ارزیابی اثر تغییر محیط کشت بر رشد و تولید چربی در ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* به عنوان مکمل چربی در خوراک دام

الهه باقری[۱]، حامد خلیل وندی بهروز یار[۱]، مهدی کاظمی بن چناری[۲]، مهدی دهقان بنادکی[۳]، بهرام محتشمی[۱]، زهرا صالحیان [۱]
۱.گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه ارومیه
۲.گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه اراک
۳.گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه علوم دامی
*مسئول مکاتبات: Email: h.khalilvandi@urmia.ac.ir

چکیده

ازجمله کاربردهای ریز جلبک‌ها می‌توان به استفاده از آن‌ها در صنایع غذایی ، تغذیه ، تولید دارو ، رنگ‌دانه ، مواد شیمیائی و سوخت اشاره نمود. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر پنج نوع محیط کشت در فرایند تولید ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* و مقایسه میزان چربی و بازده تولیدی بود. پنج محیط کشت مورد آزمایش (تیمار یک، محیط کشت پایه (گروه کنترل)؛ تیمار۲، محیط کشت پایه + ۲ گرم بر لیتر گلیسرول؛ تیمار ۳، محیط کشت پایه+ ۲ گرم بر لیتر گلوکز ؛ تیمار ۴، محیط کشت پایه + ۲ گرم گلوکز، ۲گرم بر لیتر گلیسرول و ۰/۵ گرم اوره؛ تیمار ۵، محیط کشت پایه + ۲ گرم بر لیتر گلوکز،۲ گرم بر لیتر گلیسرول و ۱ گرم اوره) در سه تکرار و به مدت ۵ هفته موردمطالعه قرار گرفتند. افزودن گلوکز (تیمار ۳) تأثیر منفی معنی‌داری بر میزان زیست‌توده تر و خشک تولیدی داشت ولی اثر کاهشی بر درصد چربی و میزان چربی و ماده آلی تولیدی معنی‌دار نبود. افزودن هم‌زمان گلوکز و گلیسرول به همراه اوره به‌عنوان منبع نیتروژن (تیمار ۴ و ۵)، میزان زیست‌توده تر و خشک تولیدی را افزایش داد. بااین‌حال، بیشترین درصد چربی و بیشترین میزان چربی تولیدی به ازای هر لیتر محیط کشت متعلق به تیمار ۵ با یک گرم اوره افزوده و بیشترین میزان ماده آلی تولیدی به تیمار ۴ با نیم گرم اوره افزوده تعلق داشت که به دلیل کاهش معنی‌دار در میزان خاکستر ریز جلبک تولیدی به دست آمد.

واژگان کلیدی: ریز جلبک ، *آیزوکرایسیس گالبانا*، مکمل چربی

مقدمه

استفاده از ریز جلبک‌های کامل در خوراک دام مدت‌هاست که موردمطالعه قرارگرفته است و قدمت آن به قبل از سال ۱۹۵۰ برمی‌گردد. مرور منابع جدید نشان می‌دهد که امروزه محققان علاقه‌مند به استفاده از ریز جلبک‌هایی هستند که چربی آن‌ها استخراج‌شده است و از آن‌ها به‌صورت مکمل استفاده می‌شود (Dib et al., 2012; Austic et al., 2013). زیست‌توده بدون چربی گونه‌های ریز جلبک، به‌تازگی از تحقیقات تولید سوخت‌های زیستی حاصل‌شده است به‌عنوان جایگزین ذرت و سویا در جیره‌های خوراک طیور، خوک و گاو استفاده می‌شود. (Isaacs et al., 2011; Lum et al., 2012). پیش‌بینی‌شده است که با افزایش جمعیت جهانی کنونی طی چند دهه آینده افزایش جمعیت جهانی بین ۷ تا بیش از ۹ میلیارد نفر خواهد بود که این امر نیاز فوری به انرژی تجدید پذیر و خوراک‌های جایگزین می‌طلبد. ظاهراً، تخصیص فعلی ذرت و (یا) سویا برای سوخت‌های زیستی و تولیدات حیوانی پایدار نیستند. برای حفظ مواد جایگزین این مواد لازم است یک زیرساخت هماهنگ در بین سوخت، خوراک و صنایع غذایی انجام گیرد (Lum et al. 2012). ریز جلبک‌های دریایی دارای ویژگی‌های جذابی برای تولید سوخت‌های زیستی هستند (Becker, 2004; Kovač et al. 2013). همچنین زیست‌توده ریز جلبکی که چربی آن استخراج‌شده است (حاصل تولید سوخت‌های زیستی) نیز ممکن است یک مکمل مناسب کربن طبیعی به‌عنوان خوراک دام باشد. نکته قابل‌توجه این است که نتایج برخی محققان نشان می‌دهد استفاده از برخی گونه‌های ریز جلبکی به‌عنوان خوراک دام سبب کاهش تولید گازهای گلخانه‌ای شده است (Lum et al. 2012). افزایش جمعیت جهانی منجر به کشف منابع جایگزین انرژی و غذا شده است. زیرا ذرت و سویا محصولات اصلی غذایی برای انسان هستند و استفاده معمول آن به‌عنوان منبع اصلی انرژی و پروتئین جیره خوراک دام‌های تولیدکننده مواد غذایی به‌طور مستقیم با تخصیص آن‌ها

برای مصرف انسان رقابت می‌کنند. اگرچه ریز جلبک‌های پرچرب (دست‌نخورده)[1] منبع اصلی اسیدهای چرب غیراشباع امگا ۳(n-3) ازجمله دکوهگزانوئیک اسید (DHA) است و ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) ، زیست‌توده ریز جلبک بدون چربی هم ممکن است حاوی مقادیر مناسبی از DHA / EPA در تخم‌مرغ، گوشت و شیر باشد (Lum et al. 2013).

ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* در شرایط آزمایشگاهی قابل‌کشت بوده و به‌عنوان یک‌گونه ریز جلبکی دارای بیشترین بازده تولید فتوسنتزی لیپیدها در جهان شناخته می‌شود (Lam and Lee, 2012). مطالعات نشان می‌دهد، غلظت نیتروژن در محیط کشت به‌طور قابل‌توجهی بر سرعت رشد سلول و ترکیبات بیوشیمیایی ریز جلبک‌ها تأثیر گذاشته (vang et al. 2013) و با محدودیت دسترسی به نیتروژن در محیط کشت، سرعت رشد سلولی ریز جلبک‌ها کاهش‌یافته و افزایش میزان چربی یا کربوهیدرات، سنتز پروتئین را کاهش می‌دهد (Hoo et al. 2014). اغلب ریز جلبک‌ها قادر به استفاده از اشکال مختلف نیتروژن، ازجمله اوره، نیترات، نیتریت، آمونیوم و منابع آلی نیتروژن هستند (Beker, 1994). ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* به میزان زیادی به‌منظور تولید اسیدهای چرب و روغن در مزارع کشت می‌شود و جزو آن دسته از آبزیان حاوی مقادیر بالای چربی، محسوب می‌شود (Yongrnanitchai and Ward, 1989). با توجه به اینکه بررسی‌ها نشان می‌دهد ایران در شرایط کم‌آبی و خشک‌سالی قرار دارد و میزان آب‌های شور و خاک‌های شور و بدون استفاده برای کشاورزی در کشور در حال افزایش است و از طرفی تأمین منابع خوراک دام باکیفیت ازنظر چربی و پروتئین از ضروریات صنعت پرورش دام و طیور کشور است بنابراین به نظر می‌رسد باید در کشور ما نیز هم‌راستا با بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته تحقیقات گسترده‌ای در موردبررسی کشت و استفاده از منابع خوراکی جدید مانند ریز جلبک‌ها صورت بگیرد. با توجه به اینکه در ساختار ریز جلبک‌ها مواد مغذی مفیدی همانند اسیدهای چرب غیراشباع وجود دارند که در شرایط رشد مختلف و محیط کشت‌های گوناگون ترکیبات آن‌ها تا حدودی تغییر می‌کند و می‌توان با برخی روش‌ها مقدار آنرا افزایش داد، هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر افزودن مواد مغذی مختلف به ترکیب محیط کشت پایه‌ای مختص رشد ریز جلبک‌ها و بررسی تأثیر آن‌ها بر رشد، تولید زیست‌توده جلبک، میزان چربی تولیدی آن‌ها و در نهایت استفاده از ریزجلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* دارای قابلیت بیشترین مقدار تولید چربی در محیط کشت مناسب به عنوان مکمل چربی در خوراک دام بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در ایستگاه آموزشی و پژوهشی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه در دمای تنظیم‌شده و نور لامپ مهتابی که به‌صورت شبانه‌روز روشن بوده و هوادهی تنظیم‌شده ، با استفاده از ظروف ده لیتری و شوری آب مناسب و با تغذیه هفتگی انجام شد. محیط کشت پایه حاوی $FeCl_3.6H_2O$، $MnCl_2.4H_2O$، H_3Bo_3، EDTA، $NaH_2Po_4.2H_2O$، $NaNO_3$، $ZnCl_2$، $CoCl_2.6H_2O$، $(NH_4)_6Mn_7O_{24}.4H_2O$ ، $CuSO_4.5H_2O$ و ویتامین‌های گروه B بود (Laing and Britain, 1991). ظروف مورداستفاده در ابتدای کار به‌منظور شروع دوره کشت ضدعفونی شدند. برای استریل کردن محیط کشت‌های مایع از دستگاه اتوکلاو در فشار ۱/۶ اتمسفر و دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. فرآیند استریلیزاسیون ابزارآلات آزمایشگاهی شیشه‌ای و فلزی از قبیل پیپت، ارلن و بشر در آون در دمایی ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انجام شد. از اشعه ماوراءبنفش برای استریل کردن محیط آزمایشگاهی و اتاق کشت جلبک استفاده شد. دمای مورداستفاده در فرایند کشت ۲۴/۲ سانتی‌گراد، شوری ۲۴ گرم بر لیتر، شدت نور ۲۵۰۰تا۵۰۰۰ لوکس و pH ۸/۷ –۸/۲ بود. آماده‌سازی پنج محیط کشت مورد آزمایش (تیمار یک، محیط کشت پایه (گروه کنترل)؛ تیمار۲، محیط کشت پایه + ۲ گرم بر لیتر گلیسرول؛ تیمار ۳، محیط کشت پایه+ ۲ گرم بر لیتر گلوکز ؛ تیمار ۴، محیط کشت پایه + ۲ گرم گلوکز، ۲گرم بر لیتر گلیسرول و ۰/۵ گرم اوره؛ تیمار ۵، محیط کشت پایه + ۲ گرم بر لیتر گلوکز،۲ گرم بر لیتر گلیسرول و ۱ گرم اوره) به‌صورت جداگانه با استفاده از آب مقطر استریل شده انجام گرفت. محیط کشت‌ها پس از آماده شدن به‌صورت مجزا به ۱۵ ظرف ۱۰ لیتری (۳ تکرار برای هر تیمار) که حاوی آب دریای مصنوعی (شوری ۲۴) بودند افزوده‌شده و پس از رسیدن جلبک‌ها به رشد لگاریتمی جلبک‌های کشت داده‌شده با استفاده از سیستم سانتریفیوژ برداشت شدند. پس از برداشت زیست‌توده جلبکی، میزان جلبک استحصالی توزین و وزن جلبک تر، میزان ماده خشک، خاکستر، چربی، موردبررسی قرار گرفت. برای تعیین میزان چربی از روش فولچ و حلال متانول و کلروفرم استفاده شد.

نتایج و بحث

1 -Full-fatted (intact)

جدول شماره ۱ نشان‌دهنده نتایج استفاده از محیط‌های کشت تغییریافته بر میزان زیست‌توده تر و خشک استحصالی به ازای هر لیتر محیط کشت و میزان خاکستر و چربی تولیدی است. بر این اساس، تیمارهای ۲، ۴ و ۵ باعث افزایش معنی‌دار میزان استحصال زیست‌توده تر شدند که بیشترین میزان تولید زیست‌توده تر مربوط به تیمار شماره ۵ بود. بااین‌حال، باوجود تأثیر معنی‌دار افزایشی تغییر محیط کشت بر میزان زیست‌توده خشک استحصالی، روند مشابهی بین تأثیر محیط کشت بر زیست‌توده تر و خشک وجود نداشت، به‌طوری‌که بیشترین میزان ماده خشک تولیدی مربوط به تیمار شماره ۴ بود. در بین تیمارهای موجود فقط تیمار شماره ۵، منجر به افزایش معنی‌دار درصد چربی تولیدی در مقایسه با گروه شاهد شد. در ارتباط با میزان چربی تولیدی به ازای هر لیتر محیط کشت مورداستفاده، تیمار ۴ و ۵ منجر به افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شدند و بهترین عملکرد مربوط به تیمار شماره ۵ بود. Piorreck و همکاران (۱۹۸۴) عنوان کرد، میزان چربی تولیدی توسط ریز جلبک‌ها، با نرخ رشد ریز جلبک‌ها حالت معکوس دارد که البته بررسی‌ها نشان می‌دهد این امر با توجه به شرایط مختلف کشت، روش‌های آنالیز، مرحله رشد و حتی تفاوت بین گونه‌ها متفاوت است. بااین‌حال، در این تحقیق، در تیمار ۴ و ۵، هم‌زمان با افزایش نرخ رشد، میزان لیپید تولیدی هم افزایش‌یافته است. افزودن اوره به محیط کشت، سبب افزایش میزان چربی تولیدی به ازای هر لیتر محیط کشت شد. تفاوت معنی‌داری بین تیمار ۴ و ۵ به ترتیب با ۰/۵ و یک گرم اوره افزوده به محیط کشت دراین‌ارتباط وجود داشت و افزودن یک درصد اوره سبب افزایش قابل‌توجه در میزان چربی تولیدی شد. بیشترین میزان تولید زیست‌توده آلی مربوط به تیمار شماره ۴ بود ولی اختلاف معنی‌داری بین سایر تیمارها و گروه شاهد وجود نداشت.

جدول شماره ۱- تأثیر تغییر محیط کشت بر ویژگی‌های تولیدی ریز جلبک آیزوکرایسیس گالبانا

	زیست‌توده تر (g/lit)	زیست‌توده خشک (g DM/lit)	خاکستر (درصد)	چربی (درصد)	تولید ماده آلی (g DM/lit)	تولید چربی (g DM/lit)
تیمار ۱	۳/۸۸^{d}	۰/۵۱^{b}	۱۸/۱۲^{b}	۳۴/۴۵^{b}	۰/۴۲^{bc}	۰/۱۸^{c}
تیمار۲	۵/۰۹^{b}	۰/۵۸^{b}	۲۰/۰۹^{b}	۲۸/۷۴^{c}	۰/۴۶^{b}	۰/۱۷^{c}
تیمار۳	۳/۳۲^{d}	۰/۴۸^{c}	۱۸/۰۵^{b}	۳۲/۱۱^{b}	۰/۳۹^{c}	۰/۱۵^{c}
تیمار ۴	۴/۶۶^{c}	۰/۶۷^{a}	۱۲/۳۲^{c}	۳۱/۲۴^{bc}	۰/۵۹^{a}	۰/۲۱^{b}
تیمار۵	۶/۱۹^{a}	۰/۵۹^{b}	۲۳/۱۴^{a}	۴۲/۲۶^{a}	۰/۴۵^{b}	۰/۲۵^{a}
SEM	۰/۲۲۳	۰/۰۴۲	۰/۹۳۶	۱/۱۳۶	۰/۰۱۹	۰/۰۱۱

تیمار یک، محیط کشت پایه (گروه کنترل)؛ تیمار۲، محیط کشت پایه + ۲ گرم بر لیتر گلیسرول؛ تیمار ۳، محیط کشت پایه+ ۲ گرم بر لیتر گلوکز ؛ تیمار ۴، محیط کشت پایه + ۲ گرم گلوکز، ۲گرم بر لیتر گلیسرول و ۰/۵ گرم اوره؛ تیمار ۵، محیط کشت پایه + ۲ گرم بر لیتر گلوکز،۲ گرم بر لیتر گلیسرول و ۱ گرم اوره

منابع

Austic, R.E., Mustafa, A., Jung, B., Gatrell, S., Lei, X.G. 2013. Potential and limitation of a new defatted diatom microalgal biomass in replacing soybean meal and corn in diets for broiler chickens. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 61:7341–7348.

Becker, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. In Handbook of Microalgal Culture. Edited by Richmond A. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., 312–351.

Dib, M.D., Engle, T.E., Han, H., Roman-Muniz, I.N., Archibeque, S.L. 2012. Effects of algal meal supplementation to finishing wethers on performance and carcass characteristics [abstract]. Journal of Animal Science. 94(2): 687-696.

Hoo, P. Y., Abdullah, A. Z. 2014. Direct synthesis of mesoporous 12-tungstophosphoric acid SBA-15 catalyst for selective esterification of glycerol and lauric acid to monolaurate. Chemical Engineering Journal, 250, 274-287.

Isaacs, R., Roneker, K.R., Huntley, M., Lei, X.G. 2011. A partial replacement of soybean meal by whole or defatted algal meal in diet for weanling pigs does not affect their plasma biochemical indicators [abstract]. Journal of Animal Science. 89(Suppl 1):723.

Kovač, D,J., Simeunović, J.B., Babić, O.B., Mišan, A.Č., Milovanović, I.L. 2013. Algae in food and feed. Food and Feed Research . 40:21–32.

Lam, M. K., & Lee, K. T. 2012. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. Biotechnology advances. 30(3), 673-690.

Lum, K.K., Kim, J., Lei, X.G. 2013. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. Journal of animal science and biotechnology., 4(1):53.

Lum, K.K., Roneker, K.R., Lei, X.G. 2012. Effects of various replacements of corn and soy by defatted microalgal meal on growth performance and biochemical status of weanling pigs [abatract]. Journal of Animal Science. 90(Suppl 3):701.

Evaluation of the effect of changing the culture medium on the growth and production of fat in the microalgae species *Isochrysis galbana* as a fat supplement in animal feed

Elahe Bagheri[1], Hamed Khalilvandi-Behroozyar[1*], Mahdi Kazemi-Bonchenari[2], Mehdi Dehghan-Banadaky[3], Bahram Mohtashami[1], Zahra Salehian[1]
1: Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2: Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak, Iran
3: Department of Animal Science, University college of Agriculture and Natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran
* Corresponding Author's Email: h.khalilvandi@urmia.ac.ir

Abstract
Applications of microalgae are so diverse and can include but not limited to their use in the food industry, human and animal nutrition, pharmaceuticals, pigments, chemicals and fuels. The aim of this study was to investigate the effects of five types of culture media on lipid, organic matter and biomass production efficiency in a microalgae strain (*Isochrysis galbana*). Five culture media tested (treat one, basic culture medium (control group); treatment 2, basic culture medium + 2 g/l of glycerol; treatment 3, basic culture medium + 2 g/l glucose; treatment 4, basic culture medium + 2 g/l of glucose, 2 g/l of glycerol and 0.5 g/l of urea; treatment 5, basic culture medium + 2 g/l of glucose, 2 g/l of glycerol and 1 g/l of urea) were studied in three replications for 5 weeks. Addition of glucose (treat 3) had a significant negative effect on the amount of wet and dry biomass produced, but a decreasing effect on the percentage of fat and the amount of fat and organic matter production was not significant. Simultaneous addition of glucose and glycerol with urea as a source of nitrogen (treat 4 and 5) increased the production of wet and dry biomass. However, the highest percentage of fat and the highest amount of fat produced per liter of culture medium belonged to treat 5 with 1 g of added urea. The highest amount of organic matter was produced by treat 4 was added with half of a gram of urea, which was obtained due to a significant reduction in the amount of microalgae ash content.

Keywords: Microalgae, *Isochrysis galbana*, lipid content