

بررسی اثرات سدیم آزید، دما و زمان گرمخانه‌گذاری بر تولید رنگدانه کاروتنوئیدی از میکروکوس

روزنوس

محمود یلمه^{۱*}، مرتضی خمیری^۲، عزت الله قائمی^۳، سیده ساناز رمضان پور^۲، محمد قربانی^۲

۱. دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

*نویسنده مسئول: Mahmud.yolmeh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱۵

چکیده

تولید رنگدانه از میکروارگانیسم‌ها نسبت به سایر منابع زیستی مثل گیاهان مزیت بیشتری دارد. تا به امروز، پژوهشی در رابطه با اثر مواد جهش‌زا بر میزان تولید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از میکروکوکوس روزنوس انجام نشده است. از این‌رو، هدف از این پژوهش بهینه‌سازی شرایط تولید رنگدانه کاروتنوئیدی از میکروکوکوس روزنوس تیمار شده با سدیم آزید بود. تولید کاروتنوئید از میکروکوکوس روزنوس در مجاورت عامل جهش-زای سدیم آزید به طور قابل توجهی افزایش یافت ($P < 0.05$). با این حال مجاورت میکروکوکوس روزنوس با غلظت‌های بالای سدیم آزید و مدت زمان اثر سدیم آزید، تولید کاروتنوئید کل و وزن خشک زیست‌توده از میکروکوکوس روزنوس کاهش یافت ($P < 0.05$). غلظت سدیم آزید و مدت زمان تیمار دهی با آن بیشترین اثر را بر تولید کاروتنوئید کل و وزن خشک زیست‌توده از میکروکوکوس روزنوس را داشتند. غلظت سدیم آزید ۹۴/۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، مدت زمان تیمار ۱۳/۲۳ دقیقه، دمای گرم‌خانه‌گذاری ۲۵/۹۱ درجه سلسیوس و مدت زمان گرم-خانه‌گذاری ۸۷/۸۷ ساعت به عنوان شرایط بهینه تولید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از میکروکوکوس روزنوس تحت تیمار با سدیم آزید یافت شد. در این شرایط بهینه، مقادیر پاسخ‌ها به‌ترتیب برای کاروتنوئید کل و وزن خشک زیست‌توده ۷/۶۱ میلی‌گرم بر لیتر و ۸/۳۶ گرم بر لیتر اندازه-گیری شد.

واژگان کلیدی: رنگدانه، میکروکوکوس روزنوس، سدیم آزید، بهینه‌سازی.

مقدمه

امروزه رنگ‌آمیزی چرم، پارچه، مواد غذایی و سایر مواد با رنگ‌های طبیعی به دلیل ماهیت غیر سمی و غیر آلرژیکی که دارند بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از سوی دیگر، استفاده رنگ‌های مصنوعی در صنایع مختلف برای مصرف‌کنندگان تبدیل به یک دغدغه شده است (Yolmeh et al., 2014). رنگ‌دانه‌های طبیعی علاوه بر ایجاد ظاهری رنگی و مطلوب در مواد مختلف می‌توانند ویژگی‌های جدیدی را در محصول ایجاد کنند، مثل فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی، که بویژه در صنایع غذایی اهمیت بالایی

دارد (Yolmeh et al., 2014). با توجه به اینکه بسیاری از رنگدانه‌های طبیعی غیر سمی، غیر سرطان-زاد، زیست‌تخریب‌پذیر و غیر حساسیت‌زا هستند، این رنگدانه‌ها به طور کلی ایمن (GRAS^۱) شناخته می‌شود (Sajilata et al., 2006). کاروتنوئیدها یکی از رنگدانه‌های مهم و پرکاربرد هستند که از منابع گیاهی و میکروبی به دست می‌آیند. این رنگدانه‌ها که متعلق به گروه شیمیایی پلی‌ان‌های ایزوپرنوئیدی^۲ هستند و

1. Generally Recognized as Safe

2. Polyenes isoprenoid

افزایش می‌یابد (Bhosale and Gadre, 2001). استراتژی افزایش تولید متابولیت میکروبی با استفاده از مواد جهش‌زا در باکتری‌ها توسط چندین محقق اشاره شده است (Arshad et al., Ghribi et al., 2004). بهینه‌سازی (Gharibzahedi et al., 2012؛ 2010). فرایندهای مختلف به منظور دستیابی به راندمان بالا با صرف کمترین مقدار هزینه و زمان اهمیت دارد که روش‌های آماری مختلفی، مثل روش سطح پاسخ^۴ (RSM) برای این منظور مورد استفاده قرار گرفته است. RSM یک روش آماری مفید برای تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه بر روی داده‌های اندازه‌گیری شده استفاده می‌شود. مزیت اصلی RSM کاهش تعداد آزمایشات مورد نیاز برای ارزیابی چندین متغیر و اثر متقابل آنها است (Yolmeh and Najafzadeh, 2014). این روش به‌طور موفقیت آمیزی برای تولید و استخراج چندین رنگدانه مثل کانتاگرانترین از باکتری *Dietzia natronolimnaea* HS-1^۵ (Gharibzahedi et al., 2012) کاروتنوئید از دانه آناتو (Yolmeh et al., 2014)، پیکوکروسین، سافرانال و کروسین از زعفران (Sarfazazi et al., 2015) و آنتوسیانین از برگ زعفران (Khazaei et al., 2015) استفاده شده است. چندین پژوهش در رابطه با تولید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از باکتری میکروکوکوس انجام شده است (Umadevi and Attri and Joshi, 2005)؛ (AL-Wandawi, 2014؛ Krishnaveni, 2013) ولی پژوهشی در رابطه با اثر مواد جهش‌زا بر میزان تولید این رنگدانه‌ها از باکتری میکروکوکوس انجام نشده است. از این‌رو، هدف از این پژوهش بهینه‌سازی شرایط

محلول در چربی بوده و رنگی زرد-قرمز ایجاد می‌کنند (Frengova et al., 2009؛ Dufosse et al., 2005). رنگدانه‌های مجاز خوراکی و طبیعی با منشاء گیاهی اشکالات متعددی از قبیل بی‌ثباتی در برابر نور، گرما، pH، حلالیت کم و اغلب عدم دسترسی آسان در طول سال را در پی دارند لذا امروزه پژوهشگران به دنبال تولید رنگدانه از میکروارگانیسم‌ها در صنایع مختلف هستند. تولید رنگدانه از میکروارگانیسم‌ها با توجه به رشد سریع و آسان، محیط کشت ارزان، استخراج راحت‌تر، عدم وابستگی به فصل خاصی از سال و گستردگی تنوع رنگ نسبت به سایر منابع زیستی دارای مزایای بیشتری است (Venil et Kim et al., 1999). چندین میکروارگانیسم تولیدکننده رنگدانه شناخته شده‌اند مثل میکروکوکوس، باسیلوس، موناسکوس پورپورئوس^۱، رودوتورولا^۲، و فافیا^۳ در طبیعت به طور معمول یافت می‌شوند (Dufosse et al., 2005). جهش‌زایی فرایندی جهت تولید یک موتانت ژنتیکی است. این فرایند ممکن است به‌صورت خود به خودی و یا با در معرض قرار گرفتن با مواد جهش‌زا رخ دهد. بطور کلی مواد جهش‌زا به دو دسته فیزیکی، مثل امواج فرابنفش و شیمیایی، مثل سدیم آزید دسته‌بندی می‌شوند (Beale, 1993). مشخص شده است که جهش‌زایی می‌تواند بر میزان تولید یک متابولیت و خصوصیات آن تاثیر مثبت و یا منفی داشته باشد (Ikram-Ul-Haq et Adu et al., 2005)؛ (Awan et al., 2010؛ al., 2010؛ Bhosale and Gadre (۲۰۰۱) تولید بتاکاروتن را از یک موتانت رودوتورولا گلوئینیس بررسی و مشاهده نمودند که میزان تولید این رنگدانه در مقایسه با سویه معمولی

4. Response surface methodology
5. *Dietzia natronolimnaea* HS-1

1. *Monascus purpureus*
2. *Rhodotorula*
3. *Phaffia*

موج ۶۰۰ نانومتر برای تلقیح در ۲۰ میلی لیتر محیط حاوی ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲ گرم بر لیتر آمونیوم سولفات با pH ۷ مورد استفاده قرار گرفته و در انکوباتور چرخشی در ۱۵۰ دور بر دقیقه، دما و زمان تعیین شده به کمک طرح آماری مورد استفاده (روش سطح پاسخ) گرم‌خانه‌گذاری شد (Umadevi and Krishnaveni, 2013).

استخراج رنگدانه و ارزیابی اسپکتروسکوپی سلول‌های میکروکوکوس روزئوس توسط سانتریفیوژ نمودن در دور $11000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه جدا شد سپس با آب مقطر شستشو داده و دوباره در شرایط بالا سانتریفیوژ شد. به سلول‌های میکروکوکوس روزئوس استون اضافه و توسط هموژنایزر (Scilogex D500, US) هموژنیزه شد. سپس این سوسپانسیون سانتریفیوژ و مایع رویی آن استفاده شد (Bhosale and Gadre, 2001). میزان جذب نوری محلول رنگی در طول موج‌های ۴۷۲ و ۵۰۸ نانومتر اندازه‌گیری و سپس میزان کاروتنوئید کل^۲ (TC) به کمک فرمول‌های زیر محاسبه شد:

$$C^Y (\mu\text{g/mL}) = \frac{((Abs_{472} \times 1724.3) - (Abs_{508} \times 2450.1))}{270.9}$$

$$C^R (\mu\text{g/mL}) = \frac{((Abs_{508} \times 2144.0) - (Abs_{472} \times 403.3))}{270.9}$$

که C^R و C^Y به ترتیب جز زرد و قرمز را تشکیل می‌دهند (Hornero-Mendez and Mínguez-) (Mosquera, 2001).

اندازه‌گیری زیست‌توده خشک^۳ (BDW)

تولید رنگدانه کاروتنوئیدی از میکروکوکوس روزئوس تیمار شده با سدیم آزید بود.

مواد و روش کار

باکتری میکروکوکوس روزئوس مورد استفاده در این پژوهش، از مرکز کلکسیون میکروارگانیزم‌های صنعتی ایران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. کلیه محیط کشت‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک آلمان تهیه و استفاده شد.

تیمار سدیم آزید

جهت تیمار سدیم آزید (جهش‌زایی شیمیایی) از روش حق و همکاران (Ikram-Ul-Haq et al., 2010) با کمی تغییر استفاده شد. بطور خلاصه، به هر لوله استریل حاوی ۵ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی میکروکوکوس روزئوس ۲۰۰-۴۰ میکروگرم بر لیتر سدیم آزید اضافه و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری شد. این لوله‌ها در ۶۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی آن دفع شد. جهت حذف کامل سدیم آزید، سلول‌های میکروکوکوس روزئوس رسوب داده شده شستشو و دوباره در شرایط بالا سانتریفیوژ شد. ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات استریل به لوله افزوده و ۰/۵ میلی لیتر از این سوسپانسیون در محیط نوترینت آگار^۱ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد.

شرایط تولید رنگدانه

یک تک کلنی از کشت نوترینت آگار به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت نوترینت برات انتقال داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت یک شب گرم‌خانه‌گذاری شد. ۰/۵ میلی لیتر از این محیط با کدورت ۰/۵ در طول

2. Total carotenoid
3. Biomass dry weight

1. Nutrient agar

قدرت پیش‌بینی بالا و دقت بیشتری خواهد بود (Yolmeh and Najafzadeh, 2014). پس از انتخاب مدل مناسب به کمک جدول آنالیز واریانس، معنی‌دار بودن عبارات مختلف، در سطح ۰/۰۵ درصد، بررسی گردید. مرحله آخر، بهینه‌سازی شرایط است که هدف از بهینه‌سازی افزایش مقادیر پاسخ‌ها بود. به‌وسیله مقدار مطلوبیت که بین ۰ تا ۱ بود اعتبار شرایط بهینه مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از تیمارها در جدول ۲ قابل مشاهده است. محدوده‌ی پاسخ برای کاروتنوئید کل و وزن خشک زیست‌توده به ترتیب ۷/۲۲-۳/۱۵ و ۷/۵۸-۳/۷۳ بود. مطابق جدول ۲، تیمار با ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سدیم آزید، مدت زمان اثر ۱۰ دقیقه، دمای گرم‌خانه‌گذاری ۲۲/۵ درجه سلسیوس و مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری ۹۰ ساعت بیشترین میزان کاروتنوئید کل (۷/۲۲ میلی‌گرم بر لیتر) را داشته و در حالی که تیمار با شرایط ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سدیم آزید، مدت زمان اثر ۲۰ دقیقه، دمای گرم‌خانه‌گذاری ۳۰ درجه سلسیوس و مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری ۶۹ ساعت بیشترین میزان وزن خشک زیست‌توده را دارا بود. علاوه بر این، یک آزمایشی بدون تیماردهی با سدیم آزید انجام گردید که نتایج آن نشان داد، میزان کاروتنوئید کل (۲/۹۱) در مقایسه با تیمارهای در حضور سدیم آزید کمتر می‌باشد. بطور کلی میزان وزن خشک زیست‌توده اندازه‌گیری شده (۶/۹۴) در نمونه شاهد بیشتر از سایر تیمارها، به‌جز تیمارهای ۶، ۹ و ۲۶ بود.

BDW با جداسازی ۵ میلی‌لیتر نمونه از کشت و فیلتراسیون بوسیله‌ی فیلتر ۰/۲ میکرومتر، شستشوی با آب مقطر و خشک کردن آنها در ۱۰۵ درجه سلسیوس تا یک وزن ثابت، محاسبه گردید (Gharibzahedi et al., 2012).

طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش اثر متغیرهای مستقل شامل غلظت سدیم آزید (X_1)، مدت زمان اثر سدیم آزید (X_2)، دمای گرم‌خانه‌گذاری (X_3) و مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری (X_4)، هر کدام در سه سطح مورد ارزیابی قرار گرفت. در جدول ۱ متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر سطوح آنها نشان داده شده است. مدل مورد استفاده در روش RSM معمولاً "معادله‌ی درجه دوم است. در روش RSM برای هر متغیر وابسته، مدلی تعریف شده که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، مدل چند متغیره به صورت زیر می‌باشد (Yolmeh and Najafzadeh, 2014).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4$$

در معادله ذکر شده Y پاسخ پیش‌بینی شده، β_0 ضریب ثابت و $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ اثرات خطی و $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$ اثر مربعیات و $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{23}, \beta_{24}, \beta_{34}$ اثرات متقابل می‌باشند. از نرم افزار Minitab 17 جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات استفاده شد و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ صورت گرفت. چهار مدل مختلف، خطی، خطی-مربعی، خطی-برهم‌کنش و درجه دوم کامل را بر نتایج بدست آمده، اعمال شد و مدل‌های مختلف را بر اساس R^2 ، R^2 اصلاح شده، R^2 پیش‌بینی شونده مقایسه شد به صورتی که مدلی که دارای بیشترین مقادیر این سه فاکتور باشد دارای

جدول ۱- نتایج تیمارهای مربوط به تولید رنگدانه از میکروکوکوس روزئوس

پاسخها		متغیرهای مستقل				
BDW (g/L)	TC (mg/L)	مدت زمان گرم- خانه‌گذاری (h)	دمای گرم‌خانه- گذاری (°C)	مدت زمان اثر سدیم آزید (min)	غلظت سدیم آزید (µg/mL)	تیمار
۶/۵۱	۵/۰۹	۶۹	۲۲/۵	۳۰	۴۰	۱
۴/۷۷	۴/۸۹	۶۹	۲۲/۵	۱۰	۲۰۰	۲
۴/۳۴	۴/۶۶	۹۰	۲۲/۵	۲۰	۲۰۰	۳
۴/۰۲	۳/۹۹	۶۹	۱۵/۰	۲۰	۴۰	۴
۳/۹۳	۴/۲۳	۶۹	۱۵/۰	۱۰	۱۲۰	۵
۷/۰۶	۵/۷۳	۹۰	۲۲/۵	۲۰	۴۰	۶
۵/۲۵	۶/۲۰	۶۹	۲۲/۵	۲۰	۱۲۰	۷
۵/۳۱	۶/۲۳	۶۹	۲۲/۵	۲۰	۱۲۰	۸
۷/۲۱	۴/۷۶	۶۹	۲۲/۵	۱۰	۴۰	۹
۳/۸۶	۴/۱۶	۴۸	۱۵/۰	۲۰	۱۲۰	۱۰
۵/۳۵	۶/۲۶	۶۹	۲۲/۵	۲۰	۱۲۰	۱۱
۴/۲۰	۳/۹۰	۴۸	۲۲/۵	۲۰	۲۰۰	۱۲
۵/۵۴	۵/۹۹	۴۸	۳۰/۰	۲۰	۱۲۰	۱۳
۶/۴۰	۶/۴۷	۴۸	۲۲/۵	۱۰	۱۲۰	۱۴
۶/۶۷	۷/۲۲	۹۰	۲۲/۵	۱۰	۱۲۰	۱۵
۴/۶۳	۳/۸۷	۶۹	۳۰/۰	۳۰	۱۲۰	۱۶
۴/۸۳	۴/۳۷	۶۹	۳۰/۰	۲۰	۲۰۰	۱۷
۴/۵۴	۴/۱۵	۹۰	۲۲/۵	۳۰	۱۲۰	۱۸
۶/۶۵	۵/۱۷	۴۸	۲۲/۵	۲۰	۴۰	۱۹
۶/۵۳	۶/۳۵	۶۹	۳۰/۰	۱۰	۱۲۰	۲۰
۴/۱۶	۳/۰۰	۶۹	۲۲/۵	۳۰	۲۰۰	۲۱
۶/۱۷	۶/۲۰	۹۰	۳۰/۰	۲۰	۱۲۰	۲۲
۴/۱۶	۴/۳۳	۹۰	۱۵/۰	۲۰	۱۲۰	۲۳
۳/۷۳	۳/۲۷	۶۹	۱۵/۰	۲۰	۲۰۰	۲۴
۳/۹۲	۳/۱۵	۶۹	۱۵/۰	۳۰	۱۲۰	۲۵
۷/۵۸	۵/۴۶	۶۹	۳۰/۰	۲۰	۴۰	۲۶
۴/۳۱	۳/۶۷	۴۸	۲۲/۵	۳۰	۱۲۰	۲۷
۶/۹۴	۲/۹۱	۴۸	۳۰/۰	.	.	*

*: شاهد (بدون تیمار با سدیم آزید)

مناسب در نظر گرفته شد. مدل مناسب برای هر یک از پاسخ‌ها به صورت زیر است:

پس از مقایسه R^2 های مدل‌های مختلف که در جدول ۳ مشخص شده، مدل خطی-مربعی برای هر دو پاسخ

$$BDW = 5/303 - 1/083 X_1 - 0/620 X_2 + 0/971 X_2 - 0/057 X_2^2$$

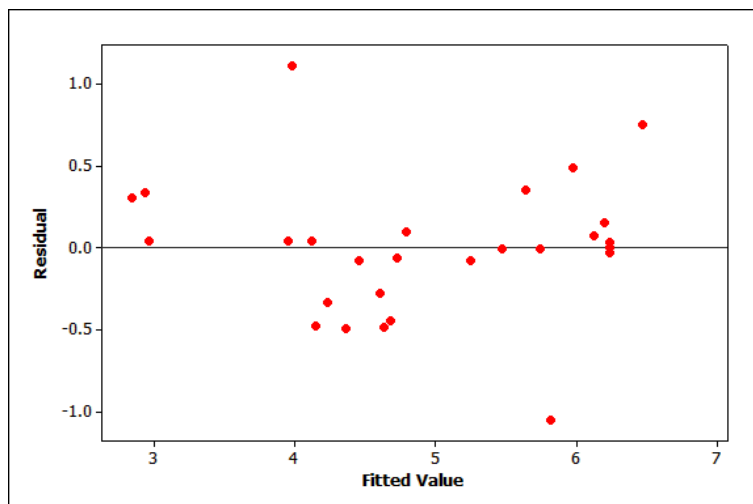
$$TC = 6/230 - 0/509 X_1 - 0/916 X_2 + 0/760 X_2 - 1/082 X_1^2 - 0/762 X_2^2 - 0/947 X_2^2$$

جدول ۲- مقایسه ضریب تعیین مدل‌های مختلف

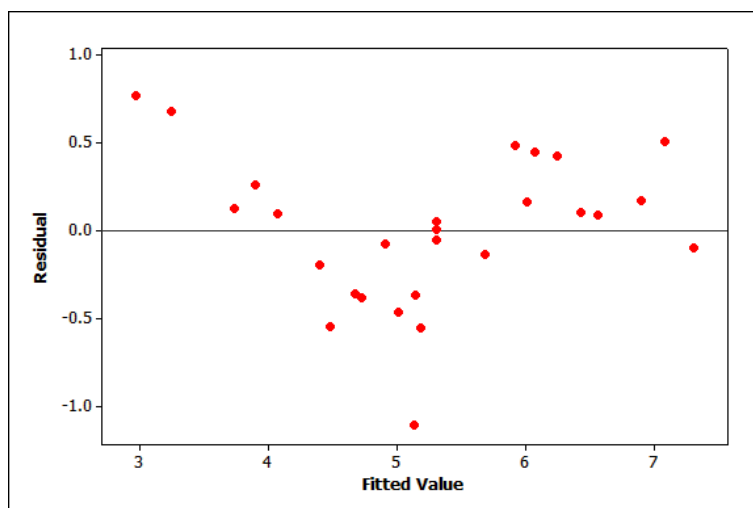
پاسخها		مدل
BDW (g/L)	TC (mg/L)	خطی
80/37	59/09	R^2 %
76/80	51/65	R^2 % تصحیح شده
69/06	42/80	R^2 % پیش‌بینی شده
		خطی-مربعی
87/72	86/83	R^2 %
82/26	80/98	R^2 % تصحیح شده
72/37	70/38	R^2 % پیش‌بینی شده
		خطی-برهمکنش
86/86	64/16	R^2 %
78/65	41/76	R^2 % تصحیح شده
56/07	13/27	R^2 % پیش‌بینی شده
		درجه دوم کامل
94/22	91/90	R^2 %
87/47	82/46	R^2 % تصحیح شده
66/73	53/38	R^2 % پیش‌بینی شده

اختلاف^۱ بین مقادیر پاسخ‌های پیش‌بینی شده^۲ و مقادیر مشاهده شده را در مقابل مقادیر پاسخ‌های پیش‌بینی-شده در شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب برای کاروتنوئید کل و وزن خشک زیست‌توده مشاهده می‌شود. میزان پایین اختلاف نشان‌دهنده دقت بالای مدل است (Yolmeh and Najafzadeh, 2014). همان‌طور که در شکل‌های ۱ و ۲ مشخص است مدل‌های انتخاب شده برای پاسخ‌ها مناسب بود.

1. Residual
2. Fit value



شکل ۱- اختلاف بین مقادیر TC پیش‌بینی شده و مقادیر مشاهده شده را در مقابل مقادیر پاسخ‌های پیش‌بینی شده



شکل ۲- اختلاف بین مقادیر BDW پیش‌بینی شده و مقادیر مشاهده شده را در مقابل مقادیر پاسخ‌های پیش‌بینی شده

جدول آنالیز واریانس برای ارزیابی معنی‌داری استفاده شد. برای هر یک از عبارتهای مدل یک مقدار F و یک مقدار P مشخص شده که هر چقدر میزان F بیشتر و میزان P کمتر باشد عبارت مورد نظر تاثیر بیشتری در میزان پاسخ و درواقع میزان معنی‌داری بیشتری خواهد داشت (Gharibzahedi et al., 2012). از این رو، مدت زمان تیمار دهی با سدیم آزید و غلظت سدیم آزید بیشترین اثر را بر تولید کاروتنوئید کل و وزن خشک زیست‌توده از میکروکوکوس روزئوس داشت (جداول ۴ و ۵).

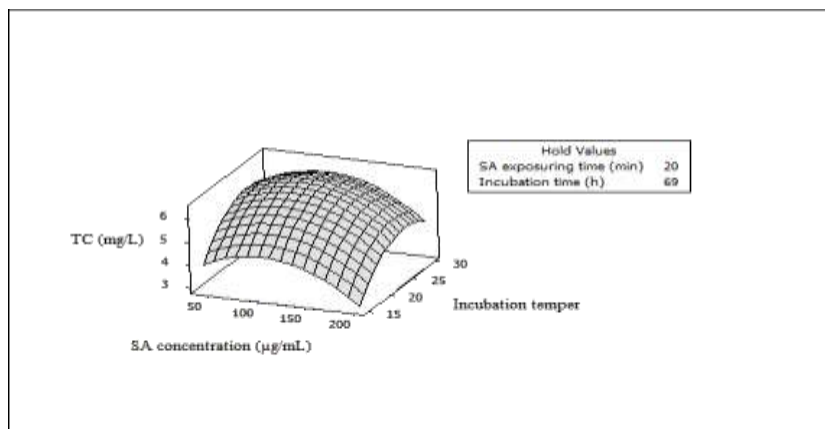
جدول آنالیز واریانس برای ارزیابی معنی‌داری استفاده شد. برای هر یک از عبارتهای مدل یک مقدار F و یک مقدار P مشخص شده که هر چقدر میزان F بیشتر و میزان P کمتر باشد عبارت مورد نظر تاثیر بیشتری در میزان پاسخ و درواقع میزان معنی‌داری بیشتری خواهد داشت (Gharibzahedi et al., 2012).

جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس مدل انتخاب شده برای کاروتنوئید کل (TC) و زیست‌توده خشک (BDW)

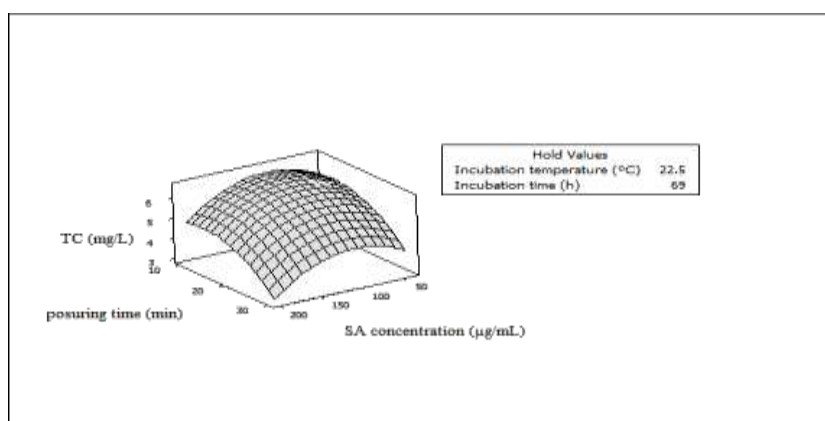
BDW				TC				
P	F	میانگین مربعات	درجه آزادی	P	F	میانگین مربعات	درجه آزادی	منبع
۰/۰۰۰	۱۶/۰۷	۴/۱۴۱	۸	۰/۰۰۰	۱۸/۸۴	۳/۸۲۲	۸	مدل
۰/۰۰۰	۲۹/۴۵	۷/۵۸۸	۴	۰/۰۰۰	۲۰/۲۰	۵/۲۰۲	۴	خطی
۰/۰۲۲	۵۴/۶۵	۱۴/۰۸۳	۱	۰/۰۰۳	۱۲/۰۸	۳/۱۱۱	۱	X _۱
۰/۰۰۹	۱۷/۹۰	۴/۶۱۳	۱	۰/۰۰۰	۳۹/۰۸	۱۰/۰۶۵	۱	X _۲
۰/۰۰۱	۴۳/۹۷	۱۱/۳۲۹	۱	۰/۰۰۰	۲۶/۸۵	۶/۹۱۶	۱	X _۳
۰/۲۷۵	۱/۲۷	۰/۳۲۶	۱	۰/۱۱۳	۲/۷۸	۰/۷۱۵	۱	X _۴
۰/۰۶۴	۲/۶۹	۰/۶۹۴	۴	۰/۰۰۰	۹/۴۸	۲/۴۴۲	۴	نمای دوم
۰/۲۸۴	۱/۲۲	۰/۳۱۳	۱	۰/۰۰۰	۲۴/۲۵	۶/۲۴۴	۱	X _۱ ^۲
۰/۷۹۷	۰/۰۷	۰/۰۱۷	۱	۰/۰۰۳	۱۲/۰۳	۳/۰۹۷	۱	X _۲ ^۲
۰/۰۲۷	۵/۷۶	۱/۴۸۴	۱	۰/۰۰۰	۱۸/۵۷	۴/۷۸۴	۱	X _۳ ^۲
۰/۶۶۳	۰/۲۰	۰/۰۵۰	۱	۰/۴۷۰	۰/۵۴	۰/۱۴۰	۱	X _۴ ^۲
-	-	۰/۲۵۷	۱۸	-	-	۰/۲۵۷	۱۸	باقیمانده
۰/۰۵۹	۲۸/۳۱	۰/۲۸۹	۱۶	۰/۰۷۱	۱۱/۱۲	۰/۲۸۹	۱۶	عدم برازش
-	-	۰/۰۰۲	۲	-	-	۰/۰۰۱	۲	خطای خالص
-	-	-	۲۶	-	-	-	۲۶	کل

بین عبارتهای درجه دوم، تنها عبارت دمای گرمخانه-گذاری اثر معنی‌داری بر میزان وزن خشک زیست‌توده داشت ($P < 0/05$). عدم برازش مدل‌های انتخاب شده برای هر دو پاسخ معنی‌دار نبود که نشان‌دهنده دقت مناسب مدل‌های انتخاب شده است. اثر متغیرهای مستقل بر میزان تولید کاروتنوئید کل در شکل‌های ۳ و ۴ و بر میزان تولید وزن خشک زیست‌توده در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است.

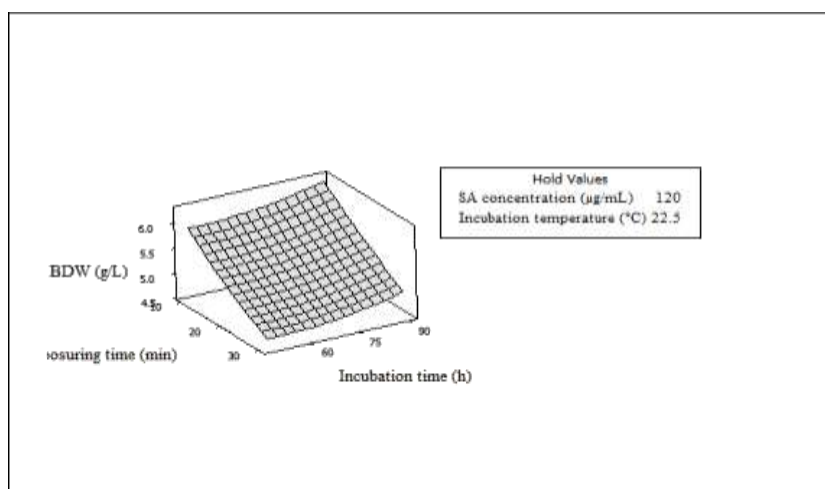
با توجه به جدول آنالیز واریانس مدل برای کاروتنوئید کل (جدول ۴) اثر همگی عبارتهای خطی به جز مدت زمان گرمخانه‌گذاری معنی‌دار بودند ($P < 0/05$). در میان عبارتهای درجه دوم نیز همگی عبارتهای به‌جز مدت زمان گرمخانه‌گذاری اثر معنی‌داری داشتند ($P < 0/05$). مطابق جدول آنالیز واریانس مدل میزان وزن خشک زیست‌توده (جدول ۵) همگی عبارتهای خطی به‌جز مدت زمان گرمخانه‌گذاری اثر معنی‌داری بر میزان وزن خشک زیست‌توده داشتند ($P < 0/05$) و



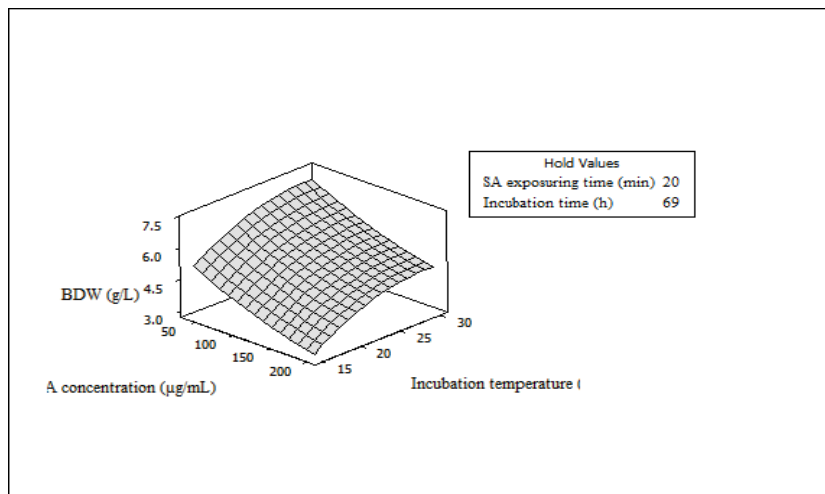
شکل ۳- اثر متقابل غلظت سدیم آزید و دمای گرم‌خانه‌گذاری بر میزان TC



شکل ۴- اثر متقابل غلظت سدیم آزید و مدت زمان اثر سدیم آزید بر میزان TC



شکل ۵- اثر متقابل مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری و مدت زمان اثر سدیم آزید بر میزان BDW



شکل ۶- اثر متقابل غلظت سدیم آزید و دمای گرمخانه‌گذاری بر میزان BDW

بحث

در دمای نسبتاً پایین افزایش می‌یابد؛ در واقع کاروتنوئیدها توانایی رشد را برای میکروارگانیسم‌ها در دمای پایین فراهم می‌کنند. اعتقاد بر این است که غشای سلولی نقش مهمی در بقا و فعالیت میکروارگانیسم‌ها در دماهای پایین بازی می‌کند و دلیل اصلی برای عدم رشد میکروارگانیسم‌ها در دماهای پایین کاهش نفوذپذیری غشای سلولی است (Beales, 2004). با این حال، برخی از میکروارگانیسم‌ها با افزایش نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع، سیالیت غشای سیتوپلاسمی را در دمای پایین افزایش می‌دهند. تولید کاروتنوئید یکی از راه‌های افزایش نسبت بالا است. در واقع، تولید کاروتنوئید توسط میکروارگانیسم‌ها یک پاسخی برای رشد در برابر کاهش درجه حرارت است (Havaux and Kloppstech, 2001؛ Beales, 2004). شکل ۴ اثر متقابل غلظت سدیم آزید و مدت زمان اثر سدیم آزید بر میزان کاروتنوئید کل استخراج شده از میکروکوکوس روزئوس را در مقادیر ثابت (نقطه مرکزی) دما و مدت زمان گرمخانه‌گذاری را نشان می‌دهد. مطابق شکل ۴ بیشترین میزان کاروتنوئید کل با تیماری در غلظت

اثر فاکتورهای مستقل بر میزان کاروتنوئید کل شکل ۳ اثر متقابل غلظت سدیم آزید و دمای گرمخانه‌گذاری بر میزان کاروتنوئید کل را نشان می‌دهد. مطابق این شکل، میزان کاروتنوئید کل میکروکوکوس روزئوس با افزایش غلظت سدیم آزید ابتدا افزایش یافت و در ادامه در غلظت‌های بالای سدیم آزید، میزان کاروتنوئید کل کاهش یافت. این کاهش احتمالاً مربوط به آسیب سلولی وارد شده به میکروکوکوس روزئوس در مجاورت با غلظت‌های بالای سدیم آزید بود. Gharibzahedi و همکاران (2012) از اتیل متان سولفونات به عنوان ماده جهش‌زا به منظور افزایش تولید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از *دایتزیا ناترونولیمینا* HS-1 استفاده و گزارش نمودند که تولید کاروتنوئید از این باکتری در مجاورت این ماده جهش‌زای شیمیایی افزایش می‌یابد. میزان کاروتنوئید کل میکروکوکوس روزئوس با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری تا حدی (حدود ۲۴ درجه سلسیوس) افزایش یافته و در ادامه کاهش یافت. مطالعات قبلی (Havaux and Fong et al., 2001؛ Fernandez-Sevilla, 2010؛ Kloppstech, 2001) نشان دادند که تولید کاروتنوئیدها از میکروارگانیسم‌ها

سدیم آزید یافت شد. مقادیر پیش‌بینی‌شده کاروتنوئید کل و وزن خشک زیست‌توده در شرایط بهینه به ترتیب ۷/۴۲ میلی‌گرم بر لیتر و ۷/۷۴ گرم بر لیتر پیش‌بینی شد. مقدار مطلوبیت هر دو پاسخ ۰/۹۹۳ بود. نتایج تجربی در شرایط بهینه یافت شده، ۷/۶۱ میلی‌گرم بر لیتر برای کاروتنوئید کل و ۸/۳۶ گرم بر لیتر برای وزن خشک زیست‌توده اندازه‌گیری شد که این پاسخ‌ها به مقادیر پیش‌بینی‌شده نزدیک بود. این نزدیکی نتایج تجربی و پیش‌بینی‌شده نشان دهنده دقت بالای الگوریتم برای برآورد کاروتنوئید کل و وزن خشک زیست‌توده است. Sunornsuk and Malison (2008) مشاهده نمودند که دمای ۳۰ درجه سلسیوس، pH ۶ و ۸۰ درصد اکسیژن محلول، بهترین شرایط برای تولید بتاکاروتن از رودوتورولا گلوئینیسی DM28 بود. Wang و همکاران (2007) فشار هیدرواستاتیکی بالایی (۳۰۰ مگا پاسکال) به مدت ۱۵ دقیقه را بر روی رودوتورولا گلوئینیسی RG6 به منظور بهبود تولید بتاکاروتن اعمال نمودند. نتایج این محققین نشان داد که ۴/۲۳ کیلوگرم بر لیتر عصاره مخمر، ۱۲/۱۱ گرم بر لیتر گلوکز، ۳۰ میلی‌لیتر بر لیتر مایه تلقیح، ۲/۵ میلی‌لیتر بر لیتر عصاره گوجه فرنگی، ۵ گرم بر لیتر آمونیوم سولفات و pH ۶/۷ به عنوان شرایط بهینه می‌تواند بیشترین میزان بتاکاروتن را در این شرایط از این میکروارگانیسم تولید نماید.

نتیجه‌گیری

تولید کاروتنوئید از میکروکوکوس روزئوس در مجاورت عامل جهش‌زای سدیم آزید افزایش یافت. غلظت سدیم آزید ۹۴/۹۵ میکروگرم گرم بر میلی‌لیتر، مدت زمان تیمار ۱۳/۲۳ دقیقه، دمای گرم‌خانه‌گذاری ۲۵/۹۱ درجه سلسیوس و مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری ۸۷/۸۷

حدود ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر سدیم آزید و مدت زمان تیمار ۱۵ دقیقه مشاهده شد. به علت آسیب سلولی وارد شده به میکروکوکوس روزئوس در مدت زمان‌های بالای تیمار تولید کاروتنوئید کل کاهش یافت. اثر فاکتورهای مستقل بر میزان وزن خشک زیست‌توده اثر متقابل مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری و مدت زمان اثر سدیم آزید بر میزان وزن خشک زیست‌توده در شکل ۵ قابل مشاهده است. وزن خشک زیست‌توده میکروکوکوس روزئوس با افزایش مدت زمان تیمار با سدیم آزید به‌طور قابل توجهی کاهش یافت که این اتفاق احتمالاً مربوط به آسیب‌دیدگی سلول میکروکوکوس روزئوس در مدت زمان‌های بالای تیمار با سدیم آزید می‌باشد. شکل ۶ اثر متقابل غلظت سدیم آزید و دمای گرم‌خانه‌گذاری بر میزان وزن خشک زیست‌توده میکروکوکوس روزئوس را نشان می‌دهد. وزن خشک زیست‌توده میکروکوکوس روزئوس با افزایش غلظت سدیم آزید کاهش یافت. مطابق این شکل، بیشترین میزان وزن خشک زیست‌توده در غلظت و دمای به ترتیب در حدود ۵۰ میکروگرم بر لیتر و ۳۰ درجه سلسیوس مشاهده می‌شود.

بهینه‌سازی شرایط تولید رنگدانه

در فرایند بهینه‌سازی، اهمیت پاسخ‌های کاروتنوئید کل و وزن خشک زیست‌توده به ترتیب ۰/۷ و ۰/۳ در نظر گرفته شد و بهینه‌سازی با تکنیک بهینه‌سازی عددی انجام شد (Yolmeh and Najafzadeh, 2014). زمان استخراج ۹۴/۹۵ میکروگرم گرم بر میلی‌لیتر، مدت زمان تیمار ۱۳/۲۳ دقیقه، دمای گرم‌خانه‌گذاری ۲۵/۹۱ درجه سلسیوس و مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری ۸۷/۸۷ ساعت به عنوان شرایط بهینه تولید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از میکروکوکوس روزئوس تحت تیمار با

شرایط محیطی مناسب و مواد جهش‌زا جهت بالا بردن میزان تولید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی میکروبی را پیشنهاد می‌دهد.

ساعت به عنوان شرایط بهینه تولید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از میکروکوکوس روزئوس تحت تیمار با سدیم آزید یافت شد. نتایج این پژوهش، بکار بردن

منابع

1. Yolmeh, M., Najafi, M. B. H., Farhoosh, R. and Salehi, F. 2014. Modeling of antibacterial activity of annatto dye on *Escherichia coli* in mayonnaise. *Food Biosci.* 8: 8-13.
2. Sajilata, M.G. and Singhal, R.S. 2006. Isolation and stabilisation of natural pigments for food applications. *Stewart Postharv. Rev.* 2(5): 1-29.
3. Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C. and Ravishankar, G.A. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trend Food Sci Technol.* 16: 389-406.
4. Frengova, G.I. and Beshkova, D.M. 2009. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 163-80.
5. Kim, C.H., Kim, S.W. and Hong, S.I. 1999. An integrated fermentation separation process for the production of red pigment by *Serratia* sp. KH-95. *Process Biochem.* 35: 485-90.
6. Venil, C.K., Zakaria, Z.A. and Ahmad, W.A. 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem.* 48: 1065-79.
7. Beale, G. 1993. The discovery of mustard gas mutagenesis by Auerbach and Robson in 1941. *Genetics* 134, 393.
8. Adsul, M., Khire, J., Bastawde, K. and Gokhale, D. 2007. Production of lactic acid from cellobiose and cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3. *Appl Environ Microbiol.* 73: 5055-7.
9. Ikram-Ul-Haq, S., Saleem, A. and Javed, M.M. 2010. Mutagenesis of *Bacillus licheniformis* through ethyl methane sulfonate for alpha amylase production. *Pak J Bot.* 41: 1489-98.
10. Awan, M.S., Tabbasam, N., Ayub, N., Babar, M.E., Rana, S.M. and Rajoka, M.I. 2011. Gamma radiation induced mutagenesis in *Aspergillus niger* to enhance its microbial fermentation activity for industrial enzyme production. *Mol Biol Rep.* 38: 1367-74.
11. Bhosale, P. and Gadre, R. 2001. Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 423-7.
12. Ghribi, D., Zouari, N. and Jaoua, S. 2004. Improvement of bioinsecticides production through mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* by u.v. and nitrous acid affecting metabolic pathways and/or delta-endotoxin synthesis. *J Appl Microbiol.* 97: 336-46.
13. Arshad, R., Farooq, S. and Ali, S.S. 2010. Improvement of penicillin G acylase expression in *Escherichia coli* through UV induced mutations. *Brazilian J Microbiol* 41: 1133-41.

14. Gharibzahedi, S.M.T., Razavi, S.H., Mousavi, S.M. and Moayedi, V. 2012. High efficiency canthaxanthin production by a novel mutant isolated from *Dietzia natronolimnaea* HS-1 using central composite design analysis. *Indust Crops Prod.* 40: 345-54.
15. Yolmeh, M. and Najafzadeh, M. 2014. Optimisation and modelling green bean's ultrasound blanching. *Int. J. Food Sci Technol.* 49: 2678-84.
16. Sarfarazi, M., Jafari, S.M. and Rajabzadeh, G. 2015. Extraction optimization of saffron nutraceuticals through response surface methodology. *Food Anal Method.* 8: 2273-85.
17. Khazaei, K. M., Jafari, S. M., Ghorbani, M., Kakhki, A. H. and Sarfarazi, M. 2015. Optimization of anthocyanin extraction from saffron petals with response surface methodology. *Food Anal Method.*
18. Attri, D. and Joshi, V.K. 2005. Optimization of apple pomace based medium and fermentation conditions for pigment production by *Micrococcus* species. *J Sci Indus Res.* 64: 598-601.
19. Umadevi, K. and Krishnaveni, M. 2013. Antibacterial activity of pigment produced from *Micrococcus luteus* KF532949. *Int J Chem Anal Sci.* 4: 149-52.
20. AL-Wandawi, H. 2014. Carotenoid Biosynthesis in *Micrococcus luteus* grown in the presence of different concentrations of nicotine. *Int J Pur Appl Sci Technol.* 24: 31-41.
21. Hornero-Méndez, D. and Mínguez-Mosquera, M.I. 2001. Rapid spectrophotometric determination of red and yellow isochromic carotenoid fractions in paprika and red pepper oleoresins. *J Agr Food Chem.* 49: 3584-8.
22. Fong, N., Burgess, M., Barrow, K. and Glenn, D. 2001. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56: 750-6.
23. Havaux, M. and Kloppstech, K. 2001. The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. *Planta* 213: 953-66.
24. Fernandez-Sevilla, J. M., Fernández, F. A. and Grima, E. M. 2010. Biotechnological production of lutein and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86: 27-40.
25. Beales, N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehen Rev Food Sci Food Safe.* 3: 1-20.
26. Malisorn, C. and Suntornsuk, W. 2008. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technol.* 99: 2281-2287.
27. Wang, S.L., Sun, J.S., Han, B.Z. and Wu, X.Z. 2007. Optimization of β -Carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology. *J Food Sci.* 72: 325-9.

Effects of sodium azide, temperature and incubation time on the production of carotenoid pigments from *Micrococcus roseus*

Mahmoud Yolmeh^{1*}, Morteza khomeiri², Ezatollah Ghaemi³, Seyyedeh Sanaz Ramezanpour², Mohammad Ghorbani²

1. Ph.D student, Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Gorgan, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Gorgan, Iran.

3. Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

*Corresponding author: Mahmud.yolmeh@yahoo.com

Received: 4 June 2016

Accepted : 2 Feb 2017

Abstract

Pigment production from microorganisms is more advantageous than other biological resources such as plants. To date, a research on the effect of chemical mutagens on the production of carotenoid pigments from *Micrococcus roseus* has not been done. Hence, the aim of this study was to optimize the production of carotenoid pigments from *M. roseus* treated with sodium azide. Carotenoid production from *M. roseus* was significantly increased at the presence of sodium azide mutagen. However, the production of total carotenoid (TC) and biomass dried weight (BDW) from *M. roseus* was reduced at the presence of high concentrations of sodium azide and high effect duration of sodium azide. Concentration of sodium azide and its treatment duration time had the greatest effect on the pigment production from *M. roseus* under treatment with sodium azide. Sodium azide concentration of 94.95 µg/L, treatment duration of 13.23 min, incubation temperature of 25.91 °C, and incubation time of 87.87 h were found as the optimum condition for the production pigment from *M. roseus* under treatment with sodium azide. At these optimum conditions, amount of responses was measured 7.61 mg/L and 8.36 g/L for TC and BDW, respectively.

Keywords: Pigment; *Micrococcus roseus*; Sodium azide; Optimization.