

بهینه‌سازی محیط کشت ریز جلبک بومی *Aurantiochytrium sp. shy* جهت افزایش میزان زیست‌توده با استفاده از روش پاسخ سطح

مرتضی پهلوان یلی¹، حسن جلیلی^{2*}، مصطفی نوروزی³، یزدان مرادی⁴، احمد حلاجی ثانی⁵

1- دانشجوی دکتری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران

2- دانشیار، گروه مهندسی زیستی دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، خیابان کارگر شمالی، تهران، ایران

3- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، نک، خیابان ونک، تهران، ایران

4- دانشیار، بخش فرآوری و بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران

5- استادیار، آزمایشگاه تحقیقاتی سوختهای زیستی، دانشکده فنی کاسپین، دانشکده فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

پذیرش: 1399/8/6

دریافت: 1397/11/3

* نویسنده مسئول:

hjalili@ut.ac.ir

صندوق پستی 1439 - 1561

چکیده:

ریزجلبک *Aurantiochytrium sp. shy* حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب چندغیر اشباعی (PUFA)، به‌ویژه اسید دوکوزاهگزانوئیک است و می‌تواند استفاده دارویی داشته باشد. در این پژوهش برای به حداکثر رساندن میزان زیست‌توده، تأثیر عواملی مثل گلوکز، عصاره گوشت، مونوسدیم گلوتامات و نمک دریا هم‌زمان با روش پاسخ سطح بررسی شد. در بررسی هم‌زمان و با در نظر داشتن اثر متقابل، بیشترین میزان زیست‌توده (7/1g/L) در غلظت‌های (گرم بر لیتر) گلوکز (60)، عصاره گوشت (6)، مونوسدیم گلوتامات (6) و نمک دریا (25ppt) به دست آمد. آنالیز سویه نشان داد میزان چربی بالاتر از 30 درصد وزن خشک سلولی است و اسید پالمیتیک و DHA قسمت عمده اسیدهای چرب را تشکیل می‌دهند. در حالت انفرادی، عصاره گوشت بیشترین تأثیر را دارد. ولی در حالت ترکیبی، برهمکنش گلوکز و عصاره گوشت در مقایسه با بقیه بیشترین تأثیر را داشته است. اگر میزان عصاره گوشت کافی باشد، افزایش گلوکز سبب می‌شود زیست‌توده افزایش یابد. به عبارتی، تأثیر مقدار گلوکز بر زیست‌توده کاملاً به مقدار عصاره گوشت وابسته است. در شرایط بهینه، نسبت گلوکز به عصاره گوشت برابر 10 و نسبت C/N برابر 5 بود. با توجه به رشد هتروتروفیک سریع و پتانسیل بالای این سویه در تولید زیست‌توده و توانمندی آن در تولید اسید چرب دوکوزاهگزانوئیک، به نظر می‌رسد سویه مورد مطالعه با بهبود شرایط تولید و عوامل مغذی، توانایی تولید زیست‌توده بالایی را داشته باشد.

کلید واژگان: بهینه‌سازی، زیست‌توده، روش پاسخ سطح¹، ریز جلبک *Aurantiochytrium sp. shy* عوامل مغذی

کربنی). ریزمغذی‌ها (فسفر، فلزات سنگین، ویتامین و ...) تقسیم می‌شوند. مهم‌ترین عوامل محیطی عبارت‌اند از: دما، شوری، pH، شدت هم‌زن و سرعت اکسیژن‌رسانی. پژوهش‌ها نشان می‌دهد عوامل محیطی و تغذیه‌ای در میزان و کیفیت زیست‌توده و چربی آنها مؤثر هستند [6]. میزان زیست‌توده، لیپید و ترکیب آنها در واقع پاسخ میکروارگانیسم به شرایط محیط کشت محسوب می‌شود [7]. بهبود فرایند و کم کردن هزینه تولید، از عوامل کلیدی توسعه بازار چربی حاصل از موجودات تک‌سلولی است. عوامل متعددی روی بازده و میزان تولید ریزجلبک تأثیرگذار هستند. از طرفی، ممکن است این عوامل بر هم تأثیر متقابل بگذارند که جهت بهینه‌سازی فرایند، استفاده از روش‌های آزمایش پاسخ سطح می‌تواند مفید باشد [6]. روش‌های طراحی آزمایش به دو دسته تقسیم می‌شوند [8]. در روش اول، مانند روش پلاکت-برمن¹، همه عوامل، مؤثر در نظر گرفته می‌شوند. در روش دوم، مانند روش پاسخ سطح، تعدادی از مهم‌ترین عوامل بررسی می‌شوند. در روش پاسخ سطح، با طراحی آزمایش و ارائه مدل آماری، اثر عوامل، جداگانه و برهمکنش بین عوامل و میزان تأثیرگذاری هر کدام تعیین می‌شود. در بین منابع کربنی، گلوکز به دلیل ساختار شیمیایی (مونوساکارید) که دارد و نیز میزان تولید انرژی بالاتر به ازای واحد مول مصرف‌شده، ریزجلبک‌ها به راحتی آنها را مصرف می‌کنند و موجب رشد سریع‌تر می‌شوند [9-13]. حضور منبع نیتروژنی در مراحل اولیه رشد جهت تکثیر بیشتر سلولی لازم است. حضور هم‌زمان دو منبع نیتروژنی مونوسدیم گلوتمات و عصاره گوشت سبب افزایش بیشتر تولید زیست‌توده و DHA می‌شود [14]. در بین عوامل محیطی، غلظت نمک دریا (شوری)، به‌عنوان عامل مؤثر انتخاب شده است. میزان نمک دریا جزو عوامل مؤثر در انتقال مواد به داخل سلول‌ها و گسیختگی دیواره سلولی است [15]. هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی محیط

ریزجلبک‌ها موجودات ریز تک‌سلولی هستند که به دلیل تنوع محصولات زیستی، در سال‌های اخیر توجه زیادی از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. مقدار مصرف سالانه ریزجلبک‌ها، پنج هزار تن در سال و به ارزش شش میلیارد دلار است [1]. این موجودات (ریزجلبک‌ها) بر اساس نحوه متابولیسم و توانایی سنتز منابع کربنی به دسته‌های اتوتروف، میکسوتروف، هتروتروف و فتوهتروتروف تقسیم‌بندی می‌شوند. ریزجلبک‌های اتوتروف توانایی تولید انرژی شیمیایی از انرژی خورشیدی به کمک فتوسنتز را دارند، درحالی‌که ریزجلبک‌ها هتروتروف منابع کربنی آلی (گلوکز، فروکتوز و ...) را در محیط عاری از نور به انرژی شیمیایی تبدیل می‌کنند. کشت هتروتروفی در مقایسه با اتوتروفی دارای مزایایی مانند سرعت رشد و تولید بیشتر، درصد چربی بالاتر، زیست‌توده بیشتر به ازای واحد حجم، طراحی ساده و ارزان راکتور زیستی و سادگی افزایش مقیاس راکتور زیستی است [2]. کشت ریزجلبک در شرایط هتروتروفی برای تولید مواد شیمیایی با ارزش، نظیر داروها و مکمل‌های غذایی به صورت اقتصادی موفقیت‌آمیز بوده است [3, 4]. در بین ریزجلبک‌های هتروتروف، تراستوکیتریدها و *Cryptocodinium cohnii* پتانسیل اقتصادی مناسبی برای تولید اسیدهای چرب چند غیر اشباعی به‌ویژه اسید چرب امگا سه DHA دارند. تاکنون 12 جنس تراستوکیتریدها شناسایی شده است که از جمله آنها را می‌توان به *Aurantiochytrium* اشاره کرد [5]. پروفایل اسیدهای چرب آن نشان می‌دهد که میزان اسید آراشیدونیک آن کم است، ولی DHA آن بالاست. با بهینه‌سازی محیط کشت می‌توان مقدار تولید زیست‌توده و همچنین محصولات جانبی حاصل از آن را افزایش داد. عوامل مؤثر در رشد ریزجلبک‌ها را می‌توان به دو دسته عوامل مغذی و محیطی تقسیم بندی کرد. عوامل مغذی نیز خود به دو دسته درشت مغذی‌ها (منبع نیتروژنی و

بهینه‌سازی محیط کشت ریز جلبک بومی ... بهلوان‌یلی و همکاران

چرب این سویه در جدول 1 ارائه شده است. بر اساس پژوهش‌های گذشته و غربالگری، چهار متغیر گلوکز، عصاره گوشت، مونوسدیم گلوتامات و نمک دریا برای بهینه‌سازی انتخاب شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده عبارت‌اند از: سود، سولفات منیزیم، فسفات هیدروژن سدیم، کربنات هیدروژن سدیم، کلرید منگنز، کلرید آهن III، سولفات روی، سولفات کبالت، اسید کلریدریک و سولفات مس (همگی مرک آلمان) و مواد میکروبی شامل مونوسدیم گلوتامات، عصاره گوشت، عصاره مخمر، تریپتون و پپتون (مرک)، گلوکز (شرکت کاسپین ایران) و آگار (چین) و نمک دریا (شرکت DD انگلیس).

کشت سویه بومی *Aurantiochytrium* sp. shy جداسازی شده از جنگل‌های مانگرویی خلیج فارس با روش پاسخ سطح به منظور به حداکثر رساندن میزان تولید زیست‌توده از آن است.

مواد و روش کار

سویه مورد مطالعه از سواحل مانگرویی خلیج فارس (استان بوشهر) نمونه‌برداری و تمام عملیات خالص‌سازی و شناسایی ریختی و مولکولی در مرکز تحقیقات ذخایر زیستی ایران انجام و با شماره KY677759 در پایگاه اطلاعات ژنتیکی NCBI ثبت شد. پروفایل اسیدهای

جدول 1 درصد وزنی مهم‌ترین اسیدهای چرب در سویه *Aurantiochytrium* sp. shy

اسیدهای چرب غیر اشباع	DPA	DHA	EPA	C16:0
24/6	6/47	16/77	1/04	54/59

جدول 2 محدوده متغیرهای مستقل برای بهینه‌سازی زیست‌توده سویه *Aurantiochytrium* sp. shy

حد محوری بالا	حد محوری پایین	حد بالا	حد پایین	واحد
100	20	80	40	g/L
10	2	8	4	g/L
10	2	8	4	g/L
45	5	35	15	g/L

به نسبت 10 درصد حجمی از محیط پیش کشت 24 ساعته (گلوکز 20، عصاره مخمر 1 پپتون 1 و نمک 32 (همگی گرم برلیتر)) سویه به تمامی ارلن‌ها تلقیح شد. تمامی ارلن‌ها در یک شیکرانکوباتور با دمای 28°C و دور هم‌زن 180 rpm و شرایط تاریکی قرار داده شدند. اندازه‌گیری میزان زیست‌توده تلقیحی پس از تلقیح به روش سنجش نوری، با طول موج 540 نانومتر و نیز با اندازه‌گیری زیست‌توده به وسیله سانتریفوژ کردن 10 میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سلول با دور 7000rpm به مدت 5 دقیقه با دستگاه

طراحی آزمایش بر اساس طرح مرکب مرکزی¹ انجام گرفته و نتایج در جدول 2 نشان داده شده است. بر این اساس 30 آزمایش طراحی و آماده شد. بدین ترتیب، در 30 ارلن 250 میلی‌لیتری مطابق داده‌های پیشنهادی، به حجم 100 میلی‌لیتر محیط کشت قرار داده شد که پس از تنظیم pH در سطح 6، استریل شدند. پس از فرایند استریلیزاسیون به هرکدام از ارلن‌ها یک میلی‌لیتر محلول مینرال و نیم میلی‌لیتر محلول ویتامین به ازای یک لیتر محیط کشت اضافه و

سانتریفوژ (Sigma4-16K) و قراردادن در انکوباتور

نتایج و بحث

انجام شد. فرایند کشت هشت روز به طول انجامید. نتایج زیست توده خشک و توزین زیست توده خشک

3 جدول

نتایج زیست توده استحصالی از آزمایش ها در جدول 3 آورده شده است.

جدول 3 نتایج زیست توده حاصل از طراحی آزمایش پاسخ سوپه *Aurantiochytrium sp.shy*

ترتیب آزمایش	گلوکز (g/l)	عصاره گوشت (g/l)	مونوسلیم گلوتامات (g/l)	شوری (g/l)	زیست توده (g/l)
1	80	8	8	35	7/45
2	80	8	8	15	7/53
3	60	6	6	25	7/27
4	40	8	4	35	6/39
5	100	6	6	25	6/86
6	60	6	6	25	7/9
7	40	8	4	15	6/48
8	40	4	4	15	7/42
9	60	10	4	25	6/65
10	40	4	8	15	7/01
11	40	4	8	35	7/39
12	60	6	6	25	7/54
13	60	6	6	45	6/27
14	80	8	4	15	7/29
15	60	6	6	25	7/28
16	80	4	8	35	6/25
17	60	6	2	25	7/09
18	40	8	8	15	6/77
19	60	6	6	5	6/88
20	60	6	6	25	7/42
21	80	4	8	15	6/31
22	60	6	6	25	7/83
23	40	4	4	35	7/21
24	60	2	6	25	6/25
25	60	6	10	25	7/47
26	40	8	8	35	6/84
27	80	8	4	35	7/07
28	20	6	6	25	6/84
29	80	4	4	35	6/41
30	80	4	4	15	6/03

یک نزدیک‌تر باشد، آن مدل تغییرات متغیر وابسته را بهتر نشان می‌دهد. به همین منظور مناسب است که R^2 تنظیم‌شده و R^2 پیش‌بینی‌شده در فاصله معقولی (در حدود 0/2) از یکدیگر قرار داشته باشند. از آنجاکه P دنباله‌ای برای مدل درجه دوم کمتر از 0/05، p عدم برازش بیش از 0/1 و اختلاف R^2 تنظیم شده و R^2 پیش‌بینی‌شده کمتر از 0/2 است، برای تحلیل میزان زیست توده، مدل درجه دوم انتخاب می‌شود. با استفاده از تحلیل واریانس و نیز بررسی تبعیت مانده‌ها از توزیع نرمال، اعتبار مدل تأیید شد.

جدول 4 اطلاعات لازم را برای انتخاب مدل نشان می‌دهد. در مدل‌سازی به روش پاسخ سطح، اولین قدم، انتخاب یک چندجمله‌ای با ضرایب مجهول است که باید به بهترین نحو بر نقاط به‌دست‌آمده از مشاهدات منطبق شود. هراندازه که p عدم برازش بیشتر باشد، نشان می‌دهد که مدل مورد بررسی، برازش بهتری بر داده‌ها دارد. مدلی که برای آن $P > 0/1$ باشد مقبول است و مدلی که بیشترین مقدار p را داشته باشد به‌عنوان مدل مناسب در این بخش پیشنهاد می‌شود. هراندازه ضریب R^2 برای مدلی به

جدول 4 میزان پارامترهای مؤثر در انتخاب مدل مناسب برای سویه *Aurantiochytrium sp.shy*

مدل	p-value ای دنباله	p-value عدم برازش	R^2	R^2 شده تنظیم	R^2 شده‌بینی پیش	
خطی	0/7307	0/0511	0/0751	-0/0729	-0/3008	
خطی با برهمکنش	0/0523	0/0927	0/4916	0/2240	0/1222	
مربعی	< 0/0001	0/8619	0/9068	0/8198	0/6730	شودپیشنهاد می
مکعبی	0/8314	0/5952	0/9402	0/7523	- 0/6833	

همچنین اگر p متناظر با هر یک از عبارت‌های مدل کمتر از 0/05 باشد، آن عبارت بر مدل تأثیرگذار است و برعکس اگر بالاتر از 0/05 باشد میزان تأثیر گذاری آن کم است. با توجه به جدول 4، عصاره گوشت در مقایسه با متغیرهای دیگر تأثیر بیشتری در نتایج آزمایش‌ها دارد. همچنین با توجه به اینکه p متناظر با AB بسیار کم است ($P < 0/0001$) تأثیر هم‌زمان عصاره گوشت و گلوکز چشمگیر است (اثر متقابل زیادی بر هم دارند)، بنابراین بررسی مستقل تأثیر این دو متغیر امکان‌پذیر نیست.

به‌منظور تعیین اثر هر متغیر و همچنین اثر متقابل متغیرها بر میزان زیست‌توده، از تحلیل واریانس استفاده می‌شود. جدول 5 تحلیل واریانس برای مدل مربوط به زیست‌توده با منبع کربنی گلوکز را نشان می‌دهد. در این جدول فرض صفر این است که متغیرهایی که در ستون منبع آورده شده‌اند تأثیر معناداری بر مدل ندارند. بر اساس این جدول (0/05) $P < p$ ، فرض صفر در نظر گرفته نمی‌شود. P متناظر با عدم برازش داده‌ها تا حد مقبول نزدیک به یک است. به عبارت دیگر، خطای مدل در پیش‌بینی پاسخ، در مقایسه با خطای موجود در آزمایش‌ها پذیرفتنی‌ست.

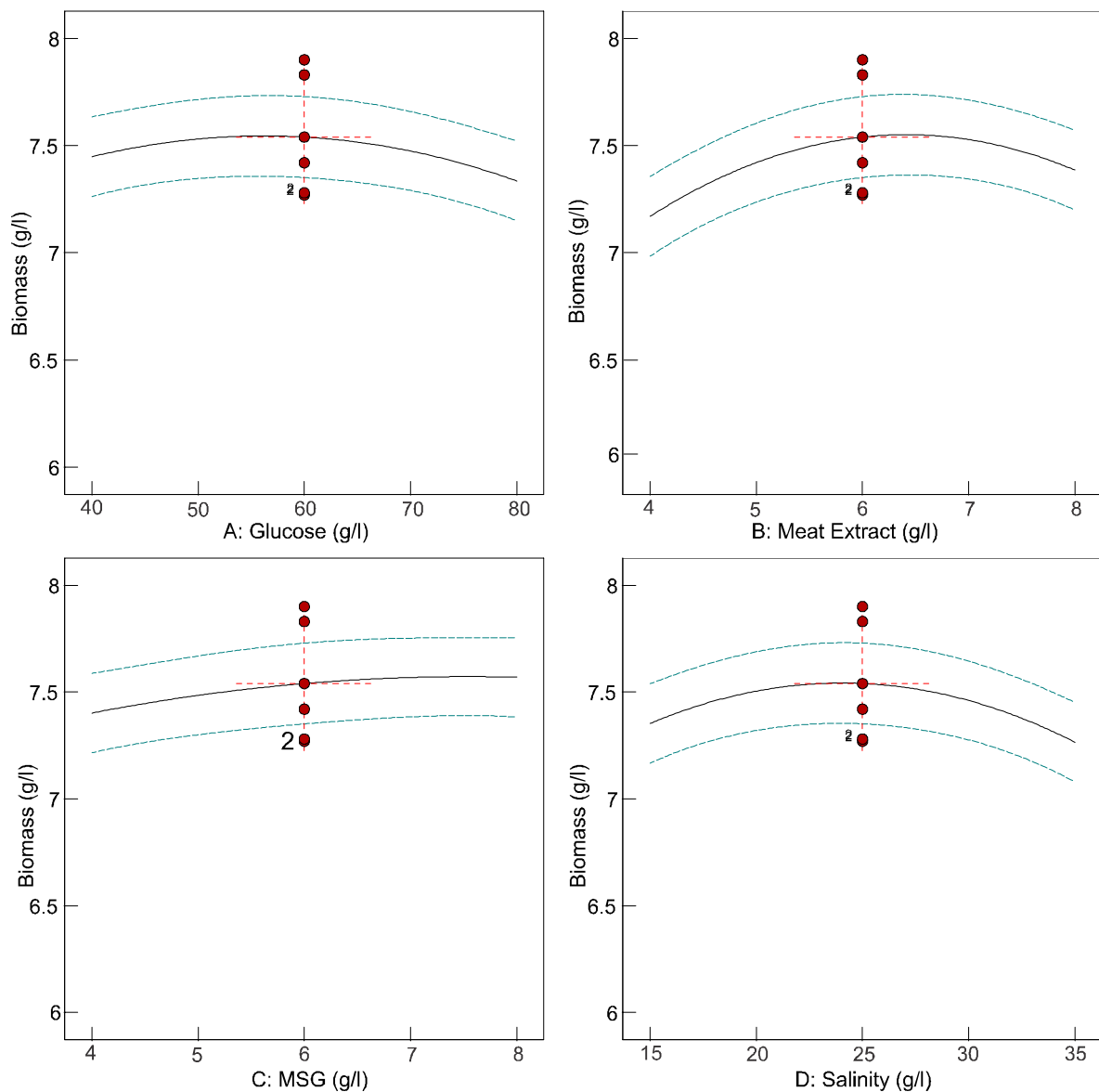
جدول 5 تحلیل واریانس تولید نتایج زیست توده سویه *Aurantiochytrium sp. shy*

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F value	p-value	
مدل	6/88	14	0/49	10/42	< 0/0001	
A- Glucose	0/076	1	0/076	1/61	0/2237	
B-Meat Extract	0/28	1	0/28	5/93	0/0279	
C-MSG	0/17	1	0/17	3/57	0/0783	
D-Salinity	0/046	1	0/046	0/97	0/3392	
AB	2/97	1	2/97	62/94	<0/0001	
AC	3/306E-003	1	3.306E-003	0/07	0/7947	
AD	1.056E-003	1	1.056E-003	0/022	0/883	
BC	0/14	1	0/14	2/86	0/1112	
BD	0/041	1	0/041	0/87	0/3658	
CD	0/013	1	0/013	0/27	0/6119	
A ²	0/60	1	0/60	12/78	0/0028	
B ²	1/88	1	1/88	39/93	< 0/0001	
C ²	0/081	1	0/081	1/73	0/2086	
D ²	1/46	1	1/46	30/97	0/0001 <	
مانده	0/71	15	0/047			
عدم برازش	0/34	10	0/034	0/46	0/8619	مهم نیست
خطای مطلق	6/88			10/42		
جمع	0/076					

بر مبنای تحلیل‌های پیشین و با استفاده از رگرسیون، زیست توده می‌شود. در این رابطه M بیانگر میزان به منظور تعیین تأثیر غلظت‌های گلوکز، عصاره گوشت، مونسدیم گلوتامات و شوری بر میزان زیست توده، رابطه زیست توده است و تمامی کمیت‌ها بر حسب گرم بر لیتر بیان شده‌اند.

$$M = 6.22 - 0.024A + 0.119B + 0.0108C + 0.120D + 0.011AB + 3.59 \times 10^{-4}AC - 4.060 \times 10^{-5}AD + 0.023BC - 2.53 \times 10^{-3}BD + 1.406 \times 10^{-3}CD - 3.706 \times 10^{-4}A^2 - 0.065B^2 - 0.014C^2 - 2.30 \times 10^{-3}D^2$$

تأثیرگذاری هریک از متغیرها بر میزان زیست توده همچنین نشان می‌دهد که افزایش مونسدیم گلوتامات تولیدی دارای الگوی خاصی است. شکل 1 تأثیر هر متغیر همواره باعث افزایش زیست توده می‌شود، اما افزایش بر میزان زیست توده را نشان می‌دهد. عصاره گوشت در مقایسه با متغیرهای دیگر تأثیر بیشتری در نتایج دارد. عوامل دیگر تا نزدیکی مرکز بازه تغییرات، موجب افزایش زیست توده و سپس کاهش آن می‌شود.



شکل 1 اثر تغییرات غلظت گلوکز، عصاره گوشت، مونوسدیم گلوتمات و شوری بر میزان زیست‌توده. سویه *Aurantiochytrium sp. shy*

مقدار گلوکز بر رشد زیست‌توده کاملاً به مقدار عصاره گوشت بستگی دارد و برای بهره‌مندی از حداکثر تأثیر افزایش گلوکز بر رشد زیست‌توده، لازم است مقدار بهینه عصاره گوشت تعیین شود. چنین رفتاری را می‌توان به نسبت بهینه کربن به نیتروژن برای رشد زیست‌توده مرتبط دانست. در این پژوهش همواره بیشترین میزان زیست‌توده زمانی به دست آمد که نسبت C/N برابر 5 باشد. در پژوهش مشابه نیز نسبت مناسب C/N برابر با 5 گزارش شده است [16].

تأثیر متقابل عصاره گوشت و گلوکز از عوامل دیگر بیشتر است ($P < 0/0001$) و این دو عامل با یکدیگر تداخل دارند. شکل‌های 2 و 3 تأثیر هم‌زمان گلوکز و عصاره گوشت بر میزان زیست‌توده را نشان می‌دهد. از این نمودار می‌توان چنین نتیجه گرفت که اگر غلظت عصاره گوشت کافی باشد، افزایش گلوکز سبب افزایش زیست‌توده می‌شود و اگر غلظت عصاره گوشت کم باشد افزایش غلظت گلوکز نه‌تنها موجب افزایش زیست‌توده نمی‌شود بلکه مقدار آن را کاهش می‌دهد؛ یعنی تأثیر

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Biomass (g/l)

● Design Points

— 95% CI Bands

X1 = A: Glucose

X2 = B: Meat Extract

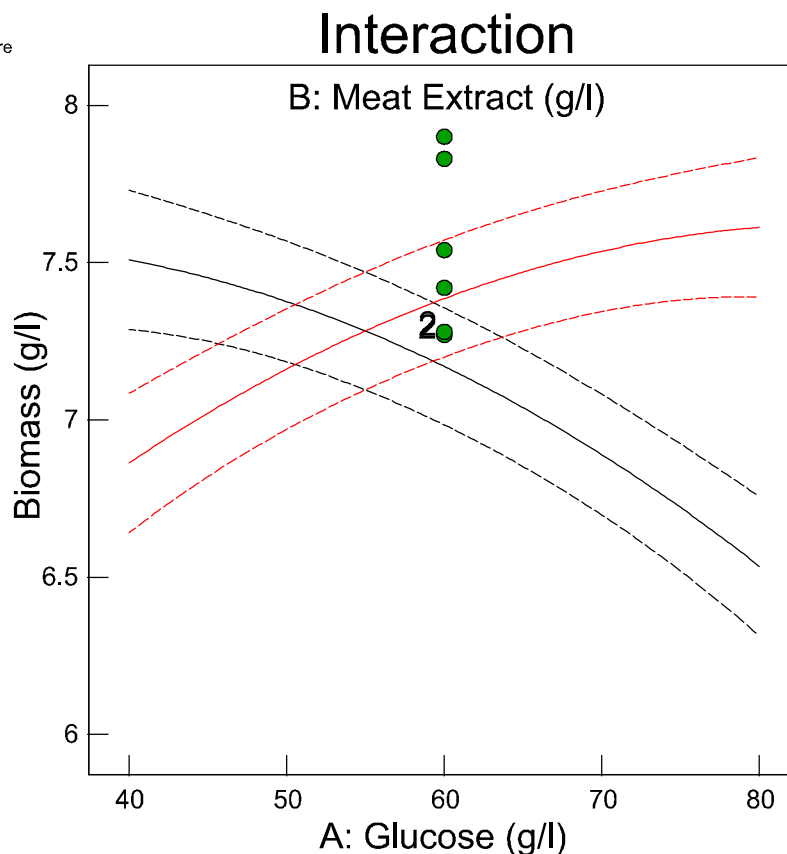
Actual Factors

C: MSG = 6

D: Salinity = 25

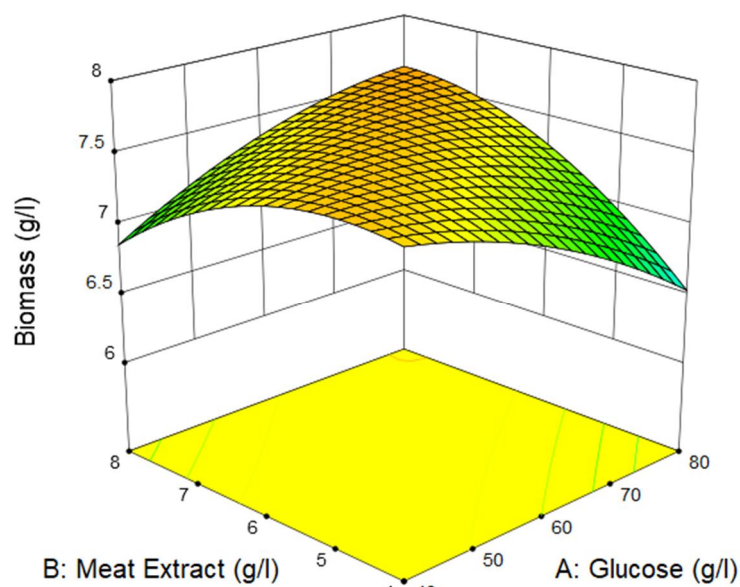
B- 4

B+ 8

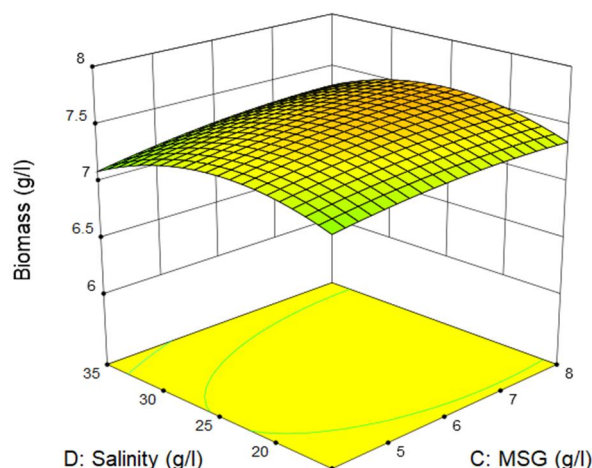


شکل 2 اثر متقابل گلوکز و عصاره گوشت بر میزان زیست توده سویه *Aurantiochytrium sp.shy*

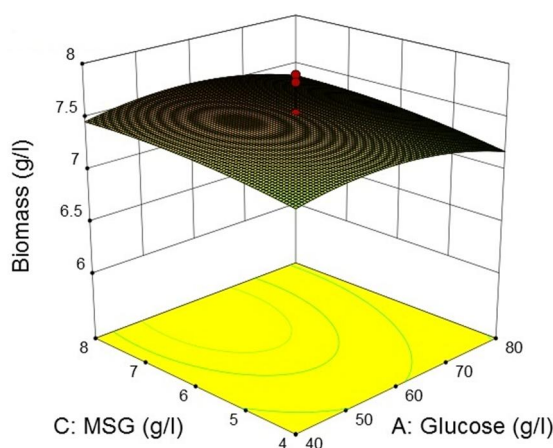
شکل های 4 و 5 تغییرات میزان زیست توده بر حسب تغییرات دو عامل از عوامل گلوکز، عصاره گوشت، مونوسدیم گلوتمات و نمک دریا را نشان می دهند.



شکل 3 تأثیر متقابل گلوکز و عصاره بر تولید زیست توده سویه *Aurantiochytrium sp.shy*



شکل 4 تأثیر متقابل عصاره گوشت و نمک دریا بر زیست‌توده سویه *Aurantiochytrium sp.shy*



شکل 5 تأثیر متقابل گلوکز و مونوسدیم گلوتامات بر زیست‌توده سویه *Aurantiochytrium sp.shy*

شوری بالا بهترین عملکرد را از خود نشان می‌دهند [17]. با توجه به عملکرد مشاهده‌شده، سویه مورد مطالعه خاصیت هالوفیلیک متوسط دارد. شکل 5 نشان می‌دهد در مقادیر میانی گلوکز با افزایش غلظت مونوسدیم گلوتامات میزان زیست‌توده تغییر چندانی ندارد و در حداکثر مقدار خود است. در تأیید این نتیجه می‌توان به سویه *Schizochytrium sp. SW1* در بررسی هم‌زمان گلوکز و مونوسدیم گلوتامات اشاره کرد، بدین صورت که مقادیر بالای آنها میزان زیست‌توده مناسبی تولید نمی‌کنند [18].

نتایج پژوهش مؤید آن است که در صورت بهینه‌سازی شرایط تغذیه‌ای و محیطی ریزجلبک *Aurantiochytrium*

شکل 4 نشان می‌دهد که بیشترین مقدار زیست‌توده در شرایطی تولید می‌شود که هر دو عامل در مقادیر میانی خود باشند. افزایش غلظت نمک دریا به تنهایی سبب افزایش مقدار زیست‌توده می‌شود و این تا زمانی ادامه دارد که موجب فشار اسمزی بالا در محیط کشت نشود. مقدار فشار اسمزی بالا سبب پارگی دیواره سلولی می‌شود که البته این میزان به نوع سویه و محل زیست آن بستگی دارد. مناطق ساحلی مانگرووی حالت شوری متوسط دارند پس ریزجلبک‌های ساکن این مناطق در شوری متوسط بهترین عملکرد را دارند. درحالی‌که سویه‌های ساکن آبهای شور مانند *Schizochytrium sp.SW1* خاصیت هالوفیلیک بالایی دارند و در مقادیر

photobioreactor. Chemical engineering & technology. **30**(8): 1094-1099.

7. Fekrat, F. and S. Shakeri, (2015), *Investigation and production of omega 3 oil rich in docosahexaenoic acid by native strain of Aurantiochytrium TA4*. Biological Journal of Microorganism. **4**(14): 9-24.

8. Standbury P.F., W., A., Hall.S.J., (1986), *Media For Industrial Fermentation - Principles of Fermentation Technology*. Pergamon -Oxford

9. Ren, L.-J., Li, J., Hu, Y.-W., Ji, X.-J., Huang, H., (2013), *Utilization of cane molasses for docosahexaenoic acid production by Schizochytrium sp. CCTCC M209059*. Korean Journal of Chemical Engineering. **30**(4): 787-789.

10. Yamasaki, T., Aki, T., Shinozaki, M., Taguchi, M., Kawamoto, S., Ono, K., (2006), *Utilization of Shochu distillery wastewater for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls using thraustochytrid*. Journal of bioscience and bioengineering. **102**(4): 323-327.

11. Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C., Chen, S., (2007), *A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation*. Process Biochemistry, **42**(11): 1537-1545.

12. Aasen, I. M., Ertesvåg, H., Heggeset, T. M. B., Liu, B., Brautaset, T., Vadstein, O., Ellingsen, T. E., (2016), *Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalene, and carotenoids*. Applied microbiology and biotechnology. **100**(10): 4309-4321.

13. Sijtsma, L. and M. De Swaaf, (2004), *Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid*. Applied Microbiology and Biotechnology. **64**(2): 146-153.

14. Pahlavan yali, M., Jalili, H., Noroozi, M., Moradi, Y., Saba, F., (2017), *optimization of culture condition for Growth of the Aurantiochytrium sp.shy Isolated from persian Gulf*. Proceeding of 2thInternational and

sp. shy امکان تولید صنعتی این سویه به منظور تولید متابولیت‌های کاربردی آن امکان‌پذیر است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از کارکنان آزمایشگاه جلبک مرکز ذخایر زیستی ایران و دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران برای انجام‌دادن این پژوهش تشکر و قدردانی کنند.

منابع

1. Kim, S.-K., (2015), *Springer handbook of marine biotechnology*. Springer.
2. Perez-Garcia, O. and Y. Bashan, (2015), *Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: from metabolic routes to techno-economics*, in *Algal biorefineries*. Springer. 61-131.
3. Chen, F., Y. Zhang, and S. Guo, (1996), *Growth and phycocyanin formation of Spirulina platensis in photoheterotrophic culture*. Biotechnology letters. **18**(5): 603-608.
4. Borowitzka, M.A., (1999) *Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters*, in *Progress in industrial microbiology*. Elsevier. 313-321.
5. Yokoyama, R. and D. Honda, (2007), *Taxonomic rearrangement of the genus Schizochytrium sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for Schizochytrium and erection of Aurantiochytrium and Oblongichytrium gen. nov.* Mycoscience, **48**(4): 199.
6. Fan, L. H., Zhang, Y. T., Cheng, L. H., Zhang, L., Tang, D. S. Chen, H. L. (2007), *Optimization of carbon dioxide fixation by Chlorella vulgaris cultivated in a membrane-*

Applied Biochemistry and Biotechnology. **177**(6): 1229-1240.

17. Chaung, K.-C., Chu, C.-Y., Su, Y.-M., Chen, Y.-M., (2012), *Effect of culture conditions on growth, lipid content, and fatty acid composition of Aurantiochytrium mangrovei strain BL10*. AMB Express. **2**(1): p. 42.

18. Manikan, V., Kalil, M. S., Isa, M. H. M., Hamid, A. A., (2014), *Improved prediction for medium optimization using factorial screening for docosahexaenoic acid production by Schizochytrium SP. SW1*. American Journal of Applied Sciences. **11**(3): 462-474.

10th national Biotechnology congress of Islamic Republic of Iran August 29-31 2017 Karaj-Iran, p. 78.

15. Hong, D.D., H.T.L. Anh, and N.T.H. Thu, (2011), *STUDY ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HETEROTROPHIC MARINE MICROALGA—SCHIZOCHYTRIUM MANGROVEI PQ6 ISOLATED FROM PHU QUOC ISLAND, KIEN GIANG PROVINCE, VIETNAM*. Journal of Phycology. **47**(4): 944-954.

16. Yu, X.-J., Yu, Z.-Q., Liu, Y.-L., Sun, J., Zheng, J.-Y., Wang, Z., (2015), *Utilization of high-fructose corn syrup for biomass production containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated Aurantiochytrium sp. YLH70*.

Optimization of *Aurantiochytrium* sp.shy Microalgae Culture Medium to Increase Biomass Using Rapid Surface Methodology

Morteza Pahlavanyali¹, Hassan Jalili^{2*}, Mostafa Noroozi³, Yazdan Moradi⁴, Ahmad Hallajisani⁵

1- PhD student, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, North Kargar St., Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Biotechnology Dep. Faculty of Biological sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Seafood Processing & Biotechnological Dep. Iranian Fisheries sciences Research Institute, Tehran, Iran

5- Assistant Professor, Biofuel Research Laboratory, Caspian Faculty of Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Rezvanshahr, Guilan Province, Iran

Received: 2019/1/23

Accepted: 2020/10/27

*Corresponding author: hjalili@ut.ac.ir

P.O.Box: 14395-1561, Postal code: 1417935840

Abstract:

The microalgal strain *Aurantiochytrium* sp. shy contains considerable amounts of poly-unsaturated fatty acids (PUFAs), chiefly docosahexaenoic acid (DHA) with potential pharmaceutical and health-related attributes. Effects of various concentrations of glucose, meat extract, monosodium glutamate and sea salt on the algal biomass and DHA production have been investigated in this study. Maximum algal biomass (7.1 g/l) was obtained when the culture medium contained 60 g/l of glucose, 6 g/l of meat extract, 6 g/l monosodium glutamate and sea salt at 25ppt. Lipid contents of the alga exceeded 30% of its dry cell weight, with palmitic acid and DHA as the most abundant components. When the effect of a single additive was concerned, meat extract was significantly effective, while interaction between meat extract and glucose was the most effective in comparison with other interactions ($P < 0.0001$). According to the results, glucose can assure more algal and fatty acids production when adequate amounts of meat extract exist in the culture medium. Optimal results attained when the ratios of glucose to meat extract and C/N concentrations were 10 and 5, respectively. Due to its remarkable growth rate and the capability to produce substantial quantities of biomass and fatty acids, *Aurantiochytrium* sp.shy was

found to be a major source of the beneficial ingredients, whose productivity can magnify if its culture conditions is optimized using favorable blend of growth-promoting materials.

Keywords: optimization, *Aurantiochytrium* sp., Optimization, Response surface Methodology, Biomass