بررسی تاثیر منابع کربن و نیتروژن بر تولید اسیدهای چرب امگا۳ در سویه جدید بومی *شیزوکیتریوم* DR31

ندا آموزیان[۱]، شهریار شاکری[۲*]، مجتبی مرتضوی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و
۲- استادیار، دکترای میکروبیولوژی صنعتی، دانشکده فناوری نوین، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته
۳- استادیار، دکترای بیوشیمی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۹)

چکیده

اسیدهای چرب امگا ۳ گروه بزرگی از اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه و با زنجیره بلند کربنی می‌باشند. این اسیدها در بدن ساخته نمی‌شوند و باید به وسیله مواد غذایی تامین گردند. مهم‌ترین اسیدهای چرب امگا۳، ایکوزاپنتانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌باشند که اثرات مفیدی بر سلامتی انسان دارند. DHA[1] به دلیل اهمیت آن در درمان بیماری‌هایی از قبیل سرطان، آلزایمر، سکته‌های قلبی، آرتریت روماتید، اضطراب، التهاب و بیماری‌های بدخیم از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف ما در این تحقیق، یافتن منابع مناسب کربن و نیتروژن به منظور افزایش تولید اسید چرب امگا ۳ در سویه بومی *شیزووکیتریوم* می‌باشد. همچنین، اثر کمی وکیفی منابع متفاوت کربن و نیتروژن بر روی رشد سویه و تولید اسید چرب امگا۳ حاوی دوکوزاهگزانوئیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. روغن تولید شده استخراج شد و در نهایت توسط گاز کروماتوگرفی مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان دادند که بهترین منابع کربن، گلیسرول و گلوکز و بهترین منبع نیتروژن، عصاره مخمر می‌باشد. گلوکز باعث افزایش تولید بیومس و گلیسرول باعث افزایش تولید روغن امگا۳ شد. تولید بیومس، اسید چرب امگا۳ و DHA توسط سویه شیزوکیتریوم در محیط انتخابی به ترتیب ۰/۷۶، ۰/۵ و ۰/۴۸گرم بر لیتر به دست آمد. نتایج این تحقیق نشان دادند که سویه بومی جدید *شیزوکیتریوم* پتانسیل تولید بیوتکنولوژی اسیدهای چرب امگا ۳ را دارد.

کلید واژگان: اسیدهای چرب امگا۳، دوکوزاهگزانوئیک اسید، سویه بومی، *شیزوکیتریوم*

* مسئول مکاتبات: sh.shakeri@kgut.ac.ir

1. Docosahexaenoic acid

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

۱- مقدمه

چربی‌ها به عنوان لیپیدهایی که استر گلیسرول و اسیدهای چرب هستند، شناخته می شوند. اجزائ اصلی لیپیدها، تری آسیل گلیسرول می‌باشد که شامل سه اسید چرب می باشند [۱]. اسیدهای چرب، زنجیره طولانی و متنوعی از اسیدهای آلیفاتیک) آلکانوئیک اسید (با طول کربن ۱۲ تا ۲۲ اتم را دارند. تاثیر طول زنجیره و همچنین، حضور یا عدم حضور باندهای دوگانه از مشخصه‌های یک اسید چرب است. اسیدهای چرب غیر اشباعی با ۲ یا بیشتر باند دوگانه در روغن هایی مانند امگا ٦ و امگا ۳ وجود دارند. گروه اول، اسیدهای چرب غالب در گیاهان و جانوران هستند و گروه دوم یعنی اسیدهای چرب امگا ۳، معمولا در غذاهای دریایی، جانوران و فیتوپلانکتون‌ها یافت می‌شوند. اسیدهای چرب امگا ۳ گروه بزرگی از اسیدهای چرب غیر اشباعی با زنجیره بلند کربنی هستند که چندین پیوند دوگانه دارند و تعداد اتم‌های کربن در آن‌ها بین ٤ تا۲٤ و تعداد باندهای دوگانه بین ۲ تا ٦ متغیر است [۲،۳]. مهم‌ترین اسیدهای چرب امگا۳، ایکوزاپنتانوئیک[1] اسید و دوکوزاهگزانوئیک[2] اسید می‌باشند که تاثیرات مفیدی بر سلامتی انسان دارند. این اسیدها به عنوان اسیدهای چرب ضروری می باشند. زیرا بدن انسان قادر به ساخت آنها نمی‌باشد اما برای متابولیسم طبیعی بدن ضروری و مفید هستند [٤]. در بین اسیدهای چرب، DHA از ۲۲ اتم کربن و ٦ پیوند دوگانه تشکیل شده است. به خاطر اهمیت آن در سلامت، پیشگیری و درمان بیماری‌های متفاوت در انسان، بیشترین توجه را به خود جلب کرده است [۵]. غشاهای سلولی برخی از بافت‌ها مانند شبکیه، مغز و میوکارد قلب به صورت خاص غنی از این اسیدهای چرب هستند [٦]. همچنین DHA در درمان آترواسکلروزیس، آرتریت روماتوئید، سکته‌های قلبی و بیماری‌های بدخیم کاربرد دارد. [۷، ۸]. این اسیدهای چرب به صورت طبیعی در ماهی‌های چرب مانند ماهی آزاد ، قزل الا ، ماهی تن و مکمل‌های روغن ماهی به وفور وجود دارند [۹،۱۰]. اما به علت افزایش تقاضا، کاهش ذخایر ماهی، مقدار کم DHA سنتز شده در کبد ماهی و صید فصلی ماهی نیاز به منابع جدید جهت تولید روغن های حاوی اسید چرب امگا ۳ وجود دارد [٤،۷]. علاوه بر این دلایل، مزه و بوی نامطلوب روغن ماهی ، آلودگی دریاها با فلزات سنگین جیوه و دی اکسین‌ها، نیاز به یافتن منابع جدید حاوی اسید های چرب امگا ۳ بیشتر می شود [۳،۱۱]. ریزجلبک‌ها، گروه متفاوتی از میکروارگانیسم‌ها هستند که پروکاریوت‌ها و تک سلولی‌های یوکاریوتی را در برگرفته‌اند. بعضی از این ریزجلبک‌ها می‌توانند محصولات با ارزشی مانند پیگمان‌ها (کاروتنوییدها و فیکوبیلین‌ها، اسیدهای چرب چند غیر اشباعی، استرول‌ها و ویتامین‌ها) را تولید کنند. ریز جلبک های ترائوستوکیترید که شامل دو جنس شاخص *ترائوستوکیتریوم*[3] و *شیزوکیتریوم*[4] می‌باشد، توانایی تولید روغن‌های حاوی اسیدهای چرب امگا۳ را به مقدار قابل توجهی دارند. این دو جنس، هتروتروف هستند و خیلی سریع رشد می‌کنند. همچنین به دلیل میزان رشد بالای آن‌ها در شوری پایین، امکان تولید محصول در حجم بالا در فرمانتور می‌باشد. اهداف این تحقیق شامل بررسی منابع مختلف کربن و نیتروژن بر میزان رشد و تولید روغن حاوی اسیدهای چرب امگا ۳ بخصوص دوکوزاهگزانوئیک اسید در سویه جدید بومی *شیزوکیتریوم* می باشد.

۲- مواد و روش‌ها

فعال سازی سویه *شیزوکیتریوم*

سویه بومی *شیزوکیتریوم* از کلکسیون میکروبی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته تهیه شد. این سویه قبلا در طی یک فرآیند جداسازی و غربالگری وسیع و با استفاده از آنالیزهای مولکولی شناسایی و در بانک ژنی ثبت شد. فعال سازی سویه بر روی محیط GYP[5] انجام گرفت. این محیط کشت حاوی، ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱ گرم بر لیتر پپتون، ۱ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۰/۳ گرم بر لیتر پنی‌سیلین، ۰/۳ گرم بر لیتر استرپتومایسین، ۲۰ گرم بر لیتر آگار و ۵۰٪ آب

1. EPA
2. DHA

3. *Thraustochytrium*
4. *Shizochytrium*
5. Glucose-Yeast extract-Peptone medium

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

دریا می‌باشد. اسم جنس سویه *شیزوکیتریوم* توسط آنالیز های مولکولی مورد تایید قرار گرفته بود.

محیط‌های مورد استفاده جهت بررسی کیفی اثر منابع متفاوت کربن

این منابع شامل: گلوکز و سوکروز ۱۰ گرم بر لیتر، توین ۸۰ و گلیسرول v/v ۱٪ ، اسکیم میلک[1] ۱۰ گرم بر لیتر و آگار ۲۰ گرم بر لیتر بودند. پپتون و عصاره مخمر، هر کدام به میزان۱ گرم بر لیتر مشابه محیط کشت GYP (پایه) بودند. این منابع در محیط کشت به صورت جداگانه آزمایش شدند. به دلیل دریازی بودن سویه بومی، برای تهیه محیط کشت از آب دریا استفاده شد. محیط کشت مورد نظر جامد می‌باشد و رشد سویه‌ها بر روی پلیت به صورت کیفی مورد مورد مطالعه قرار گرفت. بعد از تلقیح، محیط کشت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت انکوباسیون شدند. در نهایت مقدار رشد سویه بر روی محیط کشت‌های متفاوت به صورت کیفی بررسی شد [۳].

محیط‌های مورد استفاده جهت بررسی کیفی اثر منابع متفاوت نیتروژن

این منابع شامل: سدیم گلوتامات، اوره، عصاره مالت، عصاره مخمر و کلرید آمونیوم هر کدام به میزان ۱ گرم بر لیتر بود. منبع کربن گلوکز به میزان ۱۰ گرم بر لیتر به همراه آگار ۲۰ گرم بر لیتر و پپتون ۱ گرم بر لیتر بود. بعد از تلقیح، محیط کشت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت انکوباسون شدند .در نهایت مقدار رشد سویه بر روی محیط کشت‌های متفاوت به صورت کیفی بررسی شد.

بررسی اثر منابع متفاوت کربن ونیتروژن به صورت کمی بر رشد سلولی و تولید روغن

از بین منابع مختلف کربن و منابع مختلف نیتروژن که قبلا آزمایش شده بود، بهترین منابع انتخاب شدند و محیط کشت های ترکیبی ساخته شدند تا بهترین عملکرد رشد سویه تشخیص داده شود. بهترین منابع کربن، گلوکز و گلیسرول و بهترین منابع نیتروزن، سدیم گلوتامات و کلرید آمونیوم بدست آمدند. بر این اساس ٦ محیط کشت طراحی شد. بعد از تلقیح و انکوباسیون محیط کشت‌ها در دمای ۳۰ درجه و ۱۵۰ rpm[2] به مدت ۹٦ ساعت (٤ روز) آنکوبه شدند. سپس نمونه برداری ازمحیط‌ها صورت گرفت .برای جداسازی بیومس سلولی سانتریفیوژ در دور rpm ۵۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در نهایت بیومس سلولی برای انجام آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت [٤].

تعیین وزن خشک سلولی

جهت سنجش وزن خشک سلولی، ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت در rpm ۵۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، سوپرناتانت دور ریخته شد و سپس رسوب سلولی جهت خشک شدن و تبخیر آب در آون با دمای ۱۰۵درجه تا رسیدن به وزن ثابت قرار داده شد.

استخراج روغن از بیومس سلولی

برای استخراج روغن، ابتدا مقدار مشخصی از بیومس خشک سلولی را وزن کرده و به فالکون انتقال داده شد، سپس به آن مقدار ۲ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد، پس از آن بیومس خشک سلولی توسط دستگاه اولتراسونیک Horn مدل UP200S به مدت ۵ دقیقه هموژن شد. سپس مقدار ۲/۵ میلی لیتر از محلول کلروفرم و ۵ میلی لیتر از محلول متانول به آن اضافه شد و توسط دستگاه هموژنایز و اولتراسونیک پخش شدن و خرد شدن دیواره سلولی به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. مجددا مقدار ۲/۵ میلی لیتر کلروفرم و ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و به دنبال آن به مدت ۲ دقیقه هموژنایز (Homogenizer) مدل IKA ® T10 basic و هم زدن انجام شد. سپس سوسپانسیون را در rpm ٤۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده که به دنبال آن سه فاز تشکیل شد [۹].

فاز بالایی مربوط به متانول بوده، فاز وسط بیومس می‌باشد و فاز زیرین مربوط به کلروفرم است که چربی‌ها را در خود حل می‌کند. بنابراین فاز زیرین (فاز آلی) را برداشته و به فالکون تمیز از قبل وزن شده دیگر انتقال داده و سپس عمل تبخیر حلال کلروفرم در زیر هود انجام شد.

1. Skim milk

2. Revolution per minute

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

جدول ۱ محیط کشت‌های ترکیبی مورد استفاده برای سنجش تولید روغن حاوی اسیدهای چرب امگا۳

شماره محیط / ترکیبات	۱	۲	۳	٤	٥
گلوکز (g/L)	۱۵	۱۵	_	_	_
گلیسرول (v/v)	_	_	۱/۵٪	۱/۵٪	۱/۵٪
عصاره مخمر (g/L)	۱	۱	۱	۱	۱
پپتون (g/L)	۱	۱	۱	۱	۱
سدیم گلوتامات (g/L)	_	۱	_	_	۱
NH_4Cl (g/L)	۱	_	_	۱	_
آب دریا (v/v)	٪۵۰	٪۵۰	٪۵۰	٪۵۰	٪۵۰

آنالیز کروماتوگرافی گازی جهت تعیین مقدار DHA

در این تحقیق جهت محاسبه مقدار DHA و همچنین طیف اسیدهای چرب تولیدی توسط سویه بومی، آنالیز متیل استرهای اسید چرب تولید شده توسط کروماتوگرافی گازی صورت گرفت. دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد استفاده در این تحقیق مدل 6890 N, Agilent و ساخت کشور امریکا بود. آشکار ساز دستگاه نیز از نوع FID بود. ستون دستگاه DB-23 می‌باشد که پوشیده از سیانوپروپیل با فاز ثابت موئینه بوده است. قطر خارجی ستون (ID)، ۰/۳۲ میلی متر و قطر داخلی ستون (DB)، ۰/۲۵ میکرومتر می‌باشد. دمای اولیه ستون ۵۰ درجه به مدت ۲ دقیقه می‌باشد که سپس با سرعت ۱۰ درجه سانتی گراد در دقیقه به ۱۸۰ درجه سانتی گراد رسیده، بعد از ۵ دقیقه، دما با سرعت ۵ درجه سانتی گراد در دقیقه به ۲٤۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت و به مدت ۷ دقیقه ثابت ماند. نیتروژن نیز به عنوان گاز حامل استفاده شد [۱٤،۱۳،۱۲]. برای محاسبه میزان اسید چرب، سطح زیر منحنی مربوط به هر اسید چرب محاسبه شده و در مقایسه با استاندارد داخلی مقدار اسید چرب بدست آمد.

روش تهیه محلول ترانس استریفیکاسیون

محلول واکنش مورد استفاده جهت تبدیل روغن‌های استخراج شده به فرم متیل استر اسید چرب، متانولیک سولفوریک اسید ٤٪می باشد .مقدار مشخصی از روغن استخراج شده را وزن کرده و آن را به لوله آزمایش منتقل کرده و سپس به آن مقدار ۳ میلی لیتر متانولیک سولفوریک اسید ٤٪ را اضافه کرده و درب لوله آزمایش محکم بسته شد. سپس نمونه در بن ماری و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از اتمام زمان فوق، نمونه را برداشته و در دمای محیط جهت سرد شدن قرار داده شد. زمانی که نمونه به اندازه کافی سرد شد به آن ۱ میلی لیتر آب اضافه کرده و سپس ۳۰ ثانیه هم زدن[1] انجام شد. پس از آن ۱میلی لیتر هگزان افزوده و مجددا ۳۰ ثانیه هم زدن انجام شد. برای مدتی نمونه را ثابت گذاشته تا دو فاز تشکیل دهد، پس از آن فاز بالایی (فاز آلی) که شامل فاز متیل استرهای موجود در هگزان بوده را برداشته و به یک اپندورف تمیز انتقال داده شد و به مقدار کم (نوک یک اسپاتول) از نمک سدیم سولفات[2] جهت جذب آب یا اسید در محلول اضافه شد تا به دستگاه آسیبی نزند. سپس ۳۰ ثانیه هم زدن انجام شد و دوباره فاز آلی را برداشته و به یک اپندورف تمیز انتقال داده شد. برای تزریق نمونه به دستگاه کروماتوگرافی آن را رقیق کرده، به این صورت که ۵۰۰ ماکرولیتر از نمونه را برداشته و در اپندورف دیگر ۵۰۰ ماکرولیتر حلال هگزان به آن افزوده و سپس مجددا ۳۰ ثانیه هم زدن انجام شد و نمونه جهت آنالیز کروماتوگرافی آماده و تا زمان تزریق به دستگاه در یخچال ٤ درجه نگهداری شد. پس از تزریق نمونه به دستگاه و اتمام آنالیز، جهت نگهداری استوک، نمونه در فریزر ۲۰- نگهداری شد. برای شناسایی اسیدهای چرب از استاندارد این اسید ها استفاده شد [۱۷،۱٦،۱۵،۱۲]

1. Vortex
2. Na2SO4

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

جدول ۲ نتایج مربوط به بررسی اثر منابع متفاوت کربن و اندازه کلنی ها

زمان / منبع کربن	گلوکز	گلیسرول	Tween 80	سوکروز	Skim milk
روز اول (٢٤ ساعت)	+٥	+٤	+٣	+٢	+١
روز دوم (٤٨ ساعت)	+٥	+٤	+٣	+٢	+١

۳- نتایج

بررسی کیفی اثر منابع متفاوت کربن بر رشد سویه شیزوکیتریوم

از آن‌جایی که هدف بررسی اثر منابع مختلف کربن است، ابتدا باید منبع کربن مناسب برای رشد سویه شناسایی شود. برای این کار ابتدا منابع مختلف کربن به صورت جداگانه در محیط کشت آزمایش شدند. بیشترین رشد سویه مربوط به محیط حاوی گلوگز و کمترین رشد مربوط به محیط حاوی شیر پس چرخ[1] می‌باشد .بعد از گلوکز، بیشترین رشد مربوط به گلیسرول و توین ۸۰[2] گزارش شد (جدول۲). سویه مورد نظر بر روی محیط حاوی منبع کربن سوکروز به خوبی رشد نکرد و اندازه کلنی ها بسیار کوچک بودند. در حالی که این سویه بر روی محیط حاوی گلوکز، کلنی های بزرگی را تشکیل داده بود.

بررسی کیفی اثر منابع متفاوت نیتروژن بر رشد سلولی

کلنی سویه شیزوکیتریوم بر روی هر سه محیط کشت حاوی عصاره مخمر، سدیم گلوتامات و کلرید آمونیوم تقریبا به یک اندازه رشد کرده بودند، سویه فوق روی محیط حاوی عصاره مالت کمترین رشد را داشت. رشد بر روی محیط حاوی اوره بیشتر از عصاره مالت می باشد ولی در مقایسه با سه منبع نیتروژن دیگر، رشد کمتری را باعث شده بود (جدول ۳).

نتایج مربوط به اثر محیط‌های کشت ترکیبی بر تولید بیومس و روغن امگا ۳

در این محیط کشت‌ها مقدار منبع کربن برابر با ۱۵ گرم بر لیتر و عصاره مخمر و پپتون ۱ گرم بر لیتر می‌باشد. همه محیط‌ها حاوی عصاره مخمر وپپتون هستند. محیط شماره ۱ شامل گلوکز و کلرید آمونیوم است. وزن خشک سلولی سویه در این محیط ۱/٦٩ گرم بر لیتر می‌باشد، میزان روغن امگا ۳تولید شده ۲۷۰میلی گرم بر لیتر و درصد روغن امگا ۳ ۱۵/۹۷ می‌باشد. محیط شماره ۲ شامل گلوکز و سدیم گلوتامات است . وزن خشک سلولی آن۱۳/۰ گرم بر لیتر است که کمترین مقدار بیومس را در بین این محیط‌ها دارد .میزان روغن امگا۳، ٤٠ میلی گرم بر لیتر و درصد روغن آن ۳۰/۷ می‌باشد که از محیط شماره ۱ بیشتر است. محیط شماره ۳ شامل گلیسرول، عصاره مخمر و پپتون است. وزن خشک سلولی سویه در آن ۰/۷٦ گرم بر لیتر است که از محیط شماره ۲ بیشتر و از محیط شماره ۱ کمتر است.

میزان روغن امگا ۳ تولید شده، ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر است که در بین ۵ محیط، بیشترین میزان روغن را دارد. همچنین درصد وزن خشک سلولی آن نیز ٦٥ می‌باشد که باز هم بیشترین میزان را در بین این محیط‌ها دارد .محیط شماره ٤ شامل گلسیرول و کلرید آمونیوم است.

1. Skim milk
2. Tween 80

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

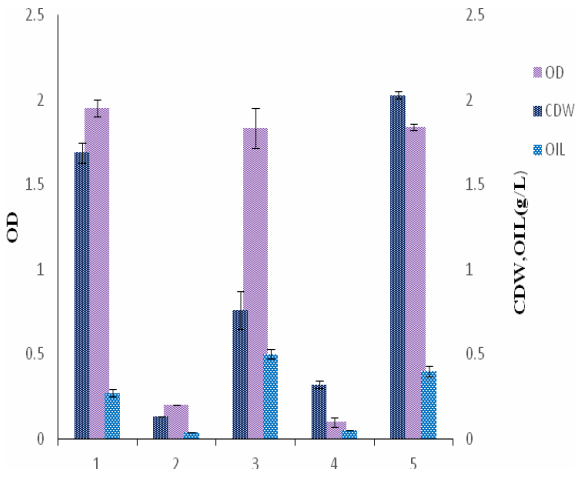
جدول ۳ نتایج مربوط به بررسی کیفی اثر منابع متفاوت نیتروژن و اندازه کلنی ها

زمان / منبع نیتروژن	عصاره مخمر	سدیم گلوتامات	NH_4CL	اوره	عصاره مالت
روز اول(۲٤ ساعت)	٤+	٤+	۳+	۲+	۱+
روز دوم(٤۸ ساعت)	٤+	٤+	۳+	۲+	۱+

وزن خشک سلولی سویه در آن ۰/۳۲ گرم بر لیتر است که از محیط‌های شماره ۳ و ۱ کمتر واز محیط شماره ۲ بیشتر می‌باشد. میزان روغن امگا ۳ آن، ۵۰ میلی گرم بر لیتر و درصد روغن ۱۵/٦ است که در مقایسه با سایر محیط‌ها کمترین میزان روغن و درصد وزن خشک سلولی را دارد. محیط شماره ۵ شامل گلیسرول و سدیم گلوتامات است. میزان وزن خشک سلولی تولید شده در آن ۲/۰۳ گرم بر لیتر است که بالاترین میزان را در بین ۵ محیط دارد. میزان روغن امگا۳ آن ٤۰۰ میلی گرم بر لیتر است که بعد از محیط شماره ٤، بیشترین مقدار را در بین سایر محیط‌ها دارد .درصد وزن خشک سلولی۱۹/۰۷ است که از نظر مقدار در رده سوم قرار می‌گیرد. نهایتا بهترین محیط از نظر تولید روغن، محیط شماره ۳ شناخته شد و همچنین محیط شماره ۵ نیز بیشترین مقدار بیومس را بدست داد (جدول ٤). در نهایت با توجه به نتایج محیط های شماره ۳ و ۵ جزو محیط های مناسب برای تولید روغن شناخته شدند.

جدول ٤ نتایج محیط کشت‌های ترکیبی بر حسب وزن خشک سلولی، جذب نوری، روغن و درصد وزن خشک سلولی

نام محیط	کلرید آمونیوم+گلوکز (۱)	گلوکز+سدیم گلوتامات (۲)	گلیسرول+عصاره مخمر+پپتون (۳)	گلیسرول+کلرید آمونیوم (٤)	گلیسرول+سدیم گلوتامات (۵)
CDW (g/L)	۱/٦۹	۰/۱۳	۰/۷٦	۰/۳۲	۲/۰۳
OIL (mg/L)	۲۷۰	٤۰	۵۰۰	۵۰	٤۰۰
OIL(CDW)%	۱۵/۹۷	۳۰/۷	٦۵	۱۵/٦	۱۹/۷۰



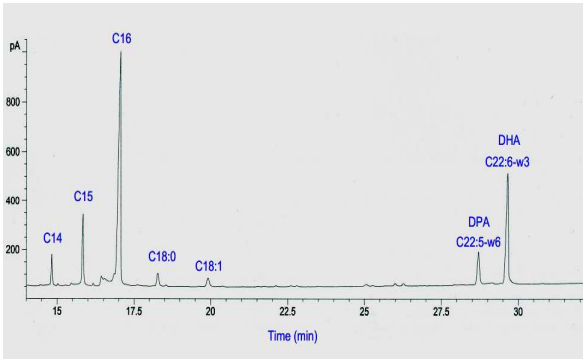
شکل ۱ تولید بیومس و روغن غنی از اسید چرب امگا۳ در محیط کشت‌های ترکیبی

بررسی پروفایل، درصد و مقدار اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در روغن تولید شده در محیط شماره ۳

پالمیتیک اسید در سویه‌های ترائوستوکیتریدها به عنوان یک ترکیب شاخص بوده و به مقدار زیاد تولید می‌شود .پیک مربوط به این اسید چرب در دقیقه ۱۷/۰٦ از ستون دستگاه گازکروماتوگرافی خارج شده است .پیک های مربوط به دوکوزاپنتانوئیک اسید[1] و دوکوزاهگزانوئیک اسید[2] به ترتیب در دقیقه ۲۸ و ۲۹ از ستون دستگاه گازکروماتوگرافی خارج شدند (شکل۲). درصد این اسیدهای چرب غیر اشباع به ترتیب برابر با ۵/۹ و ۲۱/۳ از کل اسیدهای چرب تولیدی توسط سویه می باشد.

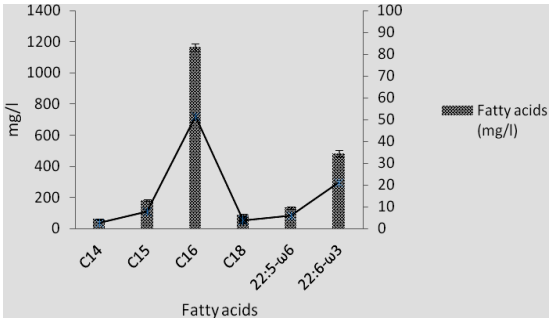
1. Docoxapantaneoic acid (DPA)
2. Dcoxahexaneoic acid (DHA)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]



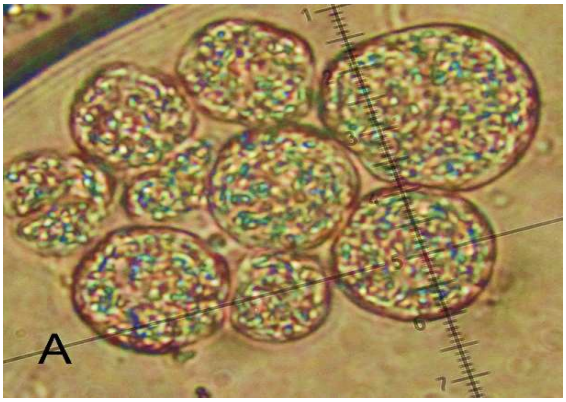
شکل۲ پیک گازکروماتوگرافی اسیدهای چرب موجود در روغن به دست آمده از محیط شماره ۳. پیک مربوط به دوکوزاهگزانوئیک اسید آخرین پیکی است که از ستون دستگاه گاز کروماتوگرافی خارج شده است

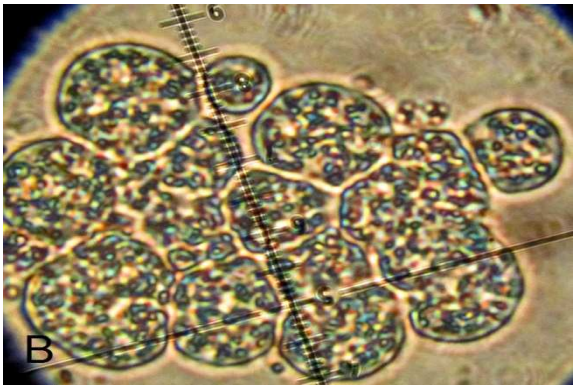
پیک شماره ۱که در دقیقه ١٤/٨٣ از ستون دستگاه خارج شده است مربوط به اسید چرب C14 یا مریستیک اسید[1] با ٦١/٦ میلی گرم بر لیتر و ٢/٧١٪ از کل اسیدهای چرب تولید شده توسط سویه می باشد (شکل ۲ و شکل ۳). پیک شماره ۲ مربوط به اسید چرب C15 یا پنتا دکانوئیک اسید[2] است که در دقیقه ١٥/٨٤ از ستون خارج شده است مقدار و درصد این اسید چرب به ترتیب برابر با ١٨١/٦ میلی گرم بر لیتر و ٨٪ می باشند. پیک شماره ۳ مربوط به اسید چرب C16 یا همان پالمیتیک اسید[3] است که در دقیقه ١٧/٠٦مشاهده شد. مقدار و درصد این اسید چرب برابر با ١١٦٦/٠٩٩ میلی گرم در لیتر و ٥١/٣٧٪ می‌باشد. پیک های شماره ٤ و ٥ مربوط به استئاریک اسید و اولئیک اسید می باشند که به مقدار جزئی در سویه تولید شده اند.



شکل ۳ درصد و مقدار اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع تولید شده در سویه بومی *شیزوکیتریوم* DR31

مورفولوژی سلول های سویه شیزوکیتریوم در طول انکوباسیون در محیط کشت شماره ۳ به مدت چهار روز، توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (شکل ٤). اندازه سلول ها بین ۵ تا ۲۰ میکرومتر مشاهده شد. این سلول ها در روز سوم از انکوباسیون، گرد و بزرگ بودند. دانه های چربی در داخل سلول ها بصورت گرانول های شفافی مشاهده شدند. همچنین در روز چهارم از انکوباسیون، لایه پلی ساکاریدی خارج سلولی در اطراف این سلول ها مشاهده شد. سلول‌ها بصورت مجتمع و در کنار هم دیده شدند و حاوی گرانول های چربی در داخل سلول بودند.





شکل٤ سلول‌های تولید کنندهDHA در روز سوم (A) و چهارم (B). لایه پلی ساکاریدی خارج سلولی در اطراف سلول ها و گرانول های چربی در داخل سلول های *شیزوکیتریوم* در روز چهارم دیده می شود.

٤- بحث

منابع کربن و نیتروژن مواد مغذی و ضروری برای رشد سلول ها و بیوسنتز متابولیت های اولیه، ثانویه و محصولات در میکروارگانیسمها از جمله ریزجلبک های خانواده ترائوستوکیتریدها می باشند .ترائوستوکیتریدها می‌توانند یک طیف وسیع از منابع کربن را برای تولیدDHA مورد استفاده قرار دهند. البته گلوکز و گلیسرول دو تا از بهترین منابعی هستند که بیشترین بازدهی را در تولید بیومس و تولید روغن دارند .به عنوان مثال، تاثیر شرایط کشت بر روی رشد و تولید

1. Myristic acid
2. Pentadecanoic acid
3. Palmitic acid

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

DHA به وسیله *شیزوکیتریوم لیماسینیوم*[1] BR21 مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه این گونه بود که از بین منابع مختلف کربن، نشان داده شد که بالاترین رشد در نسبت فروکتوز ۳٪ بدست آمد. سوکروز و شربت گلوکز، منابع کربن ضعیف‌تری برای رشد این سویه بودند .نتایج نشان داد که این دو، به خصوص شربت گلوکز حاوی الیگوساکاریدهایی است که نمی‌توانند رشد خوبی را برای این سویه ها باعث شوند .به نظر می‌آید که گلوکز یک منبع کربن خوب برای رشد سلول ها می باشد .همچنین این منبع کربن از نظر صنعتی در دسترس می‌باشد و اساسا ارزان‌تر است. در مورد منبع نیتروژن در این سویه، پپتون ۱٪ منبع خوبی برای تامین نیتروژن است. اسکیم میلک و شیر سویا[2] اگرچه منابع خوبی از نیتروژن برای تولید وزن خشک سلولی (بیومس) هستند، اما تولید DHA در آن‌ها پایین‌تر است. در تحقیق دیگری نشان داده شد که سویه BR21در محیط کشت شامل منوسدیم گلوتامات ۲٪، ۳/۲۰ گرم بر لیتر بیومس تولید کرد و مقدارDHA آن ۷۶۸/۵ میلی گرم بر لیتر را شامل می شد. *ترائوسوکیتریوم آئریوم*[3] ATCC 34304 به خوبی در محیط کشت شامل گلوکز، پپتون، عصاره مخمر به همراه سدیم گلوتامت، از خود رشد نشان داد. اگرچه نوع و مقدار منابع کربن استفاده شده برای دست یافتن به لیپید بالا و تولید DHA مهم است، نسبت مقدار کربن به نیتروژن نیز از اهمیت خاصی برخوردار است. نسبت بالای کربن به نیتروژن به طور کلی برای ذخیره لیپید توسط سویه ترجیح داده می شود. علاوه بر این ترائوستوکیتریدها از سویستراهای نیتروژن ارگانیک نسبت به نیتروژن غیر ارگانیک بیشتر استفاده می‌کنند .سدیم یکی دیگر از عنصرهای مهم برای رشد در ترائوستوکیتریدها است .زیرا یون‌های سدیم برای جذب فسفات ضروری هستند .این یون می‌تواند به صورت کلرید سدیم یا نمک دریایی مصنوعی تهیه شود [٤]. یوکوچی و هوندا[4] در سال۱۹۹۸ پی بردند که زمانی که سویه های ترائوستوکیترید از گلیسرول به جای گلوکز استفاده می کنند تولید اسیدهای چرب در آن ها افزایش پیدا می کند .هنگامی که از گلوکز ٤٪ در محیط کشت استفاده می‌شد میزان تولید کل اسیدهای چرب بین ٤٨/١ تا ٦٧ میلی گرم بر لیتر بود. ولی زمانی که از گلیسرول ٤٪ در محیط کشت استفاده شد، میزان کل اسیدهای چرب برابر با ۱/۱۲ گرم بر لیتر بود که نشان دهنده تاثیر غلظت گلیسرول بر تولید لیپید می باشد. در تحقیق دیگری میزان دوکوزاهگزانوئیک اسید تولید شده توسط گلوکز ۲/٤٥ گرم بر لیتر و دوکوزاهگزانوئیک اسید تولید شده از گلیسرول ۳/۰۵ گرم بر لیتر بود [۱۸]. در مورد نتایج مربوط به رشد کمی، محیط گلوکز و کلرید آمونیوم به لحاظ کیفی و چشمی رشد خوبی داشتند ولی زمانی که استخراج از این محیط به منظور به دست آوردن روغن صورت گرفت، میزان روغن امگا۳ آن به نسبت رشدی که سلول ها نشان داده بودند، خیلی کم بود و این نشان دهنده این است که بیشتر این مواد صرف تولید بیومس شده است. در واقع گلوکز در ترکیب با کلرید آمونیوم که یک منبع نیتروژن است، می‌تواند بیومس خوبی را تولید کند. گلیسرول در ساختار اسیدهای چرب و سنتز دانه های ذخیره ای تری آسیل گلیسرول یا همان دانه های چربی مورد استفاده قرار می گیرد و از این رو سویه شیزوکیتریوم، روغن بیشتری نسبت به بیومس تولید می‌کند .در صورتی که گلوکز باعث تولید بیومس بیشتر می‌شود. سدیم گلوتامات در ترکیب با گلوکز باعث مهار رشد و تولید کم بیومس می‌شود .در حالی که سدیم گلوتامات در ترکیب با گلیسرول باعث افزایش تولید بیومس می‌شد .برای به دست آوردن بهترین محیط، لازمه کار به دست آوردن بهترین درصد وزن خشک سلولی است. نکته مهم این است که از چه مقدار وزن خشک سلولی، چه مقدار روغن استخراج شده است، در واقع نسبت بین این دو مهم می‌باشد. با توجه به این موضوع، بهترین محیط، محیط شماره ۳ می‌باشد. زیرا به نسبت بیومس به دست آمده، میزن روغن استخراجی آن بالا بوده است. محیط شماره ۱ بیومس بالاتری نسبت به محیط شماره ۳ دارد، ولی میزان روغن آن با توجه به بیومس به دست آمده کم می‌باشد. محیط شماره ۲ بیومس تولیدی آن کم می‌باشد ولی میزان روغن تولیدی آن با توجه به درصد وزن خشک سلولی، نسبت به محیط شماره ۱ بیشتر است. محیط شماره ٤ و ٥ نیز به همین ترتیب می‌باشند. البته بطور کلی تولید بیومس در محیط شماره ٥ و همچنین درصد روغن در آن نیز قابل قبول می باشد. بطور کلی رشد سویه های *شیزوکیتریوم* بر روی دی‌ساکاریدها ضعیف است و از آن جایی که سوکروز یک دی‌ساکارید می‌باشد رشد سویه روی محیط حاوی سوکروز ضعیف می‌باشد. شیر پس چرخ نیز، همراه با سایر منابع کربن می‌تواند مفید باشد .ولی به تنهایی رشد

1. *Shizochytrium limacinium* BR212
2. Soybean meal
3. *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304
4. T.yocochi et D.Honda

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

ضعیفی را باعث می‌شود [۱۸]. عصاره مالت نیز در واقع همان مالتوز است و با توجه به ماهیت دی ساکاریدی این قند، سبب رشد کم سویه شیزوکیتریوم می‌شود. در نهایت با توجه به تولید اسید چرب غیر اشباع دوکوزاهگزانوئیک و روغن امگا ۳ در این سویه از منابع کربن و نیتروژن در دسترس، می توان از این سویه ها برای تولید بیوتکنولوژی اسیدهای چرب امگا ۳ استفاده کرد.

۵- تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته جهت حمایت های لازم برای انجام این پایان نامه تقدیر می گردد.

٦- منابع

[1] Raghukumar S. Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. Marine biotechnology. 2008;10(6):631-40.

[2] Gupta A, Barrow CJ, Puri M. Omega-3 biotechnology: thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. Biotechnology advances. 2012;30(6):1733-45

[3] Jakobsen AN. Compatible solutes and docosahexaenoic acid accumulation of thraustochytrids of the *Aurantiochytrium* group: Norwegian University of Science and Technology; 2008.

[4] Fan K, Chen S. Production of high-value products by the marine microalgae thraustochytrids. In: Yang, ST (ed). 2007.

[5] Surette ME. The science behind dietary omega-3 fatty acids. Canadian Medical Association Journal. 2008;178(2):177-80.

[6] Salem N, Wegher B, Mena P, Uauy R. Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996;93(1):49-54

[7] Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). Pharmacological Research. 1999;40(3):211-25.

[8] Siscovick DS, Raghunathan T, King I, Weinmann S, Wicklund KG, Albright J, et al. Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. Jama. 1995;274(17):1363-7.

[9] Chatdumrong W, Yongmanitchai W, Limtong S, Worawattanamateekul W. Optimization of docosahexaenoic acid (DHA) production and improvement of astaxanthin content in a mutant *Schizochytrium limacinum* isolated from mangrove forest in Thailand. Kasetsart J (Nat Sci). 2007;41:324-34.

[10] Sargent J. Fish oils and human diet. British Journal of Nutrition. 1997;78(01):5-13.

[11] Mendes A, Reis A, Vasconcelos R, Guerra P, da Silva TL. *Crypthecodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. Journal of applied phycology. 2009;21(2):199-214.

[12] Anbu P, Kim D-U, Jeh E-J, Jeong Y-S, Hur B-K. Investigation of the physiological properties and synthesis of PUFAs from thraustochytrids and its electrophoretic karyotypes. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2007;12(6):720-9.

[13] David F, Sandra P, Vickers AK. Column selection for the analysis of fatty acid methyl esters. Food analysis application Palo Alto, CA: Agilent Technologies. 2005

[14] Shantha N, Napolitano GE. Gas chromatography of fatty acids. Journal of Chromatography A. 1992;624(1):37-51.

[15] Hong W-K, Rairakhwada D, Seo P-S, Park S-Y, Hur B-K, Kim CH, et al. Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. Applied biochemistry and biotechnology. 2011;164(8):1468-80.

[16] Kamlangdee N, Fan K. Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove. Songklanakarin J Sci Tech. 2003;25:643-50.

[17] Xiao L. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from marine products. Masters Dissertion, University of Bergen. 2010.

[18] Shene C, Leyton A, Esparza Y, Flores L, Quilodrán B, Hinzpeter I, et al. Microbial oils and fatty acids: Effect of carbon source on docosahexaenoic acid (C22: 6 n-3, DHA) production by thraustochytrid strains. Journal of soil science and plant nutrition. 2010;10(3):207-16.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

The effects of carbon and nitrogen sources on production of omega 3 fatty acids in novel native strain of *schizochytrium DR31*

Amoozian, N. [1], Shakeri, Sh. [2*], Mortazavi, M. [3]

1. M.Sc. Agricultural Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
2. Assistant Professor, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
3. Assistant Professor, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

(Received: 93/10/26 Accepted: 94/3/9)

Omega 3 fatty acids are large group of polyunsaturated fatty acids with long carbon chain length. These fatty acids don't produce in human body and should be provide by nutrients. The most important omega3 fatty acids are Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid that have beneficial effects on the human health. DHA is important in treatment of disease such as cancer, Alzheimer, heart attacks, arteritis romatoid, anxiety, inflammation and malignant diseases. In this research, the aims were to find suitable carbon and nitrogen sources to increase production of omega 3 fatty acid by native strain of *schizochytrium*. Also quantitative and qualitative effects of different carbon and nitrogen sources were determined on growth of strain production of omega 3 fatty acids rich in DHA. The results showed that the best carbon sources are glucose and glycerol and the best nitrogen source is yeast extract. Glucose increased production of biomass and glycerol increased production of omega 3 fatty acids. Finally, biomass, oil and DHA were produced 0.76, 0.5 and 0.48 g/L by *schizochytrium* strain in selective medium, respectively. The results showed novel native strain of *Schizochytrium* has potential for production of omega 3 fatty acids.

Keywords: Omega 3 fatty acids, Docosahexaenoic acid, Native strain, *Schizochytrium*

*Corresponding Author E-Mail Address: sh.shakeri@kgut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]