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

مرتضی پهلوان یلی[1]، حسن جلیلی[2*]، مصطفی نوروزی[3]، یزدان مرادی[4]، احمد حلاجی ثانی[5]

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 الزهرا، ونک، خیابان ونک، تهران، ایران

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

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

دریافت: 1397/11/3 پذیرش:1399/8/6

*نویسنده مسئول:

صندوق پستی 1561- 1439 hjalili@ut.ac.ir

چکیده:

ریزجلبک *Aurantiochytrium* sp. shy حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب چندغیر اشباعی (PUFA)، به‌ویژه اسید دوکوزاهگزانوئیک است و می‌تواند استفادهٔ 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 درنظرداشتن 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 30درصد وزن خشک سلولی است و اسید پالمتیک 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. به‌عبارتی، 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 سطح[1]، ریز جلبک *Aurantiochytrium* sp. shy، عوامل مغذی

1. Rapid Surface Methodology

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.2.7]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

کشت سویه بومی *Aurantiochytrium* sp. shy جداسازی‌شده از جنگل‌های مانگروی 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 مانگروی خلیج فارس (استان بوشهر) نمونه‌برداری و تمام عملیات خالص‌سازی و شناسایی ریختی و مولکولی در مرکزتحقیقات ذخایر زیستی ایران انجام و با شماره KY677759 در پایگاه اطلاعات ژنتیکی NCBI ثبت شد. پروفایل اسیدهای 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 منیزم، 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 (شرکتDD انگلیس).

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

C16:0	EPA	DHA	DPA	اسیدهای چرب غیر اشباع	اسیدهای چرب امگاسه
54/59	1/04	16/77	6/47	26/68	24/6

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	گلوکز
10	2	8	4	g/L	عصاره مخمر
10	2	8	4	g/L	مونوسدیم گلوتامات
45	5	35	15	g/L	نمک دریا

طراحی آزمایش بر اساس طرح مرکب مرکزی[1] انجام گرفته و نتایج در جدول 2 نشان داده شده است. بر این اساس 30 آزمایش طراحی و آماده شد. بدین‌ترتیب، در 30 ارلن 250میلی‌لیتری 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 به نسبت 10درصد حجمی از محیط پیش کشت 24ساعته (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 به‌وسیله سانتریفوژکردن 10 میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سلول با دور 7000rpm به مدت 5 دقیقه با دستگاه

1. Central Composite Design

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.2.7]

سانتریفوژ (Sigma4-16K) و قراردادن در انکوباتور 60°C به مدت 12 ساعت و توزین زیست‌توده خشک انجام شد. فرایند کشت هشت روز به طول انجامید.

نتایج و بحث

نتایج زیست‌توده استحصالی از آزمایش‌ها در جدول 3 آورده شده است.

جدول 3 نتایج زیست‌توده حاصل از طراحی آزمایش پاسخ سطح سویه *Aurantiochytrium* sp.shy

ترتیب آزمایش	گلوکز (g/l)	عصاره گوشت (g/l)	مونوسدیم گلوتامات (g/l)	شوری (g/l)	زیست‌توده (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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.2.7]

بهینه‌سازی محیط کشت ریز جلبک بومی ... ـــــــ

جدول 5 تحلیل واریانس تولید نتایج زیست‌توده 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، به منظور تعیین تأثیر غلظت‌های گلوکز، عصاره گوشت، مونوسدیم گلوتامات و شوری بر میزان زیست‌توده، رابطهٔ زیر پیشنهاد می‌شود. در این رابطه M بیانگر میزان زیست‌توده است و تمامی کمیت‌ها بر حسب گرم بر لیتر بیان شده‌اند..

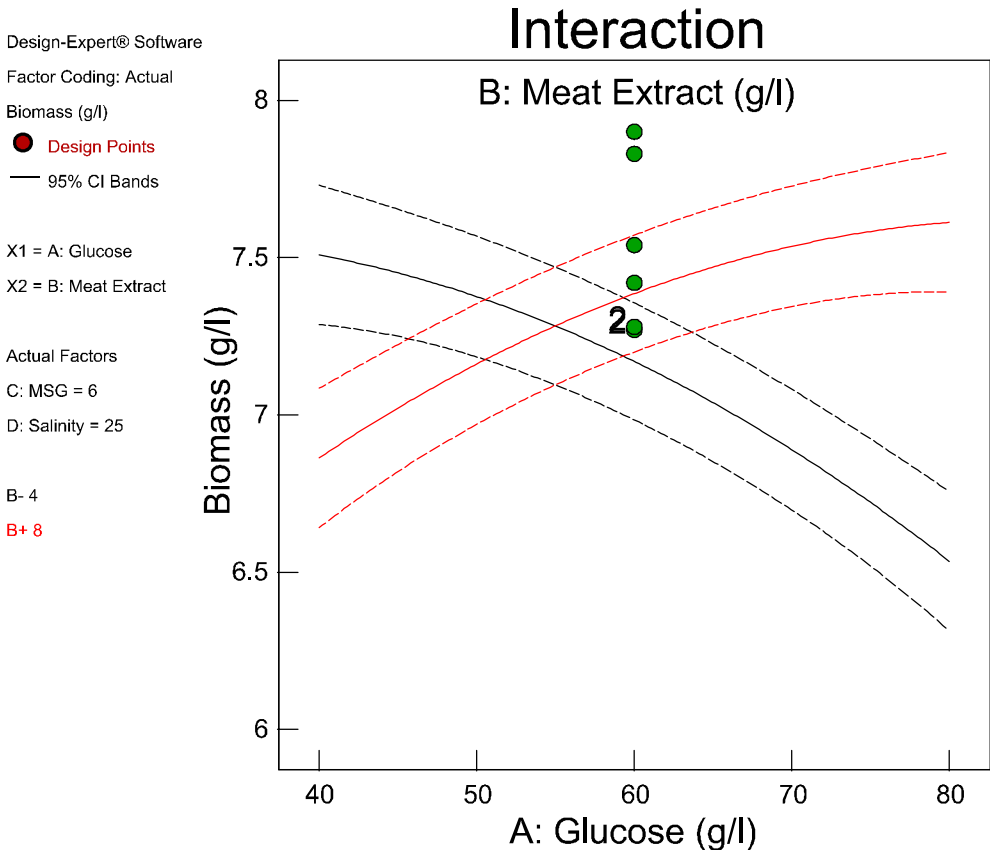
$$M = 6.22 -0.024A + 0.119B + 0.0108C + 0.120D + 0.011AB + 3.59\times10^{-4}AC -4.060\times10^{-5}AD + 0.023BC - 2.53\times10^{-3}BD + 1.406\times10^{-3} CD-3.706\times10^{-4}A^2 - 0.065B^2 -0.014C^2 -2.30\times10^{-3}D^2$$

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-23]

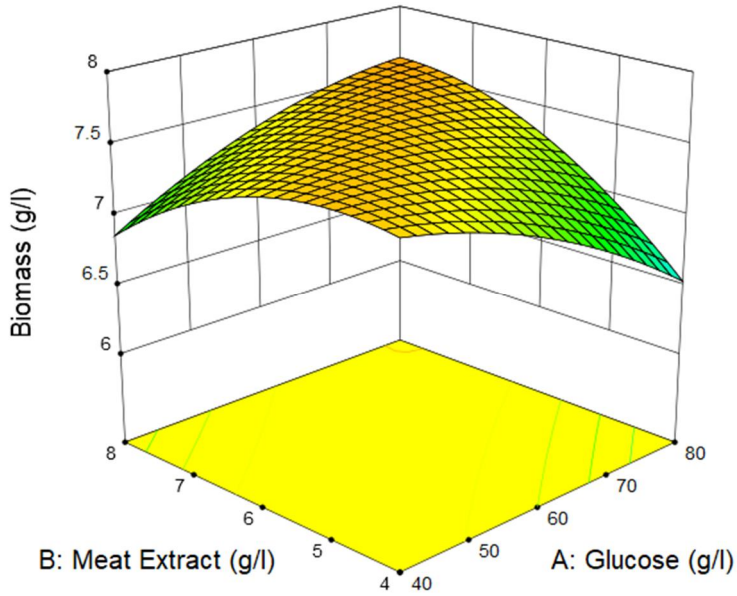
[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.2.7]

بهینه‌سازی محیط کشت ریز جلبک بومی ... ـــــــ



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

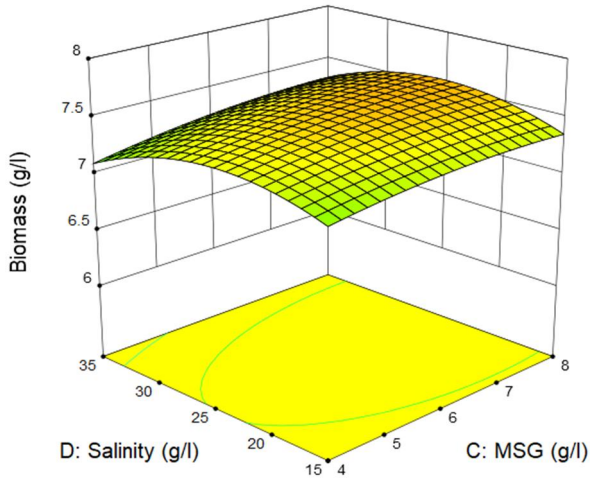
شکل‌های 4 و 5 تغییرات میزان زیست‌توده بر حسب تغییرات دو عامل از عوامل گلوکز، عصاره گوشت، مونوسدیم گلوتامات و نمک دریا را نشان می‌دهند.



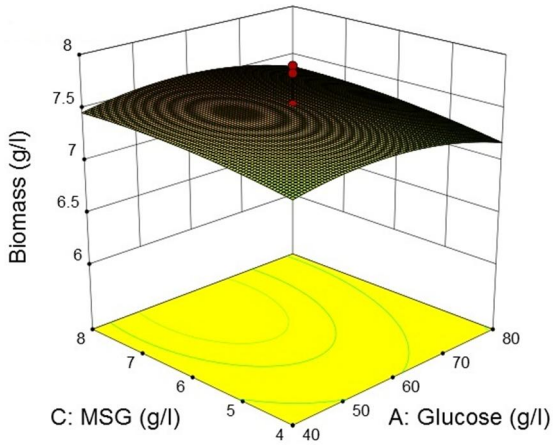
شکل 3 تأثیر متقابل گلوکز و عصاره بر تولید زیست‌توده سویه *Aurantiochytrium* sp.shy

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.2.7]



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



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

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 مانگروی 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 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*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.2.7]

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-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 - Priciples 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 2th International and

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.2.7]

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 Repulic 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, VIETNAM1*. 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.*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.2.7]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

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

Morteza Pahlavanyali[1], Hassan Jalili[2*], Mostafa Noroozi[3], Yazdan Moradi[4], Ahmad Hallajisani[5]

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.2.7]

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.2.7]