بهینه سازی محیط کشت ریز جلبک بومی *Aurantiochytrium* sp. Shy جهت افزایش زیست توده با استفاده از روش RSM[۱۴]

مرتضی پهلوان یلی، حسن جلیلی، مصطفی نوروزی، یزدان مرادی، سجاد ایمانیان

چکیده

ریز جلبک *Aurantiochytrium* sp.shy اخیراً از آب های جنگل های مانگرو در استان بوشهر جداسازی و خالص سازی گردید. براساس یافته های مورفولوژیکی(سلولهای دو، چهار تایی و رنگ کلونی ها) ، توالی ژن *18srRNA* آن، شباهت بسیار زیادی به جنس *Aurantiochytrium* نشان داد (شماره دسترسی ky677759). در این پژوهش برای به حداکثر رساندن زیست توده از گلوکز، عصاره گوشت، مونوسدیم گلوتامات (MSG) و شوری به روش RSMمورد بررسی قرار داده شد. نتایج آزمایشات نشان داد در شرایط بهینه غلظت گلوکز 60g/L، Meat Extract به میزان 6g/L ،مونوسدیم گلوتامات 6g/L و شوری 25ppt بیشترین زیست توده به میزان7.1g/L بدست آمد.آنالیز سویه نشان داد میزان چربی بالاتر از ۳۰ درصد وزن خشک زیست توده بوده و دو اسید چرب C_{16} و DHA[۱۵] بیشترین مقدار را تشکیل می دهند. لذا با توجه به رشد هتروتروفیک سریع و پتانسیل بالای این سویه در تولید زیست توده و توانمندی در تولید و ذخیره سازی روغن بالاخص تولید DHA، بنظر می رسد با بهبود فرآیند بهینه سازی عوامل زیستی و مغذی، آن را بعنوان سویه صنعتی معرفی کرد.

کلمات کلیدی:ریز جلبک*Aurantiochytrium* sp. Shy ، بهینه سازی ، زیست توده ، روش پاسخ سطح

مقدمه

ریز جلبک ها، موجودات ریز تک سلولی هستند که به دلیل تنوع تولید محصولات زیستی و زیست فناوری در سالهای اخیر توجه زیادی از پژوهشگران را به خود جلب کرده اند. ریز جلبک ها به سه دسته آتوتروف،[۱۶]میکسوتروف و هتروتروف[۱۸] تقسیم می شوند . معمولا دوره رشد حداکثری ریز جلبک های هتروتروفیک بسیار کوتاهتر از اتوتروف و میکسوتروفی می باشد و این یکی از ویژگی های بسیار خوب این نوع ریزجلبک ها بوده که از نظر زمان، دوره رشد و همچنین اقتصادی بسیارحایز اهمیت است. در ضمن این موجودات تک سلولی توانایی زندگی در آب شور و شیرین را دارند. یکی از سویه های با پتانسیل تولید اسید های چرب از جنس *Aurantiochytrium* بوده که یک پروتیست دریایی بوده و در سالهای اخیر بعنوان ریز جلبک در مقالات متعدد بیان می گردد[۵-۱]. ریز جلبک ها در طی رشد و تکثیر خود، قادر به تولید و ذخیره سازی مواد با ارزشی نظیر اسید های چرب غیر اشباع یک گانه[۱۹]و چندگانه؛[۲۰]انواع اسید های آمینه ضروری، انواع رنگدانه و ... می باشند که سبب شده در صنایع غذایی، خوراک دام، مواد آرایشی، دارویی و ... کاربرد فراوانی پیدا کنند. یکی از ویژگی های آنها، تولید زیست توده در شرایط کنترل شده بوده وهمچنین با بهینه سازی محیط کشت، می توان متابولیت های مورد نظر را با آنها تولید کرد.

سویه های جنس *Aurantiochytrium* sp. که از خانواده تراستوکیتریدها[۲۱] اغلب در محیط های دریایی یافت می شوند[6] رشد هتروتروفیکی بسیار خوبی داشته و سرعت تکثیرشان زیاد است . این میکروارگانیسم ها در مرحله چهارم رشدشان (Stationary Phase) قادر به تولید و ذخیره سازی مقدار زیادی اسید های چرب می باشند که بخش زیادی از آن را DHA تشکیل می دهد. DHA یکی از اسید های چرب ضروری امگاسه بوده که نقش حیاتی در سلامتی انسان در پیشگیری از انواع

---

۱۴ Rapid Surface Methodology
۱۵ Docosahexaenoic acid
۱۶ Autotrophic
۱۷ Mixotrophic
۱۸ Heterotrophic
۱۹ Mono-unsaturated Fatty Acids
۲۰ Poly-unsaturated Fatty Acids
۲۱ Traustochytrids

بیماریهای قلبی، جلوگیری ازانسداد رگهای قلب و فشار خون داشته و همچنین نقش بسیار موثری در رشد نوزادان و عملکرد مثبتی بر سایر بخش های بدن انسان دارد.[۷] منبع سنتی DHA روغن ماهی است ولی بنا به دلایلی از قبیل آلودگی روز افزون دریاها و اقیانوس ها به مواد آلی سمی و فلزات سنگین و انباشته شده آن در بافتهای بدن ماهی، طعم و بوی ناخوشایند ماهی برای بعضی مصرف کنندگان، و همچنین هزینه بالای خالص سازی و جداسازی اسید های چرب امگا سه از روغن ماهی، توجه و جستجو به منابع جدید، سالم تر به منظور جایگزینی از جمله ریز جلبک ها ،معطوف شده است چون که روغن موجودات تک سلولی (SCO)[۲]فاقد مشکلات روغن ماهی است[۸]. سویه ریز جلبک*Aurantiochytrium* sp.TA4 بعنوان یک ریز جلبک بومی هتروتروف، به دلیل تولید و ذخیره DHA مورد توجه قرار گرفته است. این سویه بعد از ۴۸ ساعت ۱/۳۷ گرم بر لیتر زیست توده داده که ۴۶/۶ درصد آن را روغن تشکیل می دهد، در این سویه بررسی های میکروسکوپی فلوروسنت، تری آسیل گلیسرول های ذخیره ای [۹] و در سلول های سویه *Aurantiochytrium mangrovei* mp2 حضور فراوان سلولهای شناور در سطح، پس از سانتریفوژ کردن، بیانگر فراوانی چربی در سلول ها است بالاخص وقتی میزان گلوکز از ۶% به ۱۰% افزایش می یابد [۸] و وجود قطرات چربی بزرگ در سویه *Aurantiochytrium* sp. Sw1 در ۵ روزگی [۱] همگی نشانگر پتانسیل بالای تولید چربی در سویه های زیادی از این جنس است. پژوهش ها نشان می دهد که فاکتور های محیطی و تغذیه ای بر روی میزان و کیفیت زیست توده و لیپید آنها موثر هستند[۱۰] مقدار زیست توده، لیپید تولید شده و ترکیب آنها در واقع نوعی پاسخ به شرایط محیط کشت می باشد[۹]. بهبود فرآیند و کم کردن هزینه، از عوامل کلیدی توسعه بازار روغن تک سلولی ها می باشد. فاکتور های متعددی روی بازده و میزان تولید ریزجلبک ها تاثیرگذار هستند. از طرفی، ممکن است این فاکتور ها بر هم تاثیر متقابل داشته باشند که جهت بهینه سازی فرآیند، روش های طراحی آزمایش لازم و ضروری بنظر می رسند[۱۰] .روش های طراحی آزمایش به دو دسته تقسیم می شوند [۱۱]. در حالت اول همه فاکتور ها موثر در نظر گرفته می شوند(مانند Plackett-Burman). در روش دوم،که تعدادی از مهمترین پارامتر ها در نظر گرفته می شود، روش RSM می باشد [۱۲].یکی از روش های آماری و ریاضی بسیار مهم برای بهینه سازی ، روش پاسخ سطح(RSM) بوده که با طراحی آزمایش و مدل آماری ، با در نظر گرفتن اثر متقابل متغیرها شرایط بهینه را مشخص می کند[۱۳]. هدف از RSM پیدا کردن شرایط بهینه در یک پدیده است. عوامل تغذیه ای موثر شامل غلظت و نوع منبع کربنی، نیتروژنی، فسفر، سیلیکات، ویتامین هاو فلزات سنگین بوده و عوامل محیطی شامل دما، شوری، pH و شدت هم زدن می باشد. بر اساس آزمایش های غربالگری، چهار فاکتور گلوکز، مونوسدیم گلوتامات، عصاره گوشت و شوری محیط به عنوان عواملی که نقش موثری در تولید زیست توده و لیپید توسط سویه *Aurantiochytrium* sp.shy را دارند، تعیین شده اند[۱۴] . در بین منابع کربنی، گلوکز به دلیل ساختار شیمیایی ساده (مونوساکارید) به سادگی توسط ریزجلبک ها مصرف شده و موجب سریعترین رشد می شود[۱۸-۱۵]. اگرچه لازم است در کاربرد های صنعتی از منابع کربنی ارزان قیمت استفاده شود. حضور منبع نیتروژنی در مراحل اولیه رشد، موجب رشد سریعتر ریز جلبک ها می شود.بر اساس پژوهش های انجام شده، استفاده از دو منبع نیتروژنی مونوسدیم گلوتامات و عصاره گوشت موجب تولید زیست توده و DHA بیشتر می گردد(در حال انتشار).اگرچه اثر شوری ۱۰،۳۰،۵۰ گرم بر لیتر بر میزان زیست توده سویه بومی *Aurantiuochytrium* sp.shy در کشت ارلن خیلی شاخص نبوده ولی شوری یکی از عوامل موثر بر انتقال مواد به داخل سلول ها و گسیختگی دیواره می شود[۴]. هدف از این پژوهش ، بهینه سازی محیط کشت سویه بومی ریز جلبک خالص شده از سواحل خلیج فارس با روش پاسخ سطح به منظور دستیابی به بالاترین میزان زیست توده می باشد.

مواد و روش کار

سویه مورد مطالعه از سواحل مانگروی خلیج فارس (استان بوشهر) نمونه برداری شده، پس از خالص سازی و شناسایی مورفولوژی و مولکولی با نام *Aurantiochytrium* sp. Shy و شماره دسترسی (ky677759) ثبت گردید. بر اساس غربالگری متغیر ها، چهار فاکتور گلوکز، Meat Extract، مونو سدیم گلوتامات (MSG) و شوری برای بهینه سازی میزان زیست توده تعیین شدند، مطابق مطالعات انجام شده، مقدار حداکثر و حداقل آنها بر ای چهار فاکتور بالا مانندجدول۱

[۲۲] Single cell oil

تعیین گردید. طراحی آزمایش بر اساس طرح مرکب مرکزی (CCD)[۲۳]انجام شد و نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. روشRSM که به منظور بررسی تاثیر چند متغیر بر یک پدیده بطور همزمان انجام می شود تاثیر متقابل هر یک از متغیر ها بر پدیده مورد نظر را هم مد نظر قرار می دهد.

جدول۱: بیشترین و کمترین میزان متغیر های آزمایش

ردیف	نام متغیر	واحد	مینیمم	ماکزیمم
۱	گلوکز	g/L	20	100
2	Meat Extract	g/L	2	10
3	MSG	g/L	2	10
4	Sea salt	g/L	5	45

به منظور جلوگیری از تاثیر ترتیب آزمایشات در نتایج ، آزمایشات طراحی شده با ترتیب تصادفی(Random) مطابق ستون Runبوده و اندازه گیری پاسخ ها هم به همین ترتیب انجام شده است.

جدول۲:جدول طراحی آزمایش بر اساس طرح مرکب مرکزی برای سویه *Aurantiochytrium* sp. Shy

Run	Space Type	Glucose(g/L)	Meat Extract(g/L)	MSG(g/L)	Salinity(ppt)	Biomass
1	Factorial	80	8	8	35	
2	Factorial	80	8	8	15	
3	Center	60	6	6	25	
4	Factorial	40	8	4	35	
5	Axial	100	6	6	25	
6	Center	60	6	6	25	
7	Factorial	40	8	4	15	
8	Factorial	40	4	4	15	
9	Axial	60	10	6	25	
10	Factorial	40	4	8	15	
11	Factorial	40	4	8	35	
12	Center	60	6	6	25	
13	Axial	60	6	6	45	
14	Factorial	80	8	4	15	
15	Center	60	6	6	25	
16	Factorial	80	4	8	35	
17	Axial	60	6	2	25	
18	Factorial	40	8	8	15	
19	Axial	60	6	6	5	
20	Center	60	6	6	25	

[۲۳] Central Composite Design

21	Factorial	80	4	8	15	
22	Center	60	6	6	25	
23	Factorial	40	4	4	35	
24	Axial	60	2	6	25	
25	Axial	60	6	10	25	
26	Factorial	40	8	8	35	
27	Factorial	80	8	4	35	
28	Axial	20	6	6	25	
29	Factorial	80	4	4	35	
30	Factorial	80	4	4	15	

بر اساس طراحی آزمایش، ۳۰ آزمایش مطابق ستون Run آماده سازی گردید. بدین ترتیب که در ۳۰ ارلن ۲۵۰ میلی لیتری بر اساس داده های پیشنهادی، به حجم۱۰۰ میلی لیتر، محیط کشت درست کرده و پس از تنظیم pH روی عدد ٦ (Metrohm827)، اتوکلاو گردید. پس از استریل شدن به میزان یک میلی لیتر از استوک محلول فلزی و ۰,۵ میلی لیتر استوک ویتامین استریل به ازای یک لیتر محیط کشت به تمامی ارلن ها اضافه کرده و به نسبت ۱۰ درصد حجمی از محیط پیش کشت ٢٤ ساعته به آنها تلقیح گردید وپس از فویل پیچی در شیکر Wisd با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با دور ۱۸۰ rpm قرار داده شدند. مطابق جدول انتخاب مدل مقادیر R^2پیشنهادی و واقعی کمتر از ۰/۲ با هم اختلاف دارند. در ضمن مقدار P-value مربوط به عدم برازش داده ها از سایر مدل های پیشنهادی بیشتر است و همچنین مقدار Sequential p-value کمتر از ۰/۰۵ می باشد و به این معنی است که افزودن عبارت درجه دوم به مدل، باعث بهبود آن می شود. از این رو برای داده های موجود، مدل درجه دوم پیشنهاد می گردد.

جدول۳: داده های مربوط به انتخاب مدل

Source	Sequential p-value	Lack of fit p-value	Adjusted R-squared	Predicted R-squared	
Linear	0.7307	0.0511	-0.0729	-0.3008	
2Fi	0.0523	0.0927	0.2240	0.1222	
Quadratic	<0.0001	0.8619	0.8198	0.6730	Suggested
Cubic	0.8314	0.5952	0.7523	-0.6833	Aliased

نمونه برداری (گرفتن زیست توده) بصورت روزانه در یک ساعت مشخص انجام شده و ۱۰ میلی لیتر در هر بار با سانتریفوژ Sigma4-16k در دور ۷۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و برای خشک کردن در آون Binder ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت، قرار داده شدند. کلیه آزمایشات با هم در یک دوره زمانی ۸ روزه انجام شد. مواد شامل گلوکز(کاسپین ایرانی) ، نمک دریایی (H2Ocean انگلیسی) ، Meat Extract (مرک) KH_2PO_4 (مرک) ، ویتامین Thiamin Hydrochloride ,Biotin و Cyanocobalamin (*Applichem*) ، ترکیب محلول فلزی شامل :$MgSo_4.7H_2o(200)$, $KH_2PO_4(200)$, $NaHCO_3(100)$, $MnCl_2.4H_2o(9)$, $Fecl_3,6H_2o(3)$ $CuSO_4.5H_2O(0.2)$, $CoSO_4,5H_2o$ (0.3) ,$Znso_4,7H_2o(1)$همگی مرک آلمان بوده است.

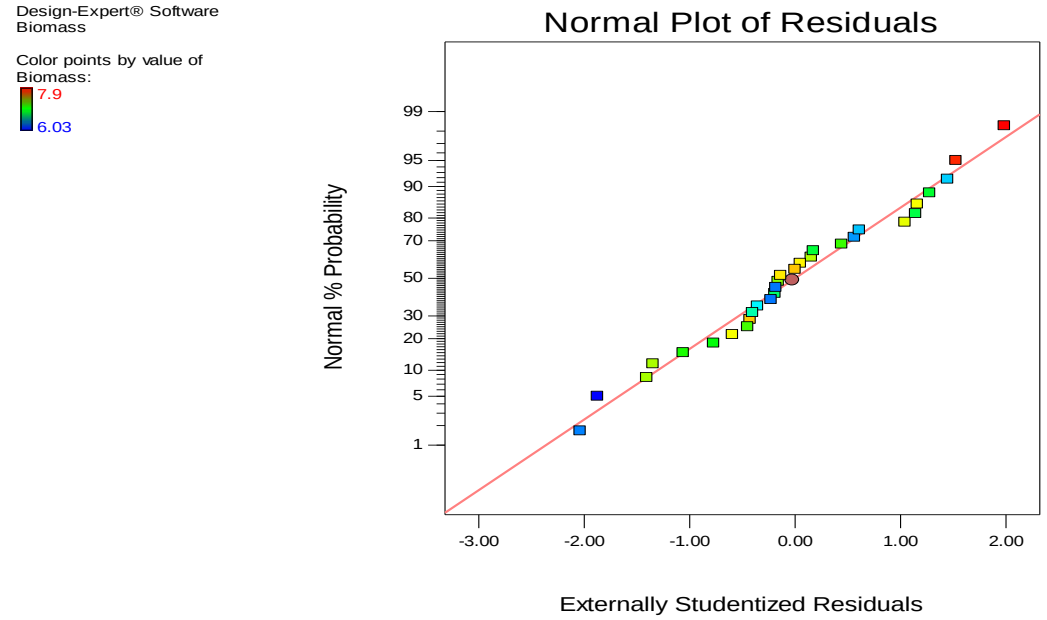
نتایج و آنالیز داده ها

اندازه گیری زیست توده در روزششم نشان داد که تقریبا ۵۷ درصد از ۳۰ ارلن، دارای زیست توده بالای۷ گرم بر لیتر می باشند.مقادیر زیست توده روز ششم کلیه آزمایشات در ستون Biomass وارد شد و داده ها مورد آنالیز قرار گرفت. از طریق

تحلیل واریانس و نیز بررسی تبعیت مانده ها از توزیع نرمال ، اعتبار مدل مورد تایید قرار گرفت. نتایج تحلیل واریانس در جدول ۴ آمده است.مقدار P-value متناظر با مدل کمتر از ۰/۰۵ است ($p<0.05$)بنابراین کفایت داشتن مدل تایید می شود یعنی مدل تغییرات داده ها را تاحد قابل قبول نمایش می دهد. P-value متناظر با عدم برازش بیشتر از ۰/۰۵ و تا حد قابل قبول نزدیک به یک می باشد ($p>0.05$)، بنابراین عدم برازش در مدل وجود ندارد یعنی خطای مدل در پیش بینی پاسخ، در مقایسه با خطای موجود در آزمایش قابل پذیرش است. همچنین اگر P-value متناظر با هریک از عبارت های مدل کمتر از ۰/۰۵ باشد، آن عبارت بر مدل تاثیر گذار بوده و بر عکس، اگر مقدار آن بیشتر باشد تاثیر گذاری در نتایج کمتر است. بر این اساس، مقدار عصاره گوشت (Meat Extract) در مقایسه با سایر عوامل، تاثیر بیشتری در نتایج آزمایش دارد. P-value متناظر با AB بسیار کم است و اثر همزمان گلوکز و عصاره گوشت چشمگیر است، یعنی اثر این دو عامل با هم تداخل دارد، لذا بررسی اثر این دو عامل به صورت مستقل امکان پذیر نیست. بر اساس مدل بالا و نتایج آن، عبارت های D^2 ، B^2 ، A^2 ، AB و B تاثیر مهمی بر مدل دارند. در ضمن با توجه به نزدیکی R^2 به ۱(R-Squared=0.9068) نشانگر دقت آن است. همواره بالاترین زیست توده زمانی که نسبت عصاره گوشت به گلوکز ۱ به ۱۰ باشد ، بدست می آید. شکل های ۱ و ۲نشان می دهند که فرضیات تحلیل واریانس شامل تبعیت مانده از توزیع نرمال و یکسان بودن واریانس ، برقرار است. بنابر این نتایج تحلیل واریانس مبنی بر کفایت مدل و ناچیز بودن عدم برازش ، قابل اطمینان است.

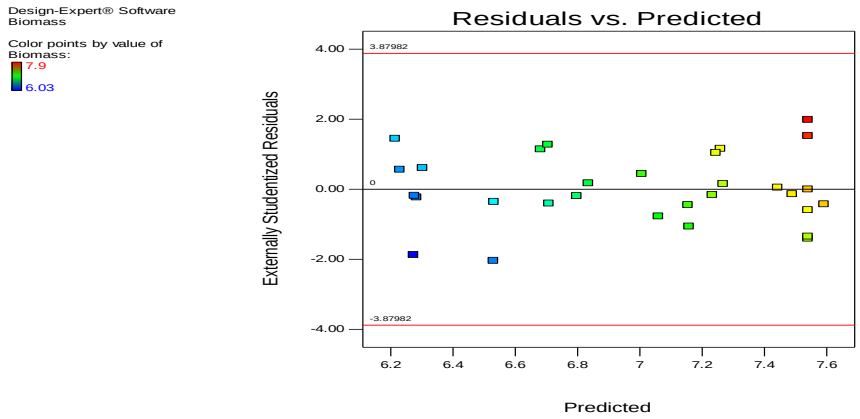
جدول۴:تحلیل واریانس زیست توده حاصل از ۳۰ آزمایش سویه *Aurantiochytrium* sp. Shy

جدول تحلیل واریانس ها						
	Sum of		**Mean**	**F**	**p-value**	
Source	**Squares**	**df**	**Square**	**Value**	**Prob > F**	
Model	6.88	14	0.49	10.42	< 0.0001	significant
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*	*0.070*	*0.7947*	
AD	*1.056E-003*	*1*	*1.056E-003*	*0.022*	*0.8830*	
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*	
Residual	0.71	15	0.047			
Lack of Fit	*0.34*	*10*	*0.034*	*0.46*	*0.8619*	*not significant*



شکل۱: نمودار نرمال مانده ها

بر اساس شکل ۱ مانده ها تقریباً بر روی یک خط راست واقع شده اند بنابر این، فرض تبعیت مانده ها از توزیع نرمال درست است. در شکل ۲ نقاط به صورت تصادفی پراکنده شده اند یعنی الگوی مشخصی در پراکندگی نقاط مشاهده نمی شود بنابر این فرض یکسان بودن واریانس برقرار است.

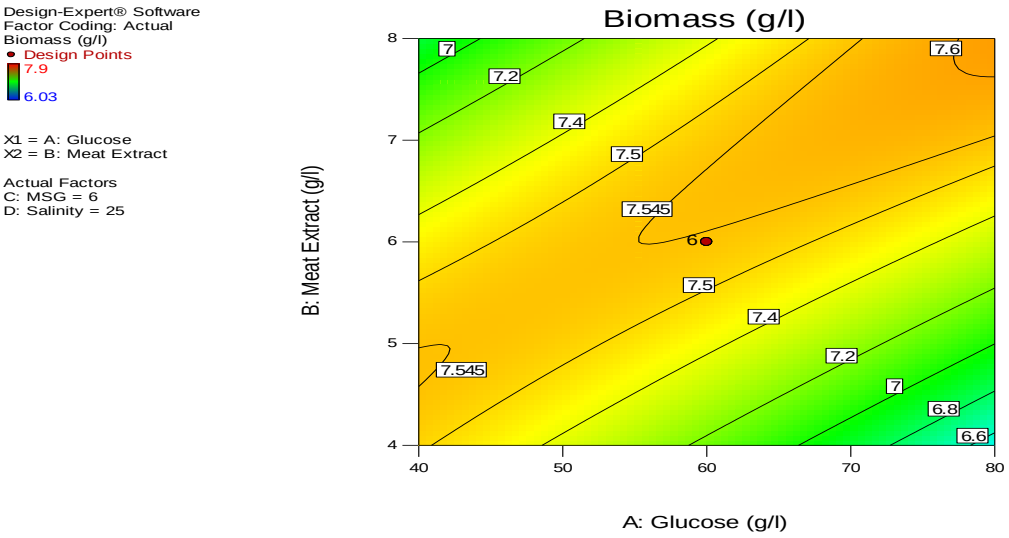


شکل۲: نمودار مانده ها بر حسب مقادیر پیش بینی شده

برای مدل رگرسیونی، تابع چند جمله ای درجه دوم انتخاب شده و این چند جمله ای به داده های مدل برازش گردید بطوریکه اختلاف مربعات مدل با داده ها به کمترین میزان برسد(R^2=0.9068). دراین چند جمله ای A ، B ، C و D به ترتیب

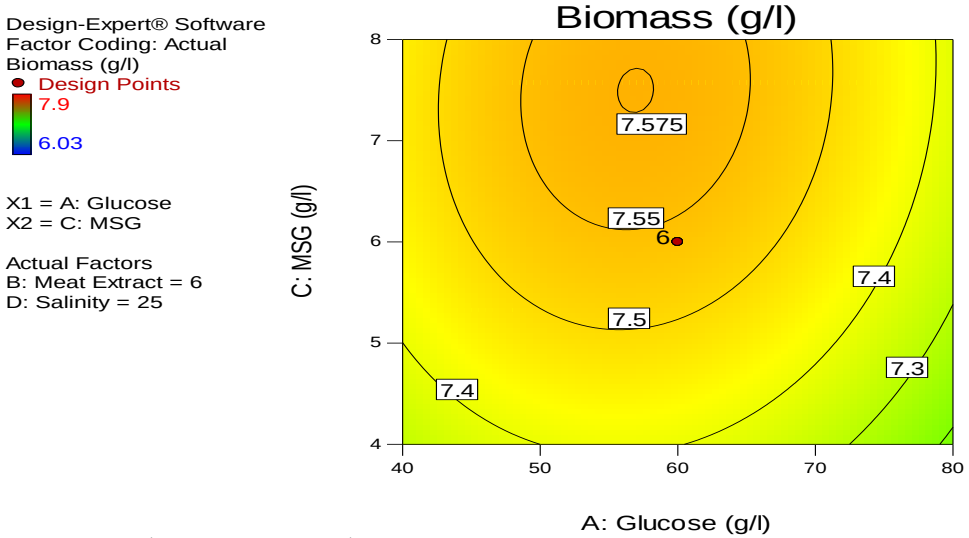
گلوکز ، عصاره گوشت ، مونو سدیم گلوتامات و شوری می باشند که A و B نقش بسیار تعیین کننده ای در میزان زیست توده دارند.

$$Biomass = 7.54 - 0.056\times A + 0.11\times B + 0.084\times C - 0.044\times D + 0.43\times AB + 0.14\times AC - 8.125E\text{-}003\times AD + 0.092\times BC - 0.51\times BD + 0.028\times CD - 0.15\times A^2 - 0.26\times B^2 - 0.054\times C^2 - 0.23\times D^2$$



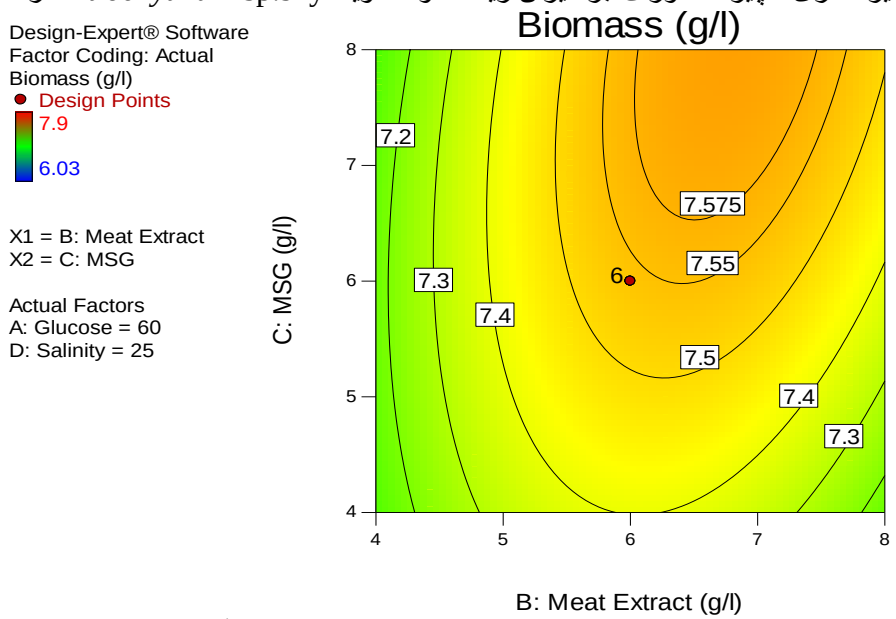
شکل۳: نمودار کانتوری زیست توده بر حسب گلوکز و عصاره گوشت

شکل۳ میزان زیست توده بر حسب گلوکز و عصاره گوشت را نشان می دهد که برچسب های منحنی ها نشانگر میزان زیست توده می باشد. منحنی ها خط های تراز زیست توده هستند.



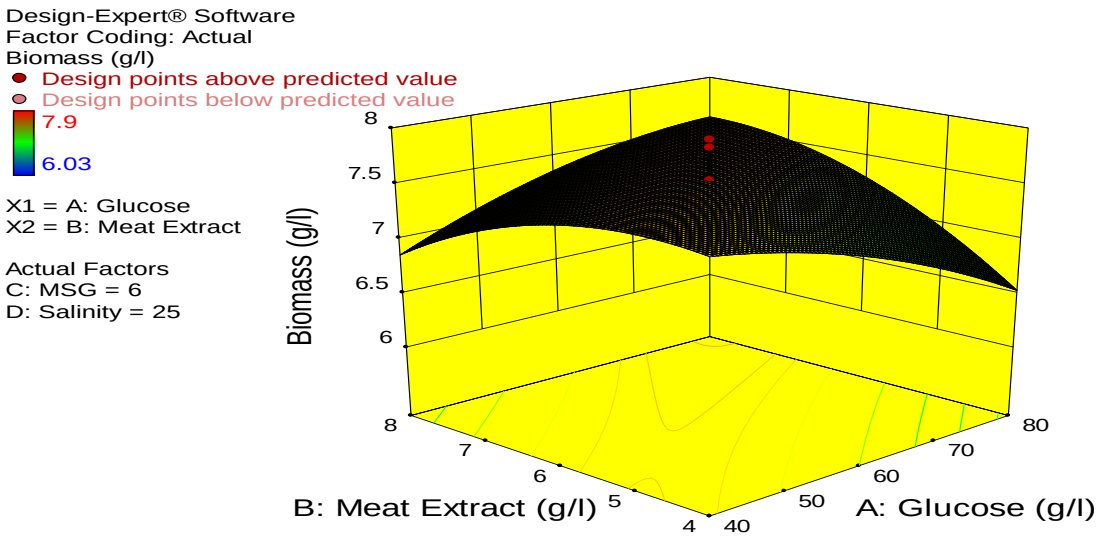
شکل۴: نمودار کانتوری زیست توده با در نظر داشتن گلوکز و مونوسدیم گلوتامات

بر اساس شکل ۴ تاثیر گذاری ناچیز فاکتور C بر میزان زیست توده سویه *Antiochytrium* sp.shy را نشان می دهد.



شکل۵: نمودار کانتوری میزان زیست توده بر اساس دو فاکتور B وC

شکل ۵ میزان زیست توده با لحاظ کردن دو فاکتور عصاره گوشت و مونوسدیم گلوتامات را نشان می دهد و شکل ۶ نمای سه بعدی میزان زیست توده



شکل۶: نمودار سه بعدی میزان زیست توده سویه *Aurantiochytrium* sp.shy بر اساس گلوکز و عصاره گوشت

بحث

توسعه بازار محصولات حاصل از ریز جلبک ها بستگی به کیفیت نهایی و قیمت تمام شده آن ها خواهد داشت[۱۹]. اورانتوچیتریوم ، سویه جدیدی است که توانایی تکثیر سریع و ذخیره سازی بالای اسید های چرب ضروری امگاسه را دارد[۲۰] .تاکنون پژوهش های زیادی برای بهینه سازی میزان تولید زیست توده (عمدتا بر روی نوع و غلظت منابع کربنی و نیتروژنی و شرایط محیطی مانند دما ، شوری و pH) در سویه های اورانتیوچیتریوم ها صورت گرفته است [۲۴-۲۱]. در بیشتر موارد ، تاثیر یک یا دو عامل به تنهایی مورد بررسی قرار گرفته است. در این پژوهش ، اثر ترکیبی دو منبع نیتروژنی عصاره گوشت و مونوسدیم گلوتامات ، غلظت گلوکز و شوری محیط کشت بر روی میزان تولید زیست توده و بر هم کنش بین آنها مورد بررسی قرار گرفته است ، در حالیکه دما ، دورهمزن و pH در مقادیر حاصل از مطالعات قبلی [۲۵]ثابت فرض گردید. نتایج پژوهش نشان داد که مهمترین عامل موثر بر میزان تولید زیست توده ، منبع نیتروژنی عصاره گوشت است. این یافته با نتایج پژوهشگران مطابقت دارد [۲۶]. زیرا نیتروژن برای رشد سریع سلول و تولید زیست توده در مراحل اولیه رشد لازم است ، نیتروژن در اثر فرآیند های متابولیسمی به پروتئین و اسید های نوکلئیک ضروری برای تقسیم سلولی تبدیل می شود و لذا حضور آن ، برای تقسیم سلولی و رسد سریعتر لازم است. همچنین در تحقیق دیگری عصاره گوشت در بین منابع نیتروژنی، بیشترین میزان زیست توده را داده است[۲۵]. یافته دیگر پژوهش این است که اثر همزمان گلوکز و عصاره گوشت از سایر پارامتر ها بیشتر است، تاثیر این دو با هم تداخل داشته و بررسی این دو بصورت مستقل امکان پذیر نیست . گلوکز مونوساکاریدی است که در بین منابع کربنی مختلف، سریعترین رشد مصرف را داشته و بیشترین میزان زیست توده را تولید می کند[۲۷-۲۵]. حضور منابع کربنی در تمام مراحل رشد ، تکثیر و ذخیره سازی چربی برای ریزجلبک ها ضروری است. اما مقدار زیاد غلظت منبع کربنی عامل جلوگیری از رشد سلولی و ذخیره سازی چربی می شود[۲۸] . نتیجه مهم دیگر پژوهش این است که بیشترین میزان زیست توده همواره در شرایطی تولید شده است که نسبت C/N در حدود ۵ باشد ، این یافته با نتیجه تحقیق پژوهشگران دیگر مطابقت دارد[۲۷].

نتایج پژوهش موید آن است که با بهینه سازی شرایط تغذیه ای و محیط کشت ریز جلبک *Aurantiochytrium* sp. SHYمی توان شرایطی را فراهم کرد که امکان تولید صنعتی و افزایش مقیاس وجود داشته باشد.

منابع:

Manikan, V., et al., *A new strain of docosahexaenoic acid producing microalga from Malaysian coastal waters.* Algal Research, 2015. **9**: p. 40-47.

Abad, S. and X. Turon, *Biotechnological Production of Docosahexaenoic Acid Using Aurantiochytrium limacinum: Carbon Sources Comparison And Growth Characterization.* Marine Drugs, 2015. **13**(12): p. 7064.

Gao, M., et al., *Isolation and characterization of Aurantiochytrium species: high docosahexaenoic acid (DHA) production by the newly isolated microalga, Aurantiochytrium sp. SD116.* Journal of Oleo Science, 2013. **62**(3): p. 143-151.

Hong, W.-K., 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): p. 1468-1480.

Yang, H.-L., et al., *Isolation and Characterization of Taiwanese Heterotrophic Microalgae: Screening of Strains for Docosahexaenoic Acid (DHA) Production.* Marine Biotechnology, 2010. **12**(2): p. 173-185.

Raghukumar, S. and K. Schaumann, *An epifluorescence microscopy method for direct detection and enumeration of the fungilike marine protists, the thraustochytrids.* 1993.

Connor, W.E., *Importance of n− 3 fatty acids in health and disease.* The American journal of clinical nutrition, 2000. **71**(1): p. 171S-175S.
Ward, O.P. and A. Singh, *Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production.* Process Biochemistry, 2005. **40**(12): p. 3627-3652.
Shahryar, F.F.a.S., *Investigation and Production of omega3 rich in docosahexaenoic acid by native strain of Aurantiochytrium TA4.* Biological Journal of Microorganism 2015. **4**(14): p. 9-24.
Fan, L.H., et al., *Optimization of carbon dioxide fixation by Chlorella vulgaris cultivated in a membrane-photobioreactor.* Chemical engineering & technology, 2007. **30**(8): p. 1094-1099.
Montgomery, D.C., *Design and analysis of experiments.* 1991.
Standbury P.F., W., A.,Hall.S.J.,, *Media For Industrial Fermentation - Priciples of Fermentation Technology*. 1986: Pergamon -Oxford
Weuster-Botz, D., *Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search?* Journal of bioscience and bioengineering, 2000. **90**(5): p. 473-483.
Manikan, V., et al., *Improved prediction for medium optimization using factorial screening for docosahexaenoic acid production by Schizochytrium SP. SW1.* American Journal of Applied Sciences, 2014. **11**(3): p. 462-474.
Liang, Y., et al., *Use of sweet sorghum juice for lipid production by Schizochytrium limacinum SR21.* Bioresource technology, 2010. **101**(10): p. 3623-3627.
Ren, L.-J., et al., *Utilization of cane molasses for docosahexaenoic acid production by Schizochytrium sp. CCTCC M209059.* Korean Journal of Chemical Engineering, 2013. **30**(4): p. 787-789.
Yamasaki, T., et al., *Utilization of Shochu distillery wastewater for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls using thraustochytrid.* Journal of bioscience and bioengineering, 2006. **102**(4): p. 323-327.
Chi, Z., et al., *A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation.* Process Biochemistry, 2007. **42**(11): p. 1537-1545.
Sijtsma, L. and M. De Swaaf, *Biotechnological production and applications of the ω-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. **64**(2): p. 146-153.
Lewis, T.E., P.D. Nichols, and T.A. McMeekin, *The biotechnological potential of thraustochytrids.* Marine Biotechnology, 1999. **1**(6): p. 580-587.
Bowles, R., et al., *Long-chain n− 3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production.* Journal of Biotechnology, 1999. **70**(1): p. 193-202.
Iida, I., et al., *Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of Thraustochytrium aureum by medium optimization.* Journal of fermentation and bioengineering, 1996. **81**(1): p. 76-78.
Perveen, Z., et al., *Isolation and characterization of a novel thraustochytrid-like microorganism that efficiently produces docosahexaenoic acid.* Biotechnology letters, 2006. **28**(3): p. 197-202.

Zhu, L., M. Zong, and H. Wu, *Efficient lipid production with Trichosporonfermentans and its use for biodiesel preparation.* Bioresource technology, 2008. **99**(16): p. 7881-7885.

morteza, p.y., *optimization of culture condition for Growth of the Aurantiochytrium sp.shy Isolated from persian Gulf.* Proceeding of 2thInternational and 10thnational Biotechnology congress of Islamic Repulic of Iran August 29-31 2017 Karaj-Iran, 2017: p. 78.

Burja, A.M., et al., *Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing Thraustochytrium species: screening of strains and optimization of omega-3 production.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **72**(6): p. 1161.

Yu, X.-J., et al., *Utilization of high-fructose corn syrup for biomass production containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated Aurantiochytrium sp. YLH70.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015. **177**(6): p. 1229-1240.

Zhou, P.P., et al., *Microbial production of docosahexaenoic acid by a low temperature-adaptive strain Thraustochytriidae sp. Z105: screening and optimization.* Journal of basic microbiology, 2010. **50**(4): p. 380-387.