مجله دنیای میکروب‌ها
سال دوازدهم شماره اول (پیاپی ۳۸) بهار ۱۳۹۸
صفحات ۵۲-۳۹

Original Article

بهینه سازی تولید بتاکاروتن *رودوتورولا موسیلوژینوسا* جدا شده از پساب کارخانه چرم

شیدا بیرانوند[۱]، محدثه لاری‌پور*[۲]، جمیله نوروزی[۳]

[۱]کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران. [۲]استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران. [۳]استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: مخمرها به دلیل تولید رنگدانه‌های مفید برای انسان در بیوتکنولوژی از ارزش خاصی برخوردار هستند. گونه‌های *رودوتورولا* به مقدار زیاد بتاکاروتن تولید می‌کنند. این مطالعه با هدف به حداکثر رساندن تولید بتاکاروتن با قیمت ارزان از یک گونه مخمری بومی انجام شد.

مواد و روش‌ها: مجموعه چهار جدایه مورد بررسی، در طی سه مرحله نمونه برداری از پساب کارخانه چرم، بر روی محیط‌های اختصاصی جدا شدند. سپس با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و PCR دو جدایه Aa1 و Aa4 شناسایی شدند. مقادیر تولید رنگدانه توسط جدایه شناسایی شده و سویه استاندارد در شرایط مختلف نمک، منبع نیتروژن، منبع کربن، هوادهی، دما، دامنه های مختلف pH ارزیابی گردید. جذب نوری رنگدانه در ٤٧٠ nm توسط دستگاه اسپکتوفتومترخوانده شد.

یافته‌ها: از میان چهار جدایه، تنها جدایه Aa1 توانایی تولید رنگدانه کارتنوییدی را داشت. شناسایی ژنتیکی دو جدایه Aa1 و Aa4 شباهت ۹۸ درصدی آن ها به گونه‌های *رودوتورولا موسیلاژینوسا* و *دباریومایسس هانسنی* را تایید نمود. نتایج نشان داد، حداکثر مقدار بتاکاروتن پس از بهینه سازی به ترتیب ۷۵/٦ و ۳۲/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای *رودوتورولا موسیلاژینوسا* و *رودوتورولا گلوتینیس* (سویه استاندارد) به دست آمد.

نتیجه گیری: جداسازی گونه بومی و بهینه سازی فعالیت‌های کاربردی آن در آزمایشگاه، نه تنها در تولید محصولات صنعتی با کیفیت بالاتر بسیار مفید است بلکه استفاده از گونه بومی بسیار اقتصادی می‌باشد.

واژگان کلیدی: بهینه سازی، بتاکاروتن، آنتی‌اکسیدان، *رودوتورولا*.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۷

مقدمه

افزودنی‌های غذایی از جمله آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند موجب افزایش ماندگاری مواد غذایی و حفظ امنیت، کیفیت تغذیه‌ای و افزایش قابلیت پذیرش آن‌ها شوند. علاوه بر این، خواص بیولوژیکی دیگری مانند خواص ضدسرطانی، ضدجهش، ضدحساسیت و ضدپیری از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گزارش شده است و برخلاف رنگ‌های مصنوعی که ممکن است عملکرد کبد را مختل کرده و موجب استرس اکسیداتیو شوند. بسیاری از رنگ‌های طبیعی نه تنها به عنوان رنگ مواد غذایی، بلکه به عنوان طعم دهنده، بهبود بیماری و یا حتی جلوگیری از آن می‌شوند. در ایران به استفاده از رنگ‌های طبیعی جهت افزایش سلامت محصول، نسبت به دیگر

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه بیوتکنولوژی میکروبی
تلفن: ۰۹۱۲۲۸۸۵۳٤٦ پست الکترونیک: mlarypoor@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

کشورهای صنعتی و پیشرفته توجه کم‌تری شده است و همان‌طور که مشهود است، همچنان استفاده از رنگ‌های مصنوعی بدون توجه به مضرات آن‌ها، در مواد خوراکی و آشامیدنی، صورت می‌پذیرد. بنابراین با توجه به مصرف بالا و نیاز مبرم صنعت غذا به رنگ‌های خوراکی و وجود فواید بسیاری ازجمله تامین سلامتی افراد، مطالعه‌ایی در مورد بررسی تولید برخی از رنگ‌های طبیعی شامل کورکومین، بتاکارتن، پاپریکا، لیکوپن و تورمریک، در جهت شناسایی بهترین ترکیب برای جایگزینی با رنگ‌های مصنوعی، انجام شده و میزان خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد سنجش قرار گرفته است (۱).

تولید کاروتنوئیدها توسط *رودوتورولا گلوتینیس* (*Rhodotorula glutinisis*) تحت تأثیر پارامترهای زیست محیطی و تخمیر چندگانه مانند هوادهی، تحریک، دما، pH و عوامل محیطی است. برای کاروتنوژنز موثر، استفاده از منابع ارزان قیمت جایگزین کربوهیدرات که معمولا محصولات جانبی صنایع مختلف است و به آلودگی محیط زیست و استفاده از سویه‌های مخمر که مقدار زیادی از کاروتنوئید تولید می‌کند، اهمیت دارد (۲).

کاروتنوئیدها توسط تمام موجودات فتوسنتزکننده و قارچ‌ها ازجمله مخمرها تولید می‌شوند و می‌توانند در مکمل‌های غذایی حیوانی یا انسانی استفاده شوند. این ترکیبات فعال زیستی و طبیعی که از لحاظ تجاری به عنوان رنگ مواد غذایی (رنگ زرد به رنگ قرمز) و به عنوان یک منبع غذایی مهم در پرورش ماهی و صدف و حلزون آبزی استفاده می‌شود، خواص ضد سرطان و آنتی‌اکسیدانی و تحرک کننده پاسخ ایمنی دارند و انتظار می‌رود که استفاده گسترده‌تری در صنایع مختلف داشته باشند (۳). تولید رنگدانه توسط میکروارگانیسم‌ها نسبت به منابع دیگر، بسیار اهمیت دارد. زیرا میکروارگانیسم‌ها با رشد سریع، بازدهی بالاتر و استخراج راحت‌تر، عدم وابستگی به شرایط جوی و گستردگی تنوع رنگ بیشتر نسبت به سایر منابع زیستی دارای مزایای بیشتری می‌باشند(٤).

بتاکاروتن عامل و منبع پرووِیتامین A و یک آنتی‌اکسیدان مهم و محافظتی است (۵). انسان‌ها قادر به بیوسنتز کاروتنوییدها نیستند بنابراین آن‌ها باید در رژیم غذایی خود کاروتنوییدها را دریافت کنند (٦).

رودوتورولا گلوتینیس به عنوان یک مخمرغیربیماریزا و از تولید کننده‌های مهم رنگ‌های بیولوژیک خوراکی می‌باشد که به عنوان افزودنی خوراکی در تغذیه مرغ‌های تخم‌گذار گزارش شده است (۷). انواع میکروارگانیسم‌ها کاروتنوئیدها را به صورت داخل سلولی تولید می‌کنند (۸). یک بررسی نشان داد که تولید بتاکاروتن، برای سویه جدا شده از طبیعت *رودوتورولا گلوتینیس* (*R. glutinis* NCIM 3353) ۳۲ برابر بیشتر از سویه استاندارد بوده است (۹). نوع کاروتنوئید و میزان نسبی آن‌ها ممکن است بسته به نوع مخمر و شرایط محیطی متفاوت باشد. مطالعاتی برای بهینه سازی شرایط مختلف تولید کاروتنوئید توسط سویه *رودوتورولا* با هدف افزایش تولید این رنگدانه‌ها انجام شده است (۱۳-۱۰). تولید این رنگدانه توسط گیاهان به فاکتورهای محیطی غیرقابل کنترل ازجمله آب و هوا، فصل و موقعیت جغرافیایی یک کشور وابسته است. اما چرخه تولید به دلیل رشد سریع مخمرها و عدم وابستگی‌های محیطی توسط این قارچ‌ها کوتاه‌تراست (١٤).

مخمر *رودوتورولا* به طور معمول از هوا، خاک، چمن‌ها دریاچه‌ها، اقیانوس‌ها، مواد غذایی، شیر، آب میوه، پوست و مدفوع انسان جدا شده‌اند (۱۵). مطالعات انجام شده بر روی موش‌ها نشان می‌دهد که تولید بتاکاروتن و تورولن توسط مخمر *رودوتورولا گلوتینیس* سویه DFR-PDY می‌تواند به عنوان مواد افزودنی غذای سالم و بدون اثرات سمی استفاده شود (١٦).

با توجه به دلایل یاد شده، در این پژوهش، از پساب کارخانه چرم به منظور جداسازی مخمرهای بومی وارزان برای تولید بتاکاروتن استفاده شده است و با ایجاد تغییرات در پارامترهای آزمایشگاهی سعی شده، میزان تولید این رنگدانه افزایش داده شود و یک سویه ارزان و در دسترس و ملی به صنعت معرفی شود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه برداری و جداسازی جدایه‌ها: نمونه برداری از

پساب کارخانه چرم پاریس، آرا، ظفر و... در سه مرحله انجام شد. اولین مرحله نمونه برداری در اسفند ماه ۱۳۹۵ انجام گردید. با هماهنگی دانشگاه با کارخانجات چرم شهرک ورامین، در ظروف استریل، ۵ نمونه مختلف از مراحل قبل از افزودن سولفور و مراحل پایانی و لجن فعال نمونه برداری شد. در دومین مرحله نمونه برداری، ۳ نمونه مختلف از مرحله افزودن آهک در فروردین ماه ۱۳۹۶ جمع آوری شد. سومین مرحله نمونه برداری در خرداد ماه ۱۳۹۶ از مرحله‌ای عاری از مواد شیمیایی (سولفور) و اولین مرحله (خیساندن پوست) ۲ نمونه مختلف جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها در فالکون ۵۰ ml و ظرف‌هایی از جنس شیشه و استریل (سه تکرار) جمع آوری شدند. برای حفظ خصوصیات نمونه‌ها در هر مرحله از نمونه برداری در فلاسک حاوی یخ در کم‌تر از بیست و چهار ساعت به آزمایشگاه منتقل شد.

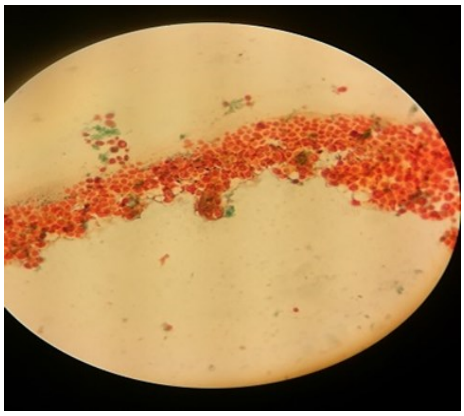
کشت پورپلیت و کشت جامد به منظور جداسازی مخمر به صورت تریپلیکیت براساس معیار (CLSI) روی محیط‌های کشت Yeast Extract Broth، Sabouraud Dextrose Broth، Sabouraud Dextrose Agar و Potato Dexterose Agar (مرک، آلمان) انجام شد. برای جداسازی مخمرها از محیط کشت مایع از سانتریفیوژکردن نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰rpm استفاده شد. پس از پایان سانتریفیوژ ، روماند جدا شد. برای اطمینان بیشتر از روماند و رسوب بر روی محیط‌های کشت، نمونه‌ها کشت داده شدند. بررسی میکروسکوپی صورت گرفت (۱۷).

ب) شناسایی جدایه‌ها: به منظور شناسایی چهار جدایه مخمری بررسی میکروسکوپی، رنگ آمیزی گرم و گیمسا، آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تخمیر قند ها، اوره‌آز، سیترات، جذب منابع کربن مختلف، احیای نیترات، تولید آسکوسپور، تولید اسید از گلوکز، بررسی رشد جدایه‌ها در غلظت‌های مختلف قند و استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی مانند کروم آگار (افتراق بین جدایه‌های مخمری توسط محیط‌های کروم آگار) (هایمدیا، هند) برای تعیین جنس و گونه انجام گردید (۱۷).

ج) آزمون تولید آسکوسپور: تولید آسکوسپور بالغ به رنگ آبی متمایل به سبز و سلول‌های زایا به رنگ قرمز می‌باشد. گسترش نازکی از سلول‌های مخمری روی لام تهیه و با حرارت میکس و روی گسترش را با محلول ۵٪ مالاشیت سبز و به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه پوشانده و ۳ تا ٤ بار حرارت داده شد. لام را با آب شسته (به مدت ۳۰ ثانیه) و با سافرانین ۱۵٪ به مدت ۳۰ ثانیه زمینه لام را رنگ و مورد بررسی قرار داده (شکل ۱) و جدایه Aa1 فاقدآسکوسپور مشاهده شد (۱۸).

د) شناسایی مولکولی: برای تشخیص قطعی گونه مخمر از روش‌های مولکولی، استخراج DNA و PCR و با نرم‌افزار BLAST تطبیق توالی انجام شد. در نهایت دو جدایه Aa1 و Aa4 شناسایی شدند.

برای شناسایی ژنتیکی دو جدایه Aa1 و Aa4 از جفت پرایمرهای NL1 و NL4 (سیناژن، ایران) به منظور تکثیر ناحیه 18S rRNA استفاده شد. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژنتیکی NL1: 5′-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG -3′ و NL4: 5′-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3′ می‌باشد. ترکیب مخلوط واکنش ۵۰ µl برای PCR، DNA استخراج شده ۱ µl، بافر PCR (۱۰ X) ۵ µl، پرایمرها (۱۰ mM) ٤ µl، داکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs) ۱ µl، آنزیم pfu پلی‌مراز (۱/۲۵ U/ml) ۱ µl، آب مقطر دیونیزه ۳٤ µl می‌باشد. برای انجام PCR از برنامه تکثیر شامل مراحل واسرشتی اولیه در ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشتی در ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال در ۵۷ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه و طویل شدن در ۷۲



شکل ۱: جدایه Aa1 فاقد آسکوسپور.

درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه استفاده گردید. قطعات تکثیر شده توسط الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲٪ (w/v) (QUELAB، کانادا) در بافر TBE 5x ۰/۵٪ (سیناژن، ایران) و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مرئی شد (۱۹ و ۲۰). در نهایت محصول PCR برای توالی یابی به کشور کره ارسال شد.

ه) تهیه سویه استاندارد: سویه استاندارد *رودوتورولا گلوتینیس* سویه PTCC5256، از مرکز پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شد. بعد از کشت در محیط SDB به مدت ۳ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به محیط جامد SDA منتقل شد و به مدت ۵ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس انجام شد.

و) کشت و بهینه سازی: برای تهیه مایه تلقیح از محیط‌های کشت SDB استفاده شد. در این مرحله یک لوپ از کشت تازه جدایه شناسایی شده برداشت شد و به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط SDB در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتر اضافه شد. سپس به مدت ۲٤ ساعت در شیکر انکوباتوردار با دمای۲۵ درجه سلیسیوس قرار داده شد. در پایان این زمان، کشت‌ها در فاز لگاریتمی قرار داشته و آماده برای تلقیح بودند. بهینه سازی با فاکتور نمک، منبع کربن، منبع نیتروژن، دما، دامنه های مختلف pH و هوادهی انجام شد (۲۱).

ز) استخراج رنگدانه: برای انجام هر آزمایش ۵ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سلول‌های مخمر (۲۵ گرم) با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد، و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر اتانول به طور مجزا به سلول‌های مخمر اضافه و سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه ورتکس گردید. سپس به منظور جداسازی سلول‌ها از حلال حاوی پیگمان، نمونه‌ها با دور ٤۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ شدند. پس از عبور از فیلترهای سرنگی PTFE مقاوم به حلال، جذب رنگ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۷۰ nm اندازه گیری شد (۲۱).

ح) روش جداسازی مخمر از محیط‌های کشت و تعیین وزن بیومس: برای جداسازی مخمرها از محیط کشت مایع از سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون محیط کشت و توده سلولی به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه استفاده شد. بعد از پایان عمل سانتریفیوژ کردن روماند جدا شده، توده سلولی با آب مقطر شستشو شده و بعد از ایجاد حالت سوسپانسیون دوباره در شرایط ذکر شده سانتریفیوژ گردیدند. برای تعیین وزن خشک سلولی، ابتدا محیط کشت را با دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۵دقیقه سانتریفیوژ کرده و ۲ بار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس از دستگاه فور با دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ۲٤ ساعت برای خشک کردن نمونه‌ها استفاده گردید (۲۲ و ۲۳).

ط) آنالیز آماری: همهٔ آزمون‌ها در سه تکرار با روش تاگوچی انجام شدند. برای تحلیل و ارزیابی آماری داده‌ها از نسخه ۱۸ نرم‌افزار آماری *SPSS* استفاده شد و آزمون t در سطح احتمال ۹۵ درصد برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت (۲٤).

یافته‌ها

الف) نمونه برداری، کشت و جداسازی: با توجه به امکانات آزمایشگاه و بررسی مقالات، کشت پورپلیت و کشت جامد بر روی محیط‌های SDA، YGC، PDA و CMA داده شد. از مایع رویی و رسوبات ته‌نشین شده هر کدام به تعداد ۵۰ عدد پلیت که در مجموع ٦۰۰ عدد پلیت کشت داده شد. که در اولین و دومین نمونه برداری، سه نوع کلنی کرم رنگ با مشخصات ظاهری متفاوت جداسازی شد. از سومین نمونه برداری کلنی گرد نارنجی رنگ جداسازی شد. بهترین روش برای جداسازی کلنی نارنجی رنگ پورپلیت برروی محیط‌های YGC و PDA بود. بهترین رشد روی سه محیط SDA، YGC و PDA و رشد کم‌تری روی محیط CMA (بیومارک، آمریکا) دیده شد. همان‌طور که اشاره شد تعداد چهار جدایه مخمر از مجموعه نمونه‌برداری‌های مرحله اول و دوم و سوم جدا شد. در مرحله اول و دوم مخمر کرم رنگ (مرحله اول پساب اصلی و آخرین پساب خروجی پورپلیت SDA سویه Aa2 و Aa3 و در مرحله دوم پساب اصلی و مرحله ۱ و ۲ پورپلیت CMA سویه Aa و در مرحله سوم پساب اصلی مرحله اول سویه Aa1 مخمر

جدول ۱: شناسایی جدایه های مخمر تولید کننده بتاکاروتن با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی .

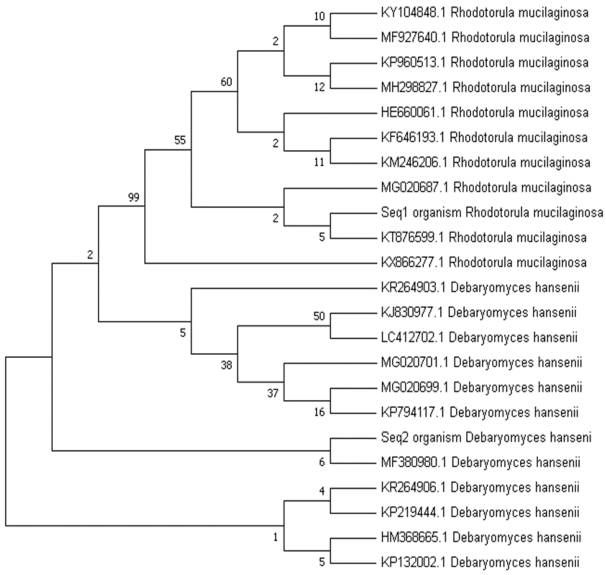
نام سویه	رنگ آمیزی گرم	رنگ آمیزی کاتن بلو	رشد روی SDA	رشد روی CMA	تخمیرقندها									گلوکز ۵۰٪	گلوکز ۶۰٪	اوره	دکربوکسیلاز	سیترات	تولید اسید	آسکسپور	Kno3
					ترهالوز	رافینوز	زایلوز	مونواینوزیتول	گالاکتوز	لاکتوز	سوکروز	مالتوز	گلوکز								
Aa1	+	+	+	+	+	−	−	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
Aa2	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	−	−
Aa3	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−
Aa4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	v	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	-

نارنجی رنگ جدا شد.

ب) آزمون های بیوشیمیایی: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی کلیدی در جدول ۱ آمده است.

ج) شناسایی مولکولی: پس از تشخیص اولیه با طراحی پرایمر و انجام تکنیک PCR، با استفاده از نرم افزار Chromaspro (برنامه بلاست) جدایه‌ها تعیین گونه شدند. جدایه Aa1 ۹۸٪ به گونه *رودوتورولا موسیلاژینوسا* (*Rhodotorula mucilaginosa*) و جدایه Aa4 ۹۸٪ به گونه *دباریومایسس هانسنی* (*Debaryomyces hanseni*) شباهت داشت (جدول ۲). توالی سویه‌ها در Genbank به شماره دسترسی ۲۱۰۵٤٦۲ ثبت شد.

د) درخت فیلوژنی: برای نشان دادن تاریخ تکاملی، این تاکسون



شکل ۳: درخت فیلوژنی براساس توالی جدایه Aa1 و Aa4 با استفاده از روش Neighbor-Joining وضریب Boot strap پانصد.

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (شکل ۲).

شاخه‌های مربوط به پارتیشن‌های تولید شده در تکرارهای کم‌تر از ۵۰٪ بوت استرپ سقوط می‌کنند. درصد درخت‌های تکراری که در آن تساوی همراه با هم در آزمون بوت استرپ (۵۰۰ تکرار) در کنار شاخه‌ها نشان داده شده است. فاصله‌های تکاملی با استفاده از روش احتمالی حداکثر کامپوزیت محاسبه شده و در واحد تعداد پایه‌های جایگزین در هر سایت قرار می‌گیرند. این تجزیه و تحلیل شامل ۲۳ توالی نوکلئوتیدی بود.

جدول ۲: مقایسه میزان شباهت سویه‌های منتخب تطبیق خورده از Blast با سویه‌های جداسازی شده.

ردیف	سویه‌های مشابه	درصد شباهت
۱	MG020687.1 *Rhodotorula mucilaginosa*	۹۸
۲	KY104848.1 *Rhodotorula mucilaginosa*	۹۷
۳	KP960513.1 *Rhodotorula mucilaginosa*	۹٦
٤	KX866277.1 *Rhodotorula mucilaginosa*	۹٥
٥	KT876599.1 *Rhodotorula mucilaginosa*	۹٥
٦	KF646193.1 *Rhodotorula mucilaginosa*	۹۷
۷	KM246206.1 *Rhodotorula mucilaginosa*	۹۷
۸	HE660061.1 *Rhodotorula mucilaginosa*	۹۷
۹	MF927640.1 *Rhodotorula mucilaginosa*	۹۷
۱۰	MH298827.1 *Rhodotorula mucilaginosa*	۹٦
۱۱	KJ830977.1 *Debaryomyces hansenii*	۹۸
۱۲	MG020701.1 *Debaryomyces hansenii*	۹۸
۱۳	KR264906.1 *Debaryomyces hansenii*	۹٦
١٤	MG020699.1 *Debaryomyces hansenii*	۹۹
١٥	LC412702.1 *Debaryomyces hansenii*	۹٦
١٦	HM368665.1 *Debaryomyces hansenii*	۹٤
۱۷	MF380980.1 *Debaryomyces hansenii*	۹٤
۱۸	KR264903.1 *Debaryomyces hansenii*	۹۷
۱۹	KP219444.1 *Debaryomyces hansenii*	۹٥
۲۰	KP132002.1 *Debaryomyces hansenii*	۹۷
۲۱	KP794117.1 *Debaryomyces hansenii*	۹٥

جدول ۳: بهینه سازی، استخراج پیگمان و تعیین وزن خشک.

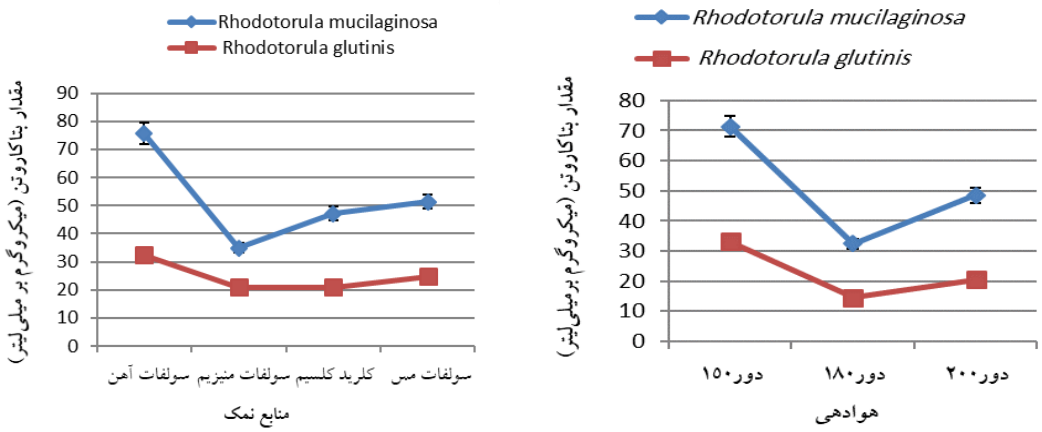
متغیر	*Rhodotorula mucilaginosa*				*Rhodotorula glutinis*			
	وزن خشک	جذب نوری	مقدار بتاکاروتن		وزن خشک	جذب نوری	مقدار بتاکاروتن	
			µg/ml	mg/ml			µg/ml	mg/ml
سولفات آهن	۰/۰۰۷	۳/۰۰۰	۷۵/٦	۰/۰۷۵٦	۰/۰۰۹	۱/۳۰۰	۳۲/۷٦	۰/۰۳۲۷٦
سولفات منیزیم	۰/۵٦۱	۱/۳۹۰	۳۵/۰۲۸	۰/۰۳۵۰۲۸	۰/۵۷۰	۰/۸۱۰	۲۰/٤۱۲	۰/۰۲۰٤۱۲
کلرید کلسیم	۰/۵۷۲	۱/۸۹۰	٤۷/٦۲۸	۰/۰٤۷٦۲۸	۰/۵۹۰	۰/۸۰۰	۲۰/۱٦	۰/۰۲۰۱٦
سولفات مس	۰/۰۰۵	۱/۹۹٦	۵۰/۲۹۹	۰/۰۵۰۲۹۹	۰/۰۰۷	۰/۹۹۰	۲٤/۹٤۸	۰/۰۲٤۹٤۸
سدیم نیترات	۰/۵۳۸	۱/٤۳۰	۳٦/۰۳٦	۰/۰۳٦۰۳٦	۰/۵٤۰	۰/۳٤۵	۸/٦۹٤	۰/۰۰۸٦۹٤
آمونیوم سولفات	۰/۵۷۵	۲/٦۳۹	٦٦/۵۰۲	۰/۰٦٦۵۰۲	۰/۵٦۵	۰/۹۸۰	۲٤/٦۹٦	۰/۰۲٤٦۹٦
آمونیوم نیترات	۰/۵٤۸	۱/٦۵٦	٤۱/۷۳۱	۰/۰٤۱۷۳۱	۰/۵۲۸	۱/۲۰۰	۳۰/۲٤	۰/۰۳۰۲٤
اورنیتین	۰/۰۰٦	۱/۲۲٦	۳۰/۸۹۵	۰/۰۳۰۸۹۵	۰/۰۰۹	۰/۲۵۹	٦/۵۲٦	۰/۰۰٦۵۲٦
پپتون کازیین	۰/۰۰۸	۱/۲٤۰	۳۱/۲٤۸	۰/۰۳۱۲٤۸	۰/۰۰۷	۰/۵۷۰	۱٤/۳٦٤	۰/۰۱٤۳٦٤
عصاره مخمر	۰/۰۰۷	۱/۳٤۹	۳۳/۹۹٤	۰/۰۳۳۹۹٤	۰/۰۰۵	۰/٤۷۳	۱۱/۹۱۹	۰/۰۱۱۹۱۹
سوکروز	۰/۰۰۳	۲/۰٤۹	۵۱/٦۳٤	۰/۰۵۱٦۳٤	۰/۰۰٤	۰/٦۲۰	۱۵/٦۲٤	۰/۰۱۵٦۲٤
گلوکز	۰/۳۳۵	۱/۸۳٦	٤٦/۲٦۷	۰/۰٤٦۲٦۷	۰/۳۳۰	۰/۸۲۲	۲۰/۷۱٤٤	۰/۰۲۰۷۱٤٤
فروکتوز	۰/۵۷۰	۱/۸۱٤	٤۵/۷۱۲	۰/۰٤۵۷۱۲	۰/۵٤۰	۰/۵۹۳	۱٤/۹٤۳٦	۰/۰۱٤۹٤۳٦
هوادهی دور ۱۸۰	۰/۰۲٤	۱/۲۸۷	۳۲/٤۳۲	۰/۰۳۲٤۳۲	۰/۰۲۱	۰/۵۷۹	۱٤/۵۹۰	۰/۰۱٤۵۹۰
هوادهی دور ۱۵۰	۰/۰٤۱	۲/۸۳۳	۷۱/۳۹۱	۰/۰۷۱۳۹۱	۰/۰٤۸	۱/۳۱٦	۳۳/۱٦۳	۰/۰۳۳۱٦۳
هوادهی دور ۲۰۰	۰/۰۵۳	۱/۹۲۹	٤۸/٦۱۰	۰/۰٤۸٦۱۰	۰/۰۵۹	۰/۸۰۳	۲۰/۲۳۵	۰/۰۲۰۲۳۵
۱۰ درجه سلیسیوس	۰/۲٦۱	۱/۲۷۱	۳۲/۰۲۹	۰/۰۳۲۰۲۹	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰
۱۵ درجه سلیسیوس	۰/۵۷۸	۱/٤۷۷	۳۷/۲۲۰	۰/۰۳۷۲۲۰	۰/۵٦۸	۰/۲۹۲	۷/۳۵۸	۰/۰۰۷۳۵۸
۲۰ درجه سلیسیوس	۰/۵۷۷	۱/۹۱٤	٤۸/۲۳۲	۰/۰٤۸۲۳۲	۰/۵٦۷	۰/۲۲۳	۵/٦۱۹	۰/۰۰۵٦۱۹
۲۵ درجه سلیسیوس	۰/۵۷۸	۱/۲۳۲	۳۱/۰٤٦	۰/۰۳۱۰٤٦	۰/۵٦۹	۱/۰۰۰	۲۵/۲	۰/۰۲۵۲
۳۰ درجه سلیسیوس	۰/۰۱۳	۲/٤۳۵	٦۱/۳٦۲	۰/۰٦۱۳٦۲	۰/۰۱۹	۱/۲۲۱	۳۰/۷٦۹۲	۰/۰۳۰۷٦۹۲
۳۵ درجه سلیسیوس	۰/۹۷۱	۲/۰۳۱	۵۱/۱۸۱	۰/۰۵۱۱۸۱	۰/۸۹۱	۰/۵۹۰	۱٤/۸٦۸	۰/۰۱٤۸٦۸
۱ pH	۰/۵٦۷	۰/۵۳۷	۱۳/۵۳۲	۰/۰۱۳۵۳۲	۰/۵۵۷	۰/۱۲۵	۳/۱۵	۰/۰۰۳۱۵
۳ pH	۰/۵۵۰	۰/۵۲۲	۱۳/۱۵٤	۰/۰۱۳۱۵٤	۰/٤۸۰	۰/۲٤۳	٦/۱۲۳	۰/۰۰٦۱۲۳
۵ pH	۰/۵۷۵	۰/٦۱٤	۱۵/٤۷۲	۰/۰۱۵٤۷۲	۰/۵٦۰	۰/۸۷۵	۲۲/۰۵	۰/۰۲۲۰۵
۷ pH	۰/۰۰۳	۰/۹۷۷	۲٤/٦۲۰	۰/۰۲٤٦۲۰	۰/۰۰۵	۰/۸۸۵	۲۲/۳۰۲	۰/۰۲۲۳۰۲
۹ pH	۰/۰۰٤	۰/٦۸۸	۱۷/۳۳۷	۰/۰۱۷۳۳۷	۰/۰۰٦	۰/۹٤	۲۳/٦۸۸	۰/۰۲۳٦۸۸
۱۰ pH	۰/۵۷۲	۰/۹٤۹	۲۳/۹۱٤	۰/۰۲۳۹۱٤	۰/۵٦۹	۰/۵۹۵	۱٤/۹۹٤	۰/۰۱٤۹۹٤
۱۱ pH	۰/۰۰۲	۰/۹۹٦	۲۵/۰۹۹	۰/۰۲۵۰۹۹	۰/۰۰۱	۰/۷۲۷	۱۸/۳۲۰	۰/۰۱۸۳۲۰
۱۲ pH	۰/۰۰٤	۰/۸۳۰	۲۰/۹۱٦	۰/۰۲۰۹۱٦	۰/۰۰۳	۰/۷۱۵	۱۸/۰۱۸	۰/۰۱۸۰۱۸

تمام مواضع حاوی شکاف و اطلاعات گم شده حذف شدند. مجموعا ۵۳۰ موقعیت در مجموعه داده نهایی وجود داشت. تجزیه و تحلیل تکاملی در *MEGA7* انجام شد.

ح) *استخراج پیگمان، بهینه سازی و تعیین وزن خشک*: پس از تعیین گونه‌ها بقیه آزمون‌ها بر روی جدایه شناسایی شده *رودوتورولا موسیلاژینوسا* در مقایسه با سویه استاندارد *رودوتورولا گلوتینیس* انجام شد. میزان تولید رنگدانه و وزن خشک هر دو گونه تحت تیمارهای مختلف مانند انواع نمک‌ها، قندها، دماهای مختلف، اسیدیته و دور هوادهی مختلف در آزمایشگاه بررسی شد، که مقدار بتاکاروتن بر اساس فرمول زیر محاسبه شده است (جدول ۳). حداکثر مقدار بتاکاروتن پس از بهینه سازی ۷۵/٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای *رودوتورولا موسیلاژینوزا* و۳۲/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای *ردوترولا گلوتینیس* و بر اساس فرمول زیر به دست آمد.

مقدار بتاکاروتن (µg/ml)= جذب نوری در طول موج ۴۷۰ nm ×۲۵/۲

جدایه Aa1 با وجود کلنی صورتی-نارنجی بر روی محیط‌های کشت سابرودکستروز آگار و بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی به جنس *رودوتورولا* شباهت داشت. پس از گرماگذاری در



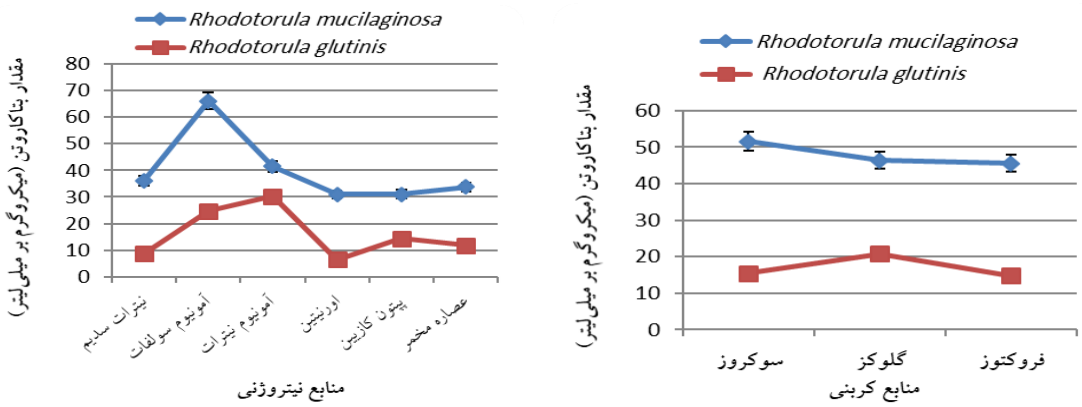
شکل ۳: مقدار بتاکاروتن در *رودوتورولا موسیلاژینوسا* و *رودوتورولا گلوتینیس* به تفکیک منابع نمک (چپ) و هوادهی (راست).

محیط‌های کروم آگار کاندیدا، جدایه‌های مخمری با رنگ کلنی متفاوت ظاهر شدند، که توان افتراق بین جدایه‌ها را ایجاد می‌کند. دو جدایه Aa2 و Aa3 با تشکیل به ترتیب کلنی‌های سبز و آبی بر روی این محیط کشت افتراقی و بر اساس آزمون های دیگر به نظر می‌رسد، که به گونه‌های *کاندیدا* (*Candida*) شباهت داشته باشند و جدایه Aa4 با داشتن کلنی کرم رنگ بر روی محیط پتیتو دکستروز آگار و محیط‌های دیگر و بر اساس آزمون‌های میکروب شناسی و بیوشیمیایی مورد بررسی شباهت به جنس *دباریومایسس* (*Debaryomyces*) را نشان داد(شکل‌های ۳ تا ۵). داده‌های جدول توصیفی و نمودار هوادهی، منابع نیتروژن و دما به وضوح میزان بتاکاروتن بیشتری و اختلاف آماری را در *رودوتورولا موسیلاژینوسا* نشان می‌دهند. همچنین داده‌های جدول توصیفی و نمودار در گستره pH ۵ و ۹ بتاکاروتن بیشتری را برای *رودوتورولا گلوتینیس* نشان داد، اما در سایر دامنه pH مورد بررسی میزان بتاکاروتن در *رودوتورولا موسیلاژینوسا* بیشتر بود. همچنین با آنالیز آماری افزایش میانگین بتاکاروتن در *رودوتورولا موسیلاژینوسا* نسبت به *رودوتورولا گلوتینیس* تایید گردید.

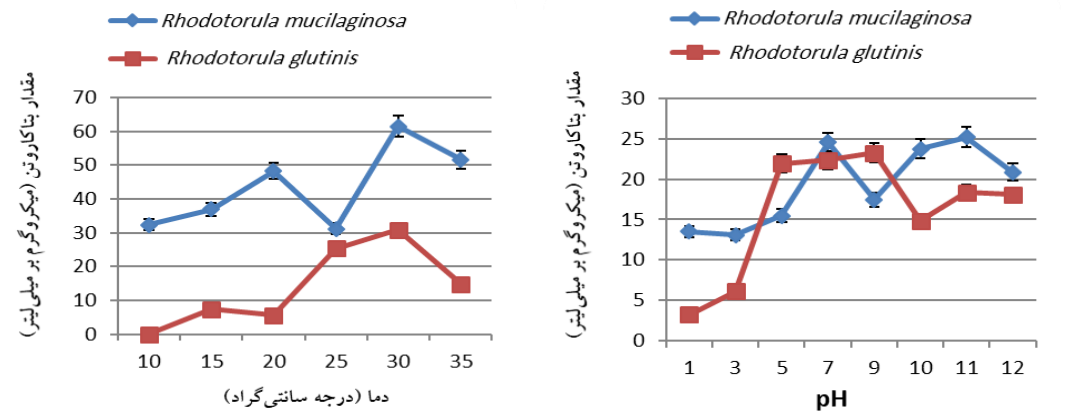
بحث

گونه بومی جداسازی شده در این تحقیق توانایی تولید بتاکاروتن را داشتند. هرناندز-آلمانزا (Hernández-Almanza) و همکاران درسال ۲۰۱٤ بیان کردند که رنگدانه‌های رنگی استخراج شده از سلول به دلیل تولید زیاد کارتنویید، مسئول حفاظت از سلول‌ها در برابر اثر واحد اکسیژن و تابش بیش از حد از طیف نور مرئی و اشعه ماورای بنفش هستند (۲۵).

قارچ تک سلولی (مخمر) شناسایی شده در این تحقیق قادر به سنتز کارتنویید می‌باشد و می‌تواند وارد صنایع غذایی شود. وودساید (Woodside) و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان کردند که



شکل ٤: مقدارتاکاروتن در *رودوتورولا موسیلاژینوسا* و *رودوتورولا گلوتینیس* در منابع نیتروژن (چپ) و کربن (راست).



شکل ۵: مقدار بتاکاروتن در *رودوتورولا موسیلاژینوزا* و *رودوتورولا گلوتینیس* در دما (چپ) و pH های (راست) مختلف.

انسان‌ها قادر به بیوسنتز کاروتنوییدها نیستند، بنابراین باید با رژیم غذایی خود کاروتنویید دریافت کنند (۲۶).

پانسار (Panesar) در سال ۲۰۱٤ بیان کرد که افزایش آگاهی مصرف کننده از اثر منفی رنگدانه مصنوعی بر سلامت انسان و در رژیم غذایی سالم، موجب افزایش علاقه در مصرف رنگدانه‌های طبیعی می‌شود (۲۷). بتاکاروتن گونه مخمر بومی جداسازی شده در این تحقیق می‌تواند به جای افزودنی‌های شیمیایی جایگزین شود. کارکو (Carocho) و همکاران درسال ۲۰۱۵ اظهار داشتند که رنگدانه‌های مخمری در صنعت مواد غذایی به جای رنگ‌های مصنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۸).

دراین تحقیق با روش بیوتکنولوژی از گونه مخمر بومی شناسایی شده کارتنویید بهینه و افزایش یافت. دسترسی به منابع طبیعی و ارزان برای تولید مکمل‌ها و داروهای آنتی‌اکسیدان می‌تواند کمک بزرگی در جلوگیری از اثرات اکسیدکننده‌ها در بدن باشد. به طور سنتی، کاروتنوئیدها از گیاهانی مانند آناتو، پاپریکا و زعفران استخراج می‌شوند، در حالی‌که امروزه کاروتنوئیدهای میکروبی به دلیل سهولت دسترسی و افزایش تولید با استفاده از شرایط معمول زیست محیطی و دستکاری‌های ژنتیکی مورد توجه واقع شده‌اند. استفاده تجاری از مخمرهای بومی و ملی با پتانسیل بیوتکنولوژی تولید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته است. علاوه بر *فافیا رودوزیما* (*Phaffia rhodozyma*) شواهدی وجود دارد که ظرفیت تولید کاروتن توسط سایر گونه‌های بومی جنس *رودوتورولا* می‌تواند بسیار بالا باشد (۲۹ و ۳۰). معرفی یک گونه مخمری تولید کننده بتاکاروتن به صنعت که از لحاظ اقتصادی ارزان و در دسترس باشد و همچنین بالاترین توان تولید رنگدانه را داشته باشد، برای استفاده در صنایع مختلف بسیار حائز اهمیت است. از طرفی اگر این سویه مخمری به صورت بومی از ضایعات بدون استفاده جداسازی شود، ارزش صنعتی آن چند برابر می‌شود که در این تحقیق گونه بومی *رودوتورولا موسیلاژینوسا* معرفی شد. با بهینه سازی شرایط رشد مخمر، میزان تولید کاروتنوئیدها در مقایسه با گونه‌های دیگر چندین برابر می‌شود. *رودوتورولا* از مخمرهای فلور نرمال در بدن انسان است، از این رو می‌تواند منبع مهمی در تولید بتاکاروتن برای کاربرد صنعتی برای انسان باشد. بهینه سازی درشرایط زیست محیطی در تخمیر میکروبی لازم است تا از پتانسیل سویه میکروبی بهره برداری کامل انجام شود (۳۱ و ۳۲).

متغیرهای بهینه سازی در این تحقیق منجر به افزایش کارتنویید شد. زیست توده برخی از مخمرها مانند *رودوتورولا گلوتینیس* به عنوان یک منبع برای سنتز بتاکاروتن مورد استفاده قرار می‌گیرد که به طور قابل توجهی موجب افزایش سوددهی اقتصادی فرآیندهای بیوتکنولوژی است. این مساله نشان می‌دهد مخمرها پتانسیل سنتز کارتنوییدها را در صنعت دارند و همچنین عوامل زیست محیطی انتخاب شده در افزایش و

بهره‌وری بیشتر آن‌ها تاثیر به سزایی دارد (۳۳). این تحقیق ارزان قیمت با سوددهی بالا می‌باشد.

BCC Research در سال ۲۰۱٦ بیان کرد که با توجه به داده‌های جهانی منتشر شده، بازار جهانی کارتنویید در سال ۲۰۱٤، به ارزش ۵/۱ میلیارد دلار گزارش شد و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۱۸ ارزش آن به ۸/۱ میلیون دلار افزایش یابد (۳٤).

برطبق نتایج پژوهش آکسوز (Aksuz) و همکاران، *رودوتورولا موسیلاژینوسا* دارای بالاترین پتانسیل تولید کاروتنوئید نسبت به گونه استاندارد مورد استفاده در این مطالعه است، که با داده‌های این تحقیق نیز تایید می‌شود. پژوهش های مختلف نشان داده است که در آینده *رودوتورولا موسیلاژینوسا* یکی از امیدوار کننده‌ترین میکروارگانیسم‌های به منظور تولید تجاری کاروتنوئیدها با بهینه سازی شرایط محیط کشت خواهد بود (۳۵). به دلیل ویژگی‌هایی مانند ماهیت تک سلولی، رشد سریع و توانایی تولید کاروتنوئیدها به ویژه تورولودین، *رودوتورولا موسیلاژینوسا* به عنوان یک مخمر صنعتی بالقوه مورد توجه می باشد (۳٦).

در این تحقیق، با توجه به علاقه جدید به کاروتنوئیدهای میکروبی، عوامل استرس موثر بر کاروتنوژنز، با ابزارهای تحلیلی پیشرفته به منظور تولید کاروتنوئید بررسی شده است. کاروتنوئیدها یکی از رایج‌ترین انواع رنگدانه‌ها موجود در طبیعت هستند که با توجه به خواص بیولوژیکی شان به طور گسترده در لوازم آرایشی و بهداشتی در صنایع غذایی و خوراکی استفاده می‌شوند. بر این اساس، بازار جهانی آن‌ها به طور مداوم در حال رشد است و انتظار می‌رود در سال ۲۰۱۸ به حدود ۱/٤ میلیارد دلار برسد. کاروتنوئیدها به راحتی می‌توانند با سنتز شیمیایی تولید شوند، اگر چه تولید بیوتکنولوژی آن‌ها به سرعت جایگزین جذاب برای مسیر شیمیایی است، نگرانی در برابر رنگدانه‌های مصنوعی در میان مخمرها و جدا از گونه‌های رنگی *فافیا رودوزیما* (*Phaffia rhodozyma*)، تعداد کمی از گونه‌های *رودواسپوریدیوم* (*Rodosporidium*)، *رودوتورولا*، *اسپوروبولومایسس* (*Sporobolomyces*) و *اسپوریدیوبولوس* (*Sporidiobolus*)، به خوبی تولید کننده کاروتنوئید هستند. این‌ها به عنوان "مخمرهای قرمز" شناخته می‌شود و اخیرا به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است و توانایی آن‌ها برای ترکیب با کاروتنوئیدها، از منابع کربن کم هزینه به طور گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفته است. (۳۷).

مواد شیمیایی استفاده شده در این تحقیق تولید کارتنویید را افزایش داد. سینگ (Saenge) و همکاران در سال ۲۰۱۱ ثابت کردند که حضور ترکیبات و مواد شیمیایی مختلف در محیط کشت می‌تواند تولید کاروتنویید توسط *رودوتورولا گلوتینیس* را تشدید کند (۳۸). جانسون (Johnson) و همکاران نشان دادند که مقدار کل کاروتنوئیدها با مقدار زیست توده سلولی رابطه مستقیم ندارد. تجمع رنگدانه‌های کاروتنوئیدی در اکثر مخمرها در مرحله فاز لگاریتمی شروع می‌شود و در فاز ثابت ادامه می‌یابد (٤۲ –۳۹). مشاهده شد که کاروتنوئیدها تقریبا به طور موازی با رشد سلول تشکیل شده‌اند که با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی ندارد، اما یموت (Yimyoot) و همکاران نشان دادند که سویه‌های مختلف دارای الگوهای مختلف برای تولید کاروتنوئید هستند که مشابه نتایج این مطالعه برای سویه‌های مختلف *رودوتورولا* بوده است (٤۳).

با بهینه سازی در موارد مختلف منبع نمک و منبع نیتروژن، منبع کربن، هوادهی، دما، pH، نتایج به دست آمده نشان داد که سویه Aa1 بیشتر از سویه استاندارد رشد و تولید بتاکاروتن داشته است. در پژوهش حاضر بیشترین میزان تولید بتاکاروتن توسط سویه بومی جداشده از پساب کارخانه چرم *رودوتورولا موسیلاژینوسا* پس از بهینه سازی در مجاورت سولفات آهن ۷۵/٦، عصاره مخمر ۳۳/۹، قند سوکروز ۵۱/٦، هوادهی (با دور۱۵۰) ۷۱/٤، درجه حرارت (۳۰ درجه سلیسیوس) ٦۱/۳٦۲ و در pH ۱۱، مقداری معادل با ۲۵/۱ میکروگرم درمیلی لیتر به دست آمد. این مقادیر در مقایسه با بتاکاروتن تولید شده توسط سویه استاندارد *رودوتورولا گلوتینیس* چشم‌گیر بود. بدین ترتیب این مخمر در شرایط یاد شده می‌تواند در صنعت مقدار زیادی بتاکاروتن تولید نماید. نتایج نشان داد که حداکثر میزان تولید کل کاروتنوئیدها به طور مستقیم با حداکثر میزان بیوماس سلولی و نوع کاروتنوئید

ارتباطی ندارد و میزان نسبی آن‌ها ممکن است بسته به نوع مخمر متفاوت باشد. به نظر می‌رسد که مخمرهای کاروتنوژیک یک واکنش مشترک از رشد سلولی و تولید کاروتنوئید در پاسخ به دوره‌های مختلف انکوباسیون را نشان نمی‌دهند. با وجود شناسایی چگونگی بیوسنتز کاروتنوئید توسط مخمرهای *رودوتورولا*، استفاده صنعتی آن‌ها عمدتا به دلیل اطلاعات ضعیف در مورد مکانیسم‌های تنظیم کننده بیوسنتز کم است. واضح است که هر دو گونه دارای توانایی تولید کاروتنوئید هستند.

با این حال، مطالعات بیشتری برای روشن ساختن مسیر تولید رنگدانه توسط این سویه بومی در صنایع غذایی، دارویی و لوازم آرایشی مورد نیاز است. استفاده از نتایج بهینه سازی تولید زیست توده و رنگدانه بتاکاروتن در مورد این گونه بومی می تواند زمینه ساز و نویدبخش استفاده از آن ها در فرایندهای صنعتی در آینده نزدیک باشد (٤٤).

نتیجه گیری

مخمر *رودوتورولا موسیلاژینوسا* جدا شده از پساب کارخانه چرم، توانایی تولید کاروتنوئید با پتانسیل بالا را دارد. بنابراین، انجام تحقیقات بیشتر می‌تواند امکان استفاده از این مخمر در صنایع غذایی و دارویی برای پیشگیری از سرطان را فراهم کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Alhui D, Salami M, Moslehi happy M. The study of the synergistic effect of natural pigments on antioxidant properties in food industry. J Sci Technol. 2017; 14(67): 62-53. [In Persian]
2. Miguel D, Sieiro T, Poza C, Villa T. Analyse of canthaxanthin and pigments from *Gordonina jacobaea* mutants. J Agric Food Chem. 2001; 49(35): 1200-1202.
3. Edge R, McGravy D, Truscott T. The carotenoids as antioxidants-are view. J Photochem. Photobiol. 1997; 41(32): 189-200.
4. Venil c, Erumalsamyl G. An in sightful over view on microbial pigment prodigiosin. Electronic J Biol. 2009; 5(3): 49-61.
5. Edge R, McGarvey D, Truscott T. The carotenoidsas antioxidants a review. J Photochem Photobiol. 1997; 41(4): 189-200.
6. Woodside J, McGrath A, Lyner N, McKinley M. Carotenoidsand health in older people. J Maturitas. 2015; 80(3): 63-68.
7. Eugenia M, Talos D, Panaitescu M. Studies onmetabolic role of *Rhodotorula rubra* 120 r carotenoid pigments. Rou Biotechnol Lett. 1997; 2(5): 55-60.
8. Nelis H, De Leenheer A. Microbial sources of carotenoid pigments used in food and feeds. J Appl Bacteriol. 1991; 70(4): 181-191.
9. Bhosale P, Gadre R. Production of b-carotene by amutant of *Rhodotorula glutinis*. Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 20(5): 195-230.
10. Sympson K, Nakayama T, Chichester C. Biosynthesis of yeast carotenoids. J Bacteriol. 1964; 88(6): 1688-1694.
11. Buzzini P. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG

3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source J Indust Microbiol Biotech. 2000; 24 (9): 41-45.

12. Costa I, Martelli H, Dasilva I, Pomeroy D. Production of β-carotene by a *Rhodotorula* strain. Biotechnol Lett. 1987; 9(8): 373-375.

13. Martin A, Chun L, Patel T. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula slooffiae* grown in peat extracts. J Ferm Bioeng. 1993; 76(6): 321-325.

14. Santos C, Caldeira M, Lopes da Silva T, Novais J, Reis A. Enhanced lipidicalgae biomass production using gas transfer from a fermentative *Rhodosporidium toruloides* culture to an autotrophic *Chlorella protothecoides* culture. Bioresour Technol. 2013;138(6): 48-54.

15. Wirth F, Goldani L. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2012; 10(1155): 465-717.

16. Latha B, Jeevaratanm K. Thirteen-week oral toxicity study of carotenoid pigment from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY in rats. Indian J Exp Biol. 2012; 50(3): 645-651.

17. Ram Krishna Rao M, Selva Kumar S, Fahmida Banu S. Characterization and identification of predominant microorganisms from agro-waste**.** J Der Pharmacia Lett. 2016; 8(5): 79-86.

18. Kwon-Chang K, John E, Bennet A. Medical mycology. J Amaerica. 1992; 22(7): 88-70.

19. Šuranská H, Vránová D, Omelková J. Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. Braz J Microbiol. 2016; 47(1): 181-190.

20. Zhao X, Kong X, Hua Y, Fen B, Zhao Z. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces* starkeyi. J Euro J Lipid Sci Technol. 2008; 110(9): 405-412.

21. Razavi H, Rezaei K, Ivan M. Comparison of pigment (carotenoid) extraction methods from *Sporobolomyces ruberrimus* H110. J Iran Food Sci Technol. 2005; 2(1): 33-42.

22. Varmira K, Habibi A, Bahramian E, Jamshidpouu S. Progressive agents for improvement of carotenogenesis in *Rhodotorula rubra.* J Adv in Food Sci & Technol. 2016; 3(2): 70-78.

23. Amr El-Banna, Amal A, Ahmed R, Mahdy E. Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis var.* glutinis. J Food Nutr Sci. 2012; 3(5): 64-71.

24. Naghavi F, Hanachi P, Soudi M, Saboora A, Ghorbani A. Evaluation of the relationship between the incubation time and carotenoid production in *Rhodotorula slooffiae* and *R. mucilaginosa* isolated from leather tanning wastewater. Iran J Basic Med Sci. 2013; 16(7): 1114-1118.

25. Hernández-Almanza A, Montanez J, Aguilar-González M, Martínez Á, Rodríguez-Herrera R, Aguilar C. Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry. J Food Bio Sci. 2014; 5(11): 64-72.

26. Woodside J, McGrath A, Lyner N, McKinley M. Carotenoids and health in older people. J Maturitas. 2014. 20(15): 63-68.

27. Panesar R. Bioutilization of kinnow waste for the production of biopigments using submerged fermentation. Int J Food Sci Nutr. 2014; 3(8): 9-13.

28. Carocho M, Morales P, Ferreira I. Quovadis trends in food science & technology. J Natural Food Additive. 2015; 45(9): 284-295.

29. Krinsky N. Carotenoid as antioxidants. J Nutr. 2001; 17(8): 815-817.

30. Frengova G, Simova E. Pavlova K. Beshlova D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in Whey ultrafiltrate. Biotechnol Bioeng. 1994; 44(8): 888-894.

31. Parekh S, Vinci V, Strobel R. Improvement of microbial strains and fermentation processes. J Appl Microbiol Biotechnol. 2000; 54(7): 287-301.

32. López-Nieto M, Costa J, Peiro E, Méndez E, Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente J, Cabri W, Barredo J. Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*. J Appl Microbiol Biotechnol. 2004; 66(8): 153-159.

33. Anna M, Agni E, Iwona G, Marek K. *Rhodotorula glutinis* potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. J Appl Microbiol Biotechnol. 2016; 100(4): 7611-7618.

34. Bcc Research. The Global Market for Carotenoids (Accessed 29 Jan 2016). Available market-report-fod025e.html at: http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoidsglobal.

35. Aksu Z, Tugba E. Carotenoid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* use of agricultural wastes as carbon source. Process Biochem. 2005; 40(7): 2985-2991.

36. Qiang W, Dong L, Qingxiang Y, Panliang W. Enhancing carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa* KC8 by combining mutation and metabolic engineering. J Annal Microbiol. 2017; 6(67): 425-431.

37. Ilaria M, Landolfo S, Teresa S, Buzzini P. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. World J Microbiol Biotechnol. 2015; 11(31): 1665-1673.

38. Saenge C, Cherisilp B, Suksaroge T, Bourtoom T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochem. 2011; 46(6): 210-218

39. DeMan J. Principles of Food Chemistry (3^{th} ed). J Asp Publishers: 1999; 45:67-45.

40. Fang T, Chiou T. Optimization of cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. J Ferment Bioeng. 1993; 75(4): 466-469.

41. Johnson E, An G. Astaxanthin from microbial sources. Crit Rev Biotechnol. 1991; 11(2): 297-326.

42. Goodwin T. Carotenoids in fungi and non-photosynthetic bacteria. Prog Indusr Microbiol. 1972; 11(8): 29-88.

43. Yimyoo T, Yongmanitchai W, Limtong S. Carotenoid production by *Rhodosporidium*

paludigenim DMKU3-LPK4 using glycerol as the carbon source. Kasetsart J Nat Sci. 2011; 45: 90-100.

44. Naghavi F, Hanachi P, Soudi M, Saboora A, Ghorbani A. Evaluation of the relationship between the incubation time and carotenoid production in *Rhodotorula slooffiae* and *R. mucilaginosa* isolated from leather tanning wastewater. Iran J Basic Med Sci. 2013; 16(10): 1114-1118.

Journal of Microbial World
Volume 12, No. 1, April 2019

Original Article

Optimization of beta-carotene production of *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from the waste leather factory

Sheida Beiranvand[1], Mohaddeseh Larypoor[2], Jamileh Norozi[3]

[1]M.Sc., Department of Microbial Biotechnology, Islamic Azad University, Tehran North Branch , Tehran, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbial Biotechnology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran.
[3]Professor, Department of Microbial Biotechnology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Yeasts have a special value for human in biotechnology because of the production of pigments. *Rhodotorula* species produce high amounts of beta-carotene. The aim of this study was to maximize the production of beta-carotene at least prices from native yeast species.

Materials & Methods: The four isolation evaluated were isolated from specific environments during three stages of sampling from the waste leather factory. Subsequently, two isolates of Aa1 and Aa4 were identified using the biochemical test and PCR technique. The production of beta-carotene was determined by the identified isolates and a standard strain in different conditions of salt, nitrogen source, carbon source, aeration, temperature, and pH. Optical absorption of the pigment was read through spectrophotometer at 470 nm.

Results: Among the four isolates, only the isolate Aa1 is capable to produce carton-free pigment. The genetic identification of the two isolates Aa1 and Aa4 confirmed 98% similarity to those of *Rhodotorula mucilaginosa* and *Debaryomyces hanseni*, respectively. The results showed that the maximum production of beta-carotene was obtained after optimization of 75.6 µg/ml for *Rhodotorula mucilaginosa* and 32.7 µg/ml for *Rhodotorula glutinis* (standard strain).

Conclusion: The isolation of native species and the optimization of its functional activities in the laboratory is not only useful in the production of high-quality industrial products, but also the use of the native species is highly economical.

Keywords: Optimization, Beta-carotene, Antioxidant, *Rhodotorula.*

Correspondence to: Mohaddeseh Larypoor

Tel: +98 9122885346

E-mail: mlarypoor@yahoo.com

Journal of Microbial World 2019, 12(1): 39-52.

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.