

بررسی بیان ژن‌های طولیل ساز گونه *Mortierella alpina* در شرایط مناسب تولید آراشیدونیک اسید و روغن

حمید رضا صمدلوی^{۱*} - روشنگر احمد مخبری^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۳

چکیده

تولید توده زیستی، روغن، آراشیدونیک اسید توسط گونه قارچی *Mortierella alpina* CBS 754.68 در سطوح مختلف گلوکز و سویا بررسی شد تا ارتباط آن با بیان ژن‌های طولیل 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.

واژه‌های کلیدی: *Mortierella alpina*، تخمیر، چربی، آراشیدونیک اسید، بیان ژن و ژن طولیل ساز

مقدمه

آراشیدونیک اسید می‌تواند موجب بهبود رشد سال اول نوزادان نارس شود. از این رو عمده‌ترین مورد مصرف آراشیدونیک اسید در غذاهای کودک است. (Ward and Sing, 2005). با توجه به اهمیت آراشیدونیک اسید در چرخه تغذیه ای انسان و به علت کمبود منابع مناسب تولید، تهیه این اسید چرب ضروری با مشکل جدی مواجه شد. پس از سال‌ها تحقیق دانشمندان گونه‌هایی از کبک پست *Mortierella* را جدا کردند که توانایی تولید مقادیر زیادی آراشیدونیک اسید را داشت. بعضی از گونه‌هایی این قارچ می‌توانند بیش از ۴۰٪ چربی در خود ذخیره کنند که بیشتر از ۴۰٪ این میزان را آراشیدونیک اسید تشکیل می‌دهد (Kavadia et al., 2001; Kawashima et al., 2000; Wynn and Ratledge, 2000). با مروری به مقالات انجام شده چنین نتیجه‌گیری می‌شود که با بهینه سازی شرایط فیزیوشیمیایی محیط کشت، میزان تولید آراشیدونیک اسید و روغن توسط این گونه قارچی افزایش می‌یابد (Kavadia et al., 2001; Higashiyama et al., 2002; Higashiyama et al., 1998; Hou 2008; Hwang et al., 2005; Jang et al., 2005). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که در گونه قارچی *Mortierella alpina* تولید آراشیدونیک اسید از یک مسیر متعارف تولید اسید چرب؛ شامل واکنش‌های طولیل سازی و غیر اشباع سازی؛ پیروی می‌کند (Ratledge, 2004). در بین این ژن‌ها، ژن طولیل ساز آنزیم‌هایی را کد می‌کند که نقش قابل توجهی در تولید آراشیدونیک

اسیدهای چرب بلند زنجیره چند غیر اشباع در رژیم غذایی انسان اهمیت ویژه‌ای داشته و از آنجائیکه بدن انسان قادر به ساختن این اسیدهای چرب نمی‌باشد منابع مناسب برای تهیه این اسیدهای چرب همواره مورد توجه دانشمندان بوده است. از مهمترین اسید چرب ضروری می‌توان به اسید لینولئیک (۱۸:۲Ω۶)، اسید آلفالینولئیک (۱۸:۳Ω۳) و آراشیدونیک اسید اشاره کرد (Ratledge, 2002). در بین این اسیدهای چرب، آراشیدونیک اسید با توجه به اینکه پیش‌ساز ایکوزانوئیدها^۳ می‌باشد و در تنظیم سوخت و ساز لیپوپروتئین^۴، رتولوژی خون، فعال سازی پلاکت‌ها^۵ و عملکرد لوکوسیت‌ها^۶ نقش قابل توجهی دارد مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است (Yamada and Yongmanitchai, 1987; Das et al., 1987; et al., 1989; Carlson, 1989). همکاران در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که

۱- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه شهروود، سمنان.

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آمل، مازندران.

* - نویسنده مسئول: (Email: hsamadiouie@yahoo.com)

3- Eicosanoid

4- Lipoprotein

5- Placket

6- Leucocyte

تولید محصول از منابع کربنی گلوکز در سطوح ۷۰ و ۵۰ گرم در لیتر و منبع پروتئینی سویا در سطوح ۲۰ و ۱۰ گرم در لیتر استفاده شد. همچنین از دمای (۲۱ درجه سانتی‌گراد)، pH (۶) و دورهمزن (۱۸۵ دور در دقیقه) استفاده شد.

اندازه‌گیری وزن خشک توده زیستی

برای جداسازی توده زیستی از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱، بر روی قیف بوختر مجهز به پمپ خلاء استفاده شد. سپس برای اندازه‌گیری وزن خشک سلولی آنها را بر روی شیشه‌های ساعت قرار داده و به مدت ۲ ساعت در آن با درجه حرارت 105°C خشک شد (Sakuradani et al., 2004).

استخراج چربی

برای استخراج چربی‌ها توده زیستی خشک شده در هاون چینی خرد شد. چربی پودر حاصله با حلال نرمال هگزان در دستگاه سوکسله استخراج گردید (Folsch et al., 1957).

اندازه‌گیری اسیدهای چرب

برای تعیین و اندازه‌گیری اسیدهای چرب، با توجه به عدم فراریت اسیدهای چرب بایستی مشتق‌های متیل استر آنها را تهیه نمود. بعد از مشتق‌سازی، اسیدهای چرب متیله به دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی تزریق شد. سپس با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی (78qoa- Gc system) و ستون HP-5MS نوع اسید چرب تعیین گردید.

اندازه‌گیری قند احیا به روش DNS^۶

نمونه محیط کشت در روزهای ۲، ۴، ۶ و ۸ تخمیر برداشت شده، توده زیستی از محیط کشت با سانتریفوژ کردن در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه از محیط کشت جدا شده و میزان قند محیط کشت به روش DNS اندازه‌گیری شد (Miller, 1959).

استخراج RNA و ساخت cDNA

توده زیستی در روزهای ۲، ۴، ۶ و ۸ 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 آن ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد مانده و خنک شده ریخته شده به نمونه‌ها ازت مایع اضافه شد بافت نمونه خرد و داخل ویال‌های ۱/۵ میلی لیتری قرار گرفت و تا زمان استخراج RNA در دمای -70°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اسید در گونه قارچی *Mortierella alpina* دارد. با در نظر گرفتن تحقیقات انجام شده چنین به نظر می‌رسد که ژن‌های طولیل ساز elongase و GLELO از ژن‌های مهم در تولید آراشیدونیک اسید می‌باشد (Wynn and Ratledge 2000). تاکنون تحقیقی در زمینه ارتباط میزان بیان ژن موثر در تولید آراشیدونیک اسید در ریزسازواره‌هایی قارچی *Mortierella alpina* با شرایط محیط کشت انجام نشده، لیکن تحقیقاتی در تولید سایر محصولات از ریزسازواره‌های دیگر انجام شده است که نشان دهنده اهمیت ارتباط بین بیان ژن موثر در تولید محصول و میزان محصول می‌باشد (Giacomo et al 2008; Rossignol et al., 2003; Walkey et al., 2011). از این رو در این تحقیق سطوح مختلف منبع کربنی (گلوکز) و منبع نیتروژنی (پودر سویا) در تولید توده زیستی، روغن و آراشیدونیک اسید در روزهای ۲، ۴ و ۶ و ۸ بررسی شد و ارتباط آن با بیان ژن‌های طولیل ساز GLELO و MALC1 که نقش قابل توجه در تولید آراشیدونیک اسید دارد انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد

در این تحقیق قارچ *Mortierella alpina* CBS 754/68 از مجموعه میکروبی کشور هلند^۱ خریداری شد. نمونه قارچ *Mortierella alpina* خریداری شده به صورت میسلیم در لوله آزمایش آگار شیب‌دار^۳ بود که بر روی محیط کشت مالت آگار در بشقابک^۴ و لوله آزمایش آگار شیب‌دار در درجه حرارت 22°C و مدت زمان ۷ روز کشت داده شد و تا انجام آزمون نمونه‌ها در یخچال^۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد همچنین مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق همگی از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

مایه تلقیح و کشت‌های اصلی

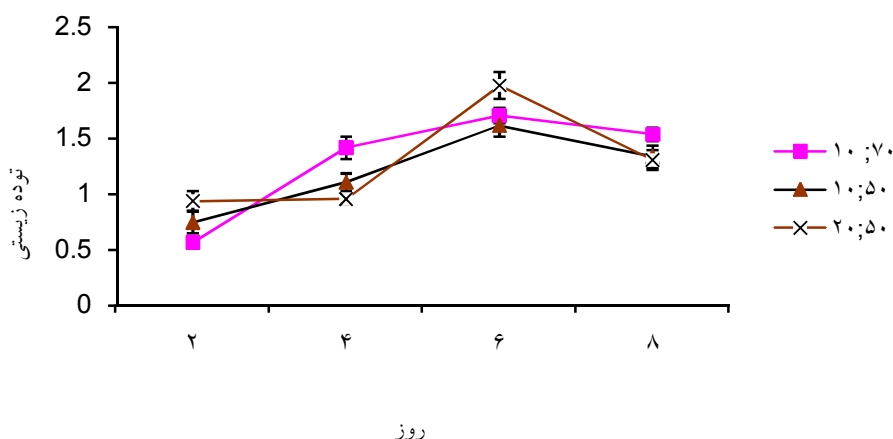
از سوسپانسیون میسلیمی برای تلقیح کشت‌های تولید محصول استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون میسلیمی، ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت شامل گلوکز تک آبه (۳۰ g/L) و عصاره مخمر (۱۰ g/L) در یک ارلن ۵۰۰ میلی لیتری تهیه شد، در درجه حرارت 121°C و 15°C دقیقه سترون گردید. سپس بوسیله آنس سترون ریزسازواره تلقیح شده و در درجه حرارت 26°C به مدت ۷۲ ساعت و ۱۷۰ دور بر دقیقه^۵ گرمخانه‌گذاری شد. ۳ تا ۱۰٪ از کشت‌های توسعه تلقیح به‌عنوان مایه تلقیح به محیط کشت تولید محصول افزوده شد. در محیط کشت

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

- 6- Dry cell weight (DCW)
- 7- Dinitrosalicylic acid

جدول ۱- توالی و مشخصات الیگونوکلوئوتیدهای ژن‌های هدف و ژن مرجع در این رساله

No.	Gene	Primer	sequence Primer	%GC	TM	Product size
5	Malce	forward	CCCAAGGTCGGCAAAGTCT	57.9	56	234bp
		Reverse	GCGTTGTTCCACAAGCTCTG	55	55.5	
6	GLELO	forward	CCTTAAGAAGAACAACCGCCA	47.6	55.7	221bp
		Reverse	GCGAACGCGTGATGTAGAAC	55	55.4	
8	Actin	forward	CGAGTTGCGTGTGCGCC	68.8	54	200bp
		Reverse	TGGGAACAGTGTGGGTGA	55.6	52	



شکل ۱- تغییرات میزان توده زیستی در روزهای مختلف تخمیر در سطوح مختلف گلوکز (۷۰ و ۵۰ گرم در لیتر) و پودر سویا (۲۰ و ۱۰ گرم در لیتر)

میزان گلوکز محیط کشت و فشار اسمزی کاهش یابد و شرایط برای رشد بیشتر ریزسازواره فراهم شود. در هر سه محیط کشت بعد از روز ۶ توده زیستی کاهش یافته که می‌تواند ناشی از کاهش میزان گلوکز باشد (شکل ۱ و ۲). Zhu و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که با کاهش گلوکز به سطح ۱۰ گرم در لیتر توانایی ریزسازواره برای مصرف گلوکز متوقف شده و توده زیستی کاهش می‌یابد.

با افزایش منبع پروتئینی رشد توده زیستی به صورت قابل توجه‌ای افزایش یافت. نتایج مصرف پروتئین نشان می‌دهد که تمامی منبع پروتئینی تا روز ۲ در محیط کشت تخلیه شده است. مصرف قند احیاء به صورت قابل توجه‌ای در روزهای اولیه تخمیر بالا بود. مصرف گلوکز در محیط حاوی منبع نیتروژنی بالاتر (۲۰ گرم در لیتر)، کندتر از سایر محیط‌های کشت بوده که نشان‌دهنده جایگزین شدن منبع نیتروژنی هم به عنوان منبع نیتروژنی و هم منبع کربنی می‌باشد (شکل ۲). در این شرایط رشد ریزسازواره بسیار قابل توجه افزایش یافت. در هر سه محیط کشت منبع کربنی از روز ۶ به بعد به پایین‌ترین سطح رسید و شرایط برای تخریب و کاهش توده زیستی فراهم شد (شکل ۱ و ۲).

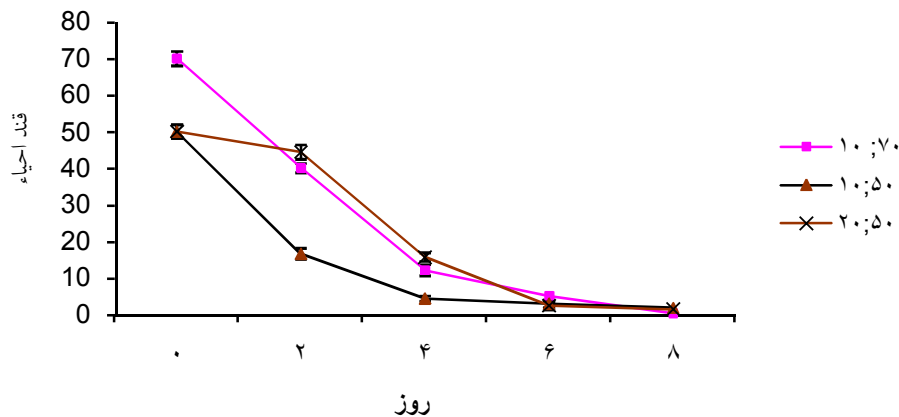
برای استخراج RNA از کیت Vivantis استفاده شد. استخراج بر طبق دستور العمل کیت انجام گرفت. ساخت cDNA با استفاده از کیت vivantis انجام شد.

انتخاب پرایمرها

در این آزمایش، دو ژن دخیل در تولید آراشیدونیک اسید انتخاب گردیده از آنجائیکه از هر ژن چندین گزارش در سایت NCBI بود به منظور طراحی پرایمر هر کدام از ژن‌ها align شدند. بعد از تایید پرایمرها به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شد. با بررسی مقاله (Sakuradani et al., 2009) ژن Actin1 (به عنوان ژن خانه دار)، به عنوان ژن مرجع انتخاب گردید (جدول ۱۵).

نتایج و بحث

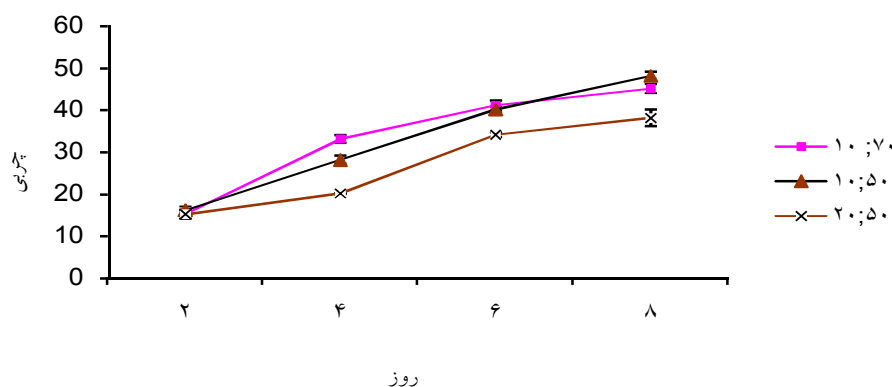
همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود رشد توده زیستی با افزایش منبع کربنی در روزهای اولیه فرایند تخمیر کاهش و در ادامه فرایند افزایش می‌یابد. چنین استنباط می‌شود که افزایش رشد باعث شده



شکل ۲- تغییرات میزان قند احياء در روزهای مختلف تخمیر در سطوح مختلف گلوکز (۷۰ و ۵۰ گرم در لیتر) و پودر سویا (۲۰ و ۱۰ گرم در لیتر)

محیط دیگر پایین تر بود که نشان دهنده تاثیر منفی منبع پروتئینی در تجمع روغن می باشد. در این محیط کشت با اینکه منبع پروتئینی همزمان با دو محیط کشت در روز ۲ تخلیه شده است ولی در ادامه فرایند تخمیر رشد توده زیستی بیشتر از دو محیط کشت دیگر می باشد و در عین حال تجمع روغن کمتر است. روند مصرف قند احياء در این محیط کشت نشان می دهد که بازده تبدیل قند به روغن پایین و میزان تولید توده زیستی نسبت به دو محیط کشت دیگر بالاتر می باشد. با در نظر گرفتن این نکته که با افزایش میزان نیتروژن چرخه اسید سیتریک فعال و انرژی بیشتری توسط این چرخه تولید شود چنین تحلیل می شود که در این شرایط حجمه زیادی از انرژی صرف افزایش توده زیستی شده است (Ratledge 2004).

روند تجمع روغن چنین نشان می دهد که چربی ذخیره ای تا روز ۶ به صورت قابل توجهی افزایش یافته و سپس این روند کند می شود. کاهش گلوکز، محیط کشت می تواند در این پدیده نقش قابل توجهی داشته باشد. بیشترین تجمع روغن در محیط کشت حاوی ۵۰ گرم در لیتر گلوکز و ۱۰ گرم در لیتر منبع پروتئینی سویا مشاهده شد که نشان دهنده افزایش بازده تولید روغن در سطوح پایین تر گلوکز می باشد. در محیط کشت با میزان قند بیشتر رشد بالاتر و تجمع روغن پایینتر بود که نشان دهنده نسبت عکس رشد با تجمع روغن می باشد (شکل ۳). در گزارشی مشابه که توسط Venkateswaran و Venkateswaran (۲۰۰۸) انجام شد بیان شد که غلظت بالای گلوکز برای تجمع چربی مناسب نمی باشد. در محیط حاوی منبع پروتئینی بیشتر تجمع روغن نسبت به دو



شکل ۳- تغییرات میزان روغن در روزهای مختلف تخمیر در سطوح مختلف گلوکز (۷۰ و ۵۰ گرم در لیتر) و پودر سویا (۲۰ و ۱۰ گرم در لیتر)

روند افزایش آراشیدونیک اسید نشان می دهد در شرایطی که تجمع روغن بالاتر است میزان تجمع آراشیدونیک اسید روغن کاهش

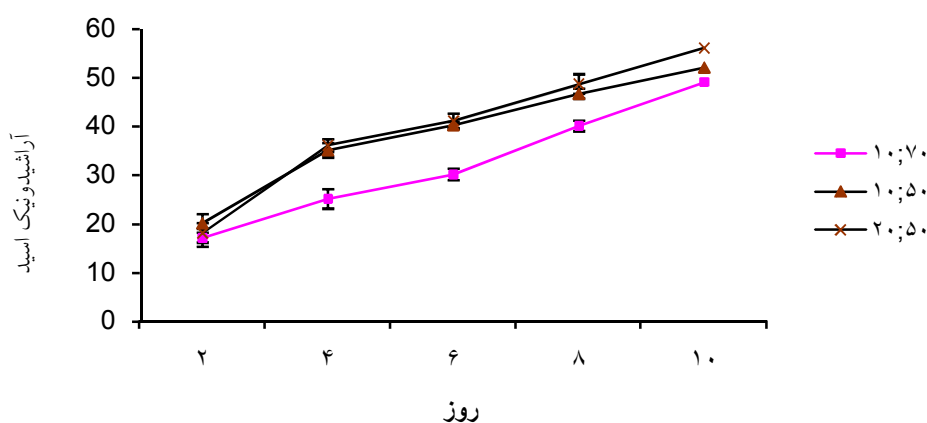
نتایج نشان داد که افزایش و یا کاهش منبع قندی و پروتئینی تاثیر در سطح بیان این ژن نداشته است. نتایج نشان داد که سطح بیان این ژن در روز ۶ به پایین‌ترین سطح رسید و دوباره در روز ۸ افزایش یافت (شکل ۵).

بیان ژن طویل‌ساز MALC1

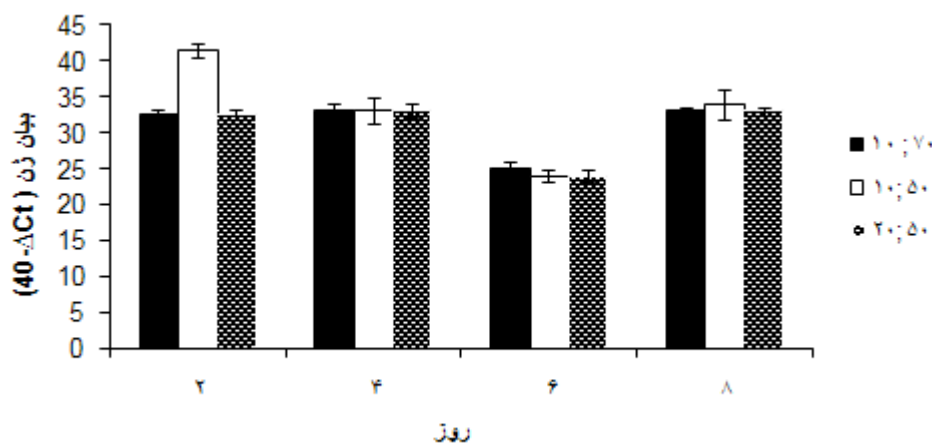
بیان ژن MALC1 تحت تاثیر مواد مغذی محیط کشت قرار گرفته است.

می‌باید و در شرایطی که روند تجمع روغن کند است میزان آراشیدونیک اسید افزایش می‌یابد. چنین برداشت می‌شود که افزایش گلوکز تاثیر منفی در تولید آراشیدونیک اسید دارد (شکل ۴). zhu و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که با تخلیه گلوکز میزان آراشیدونیک اسید افزایش یافته که این نتیجه می‌تواند دلیل کاهش روغن و افزایش تجمع آراشیدونیک اسید باشد.

بیان ژن‌های طویل‌ساز GLELO



شکل ۴- تغییرات میزان آراشیدونیک اسید در روزهای مختلف تخمیر در سطوح مختلف گلوکز (۷۰ و ۵۰ گرم در لیتر) و پودر سویا (۲۰ و ۱۰ گرم در لیتر)



شکل ۵- تغییرات میزان بیان ژن طویل‌ساز GLELO در روزهای مختلف تخمیر در سطوح مختلف گلوکز (۷۰ و ۵۰ گرم در لیتر) و پودر سویا (۲۰ و ۱۰ گرم در لیتر)

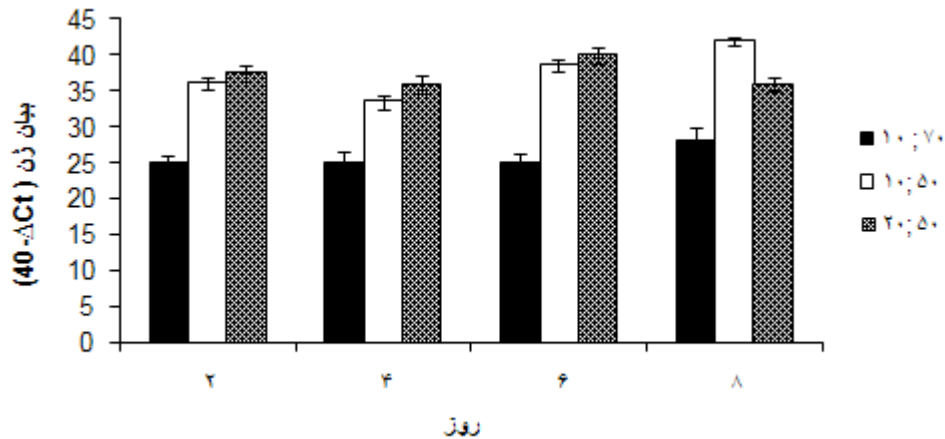
داشته است. کاهش منبع کربنی، افزایش منبع نیتروژنی و رشد توده

این ژن برخلاف ژن طویل‌ساز GLELO غالباً بیان بالاتری

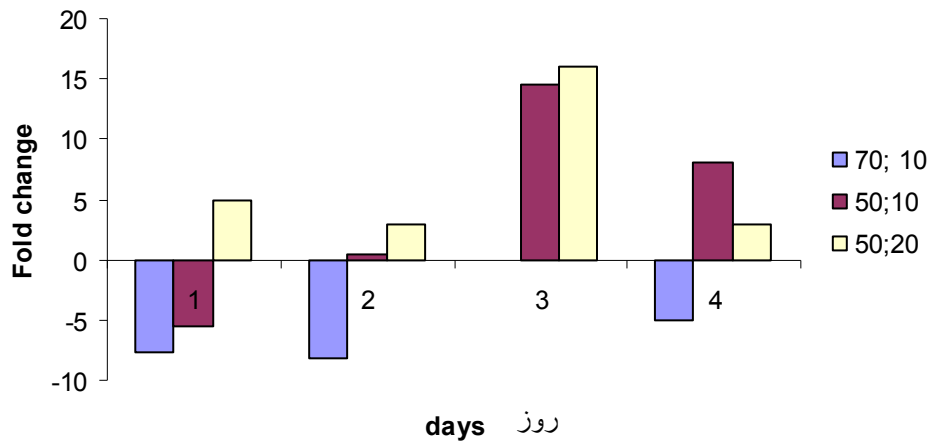
در محیط‌های که تولید آراشیدونیک اسید بالا می‌باشد همواره نسبت بیان ژن MALC1 از ژن GLELO بالاتر بوده است. در شرایطی که تولید روغن بالاتر بوده و تولید آراشیدونیک اسید نسبت به بقیه محیط‌ها کمتر است سطح بیان ژن MALC1 پایین و میزان Fold change آن منفی شده است. که این نشان‌دهنده اهمیت میزان منبع کربنی و نیتروژنی در بیان این ژن بوده است (شکل ۷).

زیستی بیان این ژن را تحت تاثیر قرار داده و باعث افزایش آن شده است. در محیط که حاوی ۵۰ گرم در لیتر گلوکز و ۲۰ گرم در لیتر سویا بود در شرایط رشد بیشترین سطح بیان ژن طویل‌ساز MALC1 مشاهده شد کاهش قابل توجه زیستی از روز ۶ به ۸ باعث کاهش در بیان ژن MALC1 شد (شکل ۶).

نسبت بیان ژن MALC1 به ژن GLELO



شکل ۶- تغییرات میزان بیان ژن طویل‌ساز MALC1 در روزهای مختلف تخمیر در سطوح مختلف گلوکز (۷۰ و ۵۰ گرم در لیتر) و پودر سویا (۲۰ و ۱۰ گرم در لیتر)



شکل ۷- تغییرات میزان Fold change طویل‌ساز MALC1 به GLELO در روزهای مختلف تخمیر در سطوح مختلف گلوکز (۷۰ و ۵۰ گرم در لیتر) و پودر سویا (۲۰ و ۱۰ گرم در لیتر)

نتیجه‌گیری

افزایش میزان گلوکز در روزهای اولیه تخمیر باعث کاهش رشد ریزسازواره شده است که می‌تواند ناشی از فشار اسمزی بیشتر محیط

و تولید آراشیدونیک اسید ژن طویل‌ساز GLELO همواره بیان شده ولی با سطح بیان پایین، افزایش و یا کاهش مواد مغذی محیط تأثیری بر سطح بیان این ژن نداشته است. از سوی دیگر افزایش تولید آراشیدونیک اسید در انتهای فرایند تخمیر می‌تواند نتیجه تأثیر شرایط محیطی بر روی سایر ژن‌ها باشد و بیان آن‌ها تحت تأثیر قرار گرفته و تولید محصول افزایش یافته در حالیکه این ژن همواره به عنوان ژن محدودکننده تولید آراشیدونیک اسید سطح بیان تقریباً ثابت و پایینی دارد. در تحقیقات مشابه‌ای گزارش شده که تبدیل (n-6):18:3 به (n-6):20:3 به عنوان گلوگاه تولید آراشیدونیک اسید توسط گونه قارچی *مورتیرلا آلفینا* می‌باشد (Wynn and Ratledge, 2000). از این رو چنین برداشت می‌شود که در مسیر تولید محصولات نهایی ژن‌های که به عنوان گلوگاه شناخته می‌شوند و تولید محصول نهایی را کنترل می‌کند همواره بیان آن‌ها تحت تأثیر تغییرات مواد مغذی محیط کشت قرار نگرفته و در شرایط بهینه تولید نیز که ما بقی ژن‌های مسیر سنتز بیان بهینه‌ای دارند این ژن‌های گلوگاه سطح بیان پایینی داشته و مانع از تولید حداکثری محصول نهایی می‌شوند از این رو افزایش سطح بیان این نوع ژن‌ها از طریق انتقال ژن تنها راه افزایش آراشیدونیک اسید می‌باشد. در تحقیقی که برای افزایش تولید آراشیدونیک اسید به منظور تولید تجاری این محصول توسط *مورتیرلا آلفینا* انجام شده بود نشان داده شد که افزایش بیان ژن طویل‌ساز GLELO تأثیر بیشتری نسبت به ژن‌های غیراشباع‌ساز ۱۲ و ۶ را دارد (Takeno *et al.*, 2005). که تأیید کننده نتایج بدست آمده از این تحقیق است.

غلیظ تر باشد. در گزارش مشابه‌ای نشان داده شد که در غلظت پایین گلوکز باعث کاهش زمان کمون در اثر کاهش فشار اسمزی محیط کشت و افزایش رشد ریزسازواره شده است (Zhu *et al* 2005). نتایج نشان داد که با تخلیه گلوکز تجمع روغن همچنان ادامه دارد که می‌تواند حاصل تبدیل قند ذخیره‌ای به روغن باشد. در واقع چنین تحلیل می‌شود که با جذب قند از محیط تمامی این قند در یک بازه زمانی مشخصی و تحت تأثیر شک‌های محیطی تبدیل به روغن می‌شود. جذب گلوکز و تبدیل شدن آن به روغن یک پروسه زمان‌دار در سلول بوده و با توجه به شرایط محیطی این زمان متغیر می‌باشد. در تحقیقی که توسط Zhu و همکاران (۲۰۰۵) و Jin و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد نشان داده شد که با تخلیه گلوکز تجمع روغن همچنان ادامه داشته که موید نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌باشد. در گزارشی متفاوت که توسط Eroshin و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد نشان دادند که با تخلیه گلوکز تولید روغن متوقف شده در عین حال تجمع اصلی روغن بعد از توقف رشد ریزسازواره انجام شده است. استفاده از منبع نیتروژنی تعریف شده (اوره و نیترات پتاسیم) می‌تواند از عوامل موثر در این تفاوت باشد. در حالیکه در این تحقیق از منبع نیتروژنی پیچیده سویا استفاده شده است. که می‌تواند علت تفاوت در نتایج باشد. استفاده از نیتروژن معدنی باعث کاهش زمان تبدیل گلوکز به روغن می‌باشد که می‌تواند به دلیل استفاده از نیتروژن معدنی فعالیت (ACC) acetyl CoA carboxylase افزایش یافته که زمینه را برای تبدیل استیل COA به مانوئیل COA را فراهم می‌کند که اسکلت تشکیل دهنده روغن می‌باشد (Certik *et al.* 1999). از نتایج بدست آمده چنین تحلیل می‌شود که در فرایند تخمیر

منابع

- Carlson, S. E., Werkman, S. H., Peoples, J. M., Cooke, R. J. & 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.
- Certik, M. and Shimizu, S., 1999, Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87: 1–4.
- Das, U. N., Begin, M. E., Huang, Y. S. & Horrobin, D. F., 1987, Polyunsaturated fatty acids augment free radical generation in tumor cells in vitro, *Biochemistry Biophysics Research Communication*, 445: 15–24.
- Eroshin, V. K., Dedyukhina, E. G., Satroutdinov, A. D. & Chistyakova, T. I., 2002, Growth-coupled lipid synthesis in *Mortierella alpine* LPM 301 a producer of arachidonic acid. *Microbiology*, 71: 169–72.
- Folsch, J., Lees, M. & Sloane-Stanely, G. H., 1957, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497–509.
- Giacomo, G. Luca, B. Simona, B. Antonio, G. Severino, Z. & 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.
- Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park, E. Y. & Shimizu, S., 2002, Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7: 252–262.
- Higashiyama, K., Yaguchi, T., Akimoto, K., Fujikawa, S., & Shimizu, S., 1998, Enhancement of arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 75: 1501–1505.
- Hou C. T., 2008, Production of arachidonic acid and dihomo-gamma-linolenic acid from glycerol by oil-producing filamentous fungi, *Mortierella* in ARS Culture Collection. *Journal of Industrial Microbiology*, 35: 501–506.
- Hwang, B. H., Kim, J. W., Park, C. Y., Park, C. S., Kim, Y. S. & Ryu, Y. W., 2005, High level production of arachidonic acid by fed-batch culture of *Mortierella alpina* using NH₄OH as a nitrogen source and pH control.

- Biotechnology Letters*, 27: 731–735.
- Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I. Aggelis, G., 2001, Lipid and gamma-linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 78: 341–346.
- Kawashima, H., Akimoto, K., Higashiyami, K., Fujikawa, S., & 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 Chemists' Society*, 77: 1135–1138.
- Jang, H. D., Lin, Y. Y., & Yang, S. S., 2005, Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. *Bioresource Technology*, 96, 1633–1644.
- Jin, M. J., Huang, H., Xiao, A. H., Zhang, K., Liu, X., Li, S., & Peng, C., 2008, A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Biotechnology Letters*, 30, 1087–1091.
- Miller, G. L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426–8.
- Nisha, A. & Venkateswaran G., 2008, Effect of Culture Variables on Mycelial Arachidonic acid Production by *Mortierella alpina*. *Food Bioprocess Technology*, 18, 111–120.
- Ratledge, C., 2004, Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochemistry*, 86, 807–815.
- Ratledge C., 2002, Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemistry Soc Transactions*, 30, 1047–1050.
- Rosignol, T., Dulau, L., Julien, A., & Blondin, B., 2003, Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*, 20, 1369–85.
- Sakuradani, E., Hirano, Y., Kamada, N., Nojiri, M., Ogawa, J., & 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.
- Sakuradani, E., Nojiri, M., Suzuki, H. & 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.
- Takeno, S., Sakuradani, E., Murata, S., Inohara-Ochiai, M., Kawashima, H., Ashikari, T., & Shimizu, S., 2005, Molecular evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpina* is at the level of an elongase. *Lipids*, 40, 25–30.
- Ward, O. P., & Singh, A., 2005, Omega-3/6 fatty acid: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40, 3627–3652.
- Wynn J. P., & 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.
- Walkey, C. J., Luo, Z., Borchers, C. H., Measday, V., & 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.
- Yamada, H., Shimizu, S., Shinmen, Y., Kawashima, H., & Akimoto, K., 1989, Biotechnological processes for production of polyunsaturated fatty acid, *Journal of Disperse Science Technology*, 10, 561–579
- Yongmanitchai, W., & Ward, O. P., 1989, Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 24, 117–125.
- Zhu, M., Zhou, P. P. & Yu, L. J., 2002, Extraction of lipid from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technology*, 84, 93–95.

Elongase Gene expression analysis of *Mortierella alpina* under optimal conditions for arachidonic acid and lipid production

H. Samadlouie*¹, R. Ahamadimokhberi²

Received: 2013.10.26

Accepted: 2014.05.24

Introduction: Arachidonic acid (5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid, ARA), a long chain polyunsaturated fatty acid (PUFA) of the n-6 class, plays an important roles in the structure and function of biological membranes. ARA has also attracted attention as a precursor of prostaglandins, thromboxane, prostacyclin, and leucotrienes, which have potent and various physiological actions including uterine muscle contraction, relaxation, vasodilatation, and antihypertensive action. Lower fungi of Zygomycetes especially *Mortierella alpina* were served as rich sources of ARA. In this research the time courses for biomass, lipid and arachidonic acid production by *Mortierella alpina* CBS 754.68 with different levels of glucose and soybean concentrations were examined. Afterward the effect of substrates levels on expression of the elongase genes involved in biosynthesis of ARA was studied in a shaker flask scale.

Materials and methods: *Mortierella alpina* CBS 754.68 was purchased from Centraal Bureau Schimmel cultures (CBS, the Netherlands). The seed culture medium contained (g/L): glucose 30 and yeast extract 7. The seed culture of 100 mL was incubated at 25 °C for two days in a gyratory shaker at 185 rpm. The fermentation medium was inoculated with 5% (v/v) of the mycelium suspension of the seed culture. Fermentation was carried out at 21 °C; pH 6 for ten days with glucose (70 and 50 g/L) and soy bean meal (20 and 10 g/L) as carbon and nitrogen resources, respectively. The dinitrosalicylic acid (DNS) method was used to determine the reducing sugar concentration. Protein concentration was assayed using the Lowry's method. Total RNA was extracted using the RNA Kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) The NCBI database was scanned for genes encoding for elongases. The hints were aligned and the conserved regions were used for primer designing. PCR primers for mentioned genes and the Housekeeping Gene (actin) were designed using the Gene Runner Design software. cDNA was synthesized using the cDNA synthesis kit (Invitrogen) using oligo (dT) as primers according to the manufacturer's instructions. Expression analysis of genes involving in ARA biosynthesis was carried out using Real-time PCR. The Real-time PCR mixtures containing cDNA and each primer were heated at 95 °C for 15 min and then subjected to 40 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 5 s, annealing at 60 °C for 20s, and extension at 72 °C for 20 s, and finally for an extension of 10 min at 72 °C. The expression levels of target genes were normalized based on actin encoding gene ($\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{reference gene}}$). Since the total number of cycles in the Real-Time PCR was 40, for easier interpretation, the ΔCt was converted into 40- ΔCt .

Results and Discussion: Biomass growth was declined with increasing carbon content in the early days of cultivation and subsequently increased. Growth has great effect on reduction of the amount of glucose in the medium; thereby osmotic pressure had been reduced and biomass production was boosted. Protein content of media had a significant impact on biomass production. The results indicate that the protein was depleted in 2 day of fermentation. In all three media the destruction of biomass was started when the carbon source was reached the lowest level. In media with high content of protein, oil accumulation was lower than the two other media, which indicated the negative impact of protein on the lipid accumulation. In this media although the protein source along with the other medium to be depleted on day 2, In following fermentation, the biomass growth and lipid accumulation was higher and lower respectively than other medium. High concentrations of glucose had inhibitory effect on oil production while had positive effect on biomass production. Results indicated that oil accumulation significantly increased until day 6 and then the trend was slow. Reduced glucose medium can have a significant effect in this phenomenon. Initial concentrations of glucose (50 g/l) and soybean (10 g/l) have good effect on lipid production (47% of biomass) while in this condition; the production of arachidonic acid was lower than the other media. ARA content of lipid was increased during the whole fermentation process in all treatment. It was observed that an improvement in arachidonic acid (56% of lipid) in lipid was achieved at lowest and highest levels of glucose (50 g/l) and soy bean (20 g/l) respectively. The results of this study showed that the expression of our target genes depends on culture conditions. Expression of MALC1 was influenced by culture condition. Low and high levels of carbon and nitrogen content respectively also biomass growth had

1- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Shahrood University, Shahrood, Iran.

2- M.Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Amol University, Amol, Iran.

(* Corresponding Author E-mail: hsamadlouie@yahoo.com)

great impact on MALC1 expression. A significant decrease of biomass from 6 to 8 had a significant impact in reducing MALC1 expression. the expression of GLELO gene was lowest at day 6 and increased again at day 8.

Conclusion: The results showed that the expression of GLELO gene was decreased coincided with reduced levels of carbon content less than 5 grams per liter on the sixth day. With comparison of expression of MALC1 and GLELO encoding genes in optimal media for ARA production can be concluded that the GLELO gene is a rate-limiting step in the ARA biosynthesis.

Key Words: *Mortierella alpine*, Fermentation, Lipid, Arachidonic acid, Gene Expression, Elangase Gene