

## بررسی تاثیر منابع کربن و نیتروژن بر تولید اسیدهای چرب امگا ۳ در سویه جدید بومی شیزوکتیریوم DR31

ندا آموزیان<sup>۱</sup>، شهریار شاکری<sup>۲\*</sup>، مجتبی مرتضوی<sup>۳</sup>

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 امگا ۳، ایکوزاپنتانویک اسید و دوکوزاهگزانویک اسید می‌باشند که اثرات مفیدی بر سلامتی انسان دارند. DHA<sup>۱</sup> به دلیل اهمیت آن در درمان بیماری‌هایی از قبیل سرطان، آلزایمر، سکنه‌های 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 شیزوکتیریوم می‌باشد. همچنین، اثر کمی و کیفی منابع متفاوت کربن و نیتروژن بر روی رشد سویه و تولید اسید چرب امگا ۳ حاوی دوکوزاهگزانویک اسید مورد بررسی قرار گرفت. روغن تولید شده استخراج شد و در نهایت توسط گاز کروماتوگرافی 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 امگا ۳ شد. تولید بیومس، اسید چرب امگا ۳ و DHA توسط سویه شیزوکتیریوم در محیط انتخابی به ترتیب ۰/۷۶، ۰/۵ و ۰/۴۸ گرم بر لیتر به دست آمد. نتایج این تحقیق نشان دادند که سویه بومی جدید شیزوکتیریوم پتانسیل تولید بیوتکنولوژی اسیدهای چرب امگا ۳ را دارد.

**کلید واژگان:** اسیدهای چرب امگا ۳، دوکوزاهگزانویک اسید، سویه بومی، شیزوکتیریوم

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

1. Docosahexaenoic acid

## ۱- مقدمه

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 [۷، ۴]. علاوه بر این دلایل، مزه و بوی نامطلوب روغن ماهی، آلودگی دریاها با فلزات سنگین جیوه و دی اکسین ها، نیاز به یافتن منابع جدید حاوی اسید های چرب امگا ۳ بیشتر می شود [۱۱، ۳]. ریزجلبک ها، گروه متفاوتی از میکروارگانیسم ها هستند که پروکاریوت ها و تک سلولی های یوکاریوتی را در بر گرفته اند. بعضی از این ریزجلبک ها می توانند محصولات با ارزشی مانند پیگمان ها (کاروتنوئیدها و فیکوبیلین ها، اسیدهای چرب چند غیر اشباعی، استرول ها و ویتامین ها) را تولید کنند. ریزجلبک های ترانوستوکتریوم که شامل دو جنس شاخص ترانوستوکتریوم<sup>۳</sup> و شیزوکتریوم<sup>۴</sup> می باشد، توانایی تولید روغن های حاوی اسیدهای چرب امگا ۳ را به مقدار قابل توجهی دارند. این دو جنس، هتروتروف هستند و خیلی سریع رشد می کنند. همچنین به دلیل میزان رشد بالای آن ها در شوری پایین، امکان تولید محصول در حجم بالا در فرماتور می باشد. 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 شیزوکتریوم می باشد.

## ۲- مواد و روش ها

## فعال سازی سویه شیزوکتریوم

سویه بومی شیزوکتریوم 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<sup>۵</sup> 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 پنی سیلین، ۰/۳ گرم بر لیتر استرپتومایسین، ۲۰ گرم بر لیتر آگار و ۵۰٪ آب

چربی ها به عنوان لیپیدهایی که استر گلیسرول و اسیدهای چرب هستند، شناخته می شوند. اجزای اصلی لیپیدها، تری آسید گلیسرول می باشد 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 مشخصه های یک اسید چرب است. اسیدهای چرب غیر اشباعی با ۲ یا بیشتر باند دوگانه در روغن هایی مانند امگا ۶ 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 فیتوپلانکتون ها یافت می شوند. اسیدهای چرب امگا ۳ گروه بزرگی از اسیدهای چرب غیر اشباعی با زنجیره بلند کربنی هستند که چندین پیوند دوگانه دارند و تعداد اتم های کربن در آن ها بین ۴ تا ۲۴ و تعداد باندهای دوگانه بین ۲ تا ۶ متغیر است [۳، ۲]. مهم ترین اسیدهای چرب امگا ۳، ایکوزاپنتانوئیک<sup>۱</sup> اسید و دوکوزاهگزانوئیک<sup>۲</sup> اسید می باشند که تاثیرات مفیدی بر سلامتی انسان دارند. این اسیدها به عنوان اسیدهای چرب ضروری می باشند. زیرا بدن انسان قادر به ساخت آنها نمی باشد اما برای متابولیسم طبیعی بدن ضروری و مفید هستند [۴]. در بین اسیدهای چرب، DHA از ۲۲ اتم کربن و ۶ پیوند دوگانه تشکیل شده است. به خاطر اهمیت آن در سلامت، پیشگیری و درمان بیماری های متفاوت در انسان، بیشترین توجه را به خود جلب کرده است [۵]. غشاهای سلولی برخی از بافت ها مانند شبکه، مغز و میوکارد قلب به صورت خاص غنی از این اسیدهای چرب هستند [۶]. همچنین DHA در درمان آترواسکلروزیس، آرتریت روماتوئید، سکتته های قلبی و بیماری های بدخیم کاربرد دارد. [۷، ۸]. این اسیدهای چرب به صورت طبیعی در ماهی های چرب مانند ماهی آزاد، قزل آلا، ماهی تن و مکمل های روغن ماهی به وفور وجود دارند [۹، ۱۰]. اما به علت افزایش تقاضا، کاهش ذخایر ماهی، مقدار

3. *Thraustochytrium*4. *Shizochytrium*

5. Glucose-Yeast extract-Peptone medium

1. EPA

2. DHA

آمدند. بر این اساس ۶ محیط کشت طراحی شد. بعد از تلقیح و انکوباسیون محیط کشت‌ها در دمای ۳۰ درجه و  $150 \text{ rpm}^2$  به مدت ۹۶ ساعت (۴ روز) آنکوبه شدند. سپس نمونه برداری از محیط‌ها صورت گرفت. برای جداسازی بیومس سلولی سانتریفیوژ در دور  $5000 \text{ rpm}$  و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در نهایت بیومس سلولی برای انجام آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت [۴].

### تعیین وزن خشک سلولی

جهت سنجش وزن خشک سلولی، ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت در  $5000 \text{ rpm}$  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 ۱۰۵ درجه 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 فالكون 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. مجدداً 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  $4000 \text{ rpm}$  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 فالكون تمیز از قبل وزن شده دیگر انتقال داده و سپس عمل تبخیر حلال کلروفرم در زیر هود انجام شد.

دریا می‌باشد. اسم جنس سویه شیزوکتیریوم توسط آنالیزهای 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 ۱٪ v/v، اسکیم میلک<sup>۱</sup> ۱۰ گرم بر لیتر و آگار ۲۰ گرم بر لیتر بودند. پپتون و عصاره مخمر، هر کدام به میزان ۱ 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 مطالعه قرار گرفت. بعد از تلقیح، محیط کشت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ 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 ۴۸ ساعت انکوباسیون شدند. در نهایت مقدار رشد سویه بر روی محیط کشت‌های متفاوت به صورت کیفی بررسی شد.

#### بررسی اثر منابع متفاوت کربن و نیتروژن به

#### صورت کمی بر رشد سلولی و تولید روغن

از بین منابع مختلف کربن و منابع مختلف نیتروژن که قبلاً 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 نیتروژن، سدیم گلوتامات و کلرید آمونیوم بدست

جدول ۱ محیط کشت‌های ترکیبی مورد استفاده برای سنجش تولید روغن حاوی اسیدهای چرب امگا ۳

شماره محیط	ترکیبات				
	۱	۲	۳	۴	۵
گلوکز (g/L)	۱۵	۱۵	-	-	-
گلیسرول (v/v)	-	-	۱/۵٪	۱/۵٪	۱/۵٪
عصاره مخمر (g/L)	۱	۱	۱	۱	۱
پیتون (g/L)	۱	۱	۱	۱	۱
سدیم گلوتامات (g/L)	-	۱	-	-	۱
(g/L) NH <sub>4</sub> Cl	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 ۲۴۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت و به مدت ۷ دقیقه ثابت ماند. نیتروژن نیز به عنوان گاز حامل استفاده شد [۱۲، ۱۳، ۱۴]. 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 ۴٪ می‌باشد. 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 ۴٪ 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<sup>۱</sup> انجام شد. پس از آن ۱ میلی لیتر هگزان افزوده و مجدداً 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<sup>۲</sup> 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 ماکرولیترا از نمونه را برداشته و در اپندورف دیگر ۵۰۰ ماکرولیترا حلال هگزان به آن افزوده و سپس مجدداً ۳۰ ثانیه هم زدن انجام شد و نمونه جهت آنالیز کروماتوگرافی آماده و تا زمان تزریق به دستگاه در یخچال ۴ 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 اسیدها استفاده شد [۱۲، ۱۵، ۱۶، ۱۷].

1. Vortex  
2. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

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 (۲۴ ساعت)	۵+	۴+	۳+	۲+	۱+
	روز دوم (۴۸ ساعت)	۵+	۴+	۳+	۲+	۱+

### ۳- نتایج

#### 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 پیتون ۱ گرم بر لیتر می‌باشد. همه محیط‌ها حاوی عصاره مخمر و پیتون هستند. محیط شماره ۱ شامل گلوکز و کلرید آمونیوم است. وزن خشک سلولی سویه در این محیط ۱/۶۹ گرم بر لیتر می‌باشد، میزان روغن امگا ۳ تولید شده ۲۷۰ میلی گرم بر لیتر و درصد روغن امگا ۳ ۱۵/۹۷ می‌باشد. محیط شماره ۲ شامل گلوکز و سدیم گلوتامات است. وزن خشک سلولی آن ۱۳/۰ گرم بر لیتر است که کمترین مقدار بیومس را در بین این محیط‌ها دارد. میزان روغن امگا ۳، ۴۰ 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 پیتون است. وزن خشک سلولی سویه در آن ۰/۷۶ 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 ۶۵ می‌باشد که باز هم بیشترین میزان را در بین این محیط‌ها دارد. محیط شماره ۴ شامل گلیسرول و کلرید آمونیوم است.

#### بررسی کیفی اثر منابع متفاوت کربن بر رشد

#### سویه شیزوکتیریوم

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 گلوکز و کمترین رشد مربوط به محیط حاوی شیر پس چرخ<sup>۱</sup> می‌باشد. بعد از گلوکز، بیشترین رشد مربوط به گلیسرول و توین<sup>۲</sup> ۸۰ گزارش شد (جدول ۲). سویه مورد نظر بر روی محیط حاوی منبع کربن سوکروز به خوبی رشد نکرد و اندازه کلنی‌ها بسیار کوچک بودند. در حالی که این سویه بر روی محیط حاوی گلوکز، کلنی‌های بزرگی را تشکیل داده بود.

#### بررسی کیفی اثر منابع متفاوت نیتروژن بر رشد

#### سلولی

کلنی سویه شیزوکتیریوم بر روی هر سه محیط کشت حاوی عصاره مخمر، سدیم گلوتامات و کلرید آمونیوم تقریباً 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 می‌باشد ولی در مقایسه با سه منبع نیتروژن دیگر، رشد کمتری را باعث شده بود (جدول ۳).

1. Skim milk  
2. Tween 80

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

زمان	منبع نیتروژن				
	عصاره مخمر	سدیم گلوتامات	NH <sub>4</sub> CL	اوره	عصاره مالت
روز اول (۲۴ ساعت)	۴+	۴+	۳+	۲+	۱+
روز دوم (۴۸ ساعت)	۴+	۴+	۳+	۲+	۱+

گرم بر لیتر است که بعد از محیط شماره ۴، بیشترین مقدار را در بین سایر محیطها دارد. درصد وزن خشک سلولی ۱۹/۰۷ است که از نظر مقدار در رده سوم قرار می گیرد. 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 ۴). در نهایت با توجه به نتایج محیط های شماره ۳ و ۵ جزو محیط های مناسب برای تولید روغن شناخته شدند.

وزن خشک سلولی سویه در آن ۰/۳۲ گرم بر لیتر است که از محیطهای شماره ۳ و ۱ کمتر و از محیط شماره ۲ بیشتر می باشد. میزان روغن امگا ۳ آن، ۵۰ میلی گرم بر لیتر و درصد روغن ۱۵/۶ 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 امگا ۳ آن ۴۰۰ میلی

جدول ۴ نتایج محیط کشت های ترکیبی بر حسب وزن خشک سلولی، جذب نوری، روغن و درصد وزن خشک سلولی

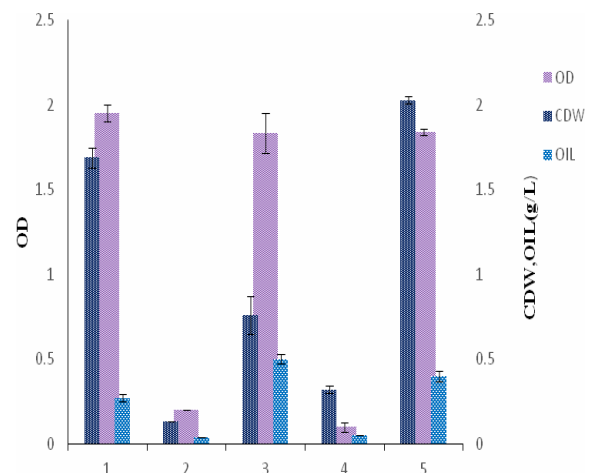
نام محیط	کلرید آمونیوم+گلوکز (۱)	گلوکز+سدیم گلوتامات (۲)	گلیسرول+عصاره مخمر+پپتون (۳)	گلیسرول+کلرید آمونیوم (۴)	گلیسرول+سدیم گلوتامات (۵)
CDW (g/L)	۱/۶۹	۰/۱۳	۰/۷۶	۰/۳۲	۲/۰۳
OIL (mg/L)	۲۷۰	۴۰	۵۰۰	۵۰	۴۰۰
OIL(CDW)%	۱۵/۹۷	۳۰/۷	۶۵	۱۵/۶	۱۹/۷۰

### بررسی پروفایل، درصد و مقدار اسیدهای

### چرب اشباع و غیر اشباع در روغن تولید شده

### در محیط شماره ۳

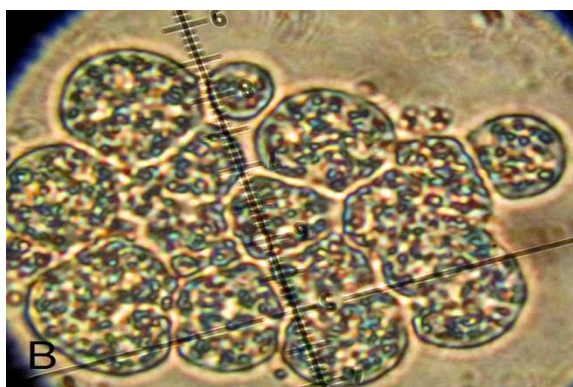
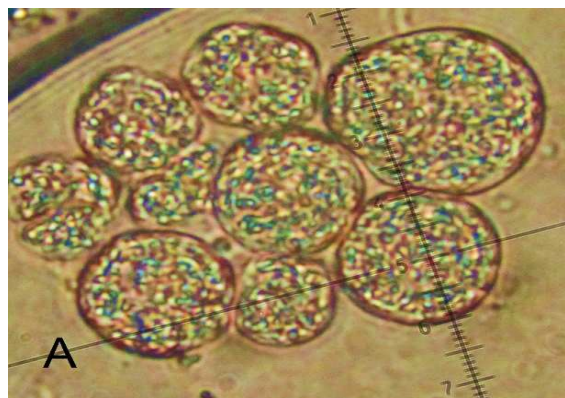
پالمیتیک اسید در سویه های ترانسستوکیتريدها به عنوان یک ترکیب شاخص بوده و به مقدار زیاد تولید می شود. پیک مربوط به این اسید چرب در دقیقه ۱۷/۰۶ از ستون دستگاه گازکروماتوگرافی خارج شده است. پیک های مربوط به دوکوزاپنتانوئیک اسید<sup>۱</sup> و دوکوزاهگزانوئیک اسید<sup>۲</sup> به ترتیب در دقیقه ۲۸ و ۲۹ از ستون دستگاه گازکروماتوگرافی خارج شدند (شکل ۲). درصد این اسیدهای چرب غیر اشباع به ترتیب برابر با ۵/۹ و ۲۱/۳ از کل اسیدهای چرب تولیدی توسط سویه می باشد.



شکل ۱ تولید بیومس و روغن غنی از اسید چرب امگا ۳ در محیط کشت های ترکیبی

1. Docoxapantanoic acid (DPA)  
2. Dcoxahehexanoic acid (DHA)

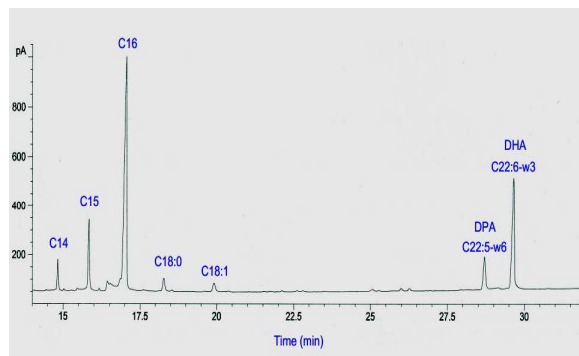
سلول‌ها بین ۵ تا ۲۰ میکرومتر مشاهده شد. این سلول‌ها در روز سوم از انکوباسیون، گرد و بزرگ بودند. دانه‌های چربی در داخل سلول‌ها بصورت گرانول‌های شفاف مشاهده شدند. همچنین در روز چهارم از انکوباسیون، لایه پلی ساکاریدی خارج سلولی در اطراف این سلول‌ها مشاهده شد. سلول‌ها بصورت مجتمع و در کنار هم دیده شدند و حاوی گرانول‌های چربی در داخل سلول بودند.



شکل ۴ سلول‌های تولیدکننده DHA در روز سوم (A) و چهارم (B). لایه پلی ساکاریدی خارج سلولی در اطراف سلول‌ها و گرانول‌های چربی در داخل سلول‌های شیزوکتیریوم در روز چهارم دیده می‌شود.

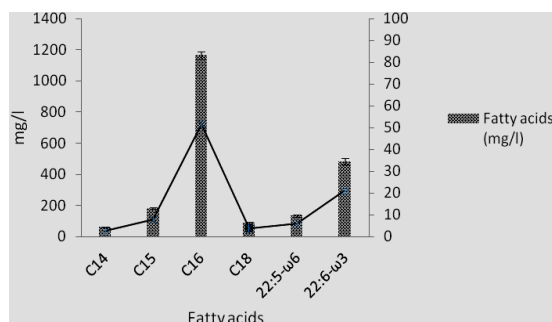
#### ۴- بحث

منابع کربن و نیتروژن مواد مغذی و ضروری برای رشد سلول‌ها و بیوسنتز متابولیت‌های اولیه، ثانویه و محصولات در میکروارگانیسمها از جمله ریزجلبک‌های خانواده ترانوستوکیتیریوم می‌باشند. ترانوستوکیتیریوم می‌تواند یک طیف وسیع از منابع کربن را برای تولید DHA مورد استفاده قرار دهند. البته گلوکز و گلیسرول دو تا از بهترین منابع هستند که بیشترین بازدهی را در تولید بیومس و تولید روغن دارند. به عنوان مثال، تاثیر شرایط کشت بر روی رشد و تولید



شکل ۲ پیک گاز کروماتوگرافی 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 ۱ که در دقیقه ۱۴/۸۳ از ستون دستگاه خارج شده است مربوط به اسید چرب C14 یا مریستیک اسید<sup>۱</sup> با ۶۱/۶ میلی گرم بر لیتر و ۲/۷۱٪ از کل اسیدهای چرب تولید شده توسط سویه می‌باشد (شکل ۲ و شکل ۳). پیک شماره ۲ مربوط به اسید چرب C15 یا پنتا دکانوئیک اسید<sup>۲</sup> است که در دقیقه ۱۵/۸۴ از ستون خارج شده است مقدار و درصد این اسید چرب به ترتیب برابر با ۱۸۱/۶ میلی گرم بر لیتر و ۸٪ می‌باشند. پیک شماره ۳ مربوط به اسید چرب C16 یا همان پالمیتیک اسید<sup>۳</sup> است که در دقیقه ۱۷/۰۶ مشاهده شد. مقدار و درصد این اسید چرب برابر با ۱۱۶۶/۰۹۹ میلی گرم در لیتر و ۵۱/۳۷٪ می‌باشد. پیک‌های شماره ۴ و ۵ مربوط به استئاریک اسید و اولئیک اسید می‌باشند که به مقدار جزئی در سویه تولید شده‌اند.



شکل ۳ درصد و مقدار اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع تولید شده

در سویه بومی شیزوکتیریوم DR31

مورفولوژی سلول‌های سویه شیزوکتیریوم در طول انکوباسیون در محیط کشت شماره ۳ به مدت چهار روز، توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). اندازه

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

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 ۲/۴۵ 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 امگا ۳ 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، می تواند بیومس خوبی را تولید کند. گلیسرول در ساختار اسیدهای چرب و سنتز دانه های ذخیره ای تری آسید گلیسرول یا همان دانه های چربی مورد استفاده قرار می گیرد و از این رو سویه شیزوکتیریوم، روغن بیشتری نسبت به بیومس تولید می کند. در صورتی که گلوکز باعث تولید بیومس بیشتر می شود. سدیم گلوتمات در ترکیب با گلوکز باعث مهار رشد و تولید کم بیومس می شود. در حالی که سدیم گلوتمات در ترکیب با گلیسرول باعث افزایش تولید بیومس می شد. 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 می باشد. با توجه به این موضوع، بهترین محیط، محیط شماره ۳ می باشد. زیرا به نسبت بیومس به دست آمده، میزان 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 می باشد. محیط شماره ۲ بیومس تولیدی آن کم می باشد ولی میزان روغن تولیدی آن با توجه به درصد وزن خشک سلولی، نسبت به محیط شماره ۱ بیشتر است. محیط شماره ۴ و ۵ نیز به همین ترتیب می باشند. البته بطور کلی تولید بیومس در محیط شماره ۵ و همچنین درصد روغن در آن نیز قابل قبول می باشد. بطور کلی رشد سویه های شیزوکتیریوم بر روی دی ساکاریدها ضعیف است و از آن جایی که سوکروز یک دی ساکارید می باشد رشد سویه روی محیط حاوی سوکروز ضعیف می باشد. شیر پس چرخ نیز، همراه با سایر منابع کربن می تواند مفید باشد. ولی به تنهایی رشد

DHA به وسیله شیزوکتیریوم لیماسینیوم<sup>۱</sup> 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 ضعیف تری برای رشد این سویه بودند. نتایج نشان داد که این دو، به خصوص شربت گلوکز حاوی الیگوساکاریدهایی است که نمی توانند رشد خوبی را برای این سویه ها باعث شوند. به نظر می آید که گلوکز یک منبع کربن خوب برای رشد سلول ها می باشد. همچنین این منبع کربن از نظر صنعتی در دسترس می باشد و اساسا ارزان تر است. در مورد منبع نیتروژن در این سویه، پپتون ۱٪ منبع خوبی برای تامین نیتروژن است. اسکیم میلک و شیر سویا<sup>۲</sup> اگرچه منابع خوبی از نیتروژن برای تولید وزن خشک سلولی (بیومس) هستند، اما تولید DHA در آن ها پایین تر است. در تحقیق دیگری نشان داده شد که سویه BR21 در محیط کشت شامل منوسدیم گلوتمات ۲٪، ۳/۲۰ گرم بر لیتر بیومس تولید کرد و مقدار DHA آن ۳۷۷۵ میلی گرم بر لیتر را شامل می شد. *ترائوستوکتیریوم آئریوم*<sup>۳</sup> ATCC 34304 به خوبی در محیط کشت شامل گلوکز، پپتون، عصاره مخمر به همراه سدیم گلوتمات، 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 ترائوستوکتیریومها از سویستراهای نیتروژن ارگانیک نسبت به نیتروژن غیر ارگانیک بیشتر استفاده می کنند. سدیم یکی دیگر از عنصرهای مهم برای رشد در ترائوستوکتیریومها است. زیرا یون های سدیم برای جذب فسفات ضروری هستند. این یون می تواند به صورت کلرید سدیم یا نمک دریایی مصنوعی تهیه شود [۴]. یوکوچی و هوندا<sup>۴</sup> در سال ۱۹۹۸ پی بردند که زمانی که سویه های ترائوستوکتیریوم از گلیسرول به جای گلوکز استفاده می کنند تولید اسیدهای چرب در آن ها افزایش پیدا می کند. هنگامی که از گلوکز ۴٪ در محیط کشت استفاده می شد میزان تولید کل اسیدهای چرب بین ۴۸/۱ تا ۶۷ میلی گرم بر لیتر بود. ولی زمانی که از گلیسرول ۴٪ در محیط کشت استفاده شد، میزان کل

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



- 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. *Cryptocodinium 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. *Songklanakarini J Sci Tech*. 2003;25:643-50.
- [17] Xiao L. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from marine products. *Masters Dissertation, 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.
- 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، می‌توان از این سویه‌ها برای تولید بیوتکنولوژی اسیدهای چرب امگا ۳ استفاده کرد.

## ۵- تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته جهت حمایت‌های لازم برای انجام این پایان‌نامه تقدیر می‌گردد.

## ۶- 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

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

Amoozian, N.<sup>1</sup>, Shakeri, Sh.<sup>2\*</sup>, Mortazavi, M.<sup>3</sup>

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