Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۴، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۹- ۲۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۰۴

بررسی و تولید روغن امگا۳ غنی از دوکوزاهگزانوئیک اسید توسط سویه بومی *آئورانتیوکیتریوم TA4*

فرزانه فکرت [**]: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، farzaneh.fekrat@gmail.com
شهریار شاکری [***]: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، sh.shakeri@kgut.ac.ir

چکیده

مقدمه: اسیدهای چرب امگا۳ در سلامتی انسان نقش مهمی را بازی می‌کنند. دوکوزاهگزانوئیک اسید جزو مهم‌ترین اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه است که از طریق مصرف روغن ماهی تامین می‌شود. در نتیجه به علت احتمال وجود آلودگی‌های فلزات سنگین در روغن ماهی، نیاز به منابع جایگزین جدید مثل روغن‌های تک سلولی وجود دارد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از جنگل‌های مانگرو در خلیج فارس و دریای عمان نمونه‌برداری شد. سویه‌های پروتیست دریازی در محیط اختصاصی جداسازی شد. غربال‌گری سویه‌های تولید کننده روغن توسط میکروسکوپ فلورسانت انجام شد. سویه منتخب از طریق تعیین توالی ژن *18S rRNA* شناسایی و پروفایل اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه توسط کروماتوگرافی گازی تعیین شد.

نتایج: بیش از ۲۰ سویه پروتیست دریازی جداسازی شد. گرانول‌های تری آسیل گلیسرول در سویه *TA4* با رنگ فلورسانت نارنجی شناسایی شد. سلول‌های دوتایی، چهارتایی و هشت‌تایی و زئوسپورها در سیکل سلولی مشاهده شد. توالی ژن *18S rRNA* این سویه (bp۱۷۳۰) بیش از ۹۷ درصد با سویه *آئورانتیوکیتریوم* مشابهت داشت (شماره دسترسی: KJ938302). محتویات روغن در این سویه ۴۶ درصد وزن خشک سلولی است. اسیدهای چرب دوکوزاهگزانوئیک اسید، دوکوزاپنتانوئیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید به مقدار ۱۰۵، ۴۶ و ۲۶ میلی‌گرم در لیتر تولید شد. محتویات آن‌ها به ترتیب برابر با ۱۶، ۷ و ۴ درصد از کل اسیدهای چرب است.

بحث و نتیجه‌گیری: سویه‌های *ترائوستوکیتریدها* به علت داشتن توانایی منحصر به فرد در تولید اسیدهای چرب غیراشباع و دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌توانند جایگزین مناسبی برای این ترکیبات با ارزش باشند. با توجه به پتانسیل سویه‌های بومی*ترائوستوکیتریدها* در تولید دوکوزاهگزانوئیک اسید، این سویه‌ها می‌توانند برای تولید روغن‌های امگا۳ استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای چرب امگا۳، دوکوزاهگزانوئیک اسید، سویه‌های بومی *ترائوستوکیتریدها*، *آئورانتیوکیتریوم*

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات
** پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته وعلوم محیطی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

از دهه ۱۹۳۰ کشف شد که اسیدهای چرب امگا۳ برای رشد طبیعی و سلامتی انسان ضروری هستند. ارزش اسیدهای چرب امگا۳ در دهه ۱۹۷۰ با مطالعه و بررسی‌هایی که بر روی قبایل و جمعیت‌های اسکیموهای گرینلند انجام شد، به اثبات رسید. این جمعیت‌ها به علت مصرف مقدار زیادی از روغن ماهی هیچ نشانه‌ای از علایم بیماری‌های قلبی- عروقی در آن‌ها مشاهده نشده بود، و این سطح بالای مصرف اسیدهای چرب امگا۳، از میزان تری‌گلیسرید، حمله قلبی و فشار خون و بیماری آترواسکلروزیس در جمعیت آن‌ها کاسته بود (۱). همچنین، شیوع پایین بیماری‌های قلبی در دیگر جمعیت‌هایی مانند نوروژی‌ها و ژاپنی‌ها که غذای ماهی زیادی مصرف می‌کنند؛ کمک کرد که پژوهش‌های ویژه و مهمی بر روی اسیدهای چرب امگا۳ انجام شود (۲). فایده و نقش مهم اسیدهای چرب امگا۳ به ویژه دوکوزاهگزانوئیک اسید[1] (DHA: C22: 6 n-3) و ایکوزاپنتانوئیک اسید[2] (EPA: C20:5 n-3) با مطالعات گسترده‌ای که در این زمینه انجام شد به اثبات رسیده است. اسیدهای چرب امگا۳ گروه بزرگی از اسیدهای چرب غیراشباع با زنجیره کربنی بلند و چندین باند دوگانه در ساختارشان [3] (PUFAs) هستند (۱ و ۳). این اسیدهای چرب موجب ویژگی‌های منحصر به فرد سیالیت، نفوذپذیری و انعطاف پذیری در غشاهای سلولی می‌شوند (۴). گیاهان توانایی سنتز ایکوزاپنتانوئیک اسیدو دوکوزاهگزانوئیک اسید را ندارند و این ترکیبات تنها از طریق منابع دریایی تامین می‌شوند. به علت اینکه این اسیدهای چرب برای متابولیسم نرمال بدن، حیاتی و ضروری هستند، آن‌ها را به عنوان اسید چرب ضروری در نظر می‌گیرند (۲ و ۵).

انسان و سایر حیوانات برای تامین مقدار کافی از دوکوزاهگزانوئیک اسید و سایر اسیدهای چرب غیر اشباع، از قبیل ایکوزاپنتانوئیک اسید، دو مسیر را طی می‌کنند. یکی این‌که آن‌ها را به طور مستقیم از طریق رژیم غذایی خود و با مصرف منابع دریایی به‌دست آورند و یا این‌که آن‌ها را از طریق مصرف رژیم غذایی گیاهی حاوی پیش ماده آلفا لینولنیک اسید[4] (ALA:C18:3 n-3) و تبدیل ناچیز آن به ایکوزاپنتانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید تأمین می‌کنند (۳). اسیدهای چرب امگا۳ به ویژه دوکوزاهگزانوئیک اسید در سلامتی انسان، رشد، توسعه و تکامل مغز و چشم نقش مهمی دارند (۶). تجمع دوکوزاهگزانوئیک اسید در غشاهای سلول‌های عصبی به عنوان شاخص مهمی از پایداری، برد عملیاتی و توان مغزی است. آزمایش‌های کلینیکی با رژیم غذایی غنی شده از دوکوزاهگزانوئیک اسید نشان داده‌اندکه افزایش چشمگیری در سطح و ظرفیت یادگیری بچه‌ها در سنین مدرسه مشاهده می‌شود (۴). همچنین، دوکوزاهگزانوئیک اسید در ساختار فسفاتیدیل سرین که یکی از مواد مغذی و مهم برای مغز است، حضور دارد. غشای سلول‌های نورونی دارای مقدار زیاد فسفاتیدیل سرین است. فسفاتیدیل سرین نقش مهمی در فعالیت‌ها و عملکردهایی که نیاز به هوش زیاد دارند ایفا می‌کند و از این رو دارای آثار مثبت در خلق و خوی افراد، کنترل و مدیریت استرس افراد است (۴). همچنین شواهد زیادی وجود دارد که اسیدهای چرب غیر اشباع به عنوان رژیم غذای مکمل در تمام دوران زندگی فرد و به ویژه دوران بارداری، شیر دهی، کودکی و کهن‌سالی مورد نیاز است. امروزه توصیه‌های زیادی می‌شودکه این دو اسید چرب (EPA و به ویژه DHA) در رژیم غذایی

www.SID.ir

Archive of SID

انسان وجود داشته باشند. همچنین، دوکوزاهگزانوئیک اسید تحریک کننده فرآیند آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است (۲ و ۴). از این رو لازم است تا به دنبال منابع جدید، سالم و مناسب برای تامین آن بود. در اوایل دهه ۱۹۹۰ تنها منبع مصرفی دوکوزاهگزانوئیک اسید که توسط متخصصین تغذیه معرفی شده بود، روغن ماهی بود (۱). اما روغن ماهی دارای معایبی چون مزه و بوی نامطلوب و پایداری اکسیداتیو پایین هستند. استفاده از روش‌های شیمیایی در استخراج آن، کم بودن منابع تولیدی به علت صید زیاد و آلودگی دریاها با فلزات سنگین چون جیوه و به دنبال آن احتمال حضور این ترکیبات سمی در اسیدهای چرب امگا۳ استخراج شده از ماهی از دیگر معایب آن بوده و از این رو پژوهشگران به دنبال منابع جایگزین روغن ماهی بوده‌اند (۱، ۳ و ۵). پژوهش‌های جدید نشان داده‌اند که تعدادی از میکروارگانیسم‌ها توانایی تولید روغن‌های خوراکی شامل اسیدهای چرب امگا۳ را به مقدار چشمگیری دارند. این سویه‌ها شامل جنس‌های *ژاپونوکیتریوم*[۵]، *آئورانتوکیتریوم*[۶]، *اولکنیا*[۷]، *شیزوکیتریوم*[۸]، *ترائوستوکیتریوم*[۹] و *کریپتکودینیوم کوهنی*[۱۰] بوده و بیشتر مربوط به خانواده *ترائوستوکیتریدها*[۱۱] هستند. محتوی روغن آن‌ها بیش از ۵۰ درصد وزن خشک‌شان بوده و ترکیب با ارزش دوکوزاهگزانوئیک اسید در میان کل محتویات روغن‌های تولیدی توسط آن‌ها بیش از ۳۰ درصد است. مزیت و فایده دیگر روغن تک سلولی‌ها این است که معمولا به طور مشخص شامل مقدار زیاد آنتی اکسیدان‌های طبیعی از قبیل کاروتنوئیدها، آستازانتین و توکوفرول‌ها هستند که توانایی محافظت اسیدهای چرب امگا۳ از اکسیداسیون را دارند (۷). از این رو با توجه به ارزش بالای این سویه‌های میکروارگانیسمی در تولید اسیدهای چرب امگا۳ و به ویژه دوکوزاهگزانوئیک اسید، هدف از انجام این پژوهش نمونه‌برداری وسیع از اکوسیستم جنگل‌های مانگرو در نواحی جنوبی ایران، جداسازی و غربال‌گری سویه‌های پروتیست دریازی از خانواده ترائوستوکیتریدها و بررسی تولید اسید چرب امگا۳ دوکوزاهگزانوئیک اسید برای نخستین بار در ایران است.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده: ترکیبات مورد استفاده در محیط کشت شامل گلوگز، عصاره مخمر، پپتون و آگار از شرکت مرک آلمان[۱۲] خریداری شد. رنگ فلوروسنت نایل رد از شرکت سیگما امریکا[۱۳] خریداری شد. تمامی حلال‌های مورد استفاده نیز از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری در طی چند مرحله و از مناطق مختلف اکوسیستم‌های جنگل‌های مانگرو در مناطق جنوبی ایران، در سواحل خلیج فارس و دریای عمان شامل قشم، کیش، چابهار و بوشهر انجام شد. یک‌سری از برگ‌های درختان حرا[۱۴] و چندل[۱۵] که شامل برگ‌های تازه و پوسیده و در حال فساد و تجزیه بودند جمع‌آوری شد. از آب دریا نیز چند نمونه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه، تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در یخچال نگه داری شد.

جداسازی سویه‌ها با روش کشت مستقیم نمونه‌ها: در این روش تعدادی از نمونه‌های برگ به منظور از بین بردن آلودگی‌های سطحی به مدت ۱ دقیقه توسط الکل ۷۰ درصد ضدعفونی، با آب مقطر شسته و توسط

www.SID.ir

Archive of SID

اسکارپل به قطعات کوچکی تقسیم شد (۸). سپس آن‌ها بر روی محیط کشت گلوگز، عصاره مخمر، پپتون و آگار حاوی آنتی بیوتیک[۱۶]، قرار داده شد. ترکیبات این محیط کشت شامل گلوگز ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۱ گرم بر لیتر، پپتون گرم بر لیتر ۱، آگار ۱۵ گرم بر لیتر، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سلین و استرپتومایسین هر کدام ۰/۳ گرم بر لیتر و با نسبت ۵۰ درصد از آب دریا بودند. پلیت‌های تلقیح شده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۷ روز انکوبه شدند. در مدت زمان انکوباسیون، سویه‌های *ترائوستوکیترید* در حاشیه قطعات برگ‌ها بر روی محیط جامد آگاردار رشد کردند. سپس آن‌ها توسط لوپ استریل به یک محیط کشت جدید GYP آنتی بیوتیک‌دار انتقال داده و دوباره به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از رشد مناسب سویه‌ها و خالص‌سازی آن‌ها، از سویه‌های خالص اسلنت تهیه و در دمای ۴ درجه به مدت یک ماه نگه‌داری شد. به علت آن که محیط کشت GYP دارای آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سلین و استرپتومایسین بود، مانع رشد آلودگی‌های باکتریایی شده و جداسازی سویه پروتیست مورد نظر راحت‌تر انجام شد (۹).

روش جداسازی سویه‌ها با استفاده از دانه گرده: نمونه‌هایی از هر دو گروه آب دریا و برگ‌های پوسیده به ارلن‌های کوچک انتقال داده، به آن‌ها مقداری دانه استریل گرده کاج افزوده، درب ارلن‌ها با پنبه بسته و به مدت ۷ روز در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در ۱۵۰ rpm انکوبه شد. پس از آن مقداری از دانه‌های گرده از روی سطح محیط کشت توسط لوپ برداشته، به شکل استریک به محیط کشت GYP آنتی بیوتیک دار انتقال داده و به مدت ۳ تا ۷ روز در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۱).

بعد از رشد سویه‌ها و خالص‌سازی آن‌ها، کشت‌های خالص از سویه‌ها در دمای ۴ درجه یخچال نگه‌داری شد.

شناسایی ریخت‌شناسی سویه غربال‌گری شده: شناسایی اولیه سویه‌های غربال‌گری شده براساس آزمون‌های اولیه شامل شکل میکروسکوپی، شکل و رنگ کلونی و مشاهده مراحل مختلف چرخه زندگی سویه انجام شد و از بین آن‌ها سویه‌ای که بیش‌ترین شباهت را به *ترائوستوکیتریدها* را داشت، انتخاب شد (۱۱).

شناسایی مولکولی ترائوستوکیتریدها و تعیین توالی ژن *18S rRNA*: DNA ژنومی با استفاده از روش فنل/ کلروفرم استخراج شد. ژن *18S rRNA* با استفاده از PCR و بر طبق برنامه جدول ۱ تکثیر شد. پرایمر رفتی T18S1F (5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3') و پرایمر برگشتی T18S5R (5'-TCACTACGGAAACCTTGTTACGAC-3') برای تکثیر ژن، استفاده شد. سپس، محصول PCR تخلیص و تعیین توالی شد (۸ و ۲۲).

پس از انجام شدن واکنش PCR، محصول تکثیر شده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد در شرایط بافری TAE و با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد. در این واکنش بتائین و دی متیل سولفوکساید به عنوان افزایش دهنده کارآیی در واکنش PCR استفاده شد.

جدول ۱- برنامه PCR برای جفت پرایمرهای T18S1F و T18S5R

فازها	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	سیکل‌ها
P_1	۹۴	۱۸۰	۱
P_2	۹۴	۴۵	۳۰
	۶۴	۳۰	
	۷۲	۱۲۰	
P_3	۷۲	۱۰ دقیقه	۱
Hold	۴	Hold	Hold

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت تولید دوکوزاهگزانوئیک اسید و تری‌آسیل گلیسرول‌های ذخیره‌ای: یک کشت تازه از سویه پروتیست غربال‌گری شده بر روی محیط کشت GYP آگار دار جامد شامل گلوگز ۱۵گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۱ گرم بر لیتر، پپتون ۱ گرم بر لیتر، آگار ۱۵ گرم بر لیتر و با نسبت ۵۰ درصد از آب دریا تهیه شد. سپس معادل نصف لوپ از کشت برداشته و به محیط کشت تولیدی (محیط کشت مایع فوق بدون آگار) تلقیح انجام شد. ارلن‌های تلقیح شده در دمای ۳۰ درجه و rpm ۱۵۰ به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد.

غربال‌گری سویه‌های تولید کننده تری آسیل‌گلیسرول توسط میکروسکوپ فلورسنت: از سویه‌هایی که روی محیط گلوگز، عصاره مخمر و پپتون کشت داده شدند یک لوپ برداشته و در روی لام شیشه‌ای پخش و بعد از خشک شدن، چند قطره از رنگ نایل رد با غلظت۰/۵میکروگرم در میلی‌لیتر در حلال دی‌متیل سولفوکساید[17] به سلول‌های تثبیت شده بر روی لام افزوده شد. سپس سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنتمدل Axioplan2 Imaging مشاهده شد. دانه‌های تری‌آسیل‌گلیسرول در معرض نور یووی[18] به شکل نارنجی در داخل سلول‌ها مشاهده شد (۱۰).

تعیین وزن خشک سلولی: به منظور سنجش بیوماس، ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت در rpm ۴۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سوپرناتانت دور ریخته شد. سپس، پلت سلولی برای خشک شدن در آون با دمای ۱۰۵ درجه تا رسیدن به وزن ثابت (مدت ۲۴ ساعت) قرار داده شد (۹).

استخراج روغن از وزن خشک و تعیین میزان تری‌آسیل گلیسرول‌های ذخیره ای به روش وزن‌سنجی: استخراج روغن از بیومس خشک سلولی بر طبق پروتکل استخراجی بلایت و دایر[19] با کمی تغییرات انجام شد (۱۲). در این روش ابتدا مقدار مشخصی از بیومس خشک سلولی وزن کرده و به فالکون انتقال داده شد. سپس به آن مقدار ۲ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. پس از آن خورد کردن بیومس خشک سلولی توسط دستگاه التراسونیک مدل UP200S به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. سپس، مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول کلروفرم و ۵ میلی‌لیتر از محلول متانول به آن اضافه شد و توسط دستگاه هموژنیزر و التراسونیک خرد شدن دیواره سلولی به مدت ۴ دقیقه انجام گرفت. دوباره مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به دنبال آن به مدت ۲ دقیقه هموژنیزر و ورتکس شدن انجام شد. سپس، آن‌ها در rpm ۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژشده و به دنبال آن دو فاز تشکیل شد. لایه پایین (فاز آلی) برداشته و به فالکون تمیز از قبل وزن شده دیگر انتقال داده شد. سپس، عمل تبخیر حلال کلروفرم در زیر هود انجام شد (۱۳ و ۱۴). پس از آن توزین دوباره اپندورف انجام شده و از اختلاف آن با وزن اپندورف خالی، وزن روغن تولیدی توسط سویه پروتیست مورد نظر محاسبه شد. روغن تولیدی برای نگه‌داری برای انجام تحلیل‌های دیگر، به فریز منفی ۲۰ منتقل شد (۱۳ و ۱۵).

روش آماده‌سازی نمونه برای انجام تحلیل کروماتوگرافی گازی: برای آن که روغن‌های ذخیره‌ای سویه قابلیت تحلیل توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی را داشته باشند باید به فرم متیل استر اسید چرب تبدیل شوند. زمانی که اسیدهای چرب به فرم متیل استر تبدیل می‌شوند اطلاعات کروماتوگرافی محکم‌تر و از قابلیت تکرار پذیری بالاتری برخوردار هستند (۱۶). مقدار مشخصی از روغن استخراج شده، وزن شده به یک لوله

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش درپیچ دار منتقل شد. سپس به آن مقدار ۳ میلی‌لیتر متانولیک سولفوریک اسید ۴ درصد اضافه و درب لوله آزمایش محکم بسته شد. سپس، توسط دستگاه حمام التراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه التراسونیک بیومس انجام شد. پس از آن، نمونه در بن ماری و در دمای ۸۰ درجه به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از اتمام زمان فوق، نمونه برداشته و در دمای محیط برای سرد شدن قرار داده شد. زمانی که نمونه به مقدار کافی سرد شد به آن ۱ میلی‌لیتر آب افزوده و به دنبال آن عمل ورتکس شدن به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر هگزان اضافه شده و دوباره ۳۰ ثانیه ورتکس شد. برای مدتی نمونه را ثابت گذاشته تا دو فاز تشکیل شد. پس از آن فاز رویی (فاز آلی) که شامل فاز متیل استرهای موجود در هگزان بوده برداشته و به لوله آزمایش تمیز دیگری انتقال داده شد. به مقدار کم (نوک یک اسپاتول) از نمک سدیم سولفات[۲۰] برای جذب آب یا اسید در محلول اضافه شد، تا آب به ستون دستگاه GC آسیبی وارد نکند (۱۳). پس از افزودن نمک فوق دوباره ۳۰ ثانیه عمل ورتکس انجام ، فاز آلی برداشته و به اپندورف تمیز دیگری منتقل شد. نمونه برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی رقیق شد. به این شکل که ۵۰ ماکرولیتر از آن برداشته و در اپندرف دیگر ۹۵۰ ماکرولیتر حلال هگزان به آن افزوده و پس از آن دوباره ۳۰ ثانیه عمل ورتکس شدن انجام شد. نمونه برای تحلیل کروماتوگرافی آماده شده و تا زمان تزریق به دستگاه کروماتوگرافی در یخچال ۴ درجه نگه‌داری شد. پس از تزریق نمونه به دستگاه و اتمام تحلیل برای نگه‌داری استوک، نمونه به فریز منفی ۲۰ منتقل شد (۹، ۱۵ و ۱۷).

تحلیل کروماتوگرافی گازی برای تعیین تولید DHA: در این پژوهش برای بررسی تولید دوکوزاهگزانوئیک اسید، محاسبه مقدار آن و همچنین طیف اسیدهای چرب تولیدی توسط سویه پروتیست، تحلیل متیل استرهای چرب تولید شده توسط کروماتوگرافی گازی انجام شد (۱۷). دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد استفاده در این پژوهش مدل N, Agilent 6890 وساخت کشور امریکا بود. ستون دستگاه از نوع DB-23 بوده که ۳۰ متر طول و ۰/۳۲ میلی‌متر عرض داشت. این ستون پوشیده از سیانوپروپیل با فاز ثابت موبینه بود و جداسازی خوب و تخمین مناسب از اسیدهای چرب امگا۳ را انجام داد. و همچنین، قابلیت تشخیص و جداسازی ترکیبات دوکوزاهگزانوئیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید را دارا بود. تنظیمات دستگاه شامل دمای دتکتور و اینجکتور هر دو ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد، حجم تزریق نمونه ۰/۵ میکرو لیتر، گاز نیتروژن گاز حامل و برنامه دمایی و زمانی آون به شکل ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۱۰ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه تا رسیدن به ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد با زمان ماندگاری ۵ دقیقه و سپس، ۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه تا رسیدن به ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با زمان ماندگاری ۷ دقیقه تنظیم شد.

نتایج

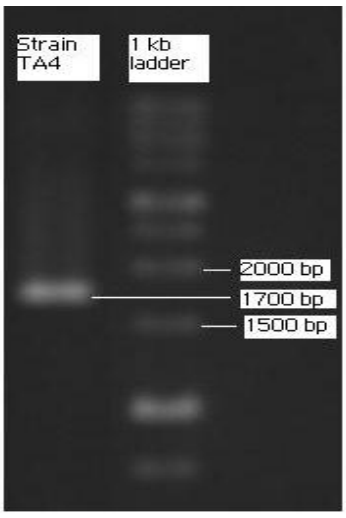
نتایج حاصل از جداسازی با کشت مستقیم: از بین کشت‌های مربوط به نمونه‌های جمع آوری شده از درختان مانگرو که شامل برگ‌های پوسیده، برگ‌های تازه و قسمت‌های ساقه و ریشه این درختان بود، بیش‌ترین رشد میکروارگانیسم‌ها مربوط به برگ‌های پوسیده بود که کلونی‌ها از نواحی حاشیه‌ای برگ‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

رشد کردند. کلونی سویه‌های رشد یافته، جداسازی و بر روی محیط کشت GYP جامد آنتی‌بیوتیک‌دار خالص‌سازی شدند. آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سلین و استرپتومایسین از رشد کلونی باکتری‌ها جلوگیری کرده و جداسازی و خالص‌سازی کلونی‌های تک سلولی *ترائوستوکیتریدها* راحت‌تر انجام شد. با گذشت زمان یکسری از قارچ‌های ریسه‌ای و پرسلولی با انتشار هاگ‌های خود با سرعت زیادی رشد کرده و تمام سطح پلیت را می‌پوشانند و مانع دیده شدن کلونی *ترائوستوکیتریدها* می‌شوند. اما از آنجا که کلونی‌های تک سلولی *ترائوستوکیتریدها* زودتر از قارچ‌های ریسه دار رشد می‌کنند زودتر جداسازی شدند که مانع از پوشیده شدن آن‌ها توسط قارچ‌های ریسه‌ای شد. در این پژوهش، بیش از ۲۰ سویه پروتیست از نمونه‌های جمع‌آوری شده، جداسازی شد. سپس، سویه‌های خالص جهت نگه‌داری و انجام سایرآزمایشات بر روی محیط کشت GYP اسلنت کشت و در یخچال با دمای ۴ درجه به نگه‌داری شد.

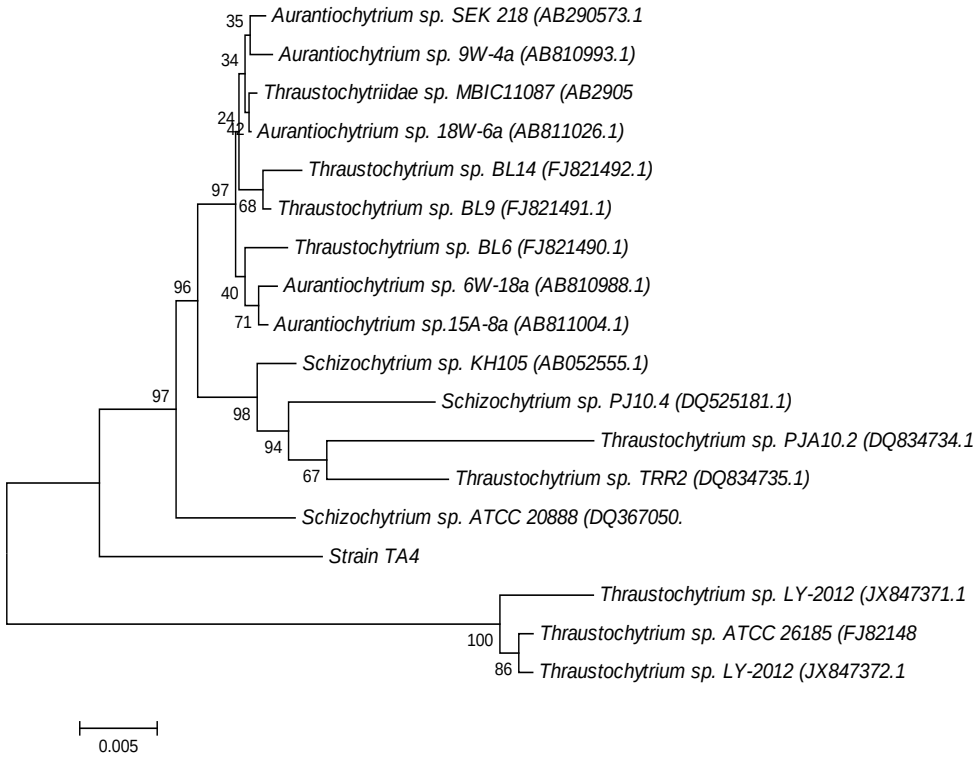
بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی سویه‌های غربال‌گری‌شده: از سویه‌های خالص کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه شد. این سویه‌ها از نظر رنگ کلونی، شکل، ظاهر کلونی روی محیط جامد و میزان و نحوه رشد در کشت مایع مورد بررسی قرار گرفتند و از بین آن‌ها با توجه به ویژگی‌های ظاهری و بررسی‌های میکروسکوپ نوری سویه *TA4* که مشابهت بیشتری به سویه‌های پروتیست تک سلولی دریازی خانواده *ترائوستوکیتریدها* داشته، برای آزمایشات بعدی انتخاب شد. اندازه سلولی این سویه بین ۵ تا ۲۰ میکرومتر بوده و در سیکل زندگی آن سلول‌های دوتایی، چهارتایی، هشت تایی و شکل‌های نامنظم آمیبی[۲۱] مشاهده شد. همچنین، تولید زئوسپورها در این سویه مشاهده شد که برای تکثیر غیر جنسی از آن استفاده می‌کند. رنگ کلونی سویه *TA4* بر روی محیط کشت جامد، نارنجی روشن و دارای سطح براق و لعابی بود. همچنین، این سویه در محیط کشت مایع به صورت کلامپ رشد کرد. ژن *18S rRNA* (1780 bp) تکثیر شد (شکل ۱) و توالی آن با داده‌های بانک ژنی و با استفاده از برنامه بلست[۲۲] مقایسه شد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-joining و با استفاده از نرم افزار مگا۴[۲۳] ترسیم شد (شکل ۲). سویه *TA4* بیش از ۹۷ درصد با سویه جنس *آئورانتیوکیتریوم* از خانواده *ترائوستوکیتریدها* مشابهت داشت. شماره دسترسی این سویه در سایت NCBI با کد KJ938302 قابل دسترسی است.



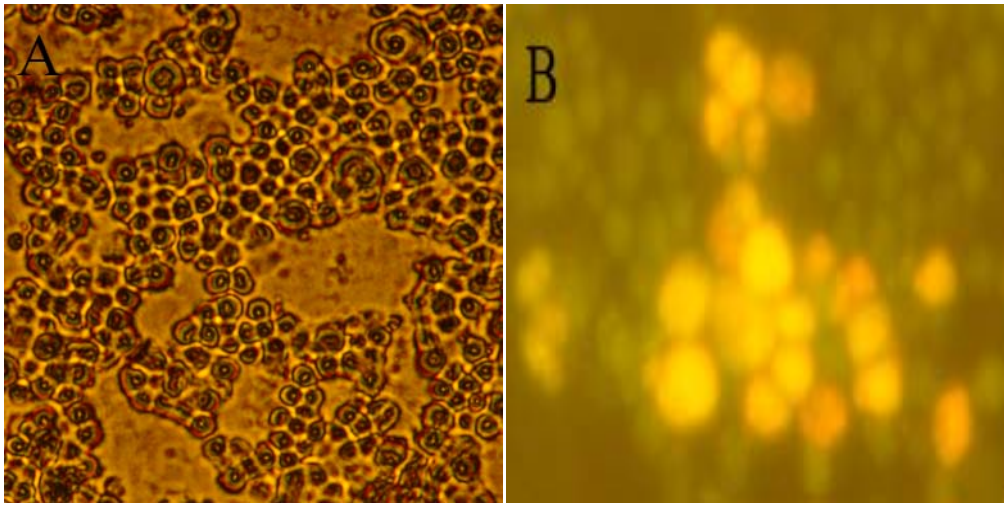
شکل ۱- تصویر ژل رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برماید برای محصول PCR با ۱۷۰۰ جفت باز

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تحلیل فیلوژنتیکی سویه *TA4*. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-joining و با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد. فاصله تکاملی با استفاده از Kimura 2 parameter محاسبه شد.



شکل ۳- A عکس میکروسکوپ نوری سویه *TA4* و B: عکس میکروسکوپ فلورسانت از سلول‌ها. دانه‌های ذخیره ای تری‌آسیل گلیسرول به شکل دانه‌هایی با فلورسانت زرد مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی سویه *TA4* توسط میکروسکوپ فلوروسنت: از سویه *TA4* که بر روی محیط کشت گلوگز، عصاره مخمر، پپتون و آگار رشد کرده بود لام تهیه و توسط نایل رد رنگ آمیزی انجام شد. سپس لام میکروسکوپی توسط میکروسکوپ فلوروسنت مشاهده شد (شکل ۳). رنگ نایل رد به تری آسیل گلیسرول‌های داخل سلول متصل شده و سلول‌ها در معرض نور UV به شکل سلول‌های حاوی گرانول‌های زرد و یا نارنجی فلورسانت مشاهده شد. هرچه سویه توانایی تولید تری‌آسیل گلیسرول‌های ذخیره‌ای بیشتری داشته باشد فلورسانت زرد بیشتری از خود ساطع می‌کند.

بررسی رشد سلولی و تولید روغن در سویه *TA4*: نتایج رشد سلولی و تولید روغن در جدول ۲ نشان داده شده است. سویه *TA4* بعد از ۴۸ ساعت ۱/۳۷ گرم بر لیتر بیومس تولید کرده که ۴۶/۶درصد آن را روغن تشکیل داده است. در این سویه مقدار ۰/۶۴۲ گرم بر لیتر روغن تولید شد.

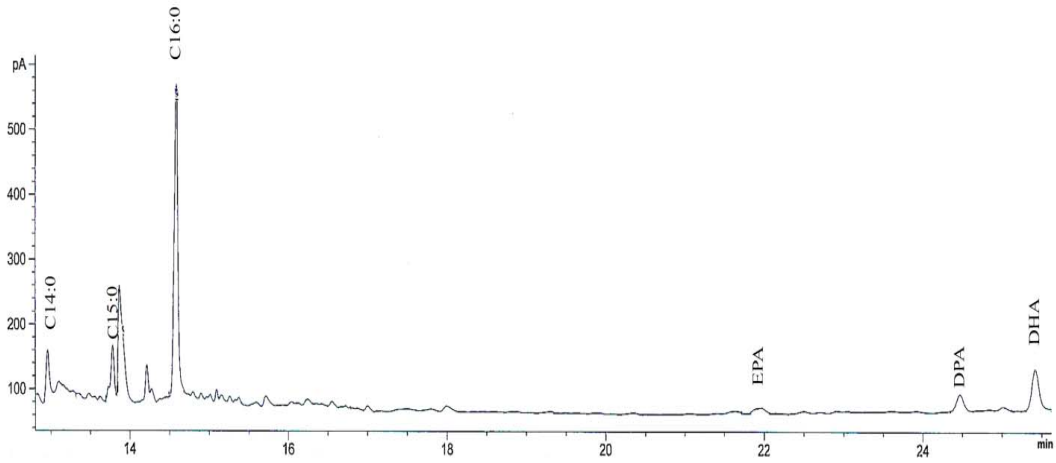
جدول ۲- مقدار بیومس، روغن تولیدی و درصد آن

سویه	وزن خشک سلولی (گرم برلیتر)	روغن (گرم بر لیتر)	گرم روغن در یک گرم وزن خشک سلولی	درصد روغن در وزن خشک سلولی
TA4	۱/۳۷	۰/۶۴۲	۰/۴۶۲	۴۶/۶

تحلیل کروماتوگرافی گازی متیل استرهای اسیدهای چرب تولید شده توسط سویه TA4: به منظور بررسی پروفایل اسیدهای چرب و تعیین نوع اسیدهای چرب تولید شده توسط سویه و تأیید نهایی تولید ترکیب ارزشمند دوکوزاهگزانوئیک اسید و همچنین، محاسبه مقدار آن و مقدار سایر اسیدهای چرب تولیدی و ترسیم پروفایل محصولات تولیدی، تحلیل کروماتوگرافی گازی متیل استر اسیدهای چرب انجام شد. با توجه به بررسی دیاگرام به دست آمده از تحلیل گروماتوگرافی گازی سویه *TA4* (شکل ۴)؛ پیک و زمان خروج متیل استرها از دستگاه کروماتوگرافی گازی و نوع اسیدهای چرب اصلی که توسط سویه تولید شده بود، مشخص شد. پیک‌های مهم و شاخص که توسط سویه تولید شده هر کدام در زمان مشخصی از دستگاه خارج و با استاندارد متیل استر اسیدهای چرب مقایسه شدند. پیک اول مربوط به مریستیک اسید(C14:0)[۲۴] بوده که در زمان ۱۲/۹۵ دقیقه از ستون خارج شد. پیک دوم و سوم مربوط به ترکیب پنتادکانوئیک اسید (C15:0)[۲۵] و پالمیتیک اسید[۲۶] (C16:0) هستند که به ترتیب در زمان‌های ۱۳/۷۸ دقیقه و ۱۴/۵۸ دقیقه از ستون خارج شدند. هر سه این ترکیبات از گروه اسیدهای چرب اشباع می‌باشند. پیک دوکوزاپنتانوئیک اسید DPA (C22:5 n-6)[۲۷] از گروه اسیدهای چرب امگا۶ در زمان ۲۴/۴۶ دقیقه از ستون خارج شد. EPA و DHA که مربوط به اسیدهای چرب مهم و با ارزش امگا۳ هستند به ترتیب در زمان‌های ۲۱/۹۷ و ۲۵/۴۱ دقیقه از ستون خارج شدند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- پروفایل متیل استر اسیدهای چرب تولید شده

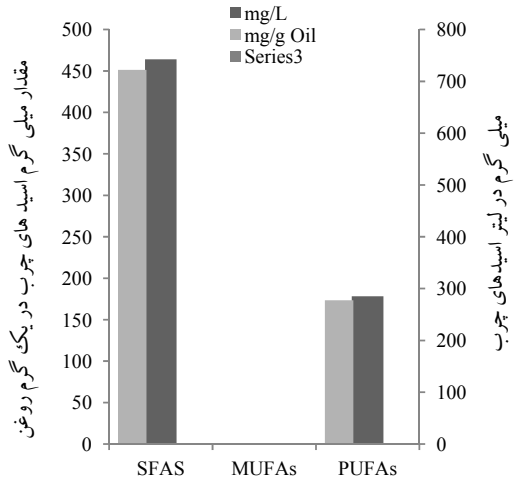
جدول ۳- درصد اسیدهای چرب و مقدار آن‌ها در سویه *آئورانتیوکیتریوم TA4*

انواع اسید چرب	درصد کلی اسید چرب	میلی‌گرم در لیتر اسیدچرب	میلی‌گرم اسید چرب در یک گرم روغن
C14	۷/۰۸ درصد	۴۵/۴۹	۷۰/۸۰
C15	۸/۳۰ درصد	۵۳/۳۳	۸۲/۹۴
C16	۵۶/۸۶ درصد	۳۶۵/۳۸	۵۶۸/۴۷
EPA (امگا ۳)	۴/۱۲ درصد	۲۶/۴۷	۴۱/۱۹
DPA (امگا ۶)	۷/۲۶ درصد	۴۶/۶۵	۷۲/۵۹
DHA (امگا ۳)	۱۶/۳۸ درصد	۱۰۵/۲	۱۶۳/۷
Total Saturated Fatty Acids	۷۲/۲۴ درصد	۴۶۴/۲	۷۲۲/۲۱
Total Muno Unsaturated Fatty Acids	----	----	----
Total Poly Unsaturated Fatty Acids	۲۷/۷۶ درصد	۱۷۸/۳۲	۲۷۷/۴۸

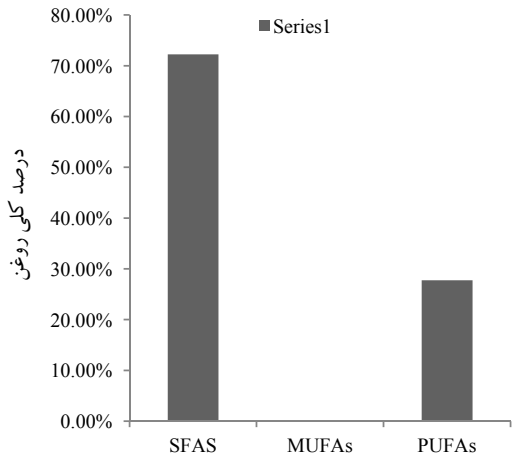
با توجه به شکل ۴ ترکیب پالمیتک اسید (C16:0) در سویه *آئورانتیوکیتریوم*[۲۸] از خانواده *ترائوستوکیتریدها* به عنوان ترکیبی شاخص بوده و به مقدار زیاد تولید می‌شود. با در نظر گرفتن زمان جداسازی پیک اسیدهای چرب با پیک‌های اسیدهای چرب موجود در نمونه استاندارد، نوع آن اسیدهای چرب شناسایی شد. ترکیب اصلی DHA در زمان ۲۵/۴۱ دقیقه در ستون DB-23 جداسازی شده است. سویه *TA4* قادر به تولید ۱۷۸/۳۲ میلی‌گرم در لیتر و ۲۷۷/۴۸ میلی‌گرم در گرم روغن اسید چرب غیر اشباع با چندین باند دوگانه از نوع DHA، EPA و DPA است (جدول ۳ و شکل ۵). این اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه ۲۸ درصد از کل روغن تولید شده توسط سویه را به خود اختصاص داده‌اند (شکل ۶).

www.SID.ir

Archive of SID

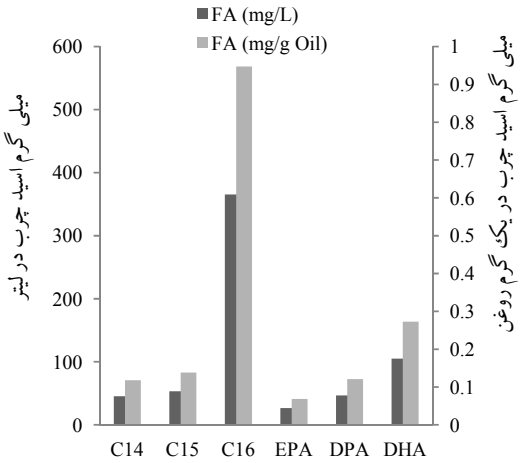


شکل ۵- مقدار اسیدهای چرب اشباع، غیراشباع با یک پیوند دوگانه و یا چند پیوند دوگانه در سویه آئورانتیوکیتریوم *TA4*

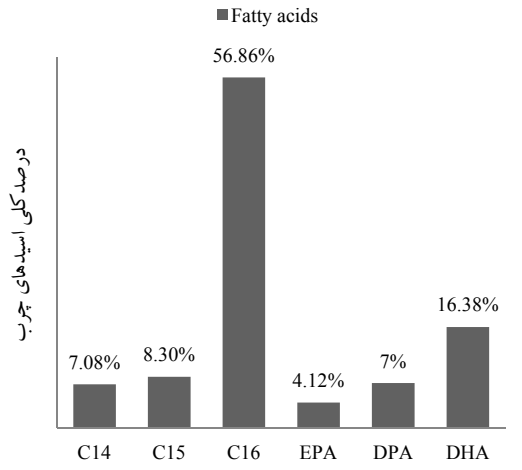


شکل ۶- درصد اسیدهای چرب اشباع، غیراشباع با یک پیوند دوگانه و یا چند پیوند دوگانه در سویه آئورانتیوکیتریوم. اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه نزدیک به ۲۸ درصد از کل روغن‌های تولیدی در سویه آئورانتیوکیتریوم را تشکیل داده اند.

مقدار و ترکیب اسیدهای چرب تولید شده توسط سویه TA4: سویه *TA4* مقدار ۳۶۵/۳۸ میلی‌گرم بر لیتر اسید چرب C16 تولید کرده که این مقدار برابر با ۵۶/۸۶ درصد از کل روغن تولیدی است (شکل ۷). مقدار DHA تولیدی این سویه ۱۰۵/۲ میلی‌گرم بر لیتر و EPA ۴۷/۲۶ میلی‌گرم بر لیتر است که به ترتیب۳۸ /۱۶ و ۴/۱۲ درصد از کل روغن تولید شده است (شکل ۸). میزان تولید روغن‌های امگا۳ این سویه ۱۳۱/۶۷ میلی‌گرم بر لیتر بوده که ۲۰/۵درصد از کل روغن تولیدی توسط سویه است.



شکل ۷- مقدار و ترکیب اسیدهای چرب تولید شده توسط سویه آئورانتیوکیتریوم *TA4*



شکل ۸- محتویات پروفایل اسیدهای چرب تولید شده توسط سویه *آئورانتیوکیتریوم TA4*

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت و ضرورت وجود اسیدهای چرب امگا۳ در رژیم غذایی انسان و نقش مهم آن‌ها در جلوگیری از بیماری های قلبی- عروقی، مشخص شده که مردان با مصرف روزانه ۶۱۰ و زنان ۴۳۰ میلی‌گرم، ریسک ابتلا به این بیماری در آن‌ها کاهش می‌یابد (۳). همچنین، مشخص شده که با مصرف حداقل یک وعده غذای ماهی در هفته، ۵۲ درصد ریسک مرگ ناگهانی بر اثر بیماریهای قلبی- عروقی (سکته قلبی) کاهش می‌یابد (۱۸). افزایش مصرف چربی‌های اشباع و همچنین افزایش مصرف اسیدهای چرب امگا۶ نسبت به امگا۳ موجب افزایش بیماری آترواسکلروزیس می‌شود. مصرف دوکوزاهگزانوئیک اسید موجب افزایش نسبت کلسترول خوب[۲۹] به کلسترول بد[۳۰] و کاهش کلسترول کل به نسبت HDL شده و ریسک ابتلای به بیماری‌های قلبی- عروقی را کاهش می‌دهد (۴ و ۱۸). روغن ماهی‌هایی از قبیل قزل آلا، شاه ماهی و ساردین در کنار سایر ماهی‌ها از منابع بزرگ مصرف دوکوزاهگزانوئیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید است. از دیگر منابع معمول برای تامین اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه برای انسان منابع گیاهی هستند، اما روغن‌های گیاهی دارای اسیدهای چرب امگا۳ نیستند و دارای گروه اسیدهای چرب غیراشباع امگا۶ هستند. مصرف منابع گیاهی دارای امگا۶ نسبت به منابع دریایی دارای امگا۳، می‌تواند سبب افزایش بیش از حد اسیدهای چرب امگا۶ نسبت به امگا۳ شده و خطر ابتلا به سرطان، دیابت، بیماری‌های مغزی و تحلیل رفتن نورون‌ها و بیماری‌های قلبی و عروقی را افزایش می‌دهد (۱۹). احتمال وجود آلودگی‌های فلزات سنگین و کاهش ذخایر ماهی و افزایش روز افزون تقاضا برای مصرف مکمل‌های امگا۳، موجب افزایش پژوهش در زمینه‌های استفاده از روغن تک سلولی‌ها (مخمرها و قارچ‌ها) به عنوان منابع جایگزین در استفاده از اسیدهای چرب امگا۳ شده است (۷). همچنین، چندین گونه باکتری دارای ترکیبات روغنی‌می‌باشند (۷)، اما به عنوان منابع جایگزین روغن‌های امگا۳ در نظر گرفته نمی شوند زیرا مقدار کم محتویات روغن آن‌ها (۵ تا ۲۰ درصد) و احتمال حضور ترکیبات نامطلوب در روغن آن‌ها موجب شده که دوکوزاهگزانوئیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید باکتری‌ها از کیفیت و درجه خلوص مناسب برخوردار نباشند (۳).سویه‌های *ترائوستوکیتریدها* که جزو یوکاریوت‌های دریازی می‌باشند، می‌توانند جایگزین مناسبی برای تامین منابع امگا۳ باشند و دارای توانایی منحصر به فردی در تولید اسیدهای چرب غیراشباع به ویژه دوکوزاهگزانوئیک اسید هستند (۱ و ۲۰). این سویه‌ها بیش از ۵۰ درصد وزن خشک سلولی خودشان روغن تولید کرده و اسیدهای چرب آن‌ها به طور گسترده از نوع دوکوزاهگزانوئیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید است. *ترائوستوکیتریدها* به گروه یوکاریوت‌های غیر فتوسنتزکننده هتروتروف متعلق و از پروتیست‌های تک سلولی دریازی هستند. دیواره سلولی *ترائوستوکیتریدها* بدون سلولز[۳۱] بوده وبه طور گسترده از L-گالاکتوز[۳۲] تشکیل شده است و بیشتر در یکی از ۳ گروه زیر قرار دارند. این سویه‌ها دارای پراکنش وسیعی در سراسر دنیا هستند. تجمع آن‌ها بیشتر در نقاط ساحلی دریاها، اقیانوس‌ها و اکوسیستم‌های جنگل‌های مانگرو است و در کل با توجه به اقلیم آب و هوایی دریاها در سراسر دنیا، این سویه‌ها یا ساکن آب و هوای معتدله و سرد شمال (اقلیم معتدل) و یا ساکن اقلیم آب و هوایی ساحلی گرمسیری (اقلیم استوایی) هستند. کشور ایران در حوضه اقلیم آب و هوایی گرمسیری استوایی قرار دارد

www.SID.ir

Archive of SID

اما تا کنون جداسازی سویه‌های *ترائوستوکیتریدها* از این مناطق گزارش داده نشده است. در این پژوهش، برای نخستین بار از اکوسیستم‌های بسیار بکر و طبیعی جنگل‌های مانگرو در جنوب ایران نمونه‌برداری انجام شد.پس از انجام مراحل جداسازی و غربال‌گری تعدادی سویه جداسازی شد. سپس، با توجه به بررسی‌های میکروسکوپ نوری، فلوروسنت، ویژگی‌های ریخت‌شناسی، مولکولی و شاخص‌های رشدی و میزان تولید روغن و دوکوزاهگزانوئیک اسید، سویه *TA4* انتخاب شد. سویه پروتیست *TA4* مورد نظر دریازی بوده و بیشتر کلونی‌های آن بر روی برگ‌های درحال تجزیه وجود داشت. *ترائوستوکیتریدها* بسیار سریع رشد کرده و در بازه زمانی کوتاه بیومس قابل توجهی تولید می‌کنند. این سویه‌ها توانایی منحصر به فردی در تولید اسیدهای چرب غیراشباع به ویژه دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) دارند و با کنترل شرایط محیط کشت می‌توان به بازده‌های بسیار بالایی در تولید اسیدهای چرب امگا۳ دست یافت. همچنین، با توجه به پژوهش‌های انجام شده میزان کلسترول تولیدی توسط *ترائوستوکیتریدها* در حدود ۱/۳±۰/۰۴ بوده که از میزان کلسترول روغن ماهی (۵ تا ۸) میلی‌گرم در گرم کمتر است. در ضمن میزان تولید دوکوزاهگزانوئیک اسید سویه‌های *ترائوستوکیتریدها* در حدود ۲۰ تا ۴۵ درصد بوده، که در مقایسه با میزان دوکوزاهگزانوئیک اسید موجود در روغن ماهی (۲ تا ۸) درصد بسیار بیشتر است. همچنین، با توجه به اینکه این سویه‌ها پروتیست یوکاریوتی هستند، بر خلاف باکتری‌های پروکاریوت، مواد و ترکیبات مضری مانند: اندوتوکسین‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدها را برای سلامتی انسان ندارند. همچنین، این سویه‌ها توانایی بالایی در تولید پالمیتیک اسید دارند که می‌توان از آن به عنوان منبع بسیار مناسب برای سوخت زیستی استفاده کرد (۷).این پروتیست‌های با ارزش علاوه بر اسیدهای چرب امگا۳ و آنتی اکسیدان‌های طبیعی، قادر به تولید متابولیت‌های بسیار متنوع دیگری از قبیل استرول‌ها، استروئیدها، ترکیب با ارزش اسکوالن، سورفاکتانت و مواد متنوع زیست فعال از جمله پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی سولفاته، آنزیم‌ها، کوآنزیم‌های مختلف و کاروتنوئیدها به ویژه آستازانتین می‌باشند (۲ و ۲۱). با توجه به اینکه سویه آئورانتیوکیتریوم جداسازی شده از اکوسیستم مانگرو ایران در سواحل خلیج فارس و دریای عمان دارای توانایی بالقوه ای در تولید اسید چرب امگا۳ دوکوزاهگزانوئیک اسید است، می‌توان از این سویه در تولید صنعتی این ترکیب با ارزش استفاده کرد. *آئورانتیوکیتریوم TA4* یک سویه بومی تولید کننده روغن امگا۳ است. این سویه از جنگل‌های مانگرو خلیج فارس جداسازی شد و در محیط کشت حاوی گلوکز به عنوان منبع کربن، محتویات روغن تولیدی آن به بیش از ۵۰ درصد وزن خشک سلولی رسید. توانایی این سویه در تولید دوکوزاهگزانوئیک اسید تا بیش از ۲۰ درصد از کل مقدار روغن تولیدی است. در این پژوهش نشان داده شد که با توجه به پتانسیل بالای سویه‌های بومی *ترائوستوکیتریدها* در تولید اسیدهای چرب امگا۳ و به ویژه دوکوزاهگزانوئیک اسید، این سویه‌ها می‌توانند برای تولید صنعتی روغن‌های امگا۳ و دوکوزاهگزانوئیک اسید استفاده شوند. همچنین، با توجه به این‌که بهینه‌سازی محیط کشت هنوز انجام نشده، قابلیت این سویه در تولید اسیدهای چرب امگا۳ بدون بهینه‌سازی بسیار مناسب است.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های این پژوهش از محل اعتبار پژوهشی (۱/۱۸۴۹) دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته تامین شد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

(1) Raghukumar S. *Thraustochytrid* marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. *Marine Biotechnology* 2008; 10 (6): 631- 40.

(2) Gupta A., Barrow CJ., Puri M. Omega-3 biotechnology: *thraustochytrids* as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnology Advances* 2012; 30 (6): 1733- 45.

(3) Mendes A, Reis A., Vasconcelos R., Guerra P., Lopes da Silva T. *Crypthecodiniumcohnii* with emphasis on DHA production: a review. *Journal of Applied Phycology* 2009; 21 (2): 199- 214.

(4) Valentine R.C., Valentine DL. *Omega-3 fatty acids and the DHA principle*. Boca Raton: CRC press; 2010.

(5) Jakobsen A.N. Compatible solutes and docosahexaenoic acid accumulation of *thraustochytrids* of the *Aurantiochytrium* group [dissertation]. Trondheim: Norwegian university of Science and technology; 2008.

(6) Kidd P.M. Omega-3 DHA and EPA for cognition behavior and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Alternative Medicine Review* 2007; 12 (3): 207.

(7) Armenta RE., Valentine MC. Single-Cell Oils as a Source of Omega-3 Fatty Acids. *Journal of American Oil Chemist Society* 2013; 90: 167- 82.

(8) Yang H.L., lu K.C., Chen S.F., Chen Y.M., Chen Y.M. Isolation and characterization of Taiwanese heterotrophic microalgae: screening of strains for docosahexaenoic acid (DHA) production. *Marine Biotechnology* 2010; 12 (2): 173- 85.

(9) Kamlangdee N., Fan K. Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium sp.* isolated from mangrove. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 2003; 25: 643- 50.

(10) Rabinowitz C., Douek J., Weisz R., Shabtay A., Rinkevich B. Isolation and characterization of four novel *thraustochytrid* strains from a colonial tunicate. *Indian Journal of Marine Science* 2006; 35 (4): 341.

(11) Perveen Z., Ando H., Ueno A., Ito Y., Yamamoto Y., Yamada Y., et al. Isolation and characterization of a novel *thraustochytrid*- like microorganism that efficiently produces docosahexaenoic acid. *Biotechnology letters* 2006; 28 (3): 197- 202.

(12) Smedes F, Thomasen T.K. Evaluation of the Bligh & Dyer lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin* 1996; 32 (8): 681- 8.

(13) Burja A.M., Armenta RE., Radianingtyas H., Barrow CJ. Evaluation of fatty acid extraction methods for *Thraustochytrium sp. ONC-T18*. *Journal of Agricultural Food chemistry* 2007; 55 (12): 4795- 801.

(14) Iverson S.J., Lang S.L., Cooper M.H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 2001; 36 (11): 1283- 87.

(15) Hong W.K., Rairakhwada D., Seo P.S., Park S.Y., Hur B.K., Kim C.H., et al. Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated microalga, *Aurantiochytriumsp*. *KRS101*. *Applied biochemistry and Biotechnology* 2011. 164 (8): 1468- 80.

(16) Shantha N.C., Napolitano GE. Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography A* 1992; 624 (1): 37- 51.

(17) Xiao L. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from marine products [dissertation]. Bergen: University of Bergen; 2010.

(18) Horrocks L.A., Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmaceutical Research* 1999; 40 (3): 211- 25.

(19) Cohen Z., Ratledge C. *Single cell oil*. USA: AOCS Press Champaign; 2005.

www.SID.ir

Archive of SID

(20) Jakobsen A.N., Aasen I.M., Josefsen K.D., Strøm A.R. Accumulation of docosahexaenoic acid-rich lipid in *thraustochytrid Aurantiochytrium sp.* strain T66: effects of N and P starvation and O2 limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008; 80 (2): 297- 306.

(21) Doughman S.D., Krupanidhi S., Sanjeevi C.B. Omega-3 fatty acids for nutrition and medicine: considering microalgae oil as a vegetarian source of EPA and DHA. *Current Diabetes Reviews* 2007; 3 (3): 198- 203.

(22) Burja M., Radianingtyas H., Windust A., Barrow C. 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: 1161- 69.

[1]- Docosahexaenoic acid
[2]- Eicosapentaenoic acid
[3]- Poly unsaturated fatty acid
[4]- α-linolenic acid
[5]- *Japonochytrium*
[6]- *Aurantiochytrium*
[7]- *Ulkenai*
[8]- *Schizochytrium*
[9]- *Thraustochytrium*
[10]- *Crypthecodiniumcohnii*
[11]- *Thraustochytids*
[12]- Merk,Germany
[13]- Sigma,USA
[14]- *Avicennia marina*
[15]- *Rhizophoramucronata*
[16]- GYP
[17]- DMSO
[18]- UV
[19]- Bligh& Dyer
[20]- Na_2SO_4
[21]- Amoeboid
[22]- BLAST
[23]- MEGA4
[24]- Myristic acid
[25]- Pentadecanoicacid
[26]- Palmitic acid
[27]- Docosapentaenoic acid
[28]- *Aurantiochytrium sp.*
[29]- HDL
[30]- LDL
[31]- non cellulosic
[32]- L-galactose

www.SID.ir

Archive of SID

Investigation and production of omega 3 oil rich in docosahexaenoic acid by native strain of *Aurantiochytrium TA4*

Farzaneh Fekrat
M.Sc. of Agricultural Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, farzaneh.fekrat@gmail.com
Shahryar Shakeri *
Assistant Professor, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, sh.shakeri@kgut.ac.ir

Abstract

Introduction: Omega 3 fatty acids play an important role in human health. Docosahexaenoic acid is the most important of polyunsaturated fatty acids that is supplied through the consumption of fish oil. Consequently, there is a need for new alternative sources like as single cell oils, because of possibility of heavy metal contamination in fish oil.

Materials and methods: In this research, the samples were collected from mangrove forests in the Persian Gulf and Oman Sea. The strains of marine protist were isolated in GYP medium. Oil-producing strains were screened by fluorescence microscopy. Selected strain was identified by sequencing *18s rRNA* gene and polyunsaturated fatty acids profile was determined by gas chromatography.

Results: More than 20 marine protist strains were isolated. Triacylglycerol granules were detected in strain *TA4* by orange fluorescent. Dyad, tetrad, octad cells and zoospore were observed in cell cycle. *18s rRNA* gene sequence of this strain (1730 bp) was similar more than 97 % to *Aurantiochytrium* strain (Accession number: KJ938302). Its oil content is 46 % of CDW. The quantity of DHA, DPA and EPA fatty acids was 105, 46 and 26 mg per liter, respectively. Their contents were 16, 7 and 4 % of the total fatty acids, respectively.

Discussion and conclusion: Thraustochytrids strains have a unique ability to produce polyunsaturated fatty acids, especially DHA and can be an alternative to these valuable compounds. These strains can be used for production of omega 3 oils due to their potential for production of DHA.

Key words: Omega 3 fatty acids, Docosahexaenoic acid, Native strains of Thraustochytrids, *Aurantiochytrium*

* Corresponding author
Received: May 19, 2014 / **Accepted:** August 26, 2014

www.SID.ir