ارزیابی توانایی دیاتوم *Thalassiosira weissflogii* در تولید اسید های چرب غیراشباع جهت مصارف پزشکی و خوراک آبزیان

احسان اعتصامی، جواد خنشا، مصطفی نوروزی، محمد علی آموزگار، سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی

خلاصه

دیاتوم ها در دنیای امروز نقش مهمی در تولید صنعتی محصولات ارزشمند زیستی مانند اسید های چرب بخصوص ترکیبات امگا ۳ ایفا می کنند. در این مقاله، سویه *Thalassiosira weissflogii* براساس روش های استاندارد مورفولوژی و ملکولی شناسایی شده است. مشاهده اولیه تولید لیپید و آنالیز پروفایل اسید های چرب در این سویه توسط رنگ آمیزی سودان بلک و دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) انجام شده است. نتایج بدست آمده نشان دهنده میزان کل لیپید به میزان ۳۷٫۸۴ درصد وزن خشک سلول و میزان بالای اسید چرب امگا ۳ (C20:5) به مقدار ۸٫۸ درصد از کل اسید های چرب در مدت ۳۰ روز بوده است. با توجه به نقش ارزشمند تغذیه ای ترکیبات (روغن) امگا ۳ در خوراک آبزیان و سایز مناسب این سویه، می توان از این سویه بعنوان خوراکی مناسب جهت تغذیه لارو میگو، ماهی و منبعی برای تولید امگا ۳ طبیعی نام برد.

کلمات کلیدی: امگا ۳،دیاتوم، خوراک آبزیان، پروفایل اسید چرب

مقدمه

گسترش بازار محصولات حاوی ترکیبات امگا ۳ (EPA-DHA) و تولید اقتصادی این ترکیبات از منابع ریزجلبکی منجر به ایجاد نگاهی ویژه به ریزجلبک ها بعنوان جایگزینی مناسبی برای روغن ماهی و منبعی مناسب جهت استحصال این شده است (میلج، ۲۰۱۱). ارزش جهانی بازار محصولات ریزجلبکی حاوی امگا۳ در سال ۲۰۱٤ برابر با ۳۷۵٫۵ میلیون دلار بوده است که برای آن افزایش دو برابری تا سال ۲۰۱٦ تخمین زده شده بود (شانهان، ۲۰۱۲). تولید لیپید در ریزجلبک ها به منظور ساخت غشای لیپوپروتئینی جهت شناور سازی سلول و ذخیره انرژی بسیار اهمیت دارد (لی و همکاران، ۱۹۸۹). از مهمترین اسید های چرب ترکیبات امگا ۳ (DHA–EPA) می باشند که نقش بسزایی در کاهش بیماری های قلبی-عروقی (ردیگر و همکاران، ۲۰۰۹) ایفا می کنند. این ترکیبات نه تنها باعث غنی تر شدن خوراک آبزیان از نظر تغذیه ای بلکه منجربه ایجاد ارزش افزوده برای محصولات صنعت آبزی پروری خواهد شد.شواهد بسیاری در دست است که نشان دهنده نقش مهم EPA و DHA در عملکرد غشای تیلاکوئیدی وتنظیم سیالیت غشا ریزجلبکها است (بوئلن و همکاران، ۲۰۱۳). بطور کلی، ریزجلبک ها با تغییرات میزان مواد تغذیه ای موجود در آب مانند پدیده شکوفایی جلبکی و همچنین درطی مراحل رشد خود در مرحله سکون(Stationary) اقدام به ذخیره سازی لیپید می کنند(شیفرین و چیزم ،۱۹۸۱ و سولر و همکاران، ۲۰۱۳، آردانز و همکاران، ۲۰۱۷). تولید لیپید بصورت اجسام لیپیدی (Lipid body) در سیتوزول ریزجلبک ها انجام و توسط میکروسکوپ فلورسنت و نوری قابل مشاهده است (پریبیل و همکاران، ۲۰۱۲). امروزه سویه های ریزجلبکی بسیاری جهت تولید صنعتی مواد ارزشمند (High Value Products) درصنایع مختلف نظیر تولید خوراک آبزیان بعنوان خوراک یا مکمل استفاده می شوند. محور اصلی این پژوهش، تحقیق درباره یکی از دیاتوم های ارزشمند در این حوزه سویه *Thalassiosira weissflogii* با توانایی تولید مناسب لیپید حاوی امگا ۳ جهت مصرف در صنایع خوراک آبزیان بوده است.

مواد ها و روش ها:

پس از نمونه برداری از آب با مشخصات جغرافیایی (N: 36-47-25, E: 53-47-52.3)، این سویه توسط روش رقت سازی جدا شد. سپس این دیاتوم در محیط کشت f/2 تحت شرایط دمایی۱±۱۸درجه سانتیگراد و نور ۴۰ ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) در چرخه تاریکی – روشنایی ۱۲:۱۲ در اتاقک رشد انکوبه شد. در ادامه یکی از ۳ تکرار را در سرعت ۳۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از شستسو با آب استریل در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. لام میکروسکوپی این دیاتوم توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BX51, japan) دیده شد وخصوصیات مورفولوژی نمونه با منابع (راند و همکاران، ۱۹۹۰

، هاسل و همکاران،۱۹۹۶ ، جانس و همکاران، ۲۰۰۶) کنترل شد. استخراج DNA نمونه از طریق روش لیو (لیو و همکاران،۲۰۰۰) انجام شد که پس از انجام PCR از طریق روش کوچیلک (کوچیلک، ۲۰۱۳)، نتیجه‌ی توالی یابی با پایگاه اطلاعاتی NCBI کنترل شد.

بررسی تولید لیپید و استخراج لیپید

نمونه دیاتومی تکثیر و تحت شرایط محیطي ذکر شده در ارلن های ۱ لیتری انبوه سازي و به مدت ۳۰ روز در اتاقک رشد نگهداری شد. جهت بررسی تولید اجسام لیپیدی (Lipid body) از روش رنگ آمیزی سودان بلک (تاکور و همکاران،۱۹۸۹) استفاده و توسط میکروسکوپ عکسبرداری شد. در ادامه زیست توده بدست آمده لیوفیلیزه و لیپید آن توسط روش بلای و دایر (بلای و دایر، ۱۹۵۹) استخراج شد. در مرحله ي بعدي پس از ترانس استریفیکاسیون لیپید (روغن) استخراج شده، جهت تعیین پروفایل اسید های چرب سویه از دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) مدل Varian و ستون BPX-70، 0.25µM، 100M، 0.22 MM× و گاز حامل نیتروژن با شدت جریان ml/min استفاده شد. غلظت سلولی این سویه نیز توسط روش شمارش سلولی از طریق لام هماسیتومترانجام شد.

نتایج:

این سویه از طریق تطابق با کلید های شناسایی مورفولوژیکی موجود در منابع ذکر شده و شباهت ۹۹ درصدی با توالیی18S DNA سویه *Thalassiosira weissflogii* با شماره دسترسی GQ281043 در بانک اطلاعاتی NCBI انجام شد. شمارش تعداد سلول ها توسط لام هماسیتومتر نشان داد که این سویه دارای تقریبا ۵ روز مرحله ابتدایی و۷ روز مرحله رشد (exponential) و ۱۳ تا ۱۸ روز مرحله ساکن است (نمودار شماره-۱). اجسام لیپیدی تشکیل شده در مدت زمان ۳۰ روز کشت این سویه توسط روش رنگ آمیزی سودان بلک (تصویر شماره-)۱ نشان داه شده است. نتایج بدست آمده از لیپید استخراج شده ازاین سویه با روش کروماتوگرافی گازی نشان دهنده توانایی تولید لیپید به میزان ۳۷/۸۴ درصد وزن خشک زیست توده و قابلیت تولید میزان ۸/۸ درصد EPA (C20:5) و ۳/۵ درصد DHA (۲۲:۶) را دارد (جدول شماره-۱).

بحث:

محصولات ارزشمند جلبکی نظیر رنگدانه ها، پروتئین، آنتی اکسیدان ها و اسید های چرب سهم بزرگی در بازار جهانی جلبک دارند. کاربرد اسید های چرب از منابع طبیعی مانند ریزجلبک ها در محصولات مختلف همانند مکمل های غذایی، دارویی، نوزادان، غذا و خوراک آبزیان منجر به تمایل بسیاری از شرکت های بزرگ به سرمایه گذاری در این صنعت شده است و طبق گزارشات انتظار نرخ رشدی برابر با ۸ درصد تا پایان سال ۲۰۲۰ در مقیاس CAGR دارند. در ریزجلیکها ترکیبات تری اسیل گلیسرول (TAGs) در اجسام لیپیدی بعنوان مکانیزم دفاعی سلول تحت تغییرات شرایط محیطی از قبیل استرس های مختلف (مانند استرس تغذیه ای) در سیتوزول ذخیره می شوند (شارما و همکاران،۲۰۱۲ ، شومن و همکاران،۲۰۱۲). نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان میدهند که این سویه توانایی تولید میزان ۸/۸ درصد کل اسید های چرب اسید پنتانئوئیک و ۳/۵ درصد اسید ایکوزانئوئیک تحت شرایط ذکر شده به مدت ۳۰ روز را دارا می باشد. لازم به ذکر است که میزان تولید ترکیبات امگا ۳ بدست آمده از این تحقیق نسبت به مطالعات انجام شده (بورگس و همکاران،۲۰۱۱ ،دیپولیتو و همکاران، ۲۰۱۵ ،ایشیدا و همکاران، ۲۰۰۰ ، بولن و همکاران، ۲۰۱۳)، پائینتر بوده است. تجزیه و تحلیل یافته ها نشان داد که تنوع و پروفایل اسیدهاي چرب در *T.weissflogii* می تواند این سویه را بعنوان منبعی منبعی ارزشمند جهت خوراک آبزیان و تولید ترکیبات امگا ۳ طبیعی نام برد (دیپولیتو و همکاران، ۲۰۱۵، گونزالز آرایا و همکاران، ۲۰۱۲). درنتیجه، با توجه به ارزش مواد تغذیه ای و اندازه مناسب، این سویه می تواند بصورت تجاری بصورت خوراک زنده جهت آبزیان (پرورش لارو میگو ، ماهی و پرورش حلزون صدف دار) استفاده شود. لازم به ذکر است که اندازه این سویه به نحوی است که کاندید مناسبی نیز برای مراحل رشد نهایی لارو (advanced larval stages) است. در آخر، پیشنهاد می شود جهت کشت تجاری این سویه در مقیاس صنعتی، تحقیقات گسترده تری جهت بهینه سازی شرایط رشد و افزایش تولید ترکیبات امگا ۳ انجام شود.

منابع:

Milledge, J.J., 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. Rev Environ Sci Bio-Technol, 10: 31–41.

Shanahan, C., 2012. The changing dynamics of the omega3 industry, http://www.naturalproductsinsider.com/articles/2012/09/the-changing-dynamics-of-the-omega-3-industry. aspx.

Lee, J.G., Roberts, S.B. and Morel, F.M.M., 1995. Cadmium: a nutrient for the marine diatom Thalassiosira weissflogii. Limnology and Oceanography, 40(6): 1056-1063.

Shifrin, N.S. and Chisholm, S.W., 1981. PHYTOPLANKTON LIPIDS: INTERSPECIFIC DIFFERENCES AND EFFECTS OF NITRATE, SILICATE AND LIGHT-DARK CYCLES1. Journal of phycology, 17(4), 374-384.

Riediger, N. D., Othman, R. A., Suh, M., & Moghadasian, M. H. (2009). A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. Journal of the American Dietetic Association, 109(4), 668-679.

Chisholm, S. W., Armbrust, E. V., & Olson, R. J. (1986). The individual cell in phytoplankton ecology: cell cycles and applications of flow cytometry. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci, 214, 343-369.

Soler, C., Claquin, P., Goutx, M., Ragueneau, O., & Moriceau, B. (2010). Impact of nutrient starvation on the biochemical composition of the marine diatom Thalassiosira weissflogii: from the whole cell to the frustule fraction. Biogeosciences Discussions, 7(4), 5953-5995.

Araujo, G. S., Matos, L. J., Gonçalves, L. R., Fernandes, F. A., & Farias, W. R. (2011). Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource technology*, 102(8), 5248-5250.

Janse, V. V. S., Taylor, J., Gerber, A., & Van Ginkel, C. (2006). Easy Identification of the Most Common Freshwater Algae. A Guide for the Identification of Microscopic Algae in South African Freshwaters. North-West University, Potchefstroom, South Africa. ISBN 0-621-35471-6.

Round, F. E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1990). Diatoms: biology and morphology of the genera. Cambridge University Press.

Hasle, G. R., Syvertsen, E. E., Steidinger, K. A., Tangen, K., & Tomas, C. R. (1996). Identifying marine diatoms and dinoflagellates. Academic Press.Krammer, K.

Kociolek, P. (2011). *Thalassiosira weissflogii*. In Diatoms of the United States. Retrieved October 07, 2016, from http://westerndiatoms.colorado.edu/taxa/species/thalassiosira_weissflogii.

Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. Journal of Clinical Microbiology, 38(1), 471-471.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J., (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37(8): 911–917.

Schuhmann H., Lim D.K.Y. and Schenk, P.M., (2012). Perspectives on metabolic engineering for increased lipid contents in microalgae. Biofuels, 3, 71–86. 10.4155/bfs.11.147

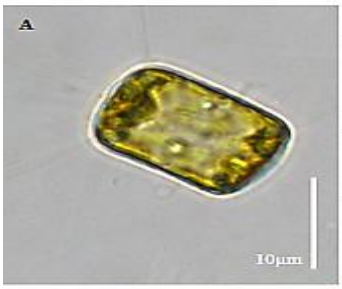
d'Ippolito, G., Sardo, A., Paris, D., Vella, F. M., Adelfi, M. G., Botte, P & Fontana, A., (2015). Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production. Biotechnology for biofuels, 8(1), 1.

Borges, L., Morón-Villarreyes, J.A., D'Oca, M.G.M., & Abreu, P.C., (2011). Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae Nannochloropsis oculata and Thalassiosira weissflogii. Biomass and bioenergy, 35(10), 4449-4454.

Ishida, Y., Hiragushi, N., Kitaguchi, H., Mitsutani, A., Nagai, S. & Yoshimura, M., (2000). A highly CO2-tolerant diatom, Thalassiosira weissflogii H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. Fisheries science, 66(4), 655-659.

Berges, J.A., Charlebois, D.O., Mauzerall, D.C. and Falkowski, P.G., 1996. Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae. Plant Physiology (Rockville), 110(2): 689-696.

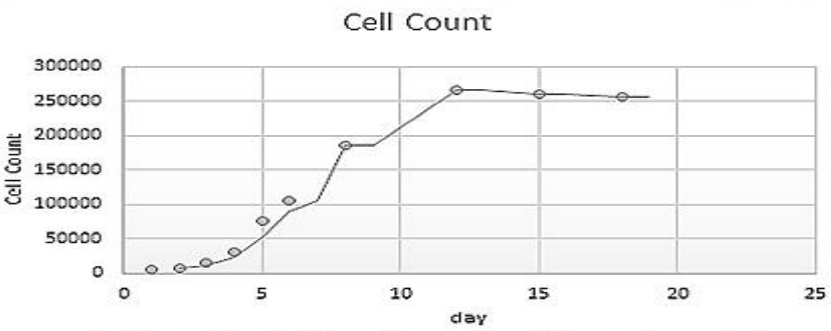
Boelen, P., van Dijk, R., Damsté, J.S.S., Rijpstra, W.I.C. & Buma, A.G., (2013). On the potential application of polar and temperate marine microalgae for EPA and DHA production. AMB Express, 3(1), 1.



Fatty acid	Fatty acids composition of *T.weissflogii* (TFA %)
C14	13.6
C14:1	0.2
C16:0	17.9
C16:1	21.9
C17:0	5.8
C17:1	1.3
C18:0	18.8
C18:1	1
C18:2	0.6
C20:0	0.4
C20:1	0.5
C18:3	3.5
C20:2	0.1
C20:2	0.4
C20:4	0.2
C20:5	8.8
C24:1	0.3
C22:6	3.5

جدول 1- پروفایل اسید های چرب در مدت 30 روز توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی

تصویر1- تصاویر میکروسکوپ نوری و اجسام لیپیدی در رنگ آمیزی سودان بلک



نمودار 1- نمودار رشد سلول بر اساس شمارش سلولی توسط لام هماسیتومتر