Molecular Identification of Native Strain of *Thraustochytrium* 71-1 and Qualitative and Quantitative Determination of Produced Total Oil and its Squalene

Farshad Khoshbasirat
M.Sc., Agricultural Engineering, Sciences and Modern Technologies, Graduate University of Advanced Technology, kerman, iran, f.khoshbasirat@gmail.com
Shahryar Shakeri *
Assistant Professor, Department of Agricultural Engineering ،Faculty of Sciences and Modern Technologies, Graduate University of Advanced Technology, kerman, Iran, sh.shakeri@kgut.ac.ir
Mahmood Maleki
Assistant Professor, Department of Agricultural Engineering ،Faculty of Sciences and Modern Technologies, Graduate University of Advanced Technology, kerman, Iran, maleki.li@gmail.com

Abstract

Introduction: Squalene is a polyunsaturated hydrocarbon with six double bonds. Squalene has many applications in biofuel, cosmetic, medical and pharmaceutical industries. The common source of Squalene is shark liver oil that its consumption is limited. *Thraustochytrium* a genus of unicellular marine protist belong to the thraustochytrids family which is capable of producing high Squalene.

Materials and methods: In this study, the qualitative and quantitative production of Squalene, oil and biomass was investigated in the native strain of Thraustochytrium 71-1 by TLC and HPLC. Molecular characterization of this strain was analyzed by 18srDNA gene analysis.

Results: Results showed that the strain 71-1 belongs to the family of Thraustochytrids and the genus of Thraustochytrium. The results showed that the strain of Thraustochytrium 71-1 produced 4.12 and 1.25 gr/L, biomass and oil, respectively. Also, Squalene was produced as 74.6 mg/L in 4 days of incubation in GYP medium.

Discussion and conclusion: In this research, the production of Squalene has been reported in the strain of the thraustochytrium marine for the first time in the Middle East. It is hoped that in future, the production of this substance could be increased by optimizing the culture medium and culture conditions of this strain to produce Squalene.

Key words: Native Strain, *Thraustochytrium*, Squalene

* Corresponding author
Received: April 3, 2018 / **Accepted:** December 24, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۲۹، بهار ۱۳۹۸، صفحه ۱۴۰- ۱۳۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۱۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۳

شناسایی مولکولی سویهٔ بومی *ترائوستوکیتریوم* ۱-۷۱ و تعیین کمی و کیفی تولید روغن و اسکوالن در آن

فرشاد خوش‌بصیرت: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، f.khoshbasirat@gmail.com
شهریار شاکری*: استادیار بیوتکنولوژی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، sh.shakeri@kgut.ac.ir
محمود ملکی: استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، maleki.li@gmail.com

چکیده

مقدمه: اسکوالن، هیدروکربن غیراشباع با شش پیوند دوگانه است. این اسید چرب زنجیره‌بلند کاربردهای بسیاری در صنایع آرایشی- بهداشتی، پزشکی، داروسازی و تولید سوخت‌های زیستی دارد. روغن کبد کوسهٔ ماهیان منبع معمول تولید اسکوالن است که درحال‌حاضر، استفاده از آن با محدودیت‌هایی مواجه است. *ترائوستوکیتریوم* جنسی از آغازیان تک‌سلولی دریازی متعلق به خانوادهٔ ترائوستوکیتریدها است که توانایی تولید مقدار زیاد اسکوالن را دارد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، میزان کیفی و کمی تولید اسکوالن، روغن و زیست‌توده در سویهٔ بومی ترائوستوکیتریوم ۱-۷۱ جداسازی‌شده از سواحل جنوبی ایران از طریق TLC و HPLC بررسی شد؛ همچنین بررسی مولکولی این سویه با تجزیه‌وتحلیل و توالی‌یابی ژن *18S rDNA* انجام شد.

نتایج: نتایج نشان دادند سویهٔ ترائوستوکیتریوم ۱-۷۱ متعلق به خانوادهٔ ترائوستوکیتریدها و جنس ترائوستوکیتریوم به‌ترتیب میزان ۴/۱۲ و ۱/۲۵ گرم‌برلیتر زیست‌توده و روغن تولید می‌کند و ۷۴/۶ میلی‌گرم‌برلیتر اسکوالن در روز چهارم پس‌از کشت در محیط‌کشت GYP تولید می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر برای نخستین‌بار در خاورمیانه، تولید اسکوالن در سویهٔ آغازی دریایی *ترائوستوکیتریوم* گزارش شد. امید است در آینده بتوان تولید این ماده را با بهینه‌کردن محیط‌کشت و شرایط کشت سویهٔ یادشده در راستای تولید اسکوالن افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: سویهٔ بومی، *ترائوستوکیتریوم*، اسکوالن

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

اسکوالن، هیدروکربن تری‌ترپن غیراشباع با شش پیوند دوگانه و کلید پیش‌ساز کلسترول، اسید صفراوی و استروئیدها در گیاهان و جانوران است. این ترکیب عامل آنتی‌اکسیدانی است که سلول‌ها را در برابر رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال محافظت می‌کند (۱). اسکوالن به‌عنوان عامل مرطوب‌کننده و نرم‌کننده در صنعت آرایشی عمل می‌کند و کاربرد گسترده‌ای در بخش‌های پزشکی و داروسازی دارد. این ترکیب بازدارندهٔ شیمیایی مؤثر تحریک‌کننده‌های توموری رودهٔ بزرگ، شش و پوست است (۲). اسکوالن عامل ضدباکتری و ضدقارچی است که عملکرد ایمنی بدن را به‌طور درخور توجهی افزایش می‌دهد و موجب کاهش سطح کلسترول خون می‌شود (۳).

نتایج بررسی‌های دانشمندان نشان می‌دهند چربی‌های دارای اسیدهای چرب امگا ۳ و ۲ نه‌تنهابدن را در برابر بیماری‌های قلبی- عروقی حمایت می‌کنند، در کاهش دردهای آرتروزهای روماتیسمی، انواع میگرن و حفظ بدن در برابر سرطان و حتی کاهش برخی از انواع دیابت مفیدند (۱). چربی‌های غیر اشباع مانع انباشته‌شدن پلاکت‌های خون در جدار شریان‌ها و مانع چسبنده‌شدن خون می‌شوند؛ درنتیجه از لخته‌شدن خون جلوگیری می‌کنند و مانع حملات قلبی می‌شوند (۲). در مدل‌های حیوانی به‌نظر می‌رسد اسکوالن نقش مهمی در سلامت شبکیه بازی می‌کند.

درحال‌حاضر، ریزجلبک‌ها منابع بالقوهٔ تولید اسکوالن شناخته می‌شوند. گزارش شده است جلبک سبز *بوتریوکوکوس*[1] زمانی که در شرایط فتواوتوتروفیک کشت شود، اسکوالن تولید می‌کند (۴)؛ باتوجه‌به محدودیت نور در چنین شرایطی، رسیدن به زیست‌تودهٔ زیاد دشوار است و درنتیجه، چگالی سلولی زیاد ازنظر تجاری لازم است. از سویی، ریزجلبکی که بتواند به‌طور هتروتروفیکی رشد کند احتیاجی به نور ندارد و به چگالی زیاد سلولی می‌رسد؛ درنتیجه، زمانی که در مقیاس‌های تجاری کشت شود بهره‌وری خوبی را نشان می‌دهد.

ترائوستوکیتریدها[2] گروهی از یوکاریوت‌های آغازین دریازی هستند که به‌طور گسترده در جنگل‌های مانگرو زندگی می‌کنند و رشد خوبی در شرایط هتروتروفیک دارند. درحال‌حاضر، چنین ریزموجوداتی برای تولید روغن‌های امگا ۳ حاوی اسیدهای چرب غیراشباع استفاده می‌شوند و برخی گونه‌ها مقادیر زیادی اسکوالن تولید می‌کنند. جنس *ترائوستوکیتریوم* آغازی هتروتروفیکی است که به‌عنوان منبع اسکوالن بررسی شده است. مخمرهای بررسی‌شده از جنس *سودوزیما*[3] نیز برای تولید اسکوالن استفاده شده‌اند و میزان تولید اسکوالن در این سویه‌ها برابر ۷۰/۳۲ میلی‌گرم‌برلیتر گزارش شده است (۵). در پژوهش حاضر، برای نخستین‌بار در خاورمیانه به بررسی سویه‌ای ازآغازیان تک‌سلولی دریازی از خانوادهٔ ترائوستوکیتریدها و جنس *ترائوستوکیتریوم* به‌عنوان سویه‌ای با پتانسیل زیاد تولید اسکوالن از سواحل جنوبی ایران به‌منظور تعیین میزان کمّی و کیفی تولید اسکوالن پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

محیط‌کشت‌ها: در پژوهش حاضر، سویهٔ *ترائوستوکیتریوم* ۱-۷۱ که فکرت[4] و شاکری در سال ۱۳۹۲ آن را از سواحل جنوبی ایران نمونه‌برداری کرده‌اند (۶) در محیط‌کشت جامد GYP با ترکیب ۲۰ گرم‌برلیتر گلوکز، ۱۰ گرم‌برلیتر پپتون، ۱۰ گرم‌برلیتر

عصارهٔ مخمر، ۱۵ گرم‌برلیتر آگار، ۰/۳ گرم‌برلیتر آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین و ۵۰ درصد آب دریا فعال شد؛ سپس برای تولید روغن در محیط کشت مایع شامل ۲۰ گرم‌برلیتر گلوکز، ۵ گرم‌برلیتر عصارهٔ مخمر، ۵ گرم‌برلیتر پپتون و ۲۰ درصد آب دریا کشت شد (۷).

بررسی ژن *18S rRNA*: DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA و باتوجه‌به دستورعمل کیت (شرکت سیناژن) استخراج شد. آغازگرهای رفت و برگشت T18S1F و T18S5R برای تکثیر ژن استفاده شدند (۸) (جدول۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در ۳۰ چرخه با دمای اتصال ۶۲ درجهٔ سانتی‌گراد انجام و محصول آن روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد. باند مدنظر توسط دستورعمل مربوط به کیت استخراج از ژل شرکت یکتا تجهیز آزما استخراج و برای تعیین توالی فرستاده شد.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده‌شده در پژوهش حاضر

نام آغازگر	توالی	طول محصول	دمای اتصال (درجهٔ سانتی‌گراد)
T18S1F	CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTA	۱۷۰۰	۶۴
T18S5R	TCACTACGGAAACCTTGTTACGAC	۱۷۰۰	۶۴

تعیین وزن خشک سلولی: ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ و سپس محلول رویی دور ریخته شد. رسوب سلولی حاصل به‌مدت ۴۸ ساعت در آونی با دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود و درنهایت، تودهٔ خشک سلولی وزن شد.

استخراج روغن از وزن خشک: استخراج روغن از زیست‌تودهٔ خشک سلولی طبق پروتکل بلایت[۵] و دایر[۶] با کمی تغییرات انجام شد (۹). طبق این روش، مقدار مشخصی از زیست‌تودهٔ خشک سلولی به فالکون منتقل و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد. خردشدن زیست‌تودهٔ خشک سلولی با دستگاه آلتراسونیک[۷] (مدل UP200S) به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد؛ سپس، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول کلروفرم و ۵ میلی‌لیتر محلول متانول به لوله اضافه و خردشدن دیوارهٔ سلولی به‌مدت ۴ دقیقه با دستگاه همگن‌ساز و آلتراسونیک انجام شد، دوباره مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه و به دنبال آن، همگن‌سازی و ورتکس به‌مدت ۲ دقیقه انجام شد. نمونه به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد و به دنبال آن، دو فاز تشکیل شد. لایهٔ پایین (فاز آلی) به فالکون تمیز دیگری که قبلاً وزن شده بود منتقل شد، عمل تبخیر حلال کلروفرم انجام و وزن روغن تولیدی توسط سویهٔ مدنظر محاسبه شد. روغن تولیدی به‌منظور نگهداری و انجام سایر تحلیل‌ها به فریزر منفی ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شد (۹).

تجزیه‌وتحلیل کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC): کروماتوگرافی لایه‌نازک[۸] (TLC)، کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد[۹] (HPLC) و کروماتوگرافی گازی[۱] (GC) از مهم‌ترین روش‌های استفاده‌شده برای تجزیه‌وتحلیل اسیدهای چرب هستند (۱۰)؛ ازاین‌رو در پژوهش حاضر، روش‌های کروماتوگرافی مایع باکارایی زیاد و کروماتوگرافی لایه‌نازک برای بررسی تولید اسکوالن استفاده شدند. سویه در ۱۰۰

میلی‌لیتر محیط کشت مایع GYP درون ارلنی با شرایط استریل تلقیح و به‌مدت ۴ روز در شیکرانکوباتوری با دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و ۱۴۰ دوردردقیقه گرماگذاری شد و پس‌ازآن، اسلاید میکروسکوپی از کشت مایع تهیه شد تا خلوص سویهٔ کشت‌شده بررسی شود؛ سپس محیط کشت به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد و درنهایت، فاز رویی دور ریخته شد. فاز زیرین که از زیست‌تودهٔ سلولی تشکیل شده بود به‌مدت ۲۴ ساعت درون آون ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس وزن خشک سلولی آن اندازه‌گیری شد؛ پس‌ازآن، روغن سلولی با حلال‌های کلروفرم و متانول استخراج شد (۷ و ۹). کاغذ کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC) با مشخصات Spherical silica gel 60; Wako Pure Chemicals در ابعاد ۱/۵ در ۸ سانتی‌متر بریده شد و به میزان ۱۰ میکرولیتر روغن به‌شکل لکه‌ای گرد روی آن قرار داده شد. به‌منظور یافتن لکهٔ اسکوالن از اسکوالن استاندارد (شرکت سیگما) برای شاهد استفاده شد. کاغذهای TLC به‌مدت ۳۰ دقیقه درون بشر حاوی حلال‌های کلروفرم و متانول (۱:۹) قرار داده شدند (۱۰) و در بشر با پارافیلم بسته شد تا حلال تبخیر نشود. پس‌از گذشت مدت زمان یادشده، کاغذها به‌آرامی با پنس از درون بشر برداشته شدند و روی آنها سولفوریک‌اسید ۲۰ درصد اسپری شد؛ درنهایت، کاغذها به‌مدت ۳۰ دقیقه درون آون ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند تا رنگ بگیرند. لکهٔ اسکوالن باکاغذ شاهد حاوی اسکوالن استاندارد شناسایی و Rf آن طبق رابطهٔ زیر اندازه‌گیری شد (۱۱).

$$\text{Retention factore}=\frac{Z_S}{Z_f-Z_0}$$

Z_S: فاصلهٔ بین باند ظاهرشده با نقطهٔ شروع نمونه (میلی‌متر)

Z_f: فاصله‌ای که فاز مایع از سطح حلال پیموده است (میلی‌متر)

Z_0: فاصلهٔ بین سطح حلال و نقطهٔ شروع (میلی‌متر)

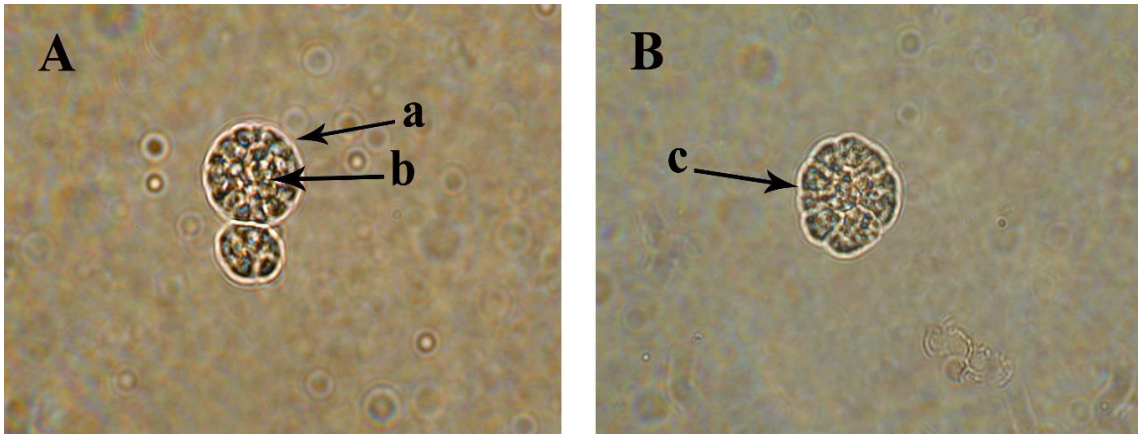
باتوجه‌به میزان Rf و لکهٔ اسکوالن، تولید اسکوالن به‌طور کیفی بررسی و تأیید شد. Rf اسکوالن در پژوهش حاضر برابر ۰/۹۷ اندازه‌گیری شد.

صابونی‌کردن روغن استخراجی و استخراج اسکوالن برای تجزیه‌وتحلیل HPLC: ازآنجاکه اسکوالن از معدود اسیدهای چربی است که صابونی نمی‌شوند، این ویژگی برای جداسازی اسکوالن از دیگر اسیدهای چرب استفاده شد. به این منظور، ۵۰ میلی‌گرم از روغن استخراجی با ۴ میلی‌لیتر محلول KOH اتانولی (۰/۱۱گرم پتاسیم‌هیدروکسید+۴ میلی‌لیتر اتانول) مخلوط شد؛ برای آماده‌سازی محلول KOH اتانولی باید ابتدا KOH با میزان بسیار اندکی آب حل و درنهایت، اتانول به آن افزوده شود. نمونه به‌مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و به‌مدت ۱ ساعت در حمام آب ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد؛ پس‌ازآن، نمونه برای چند ثانیه روی یخ قرار داده شد تا سرد شود و سپس ۲ میلی‌لیتر هگزان همراه با ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول به آن افزوده شد. نمونه چند ثانیه با دست تکان و سپس در مکان ثابتی قرار داده شد تا دو فاز تشکیل شود. اسکوالن در حلال هگزان حل می‌شود و به همراه هگزان فاز رویی محلول را تشکیل می‌دهد؛ فاز رویی تشکیل‌شده برداشته و به لولهٔ آزمایش تمیزی منتقل شد. لولهٔ آزمایش حاوی هگزان به‌مدت یک روز درون آون ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد تا هگزان آن به‌طور کامل بخار شود و اسکوالن باقی بماند؛ سپس ۱ میلی‌لیتر محلول استونیتریل‌تراهیدروفوران (۱:۹) به نمونه اضافه و نمونه ۳۰ ثانیه ورتکس شد و سپس از

فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد. نمونه‌ها به‌منظور تزریق به HPLC در فریزر منفی ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۲). دستگاه HPLC استفاده‌شده در پژوهش حاضر، Agilent, 1100 Series ساخت کشورآمریکا با ستون ZOR Bax,Sb-C18 (4.6×250mm, 5-micron) بود. اسکوالن در طول موج ۲۱۰ نانومتر ردیابی و میزان جریان دستگاه ۱ میلی‌متربردقیقه با حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر و دمای ستون ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد بود. فاز متحرک ستون از محلول استونیتریل/تتراهیدروفوران (۲۰:۸۰) تشکیل شده بود و اسکوالن استاندارد به‌عنوان شاهد برای یافتن زمان خارج‌شدن اسکوالن از دستگاه استفاده شد.

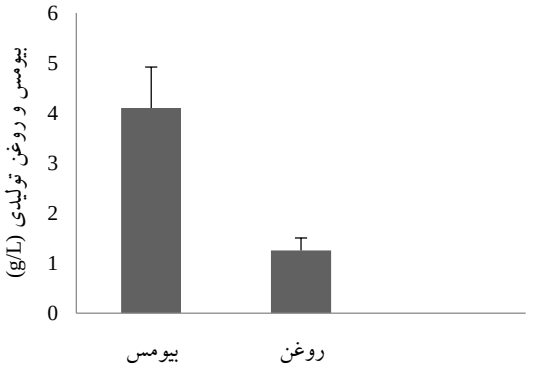
نتایج

بررسی ریخت‌شناختی سویهٔ *ترائوستوکیتریوم* ۱-۷۱: سویهٔ *ترائوستوکیتریوم* ۱-۷۱ بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی بررسی شد. این سویه روی محیط‌کشت تخصصی GYP حاوی آنتی‌بیوتیک کشت شد و سلول‌های کشت‌شده پس از ۲ روز گرماگذاری با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. نتایج مطالعه‌های میکروسکوپی نشان دادند این سویه دیوارهٔ پلی‌ساکاریدی کاملاً مشخصی دارد و اندازهٔ سلول‌ها بین ۵ تا ۲۵ میکرومتر است که از ویژگی‌های بارز خانوادهٔ ترائوستوکیتریدها است (شکل ۱).



شکل ۱- A. سویهٔ ۱-۷۱ در روز چهارم پس‌از کشت (a. سلول کاملاً گرد با دیوارهٔ پلی‌ساکاریدی مشخص، b. گرانول‌های چربی درون‌سلولی)، B. c. سلول درحال تقسیم پی‌درپی و تشکیل کلاستر سلولی و زئوسپورانژیوم

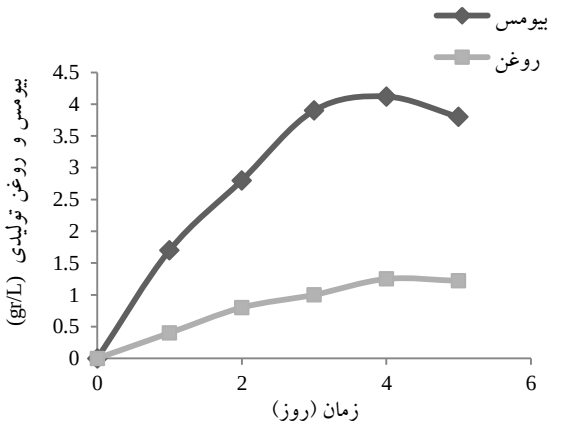
تولید زیست‌توده و روغن توسط سویهٔ *ترائوستوکیتریوم* ۱-۷۱: سویهٔ *ترائوستوکیتریوم* به‌منظور تولید روغن در محیط‌کشت مایع اختصاصی کشت و زیست‌توده و روغن تولیدی آن اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند سویهٔ ۱-۷۱ در روز چهارم پس‌از کشت، میزان ۴/۱۲ و ۱/۲۵ گرم‌برلیتر به‌ترتیب زیست‌توده و روغن تولید می‌کند (شکل ۲).



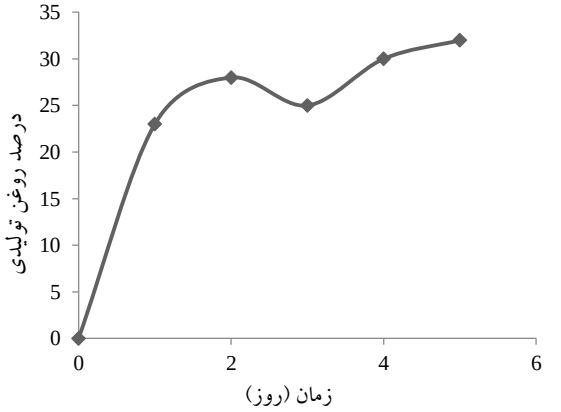
شکل ۲- میزان زیست‌توده (بیومس) و روغن تولیدی توسط سویهٔ ۱-۷۱

بررسی تولید زیست‌توده و روغن در زمان‌های متفاوت پس‌از کشت: تولید زیست‌توده و روغن در سویهٔ ۱-۷۱ طی روزهای اول تا پنجم کشت بررسی شد. نتایج نشان دادند این سویه در روزهای اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم به‌ترتیب ۱/۷، ۲/۸، ۳/۹، ۴/۱۲ و ۳/۸ گرم‌برلیتر زیست‌توده و ۰/۴، ۰/۸، ۱، ۱/۲۵ و ۱/۲۲ گرم‌برلیتر روغن تولید می‌کند (شکل ۳).

درصد روغن تولیدی به زیست‌توده در شکل ۴ دیده می‌شود. نتایج نشان دادند بیشترین درصد روغن در روز پنجم پس‌از کشت و به میزان ۳۲ درصد است.

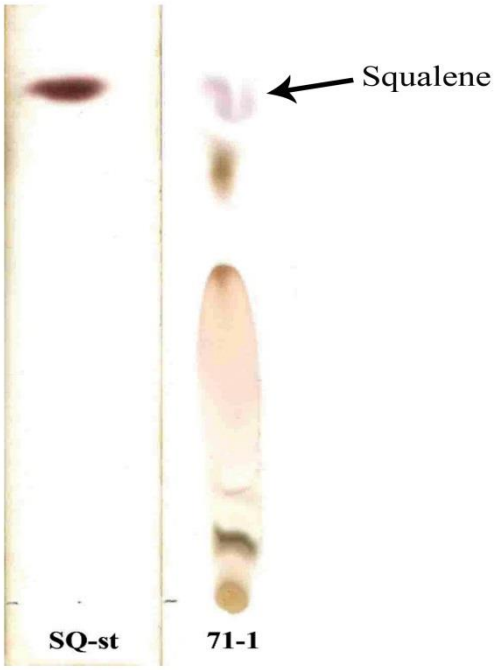


شکل ۳- میزان روغن و زیست‌تودهٔ (بیومس) تولیدی توسط سویهٔ ۱-۷۱ در زمان‌های متفاوت پس‌از کشت



شکل ۴- درصد روغن تولیدی در روز اول تا پنجم پس‌از کشت

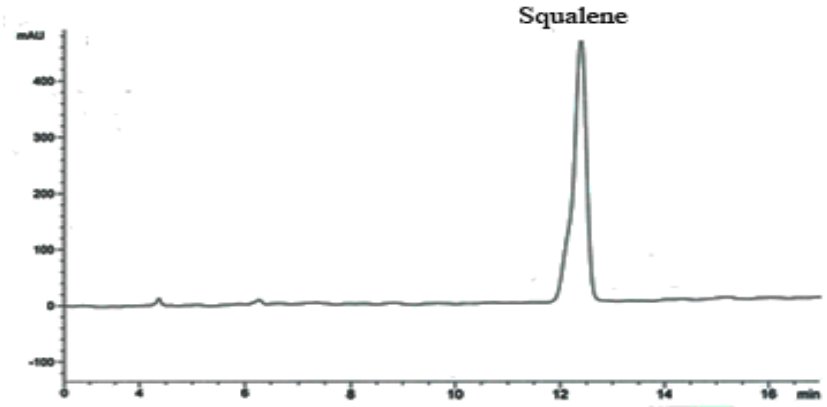
استخراج روغن و انجام تجزیه‌وتحلیل TLC: روغن استخراج‌شده در روز چهارم پس‌از کشت به‌منظور بررسی کیفی میزان تولید اسکوالن به‌وسیلهٔ تجزیه‌وتحلیل TLC بررسی شد. لکهٔ اسکوالن به‌وسیلهٔ کاغذ شاهد حاوی اسکوالن استاندارد شناسایی و Rf اندازه‌گیری شد. باتوجه‌به میزان Rf و لکهٔ اسکوالن، میزان تولید اسکوالن توسط سویهٔ ۱-۷۱ به‌طور کیفی شناسایی و بررسی شد. Rf اسکوالن در پژوهش حاضر ۰/۹۷اندازه‌گیری شد و با مشاهدهٔ لکهٔ اسکوالن مشخص شد این سویه در روغن خود حاوی اسکوالن است (شکل ۵).



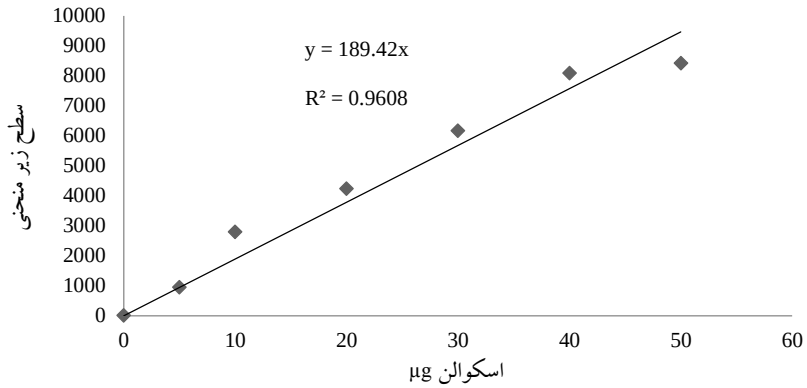
شکل ۵- کروماتوگرافی لایه‌نازک روغن استخراجی از سویهٔ ۱-۷۱

تجزیه‌وتحلیل HPLC: صابونی‌کردن روغن استخراجی و آماده‌سازی نمونه برای HPLC طبق روش یادشده انجام شد. نتایج نشان دادند پیک مربوط به اسکوالن در دقیقهٔ ۱۲/۳ ظاهر می‌شود (شکل ۶). با

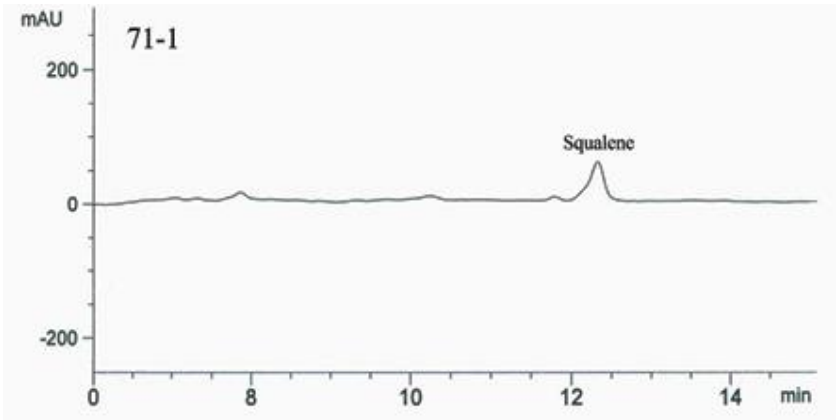
استفاده از منحنی استاندارد اسکوالن که با تزریق مقادیر متفاوت (۵ تا ۵۰ میکروگرم‌درلیتر) اسکوالن استاندارد به دستگاه به دست آمد (شکل ۷) و سطح زیر منحنی به‌دست‌آمده از پیک اسکوالن در سویهٔ *ترائوستوکیتریوم* ۱-۷۱، مقدار اسکوالن تولیدی توسط این سویه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند سویهٔ ۱-۷۱ در روز چهارم پس‌از کشت ۷۴/۶ میلی‌گرم‌برلیتر اسکوالن تولید می‌کند (شکل ۸).



شکل ۶- پیک به‌دست‌آمده از اسکوالن استاندارد که در دقیقهٔ ۱۲/۳ از ستون دستگاه خارج شده است.

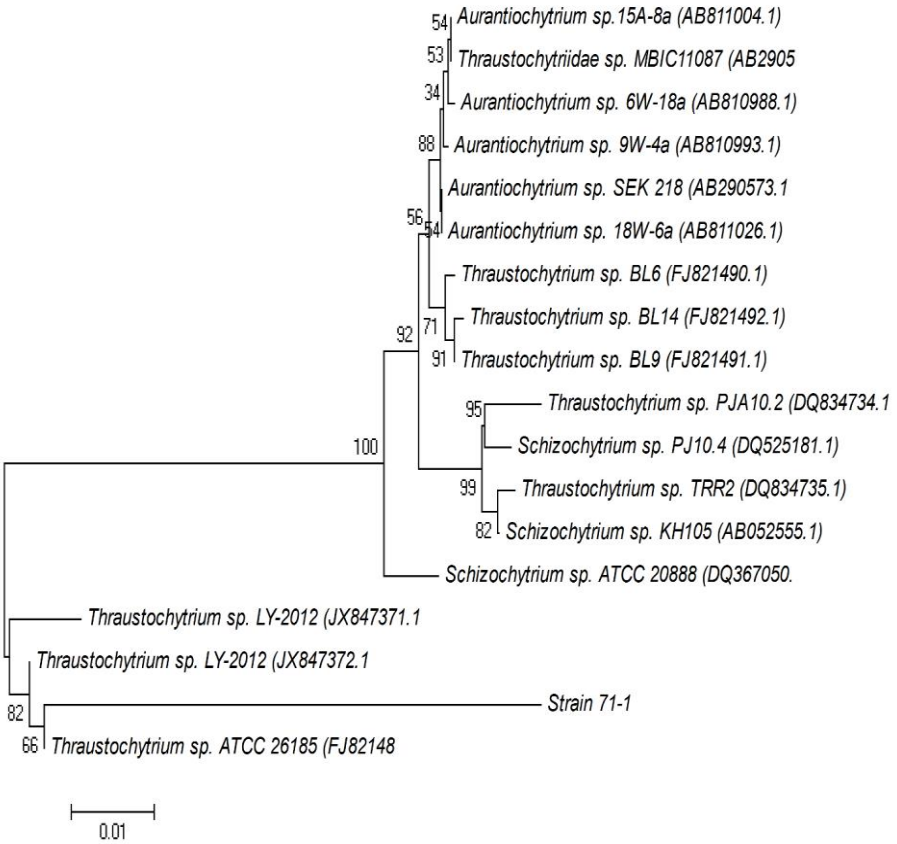


شکل ۷- منحنی استاندارد اسکوالن



شکل ۸- پیک به‌دست‌آمده از اسکوالن تولیدشده توسط سویهٔ ۱-۷۱

شناسایی مولکولی و فیلوژنتیکی سویهٔ *ترائوستوکیتریوم* ۱-۷۱: ژن *18S rRNA* تکثیر شد، توالی آن به دست آمد و درنهایت، توالی آن با داده‌های بانک ژنی بلاست شد. نتایج نشان دادند توالی این ژن بیشترین شباهت با میزان ۹۴ درصد را به همین ژن در جنس *ترائوستوکیتریوم* دارد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-joining و نرم‌افزار مگا ۴ ترسیم شد.



شکل ۹- درخت فیلوژنیکی سویهٔ *ترائوستوکیتریوم* ۱-۷۱

بحث و نتیجه‌گیری

اسکوالن نقش مهمی در سلامت انسان دارد و ازآنجاکه بدن انسان نمی‌تواند آن را تولید کند باید در رژیم غذایی زمان نوزادی و بلوغ وجود داشته باشد (۱۳ و ۱۴). روغن کبد کوسه که منبع اصلی اسکوالن شناخته می‌شود با محدودیت‌هایی مواجه است (۱۵) و منابع گیاهی تولیدکنندهٔ اسکوالن مانند زیتون و تاج‌خروس نیز محدودیت رشد دارند و میزان کمی از این ماده را تولید می‌کنند که باعث می‌شود استفاده از این منابع صرفهٔ اقتصادی نداشته باشد (۱۶ و ۱۷). ترائوستوکیتریدها آغازیان تک‌سلولی دریازی هستند که گستردگی زیستی جهانی و توانایی تولید اسکوالن به مقدار زیاد را دارند. ساپروفیت‌بودن اعضای این خانواده و نیازنداشتن آنها به نور برای رشد، تولید تجاری اسکوالن را مقرون‌به‌صرفه کرده است؛ به‌طوری‌که اخیراً منبع جایگزینی برای تولید اسکوالن در نظر گرفته شده‌اند. جیانگ[11] و همکاران در سال ۲۰۰۴ موفق شدند سویهٔ *Schizochytrium mangrovei* FB1 از

خانوادهٔ ترائوستوکیتریدها را سویه‌ای با توان تولید اسکوالن زیاد معرفی کنند؛ میزان تولید اسکوالن در این سویه ۱/۳ میلی‌گرم‌برلیتر گزارش شده است (۱۸). گوان کونچن[۱۲] و همکاران در سال ۲۰۱۰ موفق شدند میزان ۵/۹ میلی‌گرم‌برلیتر اسکوالن از سویهٔ *Aurantiochytrium* sp. BR-MP4-A1 متعلق به خانوادهٔ ترائوستوکیتریدها تولید کنند (۱۹). سویهٔ *Aurantiochytrium* sp. 18W13a در سال ۲۰۱۱ سویه‌ای تجاری در ژاپن معرفی شد که ۶/۵ گرم‌برلیتر زیست‌توده و ۱/۳ گرم‌برلیتر اسکوالن در روز چهارم پس‌از کشت و در شرایط بهینه تولید می‌کند (۲۰). سویهٔ مخمری *Pseudozyma* sp. JCC207 که در سال ۲۰۰۸ معرفی شده است، بیشترین میزان اسکوالن را در میان سویه‌های مخمری تولید می‌کند؛ این سویه توانایی تولید ۳۴۰/۵ میلی‌گرم‌برلیتر اسکوالن را در شرایط بهینه دارد (۵). باوجود تمام پژوهش‌های انجام‌شده به‌منظور یافتن سویه‌ای با توانایی تولید مقدار زیاد اسکوالن و اهمیت روزافزون این موضوع در سطح بین‌المللی، تاکنون پژوهش‌های لازم در ایران و خاورمیانه برای بررسی خانوادهٔ ترائوستوکیتریدها ازنظر تولید روغن ریزجلبکی غنی از اسکوالن انجام نشده است. در پژوهش حاضر از سویهٔ بومی *ترائوستوکیتریوم* ۱-۷۱ برای تولید اسکوالن استفاده شد؛ این سویه را فکرت و شاکری در سال ۱۳۹۲ از جنگل‌های مانگرو و سواحل جنوب کشور جداسازی و خالص‌سازی کرده‌اند (۶). سویهٔ بومی *ترائوستوکیتریوم* ۱-۷۱ ازنظر تولید اسکوالن به‌طور کیفی و کمی با تجزیه‌وتحلیل‌های TLC و HPLC بررسی شد. نتایج بررسی توالی *18S rRNA* نشان دادند این سویه بیشترین شباهت را به خانوادهٔ ترائوستوکیتریدها و جنس *ترائوستوکیتریوم* دارد. رسم درخت فیلوژنتیکی برای این ژن نشان داد این سویه ازنظر ژنتیکی بیشترین شباهت را به سویهٔ *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185 دارد. نتایج بررسی میزان وزن خشک سلولی، روغن و اسکوالن تولیدی در سویهٔ *ترائوستوکیتریوم* ۱-۷۱ نشان دادند بیشترین میزان زیست‌توده (۴/۱۲ گرم‌برلیتر)، روغن (۱/۲۵ گرم‌برلیتر) روغن و اسکوالن (۷۴/۶ میلی‌گرم‌درلیتر) در روز چهارم پس‌از کشت تولید می‌شود. باتوجه‌به تولید درخور توجه اسکوالن در این سویه در شرایط غیربهینه، انتظار می‌رود میزان تولید اسکوالن در این سویه با بهینه‌سازی شرایط محیط‌کشت افزایش یابد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته برای حمایت از پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

(1) Güneş FE. Medical use of squalene as a natural antioxidant. *Biochemistry* 2013; 10: 11.

(2) Kelly GS. Squalene and its potential clinical uses. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic* 1999; 4(1): 29-36.

(3) Miettinen TA., Vanhanen H. Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1994; 59(2): 356-363.

(4) Kalogeropoulos N., Chiou A., Gavala E., Christea M., Andrikopoulos NK. Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (carotenoids, tocopherols, sterols and squalene) of raw and roasted chicken fed on DHA-rich microalgae. *Food Research International* 2010; 43(8): 2006-2013.

(5) Chang M-H., Kim H-J., Jahng K-Y., Hong S-C. The isolation and characterization of Pseudozyma sp. JCC 207, a novel producer of squalene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008; 78(6): 963.

(6) Fekrat F., Shakeri Sh. Investigation and production of omega 3 oil rich in docosahexaenoic acid by native strain of Aurantiochytrium TA4. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 4(14): 9-24.

(7) Nakazawa A., Kokubun Y., Matsuura H., Yonezawa N., Kose R., Yoshida M., *et al*. TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production. *Journal of Applied Phycology* 2014; 26(1): 29-41.

(8) Singh D., Gupta A., Wilkens SL., Mathur AS., Tuli DK., Barrow CJ., et al. Understanding response surface optimisation to the modeling of Astaxanthin extraction from a novel strain Thraustochytrium sp. S7. *Algal Research* 2015; 11: 113-120.

(9) Bligh EG., Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 1959; 37(8): 911-917.

(10) Özcimder M., Hammers W. Fractionation of fish oil fatty acid methyl esters by means of argentation and reversed-phase high-performance liquid chromatography, and its utility in total fatty acid analysis. *Journal of Chromatography A* 1980; 187(2): 307-317.

(11) Albuquerque CL., Santana ÁL., Meireles MAA. Thin layer chromatographic analysis of annatto extracts obtained using supercritical fluid. *Food and Public Health* 2015; 5(4): 130-140.

(12) Matsuura H., Watanabe MM., Kaya K. Squalene quantification using octadecylbenzene as the internal standard. *Procedia Environmental Sciences* 2012; 15: 43-46.

(13) Rajaratnam RA., Gylling H., Miettinen TA. Independent association of serum squalene and noncholesterol sterols with coronary artery disease in postmenopausal women. *Journal of the American College of Cardiology* 2000; 35(5): 1185-1191.

(14) Rao CV., Newmark HL., Reddy BS. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis* 1998; 19(2): 287-290.

(15) Li Q., Chen G-Q., Fan K-W., Lu F-P., Aki T., Jiang Y. Screening and characterization of squalene-producing thraustochytrids from Hong Kong mangroves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57(10): 4267-4272.

(16) Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 1997; 6(12): 1101-1103.

(17) Sun H., Wiesenborn D., Tostenson K., Gillespie J., Rayas-Duarte P. Fractionation of squalene from amaranth seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1997; 74(4): 413-418.

(18) Jiang Y., Fan K-W., Tsz-Yeung Wong R., Chen F. Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga Schizochytrium mangrovei. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52(5): 1196-1200.

(19) Chen G., Fan K-W., Lu F-P., Li Q., Aki T., Chen F., et al. Optimization of nitrogen source for enhanced production of squalene from thraustochytrid Aurantiochytrium sp. *New Biotechnology* 2010; 27(4): 382-389.

(20) Kaya K., Nakazawa A., Matsuura H., Honda D., Inouye I., Watanabe MM. Thraustochytrid Aurantiochytrium sp. 18W-13a accummulates high amounts of squalene. *Bioscience, Biotechnology, and biochemistry* 2011; 75(11): 2246-2248.

---

[1]- *Botrycoccus braunii*
[2]- *Thraustochytrid*
[3]- Pseudozyma
[4]- Fekrat
[5]- Bligh
[6]- Dyer
[7]- Ultrasonic
[8]- Thin-layer chromatography
[9]- High-performance liquid chromatography
[10]- Gas chromatography
[11]- Jiang
[12]- Guanqun Chen