



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
14th Year, Vol. 14, No. 54, 2025 pp. 1-14
Received: 29/07/2025 Accepted: 03/09/2025

(Research Paper)

Enhancing β -Carotene production in the mold *Blakeslea Trispora* under imidazole stress via Adaptive Laboratory Evolution

Hamideh Moradi

Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
hmoradi2008@gmail.com

Davood Zare 

Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
zare@irost.ir

Mehrdad Azin

Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
azinmehrdad@yahoo.com

Hamid Moghimi

Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.
hmoghimi@ut.ac.ir

Abstract

Beta-carotene, a natural plant pigment belonging to the carotenoid family, is one of the most important carotenoids. It is widely used as a precursor of vitamin A in pharmaceuticals, food, feed, and other applications. Due to its high capacity for carotenoid production, the heterothallic fungus *Blakeslea trispora* is considered one of the main biological sources of these compounds. Trisporic acids act as sexual hormones between the two mating types and are key regulators of carotenoid biosynthesis. This study used an adaptive laboratory evolution (ALE) approach involving selective pressure with imidazole to develop new strains of this mold. The results showed that one of the adapted strains exhibited a significant increase in the expression of genes involved in carotenoid biosynthesis. These genes included *carRA*, which encodes lycopene cyclase and phytoene synthase; *carG*, which is involved in geranylgeranyl pyrophosphate synthase, and *Sr5AL*, which is a key gene related to the trisporic acid response. Regardless of the presence of exogenously added trisporic acids, a 2.5-fold increase in *Sr5AL* transcription positively influenced β -carotene production in one of the imidazole-adapted strains. These results suggest that β -carotene producing strains could be optimized using evolutionary approaches combined with controlled stress conditions.

Keywords: β -Carotene; *Blakeslea trispora*; Adaptive Laboratory Evolution; Imidazole.

¹Corresponding Author
3060-7647/ © 2025 The Authors



Introduction

Carotenoids are a diverse group of naturally occurring pigments responsible for the yellow, orange, and red coloration of plants, algae, and microorganisms. Beyond their aesthetic and industrial applications, carotenoids, particularly β -carotene, play essential biological roles as antioxidants and vitamin A precursors. Humans cannot synthesize β -carotene, necessitating its dietary intake from natural or synthetic sources. However, concerns about the safety of synthetic food additives have led to a significant increase in interest in the biotechnological production of carotenoids through microbial fermentation.

The zygomycota fungus *Blakeslea trispora* is recognized as one of the most efficient natural producers of β -carotene among carotenoid-producing microorganisms. Due to its heterothallic nature, successful carotenoid production requires mating between positive and negative strains. In this process, trisporic acids act as vital signalling molecules that activate and regulate carotenoid biosynthesis. This metabolic pathway uses the mevalonate (MVA) route and is controlled by specific genes, such as *carRA* (which encodes phytoene synthase and lycopene cyclase), *carB* (which encodes phytoene dehydrogenase), and *Sr5AL* (which encodes a steroid 5α -reductase-like enzyme).

Adaptive Laboratory Evolution (ALE) has emerged as a powerful strategy for improving the performance of microbes under defined stress conditions. This approach involves subjecting microbial populations to prolonged selective pressures, enabling the accumulation and fixation of beneficial genetic adaptations. In the present study, imidazole was used to induce stress. Imidazole is known to disrupt trisporic acid biosynthesis and inhibit lycopene cyclase, a critical enzyme responsible for converting lycopene into β -carotene. In order to maximize β -carotene production, the aim was to integrate UV-induced mutagenesis with ALE under imidazole stress to generate *Blakeslea trispora* strains with improved tolerance and enhanced carotenoid biosynthetic capacity.

Materials and Methods

Microorganisms and Maintenance

The negative (*B. trispora* PTCC 5278) and positive (*B. trispora* PTCC 5277) mating types were obtained from the Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST). The strains were maintained on malt extract agar slants at 28 °C for 5 days before being stored at 4 °C. The strains were initially grown in a pre-culture medium to promote active growth and then transferred to an optimized production medium for β -carotene biosynthesis. Pre-cultures were incubated at 28 °C with shaking at 120 rpm, while production cultures were maintained at the same temperature with agitation at 180 rpm.

Mutagenesis Procedure

In order to create genetic diversity, spores of the negative mating type were subjected to UV irradiation (0/1 J/cm²) for 180 seconds at a distance of 50 cm, resulting in an approximate survival rate of 10%. The surviving colonies were plated on selective media containing acetoacetanilide and the most intensely pigmented colonies were isolated.

Adaptive Laboratory Evolution

Both wild-type and mutant strains were exposed to increasing concentrations of imidazole (1250–1500 mg/L) in CM17 agar medium. Spores were transferred through 26 successive subcultures over a period of 130 days. The adapted populations were cryopreserved in 20% glycerol stocks for further analysis.

Fermentation and Carotenoid Extraction

The selected adapted strains were co-cultivated with the positive mating type in the production medium at 28 °C and 180 rpm for 5 days. The biomass was then harvested, freeze-thawed, and disrupted using glass beads. Carotenoids were sequentially extracted using ethanol and hexane, followed by the addition of water to induce phase separation. The carotenoid-rich phase was analyzed spectrophotometrically at 450 nm, and the β -carotene concentration was calculated using a standard curve.

RNA Extraction and Gene Expression Analysis

RNA was extracted from the mycelium after 56 h of growth using a commercial kit. The purity of the RNA was confirmed using a NanoDrop spectrophotometer (A260/A280). cDNA synthesis was then performed, and qRT-PCR assays were conducted using primers for *hmgr*, *ipi*, *carG*, *carA*, *carB*, and *Sr5AL*. The housekeeping gene *tef1* was used as a control. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Morphological Characterization

Colony morphology, hyphal branching, pellet formation, and pigmentation intensity were evaluated both microscopically and macroscopically. Comparisons were made among wild-type, adapted wild-type, and mutant-adapted strains.

Discussion of Results & Conclusions

The ALE strategy yielded promising results in enhancing carotenoid production. The adapted mutant strain (IM1) produced the highest β -carotene yield at 35 mg/L, approximately double that of the wild-type parent (W78) and five times higher than the adapted wild-type strain (WI78). These results confirm the synergistic benefits of combining mutagenesis with ALE under selective stress. Interestingly, there was variation in biomass production among strains. While the adapted wild-type (WI78) exhibited reduced biomass, approximately one-third lower than W78, the adapted mutant (IM1) showed a twofold increase. This suggests that the outcomes of ALE depend heavily on the genetic background of the starting strain. Mutations introduced by UV treatment likely provided the basis for the adaptive changes that enabled IM1 to withstand imidazole stress and channel resources more effectively toward carotenoid synthesis.

Transcriptional analysis revealed the key molecular mechanisms contributing to enhanced β -carotene production. In the adapted wild-type strain WI78, the upregulation of *hmgr* and *carA* indicated reinforcement of the mevalonate (MVA) pathway and activation of carotenoid biosynthesis. However, decreased expression of *carB* and *Sr5AL* suggested incomplete metabolic optimization, potentially accounting for the moderate β -carotene yield observed in WI78. By contrast, the mutant-adapted strain IM1 exhibited significant upregulation of *carG*, *carA*, and *Sr5AL*, while other pathway genes remained stable. This transcriptional profile indicates a well-coordinated metabolic network that efficiently channels precursors toward carotenoid biosynthesis.

The pronounced upregulation of *Sr5AL* in IM1 is particularly notable. This gene plays a critical role in both steroid metabolism and trisporic acid biosynthesis, both of which are essential for inter-strain signaling and the induction of carotenoid production. The fact that its expression is enhanced in the absence of externally supplied trisporic acids suggests the presence of a self-sustaining regulatory mechanism capable of maintaining high levels of β -carotene synthesis.

These findings were further supported by morphological observations. IM1 exhibited dense, highly branched hyphae and compact pellet formation accompanied by strong orange pigmentation. These structural adaptations may enhance nutrient uptake and carotenoid sequestration, while the compact pellets reduce medium viscosity—an important advantage in industrial fermentations. In contrast, WI78 showed less favorable morphology, which correlated with its lower productivity.

Collectively, the results highlight that ALE under imidazole stress induces both genetic and physiological adaptations that enhance metabolic performance. The success of IM1 demonstrates the effectiveness of combining random mutagenesis with targeted evolutionary pressure to obtain industrially valuable strains.

افزایش تولید بتاکاروتن در کپک *بلاکسلا تریسپورا* تحت تنش ایمیدازول با رویکرد تکامل سازی

آزمایشگاهی

حمیده مرادی

پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

hmoradi2008@gmail.com

داود زارع*

پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

zare@irost.ir

مهرداد آذین

پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

azinmehraddad@yahoo.com

حمید مقیمی

دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

hmoghimi@ut.ac.ir

چکیده

بتاکاروتن یک ترکیب آلی از خانواده کاروتنوئیدها (رنگدانه‌های طبیعی گیاهی) و از مهم‌ترین کاروتنوئیدها است که به‌عنوان پیش‌ساز ویتامین A به‌طور گسترده در داروسازی، غذا، خوراکی و سایر زمینه‌ها استفاده می‌شود. قارچ دو جنسی *بلاکسلا تریسپورا* به‌دلیل توانایی بالای آن در تولید کاروتنوئیدها، یکی از منابع اصلی زیستی این ترکیبات به‌شمار می‌رود. اسیدهای تریسپوریک به‌عنوان هورمون‌های جنسی بین این دو جفت عمل می‌کنند و به‌نوبه‌خود از عوامل کلیدی تنظیم‌کننده سنتز کاروتنوئید هستند. در این مطالعه، با بهره‌گیری از رویکرد تکامل آزمایشگاهی سازی (ALE) و اعمال فشار تنشی توسط ایمیدازول، سویه‌های جدیدی از این کپک توسعه یافتند. یافته‌ها نشان دادند یکی از سویه‌های سازش‌یافته افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز کاروتنوئیدها از جمله ژن *carRA* (ژن دخیل در سنتز آنزیم‌های لیکوپن سیکلاز و فیتوئن سنتاز)، ژن *carG* (دخیل در سنتز آنزیم ژرانیل ژرانیل پیروفسفات سنتاز) و ژن *Sr5AL* (ژن کلیدی مرتبط با پاسخ به تریسپوریک) دارد و افزایش ۲/۵ برابری سطح رونویسی ژن *Sr5AL*، صرف‌نظر از اینکه اسیدهای تریسپوریک اضافه شده‌اند یا خیر، تأثیر مثبتی در افزایش تولید بتاکاروتن در یکی از سویه‌های سازش‌یافته به ایمیدازول دارد. یافته‌های این پژوهش امکان بهینه‌سازی سویه‌های تولیدکننده بتاکاروتن را با استفاده از روش‌های تکاملی و تنش‌های کنترل‌شده نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: بتاکاروتن، *بلاکسلا تریسپورا*، تکامل آزمایشگاهی سازی، ایمیدازول

* نویسنده مسئول مکاتبات

مرادی، حمیده، زارع، داود، آذین، مهرداد، مقیمی، حمید. افزایش تولید بتاکاروتن در کپک *بلاکسلا تریسپورا* تحت تنش ایمیدازول با رویکرد تکامل سازی

آزمایشگاهی. زیست‌شناسی میکروبی، ۱۴۰۴، ۱۴(۵۴): ۱-۱۴. doi: 10.22108/bjm.2025.146152.1644



مقدمه

رنگدانه‌های کاروتنوئیدی به‌عنوان عامل ایجاد رنگ طبیعی با طیف رنگی زرد تا قرمز در صنایع غذایی، دارویی، لوازم آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شوند. رنگ نقش بسیار مهمی در مقبولیت و پذیرش فرآورده‌های غذایی دارد. این ترکیبات به‌عنوان مکمل غذای دام و طیور نیز به‌طور گسترده به کار گرفته می‌شوند. بتاکاروتن به‌عنوان یکی از فعال‌ترین کاروتنوئیدها برای پیشگیری از ابتلا به انواع بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی و سرطان‌ها و همچنین تقویت سیستم ایمنی بدن مؤثر است. از آنجایی که بدن قادر به ساختن این ماده نیست، ضرورت تأمین این ماده از منابع خارجی، به‌ویژه منابع طبیعی، اهمیت درخور توجهی پیدا می‌کند (۱-۳). در سال‌های اخیر با وجود دسترسی به انواعی از کاروتنوئیدهای سنتتیک و طبیعی، تولید زیستی و میکروبی رنگدانه‌های کاروتنوئیدی به‌ویژه بتاکاروتن به‌دلیل افزایش حساسیت عمومی به مسئله افزودنی‌های سنتتیک غذا درخور توجه قرار گرفته است (۴، ۵).

قارچ *بلاکسلا تریسپورا*^۲ یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های تولیدکننده کاروتنوئیدها، به‌ویژه بتاکاروتن به شمار می‌رود. این قارچ دو جنسی، از طریق هم‌آمیختگی سویه‌های مثبت و منفی، قادر است ترکیبات سیگنالی خاصی به نام اسیدهای تریسپوریک تولید کند که تنظیم‌کننده اصلی مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها هستند. سنتز اسیدهای تریسپوریک از استرول‌ها، به‌ویژه β -استرول‌ها مشتق می‌شود و مهار آنها می‌تواند به‌طور مستقیم بر بیان ژن‌های مسیر کاروتنوئید اثر بگذارد. از سوی دیگر، مشخص شده است برخی ترکیبات مانند ایمیدازول، با مهار آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز تریسپوریک اسید، می‌تواند به‌عنوان ابزار مهندسی تنش در فرایند بهبود سویه‌های تولیدی استفاده شوند (۶). تولید بتاکاروتن در *بلاکسلا تریسپورا* از طریق مسیر

مولونات صورت می‌گیرد. از جمله ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز کاروتنوئید در این کپک، *carRA* (کدکننده آنزیم‌های لیکوپین سیکلاز و فیتوئن سنتاز)، *carB* (کدکننده فیتوئن دهیدروژناز) و *SR5AL* (کدکننده آنزیم استروئیدی ۵-آلفا-ردوکتاز مرتبط با متابولیسم هورمون‌های جنسی) هستند که بیان آنها به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی و سیگنال‌های درون‌سلولی قرار دارد (۷-۹).

اغلب میکروارگانیسم‌های کاروتن‌زا به‌عنوان بخشی از واکنش دفاعی خود به تنش‌های محیطی مختلف، کاروتنوئیدها را درون یاخته‌های خود ذخیره می‌کنند (۷، ۱۰-۱۲). در حال حاضر رویکرد تکامل‌سازشی آزمایشگاهی (ALE) به‌عنوان یک رویکرد علمی شناخته می‌شود که در آن با استفاده از اعمال فشار انتخابی، میکروارگانیسمی با فوتیپ مدنظر به دست می‌آید. با توسعه دانش بیوانفورماتیک، توالی‌یابی میکروارگانیسم‌ها و شناسایی جهش‌ها و تغییرات ژنتیکی حاصل از روش تکامل‌سازشی آزمایشگاهی سرعت یافته است (۱۳، ۱۴). هنگامی که میکروارگانیسم‌ها به‌طور مکرر در آزمایشگاه‌ها به زیر کشت می‌روند، مرحله تأخیر کوتاه می‌شود و سرعت رشد در مقایسه با کشت اولیه افزایش می‌یابد. طی فرایند رقابت در محیطی با منابع محدود، جهش‌هایی سازگار به نسل‌های بعدی منتقل می‌شوند که تغییراتی را در کل جمعیت به وجود می‌آورند (۱۵-۱۸). بهره‌گیری از روش تکامل‌سازشی در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*^۳ مهندسی شده دارای ژن‌های مسیر بیوسنتز بتاکاروتن سبب افزایش سه برابری تولید بتاکاروتن در آن شد (۱۹). از این راهبرد تکاملی می‌توان به‌عنوان روش کارآمد برای افزایش و مقرون‌به‌صرفه کردن تولید بتاکاروتن در *بلاکسلا تریسپورا* نیز استفاده کرد؛ زیرا پژوهش‌ها نشان داده‌اند استفاده از عوامل استرس اکسیداتیو

^۲ *Blakeslea trispora*^۳ *Saccharomyces cerevisiae*

درجه سانتی گراد، گرماگذاری و سپس در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

محیط پیش کشت: به منظور تهیه مایه تلقیح از کپک، محیط کشت مایع با ترکیب گلوکز ۲ درصد و عصاره مخمر ۰/۳ درصد و روغن سویا ۰/۵ درصد در ارلن‌های بافل‌دار، تهیه و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شد. برای انجام تلقیح ابتدا اسپورهای سطحی سویه‌ها، با استفاده از پیت پاستور و سرم فیزیولوژی حاوی توئین شست‌وشو شد و پس از شمارش با لام نتوبار به میزان ۱۰^۷ اسپور از سویه‌های منفی و مثبت به صورت جداگانه به ارلن‌ها، تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و دور ۱۲۰ rpm در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شد (۲۳).

محیط کشت تخمیر: در آزمایشات تست نهایی تولید بتاکاروتن از محیط کشت پایه با فرمول ترکیبی گلوکز ۵۰ گرم بر لیتر، پودر سویا ۶ گرم بر لیتر، روغن سویا ۱۰ میلی لیتر بر لیتر، KH_2PO_4 ۱/۲ گرم بر لیتر، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۰/۴ گرم بر لیتر، BHT ۴ گرم بر لیتر و Span20 ۲ میلی لیتر بر لیتر استفاده شد (۲۳).

محیط کشت آزمایشات تکامل سازشی: آزمایش‌های کشت و سازگاری با استفاده از محیط جامد (CM17) متشکل از گلوکز ۳ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۰/۱ گرم بر لیتر، ال-آسپاراژین ۰/۲ گرم بر لیتر، MgSO_4 ۰/۰۵ گرم بر لیتر، KH_2PO_4 ۰/۱۵ گرم بر لیتر و آگار ۲۰ گرم بر لیتر pH برابر با ۷ و با افزودن ایمیدازول در گرادانی از غلظت‌های مختلف انجام شد (۲۲).

بررسی تحمل سویه بلاکسلا تریسپورا 5278 در برابر ایمیدازول

باتوجه به مطالعات قبلی، از آنجا که سویه منفی نسبت به سویه مثبت در تولید بتاکاروتن مؤثرتر عمل می‌کند، سویه PTCC

از جمله افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن تأثیر چشمگیری بر تولید بهینه بتاکاروتن توسط این کپک دارد (۲۰) و از طرفی ژن‌های مسئول مسیر بیوستز بتاکاروتن به طور طبیعی در این کپک وجود دارند و این امر شانس افزایش تولید در این کپک را نسبت به مخمر مهندسی شده بالاتر می‌برد.

عامل استرس‌زای ایمیدازول بر آنزیم‌های مسیر بیوستز بتاکاروتن تأثیر می‌گذارد و به طور اختصاصی آنزیم لیکوپن سیکلاز از مسیر بیوستز بتاکاروتن را مهار می‌کند (۲۱). لیکوپن سیکلاز یک آنزیم دو عملکردی است که با کاتالیز کردن تبدیل لیکوپن به بتاکاروتن، نقش کلیدی در این مسیر دارد. همچنین فعالیت درخور توجه فیتوئن سنتاز را نشان می‌دهد و اهمیت آن را در هدایت فرایندهای پیچیده درگیر برجسته می‌کند. با استفاده از تکنیک PCR کمی، می‌توان تغییرات پیچیده در بیان ژن‌های مرتبط با این مسیر را در سطح رونویسی بررسی کرد (Liu ۲۲). در این مطالعه، با استفاده از رویکرد ALE و اعمال تدریجی غلظت‌های افزایش‌دهنده ایمیدازول بر سویه منفی بلاکسلا تریسپورا تلاش شده است سویه‌هایی با تحمل بالاتر و ظرفیت بیشتر در تولید بتاکاروتن جداسازی شوند. در ادامه، تغییرات حاصل در بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوستز کاروتنوئید بررسی شده و عملکرد تولیدی سویه‌های سازش‌یافته با سویه وحشی مقایسه شده است. این پژوهش می‌تواند زمینه‌ساز توسعه سویه‌های صنعتی جدید برای تولید پایدار و ایمن کاروتنوئیدها باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌ها: کپک دو جنسی بلاکسلا تریسپورا سویه جنس منفی PTCC 5278 و جنس مثبت PTCC 5277، از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. سویه‌ها ابتدا روی محیط کشت شیب‌دار مالت اکسترکت آگار (عصاره مالت از شرکت به مالت ۵ درصد و آگار ۲ درصد) کشت شده‌اند و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸

از ۰ تا ۲ گرم بر لیتر در محیط کشت مایع (CM17) قرار گرفت. غلظتی از ماده تنش‌زا که در آن کمترین رشد از سویه مشاهده شد، به‌عنوان غلظت اولیه برای آغاز آزمایش‌های تکامل‌سازشی استفاده شد (شکل ۱).

5278 به‌عنوان سویه منفی برای ادامه مراحل آزمایشات تکمیلی انتخاب شد (۲۱). برای بررسی میزان تحمل سویه والد طبیعی نوع منفی به ماده بازدارنده ایمیدازول و ویژگی‌های رشد آن قبل از شروع آزمایش‌های تکامل‌سازشی، این سویه در معرض غلظت‌های مختلف ایمیدازول



شکل ۱: تعیین آستانه تحمل کپک بلاکسلا تریسپورا در برابر ایمیدازول

Figure 1: Determination of the imidazole tolerance threshold in *Blakeslea trispora*

قرار گرفتند و بلافاصله در تاریکی کامل انکوبه شدند. بعد از ۴۸ ساعت و رشد اسپورها در همان محیط کشت، کلنی‌هایی ظاهر شدند که در برابر اشعه ماوراءبنفش قابلیت زنده‌مانی داشتند و هر کلنی که رنگ زرد پررنگ‌تری نسبت به بقیه کلنی‌ها داشت، به‌عنوان تولیدکننده بهتر بتاکاروتن انتخاب شد. در مرحله بعد، کلنی‌های پررنگ به محیط کشت مالت اکسترکت آگار (MEA) منتقل شدند و بعد از چند مرحله واکشت، کلنی‌هایی که خصوصیات مطلوب از نظر میزان رشد و رنگ حفظ کرده بودند برای آزمایشات تکامل‌سازشی انتخاب شدند. سویه منتخب حاصل از جهش‌زایی و همچنین سویه والد طبیعی برای آزمایشات تحت تنش به محیط کشت جامد حاوی عامل تنش‌زای ایمیدازول منتقل شدند. انتقال آنها در هر واکشت از یک غلظت معین ماده تنش‌زا، به‌صورت انتقال سوسپانسیون اسپور با غلظت ثابت (شمارش توسط لام نوبار) در محیط کشت جامد در نظر گرفته شد. اسپورهای حاصل از جمعیت‌سازش یافته اول با کمک قیف و فیلتر پشم شیشه‌ای استریل، جمع‌آوری و به دوره بعدی از کشت جامد با غلظت بالاتر از ماده تنش‌زا منتقل شد. زمان ماند هر دوره در برابر

آزمایش‌های تکامل‌سازشی

به‌طور خلاصه رویکرد تکامل‌سازشی از گسترش جمعیت میکروبی تحت فشار انتخابی استفاده می‌کند. سویه‌های تطابق‌یافته‌ای که سرعت رشد آنها به‌دلیل افزایش تحمل‌پذیری و مصرف سریع‌تر سوبسترا افزایش یافته است، به‌تدریج در جمعیت گسترش می‌یابند و در نهایت از طریق جداسازی‌های مکرر انتخاب می‌شوند. اگر جمعیت اولیه سویه‌ها متنوع‌تر و با قابلیت تولید بالاتری از محصول باشد، در ادامه با انجام آزمایشات تکامل‌سازشی می‌توان انتظار داشت به سویه‌های بهتری دسترسی پیدا کرد. به همین منظور، از جهش‌زایی کلاسیک با به‌کارگیری روش فیزیکی اشعه ماوراءبنفش استفاده شد و ابتدا منحنی بقای سویه اولیه با بقای ۱۰ درصد در برابر UV تهیه شد. برای یک جهش‌زایی مؤثر، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور با غلظت اولیه 10^6 اسپور بر میلی‌لیتر روی محیط کشت انتخابی CM17 حاوی ماده غربالگر استواستائیلید پخش شد (استواستائیلید برای غربالگری سویه‌های جهش‌یافته بلاکسلا تریسپورا به کار می‌رود) (۲۲). سپس پلیت‌ها در فاصله ۵۰ سانتی‌متری به مدت ۱۸۰ ثانیه در معرض اشعه فرابنفش (دز تابشی ۰/۱

درصد استوک تهیه شد. بعد از استریل کردن، محیط کشت‌ها با نسبت ۴ به ۱ از مایه تلقیح سویه منفی و مثبت تلقیح شد. سپس در انکوباتور شیکردار در دور ۱۸۰ و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز گرماگذاری شد.

هر غلظت از عامل تنش‌زا بین ۸ تا ۱۸ واکشت بهینه بود. در مجموع طی دو دوره، ۲۶ واکشت در مدت ۱۳۰ روز از غلظت ۱۲۵۰ تا ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر انجام شد (جدول ۱). شایان ذکر است پس از اتمام هر دوره از تأثیردهی غلظت‌های مشخص عامل تنش‌زا، از جمعیت حاصل در گلیسرول ۲۰

جدول ۱: غلظت ماده تنش‌زا استفاده‌شده در طول آزمایشات تکاملی و تعداد واکشت‌ها

Table 1: Concentrations of the stress-inducing agent used during the ALE experiments and the number of subcultures at each level

Strain Name	Stress agent concentration (Initial)	Stress agent concentration (Final)	Number of Subcultures
W 78	1250mg/l	1500mg/l	8
M ₁	1250mg/l	1500mg/l	18

افزوده و پس از مخلوط‌سازی، به فالکون منتقل شد. مخلوط داخل فالکون به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه ورتکس کاملاً مخلوط شد. در ادامه، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مخلوط، افزوده و مجدداً عملیات ورتکس انجام شد تا فازهای آلی و آبی از یکدیگر جدا شوند. در پایان، مخلوط دوفازی حاصل با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز روئی که حاوی رنگدانه بتاکاروتن بود، جدا و میزان جذب نوری آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مقدار نهایی بتاکاروتن استخراج‌شده با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد (۲۳).

بررسی میزان رونویسی ژن‌ها با ریل تایم پی سی آر^۴
برای آشکارشدن تأثیر ایمیدازول در مسیر بیوسنتز کاروتنوئید سویه‌های سازش‌یافته، سطوح رونویسی ژن‌های مرتبط با مسیر MVA، ژن‌های *hmgR* و *ipi* سنتز کاروتنوئید (*carG*)، *carA* و *carB* و ژن شبه‌استروئیدی ۵-آلفا-ردوکتاز مربوط

در ادامه سویه‌های سازش‌یافته منتخب با سویه مثبت در محیط کشت تولید مایع جفت‌شده و ارزیابی براساس وزن خشک (خشک‌کردن در آون ۶۰ درجه)، مورفولوژی سویه‌ها و سنجش بتاکاروتن و مقایسه مقدار تولید بتاکاروتن در محیط تولید استاندارد انجام شد.

سنجش بتاکاروتن

از آنجا که بتاکاروتن تولیدشده توسط کپک بلاکسلا تریسپورا درون‌سلولی است، بعد از پایان مرحله تخمیر با استفاده از صافی توده سلولی حاصل، جمع‌آوری و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر نگهداری شد تا شکست سلولی برای استخراج بتاکاروتن تجمع‌یافته در میسلیم‌های کپک آسان‌تر شود. سپس مقدار مشخصی معادل ۰/۲ گرم از توده سلولی منجمدشده، جدا و به همراه ۰/۲ گرم پودر شیشه در هاون دستی به‌طور کامل ساییده شد. سپس به پودر حاصل ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد، افزوده و مخلوط به داخل فالکون منتقل شد. برای شست‌وشوی کامل باقی‌مانده پودر از هاون، ۱۰ میلی‌لیتر هگزان به هاون،

⁴ Real-time PCR

موجود در کیت مخصوص استخراج RNA قارچی، کل RNA مربوط به سویه‌ها استخراج شد و مقدار و درصد خلوص RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ با نسبت جذب A260/A280 بررسی شد (۲۴).

در ادامه با استفاده از کیت، از RNA استخراج شده cDNA تهیه شد تا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این ژن‌ها (جدول ۲) سطح رونویسی شش ژن مسیر بیوسنتز کاروتنوئید در سویه سازش یافته بررسی شود. نتایج به دست آمده با ژن خانه‌زاد *tefl*^۵ و مقایسه با کنترل مربوطه نرمال‌سازی شد.

به سنتز اسیدتریپتوپوریک (*Sr5AL*) بررسی شد. به این منظور، ابتدا اسپوره‌های حاصل از رشد سویه‌های مدنظر (والد، جهش‌یافته‌های حاصل از جهش‌زایی تصادفی و جهش‌یافته‌های حاصل از تکامل سازشی) از روی کشت جامد (MEA) با سرم فیزیولوژی توئین‌دار، شست‌وشو و به محیط کشت تولید مایع منتقل شد و در انکوباتور شیکردار با ۱۸۰ دور در دقیقه و در شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس با توجه به منحنی رشد و در زمان ۵۶ ساعت میزان بیان ژن‌های مربوطه بررسی شد. به این منظور، ابتدا توده زیستی حاصل از طریق فیلتر، جمع‌آوری و با آب مقطر دوبار تقطیر شست‌وشو شد. سپس طبق پروتکل

جدول ۲: پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه (۱۲)

Table 2: Primers used in this study (12)

Genes name	Gene Abbreviating	Forward and reverse primers (5 → 3)	Amplicon length (bp)	
Translation elongation factor -1	<i>tefl</i>	<i>tefl</i> -F <i>tefl</i> -R	AACTCGGTAAGGGTTCCTTCAAG CGGGAGCATCAATAACGGTAAC	138
Isopentenyl pyrophosphate isomerise	<i>ipi</i>	<i>ipi</i> -F <i>ipi</i> -R	TCTCACCCCTTAAATACAGCAGATG CTCGGTGCCAAATAATGAATACG	161
Gernyl gernyl pyrophosphate	<i>carG</i>	<i>carG</i> -F <i>carG</i> -R	AATTGTTTTGGCGTGACACCTT CAGTTCCTCGATTGACTAGCTTCTT	129
3 hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase	<i>hmg</i>	<i>hmgR</i> -F <i>hmgR</i> -R	AAACGATGGATTGAACAAGAGGG TAGACTAGACGACCGCAAGAGC	113
lycopene cyclase phytoene synthase	<i>carRA</i>	<i>carRA</i> -F <i>carRA</i> -R	CTAAAGCCGTTTCACTCACAGCA ACAAGTAGGACAGTACCACCAAGCG	129
Phytoene dehydrogenases	<i>carB</i>	<i>carB</i> -F <i>carB</i> -R	AGACCTAGTACCAAGGATTCCACAA AGAACGATAGGAACACCAGTACCTG	92
Steroid 5 α -reductase-like gene	<i>SR5AL</i>	<i>SR5AL</i> -F <i>SR5AL</i> -R	TCCCTTTTTTTTACATTTTCGTTTTGG ATACCTGGTTGTTTTGAGAGCCCT	180

F: Forward, R: reverse

حدود دو برابر است و همچنین نسبت به سویه سازش یافته والد (WI78)، حدود پنج برابر بیشتر است (شکل ۲).

همچنین در مقایسه با سویه والد، زیست‌توده در سویه سازش یافته وحشی (WI78) حدود یک‌سوم کاهش یافت؛ درحالی‌که سویه سازش یافته موتانت (IM1) حدود دو برابر افزایش نشان داد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند فرایند سازش در سویه‌های مختلف اثرات متفاوتی نشان

نتایج

میزان تولید بتاکاروتن

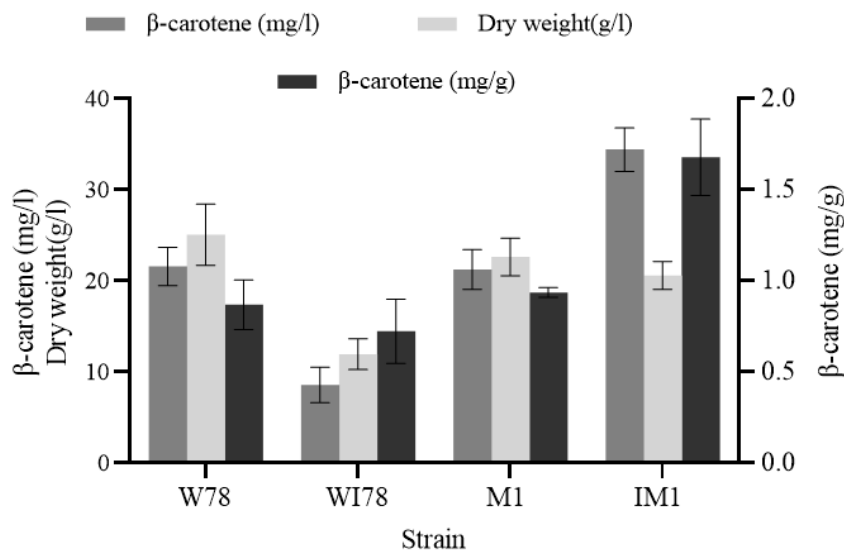
نتایج حاصل از سنجش بتاکاروتن تولیدشده در سویه‌های سازش یافته در نمودار ۱ نشان می‌دهد میزان تولید بتاکاروتن در سویه سازش یافته موتانت (IM1) به مقدار ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر رسیده است که نسبت به سویه والد طبیعی (W78) در

⁵ Housekeeping

خصوصیات ظاهری

همچنین بررسی و مشاهده تصویر میکروسکوپی لام حاصل از کشت مایع، سویه‌های سازش‌یافته در مقایسه با سویه والد (W78) و سویه سازش‌یافته آن (WI78) نشان داد میسلیم‌های سویه موتانت سازش‌یافته (IM1)، از نظر شکلی دارای ظاهر پررنگ‌تری هستند که ناشی از افزایش حضور بتاکاروتن است (شکل ۳).

می‌دهد. اثرگذاری فرایند سازش وابسته به زمینه ژنتیکی سویه است؛ به طوری که در سویه وحشی اثر منفی داشته است؛ اما در سویه موتانت موجب تقویت تولید و افزایش بازده شده است.



شکل ۲: مقایسه تولید بتاکاروتن توسط سویه‌های سازش‌یافته به ایمیدازول

Figure 2: Comparison of beta-carotene production by strains adapted to imidazole

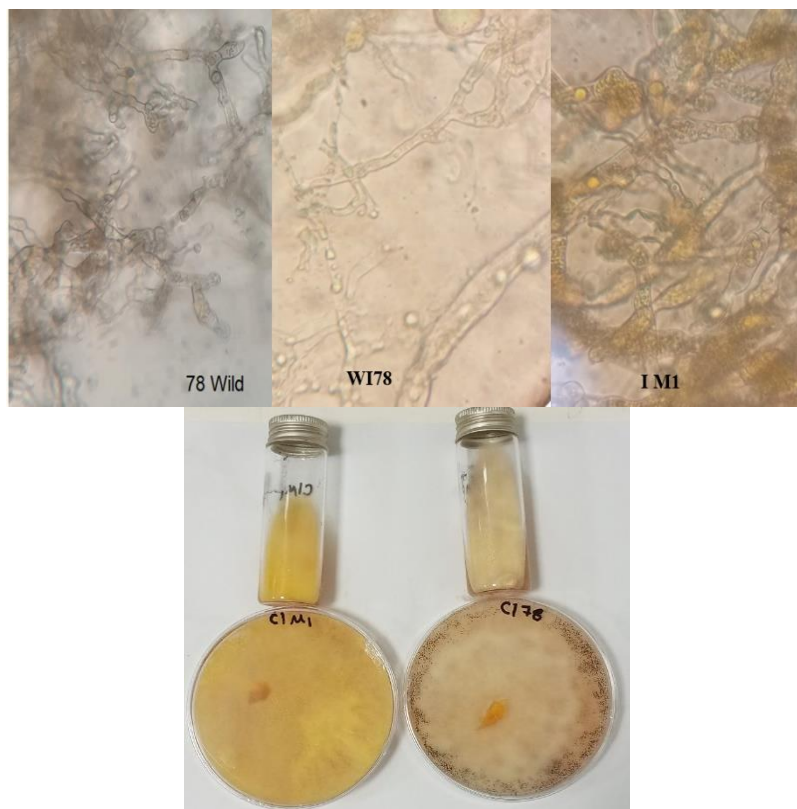
carA مسئول کدگذاری آنزیم‌های لیکوپین‌سیکلاز و فیوتن‌سنتاز است. سطوح رونویسی ژن‌های *carB* و *Sr5AL* در سویه سازش‌یافته WI78 نسبت به سویه والد کاهش داشت.

در سویه سازش‌یافته موتانت (IM1)، سطح رونویسی ژن‌های *carA* و *carG* حدود دو برابر و ژن *Sr5AL* در حدود دو و نیم برابر نسبت به سویه والد افزایش داشته‌اند و سطوح رونویسی دیگر ژن‌ها حالت پایداری نسبت به سویه والد داشت (بخش b شکل ۴).

بررسی میزان بیان ژن‌ها

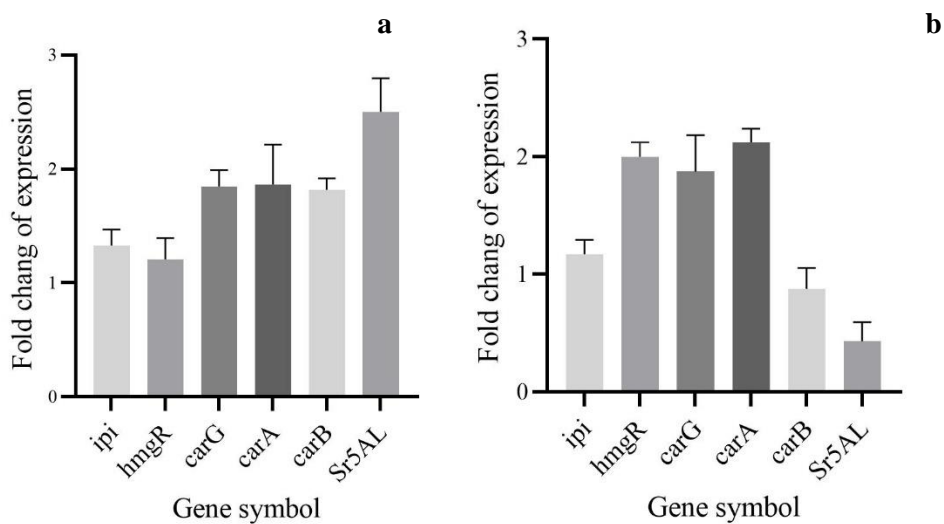
نتایج بررسی میزان رونویسی ژن‌ها نشان دادند در سویه سازش‌یافته 78 یعنی سویه WI78، سطح رونویسی ژن‌های *carA* و *hmgr* در حدود دو برابر نسبت به سویه والد افزایش داشته است (بخش a شکل ۴).

ژن *hmgr* مسئول کدگذاری اولین آنزیم محدودکننده سرعت در مسیر MVA یعنی هیدروکسی متیل‌گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز است که تنظیم مثبت این ژن منجر به تقویت شار مسیر MVA و در نتیجه افزایش دسترسی به پیش‌سازهای مورد نیاز سنتز کاروتنوئید می‌شود. ژن



شکل ۳: مقایسه ظاهری سویه های سازش یافته والد (WI78) و موتانت (IM1) به ایمیدازول در ساب کالچر ۱۴

Figure 3: Morphological comparison of the adapted wild-type strain (WI78) and the mutant strain (IM1) under imidazole stress at subculture 14



شکل ۴: (a) میزان بیان ژن های سویه والد W78 و WI78 (a) میزان بیان ژن های سویه موتانت M1 و IM1

Figure 4: (a) Gene expression levels in the parental strain W78 and adapted strain I78. (b) Gene expression levels in the mutant strains M1 and IM1

بحث

بیوسنتز کاروتنوئیدها شامل شبکه پیچیده‌ای از فرایندها است که در آن تنظیم بازخورد متابولیک نقش مهمی در هدایت کارایی و خروجی مسیر دارد. نتایج این پژوهش نشان دادند بهره‌گیری از روش تکامل آزمایشگاهی سازشی همراه با اعمال تنش ایمیدازول، منجر به بهبود معنادار در توان تولید بتاکاروتن در کپک بلاکسلا تریسپورا شده است. سویه موتانت سازش‌یافته (IM1) نسبت به سویه والد (W78) و حتی سویه والد سازگار شده (WI78) عملکرد بهتری از خود نشان داد. همچنین افزایش سطح رونویسی ژن‌های کلیدی مانند *carG*، *carRA* و *Sr5AL* در سویه IM1، حتی در غیاب افزودن اسیدهای تریسپوریک، بر نقش مهم تنظیمی ژن *Sr5AL* در القای سنتز کاروتنوئیدها دلالت دارد. اسیدهای تریسپوریک یکی از عوامل کلیدی تنظیم‌کننده مسیر سنتز کاروتنوئید هستند و از طرفی کاروتنوئیدها پیش‌ساز اسیدهای تریسپوریک هستند (۶، ۲۵). همچنین افزایش بیان ژن *hmgr* در سویه‌های بهبود یافته می‌تواند نشانه‌ای از افزایش شار مسیر MVA و در نتیجه افزایش پیش‌سازهای سنتز کاروتنوئید باشد (۲۱).

کاهش بیان ژن‌های *carB* و *Sr5AL* در برخی سویه‌ها مانند WI78 نشان می‌دهد سازش‌پذیری به تنهایی کافی نبوده و اعمال جهش‌های هدفمند یا انتخاب بهتر، در بهبود هم‌زمان تنظیم مسیر متابولیک و افزایش تولید محصول مؤثرتر بوده است. این نتایج نشان می‌دهند فرایندهای سازشی در سطح بیان ژن‌ها نیز بازتاب پیدا کرده‌اند و تنها به تحمل فیزیکی محدود نمی‌شوند.

به‌طور کلی، استفاده از عامل استرس‌زای ایمیدازول به‌عنوان ابزار انتخابی در فرایند تکامل سازشی موجب تحریک پاسخ‌های تنظیمی مؤثری در بلاکسلا تریسپورا شده است. این یافته‌ها مسیرهای تازه‌ای را برای افزایش بازده تولید ترکیبات ارزشمند بیولوژیکی از طریق به‌کارگیری روش‌های مبتنی بر فشار انتخابی و تحلیل مولکولی هموار می‌کند.

مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی نشان دادند تنش ایمیدازول، به‌ویژه پس از اعمال فرایند تکامل سازشی آزمایشگاهی (ALE)، موجب تغییرات چشمگیری در ساختار و رنگ میسلوم بلاکسلا تریسپورا شده است. سویه تکامل‌یافته IM1 دارای شبکه هیفی متراکم‌تر و منشعب‌تر نسبت به سویه‌های W78 و WI78 بود که می‌تواند نشانه‌ای از سازگاری فیزیولوژیکی سلول‌ها به‌منظور افزایش سطح تماس با محیط و ارتقای جذب مواد مغذی باشد. از نظر رنگ‌دانه‌ای، سویه‌های تکامل‌یافته، به‌ویژه IM1، رنگ نارنجی شدیدتری از خود نشان دادند. این ویژگی ظاهری با افزایش محسوس بتاکاروتن درون سلولی مطابقت داشت که از طریق آنالیز اسپکتروفتومتری تأیید شد. اگرچه افزایش وزن خشک زیست‌توده اندک بود، تمرکز اصلی تغییرات متابولیکی بر مسیرهای تولید کاروتنوئیدها بود. تشکیل پلت‌های فشرده و هیف‌های کوتاه‌تر نیز می‌تواند فرایند استخراج رنگ‌دانه و عملکرد صنعتی را بهبود بخشد. این ویژگی‌های ساختاری در شرایط صنعتی از اهمیت زیادی برخوردارند؛ زیرا رشد رشته‌ای در قارچ‌ها اغلب مشکلاتی در ویسکوزیته محیط کشت و عملکرد بیورآکتورها ایجاد می‌کند (۹). این نتایج اهمیت بررسی هم‌زمان ویژگی‌های مورفولوژیک و رنگ‌دانه‌ای را در بهینه‌سازی سویه‌های صنعتی قارچی نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه با مقایسه نتایج مقدار بتاکاروتن تولیدشده و بررسی‌های صورت‌گرفته در زمینه سطوح رونویسی ژن‌ها، تأثیر ژن *Sr5AL* در هم‌افزایی پاسخ آنزیم‌های مسیر بیوسنتز کاروتنوئید مشخص شد. نتایج نشان دادند سویه سازش‌یافته موتانت (IM1) شرایط سازش‌پذیری را نسبت به سویه سازش‌یافته والد (WI78) بهتر طی کرده است. این یافته بر مزایای بالقوه سازش‌پذیری سویه‌ها برای ویژگی‌های بهبود یافته تأکید می‌کند.

References

- (1) Dufossé L. Microbial and microalgal carotenoids as colourants and supplements. In Carotenoids: Volume 5: *Nutrition and Health* 2009 Jan 1 (pp. 83-98). Basel: Birkhäuser Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7501-0_5
- (2) Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX. Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs*. 2011 Apr 20;9(4):625-44. <https://doi.org/10.3390/md9040625>
- (3) Dufossé L, Galaup P, Yaron A, Arad SM, Blanc P, Murthy KN, Ravishankar GA. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. *Trends in Food Science & Technology*. 2005 Sep 1;16(9):389-406. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.006>
- (4) Dufossé L. Microbial production of food grade pigments. *Food Technology and Biotechnology*. 2006;44:313-21. <https://B2n.ir/wq1402>
- (5) Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines*. 2020 Jan;74(1):1-6. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- (6) Vereshchagina OA, Memorskaya AS, Tereshina VM. Trisporoids under the stimulation of carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. *Microbiology*. 2012 Sep;81(5):526-33. <https://doi.org/10.1134/S0026261712050177>
- (7) Luo W, Wang Y, Yang P, Qu Y, Yu X. Multilevel regulation of carotenoid synthesis by light and active oxygen in *Blakeslea trispora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(37):10974-88. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03389>
- (8) Breitenbach J, Fraser PD, Sandmann G. Carotenoid synthesis and phytoene synthase activity during mating of *Blakeslea trispora*. *Phytochemistry*. 2012;76:40-5. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.017>
- (9) Iturriaga E, Papp T, Breum J, Arnau J, P. A. Strain and culture conditions improvement for β -carotene Production With *Mucor*. In: Barredo J-L, editor. *Microbial Processes and Products*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. p. 239-56. <https://doi.org/10.1385/1-59259-847-1:239>
- (10) Saini RK, Keum YS. Progress in microbial carotenoids production. *Indian Journal of Microbiology*. 2017 Mar;57(1):129-30. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0637-x>
- (11) He Z, Wang S, Yang Y, Hu J, Wang C, Li H, Ma B, Yuan Q. β -carotene production promoted by ethylene in *Blakeslea trispora* and the mechanism involved in metabolic responses. *Process Biochemistry*. 2017;57:57-63. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.02.028>
- (12) Jing K, He S, Chen T, Lu Y, Ng IS. Enhancing beta-carotene biosynthesis and gene transcriptional regulation in *Blakeslea trispora* with sodium acetate. *Biochemical Engineering Journal*. 2016;114:10-7. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.015>
- (13) Lee S, Kim P. Current status and applications of adaptive laboratory evolution in industrial microorganisms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020 May 8;30(6):793. <https://doi.org/10.4014/jmb.2003.03072>
- (14) Sandberg T, Salazar M, Weng LL, Palsson BO, Feist AM. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology.

- Metabolic Engineering*. 2019;56:1-16.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.08.004>
- (15) Adamo GM, Brocca S, Passolunghi S, Salvato B, Lotti M. Laboratory evolution of copper tolerant yeast strains. *Microbial Cell Factories*. 2012;11(1):1.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-1>
- (16) Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnology for Biofuels*. 2013;6(1):151.
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-151>
- (17) Mangado A, Morales P, Gonzalez R, Tronchoni J. Evolution of a yeast with industrial background under winemaking conditions leads to diploidization and chromosomal copy number variation. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9(1816).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01816>
- (18) Sauer U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. In: Nielsen J, Eggeling L, Dynesen J, Gárdonyi M, Gill RT, de Graaf AA, et al., editors. *Metabolic Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2001. p. 129-69. https://doi.org/10.1007/3-540-45300-8_7
- (19) Reyes LH, Gomez JM, Kao KC. Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. *Metabolic engineering*. 2014 Jan 1;21:26-33.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.11.002>
- (20) Nanou K, Roukas T. Stimulation of the biosynthesis of carotenes by oxidative stress in *Blakeslea trispora* induced by elevated dissolved oxygen levels in the culture medium. *Bioresource Technology*. 2011 Sep 1;102(17):8159-64.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.027>
- (21) Liu Y, Li X-y, Lu S-h, Yu C, Zhang Y-z, Wang Z-m, et al. Comparative metabolic responses induced by pyridine and imidazole in *Blakeslea trispora*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7:347.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00347>
- (22) Mark F., Chien-Chang H., Graham S.B., Bi-Ru T. & Jeanette L. *Blakeslea trispora* mated culture capable of increased beta-carotene production in US5422247A Vol. US85814592A (Archer Daniels Midland Co, 1993).
- (23) Shariati S, Zare D, Mirdamadi S. Screening of carbon and nitrogen sources using mixture analysis designs for carotenoid production by *Blakeslea trispora*. *Food science and biotechnology*. 2019 Apr 5;28(2):469-79. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0484-0>
- (24) Li Y, Wang W, Du X, Yuan Q. An improved RNA isolation method for filamentous fungus *Blakeslea trispora* rich in polysaccharides. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2010 Jan;160(2):322-7.
<https://doi.org/10.1007/s12010-008-8289-x>
- (25) Wang Q, Chen Y, Yang Q, Zhao J, Feng L, Wang M. SR5AL serves as a key regulatory gene in lycopene biosynthesis by *Blakeslea trispora*. *Microbial Cell Factories*. 2022;21(1):126.
<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01853-x>