بررسی امکان تولید امگا- ۳ توسط ریزجلبک کریپتکودینیوم کوهنی در بیوراکتور ستونی حبابدار

نیلوفر حسینخانی، حسن جلیلی

خلاصه

ریزجلبک‌ها منابع طبیعی برای تولید ترکیبات با ارزشی همچون اسیدهای چرب می‌باشند که در صنایع غذایی و دارویی کاربرد دارند. اسیدهای چرب زنجیره بلند غیر اشباع[۴](PUFA)، نوعی از اسیدهای چرب هستند که به دلیل اهمیت آنها در سلامتی انسان، بسیار پرکاربرد می باشند. ایکوزاپنتنوئیک اسید (EPA C20:5 n-3)، دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA C22:6 n-3) و آراشیدونیک اسید (AA C20:4 n-3) جزء PUFA ها می باشند که در حوزه سلامت حائز اهمیت هستند. ریزجلبک *Crypthecodinium Cohnii* به دلیل توانایی تولید PUFA ها شهرت یافته است. این ریزجلبک یک داینوفلاژلیت هتروتروف و به اصطلاح میکروارگانیسم روغنی[۵]می باشد. DHA در پروفایل اسید چربی این سویه بیشترین درصد (۳۳%) را به خود اختصاص داده است. برای تولید بهینه DHA توسط ریز جلبک *C.Cohnii* در آزمایشگاه و فرمانتورهای صنعتی، شرلیط محیط کشت پارامتری مهم و اساسی است. هوادهی[۶]عاملی مهم و تاثیرگذار بر رشد ریزجلبک *C.Cohnii* می باشد. در گزارش ها آمده است که هوادهی نرخ رشد[۷]سویه را کاهش می دهد و همچنین در فرمانتورهای صنعتی که حجم و چگالی محیط بالاست، انتقال اکسیژن عامل محدود کننده و کاهش دهنده رشد می‌باشد. از طرفی نیز گزارش شده است که اکسیژن اضافی موجود در محیط، عامل محدود کننده رشد نمی باشد. در سال ۱۹۷۳ Beach & Holz اهمیت هوادهی را بیان کردند که ریز جلبک *C.Cohnii* در صورت حضور اکسیژن اضافی در محیط کشت سریعتر رشد میکند و تکثیر می یابد در مقایسه با شرایط کمبود اکسیژن. در فرمانتورهای صنعتی که حجم و چگالی بالاست از همزن های مکانیکی قدرتمند برای همزدن[۸] محیط کشت استفاده می کنند که همچنین موجب بهبود هوادهی و توازن محیط می شود. اما تلاطم و هم زدن مکانیکی اثر منفی بر روی *C.Cohnii* دارد. از آنجایی که *C.Cohnii* دارای حساسیت نیروی برش مُی باشد، بنابراین همزدن و تلاطم اثر مهاری بر رشدش دارد. در تایید این سخن، در سال ۱۹۸۷ Margafel بیان کرد که به طور کلی داینوفلاژلیت‌ها نسبت به نیروی برشی حساس هستند. همچنین Tuttle & Leoblich (۱۹۷۵) و Galleron (۱۹۷۶) نیز بر این نکته تاکید کردند که تلاطم و همزدن مکانیکی اثر منفی بر رشد *C.Cohnii* دارد. از طرفی دیگر گزارش هایی، عدم تاثیرات منفی تلاطم را بر روی رشد *C.Cohnii* بیان کرده اند (Berdalet ۱۹۹۲). همانطور که مشاهده می شود گزارش‌ها و داده‌ها درباره تاثیرات هوادهی و هم زدن بر رشد *C.Cohnii* و به دنبال آن، تولید DHA متفاوت است. این نکته واضح است که برای سلول‌هایی که نسبت به نیروی برشی حساس هستند، فرمانتورهایی که دارای همزن های مکانیکی هستند مناسب نمی‌باشند و در مقابل بیوراکتورهای ستونی حبابدار که در آنها همزن های مکانیکی حذف شده اند، گزینه مناسبی می باشند. گزارش پیش‌رو به منظور کشت ریز جلبک *C.Cohnii* در بیوراکتور ستونی حبابدار طراحی شده است و همچنین تاثیرات سایزهای مختلف حباب‌ها بر روی رشد سلول و تولید DHA بررسی شده است.

مواد و روش ها

کشت اولیه در ارلن مایر: برای تهیه پیش کشت، بعد از تهیه محیط کشت (محیط استاندارد) به مقدار ۲۰۰ میلی لیتر و تنظیم pH (۶-۸) و استریل نمودن آن در دمای ۱۲۱ °C به مدت ۲۰ دقیقه، تلقیح (به میزان ۱۰% حجمی – حجمی) صورت گرفت و محیط کشت در شیکر انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ °C و دور ۱۵۰ rpm و در تاریکی انکوبه شد.

آماده سازی بیوراکتور: محیط کشت داخل بیوراکتور شامل ۲۷ گرم/لیتر گلوکز، ۶ گرم/لیتر عصاره مخمر و ۸۳/۴ گرم/لیتر نمک دریا می باشد که به حجم ۲ لیتر تهیه شد و به داخل بیوراکتور ۵ لیتری،انتقال داده شد. سپس بیوراکتور و محتویات داخل

---

[۴] Poly unsaturated fatty acid
[۵] Oleaginous microorganism
[۶] Aeration
[۷] Growth specific rate
[۸] Agitation
[۹] Shear sensitive

آن استریل شد و سپس تلقیح صورت گرفت. بعد از تلقیح، دمای بیوراکتور در دمای C ۲۸° و pH در محدوده ۰/۳ ± ۶/۵ ثابت نگه داشته شد. تنظیم pH به صورت اتوماتیک توسط NaOH ۲ مولار انجام می‌گرفت. میزان دبی هوای ورودی برابر با ۰/۵ VVM ثابت نگه داشته شد.

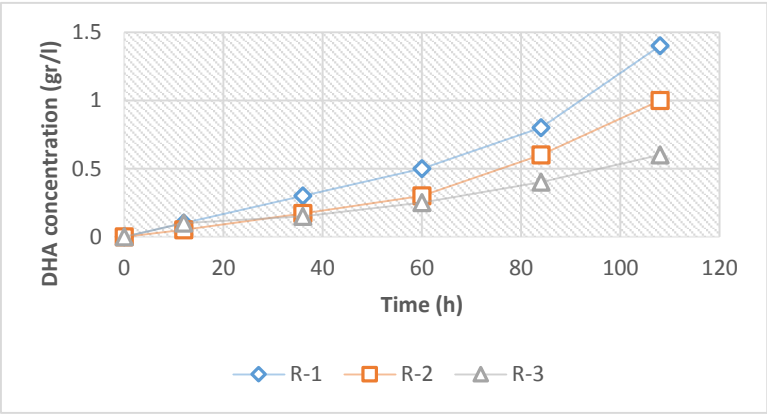
قطر حباب ها: اسپارژرهای مورد استفاده در این آزمایش دارای منافذی به قطرهای ۰/۳۶، ۰/۱۸ و ۰/۰۹ سانتی متر بودند. که به ترتیب R-2 R-1 و R-3 نامگذاری شده اند.

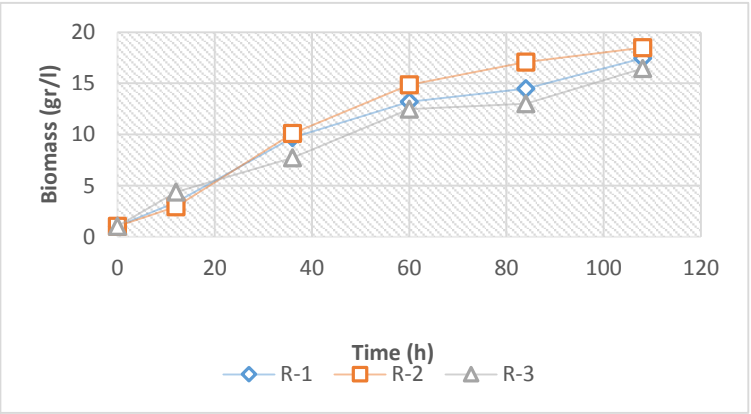
تعیین غلظت زیست توده: نمونه گیری هر ۱۲ ساعت انجام می شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۶۵۰۰ rpm سانتریفیوژ می شدند. سپس محلول رویی و رسوب از یکدیگر جدا، و رسوب باقی مانده، دو بار با آب مقطر شستشو داده شد. بعد از فریزدرایر، نمونه‌ها در فریزر C° ۲۰- نگهداری شدند. برای تعیین غلظت زیست توده، وزن خشک زیست توده، اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل اسید های چرب: این مرحله طبق پروتوکل Trans-methylation method انجام گرفت. (Jiang and Chen 2000)

نتایج

نتایج به دست آمده از میزان زیست توده و DHA تولید شده، در زیر نمایش داده شده است.





بحث

اندازه حباب‌ها، اثر خود را از طریق دو روش، شامل انتقال اکسیژن و اختلال می گذارد. که هر یک از این روش‌ها نقش مهمی در تولید DHA و تشکیل زیست توده دارد. تلاطم بیشتر موجب کاهش تولید زیست توده و DHA می شود (Wong and Yeung's). انتقال اکسیژن اثری مشابه با اختلال دارد (Beach and Holz). نتایج ما مطابق با این گزارش‌ها است که حداکثر میزان تولید زیست توده در R-2 اتفاق افتاده است (هوادهی با حباب هایی به قطر ۰/۱۸ سانتی متر). و بیشترین میزان DHA در R-1 تولید شده است که هوادهی با حباب هایی به قطر ۰/۳۶ سانتی متر انجام شده است.

مراجع

M. E. De Swaaf, "Docosahexaenoic acid production by the marine algae Crypthecodinium cohnii," 2003.

R. Tuttle and A. Loeblich III, "An optimal growth medium for the dinoflagellate Crypthecodinium cohnii," Phycologia, vol. 14, pp. 1-8, 1975.

Hu, W. W.,Gladue, R.,Hansen, J.,Wojnar, C. et al., The sensitivity of the dinoflagellate Crypthecodinium cohnii to transient hydrodynamic forces and cell-bubble interactions. Biotechnol. Prog. 2007, 23, 1355–1362.

Beach DH, Holz GG (1973) Environmental influences on the docosahexaenoate content of the triacylglycerols and phosphatidylcholine of a heterotrophic, marine dinoflagellate, Crypthecodinium cohnii. Biochim Biophys Acta 316:56

W. Barclay, K. Apt, and X. D. Dong, "Commercial production of microalgae via fermentation," Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition, pp. 134-145, 2013