ترشح لیپاز و تولید دوکوزاهگزانوئیک اسید توسط سویه *آئورانتیوکیتریوم* رشد یافته در روغن کتان

ندا آموزیان[۱]، شهریار شاکری[۲*]، محمود ملکی[۳]، احمد شاکری[۴]

۱- کارشناس ارشد، رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

۲- استادیار، دکترای میکروبیولوژی صنعتی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

۳- استادیار، دکترای بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

٤- رزیدنت قلب و عروق، مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰٤/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۳)

چکیده

اسیدهای چرب امگا ۳ گروه بزرگی از اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشند. مهم‌ترین اسید چرب امگا۳، دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌باشد که اثرات مفیدی بر سلامتی انسان دارد. هدف این تحقیق، تبدیل روغن کتان توسط سویه بومی *آئورانتیوکیتریوم* به روغن امگا۳ غنی از DHA و اسید لینولنیک بود. ابتدا، تولید آنزیم لیپاز در این سویه و فعالیت آن در محیط مایع سنجش شد. سپس تولید بیومس و روغن امگا۳ در محیط حاوی مقادیر متفاوت روغن کتان تعیین شدند. مقدار اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، توسط کروماتوگرافی گازی تعیین شدند. سویه *آئورانتیوکیتریوم* بعد از گذشت ٤۸ ساعت در محیط اختصاصی تولید لیپاز، یک هاله رسوبی ٦ میلی‌متری ایجاد کرد. فعالیت لیپاز تولیدی در محیط حاوی ۱ درصد روغن کتان ۱۵۰ واحد در میلی‌لیتر اندازه گیری شد. پروفایل اسیدهای چرب تولید شده در محیط فاقد روغن کتان شامل C14، C15، C16، C17، C18، C18:1، DPAو DHA بود. با افزودن روغن کتان به محیط کشت، بیومس تا ۱۵/۷ گرم در لیتر افزایش یافت. بیشترین مقدار DHA (۳۸۸ میلی‌گرم در لیتر) و روغن (۵۳/۲۵٪) در محیط حاوی ۰/٦٪ روغن کتان بدست آمد. با افزایش غلظت روغن کتان در محیط کشت، مقدار اسیدهای چرب اشباع تولید شده کاهش و اسیدهای چرب غیراشباع با یک یا چند پیوند دوگانه افزایش یافتند. پروفایل اسیدهای چرب تولید شده در محیط حاوی روغن کتان شامل C18:2 و C18:3، DPA و DHA بود. در نهایت روغن امگا۳ تولید شده شامل DHA، اسید لینولنیک و اسید اولئیک بود که می‌تواند در غنی‌سازی مواد غذایی و لبنیات مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژگان: سویه *آئورانتیوکیتریوم*، روغن امگا۳، دوکوزاهگزانوئیک اسید، روغن کتان، اسید لینولنیک

* مسئول مکاتبات: sh.shakeri@kgut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۱- مقدمه

اسیدهای چرب دارای نقش کلیدی در متابولیسم، سوخت و ساز، ذخیره و انتقال انرژی، اجزای اصلی غشاها و تنظیم ژن می‌باشند [۱]. اسیدهای چرب امگا۳ از دسته اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند و زنجیره‌های کربنی طویل با چند پیوند دوگانه دارند. اسیدهای چرب امگا٦، اسیدهای چرب چندغیراشباع غالب در گیاهان و جانوران هستند. اسیدهای چرب امگا۳، معمولا در غذاهای دریایی و فیتوپلانکتون‌ها یافت می‌شوند [۲]. در بین اسیدهای چرب امگا۳، دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) از ۲۲ اتم کربن و ٦ پیوند دوگانه تشکیل شده است [۳]. امروزه مطالعات زیادی بر روی تاثیرات مثبت مصرف DHA بر سلامت، بینایی و بیماری های قلبی و عروقی صورت گرفته است. غشاهای سلولی برخی از بافت‌ها مانند شبکیه، مغز و میوکارد قلب به صورت خاص غنی از این اسید چرب می‌باشند. مصرف DHA در دوران بارداری و نوزادی برای رشد و تکامل مغز در کودکان زیر ۷ سال ضروری است و از این رو کمبود DHA ارتباط قوی را با عدم یادگیری نشان می‌دهد [٤, ٥]. ریزجلبک‌ها، گروه بزرگی از میکرو ارگانیسم‌ها می‌باشند که شامل پروکاریوت‌ها و تک سلولی‌های یوکاریوتی هستند. بعضی از این ریزجلبک‌ها می‌توانند محصولات با ارزشی مانند پیگمان‌ها (کاروتنوییدها و فیکوبیلین‌ها)، اسیدهای چرب غیراشباع، استرول‌ها و ویتامین‌ها را تولید کنند. ریزجلبک‌های ترائوستوکیترید که شامل سه جنس *اصلی* *Thraustochytrium*، *Schizochytrium* و *Aurantiochytrium* می‌باشند، توانایی تولید روغن‌های حاوی اسیدهای چرب امگا۳ را به مقدار قابل توجهی دارند. این سه جنس، هتروتروف هستند و برای رشد خود به منابع کربن و نیتروژن نیاز دارند و خیلی سریع رشد می‌کنند [۲]. بهترین منابع کربن برای تولید این اسیدهای چرب، گلیسرول و گلوکز و بهترین منابع نیتروژن، عصاره مخمر و پپتون می‌باشند. گلوکز باعث افزایش تولید بیومس و گلیسرول باعث افزایش تولید روغن امگا۳ می‌شود. همچنین این پروتیست‌های دریازی توانایی ترشح آنزیم‌های لیپاز، سلولاز و پروتئاز را دارند. تولید لیپاز در این سویه‌ها به آن‌ها توانایی استفاده از روغن‌ها را به عنوان منبع کربن می‌دهد. از این رو استفاده از روغن‌های مصرف شده و یا روغن‌های فاقد اسیدهای چرب امگا۳ و تبدیل آن‌ها به روغن‌های امگا۳ حاویDHA توسط این سویه‌ها بسیار با ارزش می‌باشد. یکی دیگر از روغن‌های غیراشباع مورد استفاده، روغن کتان می‌باشد. روغن کتان از دانه‌های کتان بدست می‌آید. این دانه‌ها حاوی پروتئین، فیبر، ویتامین‌های گروه ب و عناصر معدنی می‌باشند. همچنین دانه‌های کتان غنی از تیامین، منیزیم و فسفر هستند [٦]. روغن کتان نیز حاوی ٥٤٪ اسید چرب غیراشباع آلفا لینولنیک، ۱۸٪ اسید چرب امگا ۹ اولئیک، ٦٪ اسید چرب امگا ٦ لینولئیک و ٥٪ اسید چرب پالمیتیک می‌باشد. حدود ۷۲٪ از اسیدهای چربی که در روغن کتان وجود دارند، اسیدهای چرب غیراشباع هستند. روغن کتان غنی از آلفا لینولنیک است که یکی از اسیدهای چرب مهم در رژیم غذایی می باشد [٦, ۷]. آلفا لینولنیک اسید، یکی ازاسیدهای چرب اصلی خانواده امگا۳ است. این اسید چرب می تواند به عنوان پیش‌ساز بسیاری از اسیدهای چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA 20:5 n-3)، دوکوزاپنتانوئیک اسید (DPA, 22:5 n-3) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA, 22:6 n-3)مورد استفاده قرار گیرد [۸, ۹]. تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که استفاده از روغن کتان در هضم و کارکرد کبد موثر است و سطح کلسترول خون و فشار خون را کاهش می دهد. همچنین روغن کتان، تاثیرات ضد سرطانی بر روی سزطان های پستان، پروستات و روده دارد و از هایپرگلایسیما، ترومبوزیز، سکته قلبی و بیماری‌های قلبی جلوگیری می‌کند [٦, ۱۰]. البته این اسید چرب با اینکه جزو اسیدهای چرب امگا۳ می‌باشد اما خواص دارویی و غذایی بسیار کمتری نسبت به دوکوزاهگزانوئیک اسید دارد. تنها تحقیقی که در مورد تاثیر روغن کتان در محیط کشت سویه *شیزوکیتریوم* بر تولید DHA گزارش شده، توسط گافنی و همکاران[1] می باشد [۱۱]. نتایج تحقیق ذکر شده نشان دادند که افزودن ۰/۰۵ درصد حجمی به حجمی (% v/v) از روغن کتان به محیط کشت سویه تولید کننده روغن امگا ۳، سبب ورود اسید چرب آلفا لینولنیک اسید به پروفابل اسیدهای چرب تولیدی در سویه می شود. علاوه بر این، تولید DHA، ظرفیت آنتی اکسیدانتی و فنلی در این سویه بطور معنی داری افزایش یافته بود. نکته مهم اینکه در تحقیق ذکر شده، فعالیت آنزیمی لیپاز توسط سویه، مورد بررسی قرار نگرفته و مشخص نشده که آیا سویه مورد بررسی، آنزیم لیپاز تولید می کند یا خیر؟ زیرا تولید این آنزیم،

1. Gaffney et al.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

تاثیر قابل توجهی بر تجزیه روغن در محیط کشت و استفاده از آن به عنوان منبع کربن می گذارد. از این رو در تحقیق حاضر، در ابتدا فعالیت آنزیم لیپازی در سویه بومی تولید کننده روغن امگا ۳ مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت و سپس به بررسی اثر مقادیر متفاوت از روغن کتان در محیط کشت بر تولید بیومس، روغن و پروفایل اسیدهای چرب تولیدی پرداخته شد. هدف این تحقیق تبدیل روغن کتان به یک روغن امگا۳ غنی از دوکوزاهگزانوئیک اسید به همراه آلفا لینولنیک اسید و اولئیک اسید توسط سویه های *آئورانتیوکیتریوم* ترشح کننده لیپاز بود.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- سویه *آئورانتیوکیتریوم*

سویه بومی *آئورانتیوکیتریوم* از کلکسیون میکروبی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته تهیه شد. این سویه قبلا با استفاده از آنالیزهای مولکولی شناسایی شده است. فعال سازی سویه بر روی محیط GYP[1] انجام گرفت. این محیط کشت حاوی، ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱ گرم بر لیتر پپتون، ۱ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۰/۳ گرم بر لیتر پنی‌سیلین، ۰/۳ گرم بر لیتر استرپتومایسین، ۲۰ گرم بر لیتر آگار و ۵۰٪ آب دریا می‌باشد. شماره پذیرش این سویه در بانک ژنی NCBIبصورت *Aurantiochytrium* sp qe-4 (KR091914) می‌باشد.

۲-۲- بررسی تولید آنزیم لیپاز در سویه *آئورانتیوکیتریوم*

۱-۲-۲- بررسی هاله رسوبی حاصل از فعالیت آنزیم لیپاز در محیط جامد

در ابتدا برای بررسی تولید لیپازهای خارج سلولی، محیط کشت جامد حاوی روغن کتان تهیه شد و پس از اتوکلاو در زیر هود لامینار در پلیت‌ها توزیع شد. البته می توان روغن کتان را نیز بعد از فرآیند اتوکلاو به محیط کشت افزود، همچنین روغن موجود در محیط کشت درحین اتوکلاو، دستخوش تغییر نشده و اسیدهای چرب آن آزاد نمی شوند. رها سازی اسیدهای چرب در محیط با مشاهده رسوب سفید رنگ قابل ردیابی هستند. این محیط شامل آگار (۱۵ gr/lit)، عصاره‌ی مخمر (۱ gr/lit)، پپتون (۱ gr/lit) و روغن کتان به میزان ۱v/v٪ و۵۰٪ آب دریا می باشد. همچنین این محیط حاوی ۱ تا ۲ قطره توین ۸۰ و ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$ می‌باشد. کشت سویه‌ها روی پلیت‌های جامد صورت گرفت و در دمای ۳۰ درجه گرمخانه‌گذاری شدند. مشاهده‌ی هاله‌های رسوبی و حاصل از تجزیه سوبسترای لیپیدی و آزادسازی اسیدهای چرب پس از ۲٤ و ٤۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. و قطر هاله ها بر حسب میلی متر اندازه گیری شد [۱۲].

۲-۲-۲- تولید لیپاز در محیط مایع

به منظور تهیه‌ی محیط مایع جهت سنجش فعالیت آنزیم لیپاز ابتدا محیط کشت شامل روغن کتان (۱٪ v/v)، پپتون (۱ gr/lit)، عصاره ی مخمر (۱ gr/lit)، یک تا دو قطره توئین ۸۰ و ۵۰٪ آب دریا تهیه شد و سپس ۵۰ میلی‌لیتر در ارلن‌های به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر توزیع شد. ارلن‌ها سپس در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانت‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از اتوکلاو و سرد شدن محیط‌های کشت، تلقیح کشت‌های مایع با سویه مورد نظرانجام شد. یک لوپ از سویه‌ی مورد نظر در محیط تلقیح شد و ارلن‌های تلقیح شده در شیکرآنکوباتور در دمای ۳۰ درجه، سرعت ۱۵۰ rpm و در تاریکی، به مدت ٤ روز جهت تولید لیپازهای خارج سلولی قرار داده شدند. پس از اتمام مدت زمان آنکوباسیون، جداسازی مایع رویی۲ و بیومس سلولی۳ صورت گرفت [۱۳].

۳-۲-۲- تولید لیپاز خارج سلولی با استفاده از پلیت‌های کروموژنیک

به منظور بررسی فعالیت لیپازی در سوپرناتانت، محیط کشت مایع حاوی سویه‌ی رشد یافته با دور ٤۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ٤درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و پس از جداسازی سوپرناتانت از بیومس سلولی دیسک‌های کاغذی در سوپر ناتانت سلولی به مدت ۱۰ دقیقه غوطه ور شده و پس از خشک شدن روی پلیت‌های کروموژنیک فنول رد قرار داده شدند. این محیط شامل فنول رد (۱٪)، آگار (۱۵ gr/lit)، کلریدکلسیم (۱۰ میلی مولار)، روغن کتان ۱٪ و توئین ۸۰ به میزان یک تا دو قطره و۵۰٪ آب دریا می‌باشد. قابل ذکر است که تنظیم pH قبل از افزودن فنول رد انجام شد. فنول رد در

1. Glucose-Yeast extract-Peptone medium

2. Supernatant
3. Biomass

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

محدوده‌ی pHبین ۷/۳ تا ۷/٤ به رنگ قرمز می‌باشد و در pHاسیدی به رنگ زرد تغییر رنگ می‌کند. پس از آنکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد هاله‌های زرد رنگ اطراف دیسک‌های کاغذی اندازه گیری شدند که نشان دهنده‌ی تولید لیپاز در سوسپانسیون محیط کشت و تجزیه روغن کتان می‌باشند. این هاله‌ها در فواصل زمانی ۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت مشاهده شده و قطر آن‌ها اندازه گیری شد [١٤].

٤-۲-۲- سنجش فعالیت آنزیم لیپاز

بعد از نمونه برداری، سوسپانسیون سلولی با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه و دمای ٤درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس یک میلی‌لیتر از سوپرناتانت به ۵ میلی‌لیتر از سوبسترای سنجش فعالیت لیپاز شامل روغن زیتون و یکدهم مولار هیدروکسید سدیم و پلی وینیل الکل دو درصد به همراه ٤ میلی لیتر بافر فسفات یک دهم مولار با pH برابر با ۷ اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بنماری شیکر دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد. برای متوقف کردن واکنش، ۵ میلی‌لیتر محلول متوقف کننده شامل الکل واستون (v/v ۱/۱) اضافه شد. سپس ۳ قطره از محلول فنل فتالئین دو درصد اضافه شده و با هیدروکسید سدیم ۵۰ میلی مولار تیتراسیون انجام شد. در نهایت فعالیت لیپاز بصورت واحد در میلی لیتر محاسبه شد. یک واحد فعالیت آنزیمی، معادل مقدار آنزیمی است که یک میکرومول اسید چرب را در یک دقیقه آزاد می‌کند [۱۵].

۳-۲- بررسی تولید بیومس و روغن در محیط های حاوی روغن کتان

محیط پایه شامل گلوکز ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۱ گرم، پپتون ۱ گرم، ۵۰٪ آب دریا و ۲-۱ قطره توئین ۸۰ می باشد. به محیط پایه، روغن کتان با مقادیر ٪۰/۲، ٪۰/٤، ٪۰/٦، ۰/۸٪ و ۱٪ اضافه شد. محیط‌ها بعد از تلقیح توسط سویه فعال، در دمای ۳۰ درجه و ۱۵۰rpm به مدت ۹٦ ساعت (٤ روز) آنکوبه شدند. سپس نمونه برداری ازمحیط‌ها صورت گرفت. برای جداسازی بیومس سلولی سانتریفیوژ در دور rpm ۵۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در نهایت بیومس سلولی برای انجام آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت [١٦].

٤-۲- تعیین وزن خشک سلولی

جهت سنجش وزن خشک سلولی، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت در rpm ۱۰۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، سوپرناتانت دور ریخته شد و سپس پلت سلولی جهت خشک شدن و تبخیر آب در آون با دمای ۱۰۵ درجه تا رسیدن به وزن ثابت قرار داده شد.

۵-۲- استخراج روغن از بیومس سلولی

برای استخراج روغن، ابتدا مقدار مشخصی از بیومس سلولی را وزن کرده و به فالکون انتقال داده شد، سپس به آن مقدار ۲ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد، پس از آن بیومس سلولی توسط دستگاه آلتراسونیک به مدت ۵ دقیقه هموژن شد. سپس مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول کلروفرم و ۵ میلی‌لیتر از محلول متانول به آن اضافه شد و توسط دستگاه هموژنایز و آلتراسونیک پخش شدن و خرد شدن دیواره سلولی به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. مجددا مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به دنبال آن به مدت ۲ دقیقه هموژنایز و ورتکس انجام شد. سپس سوسپانسیون را در rpm ٤۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده که به دنبال آن سه فاز تشکیل شد. فاز بالایی مربوط به متانول بوده، فاز وسط بیومس می‌باشد و فاز زیرین مربوط به کلروفرم است که چربی‌ها را در خود حل می‌کند. بنابراین فاز زیرین (فاز آلی) را برداشته و به فالکون تمیز از قبل وزن شده دیگر انتقال داده و سپس عمل تبخیر حلال کلروفرم در زیر هود انجام شد [۱۷].

٦-۲- آنالیز کروماتوگرافی گازی جهت تعیین مقدار دوکوزاهگزانوئیک اسید، آلفالینولنیک اسید و اولئیک اسید

در این تحقیق جهت محاسبه مقدار اسید های چرب اشباع و غیراشباع و همچنین پروفایل اسیدهای چرب تولیدی توسط سویه بومی، آنالیز متیل استرهای اسید چرب تولید شده توسط کروماتوگرافی گازی صورت گرفت.

۱-٦-۲- روش تهیه محلول ترانس استریفیکاسیون

محلول واکنش مورد استفاده جهت تبدیل روغن‌های استخراج شده به فرم متیل استر اسید چرب، سولفوریک اسید متانولی٤٪ می‌باشد. مقدار مشخصی از روغن استخراج شده را وزن کرده و آن را به لوله آزمایش منتقل کرده و سپس به آن مقدار ۳ میلی‌لیتر سولفوریک اسید متانولی ٤٪ اضافه کرده و درب لوله آزمایش محکم بسته شد. سپس نمونه در بن ماری و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از اتمام زمان فوق، نمونه را برداشته و در دمای محیط جهت سرد شدن قرار داده شد. سپس به آن ۱ میلی‌لیتر آب اضافه کرده و ۳۰ ثانیه ورتکس انجام شد. پس از آن ۱میلی‌لیتر هگزان افزوده و مجددا ۳۰ ثانیه ورتکس انجام شد. برای مدتی نمونه را ثابت گذاشته تا دو فاز تشکیل دهد، پس از آن فاز بالایی (فاز آلی) که شامل فاز متیل استرهای موجود در هگزان بوده را برداشته و به یک اپندورف تمیز انتقال داده شد و به مقدار کم (نوک یک اسپاتول) از نمک Na_2SO_4 جهت جذب آب یا اسید در محلول اضافه شد. سپس ۳۰ ثانیه ورتکس انجام شد و دوباره فاز آلی را برداشته و به یک اپندورف تمیز انتقال داده شد. برای تزریق نمونه به دستگاه کروماتوگرافی آن را رقیق کرده، به این صورت که ۵۰۰ ماکرولیتر از نمونه را برداشته و در اپندورف دیگر ۵۰۰ ماکرولیتر حلال هگزان به آن افزوده و سپس مجددا ۳۰ ثانیه ورتکس انجام شد و نمونه جهت آنالیز کروماتوگرافی آماده و تا زمان تزریق به دستگاه در یخچال ٤ درجه نگهداری شد. پس از تزریق نمونه به دستگاه و اتمام آنالیز، جهت نگهداری استوک، نمونه در فریزر ۲۰- نگهداری شد. برای شناسایی اسیدهای چرب از استاندارد این اسیدها استفاده شد.

۷-۲- آنالیز آماری

تمام داده ها حاصل سه تکرار از آزمایشات می باشند. همچنین آنالیز آماری نتایج توسط نرم افزار SPSS (version 16) انجام شد ($P<0.05$).

۳- نتایج و بحث

۱-۳- بررسی تولید لیپاز خارج سلولی

سویه *آئورانتیوکیتریوم* بر روی محیط اختصاصی تولید لیپاز کشت داده شد. هاله تشکیل شده در اطراف کلنی نشان دهنده‌ی مصرف روغن کتان به عنوان منبع کربن مورد نیاز سویه است. مشاهده‌ی هاله اطراف کلنی پس از ۲٤و ٤۸ ساعت انجام شد و قطر هاله بر حسب میلی‌متر اندازه گیری شد (شکل ۱ قسمت A). نتایج نشان داد، که قطر هاله رسوبی حاصل از ترشح لیپاز و تجزیه روغن و آزادسازی اسیدهای چرب در ٤۸ ساعت از انکوباسیون، ٦ میلی‌متر می‌باشد. به منظور بررسی وتایید فعالیت لیپازی سویه در سوپرناتانت، دیسک‌های کاغذی با سوپرناتانت محیط کشت آغشته و خشک شدند و سپس، تلقیح دیسک‌های فوق به محیط جامد حاوی فنل رد صورت گرفت. سوپر ناتانت حاوی لیپاز خارج سلولی سویه مورد نظر با تجزیه‌ی روغن کتان موجود در محیط کروموژنیک و رهاسازی اسیدهای چرب منجر به کاهش pHو تغییر رنگ فنول رد از قرمز به رنگ زرد شد. بر اساس مشاهدات، اندازه هاله زرد رنگ ٤ میلی‌متر محاسبه شد (شکل ۱ قسمت B). بهینه فعالیت این آنزیم در pH بین ۷/۵ تا ۸ می باشد.

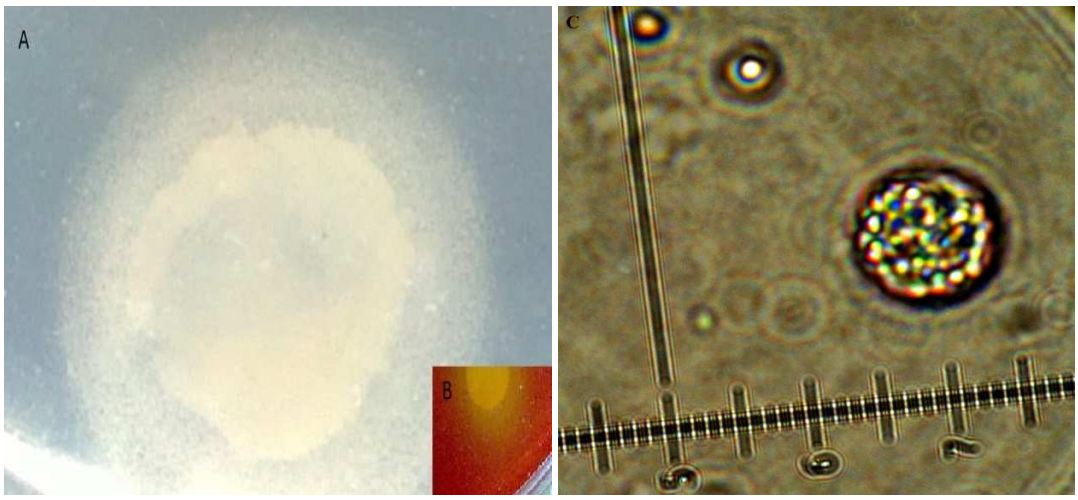

Fig 1 A) Formation of precipitated halo zone by lipase activity around the colony of *Aurantiochytrium* strain. B) Yellowish halo caused by lipase activity and subsequently reduction in pH on chromogenic medium containing phenol red and flaxseed oil. C) Cellular morphology of *Aurantiochytrium* strain in lipase production medium, intracellular oil granules was observed as bright spots.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

جهت سنجش فعالیت لیپازی سویه آئورانتیوکیتریوم از محیط کشت تولید لیپاز حاوی روغن کتان، عصاره مخمر و پپتون استفاده شد. روغن کتان به عنوان تنها منبع کربن در این محیط مورد استفاده قرار گرفت و رشد سویه و تولید لیپاز به مدت ٤ روز مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت لیپاز بعد از این مدت ۱۵۰ واحد در میلی‌لیتر اندازه گیری شد. شکل ۱ قسمت C مورفولوژی سلولی سویه *آئورانتیوکیتریوم* را در این محیط نشان می دهد. ذرات چربی ذخیره شده در داخل سلول بصورت گرانول های شفاف قابل مشاهده هستند.

۲-۳- تولید بیومس، روغن و اسیدهای چرب در محیط پایه بدون روغن کتان

محیط پایه مورد استفاده در این تحقیق حاوی ۱۰ گرم در لیتر گلوکز و فاقد روغن کتان می‌باشد. در این محیط بیومس و روغن به ترتیب ۱/۷۳ و ۱/۲۳ گرم در لیتر تولید شدند. درصد روغن تولیدی نسبت به وزن خشک سلولی ۷۱/۰۹٪ بدست آمد. مقدار DHA تولیدی در این محیط ۸۸/۹ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد و همچنین مقدار کل اسیدهای چرب تولیدی برابر با ۷۱۰/۹ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. پروفایل و کروماتوگرام اسیدهای چرب تولیدی در این محیط در شکل ۲ نشان داده شده‌اند. پیک اسید چربی که در دقیقه ١٤/٨٢ از دستگاه خارج شده است مربوط به اسید چرب C14 یا مریستیک اسید با ٥٤/٤٨ میلی‌گرم بر لیتر و ٤/٤٣٪ از کل اسیدهای چرب تولید شده توسط سویه می‌باشد. پیک بعدی مربوط به اسید چرب C15 یا پنتادکانوئیک اسید می‌باشد که در دقیقه ۱۵/۸۳ از ستون دستگاه خارج شده است. مقدار و درصد این اسید چرب به ترتیب ۷۸/۵۹ میلی‌گرم بر لیتر و ٦/٣٩٪ می‌باشند. پیک مربوط به اسید چرب C16 یا همان پالمیتیک اسید، در دقیقه ١٧/١٤ مشاهده شد. مقدار و درصد این اسید چرب برابر با ۸۵۲/۳۹ میلی‌گرم بر لیتر و ٦٩/٣٠٪ می‌باشد. پالمیتیک اسید در سویه‌های ترائوستوکیتریدها به عنوان یک ترکیب شاخص بوده و به مقدار زیاد تولید می‌شود. در این سویه نیز بیشترین مقدار اسیدهای چرب تولیدی مربوط به پالمیتیک اسید می‌باشد. پیک های اسیدهای چرب C17، C18و C18:1 بین زمان های ۱۸ تا ۲۱ دقیقه مشاهده شدند. دو پیک آخر به ترتیب مربوط به DPA و DHA می‌باشد که در دقیقه ۲۸ و ۲۹ از ستون دستگاه خارج شده‌اند. مقدار این اسیدهای چرب به ترتیب برابر با ٢٦/٤٤ و ۸۸/۹۲ میلی‌گرم بر لیتر و درصد این اسیدها برابر با ٢/١٥٪ و ٧/٢٣٪ می‌باشد.

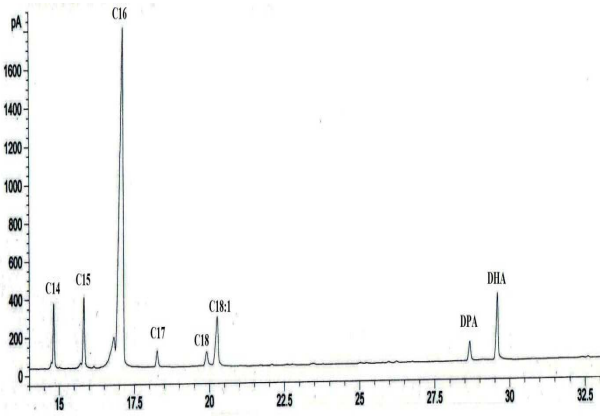

Fig 2 Gas chromatogram of extracted fatty acids from basal medium containing glucose as sole carbon source

محتویات پالمیتیک اسید و DHA در روغن تولیدی در این محیط برابر با ٦٩/٣ ٪ و ٧/٢ ٪ از کل اسیدهای چرب می باشند. منابع کربن و نیتروژن، مواد مغذی و ضروری برای رشد سلول‌ها و تولید روغن‌های امگا۳ در این سویه‌ها می‌باشند. ترائوستوکیتریدها می‌توانند یک طیف وسیع از منابع کربن را برای تولید DHA مورد استفاده قرار دهند [۱۷]. البته گلوکز و گلیسرول دو تا از بهترین منابعی هستند که بیشترین بازدهی را در تولید بیومس و تولید روغن دارند. اگرچه نوع و مقدار منابع کربن استفاده شده برای دست یافتن به مقدار بیشتر لیپید و DHA مهم می باشد، نسبت مقدار کربن به نیتروژن نیز از اهمیت خاصی برخوردار است. نسبت بالای کربن به نیتروژن به طور کلی برای ذخیره لیپید توسط سویه ترجیح داده می‌شود. یوکوچی و هوندا[1] در سال ۱۹۹۸ پی بردند، زمانی‌که سویه‌های *آئورانتیوکیتریوم* از گلیسرول به جای گلوکز استفاده می کنند، تولید اسیدهای چرب در آن‌ها افزایشپیدا می‌کند [۱۹]. گلیسرول در ساختار اسیدهای چرب و سنتز دانه‌های ذخیره‌ای تری‌آسیل‌گلیسرول یا همان دانه‌های چربی مورد استفاده قرار می گیرد و از این‌رو سویه *آئورانتیوکیتریوم*، روغن بیشتری نسبت به بیومس تولید می‌کند. در حقیقت گلیسرول اسکلت اصلی چربی‌ها و روغن‌ها می‌باشد که مولکول‌های اسید چرب به آن متصل شده‌اند [۲۰].

1. Yocochi and Honda

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۳-۳- تولید بیومس، روغن و اسیدهای چرب در محیط پایه حاوی مقادیر متفاوت از روغن کتان

به محیط پایه حاوی گلوکز ۱۰ گرم بر لیتر مقدارهای متفاوتی از روغن کتان بین ۰/۲ تا ۱ درصد اضافه شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است با افزایش مقدار روغن کتان، تولید بیومس سلولی نیز افزایش پیدا کرده است. بیومس سلولی در محیط پایه ۱/۷۳ گرم بر لیتر بوده که با افزایش مقدار روغن کتان به ۱ درصد، ۱۵/۷ گرم بر لیتر بیومس تولید شده است که مقدار قابل ملاحظه‌ای می‌باشد. به همین صورت تولید روغن در این سویه نیز با افزایش مقدار روغن کتان در محیط کشت، یک روند رو به افزایش را نشان می‌دهد. این روند افزایشی تا محیط حاوی ٪۰/٦ روغن کتان‌می‌باشد و بعد از آن مقدار روغن تا حدودی کاهش پیدا کرده است. در این محیط ٥/٦٤ گرم بر لیتر روغن امگا ۳ تولید شده است. مقدار روغن بر حسب درصد وزن خشک سلولی تقریبا یک روند کاهشی را نشان داد. درصد روغن تولیدی در محیط حاوی ٪۰/٦ روغن کتان برابر با ٪٥۳/۲٥ بدست آمد. میزان تولید بیومس با افزایش روغن کتان در محیط کشت نسبت به تولید روغن توسط سویه‌ها بسیار بیشتر می‌باشد و با توجه به اینکه میزان روغن بر حسب گرم در لیتر نیز یک روند افزایشی داشته اما درصد آن نسبت به بیومس سلولی کاهش نشان می‌دهد.

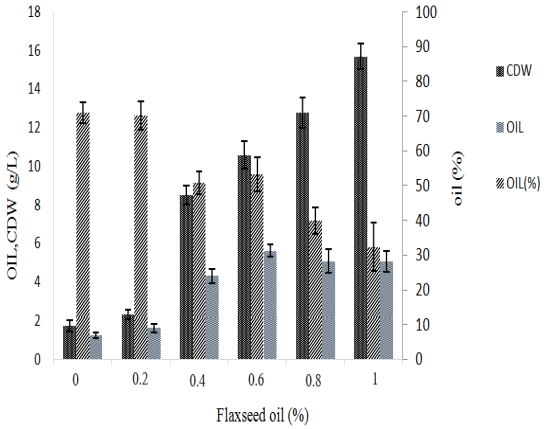

Fig 3 Production of biomass and oil in basal medium and media containing 0.2-1% of flaxseed oil. Maximum production of biomass was observed in medium containing 1% of flaxseed oil and highest amount of oil was produced in medium containing 0.6% flaxseed oil. (CDW: Cell dry weight).

٤-۳- تولید اسید چرب دوکوزاهگزانوئیک اسید در محیط های حاوی روغن کتان

با افزایش مقدار روغن کتان تا ٪۰/٦ در محیط کشت، درصد DHAاز کل اسیدهای چرب تولیدی یک روند افزایشی نشان داده و پس از آن کاهش پیدا کرده است. درصد DHA تولیدی در محیط پایه و محیط حاوی ٪۰/٦ روغن کتان به ترتیب برابر با ۷/۲۳ و ٦/۸۹٪ می باشند (شکل ٤). مقدار DHA تولیدی بر حسب میلی‌گرم در لیتر نیز با افزایش مقدار روغن کتان، افزایش یافته است. بیشترین مقدار DHA تولیدی در محیط ٪۰/٦ نمایان شده و مقدار آن برابر با ۳۸۸ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. مقدار DHA تولید شده در محیط پایه ۸۸/۹ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد که در مقایسه با محیط حاوی ٪۰/٦ روغن کتان کمتر می‌باشد.

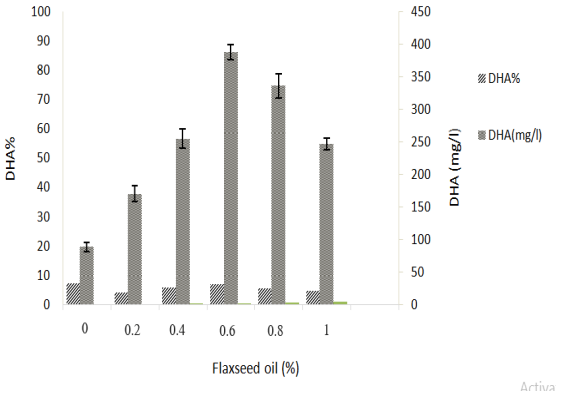

Fig 4 The amount of DHA in basal medium and media containing flaxseed oil. High amount of DHA was produced in 0.6% flaxseed oil medium.

در این تحقیق از روغن کتان به عنوان یک سوبسترا و منبع کربن مناسب برای تولید روغن امگا ۳ غنی از DHA استفاده شد. البته روغن تولید شده علاوه بر DHA، سرشار از اسید چرب امگا۳ لینولنیک اسید نیز بود. سویه‌های *آئورانتیوکیتریوم* با ترشح لیپاز و تجزیه چربی به اسیدهای چرب آزاد و همچنین گلیسرول، سبب جذب آسان آن ها به سلول می شوند. همان‌طور که گفته شد گلیسرول جذب شده سبب افزایش تولید روغن در سویه‌های *آئورانتیوکیتریوم* شده و در نتیجه با افزایش سنتز اسیدهای چرب، روغنی تولید می‌شود که علاوه بر DHA حاوی لینولنیک اسید نیز می‌باشد [۲۱, ۲۲]. مقدار کل اسیدهای چرب تولید شده بر حسب میلی گرم در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

هر گرم از بیومس تولیدشده و DHA بر حسب میلی گرم در هر گرم روغن تولید شده در شکل ۵ نشان داده شده اند. با افزایش مقدار روغن کتان در محیط کشت سویه، مقدار بیومس و روغن تولیدی افزایش چشمگیری داشته اند، از این رو مقدار کل اسیدهای چرب و DHA تولیدی بر حسب میلی گرم در گرم بیومس و یا روغن کاهش داشتند. میزان کل اسیدهای چرب تولیدی بر حسب بیومس تولید شده در محیط های حاوی روغن کتان یک روند کاهشی داشته است. در بین این محیط ها به ترتیب بیشترین و کمترین میزان کل اسیدهای چرب تولیدی مربوط به محیط حاوی ٪۰/۲ و ٪۱ روغن کتان می‌باشد. در مورد مقدار تولید DHA بر حسب میزان روغن تولید شده، نتایج مشابهی حاصل شدند. با این تفاوت که بیشترین‌میزان تولید DHA مربوط به محیط ٪۰/٦ و کمترین تولید آن مربوط به محیط ٪۱ می‌باشد.

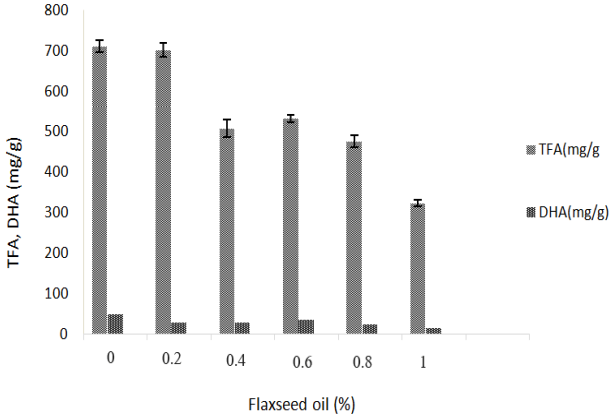

Fig 5 Content of total fatty acids (TFA) (mg/g biomass) and DHA (mg/g TFA)in basal medium and media containing different concentrations of flaxseed oil.

۵-۳- بررسی تولید اسیدهای چرب اشباع، تک غیراشباع و چندغیراشباع در محیط حاوی روغن کتان

اسیدهای چرب اشباع شامل میریستیک (C14)، پنتادکانوئیک (C15)، پالمیتیک (C16) و استئاریک اسید (C18) می باشند که توسط سویه *آئورانتیوکیتریوم* تولید شده‌اند. تولید این اسیدهای چرب اشباع توسط این سویه با افزایش مقدار روغن کتان در محیط کشت، کاهش یافته است. بدین صورت که بیشترین تولید اسید چرب اشباع (٪۸٤) مربوط به محیط پایه و کمترین تولید آن (٪۳۳) مربوط به محیط حاوی ٪۱ روغن کتان می‌باشد (شکل ٦).

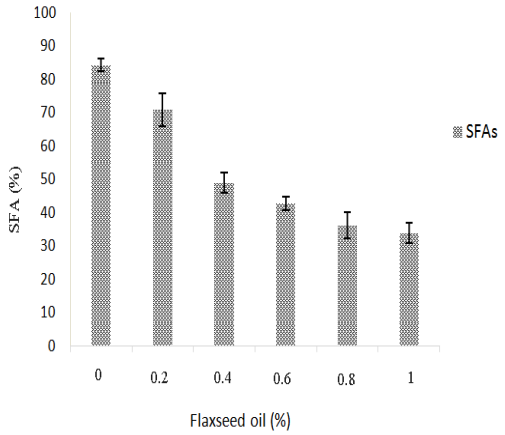

Fig 6 Composition of saturated fatty acids (SFAs) in basal medium and media containing different concentrations of flaxseed oil. The amount of SFAs was decreased when concentration of flaxseed oil was increased in medium.

اسید چرب غیراشباع با یک پیوند دوگانه شامل اولئیک اسید (C18:1) می‌باشد که توسط سویه *آئورانتیوکیتریوم* تولید شده است. تولید این اسید چرب غیراشباع با یک پیوند دوگانه با افزایش مقدار روغن کتان در محیط کشت، افزایش یافته است. بدین صورت که بیشترین تولید اسید چرب اولئیک مربوط به محیط حاوی ٪۱ روغن کتان و کمترین تولید آن مربوط به محیط کشت پایه می‌باشد (شکل ۷).

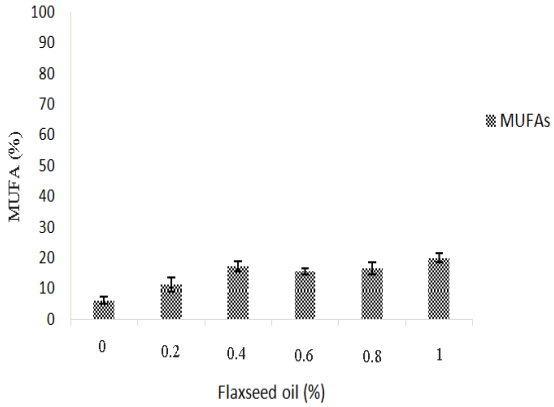

Fig 7 Composition of mono-unsaturated fatty acids (MUFAs) in basal medium and media containing different concentrations of flaxseed oil. The amount of MUFAs was enhanced when concentration of flaxseed oil increased in medium.

اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه شامل لینولئیک (C18:2)، لینولنیک (C18:3)، دوکوزاپنتانوئیک (C22:5) و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

دوکوزاهگزانوئیک اسید اسید (C22:6) می‌باشند که توسط سویه *آئورانتیوکیتریوم* تولید شده‌اند. تولید این اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه با افزایش مقدار روغن کتان در محیط کشت، افزایش یافته است. بدین صورت که بیشترین تولید کل اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه مربوط به محیط حاوی ۱٪ روغن کتان و کمترین تولید آن مربوط به محیط پایه بدون روغن کتان می‌باشد (شکل ۸). بیش از ٤٦٪ از اسیدهای چرب تولید شده در محیط حاوی ۱٪ روغن کتان مربوط به اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه می‌باشند.

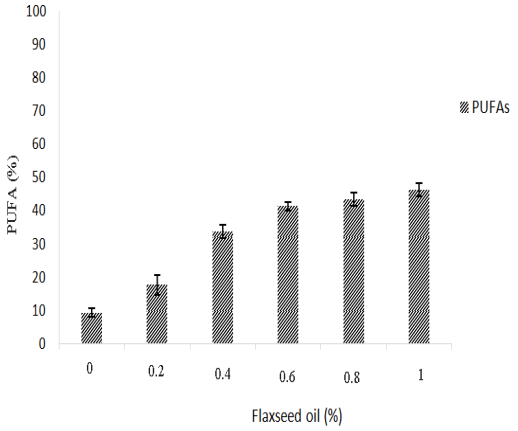

Fig 8 Composition of poly-unsaturated fatty acids (PUFAs) in basal medium and media containing different concentrations of flaxseed oil. The amount of PUFAs was significantly enhanced when concentration of flaxseed oil increased in medium.

٦-۳- تولید بیومس، روغن و اسیدهای چرب در محیط پایه حاوی روغن کتان

بهترین محیط تولید اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه شامل DHA محیط حاوی ۰/٦٪ روغن کتان می‌باشد. در این محیط بیومس و روغن به ترتیب ۱۰/۵۹ و ٥/٦٤ گرم در لیتر تولید شدند. درصد روغن تولیدی نسبت به وزن خشک سلولی۵۳/۲٪ بدست آمد. مقدار DHA تولیدی در این محیط ۳۸۸ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد. پروفایل و کروماتوگرام اسیدهای چرب تولیدی در این محیط در شکل ۹ نشان داده شده‌اند. پیک ابتدایی مربوط به اسید چرب C14 یا مریستیک اسید است که در دقیقه ١٤/٨٢ از ستون دستگاه خارج شد. مقدار این اسید چرب ۱۲۹/۱۵ میلی گرم و ۲/۲۹٪ از کل اسیدهای چرب است. پیک دوم مربوط به اسید چرب C15 یا پنتادکانوئیک اسید با مقدار ١٦٠/٧٤ میلی‌گرم و ۲/۸۵٪ از کل اسیدهای چرب می‌باشد. پیک مربوط به C16 یا اسید پالمیتیک در دقیقه ۱۷/۰٦ از ستون دستگاه خارج شده است. مقدار و درصد این اسید چرب، به ترتیب برابر با ۱۸٤٦/۵۳ میلی‌گرم و ۳۲/۷٤٪ می‌باشد پیک های اسیدهای چرب C17، C18، C18:1 و C18:2 در زمان های ۱۸ تا ۲۱ دقیقه از ستون دستگاه خارج شده اند. پیک مربوط به اسید چرب آلفا لینولنیک در زمان ۲۲/۲ دقیقه از ستون خارج شده است. این اسید چرب نیز ۲٦/۱ ٪ از کل اسیدهای چرب تولیدی توسط سویه را تشکیل داده است. پیک بعدی‌مربوط به DPA یا دوکوزاپنتاونئیک اسید می‌باشد که در دقیقه ۲۹ مشاهده شده است. مقدار این اسید ۹۵/۳۱ میلی گرم و درصد آن برابر با ۱/٦۹٪ از کل اسیدهای چرب است. پیک آخر مربوط به DHAیا دوکوزاهگزانوئیک اسید می‌باشد. مقدار و درصد این اسید چرب برابر با ۳۸۸/۵۹ میلی‌گرم و ٦/۸۹٪ می‌باشد.

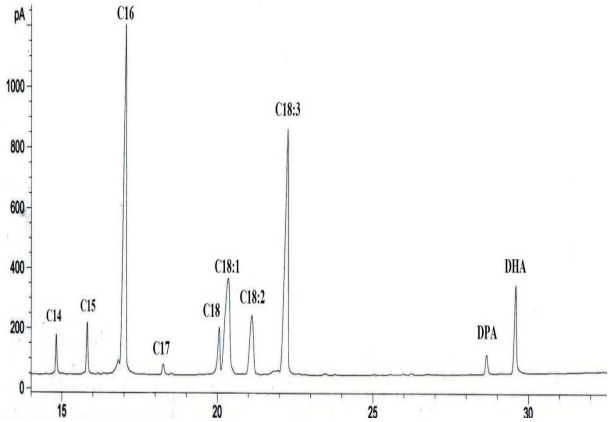

Fig 9 Gas chromatogram of extracted fatty acids from medium containing 1% of flaxseed oil. This profile is including 10 different saturated, mono saturated and poly unsaturated fatty acids.

مقدار کل اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه تولید شده در این محیط بیش از ٤٦٪ می‌باشد. با توجه به میزان کل اسیدهای چرب موجود، مقدار DHA در محیط ۰/٦٪ به نسبت سایر محیط بیشتر بود. همچنین مقدار DHA (mg/L) نیز یک روند افزایشی داشت، که بیشترین مقدار تولید آن مربوط به محیط روغن کتان ۰/٦٪ بود که نسبت به محیط پایه افزایش چشمگیری داشته و پس از آن دوباره یک روند کاهشی داشت. کاهش نسبت DHA در کل اسیدهای چرب ممکن است به دلیل ممانعت سوبسترا باشد که باعث افزایش غلظت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

کربن شده و به موجب آن، باعث عدم تبدیل کربن به لیپید می‌شود [۲۲].

۷-۳- مقایسه اسیدهای چرب تولیدی در محیط پایه بدون روغن کتان با محیط حاوی ۰/۶٪ روغن کتان

همانگونه که در جدول ۱ نشان داده شده است درصد اسیدهای چرب اشباع در محیط پایه بیشتر از محیط حاوی ۰/۶٪ روغن کتان می‌باشد. اما این وضعیت در مورد اسیدهای چرب غیراشباع با یک یا چند پیوند دوگانه برعکس می‌باشد. اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه بیش از ٤١ درصد از کل اسیدهای چرب را در محیط حاوی روغن کتان به عنوان منبع کربن تشکیل می‌دهند. این در حالی است که مقدار این اسیدهای چرب در محیط پایه ۹/۳۸٪ از کل اسیدهای چرب می‌باشد. همچنین DHA تولیدی در محیط حاوی روغن کتان در مقایسه با محیط پایه بسیار بیشتر می-باشد.

Table 1 Comparison of saturated, mono unsaturated and poly unsaturated fatty acids production in basal medium and medium containing 0.6% flaxseed oil.

Medium	Saturated fatty acids (%)	Monounsaturated fatty acids (%)	Polyunsaturated fatty acids (%)	DHA (%)	DHA (mg/l)
Basal medium	84.34	6.24	9.38	7.23	88.92
0.6% flaxseed oil medium	42.88	15.64	41.42	6.89	388.59

٤- نتیجه گیری

در این تحقیق از سویه بومی *آئورانتیوکیتریوم* استفاده شد که توانایی قابل ملاحظه ای در تولید اسیدهای چرب امگا ۳ خصوصا DHA دارد. این سویه با تولید آنزیم لیپاز، از روغن کتان به عنوان منبع کربن استفاده کرده و روغنی تولید می کند که دارای یک پروفایل کامل از تمام اسیدهای چرب مفید می باشد. افزایش مقدار اسیدهای چرب ضروری آلفا لینولنیک اسید و لینولئیک اسید در پروفایل اسیدهای چرب سویه *آئورانتیوکیتریوم* و همچنین افزایش مقدار DHA در روغن تولید شده، بیانگر این موضوع می باشد که افزودن روغن کتان به عنوان مکمل به محیط کشت سویه *آئورانتیوکیتریوم* تولید کننده لیپاز، می تواند نقش مهمی را در بهبود خصوصیات غذایی روغن امگا ۳ تولید شده داشته باشد و همچنین می توان از این روغن غنی از اسیدهای چرب غیراشباع مهم در صنایع غذایی و لبنی استفاده نمود.

٥- سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه تحصیلات تکمیلی جهت حمایت از این پژوهش تقدیر به عمل می آید.

٦- منابع

[1] Das, U.N., Ramos, E.J and Meguid M.M. (2003). Metabolic alterations during inflammation and its modulation by central actions of omega□3 fatty acids. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 6(4): 413-419.

[2] Raghukumar, S. (2008). Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. Marine Biotechnology, 10(6): 631-640.

[3] Fan, K.W and Chen S.F. (2007). Bioprocessing for value-added products from renewable resources. Shang, T.Y. Elsevier Science. 684.

[4] Lunn, J. and Theobald, H. (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. Nutrition Bulletin, 31(3): 178-224.

[5] Valentine, R.C. and Valentine, D.L. (2009). Omega-3 fatty acids and the DHA principle. CRC press.

[6] Jhala, A.J. and Hall, L.M. (2010). Flax (Linum usitatissimum L.): current uses and future applications. Australian Journal of Basic Appllied Sciences, 4(9): 4304-4312.

[7] Harper, C.R., Edwards, M.J., DeFilippis, A.P. and Jacobson, TA. (2006). Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[16] Certik, M. and Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. Journal of Bioscience and Bioengineering, 87(1): 1-14.

[17] Jakobsen, A.N., Aasen, I.M., Josefsen, K.D. and Strøm, A.R. (2008). 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, 80(2): 297-306.

[18] Chatdumrong, W., Wichien, Y., Savitree, L. and Wanchai, W. (2007). Optimization of docosahexaenoic acid (DHA) production and improvement of astaxanthin content in a mutant Schizochytrium limacinum isolated from mangrove forest in Thailand. Natural Sciences, 41: 324-334.

[19] Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T. and Nakahara, T. (1998). Optimization of docosahexaenoic acid production by Schizochytrium limacinum SR21. Applied Microbiology and Biotechnology, 49(1): 72-76.

[20] Shene, C., Leyton, A., Esparza,Y., Flores, L., Quilodrán, B., Hinzpeter, I. and Rubilar, M. (2010). Microbial oils and fatty acids: Effect of carbon source on docosahexaenoic acid (C22: 6 n-3, DHA) production by thraustochytrid strains. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 10(3): 207-216.

[21] Chi, Z., Denver, P.,Zhiyou, W.,Craig, F. and Shulin, C. (2007). A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. Process Biochemistry, 42(11): 1537-1545.

[22] Arafiles, K., Alcantara, J.C.O., Cordero, P.R.F., Batoon, J.A.L., Galura, F.S., Leaño, E.M. and Dedeles, G.R. (2011). Cultural optimization of thraustochytrids for biomass and fatty acid production. Mycosphere, 2(5): 521-531.

acids in humans. The Journal of Nutrition, 136(1): 83-87.

[8] Mamatha, S. (2009). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) of Mucor sp. with special reference to gamma linolenic acid (GLA). Thesis, University of Mysore.

[9] Barceló-Coblijn, G., Murphy, E.J., Othman, R., Moghadasian, M.H., Kashour T. and Friel, J.K. (2008). Flaxseed oil and fish-oil capsule consumption alters human red blood cell n–3 fatty acid composition: a multiple-dosing trial comparing 2 sources of n–3 fatty acid. The American Journal of Clinical Nutrition, 88(3): 801-809.

[10] Thomson, L., Rickard, S.E., Orcheson, L.J. and Seidl, M.M. (1996). Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogeneis. Carcinogenesis, 17: 1373-6.

[11] Gaffney, M., O'Rourke, R. and Murphy, R. (2014). Manipulation of fatty acid and antioxidant profiles of the microalgae Schizochytrium sp. through flaxseed oil supplementation. Algal Research, 6: 195-200.

[12] Taoka, Y., Nagano, N., Okita, Y., Izumida, H., Sugimoto, S. and Hayashi, M. (2009). Extracellular enzymes produced by marine eukaryotes, thraustochytrids. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 73(1): 180-182.

[13] Kanchana, R., Muraleedharan, U.D and Raghukumar, S. (2011). Alkaline lipase activity from the marine protists, thraustochytrids. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(9): 2125-2131.

[14] Santaniello, E., Pierangela, C., Silvana, C. and Hany, E.S. (2006). Design of new chromogenic substrates for the spectrophotometric assay of lipolytic activity of lipases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 40(3): 76-80.

[15] Kamzolova, S.V., Igor, G.M., Andreas, A., Oksana, A.P., Nadezda, V.S., Ulrich, S. and Tatiana, V.F. (2005). Lipase secretion and citric acid production in Yarrowia lipolytica yeast grown on animal and vegetable fat. Food Technology and Biotechnology, 43(2): 113-122.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Lipase secretion and Docosahexaenoic acid production by *Aurantiochytrium* strain grown on flaxseed oil

Amoozian, N. [1], Shakeri, Sh. [2*], Maleki, M. [3] , Shakeri, A. [4]

1. M.Sc. Agricultural Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
2. Assistant Professor, Industrial Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran,
3. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran,
4. Cardiology resident, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran,

(Received: 2016/07/12 Accepted: 2017/03/13)

Omega-3 fatty acids are a large group of polyunsaturated fatty acids. Docosahexaenoic acid, the most important omega-3 fatty acid, has beneficial effects on human health. The aim of this study was to convert flaxseed oil by native strain of *Aurantiochytrium* to omega-3 oil rich in DHA and linolenic acid.At first, lipase production and its activity was measured in broth medium. Production of biomass and oil in medium containing amounts of flaxseed oil were determined. Also, saturated and unsaturated fatty acids were determined by gas chromatography. *Aurantiochytrium* strain produced precipitated halozone after 48 hours incubation in lipase production medium with a diameter of 6 mm. Lipase activity of 150 units per ml was measured in medium containing 1% of flaxseed oil. atty acids oil in basal medium without flaxseed oil was including C14, C15, C16, C17, C18, C18:1, DPA and DHA. By adding flaxseed oil to the basal medium, biomass was increased to 15.7 g/l. The greatest amount of DHA (388 mg/l) and oil content (53.25%) was obtained in medium containing 0.6% of flaxseed oil. In conclusion, by increasing the concentration of flaxseed oil in medium, the amount of saturated fatty acids was decreased and mono or polyunsaturated fatty acids were increased. Also, fatty acids profile of oil produced in flaxseed oil medium was including C18:2, C18:3, DPA and DHA. Finally, produced omega-3 oil was contained DHA, linolenic and oleic acid and can be used to enrichment foods and dairy products.

Key words: *Aurantiochytrium* strain, Omega 3 oil, Docosahexaenoic acid, Flaxseed oil, Linolenic acid

*Corresponding Author E-Mail Address: sh.shakeri@kgut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]