ دقیقه سترون گردید. سپس بوسیله آنس سترون ریزسازواره را تلقیح کرده و در درجه حرارت ۲۶°C به مدت ۷۲ ساعت و ۱۷۰ دور بر دقیقه[5] گرمخانه‌گذاری شد (Singh and Ward, 1997). ۳ تا ۱۰٪ از کشت‌های توسعه تلقیح به‌عنوان مایه تلقیح به محیط کشت تولید محصول افزوده شد. در محیط‌های کشت تولید محصول از ارلن‌های ۵۰۰ میلی لیتری که شامل ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت می‌باشد، استفاده شد. محیط‌های کشت تولید محصول با توجه به روش آماری طراحی شده است در هر مرحله اجزاء مورد نیاز افزوده می‌شود. نکته قابل توجه اینکه املاح معدنی مورد استفاده شامل سولفات منیزیم ۷ آبه (۰/۵ گرم بر لیتر)، کلرید کلسیم ۲ آبه (۰/۱ گرم بر لیتر) و دی پتاسیم هیدروژن

---

[1] Mortierella alpina CBS 754.68
[2] Centraalbureau voor Schimmelcultures
[3] Slant agar
[4] Petri dish
[5] Revolution per minute (rpm)

سولفات ۳ آبه (۴ گرم بر لیتر)؛ منبع پروتئینی استفاده شده عصاره مخمر مرک و از سویای پودر شـده سبحان استفاده شد و محیط کشت دیگری مشابه به محیط کشت اصلی اما شامل نـانوذره منیـزیم در سطح ۰/۰۵ گرم در لیترساخته شد. همچنین برای تنظیم pH از اسید کلریدریک و سود استفاده شـد (Zhu *et al.*, 2002 and 2003).

۳-۴- اندازه‌گیری وزن خشک سلولی

جداسازی توده زیستی توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱، روی قیف بوخنر مجهز به پمپ خلاء صورت گرفت. سپس برای اندازه‌گیری وزن خشک سلولی[1] آنها را روی شیشه‌های ساعت قرار داده و به مدت ۲ ساعت در آون با درجه حرارت ۱۰۵°C خشک شد (Park *et al.*, 1999; Koike *et al.*, 2001; Sakuradani *et al.*, 2004)

۳-۵- استخراج RNA از قارچ Mortierella alpina

یکی از موانع استخراج RNA وجود آنزیم ریبونوکلئاز (RNase) در محیط می‌باشد. این آنزیم بسیار پایدار و فعال بوده و برای عمل نیازی به کوفاکتور ندارد. از آنجایی که غیرفعال کردن این آنزیم مشکل بوده و حتی در مدت یک دقیقه قادر به تخریب RNA می‌باشد بنابراین باید تمام مواد و تجهیزات جهت استخراج RNA و جابجایی آن عاری از این آنزیم باشد. جهت ایجاد محیطی عاری از RNaseنکات زیر باید مورد توجه قرار گیرد:

۱-گرد و خاک و آلودگی‌های میکروبی و قارچی منبع عظیم RNase هستند، در هنگام کار با RNA همیشه تمام محیط را با الکل ۹۶درصد ضدعفونی کنید. تمام مراحل کار باید زیر هود انجام گیرد. قبل

[1] Dry cell weight (DCW)

از شروع کار توسط اشعه UV به مدت ۱۵ دقیقه سطح کار ضدعفونی شود.

۲- بصورت دائم از دستکش و ماسک استفاده شد و از تماس پوست دست با نمونه‌ها و ابزارآلات جلوگیری شد چون پوست منبع عمومی RNase است. هر زمان که امکان‌پذیر است درب تیوب‌ها بسته نگه داشته شد.

۳-۵-۱- آماده سازی نمونه ها

توده زیستی در روزهای ۲، ۳، ۵ تخمیر از دو محیط کشت فرموله شده در ظروف تکان خورنده از محیط کشت با سانتریفوژ کردن در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جدا شده، داخل هاون چینی که به مدت ۱۲ ساعت داخل آون ۲۲۰ درجه سانتی گراد مانده و خنک شده ریخته شده به نمونه‌ها ازت مایع اضافه شد بافت نمونه خرد و داخل ویال های ۱/۵ میلی لیتری قرار گرفت و تا زمان استخراج RNA در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد. نکته قابل توجه اینکه به هیچ عنوان نمونه‌ها بعد از خرد شدن در ازت مایع نباید ذوب شوند.

۳-۵-۲- استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت Bio Basic

روش کار استخراج RNA کل با استفاده از این کیت به این شرح بود:

۱. ابتدا با لوپ مقداری از نمونه را به‌طور جداگانه وزن کرده و در زیر هود با هاون در نیتروژن مایع کاملاً سائیده و به ویال منتقل گردید.

۲. به میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر (۱ ml) از بافر به ویال حاوی نمونه اضافه و به وسیله ورتکس خوب مخلوط شد.

۳. این مخلوط را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری، سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفوم به ویال اضافه گردید.

۴. ویال را به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰g در دمای ۴- سانتریفیوژ گردید، سپس محلول رویی با سمپلر به ویال جدید انتقال داده شد.

۵. به میزان یک سوم از حجم مایع منتقل شده اتانول ۹۶ درصد به تیوب اضافه کرده و ۳۰ ثانیه ورتکس شد، سپس ۵ تا ۱۰ دقیقه ویال را در یخچال منفی بیست قرار دادیم.

۶. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد.

۷. مایع رویی با احتیاط خارج شد. به رسوب باقی مانده یک میلی لیتر اتانول ۷۵درصد اضافه گردید. به مدت ۵ ثانیه لوله را ورتکس کردیم. لوله را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ نمودیم.

۸. مایع رویی با احتیاط و مشاهده مداوم رسوب ته لوله خارج شد. لوله را با درب باز در دمای آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه کرده تا الکل باقی مانده تبخیر شود. سپس ۳۰ میکرولیتر RNase به ویال اضافه نمودیم.

۳-۵-۳- بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده

RNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی با استفاده از دو روشنانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار می گیرد:

۳-۵-۳-۱- نانودراپ

بعد از استخراج RNA ابتدا از نانودراپ استفاده می‌کنیم عدد بدست را در فرمول قرار می‌دهیم مقدار RNA مصرفی مشخص می‌شود سپس به آن یک میکرولیتر DNase و یک میکرولیتر بافر DNase اضافه کرده و حجم کل واکنش را با آب دیونیزه به ۱۰ میکرولیتر می‌رسانیم. سپس نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در بن ماری قرار می‌دهیم. یک میکرولیتر EDTA به ویال اضافه کرده و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری قرار می‌دهیم، سپس دوباره برای اندازه‌گیری مقدار RNA از نانودراپ استفاده می‌کنیم.

۳-۵-۳-۲- الکتروفورز ژل آگارز

الکتروفورز یک نمونه RNA سالم قارچی روی ژل آگارز ایجاد دو باند واضح می‌نماید که مربوط به RNA ریبوزومی ۱۸s و ۲۸s می‌باشد. هرچه شدت اسمیر بین این دو باند کمتر باشد کیفیت RNA بالاتر است. علاوه براین دو باند، معمولا باند ۵s rRNA نیز در پایین ژل مشاهده می‌شود (Liu and Saint, 2002).

۳-۶- واکنش آرتی پی سی آر (RT-PCR)

واکنش RT-PCR به روش دو مرحله‌ای صورت گرفت. در این روش، RNA استخراجی که DNA آن با آنزیم DNAs تجزیه شده به کمک پرایمر Oligo dT به cDNA تبدیل می‌شود. سپس، این بخش از واکنش RT به مخلوط واکنش PCR افزوده می‌گردد. به منظور اطمینان از عدم حضور DNA، RNA استخراجی را با استفاده از پرایمر ژن مرجع در شرایط PCR قرار می‌دهیم عدم وجود باند DNA نشان‌دهنده عدم آلودگی RNA به DNA ژنومی می‌باشد.

۳-۶-۱- سنتز cDNA

در طی واکنش رونویسی معکوس، آنزیم DNA پلی مراز وابسته به RT با کمک پرایمرهایی که به mRNA هیبرید می‌شوند، آن را به cDNA تبدیل می‌نماید. mRNA برای سنتز پروتئین‌ها ضروری است و مقدار آن شاخصی برای بیان ژن در نظر گرفته می‌شود.

برای ساخت total cDNA در این گونه قارچی، از پرایمر Oligo dT استفاده شد. Oligo dT به توالی پلی A انتهای RNA متصل می‌شود. بنابراین، سنتز cDNA در طول نسخه برداری معکوس به طور تصادفی هم از mRNA و هم از rRNA صورت می‌گیرد. نکته قابل توجه اینکه عموما میزان غلظت RNA مورد استفاده برای ساخت cDNA با استفاده از کیت vivantis بین ۲ تا ۸ میکرولیتر در میلی‌لیتر می‌باشد. تهیه cDNA با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت DNA Takara و طبق روش توصیه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. به لوله‌های حاوی RNA تیمار شده با DNase، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگر ریورس اختصاصی به‌طور جداگانه اضافه گردید. سپس برای تکمیل سنتز cDNA، مقادیر مورد نیاز از بافر آنزیم ترانسکریپتاز، dNTP و آنزیم ترانسکریپتاز اضافه گردید و به حجم نهایی توسط آب مقطر تیمار شده با DEPC به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط حاضر به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷درجه و سپس ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه و سپس در دمای ۴ درجه روی هات پلت انکوبه شده سپس در یخچال ۲۰- قرار داده می‌شوند. cDNA حاصل تا زمان انجام واکنش PCR در دمای ۲۰°C- نگهداری می‌شود.

۳-۶-۲- واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)

جهت انجام واکنش PCR، مخلوط واکنش تهیه شده که در قبل اشاره شد در چرخه‌های دمایی که شامل واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، سپس، ۳۰ چرخه دمایی شامل واسرشت‌سازی

در ۹۵°C به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمر در ۵۵°C به مدت یک دقیقه و تکثیر در ۷۲°C به مدت یک دقیقه. در پایان نیز، تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C قرار گرفت.

۳-۷- طراحی پرایمر

پرایمرها، اولیگونوکلئوتیدهائی با طول حدود۲۰ جفت باز هستند که با اتصال به قطعات مشخص روی DNA الگو ، امکان عملکرد آنزیم و تکثیر این قطعات فراهم می‌شود. قطعاتی که برای تکثیر انتخاب می شوند باید بر اساس توالی هدف باشند. در این آزمایش، هفت ژن دخیل در تولید آراشیدونیک اسید و روغن انتخاب گردیده از آنجائیکه از هر ژن چندین گزارش در سایت NCBI بود به منظور طراحی پرایمر هر کدام از ژن ها aling شدند و در مرحله بعد برای نقاط مشترک پرایمر تهیه شد. در عین حال برای پی‌بردن به اینکه پرایمرهای طراحی شده اختصاصی می باشند در سایت NCBI، BLAST (برای تشخیص اینکه تا چه حدی این پرایمر توانایی تکثیر قطعات غیر اختصاصی را دارد) شدند بعد از تایید پرایمرها به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شد(جدول ۳-۱). ژنActin (accessing number: DQ973624.1) به عنوان ژن مرجع[1]، انتخاب گردید (*et al.*, 2009 Sakuradani).

[1] House keeping gene

جدول ۳-۱-توالی و مشخصات پرایمر ژن‌های مورد نظر و ژن مرجع

No.	Gene	Primer	sequence Primer	%GC	TM	Product size
1	HSP	forward			۵۹/۷	
		Reverse			۶۰/۲	
2	DiFO1	forward			۵۹/۳	
		Reverse			۵۹/۸	
3	DiPeT	forward			۵۹/۸	
		Reverse			۶۰/۵	
4	EF1	forward			۶۰/۸	
		Reverse			۶۰/۲	
5	Gly3 pHosp Hate	forward			۶۱/۶	
		Reverse			۶۰/۷	
6	Malic	forward			۶۵/۳	
		Reverse			۶۵/۸	

۳-۸- الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز

پس از PCR، مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه برداشت شد و همراه با یک میکرولیتر بافر بارگیری، روی ژل آگاروز ۲٪ بارگیری گردید. عمل الکتروفورز در بافر TBE ۰/۵x و با ولتاژ ثابت ۱۰۰ در طی ۱ ساعت انجام گرفت. پس از الکتروفورز، ژل مربوطه به مدت ۱۰ دقیقه در داخل محلول رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید قرار گرفته و پس از رنگ زدایی توسط آب مقطر به مدت ۵ دقیقه، توسط دستگاه System Gel Doc. BioDoc-It™ (ساخت آلمان) مورد عکس‌برداری قرار گرفت.

Real time PCR -۹-۳

میزان تظاهر هفت ژن تحت مطالعه، قارچ مورتیرلا آلفینا در محیط بهینه تولید روغن در زمان‌های مختلف تخمیر (۲ ،۳ ، ۵ روز پس از تخمیر) با استفاده از دستگاه Real time PCR اندازه‌گیری شد. بررسی بیان ژن در این روش با استفاده ازغلظت‌سنجی نسبی(Relative Quantification) انجام گرفت. جهت انجام غلظت‌سنجی نسبی به یک ژن کنترل داخلی (ژن Actin) نیاز است.

جهت انجام واکنش از کیت SYBR GREEN شرکت TaKaRa استفاده گردید. مواد استفاده شده در PCR طبق جدول۳-۲ می باشد. چرخه های دمایی نیز، به شرح زیر انتخاب شدند: واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵˚C به مدت ۱۰ دقیقه، سپس، ۴۰ چرخه دمایی شامل واسرشت‌سازی در ۹۵˚C به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۶۰˚C به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در ۹۵˚C به مدت ۱۵ ثانیه. در پایان نیز، تکثیر نهایی به مدت ۱دقیقه در ۶۰˚C انجام گرفت.

جدول ۳-۲-مواد لازم جهت انجام Real time PCR

مواد لازم برای واکنش real time PCR	مقادیر
SYBR GREEN Master mix(2X)	۱۰ µl
PrimerF(10µM)	۰/۴ µl
PrimerR(10µM)	۰/۴ µl
cDNA	۲ µl
ROX Reference Dye(50x)	۰/۴ µl
Distillated water	۶/۸ µl
حجم نهایی واکنش برابر با µl ۲۰ می‌باشد.	

جدول ۳-۳-برنامه دستگاه Real Time PCR

مرحله	دما و زمان مورد استفاده
فعال سازی ابتدایی آنزیم	۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه
۴چرخه شامل مراحل زیر:	
واسرشت شدن	۹۵درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه
اتصال آغازگرها	۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه
بسط ترکیبی	۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه

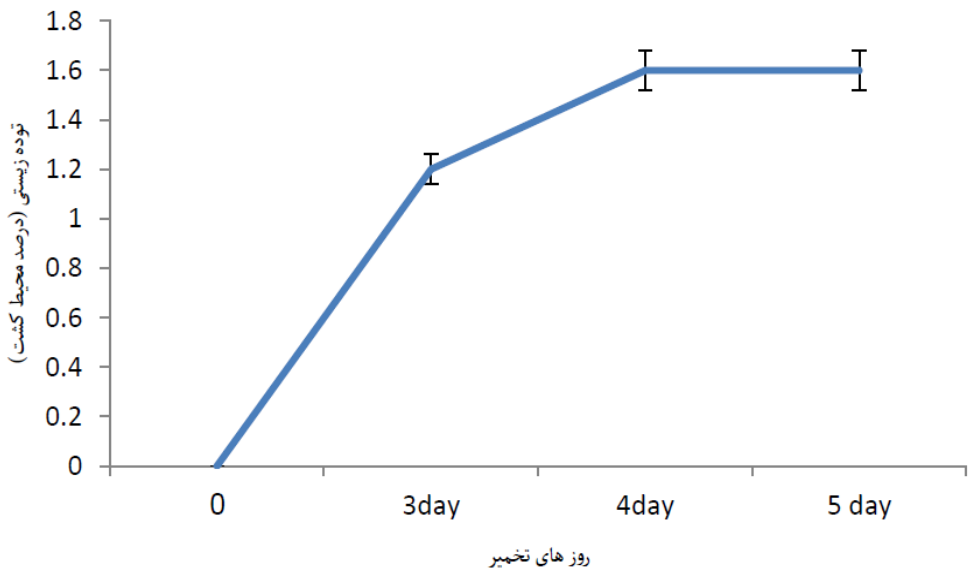
۳-۹-۱- کنترل های Real time PCR

بطور کلی، هیچ واکنش PCR بدون وجود کنترل مثبت و منفی ارزش چندانی ندارد زیرا وجود کنترل منفی، امکان وجود آلودگی مواد و وسایل مورد استفاده در واکنش را نشان می‌دهد و وجود کنترل مثبت، اطمینان از تشخیص آلودگی RNA را به DNA ژنومی را بیان می‌نماید. بنابراین، باید برای Real time PCR مثل دیگر آنالیزهای PCR، کنترل‌های مثبت و منفی استفاده شوند.

فصل ٤: نتایج و بحث

۴-۱- بررسی تغییرات میزان توده‌زیستی در محیط کشت نیتروژن آلی

میکروارگانیسم مورتیرلا آلپینا به عنوان گونه روغنی توانایی بالایی در تولید روغن در محیط کشت شامل منبع کربنی گلوکز و منبع پروتئنی سویا دارد. با توجه به تحقیقات انجام شده سطح سوبسترای منبع پروتئینی در سطحی تنظیم شد که ریزسازواره سریع‌تر وارد فاز تخریب شود (samadlouie et all., 2014). در این مرحله از تحقیق از پروتئین سویا به عنوان منبع پروتئینی در سطح (۱۰ گرم در لیتر) و گلوکز در سطح (۵۰ گرم در لیتر) استفاده شد. در حین فرآیند تخمیر روند رشد آن اندازه‌گیری شد.



شکل ۴-۱-میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی

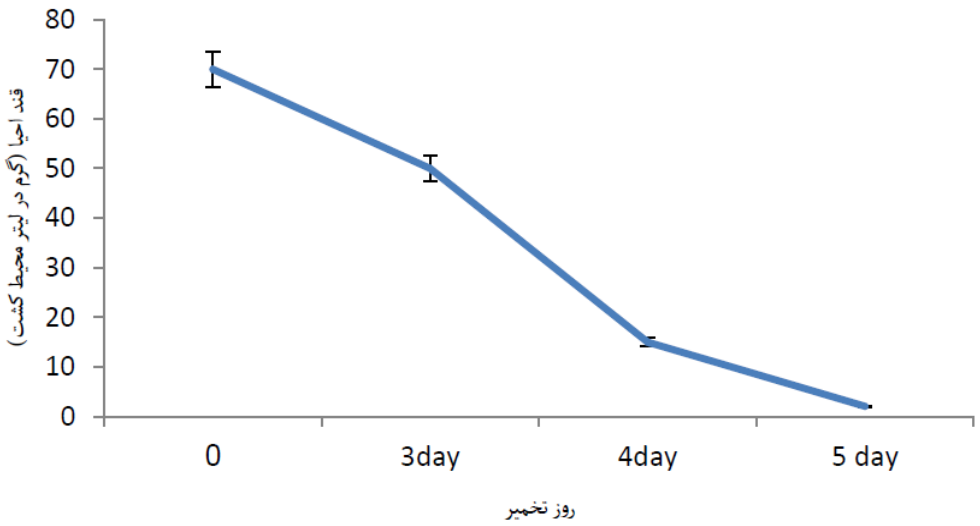
رشد میکروارگانیسم به معنی افزایش متوازن همه اجزا سلولی می‌باشد از این‌رو افزایش توده زیستی در شرایطی که میکروارگانیسم به فاز تجمع روغن وارد نشده است می‌تواند به عنوان رشد در نظر گرفته شود و از آنجائیکه تولید روغن در شرایط کاهش رشد تقویت می‌شود از این رو در شرایطی که میکروارگانیسم در مرحله توقف تولید توده زیستی می‌باشد، در حال تجمع روغن است و در واقع در فاز مرگ می‌باشد. با توجه به نکات ذکر شده می‌توان از روی شکل ۴-۱ چنین برداشت کرد که بیشترین میزان افزایش وزن خشک توده زیستی تا روز سوم تخمیر می‌باشد که میزان توده زیستی به سطح ۱/۲ درصد محیط کشت رسید از روز سوم به چهارم روند افزایش رشد کند شده و به سطح ۱/۶٪ محیط کشت رسید از روز چهارم به بعد روند رشد توده زیستی متوقف شده است. با توجه به نمودار تغییرات توده زیستی به زمان نتایج تغییرات وزن خشک توده زیستی نشان داد که دو مرحله با توجه به زمان های اندازه گیری شده قابل مشاهده است، مرحله رشد که نمودار تا روز سوم رشد حالت افزایشی داشته و مرحله کاهش رشد (decaleration) که رشد توده زیستی شتاب کاهشی داشته و در انتها مرحله تجزیه با در نظر گرفتن تجمع روغن در توده زیستی است. در این مرحله تجزیه بافت توده زیستی تحت تاثیر کاهش ترکیبات مغذی محیط کشت افزایش می‌یابد. از اینرو در این مرحله تغییرات گلوکز و منبع پروتئینی بررسی می‌شود.

با بررسی میزان پروتئین چنین نتیجه شد که در روز اول اندازه گیری تمامی منبع پروتئینی مصرف شد. سطح منبع پروتئینی ۱۰ گرم در لیتر تنظیم شد تا میکروارگانیسم سریع‌تر وارد مرحله لیپوژنتیکی شود. تخلیه پروتئین نقش مهمی در کاهش رشد میکروارگانیسم دارد از این‌رو میکروارگانیسم تا روز سوم به صورت لگاریتمی با حداکثر سرعت رشد ویژه میکروبی روند رشد را طی کرده و با تخلیه نیتروژن در روز سوم به چهارم کاهش رشد قابل مشاهده می‌باشد.

مهمترین سوبسترا و پرمقدارترین سوبسترای محیط کشت در میکروارگانیسم‌های روغنی منبع کربنی می‌باشد و از آنجائیکه مسیر EMP مسیر اصلی تولید روغن در این میکروارگانیسم می‌باشد گلوکز

مهمترین و سهل‌الهضم ترین منبع در رشد و تولید توده زیستی در این قارچ می‌باشد. گلوکز هم در تولید توده زیستی و هم در تولید روغن نقش کلیدی را دارد (Carter et al., 1971; Papagianni, 2004).

با توجه به شکل ۴-۲ با بررسی میزان گلوکز محیط کشت، نتایج نشان داد که سوبسترای گلوکزی تحت تاثیر رشد میکروارگانیسم روند کاهشی دارد. از روز اول فرایند تخمیر تا روز ۴ سطح منبع کربنی گلوکز مناسب رشد میکروارگانیسم می‌باشد که تا این روز میکروارگانیسم رشد کرده و از منبع کربنی برای تجمع توده زیستی استفاده کرده است. از روز ۴ به بعد سطح گلوکز به زیر ۱۰ گرم در لیتر رسیده که میکروارگانیسم توانایی مصرف آن را ندارد، بنابراین روند کاهش گلوکز با کاهش تجمع توده زیستی همزمان می‌باشد.



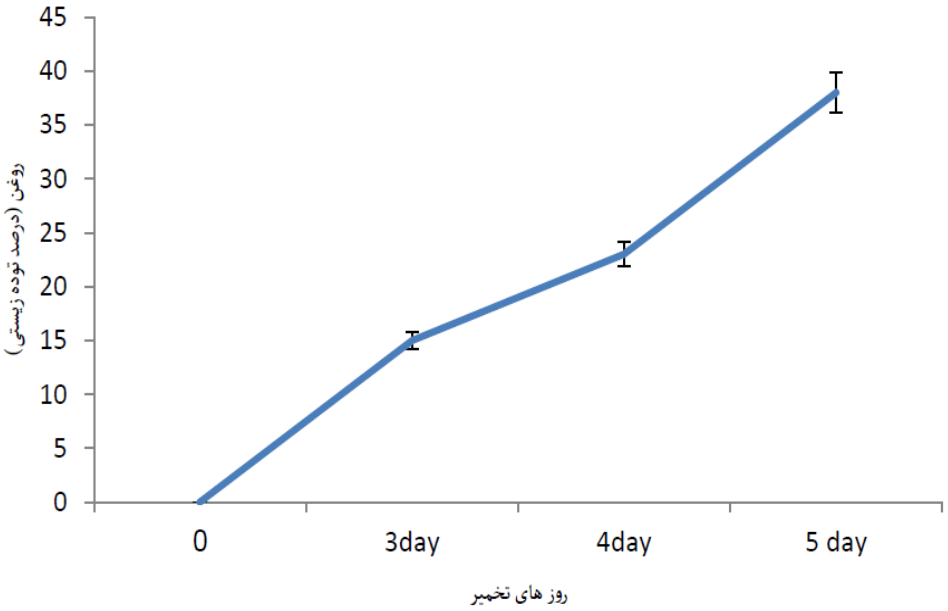
شکل ۴-۲- میزان قند احیاء در روزهای متفاوت تخمیر

منابع کربنی نقش مهمی در تولید توده زیستی و محصول از گونه‌های میکروبی روغنی دارد. طیف وسیعی از این ترکیبات 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 پروفایل اسید چرب لیپید بصورت گسترده‌ای بسته به نوع سوبسترا تغییر می‌کند (Ahmed *et al.*, 2006; Stredansky *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2000).

۴-۲- بررسی تغییرات میزان روغن

نتایج بدست آمده نشان دهنده‌ی این بود که در محیط کشت تعریف شده حاوی گلوکز به عنوان منبع کربنی و پودر سویا به عنوان منبع پروتئینی، روغن در روزهای اندازه گیری شده روند افزایشی دارد. طبق شکل ۴-۳ بیشترین میزان افزایش روغن از روز چهارم به پنجم بود که میزان روغن در وزن خشک توده زیستی از ۲۳٪ به ۳۸٪ افزایش یافت. از روز سوم تخمیر تا روز چهارم روند افزایش روغن کند بوده و در این مدت میزان قابل توجهی توده زیستی تولید شد. چنین تحلیل می‌شود که در شرایط رشد، تولید روغن کند بوده ولی هنگامی که تجمع توده زیستی کند می‌شود تولید روغن تقویت شده است. این بدین معنی است که گلوکز به جای وارد شدن در فاز تجمع روغن، وارد فاز لیپوژنتیکی شده است.



شکل ۴-۳-میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی

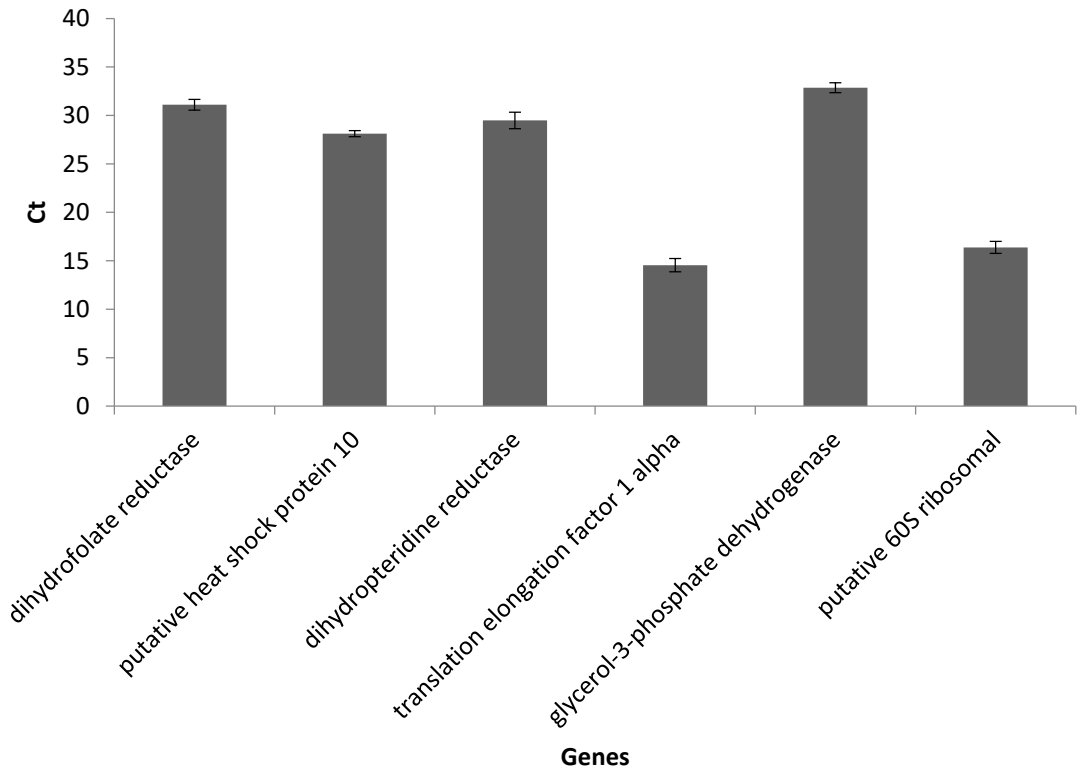
در تحقیق Park et al. (1999) منابع مختلف نیتروژنی مانند عصاره مخمر، کنجاله سویا، شربت ذرت خیسانده[1]، فارمامدیا[2]، پروتئین ماهی و پروتئین گلوتن و تأثیر آنها را بر تولید روغن انجام داده بودند و دریافتند که تولید روغن تحت تاثیر رشد میکروارگانیسم می‌باشد. همچنین در تحقیقی دیگر Parker et al. (2000) گزارش نمودند که پودر سویا یک منبع نیتروژنی با ارزش در تولید روغن توسط قارچ ها می‌باشد. این نتیجه می تواند به این دلیل باشد که پروتئین سویا یک منبع نیتروژنی بوده و به آهستگی توسط میکروارگانیسم مصرف می‌شود و در نتیجه سبب افزایش تولید روغن می‌گردد. از این‌رو در این تحقیق از سویا به عنوان منبع پروتئینی به منظور تحریک روغن استفاده شد.

۴-۳- بررسی بیان ژن خانه‌دار در روز سوم تخمیر

نمونه‌های RNA از قارچ مورتیرلا آلپینا با استفاده از کیت Bio Basic در شرایط رشد استخراج شد. در مرحله بعد RNA با استفاده از کیت cDNA ساخته شد با استفاده از دستگاه نانودرب غلظت cDNA در سطح ۵۰ نانوگرم رقیق‌سازی شد و میزان بیان ژن‌ها با استفاده کیت سایبر گرین تاکارا اندازه‌گیری شد. روز سوم تخمیر روز رشد میکروارگانیسم بوده بطوری که میزان قند احیا ۵۰ گرم در لیتر و میکروارگانیسم در سطح ۱/۲ درصد بوده و با در نظر گرفتن اینکه میکروارگانیسم در حال رشد می‌باشد و با در نظر گرفتن سطح بالای قند چنین تحلیل می‌شود که میکروارگانیسم در حداکثر فعالیت متابولیکی بوده با بررسی بیان ژن‌ها و با در نظر گرفتن سطوح برابر غلظت cDNA چنین انتظار می‌رود که حداکثر بیان ژن در این روز مشاهده شود.

---

[1]- Corn steep liquor (CSL)
[2]- Pharmamedia



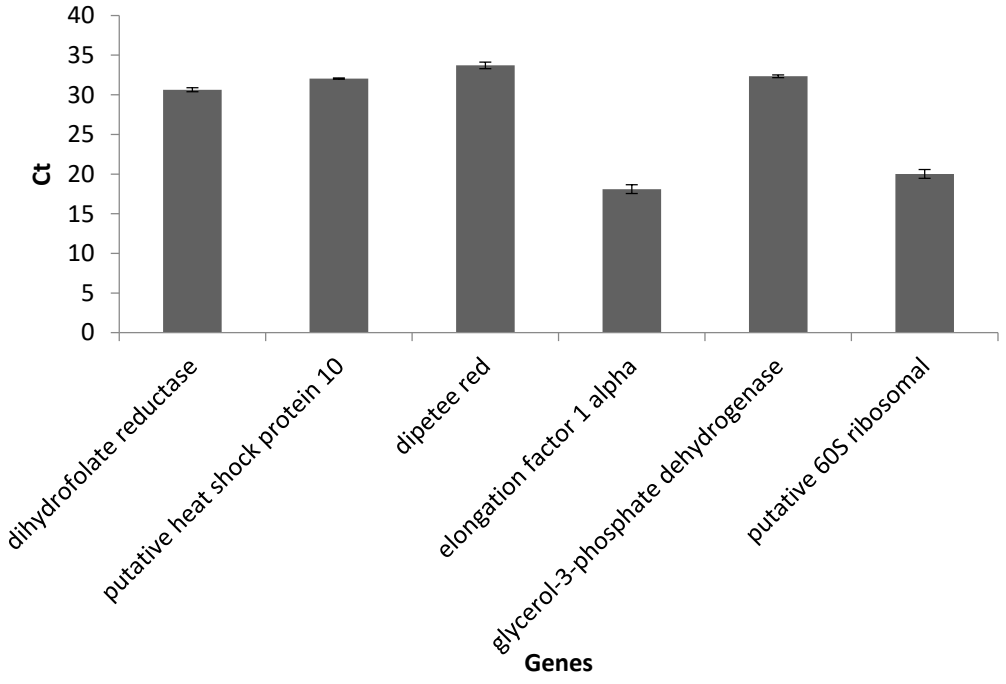
شکل ۴-۴-بررسی میزان Ct ژن‌ها در روز سوم تخمیر

با توجه به شکل ۴-۴ ژن translation elongation factor 1 alpHa با Ct ۱۴/۵۳ حداکثر بیان ژن را بین ژن‌های انتخاب شده داشت. ژن دوم putative 60S ribosomal می‌باشد که میزان Ct آن ۱۶/۳۷ می‌باشد. glycerol-3-pHospHate dehydrogenase پایین‌ترین میزان بیان ژن را بین ژن‌های انتخابی داشت. همه ژن‌های کاندید شده دارای بیان در این روز تخمیر بودند که نشان می دهد می‌توانند کاندید مناسبی برای ژن خانه‌دار باشند، ولی نکته مهمتر تغییرات بیانی در حین فرایند تخمیر می‌باشد از این رو میزان بیان در شرایطی که کاهش رشد نیز وجود داشته باشد باید مورد بررسی قرار گیرد.

۴-۴- بررسی بیان ژن خانه دار در روز پنج تخمیر

همانند روش قبل RNA استخراج شد و پس از ساخت cDNA غلظت در سطح ۵۰ نانوگرم با استفاده

از روش رقیق‌سازی مرحله‌ای تنظیم شد. از آنجائیکه هدف مقایسه بیان ژن‌های خانه‌دار می‌باشد دقت زیادی در تنظیم محلول رقیق شده انجام شد که نتایج بدست آمده فقط اختلاف در بیان ژن باشد و تفاوت غلظت بین نمونه‌های روز ۳ و ۵ باعث اختلال در نتایج بدست آمده نباشد. روز پنج تخمیر با توجه به اینکه سطح گلوکز به سطح زیر ۱۰ گرم در لیتر رسیده و از آنجائیکه میکروارگانیسم توانایی مصرف گلوکز در سطح زیر ۱۰ گرم در لیتر را ندارد چنین تحلیل می‌شود که میکروارگانیسم وارد فرایند مرگ شده است. با بررسی میزان توده زیستی تحلیل فاز مرگ تایید می‌شود. از آنجائیکه از روز ۳ به ۵ رشدی در میکروارگانیسم مشاهده نشده و با در نظر گرفتن افزایش روغن از سطح ۲۵ تا ۳۵ درصد چنین برداشت می‌شود که میکروارگانیسم وارد فرایند خودکافتی یا (Autolysis) شده است.



شکل ۴-۵- بررسی میزان Ct ژن ها در روز پنجم تخمیر

در این مرحله از فرایند تخمیر با توجه به شکل ۴-۵ ژن translation elongation factor 1 alpHa مانند روز ۳ دارای حداکثر بیان ژن و حداقل Ct (۱۸) می باشد. همانند مرحله قبل نیز ژن putative 60S ribosomal ژن دوم می‌باشد و میزان Ct آن ۲۰ می‌باشد. ژنDehydropteridine reductase

پایین‌ترین میزان بیان ژن را بین ژن‌های انتخابی داشت. کاهش بیان ژن‌ها تایید کننده این نتیجه بوده که میکروارگانیسم وارد فاز تخریب و افزایش تجمع روغن شده است.

۴-۵- انتخاب ژن خانه‌دار مناسب در شرایط تخمیری رشد و مرگ

از آنجائیکه گونه قارچی مورتیرلا از منابع اصلی تولید روغن می‌باشد و با در نظر گرفتن این نکته که اهمیت مورتیرلا آالپینا درتولید آراشیدونیک اسید می‌باشد. این اسید چرب ضروری عموما در مرحله کاهش رشد تولید می‌شود. در فرایند تولید روغن عموما اسید چرب غالب اولئیک اسید می‌باشد با کاهش رشد میکروارگانیسم وارد فاز تولید روغن با قدرت بیشتری می‌شود. اسید چرب غیراشباع در شرایطی که تولید روغن متوقف شده و وارد فاز تجزیه روغن می‌شود در روغن افزایش می‌یابد. از این‌رو فاز مرگ از مهمترین مراحل فرایند تولید آراشیدونیک اسید می‌باشد. در این مرحله از تحقیق، دو مرحله از زندگی مورتیرلا بررسی شد. مرحله اول مرحله رشد بود که همانطور که نتایج نشان داد عموما ژن‌های خانه‌دار، بیان بالاتری داشتند. بعد از فرایند رشد، میکروارگانیسم وارد فرایند تجزیه شده که با کاهش مواد مغذی، میکروارگانیسم آنزیم های تجزیه کننده خود را در محیط ترشح می‌کند. با در نظر گرفتن کاهش فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم، چنین انتظار می رود که ژن‌ها دارای بیان پایین تری باشند که عموما کاهش بیانی در ژن‌ها مشاهده شد. ژن خانه‌دار مناسب ژنی می‌باشد که در مرحله رشد و مرگ کمترین تغییرات بیانی را داشته باشد.

جدول ۴-۱-انحراف معیار و ضریب تنوع بیان ژن‌های خانه‌دار در روزهای متفاوت تخمیر فاز رشد و مرگ

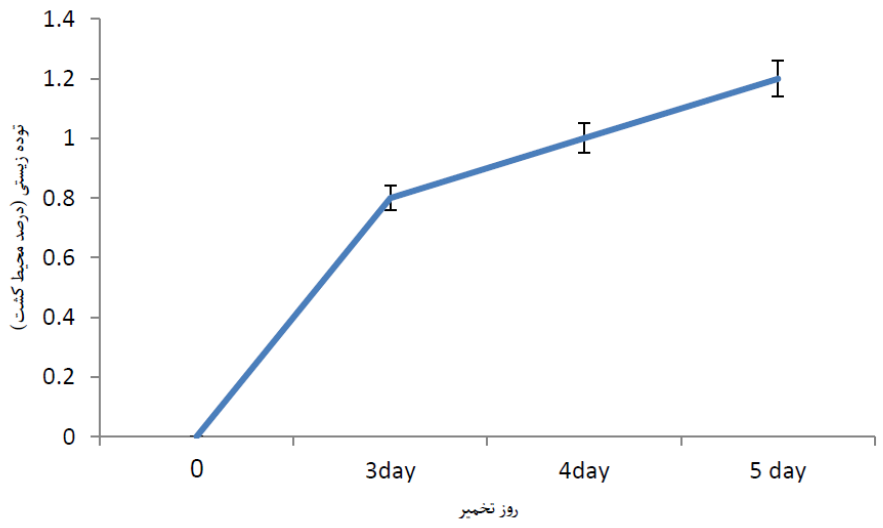
	dihydrofolate reductase	putative heat shock protein 10	Dihydropteridine reductase	translation elongation factor 1 alpHa	glycerol-3-pHospHate dehydrogenase	putative 60S ribosomal
min [CP]	۳۰/۱۹	۲۷/۴۳	۲۹/۰۰	۱۳/۸۴	۳۱/۹۰	۱۶/۲۴
max [CP]	۳۲/۰۰	۳۲/۶۰	۳۳/۸۱	۱۸/۶۰	۳۳/۱۰	۲۰/۶۰
std dev [± CP]	۰/۴۷	۱/۹۶	۲/۱۱	۱/۷۸	۰/۴۳	۱/۸۲
CV [% CP]	۱/۵۲	۶/۵۲	۶/۶۸	۱۰/۸۸	۱/۳۳	۱۰/۰۱
coeff. of corr. [r]	-۰/۳۷	۰/۹۵۸	۰/۹۹۰	۰/۹۶۳	-۰/۵۴۱	۰/۹۸۶
p-value	۰/۴۶۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۲۶۷	۰/۰۰۱
M value	۰/۲۱۸	۰/۱۵۳	۰/۱۵۲	۰/۱۷۱	۰/۲۱۶	۰/۱۵۷

با توجه به جدول ۴-۱ چنین تحلیل می‌شود که کمترین میزان انحراف معیار مربوط به ژن glycerol-3-pHospHate dehydrogenase می‌باشد، همچنین این ژن دارای CV بسیار مناسبی می‌باشد ولی از آنجائیکه میزان شاخص Best keeper این ژن پایین می‌باشد این ژن حذف می‌شود. ژن کاندید بعدی dihydrofolate reductase می باشد که با اندکی بیشتر میزان انحراف معیار ۰/۴۷ داشت. این ژن نیز CV پایینی داشته که می تواند کاندید مناسبی برای ژن خانه‌دار با پایداری بالا باشد ولی از آنجائیکه این ژن پایین ترین میزان شاخص bestkeeper را دارد از این رو این ژن نیز حذف می‌شود. ژن translation elongation factor 1 alpHa شاخص Best keeper، P value، M value مناسبی دارد اما به دلیل بالاترین میزان CV این ژن نیز حذف می‌شود. هچنین ژن putative 60S ribosomal می‌تواند از ژن‌های کاندید به عنوان ژن خانه دار در این مرحله از تحقیق باشد و

شاخص های برابری با ژنputative heat shock protein 10 دارد اما به دلیل CV بالاتر در این مرحله حذف شد. بالا بودن Ct و بیان کم ژن می‌تواند دلیل پایین بودن شاخص best keeper باشد. پایین بودن فاکتور M در دو ژن dihydropteridine reductase و putative heat shock protein 10 این ژن‌ها را به عنوان کاندید مناسب معرفی می‌کند. بالا بودن شاخص best keeper و همچنین پایین بودن CV این دو ژن، در این مرحله کاندیدای مناسبی برای ژن خانه دار در نظر گرفته شدند.

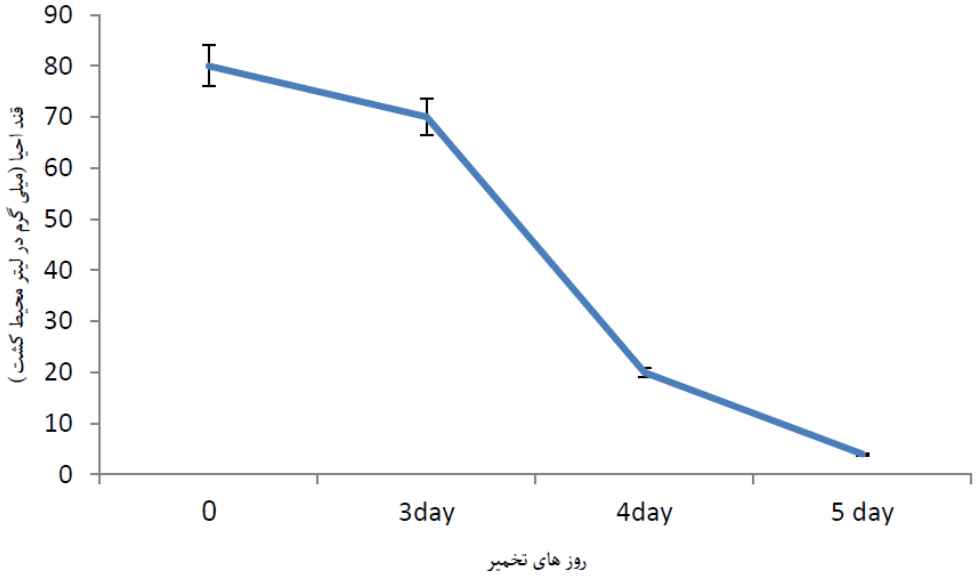
۴-۶- بررسی تغییرات میزان توده زیستی در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانوذره منیزیم

در این مرحله از تحقیق تأثیر نانو ذره منیزیم در سطح ۰/۰۵ گرم در لیتر بر میزان تولید توده زیستی، مصرف گلوکز و تولید روغن در حین فرایند تخمیر بررسی شد. علم نانو در علوم متفاوت کاربردهای وسیعی دارد از انجائیکه منیزیم به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های مسیر EMP می‌باشد حضور این نانو ذره در این سطح چنین پیش‌بینی می‌شود که محرک رشد و تولید روغن باشد. در سطوح بالاتر منیزیم به صورت نانو اثر بازدارندگی داشته در حالی‌که در این سطح نتایج نشان داد که اثر مثبتی در فرایند رشد، مصرف گلوکز و تولید روغن داشته است.



شکل ۴-۶میزان تولید توده زیستی در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانوذره منیزیم

با توجه به شکل ۴-۶ نتایج نشان داد که نانوذره 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. افزایش توده زیستی تا روز سوم رشد به میزان قابل توجهی افزایش یافت و به سطح ۰/۸٪ محیط کشت در وزن خشک توده زیستی رسید. روند این افزایش بعد از روز سوم کند بود ولی تا روز پنجم همچنان ادامه داشت. در محیط کشت حاوی نانوذره منیزیم در روز پنجم، توده زیستی به سطح ۱/۲ درصد محیط کشت رسید در حالی که در نمونه شاهد این مقدار توده زیستی تا روز سوم تخمیر مشاهده شد. آنچه که از این نتایج مشهود است همانطور که گفته شد نانوذره باعث کاهش سرعت روند افزایش توده زیستی می شود.



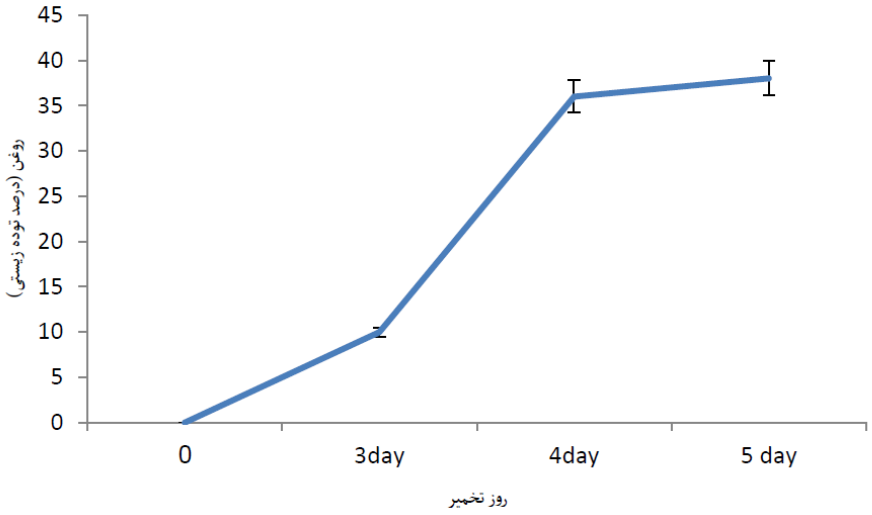
شکل ۴-۷میزان مصرف قند احیا در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانوذره منیزیم

مطابق شکل ۴-۷ میزان مصرف قند احیا نشان داد که روند مصرف مواد قندی تا روز سوم کند بوده و این روند از روز ۳ به ۴ افزایش قابل توجه ای یافته است. در روز ۴ میزان قند به ۲۰ گرم در لیتر کاهش یافته و تا روز ۵ به پایین ترین سطح ممکن کاهش یافته است.

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

همانطور که در شکل ۴-۸ مشاهده می شود روند افزایش میزان روغن در این محیط کشت به طور قابل توجهی از روز اول تخمیر تا روز چهارم تخمیر بالا بوده به طوری که میزان روغن در توده زیستی به سطح ۳۶٪ وزن خشک توده زیستی رسید. از روز چهارم به پنجم این روند بسیار کند بوده و به سطح ۴۰٪ توده زیستی رسید در این شرایط تولید توده زیستی به صورت قابل توجهی افزایش یافت. این روند با روند تولید روغن در شرایط بدون نانو کاملا متفاوت بود چنین تحلیل می شود که نانو ذره منیزیم زمان تجمع روغن در میکروارگانیسم را کاهش داده و باعث شده در اوایل فرایند تخمیر تجمع

روغن تحریک شده و توده زیستی شروع به تجمع روغن در زمان اولیه تخمیر کند افزیش تجمع روغن و رشد سریع تنها در شرایط استفاده از نانو ذره ممکن است در حالیکه در سایر تحقیقات نتایج متفاوتی گزارش شده که اکثر آن ها بر این اتفاق می باشند که تجمع روغن در زمان کاهش رشد تسریع می شود (Ratledge , 2004)

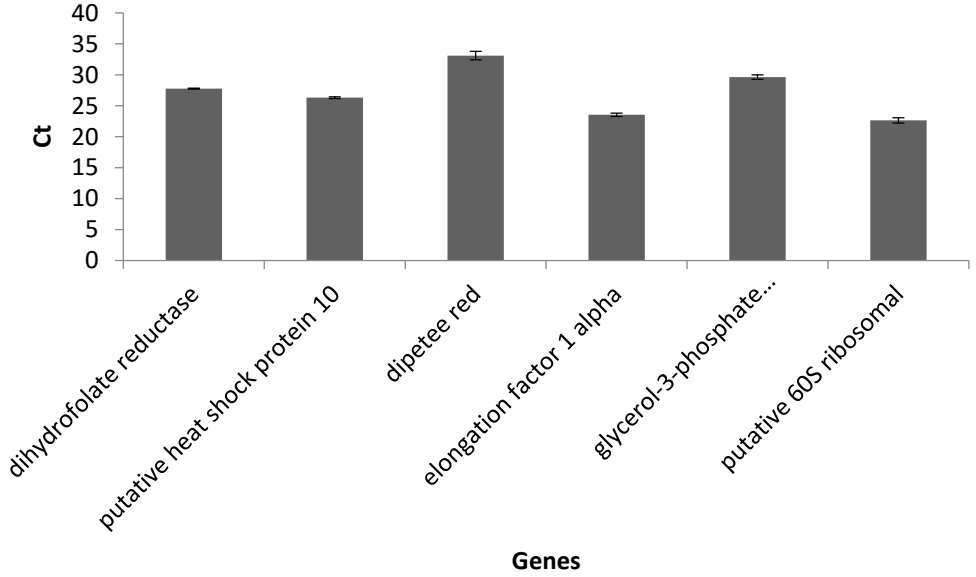


شکل ۴-۸- میزان تولید روغن در طی زمان تخمیر در محیط کشت نیتروژن آلی حاوی نانو ذره منیزیم

۴-۸- بررسی بیان ژن در روز سوم تخمیر

همانند روش قبل RNA استخراج شده و پس از ساخت cDNA غلظت در سطح ۵۰ نانوگرم با استفاده از روش رقیق سازی مرحله ای تنظیم شد از آنجائیکه هدف مقایسه بیان ژن های خانه دار می باشد دقت زیادی در تنظیم محلول رقیق شده انجام شد که نتایج بدست آمده فقط اختلاف در بیان ژن باشد و تفاوت غلظت بین نمونه ها روز ۳، ۴ و ۵ باعث اختلال در نتایج بدست آمده نباشد. نتایج بیان ژن نشان می دهد که همه ژن های خانه دار بیان داشته و در این روز تخمیر، میکروارگانیسم در اویل فاز رشد بوده و روند رشد افزایشی بود. میزان قند در سطح بالایی در محیط کشت وجود داشت.با توجه به شکل ۴-۹ بیشترین میزان بیان ژن مربوط به ژن putative 60S

ribosomal با میزان ۲۲/۶۴ می باشد. پس از آن بیشترین میزان بیان ژن مربوط به ژن translation elongation factor 1 alpHa با مقدار ۲۳/۵۵ می باشد و کمترین میزان بیان ژن با بالاترین Ct و مقدار ۳۳/۱ مربوط به dihydropteridine reductase می باشد.

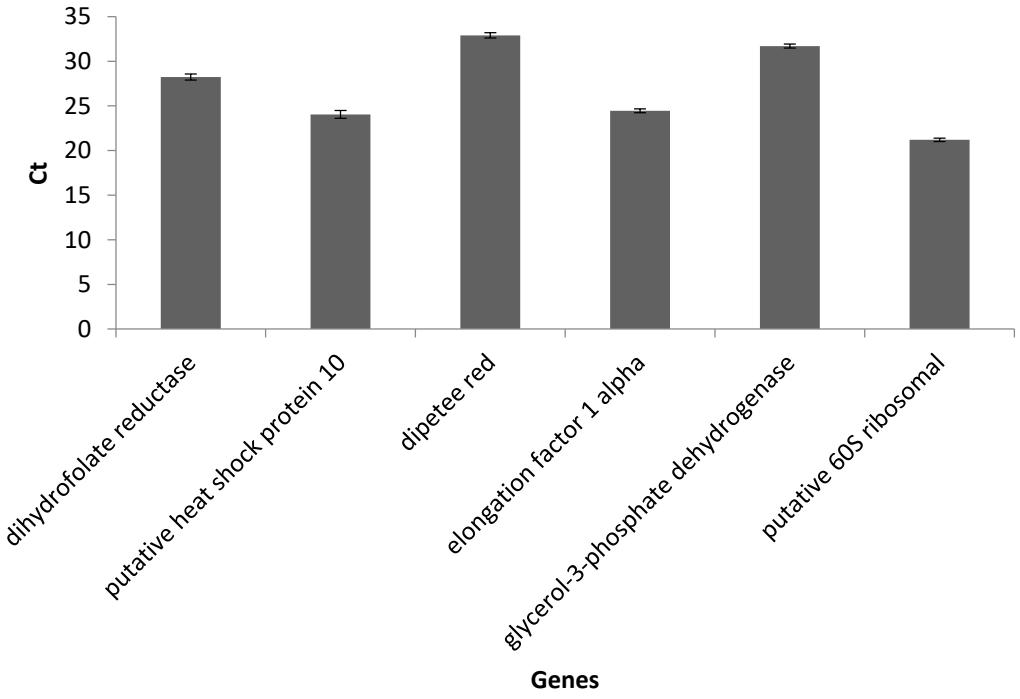


شکل ۴-۹- بررسی میزان Ct ژن ها در روز سوم تخمیر

۴-۸-۱- بررسی بیان ژن در روز چهارم تخمیر

در روز چهارم تخمیر میکروارگانیسم در فاز رشد بوده و توده زیستی همچنان افزایش یافته در عین حال روغن قابل توجه ای در میکروارگانیسم تجمع یافته است. با در نظر گرفتن روند رشد و میزان سطح گلوکز که در سطح ۲۰ گرم در لیتر می باشد چنین تحلیل می شود که میکروارگانیسم در حال رشد می باشد. نتایج بیان ژن نیز قابل تحلیل می باشد که روند افزایشی داشته باشد. با نگاهی به میزان بیان ژن های خانه دار در شکل ۴-۱۰ چنین برداشت می شود که ژن putative 60S ribosomal بیان بالاتری نسبت به مابقی ژن ها داشته و در عین حال ژن dihydropteridine reductase نیز حداقل میزان بیان را دارد. مشابهت بیانی با روز سوم تخمیر نشان دهنده این است

که روند توسعه سلولی از یک روند ثابتی پیروی می کند که تایید این واقعیت علمی می باشد که میکروارگانیسم در مرحله رشد سلولی می باشد.

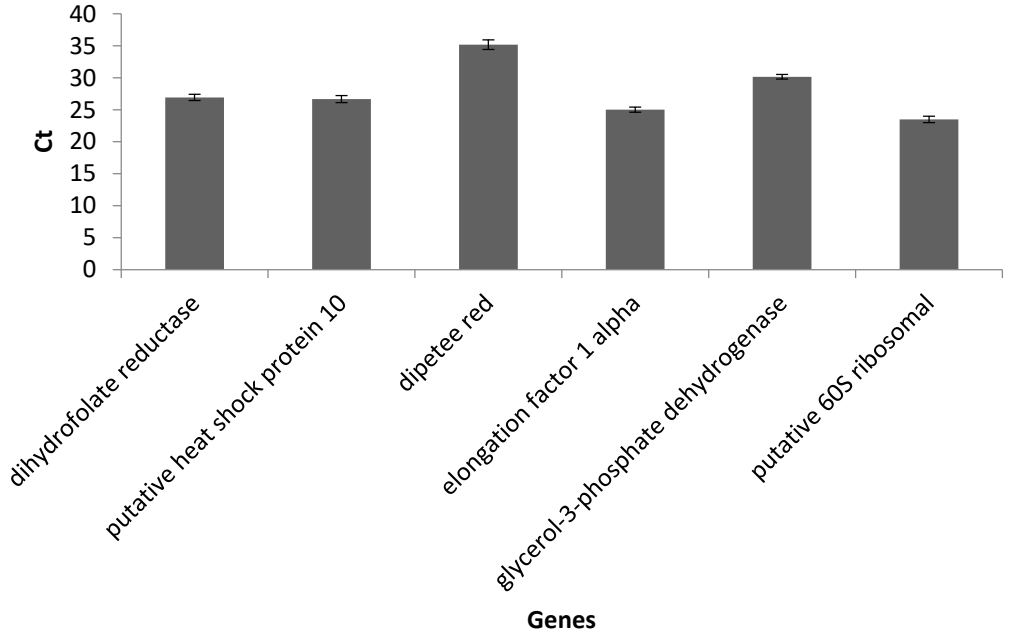


شکل ۴-۱۰-بررسی میزان Ct ژن ها در روز چهارم تخمیر

۴-۸-۲- روز پنجم تخمیر قارچی

در روز پنجم میکروارگانیسم در اواخر فاز رشد می باشد با توجه به روند افزایشی رشد و کاهش قند به سطح زیر ۱۰ گرم در لیتر در عین حال میزان روغن در حداکثر سطح موجود افزایش یافته است. با بررسی شکل ۴-۱۱ میزان بیان ژن های خانه دار، روند بیانی مانند روز ۳ و ۴ رشد را دارا می باشد که چنین تحلیل می شود که میکروارگانیسم در این روز نیز در فاز رشد می باشد. نکته قابل تامل کاهش سطح گلوکز به سطح ۱۰ گرم در لیتر می باشد که نشان دهنده این واقعیت می باشد که میکروارگانیسم در اواخر فاز رشد بوده است. با توجه به محتوی کم و غیر قابل استفاده گلوکز در محیط کشت، احتمالا بعد از این روز روند تجزیه را طی خواهد کرد. یکنواختی روند بیانی سطح پایین

Ct نشان می دهد که تحلیل مورد نظر درست بوده و همچنان فعالیت متابولیکی سلول بالا است.



شکل ۴-۱۱- بررسی میزان Ct ژن ها در روز پنجم تخمیر

۴-۹- تعیین ژن خانه دار مناسب در فرایند رشد ریزسازواره

با بررسی جدول ۴-۲ چنین نتیجه می شود که ژن translation elongation factor 1 alpHa دارای شاخص انحراف معیار و CV پایین می باشد همچنین دارای فاکتور M بسیار مناسبی می باشد ولی با توجه به غیر معنا دار بودن فاکتور P این ژن حذف می شود. میزان شاخص پایین Bestkeeper برای ژن‌های glycerol-3-pHospHate dehydrogenase و dihydrofolate reductase باعث شده این ژن‌ها نیز حذف شوند. شاخص پایین Bestkeeper ژن putative heat shock protein 10 باعث حذف این ژن شد. دو ژن dihydropteridine reductase و putative 60S ribosomal با شاخص Bestkeeper مناسب، انحراف معیار همچنین CV پایین و فاکتور M زیر ۱/۵ ژن های کاندید این مرحله از تخمیر بودند.

جدول ۴-۲- انحراف معیارو ضریب تنوع بیان ژن‌های خانه‌دار در روزهای متفاوت تخمیر در فاز رشد و مرگ

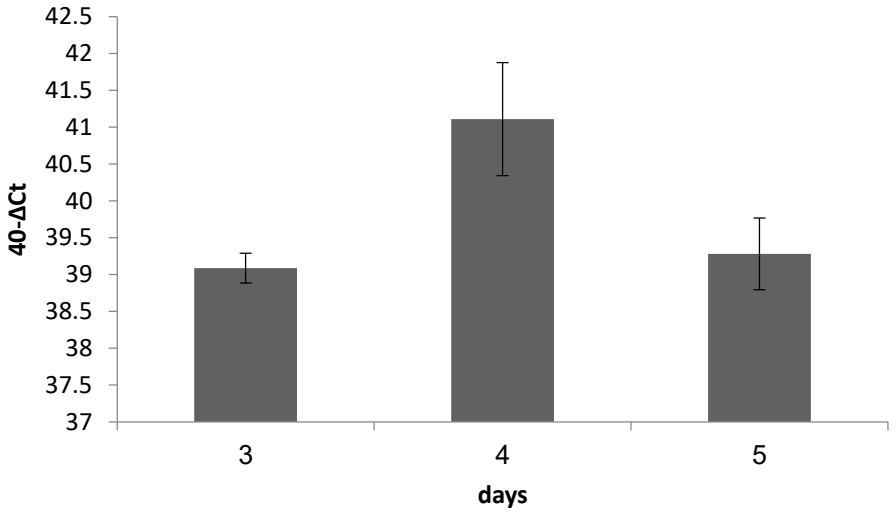
	dihydrofolate reductase	putative heat shock protein 10	dihydropteridine reductase	translation elongation factor 1 alpHa	glycerol-3-pHospHate dehydrogenase	putative 60S ribosomal
min [CP]	۲۶/۴۰	۲۳/۶۴	۳۲/۶۱	۲۶/۸۹	۲۹/۲۸	۲۱/۰۰
max [CP]	۲۸/۶۳	۲۷/۲۹	۳۶/۰۰	۲۹/۱۰	۳۱/۹۵	۲۴/۰۰
std dev [± CP]	۰/۶۲	۱/۰۹	۰/۹۷	۰/۵۹	۰/۸۱	۰/۸۸
CV [% CP]	۲/۲۵	۴/۲۳	۲/۸۷	۲/۱۱	۲/۶۴	۳/۹۴
coeff. of corr. [r]	-۰/۶۹۱	۰/۶۹۲	۰/۹۶۲	۰/۱۱۳	-۰/۴۱۲	۰/۸۹۵
p-value	۰/۰۳۹	۰/۰۳۹	۰/۰۰۱	۰/۷۷۳	۰/۲۶۹	۰/۰۰۱
M value	۰/۰۸۰	۰/۰۷۹	۰/۰۶۰	۰/۰۶۸	۰/۰۷۸	۰/۰۷۰

۴-۱۰- تعیین ژن خانه دار مناسب با بررسی دو حالت تخمیر

با بررسی دو حالت تخمیر چنین تحلیل می شود که ژن dihydropteridine reductase با بالاترین شاخص Bestkeeper و میزان M مناسب زیر ۱/۵ همچنین CV و انحراف استاندار پایین می تواند به عنوان ژن خانه دار معرفی شود سایر ژن ها نسبت به این ژن شاخص های پایین تری داشتند. در مرحله بعد میزان بیان ژن مالیک آنزیم در دو حالت ذکر شده با این ژن که حداقل تغییرات در حین فرایند تخمیر داشته مقایسه شود و میزان تغییرات Ct با این ژن خانه دار مقایسه شد.

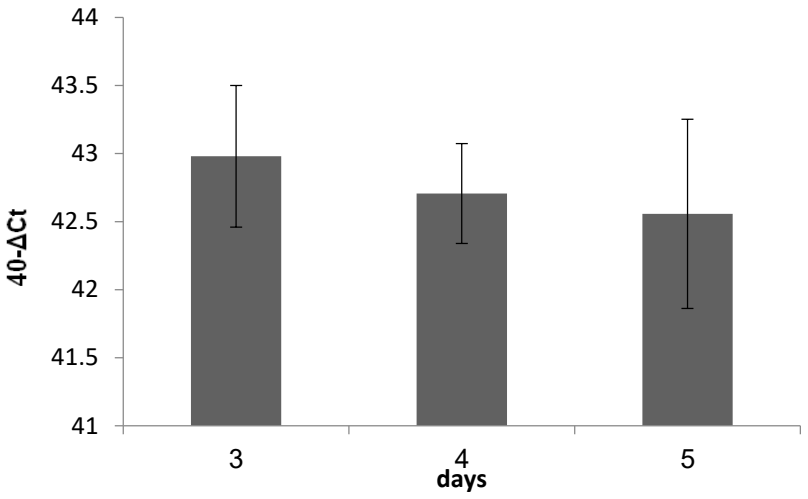
۴-۱۱- بررسی بیان ژن مالیک آنزیم

ژن مالیک آنزیم از ژن های کلیدی تولید روغن در میکروارگانیسم مورتیرلا آلپینا می باشد این ژن با تامین NADH فرایند تولید روغن را کنترل می کند. همانطور که در دو شرایط تخمیر بررسی شد ذرات نانو باعث افزایش سرعت تولید روغن شده و تاثیری در محتوی روغن میکروارگانیسم نداشتند. در شرایطی که نانو ذره منیزیم در محیط کشت وجود داشت در روز ۴ به حداکثر سطح روغن تولیدی میکروارگانیسم رسید در حالیکه در نمونه فاقد نانو این میزان روغن در روز ۵ بدست آمد. محتوی روغن در هر دو شرایط به یک میزان بوده در حالیکه سرعت تولید روغن متفاوت بوده است.



شکل ۴-۱۲-میزان ΔCt -40 در روزهای ۳، ۴ و ۵ تخمیر در نمونه با نانو

از انجائیکه ژن خانه دار dihydropteridine reductase به عنوان ژن کاندید بین ژن های خانه دار انتخاب شد اختلاف بیان ژن مالیک با این ژن در شکل ۴-۱۲ آمده است. همانطور که مشاهده می شود بیشترین میزان بیان ژن مالیک آنزیم در روز ۴ تخمیر مشاهده می شود که در شرایط تولید روغن می باشد. در روز ۵ میزان بیان مجددا کاهش یافته است که نشان می دهد میزان تولید روغن کاهش یافته است.

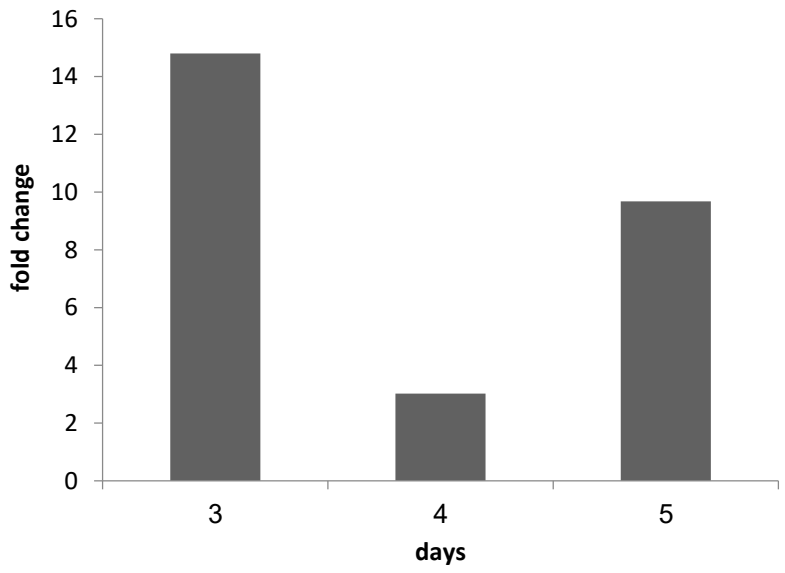


شکل ۴-۱۳- میزان ΔCt -40 در روزهای ۳، ۴ و ۵ تخمیر در نمونه بدون نانو

با توجه به انتخاب ژن dihydropteridine reductase به عنوان ژن خانه دار، اختلاف بیان این ژن با ژن malic enzyme در نمونه بدون نانو در شکل ۴-۱۳ آمده است. همانطور که مشاهده می‌شود همواره ژن مالیک آنزیم در حین فرایند رشد بیان بالایی داشته و اختلاف معنی داری بین نمونه ها مشاهده نمی شود. با مراجعه به شکل ۴-۳ می توان به صحت میزان بیان ژن مالیک آنزیم در نمونه بدون نانو پی برد . بدلیل اینکه در روز سوم میکروارگانیسم تولید توده زیستی می کند و میزان تولید روغن پایین است . در روز چهارم همچنان تولید توده زیستی به صورت کند ادامه دارد و در روز پنجم روند رشد متوقف می شود و تولید روغن افزایش می یابد.

۴-۱۲- مقایسه بیان ژن مالیک آنزیم در دو حالت تخمیر بی‌نانو و با نانو با استفاده از شاخص Fold change

مقایسه دو حالت تخمیری و برسی تفاوت بیان ژن مالیک آنزیم در دو حالت تخمیر با استفاده از شاخص fold change انجام گرفت که میزان آن 2^-ΔΔCt ی باشد. در این مرحله از تحقیق میزان افزایش و یا کاهش برابری بیان ژن مالیک آنزیم در حالت نانو به حالت بدون نانو نشان داده شد.



شکل ۴-۱۴- میزان fold change در روزهای متفاوت تخمیر

همانطور که در شکل ۴-۱۴ نشان داده می شود میزان fold change همواره مثبت بوده که نشان دهنده افزایش بیان ژن مالیک آنزیم در هنگام استفاده از نانو ذره می باشد. بیشترین میزان fold change در روز ۳ تخمیر بوده که با توجه به سرعت تجمع روغن چنین تحلیل می شود که افزایش بیان ژن مالیک آنزیم در روز اولیه تخمیر عامل مهمی در افزایش تجمع روغن در توده زیستی در این روز می باشد و نمونه ی با نانو ۱۴ برابر بیان بیشتری نسبت به نمونه ی بدون نانو دارد. تولید شدید روغن در روز ۴ احتمالا اثر بازدارنده بیانی داشته که بیان این ژن در این روز کاهش یافته با این حال باز هم نمونه ی با نانو ۳ برابر بیان بیشتری نسبت به نمونه ی بدون نانو داشت و در نهایت در روز ۵ دوباره بیان ژن مالیک انزیم درنمونه ی با نانو افزایش بیشتری نسبت به نمونه ی بدون نانو داشت.

۴-۱۳- نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که شرایط مناسب برای رشد سلولی در قارچ مورتیرلا آلپینا در تحقیق حاضر از لحاظ غلظت منابع قندی و نیتروژنی به نسبت ۱۰ به ۵۰ گرم در لیتر می باشد. در حین فرایند تخمیر روند رشد میکروارگانیسم ها تا روز چهارم تخمیر می باشد و از روز چهارم

به بعد وارد فاز مرگ می شود . درجه حرارت و سرعت همزدن تاثیر زیادی بر هر سه پاسخ وزن خشک سلولی، مقدار آراشیدونیک اسید در محیط کشت و کل اسیدهای چرب و بویژه بر تولید آراشیدونیک اسید در محیط کشت دارد. تغییرات تجمعی روغن در توده زیستی نشان داد که میزان تولید روغن ابتدا کم، سپس افزایش، مجددا کاهش قابل توجهی یافت که نشان دهنده مصرف روغن توسط این گونه قارچی می باشد. در این تحقیق از سویا به عنوان منبع پروتئینی استفاده شد که شکل گویچه‌ها به صورت کرکی (یا گویچه‌های پر مانند، ریخت‌شناسی شعاعی) بود. حداکثر بیان ژن در روز رشد میکروارگانیسم مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد ژن translation elongation factor 1 alpHa در محیط کشت نیتروژن آلی بالاترین میزان بیان ژن را بین ژن های انتخابی داشت. دما و زمان annealing تاثیر زیادی در بیان ژن ها داشت. با بررسی و مقایسه کردن معیارهای best keeper ، فاکتور M، میزان انحراف معیار، CV و میزان بیان ژن ها، ژن dihydropteridine reductase در محیط کشت حاوی نیروژن آلی بدون نانوذره منیزیم و با نانوذره منیزیم به عنوان ژن کاندید به عنوان پایدار ترین ژن خانه دار انتخاب شد. استفاده از نانو ذرات منیزیم در سطح ۰/۰۵ گرم در لیتر درمحیط کشت، محرک تولید روغن در این تحقیق بود. منیزیم به صورت محلول و به صورت نانوذره در سطوح بالاتر و پایین تر اثر بازدارندگی در تولید روغن 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) بیان ژن مالیک آنزیم در روزهای متفاوت تخمیر ابتدا کم بود، سپس افزایش یافت و مجددا کاهش یافت. همچنین در این تحقیق مقایسه و بررسی تفاوت بیان ژن مالیک آنزیم در دو حالت تخمیر با استفاده از شاخص fold change انجام گرفت که استفاده از نانوذره تاثیر زیادی در مقدار بیان ژن مالیک آنزیم داشت.

۴-۱۴- پیشنهادات

- ✓ عوامل ژنتیکی موثر در کاهش زمان تخمیر در اثر استفاده نانو ذره منیزیم در محیط کشت آب پنیر بررسی شود.
- ✓ با توجه به اینکه قارچ‌ها قابلیت استفاده از ضایعات کشاورزی و صنایع غذایی دارند، از این مواد برای کاهش هزینه‌ها و برطرف کردن مشکلات ناشی از آنها استفاده شود.
- ✓ ژن مالیک آنزیم با توالی و دمای annealing دیگری بر روی cDNA قارچ مورتیرلا آلپینا بررسی شود.
- ✓ از ژن های دیگری به عنوان ژن خانه دار بر روی قارچ مورتیرلا آلپینا استفاده شود.
- ✓ تحقیقات وسیعتری در تأثیر ژن های خانه دار بر محتوی اسیدهای چرب غیر اشباع انجام شود

فصل ۵: منابع

منابع فارسی

۱ اسدی، ز.، نیکوپور، ه.، خسروی داران، ک. و باخدا، ح. (۱۳۹۳). بررسی تولید آراشیدونیک اسید توسط Mortierella alpina در تخمیر حالت جامد با استفاده از تفاله خرما، مجله علوم غذایی و تغذیه. ۳: ۶۰-۶۸.

۲ حسینی، س.، آذین،م.، قوامی، م.، و حسینی مظهری، س.ض. (۱۳۹۱). بررسی تولید روغن میکروبی به وسیله Mortierella alpina، مجله علوم غذایی و تغذیه. ۳: ۴۰-۵۶.

۳ شجاع الساداتی، س. ع. و اسدالهی، م. ع. (۱۳۸۷). بیوتکنولوژِی صنعتی. انتشارات دانشگاه تربیت مدرس،۳۹۴ صفحه.

۴ محمدی‌نصر، م.، میرباقری، م. و نحوی، الف. (۱۳۹۳). استفاده از منبع کربوهیدراتی و پسماندهای روغنی در تولید لیپید از قارچ موکور هیمالیس، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. ۲: ۵۹-۶۶.

منابع لاتین

5 Ahmed, S. U., Singh, S. K., Pandey, A., Kanjilal, S., & Prasad, R. B. (2006). Effects of various process parameters on the production of γ-linolenic acid in submerged fermentation. Food technology and Biotechnology, 44(2), 283-287

6 Aiba, S., HumpHrey, A. E. and Millis, N. F. (1973). Biochemical Engineering. 2nd ed., University of Tokyo Press, Japan.

7 Annunziata, A. and Annunziata, R. (2011). Functional foods development in the European market: A consumer perspective. Journal of Functional Foods, 3: 223–228.

8 Barclay, W., Weaver, C. and Metz, J. (2005). Development of a docosahexaenoic acid production technology using Schizochytrium: a historical perspective. In: Cohen, Z. and Ratledge, C. (eds.). Single Cell Oil. American Oil Chemist's Society Press, Champaign, IL, USA.

9 Benatti, P., Peluso, G., Nicolai, R. and Calvani, M. (2004). Polyunsaturated fatty acid: biochemical, nutritional and epigenetic properties. Journal of the American College of Nutrition, 23: 281-302.

10 Birch, E. E., Garfield, S., Hoffman, D. R., Uauy, R. and Birch, D. G. (2000). A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chian polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. Development of Medical Child Neurology, 42: 174–181.

11 Bohle, K., Jungebloud, A., Göcke, Y., Dalpiaz, A., Cordes, C., Horn, H. and Hempel, D.C. (2007). Selection of reference genes for normalisation of specific gene quantification data of Aspergillus niger. Journal of biotechnology, 132: 353-358.

12 Bull, A. T. and Bushell, M. E. (1976). Environmental control of fungal growth. The Filamentous Fungi, 2: 1– 31.

13 Carlson, S. E., Werkman, S. H., Peeples, J. M., Cooke, R. J. and Tolley, E. A. (1993). Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. Proceeding of National Academic Science of USA, 90: 1073-1077.

14 Carter, B., Bull, A. T., Pirt. S. J. and Rowley, B. I. (1971). Relationship between energy, substrate utilization and specific growth rate in Aspergillus nidulans. Journal of Bacteriology, 108: 309– 13.

15 Certik, M., Slavikova, L. Masrnova, S. and Sajbidor, J. (2006). Enhancement of nutritional value of cereals with γ-linolenic acid by fungal solid-state fermentations. Food Technology and Biotechnology, 44: 75-82.

16 Cohen, Z. and Khozin-Goldberg, I. (2005). Searching for PUFA-rich microalgae. In: Cohen, Z. and Ratledge, C. (eds.). Single Cell Oil. American Oil Chemist's Society Press, Champaign, IL, USA.

17 Das, T., Thurmond, J. M., Bobik, E., Leonard, A. E., Parker- Barnes, J. M., Huang, Y. S. and Mukerji, P. (2000) Polyunsaturated Fatty Acid-Specific Elongation Enzymes, Biochemistry Soc Trans, 28: 658–660.

18 Das, T., Thurmond, J. M., Leonard, A. E., Parker-Barnes, J. M., Bobik, E. and Chuang, L. T. (2002). In: Huang YS, Ziboh VA, editors. g-Linolenic acid—recent advances in biotechnology and clinical applications. Champaign, IL: AOCS Press;. p. 40–4.

19 Dedyukhina, E.G., Chistyakova, T.I., Kamzolova, S.V., Vinter, M.V. and Vainshtein, M.B. (2012). Arachidonic acid synthesis by glycerol-grown Mortierella alpina. European journal of lipid science and technology, 114: 833-841.

20 Dyal, S. D. (2004). Maximaizing the production of Gamma-Linolenic acid in Mortierella ramanniana var. ramanniana as a function of pH, temperature, carbon source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation. M.Sc. Thesis. University of Alberta, Canada.

21 Dyal, S. D. and Narine, S. S. (2005). Implications for the use of Mortierella fungi in the industrial production of essential fatty acid. Food Research International, 38: 445-467.

22 Fakas, S., Papapostolou, L., Papanikolaou, S. and Georgiou, C. D. (2009) Susceptibility to peroxidation of the major mycelial lipid of Cunninghamella echinulata. Eur. Journal of Lipid Science Technology, 110: 1062–1067.

23 Fennema, O. R. (1996). Food Chemistry. New York: Marcel Dekker, U. S. A. 705p.

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

25 Gerasimenko, N. I., Busarova, N. G., Moiseenko, O. P. (2010). Seasonal Changes in the Content of Lipids, Fatty Acids, and Pigments in Brown Alga Costaria costata. Russian Journal of Plant PHysiology, 57: 205–211.

26 Giacomo, G. Luca, B. Simona, B. Antonio, G. Severino, Z. and Marilena, B. (2008). Correlation between cell lipid content, gene expression and fermentative behavior of two Saccharomyces cerevisiae wine strains. Journal of Applied Microbiology, 104: 906–914.

27 Grantina-Ievina, L., Berzina, A., Nikolajeva, V., Mekss, P. and Muiznieks, I. (2014). Production of fatty acids by Mortierella and Umbelopsis species isolated from temperate climate soils. Environ Exp Biol, 12: 15-27.

28 Hao, G., Chen, H., Wang, L., Gu, Z., Song, Y., Zhang, H., Chen, W. and Chen, Y.Q. (2014). Role of malic enzyme during fatty acid synthesis in the oleaginous fungus Mortierella alpina. Applied and environmental microbiology, 80: 2672-2678.

29 Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. Y. and Shimizu, S. (2002). Production of arachidonic acid by Mortierella fungi. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 7: 252-262.

30 Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E.Y. and Shimizu, S. (2002). Production of arachidonic acid byMortierella fungi. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 7: 252-262.

31 Higashiyama. K., Yaguchi. T., Akimoto. K., Fujikawa. S. and Shimizu, S. (1998). Enhancement of arachidonic acid production by Mortierella alpina. Journal of American. Oil Chemistrs' Society, 75: 1501–1505.

32 Hao, S.Y. (2008). Genetic, lipidic and proteomic characterization of an arachidonic acid producing fungus, Mortierella alpine. University of Hong Kong, 1:20-348.

33 Hudecova, I.(2015). Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. Clinical biochemistry, 48:948-956.

34 Hou C. T. (2008). Production of arachidonic acid and dihomo-gama-linolenic acid from glycerol by oil-producing filamentous fungi, Mortierella in ARS Culture Collection. Journal of Industrial Microbiology, 35: 501–506.

35 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.

36 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.

37 Jin, M. J., Huang, H., Xiao, A. H., Zhang, K., Liu, X., Li, S. and Peng, C. (2008). A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by Mortierella alpina. Biotechnology Letters, 30: 1087–1091.

38 Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I. and Aggelis, G. (2001). Lipid and gamma-linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. Journal of American Oil Chemistrs' Society, 78: 341–346.

39 Kawashima, H., Akimoto, K., Higashiyami, K., Fujikawa, S. and Shimizu, S. (2000) Industrial production of dihomo-gammalinolenic acid by a delta5-desaturase-defective mutant of Mortierella alpina 1S-4 fungus. Journal of American Oil Chemistrs' Society, 77: 1135–1138.

40 Kim, H. (1997). Lipid production in fungi. PHD. Thesis. Auburn University, Alabama, USA.

41 Kim, H.K. and Yun, S.H. (2011). Evaluation of potential reference genes for quantitative RT-PCR analysis in Fusarium graminearum under different culture conditions. The Plant Pathology Journal, 27: 301-309.

42 Koike, Y., Cai, H. J., Higashiyama, K., Fujikawa, S. and Park, E. Y. (2001). Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelia morpHology and arachidonic acid production in cultures of Mortierella alpine. Journal of Bioscience and Bioengineering, 91:382–389.

43 Kozera, B. and Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. Journal of applied genetics, 54: 391-406.

44 Lanting, C. I., Fidler, M., Huisman, C. L., Touwen, and E. R. (1994). Boersma, Neurological Differences Between 9-Year-Old Children. Fed Breast-Milk as Babies, Lancet, 344: 1319–1322.

45 Leonard, A. E., Pereira, S. L., Sprecher, H. and Huang, Y. S. (2004). Elongation of long-chain fatty acids. Progress in Lipid Research, 43: 36–54.

46 L1anos, A., François, J. M., and Parrou, J. L. (2015). Tracking the best reference genes for RT-qPCR data normalization in filamentous fungi. BMC genomics, 16: 63-71

47 Lindberg, A. and Molin, G. (1993). Effect of temperature and glucose supply on the production of polyunsaturated fatty acids by the fungus Mortierella alpina CBS343.66 in fermentor cultures. Applied Mircobiology and Biotechnology, 39: 450–455.

48 Liu, W. and Saint, D.A. (2002). A new quantitative method of real time reverse transcription simulation of polymerase chain reaction Kinetics. Analytical Biochemistry, 302: 52-59.

49 Malaiwong, N., Yongmanitchai, W. and Chonudomkul, D. (2016). Optimization of arachidonic acid production from Mortierella alpina PRAO7-10 by response surface methodology. Agriculture and Natural Resources, 50: 162-172.

50 Mannhalter, C., Kozier, D. and Mitter, G. (2000). Evaluation of RNA isolation methods and reference gene for RT-PCR analysis of rare target RNA. Clin. Chem. Lab, 38: 171-177.

51 Marisa, L., Wang, A. and Juan, F. (2005). Real-Time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques, 39: 75-85.

52 Morrison, T.B., J. and Wittwer, C.T. (1998). Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR green monitoring during amplification. Biotechniques, 24: 954-962.

53 MurpHy, D. (1991). Storage lipid bodies in plants and other organisms. Progress in Lipid Research, 29: 299-324.

54 Nasr, M.M., Nahvi, I., Keyhanfar, M. and Mirbagheri, M. (2017). The effect of carbon and nitrogen sources on the fatty acids profile of Mortierella vinacea. Biological Journal of Microorganism, 5: 1-8.

55 Nielsen, J., Johansen, C. L., Jacobsen, M., Krabben, P. and Villadsen, J. (1995). Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of Penicillium chrysogenum and its relation to penicillin production. Biotechnology Progress, 11: 93– 98.

56 Nisha, A. and Venkateswaran G. (2008). Effect of Culture Variables on Mycelial Arachidonic acid Production by Mortierella alpine. Food Bioprocess Technology, 18:.111–120.

57 Nisha, A. and Venkateswaran, G. (2011). Effect of culture variables on mycelial arachidonic acid production by Mortierella alpina. Food and Bioprocess Technology, 4: 232-240.

58 Nisha, A., Rastogi, K. N. and Venkateswaran, G. (2011). Optimization of media components for enhanced arachidonic acid production by Mortierella alpina under Submerged Cultivation. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 16: 229–237.

59 Papagianni, M. (2004). Fungal morpHology and metabolite production in submerged mycelial processes. Biotechnology Advances. 22: 189–259.

60 Park, E. Y., Koike, Y., Higashiyama, K., Fujikawa, S. and Okabe, M. (1999). Effect of nitrogen source on mycelia morpHology and arachidonic acid production in cultures of Mortierella alpina. Journal of Bioscience and Bioengineering, 88: 61-67.

61 Peng, C., Huang, H., Ji, X., Liu, X., You, J., Lu, J. and Cong, L. (2010). A temperature-shift strategy for efficient arachidonic acid fermentation by Mortierella alpina in batch culture. Biochemical Engineering Journal, 53: 92–96.

62 Pirt, S. J. and Callow, D. S. (1959). Continuous flow culture of the filamentous mould Penicillium chrysogenum and the control of its morpHology. Nature, 184: 307– 10.

63 Prosser, J. I. (1979). A model for hypHal growth and branching. Journal Gen Microbiology, 111: 153– 164.

64 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.

65 Ratledge, C. (1982). Single cell oil. Enzyme Microbiology and Technology, 4: 58-60.

66 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.

67 Ratledge, C. (1993). Single cell oils-have they a biotechnological future? Trends in Biotechnology, 11: 278–284.

68 Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochemistry, 86: 807–815.

69 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.

70 Rayaroth, A.C., Tomar, R.S. and Mishra, R.K. (2017). Arachidonic Acid Synthesis in Mortierella alpina: Origin, Evolution and Advancements. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 87: 1053-1066.

71 Rocky-Salimi, K., Hamidi-Esfahani, Z. and Abbasi, S. (2011). Statistical optimization of arachidonic acid production by Mortierella alpina CBS 754.68 in submerged fermentation. Iranian Journal of Biotechnology, 9: 87–93.

72 Sakuradani, E., Hirano, Y., Kamada, N., Nojiri, M., Ogawa, J. and Shimizu, S. (2004). Improvement of arachidonic acid production by mutants with lower n-3 desaturation activity derived from Mortierella alpina 1S-4. Applied Microbiology and Biotechnology, 66: 243–248.

73 Sakuradani, E., Nojiri, M., Suzuki, H. and Shimizu, S. (2009). Identification of a novel fatty acid elongase with a wide substrate specificity from arachidonic acid-producing fungus Mortierella alpina 1S-4. Applied Microbiology and Biotechnology, 84: 709–716.

74 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.

75 Sikorski, Z. E. and Kolakowska, A. (2003). Chemical and functional properties of food lipids. CRC Press, New York, 388p.

76 Singh, A. and Ward, O. P. (1997). Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by Mortierella alpina ATCC 32222. Apply Microbiology Biotechnology, 48: 1–5.

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

78 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

79 Susanto, E., Fahmi, A.S., Abe, M., Hosokawa, M. and Miyashita, K. (2016). Lipids, Fatty Acids, and Fucoxanthin Content from Temperate and Tropical Brown Seaweeds. Aquatic Procedia, 7:66-75.

80 Teste, M.A., Duquenne, M., François, J.M. and Parrou, J.L. (2009). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in Saccharomyces cerevisiae. BMC molecular biology, 10: 99.

81 Vandesompele, J., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002). Elimination of primer dimer artifacts and genomic coamplication using a two-step SYBR green1 real-time RT-PCR. Analytical Biochemistry, 303: 95-98.

82 Walkey, C. J. Luo, Z., Borchers, C. H., Measday, V. and Van Vuuren, H. J. (2011). The Saccharomyces cerevisiae fermentation stress response protein Igd1p/Yfr017p regulates glycogen levels by inhibiting glycogen debranching enzyme. FEMS Yeast Research, 12: 1133–1140.

83 Wang, L., Chen, W., Feng, Y., Ren, Y., Gu, Z., Chen, H., Wang, H., Thomas, M.J., Zhang, B., Berquin, I.M. and Li, Y. (2011). Genome characterization of the oleaginous fungus Mortierella alpina. PloS one, 6: 28319.

84 Wang, T. and Brown, M. J. (1999). mRNA quantification by real time Taqman poly merase chain reaction: Validation and comparison with RNase protection. Analytical Biochemistry, 269: 198-201.

85 Ward, O. P. and Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acid: alternative sources of production. Process Biochemistry, 40: 3627-3652.

86 Wynn JP, and Ratledge, C. (2000). Evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in Mortierella alpina is at the level of the 18:3 to 20:3 elongase. Microbiology, 146: 2325–2331.

87 Wynn, J. P. and Ratledge, C. (2006). Microbial production of oils and fats. In: Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A. and Levin, R. E. (eds.). Food Biotechnology, CRC Press.

88 Zampieri, D., Nora, L.C., Basso, V., Camassola, M. and Dillon, A.J. (2014). Validation of reference genes in Penicillium echinulatum to enable gene expression study using real-time quantitative RT-PCR. Current genetics, 60: 231-236.

89 Zeng, Y., Ji, X.J., Chang, S.M., Nie, Z.K. and Huang, H. (2012). Improving arachidonic acid accumulation in Mortierella alpina through B-group vitamin addition. Bioprocess and biosystems engineering, 35: 683-688.

90 Zhang, Y. and Ratledge, C. (2008). Multiple isoforms of malic enzyme in the oleaginous fungus, Mortierella alpina. Mycological research, 112: 725-730.

91 Zhou, Y. H., Zhang, Y. J., Luo, Z. B., Fan, Y. H., Tang, G. R., Liu, L. J., and Pei, Y. (2012). Selection of optimal reference genes for expression analysis in the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana during development, under changing nutrient conditions, and after exposure to abiotic stresses. Applied microbiology and biotechnology, 93: 679-685.

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

93 Zhu, M., Yu, L. J., Li, W., Zhou, P. P. and Li, C. Y. (2006). Optimiztion of arachidonic acid production by fed-bath culture of Mortierella alpine based on dynamic analysis. Enzyme Microbiology Technology, 38: 735–740.

94 Zhu, M., Zhou, P. P. and Yu, L. J. (2002). Extraction of lipid from Mortierella alpina and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. Bioresource Technology, 84: 93–95.

Abstract

Microorganisms that have a lipid accumulation capability more than 20% of their biomass are called oleaginous. Mortierella alpine fungi species are famous oleaginous fungi. The most important product of Mortierella alpine is lipid with high content of the arachidonic acid fatty acids. In this research the effect of pHysic chemical factors and magnesium nano-particles on the oil production from Mortierella alpina fungus in a submerge fermentation condition as well as theirs relation with the rate Malic gene expression and housekeeping genes were investigated. The results showed that at the early fermentation time until third days, a considerably biomass growth was observed. during the 24 after that time, the growth trend had slowed down, subsequently at the end of fermentation time, a deterioration in biomass accumulation was occurred. More to the point, the consumption of the reducing glucose was coincident with the accumulation of biomass. at the days two and five in a non-nano particle medium, translation elongation factor 1 alpHa as housekeeping gene had the maximum gene expression among the selected genes at the 3 and 5 days of fermentation time. To select a suitable housekeeping gene, the gene that has the lowest variation in expression at the stage of growth and death must be investigated. The dihydropteridine reductase at this stage was confirmed as the best candidate gene with the most stability index. Nano-particles in media induced the growth rate comparing to the control sample.

Dihydropteridine reductase and putative 60S ribosomal with a suitable best keeper index and low Standard deviation, CV index and factor M1 were chosen in the fermented medium containing nano-particles. However, in both cases, the dihydropteridine reductase gene was selected as the best housekeeping gene for further processing; hence the gene was used to normalize the malic enzyme gene expression. The results of the fold-change of the malic enzyme in a nano-sample to the non-nano-sample indicated that, nano-particle had positive effect on the malic gene expression and the highest effect was achieved at the begging of the fermentation time that caused the lipid production to induce.

Keyword: mortierella alpine, single cell oil, glucose, malic enzyme, arachidonic acid

Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Food Sciences

Investigation of Environmental Factor on Lipid Production from Mortierella Alpina in Submerge Media and its Relationship with the Malic Enzyme Gene Expression

By: Abdollah vatandoost

Supervisors:

Dr. Hamidreza Samadloui

Dr. Shahrokh Gharanjik

June, 2018