Journal of Microbial World
Volume 13, No. 3, September 2020

Original Article

Optimization of Culture Conditions and Carotenoid Pigments production by *Micrococcus* spp. and *Rhodotorula* spp.

Maryam Zohari[1], Abbas Akhavan Sepahy[2], Kumarss Amini[3]

[1]Ph.D. Student, Department of biology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran Iran. [2]Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biolog, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [3]Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Markazi, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Biological sources of pigments receive major attention nowadays because of the stringent rules and regulations applied to chemically synthesized pigments. The aims of this study were isolating carotenoids producing *Micrococcus* spp. and *Rhodotorula* spp. from soil sources, optimizing the culture conditions for biomass and carotenoids production and its identification.

Materials and Methods: Carotenoid producing strains, *M. luteus* and *R. mucilaginosa*, were isolated from the soil and sediment samples in Kerman Province, Iran; they were identified using 16SrDNA analysis. Optimum conditions for biomass and carotenoids production were determined. FT-IR and spectrophotometry analysis showed high similarity of extracted pigments with carotenoids.

Results: The optimum temperature of growth and pigment production was 25 ºC. for both of bacteria and yeasts. The optimum pH for bacteria was 7 and for yeasts 6.5. 1% of carbon source for both of them was the optimum condition while about nitrogen source, 2% for bacteria and 1% for yeasts were the optimum condition for growth and pigment production.

Conclusion: Microorganisms presented in this study can be used as potential sources of commercial carotenoids production in Kerman, Iran.

Keywords: Spectrophotometry, *Micrococcus luteus*, *Rhodotorula mucilaginosa, FT-IR.*

Correspondence to: Abbas Akhavan Sepahi

Tel: +98 22949793

E-mail: a_akhavan@iau-tnb.ac.ir

Journal of Microbial World 2020, 13(3): 228-238.

DOI:

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.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزهم شماره سوم (پیاپی ۴۴) پاییز ۱۳۹۹
صفحات ۲۳۸-۲۲۸

Original Article

بهینه سازی شرایط رشد و تولید رنگدانه‌های کارتنوئیدی جدا شده از گونه‌های *میکروکوکوس* و *رودوتورولا*

مریم زهری[۱]، عباس اخوان سپهی[۲*]، کیومرث امینی[۳]

[۱]دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

[۲]دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[۳]دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: منابع بیولوژیک رنگدانه‌ها به دلیل تفاوت آن‌ها در خواص و شرایط تولید در مقایسه با روش‌های تولید شیمیایی، مورد توجه پژوهشگرانِ این رشته ها قراراست. هدف از این مطالعه جداسازی کارتنوئیدهای تولیدی از گونه‌های *میکروکوکوس* و *رودوتورولا* از منابع خاکی، بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید زیست توده و شناسایی رنگدانه کارتنوئیدی جدا شده بوده است.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی توصیفی بر روی ۱۰۴ نمونه‌ی *میکروکوس* و *رودوتورولا* (جدا شده از خاک مناطق کویری استان کرمان) انجام گرفت. سویه‌های *میکروکوکوس لوتئوس* و *رودوتورولا موسیلاجینوسا* مولد کارتنوئید، توسط آنالیز 16S rRNA شناسایی شدند. شرایط بهینه برای تولید بیومس و کارتنوئید تعیین گردید. رنگدانه‌های جدا شده به کمک اسپکتروفتومتری و FT-IR شناسایی گردیدند.

یافته‌ها: شرایط بهینه‌ی رشد و تولید رنگدانه از لحاظ دما برای هر دو تولید کننده‌ی رنگدانه دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس بوده است. pH برای باکتری‌ها ۷ و برای مخمرها ۶/۵ شرایط بهینه را ایجاد نمود. یک درصد کربن در محیط کشت برای هر دو (باکتری و مخمر) شرایط بهینه بود و درصد نیتروژن برای باکتری *میکروکوکوس لوتئوس* دو درصد و برای مخمر *رودوتورولا موسیلاجینوسا* یک درصد بوده است.

نتیجه‌گیری: داده‌های به دست آمده در مطالعه حاضر نشان دادکه میکروارگانیسم‌های شناسایی شده در این مطالعه به عنوان منبع بالقوه بومی خاک ایران در تولید کارتنوئید تجاری به حساب می‌آیند.

واژگان کلیدی: اسپکتروفتومتری، *میکروکوکوس لوتئوس*، *رودوتورولا موسیلاجینوسا*، FT-IR.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۹ پذیرش برای چاپ: مرداد ماه ۹۹

مقدمه

کارتنوئیدها رنگدانه‌های ترپنوئیدی با طیف رنگ زرد تا قرمز هستند که از باکتری‌ها، گیاهان، جلبک‌ها و قارچ‌ها جداسازی شده‌اند. تاکنون طی مطالعات مختلف نشان داده شده که کارتنوئیدها نقش حیاتی در کاهش صدمات اکسیداتیو در میکروارگانیسم‌ها دارند که به طور مشخص مربوط به تولید بتاکاروتن، به عنوان پیش‌ساز ویتامین A می‌باشد. به علاوه، بررسی‌های اخیر ثابت کرده‌اند که این رنگدانه‌ها دارای فعالیت‌های دیگری نیز هستند که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۰۹۸۲۲۹۴۹۷۹۳ پست الکترونیک: a_akhavan@iau-tnb.ac.ir

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.

ویژگی‌های ضد سرطانی، اثرات آنتی‌اکسیدانی، افزایش سطح ایمنی و تنظیم بیان ژن اشاره نمود. مطالعات نشان داده اند که بتاکاروتن ممکن است باعث آغاز مسیرهای تنظیمی حساس به احیا (redox) شده و به عنوان یک به دام اندازنده رادیکال‌های آزاد عمل کنند که سلول‌ها و بافت‌ها را از آسیب اکسیداتیو و رشد تومور نجات می‌دهند. علاوه بر این، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی رنگدانه‌های کارتنوئیدی جدا شده از گونه‌های *میکروکوکوس* توسط روش بررسی حذف رادیکالی DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl–2,2) نشان داده شده است (۱ و ۲). مطالعات متعدد اثبات می‌کند که مصرف مواد غذایی حاوی رنگدانه‌های کارتنوئیدی مانند کلم، سیب‌زمینی، اسفناج، هویج نقش غیر قابل انکاری در کاهش خطرات ابتلا به انواع مختلف بیماری‌ها به ویژه سرطان‌ها دارند. امروزه رنگدانه‌های کارتنوئیدی استخراج شده از منابع باکتریایی و مخمر کاربردهای گوناگون و مهمی دارند که بدلیل وجود طیف وسیعی از منابع نیتروژن و کربن، بی‌خطر بودن مصرف و استخراج میزان قابل توجه حجم سلولی مولد این رنگدانه‌ها مورد توجه می باشند. گرچه با افزایش تقاضا برای این رنگدانه‌ها، انگیزه برای معرفی جایگزین‌های جدید و مطمئن‌تر برای میکروارگانیسم‌های مولد کارتنوئیدی افزایش یافته است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که در آینده‌ای نزدیک میکروجلبک‌ها منابع اصلی ارگانیک برای تولید رنگدانه‌های کارتنوئید صنعتی خواهند بود (۱، ۳ و۴). تاکنون از حدود ۶۰۰ نوع کارتنوئید شناسایی شده فقط درصد کوچکی از آنها به دلیل زیست تخریب‌پذیری و زیست سازگاری قابلیت تولید و مصرف دارند. گروه‌های مختلفی از مخمرها، متعلق به جنس *رودوتورولا*، *اسپوروبلومایسس* و *فافیا*، همچنین باکتری‌های گرم مثبت شامل گونه‌هایی از جنس *فلاووباکتریوم*، *کورینه‌باکتریوم* و *میکروکوکوس* دارای توان تولید مقادیر بالایی از رنگدانه‌ها مانند بتاکاروتن، آستازانتین می‌باشند (۴). جنس *میکروکوکوس*، کوکسی گرم مثبت ، فاقد حرکت، فاقد توان تولید اسپور، هوازی اجباری و مولد مقادیر بالای رنگدانه‌ی کارتنوئیدی با ویژگی‌های فعالیت زیستی و ضد پرتویی است.

جنس *رودوتورولا* متعلق به مخمرهای بازیدیومیست و ساپروفیتی است که در همه جا وجود دارد و می‌توان آن را از منابع محیطی مختلفی جداسازی نمود. *میکروکوکوس* و *رودوتورولا* کارتنوئیدهایی را تولید می‌کنند که برای مصارف غذایی، دارویی و صنایع آرایشی مفید است و درصد به کارگیری آن وابسته به شرایط کشت می‌باشد. پیش از این نتزر (Netzer) و همکاران کارتنوئیدهای اصلی *M.luteus* NCTC 2665 را تحت عنوان سارسینازانتین جداسازی و شناسایی کرده‌اند (۵). بنجامین (Benjamin) و همکاران نیز رنگدانه کارتنوئیدی را از *M.luteus* BAA2 جداسازی و شناسایی نموده‌اند (۶). علاوه بر اینها ثابت شده است که به صورت بسیار نادری سویه‌های مختلفی از رودوتورولا ویژگی‌های خاصی را مانند ظرفیت تولید مقادیر انبوهی از کارتنوئیدها دارا می‌باشند (۷ و ۸). تولید انبوه کارتنوئیدهای طبیعی با استفاده از باکتری‌ها و مخمرها به دلیل راندمان بالای تولید، قیمت پایین محیط‌های کشت، تنوع و سادگی دستکاری در فرآیندهای متداول تولید بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تولید رنگدانه‌های کارتنوئیدی توسط گونه‌های *میکروکوکوس* و *رودوتورولا* می‌تواند به کمک بهینه‌سازی فرآیند تخمیر، به لحاظ اقتصادی اجرایی‌تر شود (۸). اهداف تحقیق حاضر شامل جداسازی کارتنوئیدها از گونه‌های مولد این ماده مانند میکروکوکوس و رودوتورولا و بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید کارتنوئیدها بوده است.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی میکروارگانیسم‌ها:

تعداد ۳۰ ظرف از نمونه‌های خاک ها ورسوبات مناطق کویری از استان کرمان جمع‌آوری گردید. نمونه‌های مختلف خاک از مناطق مختلف استان کرمان جمع‌آوری و در ظروف استریل قرار داده شد و در طی شش ساعت در کنار یخ خشک به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس بلافاصله برای جداسازی مخمر یا باکتری ها اقدام گردید. برای جداسازی باکتری‌ها و مخمرها، نمونه‌ها به ترتیب در نوترینت آگار و پوتیتو دکستروز آگار

کشت داده شدند. کشت‌های خالص از کلنی‌های باکتریایی مولد رنگدانه برای یک شبانه‌روز در نوترینت براث در ۳۵ °C گرمخانه گذاری شد. سپس برای مطالعات بیشتر در چهار درجه‌ی ساسیوس نگهداری شدند. مخمرهای جداسازی شده در نوترینت آگار (حاوی ۴۵ درصد گلوکز، ۱۳ µg/ml از پنی‌سیلین G و ۴۰ µg/ml از استرپتومایسین) کشت شده و به لحاظ مورفولوژی، فیزیولوژی و ویژگی‌های بیوشیمیایی مطابق با روش‌های Barnett و همکاران (۹) مورد بررسی قرار گرفتند. تفکیک گونه‌های رودوتورولا و باکتری *میکروکوکوس* بر اساس تخمیر کربوهیدرات و تست‌های بیوشیمیایی تا سطح گونه مطابق با روش‌های استاندارد انجام پذیرفت (۱۰).

ب) شناسایی مولکولی:

برای بررسی وجود ژن مولد رنگدانه‌ی کارتنوئیدی (*crt*) در میکروارگانیسم‌های مولد کارتنوئید، جدایه‌هایی که رنگدانه‌های پر رنگ‌تری را نشان دادند انتخاب و از بابت حضور خوشه‌ی ژنی *crt* در ژنومشان مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج DNA از باکتری و مخمر توسط کیت QIAamp Minikit (QIAGEN, Germany) و طبق دستورالعمل آن انجام گرفت. پرایمرها با استفاده از سکانس‌های شناسایی شده طراحی شدند. سکانس‌های هدف به کمک روش PCR و مطابق با روش استفسنس (Stafsnes) و همکاران (۱۱) و نتزر (Netzer) و همکاران (۵) تکثیر شدند. PCR با شرایط زیر و در ۳۵ چرخه انجام شد:

۹۵ درجه‌ی سلسیوس برای ۳۰ دقیقه، یک دقیقه در۵۶ درجه‌ی سلسیوس، یک دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس و سنتز پایانی در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس برای ۵ دقیقه انجام شد. تفکیک قطعات DNA توسط الکتروفورز بر روی ژل آگاروز دو درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید انجام شده و قطعات حاصل تعیین سکانس گردیدند. سویه‌های جدا شده توسط آنالیز سکانس 16S rRNA شناسایی گردید و درخت فیلوژنی با استفاده از روش neighbor-joining رسم گردید (۴). به علاوه *M.luteus* NCTC 2665 و *Rhodotorula* PTCC 5257 که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بودند به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند. پرایمرهای مورد استفاده برای باکتری و مخمر جهت بررسی حضور ژن مولد رنگدانه به صورت زیر بود:

پرایمرهای مورد استفاده برای باکتری crtYg-F (5-ATCTACCTGCTGGCCCT-3) و crtYh-R (5-TCAGCGA TCGTCCGGGTGGGG-3) بوده که منجر به تکثیر قطعات ۷۳۴ جفت بازی شده است. پرایمرهای مورد استفاده برای مخمر Crt I F 5-CCTGACTGCTGGCTCT-3 و crt I R 5-TACTACCTGCTGGTTCA-3 بوده که منجر به تکثیر قطعات ۸۸۵ جفت بازی شده است.

ج) استخراج رنگدانه‌ی کارتنوئیدی (۶):

نمونه های جمع‌آوری شده در ۱۰۰۰۰ rpm و گرمخانه‌گذاری در چهار درجه‌ی برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و با آب دو بار تقطیر شستشو شدند. زیست‌توده‌ی میکروارگانیسم‌ها اندازه‌گیری شد. این کار از طریق خشک کردن زیست‌توده برای *میکروکوکوس* در ۱۰۵ درجه‌ی سلسیوس و برای *رودوتورولا* تا زمانی انجام گرفت که به وزن ثابتی برسند. استخراج رنگدانه‌های کارتنوئیدی از گونه‌ها به این صورت انجام گرفت که جدایه‌های حاوی رنگدانه در محیط کشت LB حل شده و در ۳۷ درجه‌ی سلسیوس روی انکوباتور شیکر دار با دور ۱۲۰ rpm قرار داده شد. سپس محیط حاصل در ۸۰۰۰ rpm برای ۱۸ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در استن حل شده و توسط نسبت یک به پنج با پترولیوم اتر استخراج گردید. در صورت نیاز این فرآیند تکرار شد تا هر آنچه رنگ قابل مشاهده وجود داشت به طور کامل خارج گردد. رنگدانه‌های کارتنوئیدی استخراج شده از میکروارگانیسم‌ها توسط فویل آلومینیوم پوشانده شده تا نمونه از نور محافظت شود و برای آزمون‌های بیشتر در چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری گردید.

د) ایجاد شرایط بهینه‌ی رشد و تولید رنگدانه (۳۰):

به منظور بررسی اثرات کربن، نیتروژن، دما، زمان و pH روی میزان رشد و میزان تولید رنگدانه در نمونه های جداشده،

همه‌ی ترکیبات و سایر فاکتورها ثابت نگه داشته شد و فقط سطح فاکتور مورد آزمون تغییر کرد. رشد میکروارگانیسم‌ها توسط اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. بهینه سازی تولید کارتنوئید و رشد در *رودوتورولا* و *میکروکوکوس* با استفاده از محیط‌های کشت YPG (Yeast extract-Pepton Agar) و GPM (Glucose Pepton Yeast agar) تعیین گردید. محیط کشت YPG شامل چهار درصد NaCl با میکروارگانیسم تلقیح شده و در دماهای ۱۶، ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۰ درجه گرماگذاری گردید. سپس در ۱۲۰ rpm برای چهار روز شیک گردید. غلظت رنگدانه‌های کارتنوئیدی و وزن سلولی خشک در محیط، هر ۷۲ ساعت مورد آزمون قرار گرفت. سویه‌های باکتریایی در ۱۶، ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۰ درجه گرماگذاری شدند و پلت تولیدی هر سه ساعت مورد بررسی قرار گرفت. هر دو محیط کشت باکتریایی و مخمر برای دامنه‌ی pH ابتدایی مختلف شامل ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸ مورد آزمون قرار گرفتند. درصد کربن و نیتروژن شامل ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد تهیه شده و بهترین شرایط برای رشد و تولید رنگدانه تعیین گردید.

ه) شناسایی رنگدانه‌های خالص شده‌ی کارتنوئیدی:

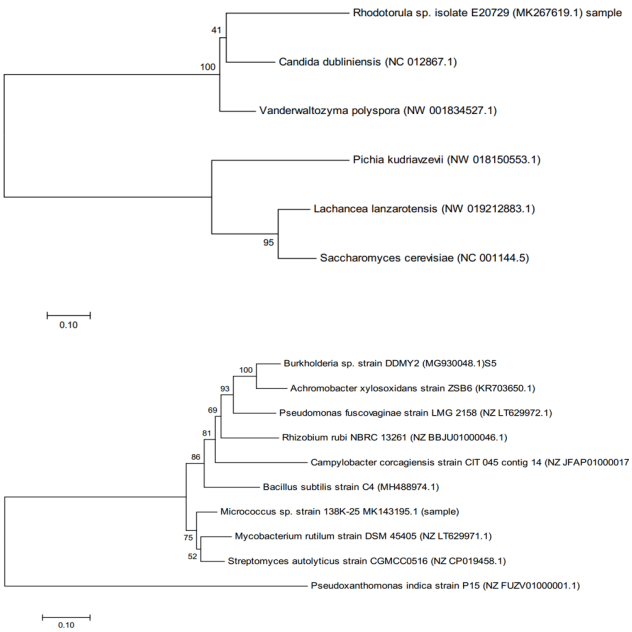
طیف جذبی رنگدانه کارتنوئیدی استخراج شده‌ی هر دو گونه در طول موج ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر با استفاده از UV-1202 spectrophotometer (Shimadzu, Germany) بررسی گردید و معلوم شد که حداکثر جذب در ۴۴۰ و ۴۷۰ نانومتر برای *میکروکوکوس* و *رودوتورولا* بود. کارتنوئید استخراج شده در پترولیوم اتر حل شده و غلظت نمونه‌ها توسط فرمولی که توسط Davis و همکاران توصیف شده (۱۴) تعیین شده است. طیف سنجیِ تبدیلِ مادونِ قرمزِ فوریه (FT-IR) کارتنوئیدهای استخراجی مطابق با روش Song (۱۵) انجام گرفت.

نتایج

الف) در این مطالعه، ۴۰ باکتری و ۶۱ سویه‌ی مخمر از نمونه‌ی خاک جداسازی شد. بر اساس آزمایشات بیوشیمیایی، بررسی مورفولوژیکی و آنالیز مولکولی، مشخص گردید که ۷۰ درصد از باکتری‌های جدا شده از خاک، *میکروکوس لوتئوس* و ۳۰ درصد *میکروکوس روزئوس* بودند. در میان گونه‌ی *رودوتورولا* ۹۵ درصد سویه‌ها متعلق به *رودوتورولا گلوتینیس* و یا *موسیلاجینوسا* هستند. جدایه‌های *میکروکوکوس لوتئوس* و *رودوتورولا* روی محیط کشت NA و PDA، کلنی‌های زرد و صورتی تا قرمز با سطح صاف ایجاد نمودند. آنالیز سکانس ژنی 16S rRNA از سویه‌های جدا شده برای ترسیم درخت فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفت که در شکل (۱) نمایش داده شده است. از ۱۰۴ نمونه‌ی جدا شده، پنج سویه‌ای که ثابت گردید حاوی ژن *crt* هستند و دارای رنگدانه‌های پر رنگ‌تری بودند برای ادامه‌ی آزمایشات انتخاب گردیدند.

ب) تاثیر پارامترهای مختلف بر تولید زیست‌توده و کارتنوئیدها:

حداکثر زیست‌توده و کارتنوئید تولیدی بعد از ۷۲ ساعت به دست آمد (شکل (۲)). راندمان تولید زیست‌توده در شرایط بهینه ۱۰/۵±۰/۳۴ g/L برای *میکروکوس لوتئوس* و ۱۱/۵±۰/۰۲۸ g/L برای *رودوتورولا موسیلاجینوسا* بوده است. همان گونه که در شکل (۳) نشان داده می‌شود، میزان pH، دما،

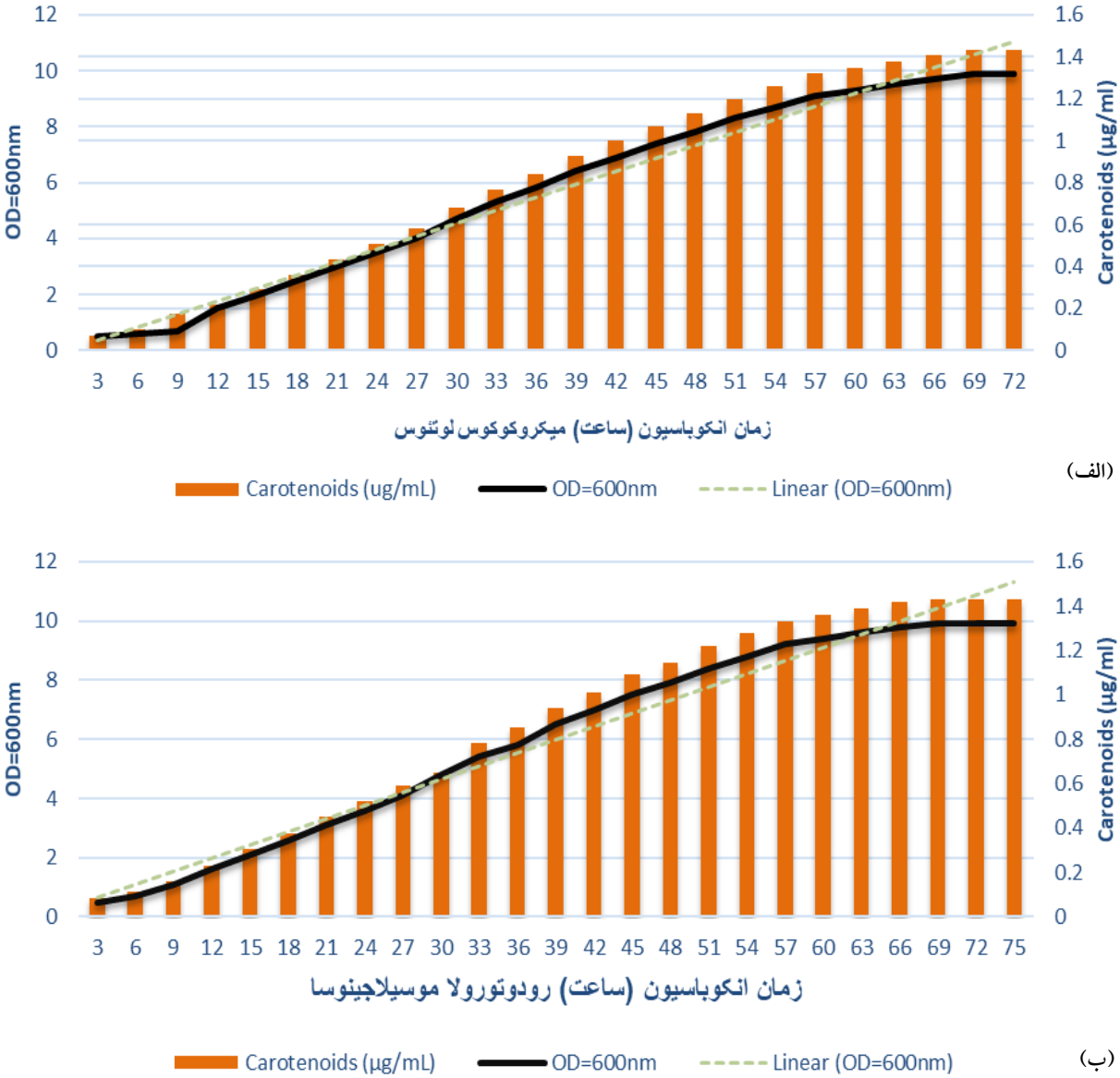


شکل ۱: درخت فیلوژنتیک توالی های ژن 16S rRNA سویه های جدا شده با استفاده از روش Neighbor joining و ضریب Boot Strap صد. باکتری *Pseudoxanthomas Indica* P15 و *Saccharomyces cervisiae* به عنوان گروه خارجی(outgroup) در نظر گرفته شده است.

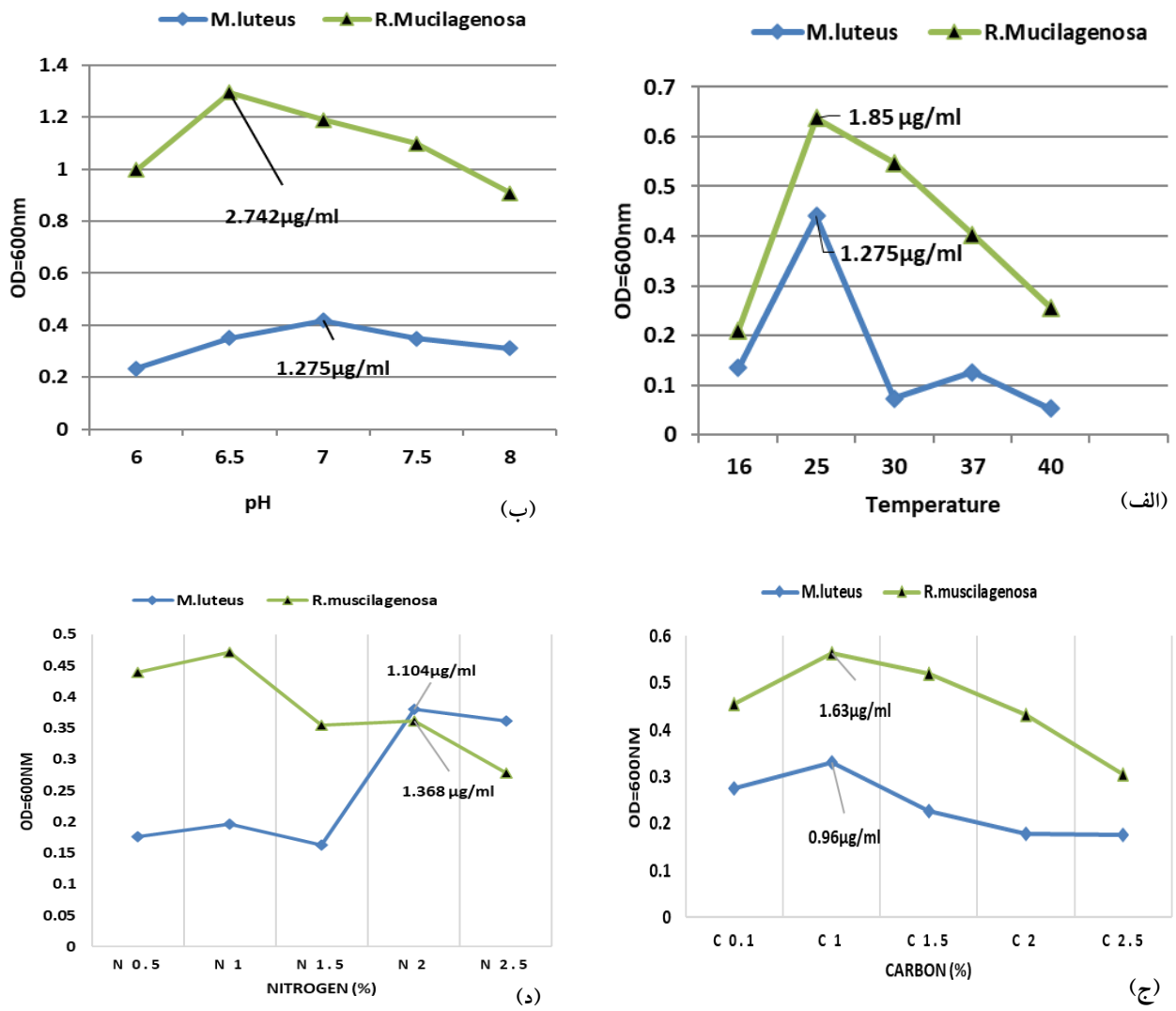
غلظت کربن و نیتروژن تاثیر قابل توجهی بر تولید زیست‌توده و کارتنوئیدها دارد. میکروارگانیسم‌ها در ۱۸ تا ۳۸ درجه‌ی سلسیوس قادر به رشد هستند اما شرایط بهینه‌ی رشد و تولید رنگدانه از لحاظ دما برای هر دو تولید کننده‌ی رنگدانه دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس بوده است. pH برای باکتری‌ها ۷ و برای مخمرها ۶/۵ شرایط ایده‌آل را ایجاد نمود. یک درصد کربن در محیط کشت برای هر دو (باکتری و مخمر) شرایط بهینه بود و درصد نیتروژن برای باکتری دو درصد و برای مخمر یک درصد بوده است. با افزایش زمان گرمخانه گذاری حجم زیست‌توده و تولید رنگدانه کارتنوئیدی افزایش یافته و به حداکثر میزان می‌رسد (شکل ۲ و ۳).

ج) جداسازی و شناسایی کارتنوئیدها:

رنگدانه‌های زرد و صورتی تولیدی توسط سویه‌های *میکروکوکوس* و *رودوتورولا*، استخراج شده و با اندازه‌گیری میزان جذب طیفی با اسپکتروفتومتری UV-Vis (به منظور تعیین طول موج حداکثر جذب رنگدانه) و اسپکتروسکوپی FT-IR، شناسایی گردید. روش FT-IR (طیف‌سنجی مادون قرمز) بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی



شکل ۲: تاثیر زمان انکوباسیون بر روی رشد (OD=600nm) و تولید کارتنوئید در: *میکروکوکوس لوتئوس* (الف) و *رودوتورولا موسیلاجینوسا* (ب).

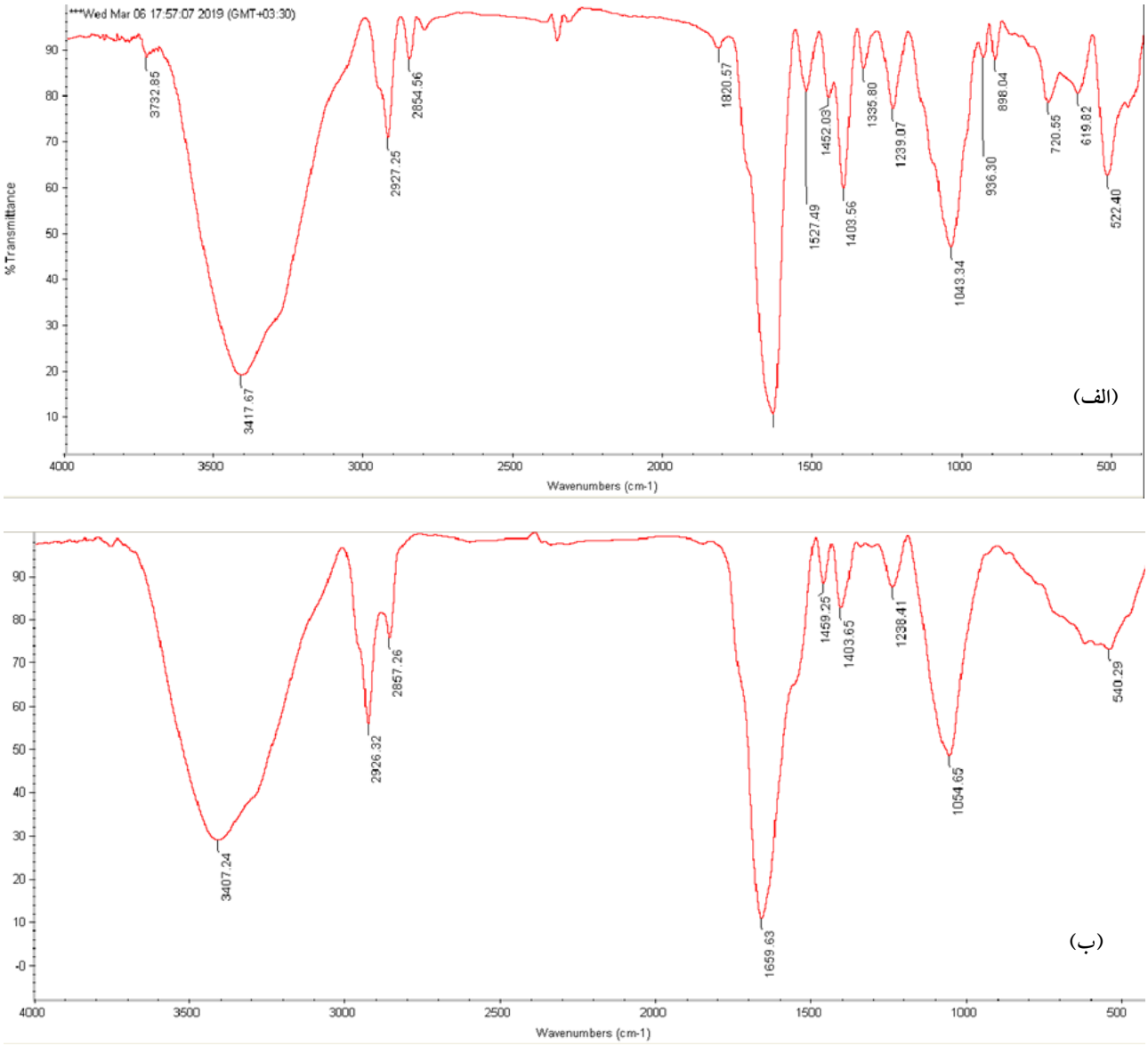


شکل ۳: تاثیر دما، pH، درصد کربن و نیتروژن محیط کشت بر تولید زیست توده (OD=600nm) و کارتنوئید در *میکروکوکوس لوتئوس* و *رودوتورولا موسیلاجینوسا* (OD=440nm) برای محاسبه‌ی پیگمان زرد و OD=470nm برای تعیین میزان پیگمان صورتی در هر خوانش میزان تولید توده‌ی زیستی): تأثیر دما (الف)، تأثیر pH (ب)، تأثیر درصد کربن (ج) و تأثیر درصد نیتروژن (د).

مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد (۲۰). رنگدانه‌های استخراج شده نشان داد که حداکثر جذب ۴۴۰ و ۴۷۰ نانومتر در محدوده‌ی UVA به ترتیب برای *میکروکوکوس* و *رودوتورولا* به دست آمده است. در طیف جذبی هر دو رنگدانه یک پیک اصلی و دو پیک فرعی مشاهده شده می‌شود. در طیف جذبی FT-IR هر دو رنگدانه پیک‌های گسترده و قوی را داشتند (شکل (۴)). آنالیز FT-IR مشابهت زیادی را میان این رنگدانه‌ها با کروماتوگرام مربوط به بتاکاروتن نشان داد.

بحث

امروزه با توجه به نقش اساسی کارتنوئیدها در صنایع مختلف به خصوص صنایع غذایی، تولید صنعتی کارتنوئیدهای طبیعی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها به دلیل راندمان بالای تولید، قیمت پایین محیط‌های کشت، تنوع و سادگی دستکاری در فرآیندهای متداول تولید از مهمترین زمینه‌های مطالعات دانشمندان است. این مطالعه بر آن بود تا به جداسازی کارتنوئیدها از گونه‌های *میکروکوکوس* و *رودوتورولا*، بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید کارتنوئیدها و شناسایی رنگدانه‌های تولیدی بپردازد. این



شکل ۴: نمودار FT-IR نشان دهنده گروههای عاملی رنگدانه زرد تولید شده توسط *میکروکوکوس لوتئوس* (الف) و رنگدانه صورتی تولید شده توسط *رودوتورولا موسیلاجینوسا* (ب) است.

مطالعه نشان داد که از ۵ سویه‌ی *میکروکوکوس* و *رودوتورولا*، جدایه‌های مخمر که رنگ بیشتری نشان دادند قادر بودند در محیط کشت مایع حاوی بیش از ۱۰ درصد NaCl رشد کرده و تولید اسید از مانیتول، فروکتوز، مانوز، سوربیتول و سوکروز نموده، نشاسته را مصرف کنند که بر اساس تحقیق بارنت (Barnett) و همکاران می‌تواند این ویژگی‌ها مربوط به سویه‌های *R. mucilaginosa* باشد (۹). همانطور که مطالعات پیشین نشان داده‌اند. سویه‌های مختلف باکتریایی و مخمر کارتنوئید تولید می‌کنند. تولید رنگدانه‌ها به خصوص کارتنوئیدها در جدایه‌های مختلف از جنس *میکروکوکوس* و *رودوتورولا* در سایر مطالعات گزارش شده است. ژاوو (Zhao) و همکاران، همچنین موتژیلان (Muthezhilan) و همکاران مخمرهای متعلق به جنس *رودوتورولا* را جداسازی نمودند که قادر به تولید رنگدانه‌ی قرمز کارتنوئیدی بودند (۱۳ و ۱۹). سورخا (Surekha) و همکاران رنگدانه‌های کارتنوئیدی را خالص‌سازی نمودند که زرد رنگ و غیر محلول در آب بوده و خارج سلولی بودند. این رنگدانه‌ها توسط سویه‌ی *میکروکوکوس لوتئوس* BAA2 ترشح شده بودند (۲۰). مطالعه‌ی مشابهی با نتایج مشابه توسط الوندواوی

(Al-Wandawi) و همکاران (۲۱) در همین رابطه انجام شده است. در مطالعه‌ی حاضر افزایش زمان گرمخانه‌گذاری بیش از ۷۲ ساعت باعث کاهش هر دو فاکتور تولید زیست‌توده و کارتنوئید گردید. السانوتی (Elsanhoty) و همکاران نشان دادند که زمان گرمخانه‌گذاری بر تولید کارتنوئیدها در *رودوتورولا موسیلاجینوسا* اثر دارد. بیشترین افزایش برای تولید زیست‌توده و رنگدانه پس از گرمخانه‌گذاری سه روزه مشاهده گردید (۲۲). تاسکین (Taskin) و همکاران اثرات زمان گرمخانه‌گذاری را در تولید رنگدانه‌ها در استخراج از تفاله‌ی هسته‌ی آلو به عنوان سوبسترا بررسی کرده و نشان دادند که بیشترین تولید کارتنوئیدها ظرف ۹۶ ساعت دیده شده است (۲۳). با توجه به مطالعات السانوتی (Elsanhoty) و همکاران، همچنین مالیسون (Malison) و همکاران pH بهینه برای تولید کارتنوئیدها به ترتیب ۶/۵ و ۶ بوده است (۲۲ و ۲۴). مطالعات انجام شده در تعیین درصد کربن و نیتروژن محیط کشت نشان داده که بهترین منبع تأمین این عناصر به ترتیب گلوکز و عصاره‌ی مخمر می‌باشد (۱۳، ۲۵، ۲۹ و ۳۰) همان گونه که در شکل (۳) نمایش داده شده است حداکثر میزان زیست‌توده‌ی سلولی در محیط کشت حاوی یک درصد کربن و دو درصد نیتروژن به دست آمده است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه جدایه ها میزان بالای رنگدانه‌های کارتنوئیدی تولید نمودند. تولید زیست‌توده و رنگدانه وابسته به زمان گرمخانه گذاری، دما، pH، درصد کربن و نیتروژن بود. میکروارگانیسم‌های این مطالعه پتانسیل تولید تجاری را دارد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دو گانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات کمال امتنان و تشکر را دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. Br J Pharmacol. 2017;174(11):1290-324.
2. Mohana D, Thippeswamy S, Abhishe R. Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. Radiation Protection and Environment. 2013;36(4):168-74.
3. Maria AG, Graziano R, Nicolantonio DO. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? Food Nutr Res. 2015;59(1):26762.
4. Hashimoto H, Uragami C, Cogdell RJ. Carotenoids and photosynthesis. Carotenoids in Nature: Springer; 2016. p. 111-39.
5. Netzer R, Stafsnes MH, Andreassen T, Goksøyr A, Bruheim P, Brautaset T. Biosynthetic pathway for γ-cyclic sarcinaxanthin in *Micrococcus luteus*: Heterologous expression and evidence for diverse and multiple catalytic functions of C50 carotenoid cyclases. J Bacteriol. 2010;192(21):5688-99.
6. Benjamin S, Surekha P, Dhanya P. Micrococcus luteus Strain BAA2, A Novel Isolate Produces Carotenoid Pigment. Electronic J Biol.12(1).

7. Yolmeh M, Khamiri M, Ghaemi E, RamezanPour S. Antimicrobial Activity of Carotenoid Pigments Extracted from *Micrococcus roseus*. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9 (4):565-70.
8. Yolmeh M, Khomeiri M, Ghorbani M, Ghaemi E, Ramezanpour SS. High efficiency pigment production from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) under ultraviolet irradiation. Biocatalysis and agricultural biotechnology. 2017;9:156-61.
9. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification: Cambridge University Press; 1983.
10. Silva LT. Evaluating the potential of yeast strains to produce added value products for the food and/or pharmaceutical industries 2015.
11. Stafsnes MH. Characterization and exploitation of a marine microbial culture collection: –a special focus on carotenoid producing heterotrophic bacteria. 2013.
12. Marova I, Carnecka M, Halienova A, Certik M, Dvorakova T, Haronikova A. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. J Environ Manage. 2012;95:S338-S42.
13. Zhao Y, Guo L, Xia Y, Zhuang X, Chu W. Isolation, Identification of Carotenoid-Producing *Rhodotorula* sp. from Marine Environment and Optimization for Carotenoid Production. Mar Drugs. 2019;17(3):161.
14. Goodwin TW. Chemistry and biochemistry of plant pigments: Academic Press; 1976.
15. Song M-J, Bae J, Lee D-S, Kim C-H, Kim J-S, Kim S-W, et al. Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. J Biosci Bioeng. 2006;101(2):157-61.
16. Baskar V, Madhanraj P, Kanimozhi K, Panneerselvam A. Characterization of carotenoids from selected strains of *Streptomyces* sp. Ann Biol Res. 2010;1(4):194-200.
17. Rahimi MT, Sarvi S, Sharif M, Abediankenari S, Ahmadpour E, Valadan R, et al. Molecular Cloning, Expression and Characterization of Plasmid Encoding Rhomboid 4 (ROM4) of Tachyzoite of *Toxoplasma gondii* RH Strain. Iranian journal of parasitology. 2017;12(4):498.
18. Csepanyi E, Czompa A, Haines D, Lekli I, Bakondi E, Balla G, et al. Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model. Pharmacol Res. 2015;100:148-56.
19. Muthezhilan R, Ragul R, Pushpam R, Narayanan RL, Hussain AJ. Isolation, optimization and extraction of microbial pigments from marine yeast *Rhodotorula* Sp (Amby109) as food colourants. Biosci Biotechnol Res Asia. 2014;11:271-8.
20. Surekha P, Dhanya P, Sarath M, Pradeep S, Benjamin S. Micrococcus luteus strain BAA2, a novel isolate produces carotenoid pigment. Electronic J of Biology. 2016;12(1):83-9.
21. Al-Wandawi H. Carotenoid Biosynthesis in *Micrcoccus luteus* Grown in the Presence of Different Concentrations of Nicotine. International Journal of Pure & Applied Sciences & Technology. 2014;24(1).
22. Elsanhoty R, Al-Turki AI, M.M A-R. Production of carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa* and their applications as colorant agent in sweet candy. 2017;15:21-6.
23. Taskin M, Sisman T, Erdal S, Kurbanoglu EB. Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. Eur Food Res

Technol. 2011;233(4):657.

24. Malisorn C, Suntornsuk W. Optimization of β-carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. Bioresour Technol. 2008;99(7):2281-7.

25. Akinnibosun F, Omorodion S. Isolation and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria from Pesticide-Contaminated Agricultural Soils in Edo State, Nigeria. NISEB Journal. 2017;16(1).

26. Abbes M, Baati H, Guermazi S, Messina C, Santulli A, Gharsallah N, et al. Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. BMC Complement Altern Med. 2013;13(1):255.

27. Shree GS, Prasad KY, Arpitha H, Deepika U, Kumar KN, Mondal P, et al. β-carotene at physiologically attainable concentration induces apoptosis and down-regulates cell survival and antioxidant markers in human breast cancer (MCF-7) cells. Mol Cell Biochem. 2017;436 (1-2):1-12.

28. Vijay K, Sowmya PR-R, Arathi BP, Shilpa S, Shwetha HJ, Raju M, et al. Low-dose doxorubicin with carotenoids selectively alters redox status and upregulates oxidative stress-mediated apoptosis in breast cancer cells. Food Chem Toxicol. 2018;118:675-90.

29. Heidari H. R. , Partovifar M. , and Memarpoor M., Evaluation of the Bioactive Potential of Secondary Metabolites Produced by a New Marine *Micrococcus* Species Isolated from the Persian Gulf, Avicenna J Med Biotechnol. 2020 Jan-Mar; 12(1): 61–65.

30. Mohammadi M., Pourbabayee A. A., Javadi A., 2015, Optimization of carotenoid pigment production by native strains *Haloarchaea lipolitical*, Journal of Microbial World, Volume 8, No. 2 (in persian)