

Isolation, Optimization, and Investigation of Production of Linoleic Acid in *Aspergillus niger*

Noushin Shafiei¹, Keivan Beheshti Maal^{1*}, Mahboobeh Madani¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

***Corresponding Author:**
Keivan Beheshti Maal,
Department of Microbiology,
Faculty of Biological
Sciences, Falavarjan Branch,
Islamic Azad University,
Isfahan, Iran.

Email:
beheshtimaal@iaufala.ac.ir

Received: 11 Aug, 2015

Accepted: 17 Nov, 2015

Abstract

Background and Objectives: Microorganisms that are capable of accumulating lipid up to 20% of their biomass are called oleaginous microorganisms. In this study, optimization in lipid and linolenic acid production was investigated in *Aspergillus niger* as an oleaginous filamentous fungi.

Methods: In this study, at first different strains of filamentous fungi were isolated, and after staining of the isolates with Sudan Black, their oil was extracted using chloroform/methanol. Then, the isolates with oil/dry biomass ratio of more than 20% were considered as oleaginous filamentous fungi. After microscopic examination, the identified isolate was optimized in terms of oil production. Finally, the amount of linolenic acid was evaluated using gas chromatography.

Results: At first, 20 filamentous fungi isolates were isolated. According to the results of Sudan Black staining, lipid inclusions were observed in all the fungal isolates. The amount of oil produced in all isolates, showed that the percentage of oil production in isolates 4, 5, and 16, was more than 20%. In microscopic examination, the isolate 5 was *Aspergillus niger*. The best pH, temperature, time, and carbon source for oil production by *Aspergillus niger* was 4.5, 30°C, 96 hours, and fructose, respectively. The amount of linolenic acid in *Aspergillus niger* was reported 22.4% using gas chromatography.

Conclusion: The results of this study revealed that *Aspergillus niger* is an appropriate filamentous fungi for linolenic acid production.

Keywords: Fungi; Fatty acid; Microbial oil; *Aspergillus niger*.

جداسازی، بهینه سازی و بررسی تولید لینولنیک اسید در *آسپرژیلوس نایجر*

نوشین شفیعی^۱، کیوان بهشتی مآل^{۱*}، محبوبه مدنی^۱

چکیده

زمینه و هدف: میکروارگانیسم‌هایی که قابلیت تجمع لیپید به میزان بیش از ۲۰٪ بیومس خود را دارند، تحت عنوان میکروارگانیسم‌های مولد چربی نامیده می‌شوند. در این تحقیق، بهینه‌سازی در تولید چربی و تولید لینولنیک اسید در *آسپرژیلوس نایجر* به‌عنوان قارچ رشته‌ای مولد چربی بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه ابتدا سویه‌های مختلف قارچ‌های رشته‌ای جداسازی شدند و پس از رنگ‌آمیزی جدایه‌ها به‌وسیله سودان سیاه، چربی آنها با استفاده از حلال کلروفرم/متانول استخراج گردید. سپس جدایه‌هایی که نسبت چربی به بیوماس خشک آنها بیش از ۲۰٪ بود به‌عنوان جدایه‌های مولد چربی انتخاب شدند. پس از بررسی میکروسکوپی، جدایه شناخته‌شده از نظر تولید چربی بهینه‌سازی شد. در نهایت، مقدار لینولنیک اسید با استفاده از کروماتوگرافی گاز بررسی گردید.

یافته‌ها: ابتدا ۲۰ سویه مختلف قارچ‌های رشته‌ای جداسازی شد. برطبق نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی سودان سیاه، دانه‌های چربی در همه آنها مشاهده گردید. همچنین مقدار چربی تولیدشده در همه جدایه‌ها نشان داد درصد تولید چربی در جدایه‌های ۴، ۵ و ۱۶ بیش از ۲۰٪ است. در بررسی میکروسکوپی؛ جدایه ۵، *آسپرژیلوس نایجر* بود. بهترین pH، دما، زمان و منبع کربن برای تولید چربی در *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۴/۵، ۳۰ درجه سانتیگراد، ۹۶ ساعت و فروکتوز تعیین شد. با استفاده از روش کروماتوگرافی گاز، میزان لینولنیک اسید در *آسپرژیلوس نایجر*، ۲۲/۴٪ گزارش شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد *آسپرژیلوس نایجر* یک قارچ رشته‌ای مناسب برای تولید لینولنیک اسید است.

کلیدواژه‌ها: قارچ؛ اسید چرب؛ روغن میکروبی؛ *آسپرژیلوس نایجر*.

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم‌زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

کیوان بهشتی مآل، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم‌زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

beheshtimaal@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۲۷

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Shafiei N, Beheshti Maal K, Madani M. Isolation, optimization, and investigation of production of linoleic acid in *Aspergillus niger*. Qom Univ Med Sci J 2016;10(6):24-31.[Full Text in Persian]

مقدمه

روغن میکروبی یا روغن تک‌یاخته، به محتوای لیپیدی در سلول‌های میکروبی اطلاق می‌شود. میکروارگانیسم‌هایی نظیر باکتری‌ها، جلبک‌ها، مخمرها و کپک‌ها که قابلیت تجمع لیپید به میزان بیش از ۲۰٪ بیومس خود را دارند، تحت عنوان میکروارگانیسم‌های مولد چربی نامیده می‌شوند (۲،۱). از بین میکروارگانیسم‌های تولیدکننده چربی، قارچ‌ها اهمیت ویژه‌ای دارند؛ زیرا محتوای چربی آنها بالا بوده، و قادر به استفاده از سوبسترای ارزان قیمت می‌باشند. به همین دلیل جداسازی و کشت قارچ‌های روغنی برای تولید اسید چرب، اهمیت ویژه‌ای دارد (۳). تجمع لیپید در میکروارگانیسم‌های مولد چربی با گرسنگی سلول در زمینه نیتروژن یا ماده غذایی دیگری غیر از کربن نظیر فسفر، روی، آهن یا منگنز اتفاق می‌افتد. پاسخ سلول‌ها به کمبود ماده غذایی کلیدی، با وارد شدن به فاز تجمع لیپید صورت می‌گیرد. چنانچه سلول‌ها به شرایطی بازگردند که ماده غذایی نیتروژنی در دسترس باشد ذخایر چربی مصرف‌شده، به مواد سلولی تبدیل می‌شوند. تجمع لیپید یک پاسخ القاشده تحت استرس است که در آن روغن به عنوان یک ماده ذخیره‌ای داخل سلولی تجمع می‌یابد (۵،۴). از مهم‌ترین قارچ‌های رشته‌ای مولد چربی می‌توان به *آسپرژیلوس اریزیایی*، *کانینگهاملا اکینولاتا*، *هومیکولا لانوکیناز*، *مورتییرلا ایزابلینا* و *موکور موسدو* اشاره کرد (۱). روغن میکروبی، کاربرد پزشکی دارد برای مثال می‌توان از روغن میکروبی در تولید آراشیدونیک اسید که یک اسید چرب غیراشباع چندگانه است استفاده کرد. تعدادی کاربردهای فیزیولوژی آراشیدونیک اسید در درمان پسونیاسیس پوستی، کاهنده چربی کبد و کشنده سلول‌های تومری می‌باشد. قارچ رشته‌ای *مورتییرلا آلیاسه*، آراشیدونیک اسید را به فرم تری‌گلیسرید در میسلیم‌های خود انباشته می‌کند. از میان میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آراشیدونیک اسید، *مورتییرلا آلیپینا*، بهترین گونه تولیدکننده شناخته شده است (۷،۶). اسید چرب دوکوزا هگزانویک اسید برای سلامتی انسان، به خصوص طی دوره بارداری و تغذیه نوزادان اهمیت دارد. Martek در اواخر دهه ۱۹۸۰، تولید این اسیدچرب را در کریپتوکودینیوم کوهنی بررسی کرد.

اسیدهای چرب غیراشباع لینولنیک اسید و لینولنیک اسید، از اسیدهای چرب ضروری هستند. این اسیدهای چرب توسط بدن انسان ساخته نمی‌شوند، بنابراین از مواد غذایی حاوی آنها به دست می‌آیند. لینولنیک اسید مانع از تجمع پلاکت‌ها شده و بدین ترتیب مانع از انسداد عروق خونی می‌گردد، لذا این اسید چرب غیراشباع از پیشرفت بیماری‌های قلبی - عروقی جلوگیری می‌کند (۹،۸). Kumar میزان اولئیک اسید و لینولنیک اسید را در روغن استخراج‌شده از *گونه‌ای از مورتییرلا* به وسیله کروماتوگرافی گاز مورد آنالیز قرار داد. در این مقاله به بررسی میزان تولید لینولنیک اسید در *آسپرژیلوس نایجر* به عنوان قارچ رشته‌ای مولد چربی پرداخته شد.

روش بررسی

در این مطالعه نمونه‌گیری از خاک درختان مختلف، به ویژه درختانی که میوه چرب یا دانه روغنی دارند (خاک مزارع ذرت و آفتابگردان، خاک درختان توت و گردو، خاک آلوده به روغن‌های صنعتی در تعمیرگاه ماشین، خاک مغازه قصابی، خاک چمنزار، خاک مزرعه کلم و خاک مراتع) در مناطق مختلف استان اصفهان انجام شد. به منظور جداسازی کپک‌ها از خاک، سری رقت 10^{-3} از نمونه‌های خاک ساخته شد و به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به هر پلیت حاوی محیط کشت، پوتیتو دکستروز آگار (مرک، آلمان) تلقیح و به مدت ۵-۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. کلنی‌های کپکی مختلف در محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار جدید خالص‌سازی شدند. به منظور نگهداری قارچ‌ها به مدت چندین ماه از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار، اسلنت تهیه و گونه‌های خالص‌شده با استفاده از آنس استریل به اسلنت منتقل و پس از رشد در یخچال نگهداری شدند (۱۰).

غربالگری کیفی قارچ‌های رشته‌ای مولد چربی به وسیله رنگ‌آمیزی با سودان سیاه انجام گرفت. جهت رنگ‌آمیزی با سودان سیاه، ابتدا از نمونه کپکی رشدیافته ۷۲ ساعته در محیط غربالگری جامد (گلوکز، عصاره مخمر و آگار به ترتیب ۵، ۳۰ و ۱۵ گرم برلیتر و آب مقطر ۱ لیتر)، اسمیر تهیه و بر روی شعله تثبیت شد.

محول ۲ نرمال هیدرواکسید پتاسیم در متانول، در یک اپندرف ۲ میلی‌لیتری قرار گرفت. این ترکیب به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با دور rpm ۵۰۰۰ و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. این ترکیب از ۲ فاز (لایه زیرین حاوی گلیسرول و لایه فوقانی حاوی اسیدچرب استری شده) تشکیل شده است (۱۴).

دستگاه کروماتوگرافی گاز شامل ستون موئین به طول ۳۰ متر است. گاز حامل، شامل هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر ثانیه است. طراحی دمایی این دستگاه ابتدا براساس دمای اولیه ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه بوده و سپس دما از ۷۰-۱۷۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۵ درجه سانتیگراد بر ثانیه افزایش می‌یابد و بدون توقف زمانی در دمای ۲۲۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۴ درجه سانتیگراد بر ثانیه، افزایش و ۱۵ دقیقه در این دما متوقف می‌شود. ابتدا استاندارد استری شده متیل لینولات به همراه نمونه چربی استری شده به ستون GC تزریق گردید. سپس منحنی استاندارد متیل لینولات با منحنی حاصله از چربی استری شده نمونه موردنظر در این دستگاه مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و درصد متیل لینولات در چربی استری شده نمونه موردنظر در دستگاه کروماتوگرافی گاز مشخص گردید. در نهایت، میزان لینولنیک اسید در آسپرژیلوس نایجر طبق فرمول:

$$N_1V_1=N_2V_2$$

محاسبه شد (۱۵).

یافته‌ها

از خاک مناطق مختلف استان اصفهان، ۲۰ جدایه قارچ رشته‌ای جداسازی و خالص‌سازی شد. از خاک مزرعه ذرت، ۳ جدایه؛ از خاک مزرعه آفتابگردان، ۲ جدایه؛ از خاک درخت توت، ۴ جدایه؛ از خاک درخت گردو، ۳ جدایه؛ از چمنزار کنار زاینده‌رود، ۲ جدایه؛ از خاک مراتع قهدریجان، ۲ جدایه و از خاک تعمیرگاه ماشین، مزرعه کلم، مغازه قصابی و درختچه‌های شمشاد هرکدام، ۱ جدایه به دست آمد. این کلنی‌ها حالت پنبه‌ای یا پرزی شکل داشتند. این نمونه‌ها در اسلنت‌های حاوی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار در یخچال نگهداری شدند. همه نمونه‌هایی که در محیط غربالگری جامد، در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند، به وسیله

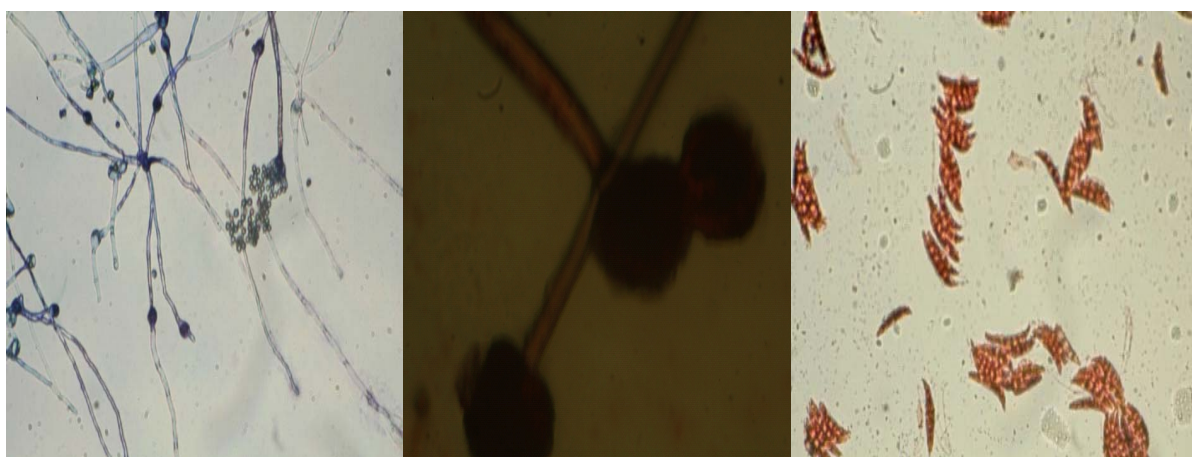
رنگ سودان سیاه بر روی اسمیر ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. پس از شستن رنگ اضافه با آب، اجازه داده شد تا لام خشک شود. در ادامه، اسمیر مربوطه را با گزیلول شست‌وشو داده و اجازه داده شد تا خشک گردد. سافرائین به مدت ۱۰-۵ ثانیه روی اسمیر ریخته شد و پس از شست‌وشو با آب، خشک گردید. سپس اسمیر زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد (۱۱). قارچ‌های رشته‌ای حاوی دانه‌های سیاه قابل توجه، برای مرحله بعد انتخاب شدند. به منظور اندازه‌گیری چربی، ابتدا وزن خشک نمونه رشد کرده در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت با سرعت هوادهی rpm ۱۶۰ در محیط غربالگری مایع (گلوکز ۳۰، عصاره مخمر ۱/۵، NaCl ۱۵، NH₄CL ۰/۵، Na₂HPO₄ ۵، KH₂PO₄ ۷ گرم برلیتر و ۱ لیتر آب) اندازه‌گیری شد. سپس داخل هاون ریخته و به صورت پودر درآمد. در ادامه، محلول کلروفرم/متانول به نسبت ۱/۲ به این پودر اضافه گردید و مجدداً با استفاده از کاغذ صافی، صاف شد. به منظور تبخیر شدن کلروفرم، ظرف محتوی این محلول درون شیکر با سرعت rpm ۲۰۰ قرار گرفت. در نهایت، مقدار چربی به دست آمده نسبت به وزن خشک بیوماس، به صورت درصد بیان گردید (۱۲، ۱۳).

در این آزمایش، به منظور شناسایی قارچ‌های رشته‌ای، از روش میکروسکوپی اسلاید کالچر جهت بررسی بهتر و دقیق‌تر دستگاه‌های رویشی و زایشی قارچ‌های رشته‌ای استفاده گردید. بعد از حدود ۷-۵ روز، قارچ‌های رشته‌ای برای بررسی‌های میکروسکوپی آماده شدند.

در این تست از ۴ فاکتور زمان، pH، دما و منبع کربن (در هر مرحله از یک فاکتور به عنوان متغیر) استفاده شد. در مرحله اول از فاکتور زمان استفاده شد و زمانهای ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ روز در نظر گرفته شدند. در مرحله دوم با استفاده از متغیر pH، تولید چربی در pHهای ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵، ۶/۵ و ۷/۵ بررسی گردید. در مرحله سوم از متغیر دما (در محدوده دمایی ۲۵، ۲۸، ۳۰، ۳۵ درجه سانتیگراد) استفاده شد. در مرحله چهارم با استفاده از منابع کربن مختلف (گلوکز، ساکاروز، فروکتوز و لاکتوز) تولید چربی بررسی گردید (۸، ۳). جهت تولید اسیدچرب استری شده، ۵۰ میکرولیتر نمونه چربی به همراه ۵۰۰ میکرولیتر هگزان و ۱۰ میکرولیتر

۱۵/۷، ۱۵، ۱۸، ۲۵/۴، ۱۱، ۹، ۸/۷ و ۱۲٪ بود. با توجه به نتایج حاصله، مقدار چربی تولیدشده نسبت به وزن خشک بیوماس در جدایه‌های ۴، ۵ و ۱۶ بیش از ۲۰٪ بود.

ابتدا خصوصیات جدایه‌های ۴، ۵ و ۱۶ از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی خصوصیات میکروسکوپی این قارچ‌ها، از روش اسلاید کالچر استفاده گردید. پس از رنگ آمیزی، نمونه‌ها به وسیله سودان سیاه یا متیلن‌بلو در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۴۰ مشاهده شدند. براساس خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، جدایه ۴، *گونه‌ای از پنی‌سیلیوم؛ جدایه ۵، آسپرژیلوس نایجر* و جدایه ۱۶، *گونه‌ای از فوزاریوم* بود (شکل شماره ۱).



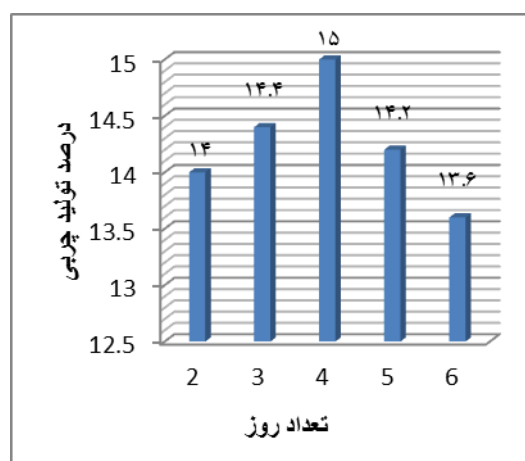
شکل شماره ۱: شکل میکروسکوپی *گونه‌ای از پنی‌سیلیوم*، *آسپرژیلوس نایجر* و *گونه‌ای از فوزاریوم* به ترتیب از راست به چپ

یکسان زمان، pH و منبع کربن) به ترتیب ۱۲/۴، ۱۳/۵، ۱۷ و ۱۰٪ بود (نمودار شماره ۳). تولید چربی در منابع کربن گلوکز، ساکاروز، فروکتوز و لاکتوز در *آسپرژیلوس نایجر* (تحت شرایط یکسان زمان، pH و دما) به ترتیب ۱۸، ۱۳/۲، ۲۱/۰۴ و ۱۶/۶٪ بود (نمودار شماره ۴). این نتایج نشان می‌دهد بهترین pH، دما، زمان و منبع کربن برای تولید چربی در *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۴/۵، ۳۰ درجه سانتیگراد، ۹۶ ساعت و فروکتوز می‌باشد.

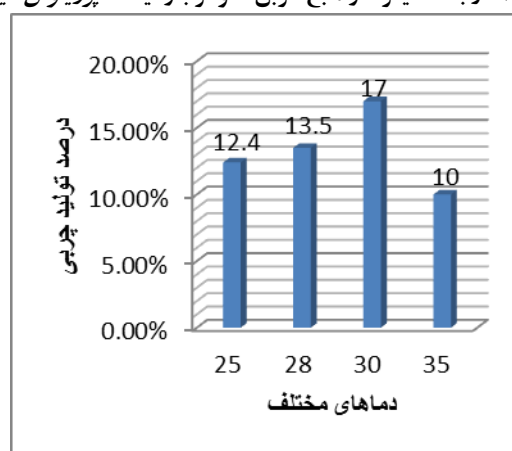
سودان سیاه رنگ آمیزی شدند. دانه‌های چربی به صورت دانه‌های سیاه‌رنگ در سلول‌های قارچی زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۴۰، قابل رؤیت بودند. براساس نتایج حاصله همه جدایه‌ها کم و بیش دارای دانه‌های سیاه‌رنگ بودند.

با توجه به مشخص نبودن مقدار دقیق چربی تولیدشده در رنگ آمیزی سودان سیاه و بررسی دقیق‌تر تولید چربی، غربالگری کمی در هر ۲۰ جدایه انجام شد؛ بدین ترتیب که از همه نمونه‌های کشت داده شده در محیط غربالگری مایع، استخراج چربی با استفاده از بیوماس خشک صورت گرفت و سپس نسبت وزن چربی به وزن خشک بیوماس اندازه گیری شد. مقدار چربی تولیدشده نسبت به وزن خشک بیوماس در جدایه ۲۰-۱ به ترتیب ۱۰، ۱۵، ۱۴/۵، ۲۶/۲، ۲۱/۴، ۱۳/۶، ۹، ۱۱، ۱۸، ۱۰، ۸/۳ و ۱۰/۵

در مرحله اول بهینه‌سازی، تولید چربی در *آسپرژیلوس نایجر* در زمانهای ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ روز، (تحت شرایط یکسان pH، دما و منبع کربن) به ترتیب ۱۴، ۱۴/۴، ۱۵، ۱۴/۲ و ۱۳/۶٪ بود (نمودار شماره ۱). در مرحله دوم تولید چربی در pH مساوی ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵ و ۶/۵ در *آسپرژیلوس نایجر* (تحت شرایط یکسان زمان، دما و منبع کربن) به ترتیب ۱۵/۲، ۲۶، ۱۲، ۱۱/۶ و ۱۰/۸٪ بود (نمودار شماره ۲). در مرحله سوم تولید چربی در دمای ۲۵، ۲۸، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد در *آسپرژیلوس نایجر* (تحت شرایط

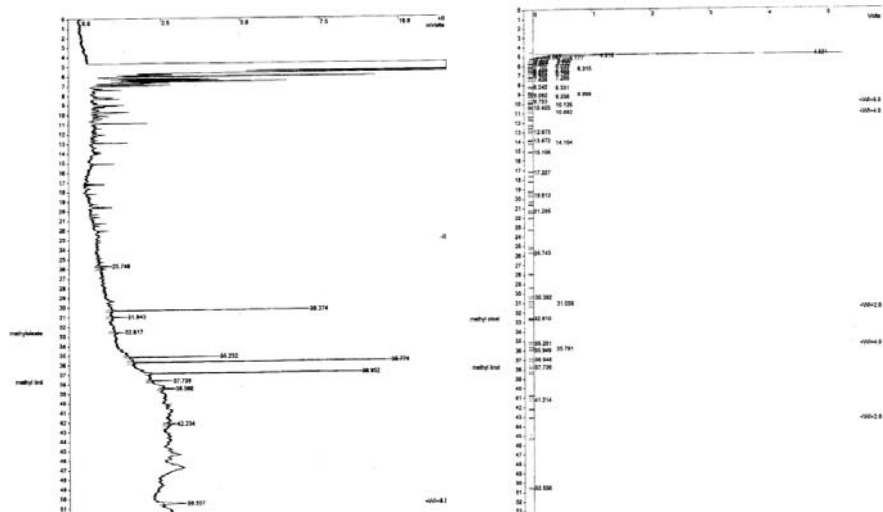


نمودار شماره ۱: مقایسه تولید چربی در زمانهای مختلف، pH=5/5، دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و منبع کربن گلوکز به وسیله *آسیژیلوس نایجر*



نمودار شماره ۳: مقایسه تولید چربی در دماهای مختلف، پس از ۴ روز، pH= ۵/۵ و منبع کربن گلوکز به وسیله آسپرژیلوس نایجر

منحنی استاندارد متیل لینولات به همراه منحنی حاصله از چربی استری شده آسپرژیلوس نایجر (شکل شماره ۲)، در این دستگاه مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و درصد متیل لینولات در



شکل شماره ۲: منحنی استاندارد متیل لینولئات (سمت راست) و چربی استری شده آسپرژیلوس نایجر (سمت چپ) در دستگاه کروماتوگرافی گازی.

بحث

در این مطالعه، قارچ‌های رشته‌ای مولد چربی (گونه‌ای از پنی‌سیلیوم و آسپرژیلوس نایجر)، از مزرعه آفتابگردان و گونه‌ای از فوزاریوم از خاک چمنزار جداسازی شدند. این نتایج نشان داد از بین منابع جداسازی؛ خاک مزرعه آفتابگردان به دلیل وجود منابع کربن و چربی مناسب، منبع خوبی برای جداسازی قارچ‌های رشته‌ای مولد چربی می‌باشد. Liu و همکاران (سال ۲۰۱۰) برای نگهداری قارچ رشته‌ای، از محیط کشت عصاره مخمر پیتون گلوکز (YPG) استفاده کردند (۸). Kumar و همکاران (سال ۲۰۱۱) نیز برای جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌های رشته‌ای از محیط پوتیتو دکستروز آگار (PDA) استفاده کردند (۹). در این تحقیق ابتدا از هر دو محیط کشت YPG و PDA استفاده شد. باتوجه به اینکه تنوع رنگ در کلنی‌های مختلف رشد یافته در محیط PDA بیشتر از YPG بود، در مراحل بعدی از محیط PDA استفاده شد. Kumar و همکاران (سال ۲۰۱۱)، همچنین Khot و همکاران (سال ۲۰۱۲) از بین قارچ‌های جداسازی شده، جدایه‌های مولد چربی را به وسیله رنگ آمیزی نایل رد به طور کیفی غربالگری کردند (۹، ۱۶). Liu و همکاران (سال ۲۰۱۰) و Li و همکاران (سال ۲۰۱۱) نیز از بین قارچ‌های جداسازی شده، جدایه‌های مولد چربی را به وسیله رنگ آمیزی سودان سیاه، غربالگری کیفی کردند (۸، ۱۱). در این مطالعه به دلیل کم هزینه بودن و سریع بودن مراحل آزمایش، از رنگ آمیزی سودان سیاه به جای نایل رد استفاده گردید. همچنین در تولید چربی در آسپرژیلوس نایجر؛ فاکتور زمان، pH، دما و منبع کربن به صورت تک فاکتوری به ترتیب ۴ روز، ۴/۵، ۳۰ درجه سانتیگراد و فروکتوز بود. Bajpai و همکاران (سال ۱۹۹۹)، شرایط بهینه در تولید اسید چرب دوکوزا هگزانوئیک اسید (DHA) را در قارچ ترانستوکیتریوم آرئوم بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بهترین زمان، pH، دما و منبع کربن در تولید این اسید چرب به ترتیب ۶ روز، ۶، ۲۸ درجه سانتیگراد و نشاسته می‌باشد (۱۷). بنابراین، در مطالعه حاضر تولید چربی در آسپرژیلوس نایجر، سریع تر و کم هزینه تر بود.

Liu و همکاران (سال ۲۰۱۰) به بررسی شرایط بهینه در تولید چربی در قارچ تامنیدیم تنیدیم پرداختند و به این نتیجه دست یافتند که بهترین pH، دما و منبع کربن در تولید این اسید چرب به ترتیب ۵/۶، ۳۰ درجه سانتیگراد و گلوکز می‌باشد (۸). بنابراین، در مطالعه حاضر تولید چربی در آسپرژیلوس نایجر، سریع تر و pH بهینه، پایین تر بود. Kumar و همکاران (سال ۲۰۱۱) با بررسی شرایط بهینه در تولید چربی در قارچ مورتییرا/ایزابیلینا نشان دادند بهترین pH، دما و منبع کربن در تولید این اسید چرب به ترتیب ۵ روز، ۵/۶، ۳۰ درجه سانتیگراد و گلوکز می‌باشد (۹). بنابراین در مطالعه حاضر، تولید چربی در آسپرژیلوس نایجر سریع تر و pH بهینه پایین تر بود. در مطالعه حاضر درصد لینولنیک اسید در روغن به دست آمده از آسپرژیلوس نایجر به میزان ۲۲/۴۴٪ گزارش شد. Li و همکاران (سال ۲۰۱۱) اسیدهای چرب استخراج شده از برخی قارچ‌ها را به وسیله کروماتوگرافی گازی آنالیز کردند که در نتیجه گونه‌ای از فوزاریوم، تیلیوپسیس آلیسنس، گونه‌ای از پلکتوسپارا و بکوسلا تنیدیا به ترتیب حاوی ۰/۶، ۲/۶، ۱/۷ و ۲/۴ درصد لینولنیک اسید بودند (۱۱). Kumar و همکاران (سال ۲۰۱۱)، مقدار لینولنیک اسید را در گونه‌ای از مورتییرا، ۴/۸٪ اندازه گیری کردند (۹). در مطالعه حاضر نیز میزان لینولنیک اسید در آسپرژیلوس نایجر نسبت به قارچ‌های مطالعه شده، بیشتر بود. بنابراین، آسپرژیلوس نایجر قارچ رشته‌ای مناسبی برای تولید لینولنیک اسید می‌باشد.

نتیجه گیری

آسپرژیلوس نایجر با تولید ۲۱/۴٪ چربی، یک قارچ رشته‌ای مولد چربی است. این قارچ رشته‌ای از خاک مزرعه آفتابگردان در استان اصفهان جداسازی و از نظر تولید چربی بهینه سازی شد. در نهایت، آسپرژیلوس نایجر با تولید ۲۲/۴۴٪ لینولنیک اسید می‌تواند یک قارچ مناسب برای تولید لینولنیک اسید باشد. این اولین گزارش از تولید لینولنیک اسید به وسیله آسپرژیلوس نایجر در جهان است.

References:

1. Shi S, Valle-Rodriguez JO, Siewers V. Prospects for microbial biodiesel production. *Biotechnol* 2011;(6):277-85.
2. Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, De Lucia M, Alan Leonardi A, et al. Production of single cell oil of cold adapted oleaginous yeast *Rodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microb Cell Fact* 2010;9:73.
3. Higashiyama K, Fujikawa S, Park EY. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2002;(7):252-6.
4. Gao X, Liu Y, Chen Z. Rapid screening and cultivation of oleaginous microorganisms. *Indian J Exp Biol* 2012;50(4):282-9.
5. Zheng Y, Yu X, Zeng J, Chen S. Feasibility of fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnol Biofuels* 2012;5(1):50.
6. Schorken U, Kempers P. Lipid Biotechnology: Industrially relevant production processes. *Eur J Lipid Sci Technol* 2009;111(7):627-45.
7. Iassonova RD, Hammond EG, Beattie SE. Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerol's encapsulated in oleaginous yeast. *J Am Oil Chemists' Soc* 2008;85(8):55-62.
8. Liu G, Lin Q, Jin X. Screening and fermentation optimization of microbial lipid-producing molds from forest soils. *Afr Microbial Res* 2010;4(14):1462-8.
9. Kumar L, Ramalakshmi M, Sivakumar U. Production of microbial oils from *Mortierella* sp for generation of biodiesel livestock. *Afr J Microbiol Res* 2011;2(4):4105-11.
10. Xia C, Zhang J, Zhang W, Hu B. A new cultivation method for microbial oil production: Cell cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnol Biofuels* 2011;4:15.
11. Li SL, Feng SL, Li Z, Xu H, Yu YP, Qiao DR, et al. Isolation, identification and characterization of oleaginous fungi from the soil of Qinghai Plateau that utilize D-xylose. *Afr J Microbiol Res* 2011;(15):2075-81.
12. Murad AA, Karim AN, Hashim FN, Adnan A, Zainal Z, Hamid AA, et al. Identification and Characterisation of an Oleaginous Fungus *Pro g-Linoleneic Acid*. *Int J Microbiol* 2012(9):1-9.
13. Li SL, Lin Q, Li XR, Xu H, Yang YX, Qiao DR, et al. Biodiversity the oleaginous microorganisms in Tibetan plateau. *Braz J Microbiol* 2012;43(2):627-34.
14. Langueira E, Pineda J. Determination of fatty acid methyl esters (fames) in Olive Oil using automated samplev preparation. *Agilent Technolo* 2012;(24):1-7.
15. Lawrence M, Gurecki T. Selection Guide for Polar WAX GC Column Phases. *Produc Guide* 1998;(15):1-16.
16. Khot M, Kamat S, Zinjarde. Single oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. *Microb Cell Fact* 2012;11:71.
17. Bajpai PK, Bajpai P, Ward OP. Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *JAOCS* 1991;68(7):509-14.