

یافته علمی کوتاه

ارزش غذایی اسید های چرب دو ریز جلبک

Isochrysis galbana و *Nannochloropsis oculata*

محمود حافظیه*

*jhafezieh@yahoo.com

موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۲

کلمات کلیدی: ارزش غذایی، اسید های چرب، *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*

ترکیبات پلی ساکارید پنج گونه ریز جلبکی و روش استحصال سریع مونوساکارید ها پرداختند. از حیث ارزش غذایی مطالعات معدودی وجود دارند که ترکیبات بیوشیمیایی ریز جلبک ها را نشان داده اند (Ben-Bidlingmeyer et al., 1984, Amotz et al., 1985, Brown, 1991 و Brown & Farmer, 1994). در این بررسی ها، ریز جلبک ها را منابع غنی از ویتامینها، مواد معدنی، محصولات دارویی و آنتی بیوتیکها، روغنها، پروتئینها و رنگدانهها معرفی نموده اند (Beneman, 1990). البته برخی ریز جلبک ها در مقایسه با گیاهان روغنی (Oleogenous)، دارای طیف وسیعی از اسید های چرب به خصوص اسیدهای با ساختار ۱۸ کربنه هستند (Belarbi et al., 2000). این ریز جلبکها بازتاب بسیار خوبی برای تولید روغن از خود نشان می دهند و برخی تا بیش از ۳۰ برابر دانه های سویا روغن در خود ذخیره می نمایند، ولی نکته قابل توجه در آنها کیفیت اسید های چرب است که آنها را از گیاهان خشکی متمایز نموده است. بیشتر آنها اسیدهای چرب غیر اشباع همچون

در حال حاضر ارزشمند ترین گونه های ریز جلبکی به منظور آبی پروری بر اساس اندازه، خوش هضم بودن، ارزش غذایی و راحتی کشت شامل *Nannochloropsis oculata* (۴-۲ میکرون)، *Isochrysis galbana* (۷-۵ میکرون)، *Tetraselmis Choii* (۷-۱۰ میکرون)، *Dunaliella Chaetocerus gracilis* (۸-۶ میکرون)، *tertiolecta* (۷-۹ میکرون) و چندین گونه از کلرلاها (قطر ۳-۹ میکرون) می باشند (حافظیه، ۱۳۸۲). تاریخچه بررسی ارزش غذایی ریز جلبک ها با اهداف مختلف به کارهای مرکز تحقیقات اقیانوسی استرالیا بر می گردد که چهل گونه از ریز جلبک ها مورد آنالیز بیوشیمیایی قرار گرفتند تا در صنعت آبی پروری و به خصوص صنعت پرورش لارو آبزیان دریایی مورد استفاده قرار گیرند (Volkman et al., 1989). کارهای اولیه مربوط به بررسی ارزش غذایی ریز جلبک ها مربوط به Dubois و همکاران (۱۹۵۶) که به روش کالریمتریک، میزان قند و مواد مرتبط را تعیین نمودند همچون Chu و همکاران (۱۹۸۲) و Blakeney و همکاران (۱۹۸۳) به ترتیب بر

I. galbana و *N. oculata* با هدف بررسی اسید های چرب در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه های خالص دو ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* و *Isochrysis galbana* از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان بندرعباس تهیه گردید. کشت در شدت نور حدود ۱۰۰۰ لوکس، در دمای اتاق و در محیط کشت F₂ شامل سه محلول مواد مغذی، سلیکات و ویتامین انجام گردید (Leger et al., 1986). پس از سترون نمودن محیط های کشت ساخته شده، با افزودن جلبک از ذخیره خالص جلبکی هر گونه عملیات کشت شروع شد. میزان جلبک تلقیح شده در هر نمونه می بایست به ازاء یک میلی گرم ماده ی خشک گونه ی مذکور در هر لیتر محیط کشت باشد. شرایط محیطی مطلوب برای رشد جلبکها و انجام فتوسنتز آنها، نور سفید تک رنگ با روشنایی ۳۵۰۰±۳۵۰ لوکس و با تناوب نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی، درجه حرارت ۲۵±۲ درجه سانتی گراد و pH ۸-۷/۵ می باشد (Anderson, 1998).

جلبک ها پس از گذشت ۹۶ ساعت به انتهای مرحله رشد لگاریتمی خود رسیده که بالاترین ارزش غذایی و تراکم در این مرحله می باشد. هر گاه غلظت جلبک ها به حداکثر خود رسید (رنگ آن کاملاً تیره شد) عمل هوادهی را قطع کرده و جلبک را به کمک سرد کردن محیط براحتی می توان جدا سازی نمود. در این روش آب حاوی جلبک را بمدت ۴۸-۲۴ ساعت داخل یخچال قرار داده تا ریز جلبک ته نشین شود. سپس از لام نفوبار برای شمارش سلول های ریز جلبک در واحد میلی لیتر استفاده شد که برای این کار محلول بعد از همگن سازی، یک میلی لیتر از آن را در بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتری ریخته، با استفاده از چند قطره محلول لوگول، جلبکها را از بین بردیم. سپس با افزودن آب مقطر، حجم آنرا به ۵۰ میلی لیتر رسانده مجدداً همگن نموده و با گسترش روی لام نفو بار به شمارش سلولها اقدام نمودیم.

به منظور استخراج چربی نمونه ها، بعد از خشک شدن، در هاون شیشه ای کوچک کاملاً پودر شده و با ترازوی دیجیتال با دقت یک هزارم گرم، وزن شدند.

لینولئیک اسید، EPA و DHA تولید می کنند (Skjak- Braek, 1992). مطالعات گذشته نشان داده اند که گونه های مختلف ریز جلبک ها در ساختار این اسیدها از خود نوساناتی را نشان می دهند که بطور عمده به محیط کشت آنها باز می گردد (Fernandez - Reiriz et al., 1989; Volkman et al., 1989; Dunstan et al., 1993). *N. oculata* از نظر ترکیبات شیمیایی دارای پروتئین خام ۳۱/۲ درصد وزن خشک سلول، چربی ۳۶ درصد، فیبر خنثی شده ۴ درصد، فیبر اسیدی ۴/۱ درصد، مقدار NH₃-N ۱۲۰ واحد در میلیون وزن خشک و مقدار ویتامین ث ۴۵ واحد در میلیون وزن خشک می باشد (اچ هوف و دابلیو اسنل، ۱۹۹۹). این جلبک در درجه حرارت ۲۰-۳۰ درجه سانتی گراد و نور (LUX) ۸۰۰۰-۲۵۰۰ و شوری ۲۰-۳۶ppt براحتی کشت داده می شود و این بدان معنی است که *N. oculata* در دامنه وسیعی از شوری به خوبی رشد می کند. این جلبک غیر متحرک با رنگ متمایل به سبز بدون تاژک، باسلول های کوچک گرد با قطر ۴-۶ میکرون بوده، کلروپلاست بیشتر حجم سلول را اشغال کرده است. سلول ها تمایل دارند در محیط کشت شناور شوند و بدون هوادهی در کشت معلق می مانند.

Isochrysis galbana دارای رشد زیاد بوده، از نظر ترکیبات شیمیایی دارای دامنه ۴۶/۸۱-۴۱/۵۳ درصد پروتئین (درصد وزن خشک سلول)، ۲۲/۵۴ درصد چربی، ۲۲/۵۴ درصد کربوهیدرات، ۸/۴ درصد خاکسترو از نظر ویتامین ث دارای ۲۲/۵ واحد در میلیون وزن خشک می باشد (اچ هوف و دابلیو اسنل، ۱۹۹۹). این جلبک در درجه حرارت ۲۵-۳۰ درجه سانتی گراد و نور (LUX) ۱۰۰۰۰-۲۵۰۰ و شوری ۱۰-۳۰ppt پرورش یافته ولی تحمل دامنه شوری آن کمتر از گونه *N. oculata* است. این جلبک دارای دو تاژک بوده که از نزدیک انتهای سلول بیرون می آیند. سلول ها به سرعت در آب حرکت می کنند و در هنگام شنا می چرخند. این جلبک گرد دارای ۴-۸ میکرون قطر و رنگ طلایی بوده و اغلب یک لکه چشمی قرمز دارد. کلروپلاست به شکل یک فنجان بوده و به نظر می رسد یک سوم سلول را اشغال کرده و بقیه سلول شفاف به نظر میرسد (اچ هوف و دابلیو اسنل، ۱۹۹۹). که با توجه به مزایای معرفی شده ذیل، دو گونه

۳۰ متر با قطر ۳,۲۵ میلی متر است. آشکار ساز دستگاه از نوع FID می باشد که دمای شعله از سوخت مستقیم دو گاز هیدروژن و هوای فشرده تامین می شود. گاز حل شده در این دستگاه هلیوم بوده و فشار تمامی گازها از خروجی دستگاه روی ۴bar و همچنین دمای تزریق روی ۲۵۰ درجه سانتی گراد و دمای آشکار کننده روی ۲۸۰ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. و در نهایت جهت انجام آنالیزهای آماری از نرم افزارهای SPSS 14 و جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون Shapiro-Wilk's استفاده گردید. بعد از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده ها، با T-Test Student در سطح اطمینان ۹۵٪ هر یک از اسید چرب دو تیمار مقایسه گردیدند.

با توجه به آزمون T-test مشخص گردید که بین دو ریز جلبک *I. galbana* و *N. oculata* از نظر میزان اسید چرب اختلاف معنی دار آماری مشاهده می گردد ($p < 0.05$, $F = 182.16$ Sig. = 0.000).

پروفایل اسیدهای چرب در ریز جلبک ها در جدول و شکل شماره یک نشان داده شده است. اسید پالمیتیک، (16:0)، پالمیتولئیک (16:1n-7) ایکوزاترینوئیک (18:3n-3)، آراشیدونیک (20:4n-6) و ایکوزاینانوئیک (20:5n-3) بطور معنی دار ($p < 0.05$) در ریز جلبک *N. oculata* بیشتر از ریز جلبک *I. galbana* و اسید مریستیک (14:0)، لینولئیک (-18:2n) (6)، استناریدونیک (18:4n-3) و دکوزا هگزانوئیک (22:6n-3) بطور معنی دار ($p < 0.05$) در *I. galbana* بیشتر از *N. oculata* می باشند. اسید اولئیک (-18:1n) 9 اختلاف معنی داری را بین دو ریز جلبک نشان ندادند ($p > 0.05$).

۱ گرم از نمونه درون ظروف شیشه ای ۱۵ میلی لیتری درب دار با ۱۰ میلی لیتر اتر مخلوط و به مدت ۱۲ ساعت در یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری گردید.

سپس اتر حاوی چربی محلول را به ظرف دیگری ریخته و مجدداً ۱۰ میلی لیتر اتر بدان اضافه و برای ۱۲ ساعت در داخل انکوباتور نگهداری گردید.

ذرات معلق جامد سوسپانسیون در فاز اتری باقی مانده، تمام نمونه ها بمدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شدند.

با تبخیر اتر و بر جای ماندن چربی استخراج شده در کف ظروف و توزین آنها درصد چربی کل هر نمونه محاسبه گردید.

برای آنالیز اسیدهای چرب ابتدا می بایست اسیدهای چرب موجود در ساختمان مولکولی تری آسیل گلیسرولها و سایر مولکولها جدا شده و متیله شوند.

به این منظور به چربیهای استخراج شده به ازاء هر ۰/۱ گرم چربی ۱ میلی لیتر هپتان نرمال و ۰/۰۵ میلی لیتر هیدروکسید پتاسیم متانولی دو نرمال افزوده شد و به شدت همزده شدند.

برای تهیه محلول هیدروکسید پتاسیم متانولی دو نرمال، ۵/۶ گرم هیدروکسید پتاسیم در ۵۰ میلی لیتر متانول حل گردید.

بدین ترتیب گلیسرول از اسیدهای چرب جدا و رسوب داده و اسیدهای چرب متیله شدند (Leibovitz et al., 1987).

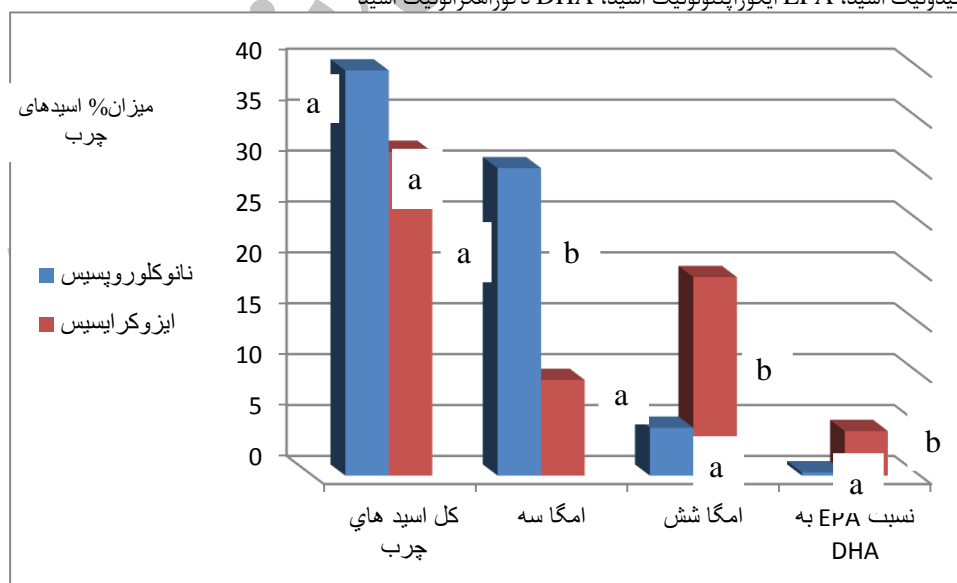
لایه فوقانی حاوی متیل استرهای اسیدهای چرب محلول در هپتان است. این قسمت به وسیله سرنگ به ویالهای کوچک منتقل و تا زمان تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی در دمای ۲۵- درجه نگهداری شد.

آنالیز اسیدهای چرب بوسیله دستگاه گاز کروماتوگراف مدل DANI-1000 انجام گرفت. طول ستون این دستگاه

جدول ۱: درصد اسیدهای چرب بر حسب کل اسیدهای چرب در *N. oculata* و *I. galbana*

<i>I. galbana</i>	<i>N. oculata</i>	اسیدهای چرب
۱۷/۵±۱/۰ ^b	۵/۱±۰/۴ ^a	اسید مریستیک
۱۴/۳±۰/۴ ^a	۳۲/۱±۱/۴ ^b	اسید پالمیتیک
۶/۳±۰/۵ ^a	۲۴/۹±۱/۷ ^b	اسید پالمیتولئیک
تعیین نشده	۲/۷±۰/۲	اسید استئاریک
۱۵/۱±۰/۷ ^a	۱۶/۵±۰/۹ ^a	اسید اولئیک
۸/۸±۰/۴ ^b	۱/۹±۰/۳ ^a	اسید لینولئیک
۸/۲±۰/۳ ^a	۱۹/۵±۰/۲ ^b	اسید ایکوزاترینوئیک
۲۴/۹±۱/۴ ^b	۱/۸۶±۰/۴ ^a	اسید استئاریدونیک
۰/۳۹±۰/۱ ^a	۲/۸±۰/۲ ^b	ARA*
۱/۸۷±۰/۳ ^a	۹/۴±۰/۷ ^b	EPA*
۸/۲±۰/۶ ^b	۰/۳±۰/۶ ^a	DHA*
۳۱/۸±۱/۴ ^a	۳۹/۸±۲/۰ ^a	کل اسید های چرب اشباع
۹/۴±۰/۵ ^a	۳۰/۳±۰/۵ ^b	Omega 3
۱۹/۵±۰/۳ ^b	۴/۷±۰/۶ ^a	Omega 6
۴/۳۸±۰/۶ ^b	۰/۰۳۲±۰/۰۸ ^a	EPA/DHA

ARA* آراشیدونیک اسید، EPA ایکوزاپنتونوئیک اسید، DHA دکوزاهگزانوئیک اسید



گروه های مختلف اسید

شکل ۱: مقایسه میزان اسیدهای چرب در دو گونه ریز *I. galbana* و *N. oculata*

(٪ از کل اسید های چرب) حروف غیر مشابه انگلیسی (a و b) در هر دو ستون کنار هم نشانه اختلاف معنی دار می باشد.

اسیدهای چرب غیر اشباع زنجیره بلند برای رشد، بازماندگی، مقاومت در برابر بیماریها و حتی پیگمانتاسیون لارو ماهیان دریایی و پست لارو میگو ضروری می باشند (Watanable, 1993). از میان اسیدهای چرب ضروری، دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) و ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند. از آنجائیکه پروفایل اسیدهای چرب به عنوان یک فاکتور حیاتی در امر تکثیر و پرورش بسیار مورد توجه می باشد، محققین سعی نموده اند با استفاده از جلبک های تک سلولی، مخمر غنی شده یا با امولسیون اسیدهای چرب HUFA را در غذای زنده دوره لاروی آبزیان پرورشی افزایش دهند. (Leger et al., 1986).

نتایج حاصله نشان می دهد بیشترین میزان اسید چرب EPA و آراشیدونیک اسید مربوط به نمونه *N. oculata* (به ترتیب $9/4 \pm 0/7$ و $2/8 \pm 0/2$ درصد کل اسیدهای چرب) در مقایسه با *I. galbana* ($1/87 \pm 0/3$) و می دارند.

جدول ۲: ساختار اسید های چرب جنس *Nannochloropsis*

اسید چرب	میزان	22:6	20:5	20:4	18:4	18:3	18:2	18:1	18:0	16:3	16:1	16:0	
			-	-	۵/۹	۰/۳	۰/۸	۰/۶	۵۷/۷	۱/۰	۰/۲	۱۶/۶	۱۵/۱

همانطور که دیده می شود در برخی موارد با اطلاعات بدست آمده از این مطالعه همخوانی وجود دارد و در برخی از جمله میزان اسید های چرب از جمله 20:5 و 22:6 مغایرت دیده می شود که همانطور که گفته شد بسیار به محیط کشت این ریز جلبک ها و محتوای آنها بستگی دارد (Fernandez Reiriz et al., 1989). در مورد اخیر مشخص گردید که از محیط کشت گیلارد برای کشت *N. oculata* استفاده شده است.

منابع

به عنوان نتیجه گیری کلی می توان عنوان نمود که در مورد آبزیان پرورشی که شیرین که معمولا میزان نیاز به امگا سه بیشتر است، بهتر است از گونه *N. oculata* به منظور غنی سازی غذای زنده دوره لاروی استفاده شود حال آنکه در مورد آبزیان دریایی که به میزان امگا شش بیشتری نیاز دارند از گونه *I. galbana* استفاده شود.

همچنین می توان نتیجه گرفت که غنی سازی با دو نوع جلبک نانو و ایزو می تواند در جهت افزایش میزان EPA و DHA در غذای زنده دوران لاروی آبزیان پرورشی مفید واقع شود.

اچ هوف و دابلیو اسنل، ف.ت.، ۱۹۹۹. تکثیر و پرورش غذای زنده دستورالعمل تکثیر و پرورش پلانکتون ها، ترجمه آذری تاکامی، امینی چرمهینی، ۱۳۸۷. انتشارات دانشگاه تهران، ۳۸۴ صفحه.

حافظیه، م.، ۱۳۸۲. آرتمی (میگویی آب شور). موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۶۳ صفحه.

Andersen, R.A., 1998. Algal culturing techniques. Academic Press. pp.408-439.

- Belarbi, E.H., Molina, E. and Chisti, Y., 2000.** A process for high yield and saleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish. *Process Biochemistry*. 35: 951-969.
- Ben-Amotz, A., Tomabene, T.G. and Thomas, W.H., 1985.** Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21: 72-81.
- Beneman, J.R., 1990.** Microalgae products and production: an overview. *Development of Industrial Microbiology* 31(5): 247-256.
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A. and Tarvin, T.L., 1984.** Rapid analysis of amino acids using pre-column derivitization. *Journal of Chromatography*, 336: 93-104.
- Brown, M.R., 1991.** The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 145: 79-99. Brown, M.R. and Farmer, CA. 1994. Riboflavin content of six species of microalgae used in mariculture. *Journal of Apply Phycology*, 6: 61-65.
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J. and Stone, B.A., 1983.** A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*. 113: 291-299.
- Chu, F.E., Dupuy, J.L. and Webb, K.L., 1982.** Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the American oyster, *Crassostrea uirginica*. *Aquaculture*, 29: 241-252.
- Dubois, M., Gillies, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956.** Calorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Annual Chemistry*, 28: 350-356.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barret, S.M. and Garland, C.D., 1993.** Changes in the lipid composition and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Apply Phycology*. 5: 71-83.
- Fernandez-Reiriz, M.J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J. and Labarta, U., 1989.** Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*. 83: 17-37.
- Leger, Ph., 1986.** The use and nutritional value of *Artemia* as food source. *Oceaography Marine Biology Annual Reveiw*, 24: 521-623.
- Leibovitz, H.E., Bengtson, D.A., Maugle, P.U. and Simpson, K.L., 1987.** Effects of dietary *Artemia* lipid fractions on growth and survival of larval inland silver sides, *Menidia beryllina*. In: *Artemia* research and its Applications. Univesa Press, Wettern, Belgium, 3: 469-478.
- Skjak-Braek, G., 1992.** Alginates–biosynthesis and some structure function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. *Biochemical Society Transition*. 20: 27-33.

Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P., Takaert and Versichele, D., 1986. Manual for the culture and use of Brine Shrimp *Artemia* in Aquaculture, *Artemia* Reference Center, State University of Gent, Belgium.

Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I. and Garland, C.D., 1989.

Fatty acid and lipids composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 128: 219-240.

Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexanoic acid in marine larval fish. *Journal of the World Aquaculture Society* 24: 152-161.

Archive of SID

Short Communication**Fatty acids nutritional value of two microalgae
Nannochloropsis oculata and *Isochrysis galbana***

Hafezieh M.*

*jhafezieh@yahoo.com

Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran

Keywords: Nutritional value, Fatty acids, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata*

Abstract

Microalgae nutritional value during the larviculture has many important roles can be affected on increasing quantity and quality production. The deficiency of some fatty acids especially HUFA in formulation feed which is normally used in aquaculture, is one of the most important problem in feeding, which using the marine sources oil can solve that. In this study, standard method used in culture of two important species of microalgae in aquaculture (*Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana*) then comparative survey of their nutritional values with emphasize on DHA, EPA and ARA were done, statistically.

Microalgae brought from Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Center- Bandar Abbas and cultured in F2 media, counted by Neobar lam and finally their fatty acids identified with Gas Chromatograph DANI-1000. Statistical analysis was done on treatments average data each with three replications by SPSS V.14($p < 0.05$). Fatty acid contents T- Test revealed that there are statistical differences ($f=182.16$, $p < 0.05$, $sig.=0.000$) between two microalgae species *N. oculata* and *I.galbana*. Results showed that total FA (31.8 ± 1.4 and 39.8 ± 2.0) without any difference significantly ($p > 0.05$), total unsaturated FA-omega 3 (9.4 ± 0.5 and 30.2 ± 0.5), total unsaturated FA – omega 6 (19.5 ± 0.2 and 4.7 ± 0.6) and EPA/DHA ratio (4.38 ± 0.6 and 0.032 ± 0.08) with statistical difference ($p < 0.05$) in *N. oculata* and *I.galbana* respectively.

*Corresponding author