

# بهینه‌سازی تولید رنگدانه کانتاگزانتین توسط سویه مقاوم به اشعه دیتزیا ماریس و ارزیابی اثرات آن بر کشت سلولی

عاطفه صالحی بختیاری<sup>1</sup>، زهرا اعتمادی فر<sup>2\*</sup>، ماتیا سادات برهانی<sup>3</sup>

1- کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

2- دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

3- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

\*نویسنده مسئول:

آدرس پست الکترونیکی: [z.etemadifar@sci.ui.ac.ir](mailto:z.etemadifar@sci.ui.ac.ir)

صندوق پستی: 8174673441

تاریخ پذیرش: 1399/10/10

تاریخ دریافت: 1398/11/21

## چکیده:

**زمینه و اهداف:** کاروتنوئیدها آنتی‌اکسیدان‌های زیستی بوده و در حفاظت بدن در مقابل بیماری‌ها و پدیده پیری نقش مهمی ایفا می‌کنند. کانتاگزانتین یکی از پرکاربردترین کاروتنوئیدها در صنعت پزشکی می‌باشد. هدف از این پژوهش، مطالعه خواص زیستی رنگدانه کانتاگزانتین و همچنین بهینه‌سازی تولید آن در محیط کشت ارزان قیمت توسط سویه میکروبی مقاوم به اشعه دیتزیا ماریس بوده است.

**مواد و روش‌ها:** کاروتنوئید باکتریایی، استخراج و خواص ضد باکتریایی، ضد توموری و سمیت سلولی آن بررسی شد. سپس با استفاده از روش شناسی سطح پاسخ اثر واسطه‌های چرخه کربس و pH، بر تولید رنگدانه و زیست توده میکروبی در محیط کشت آب پنیر مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** حداکثر تولید رنگدانه به میزان 92/54 میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت آب پنیر در pH 8 و در حضور 12/5 mM از سیترات، گلوتامات، مالات، و سوکسینات توسط روش سطح پاسخ به دست آمد. رنگدانه فوق‌هیچگونه اثر سمیت سلولی سمیتی بر رده‌های سلولی Hela، HFB، MCF-7 نشان نداد. به علاوه، رنگدانه فاقد خاصیت ضد باکتریایی بود.

**بحث:** سویه‌های میکروبی مقاوم به اشعه، به دلیل پایداری آنها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا کاندید بهتری در تولید رنگدانه‌های میکروبی محسوب می‌شوند. در این مطالعه، در جهت کاهش هزینه تولید کانتاگزانتین از محیط کشت آب پنیر استفاده شد. افزودن واسطه‌های کربس در محیط کشت تخمیر، تولید رنگدانه توسط دیتزیا ماریس به طور چشمگیری افزایش داد.

**کلید واژگان:** کاروتنوئید، کانتاگزانتین، دیتزیا ماریس، مقاوم به اشعه، آب پنیر

## 1- مقدمه

کاروتنوئیدها رنگ‌دانه‌های 30، 40، 50 کربنه، به رنگ زرد، نارنجی و در برخی موارد قهوه‌ای و ارغوانی هستند. امروزه بیش از 1100 نوع کاروتنوئید شناسایی شده است [1]. کاروتنوئیدها از دسته ترکیبات ایزوپرنوئیدی می‌باشند و براساس ساختمان شیمیایی و حضور اکسیژن در ساختار خود، به دو دسته کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها تقسیم‌بندی می‌شوند [2]. این ترکیبات، یکی از رایج‌ترین و مهم‌ترین گروه رنگ‌دانه‌ها در طبیعت بوده و وظایف زیستی مهمی را در موجودات زنده از قبیل پیش‌ساز ویتامین A بودن، تأثیر بر آنزیم‌ها و بیان ژن‌ها، حفاظت در برابر فتواکسیداسیون، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، نقش در پاسخ‌های سیستم ایمنی و خاصیت ضد میکروبی بر عهده دارند [3]. به دلیل اثرات مفید کاروتنوئیدها بر سلامتی انسان، این ترکیبات توجه زیادی به خود جلب کرده‌اند. کاهش دادن خطر سرطان‌ها، آب‌مروارید، بیماری‌های قلبی-عروقی و همچنین بهبود سیستم ایمنی بدن، برخی از مزایای کاروتنوئیدها بر سلامت انسان به شمار می‌روند که به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها می‌باشد و می‌تواند در صنایع دارویی مفید باشد. همچنین کاروتنوئیدها در زمینه فناوری نانو، لوازم آرایشی، صنایع غذایی و ساخت حس‌گرها کاربرد دارند [4,5].

کاروتنوئیدهای طبیعی، به‌طور گسترده در گیاهان، حیوانات، قارچ‌ها و همچنین میکروارگانیسم‌های فتوسنتز کننده و غیر فتوسنتز کننده موجود می‌باشند. به‌طور معمول برای تولید کاروتنوئیدهای طبیعی، از گیاهان و میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. هرچند در سال‌های گذشته، تولید کاروتنوئیدهای طبیعی توسط میکروارگانیسم‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. علت این امر وجود معایب فراوان در رنگ‌دانه‌های گیاهی، مانند حلالیت کم در آب، غیرقابل تولید بودن در تمام طول سال و بی‌ثباتی در برابر عواملی چون نور، گرما و pH

می‌باشد. درحالی‌که از مزایای تولید رنگ‌دانه‌های طبیعی با منشأ میکروبی می‌توان به مواردی چون رشد سریع میکروب‌ها، عدم تأثیرپذیری از شرایط آب و هوایی، در دسترس بودن در تمام طول سال، قابلیت رشد در محیط‌های کشت ارزان‌قیمت، زیست‌تخریب‌پذیری و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی قوی و به‌علاوه مقرون‌به‌صرفه بودن تولید آنها، اشاره داشت. همچنین رنگ‌دانه‌های طبیعی با منشأ میکروبی می‌توانند جایگزین مناسبی برای رنگ‌دانه‌های مصنوعی در صنعت باشند که به دلیل اثرهای جانبی بر سلامت انسان‌ها و همچنین آلودگی‌های زیست‌محیطی پیشنهاد نمی‌شوند [6].

در بین میکروارگانیسم‌ها، میکروارگانیسم‌های اکستروفیل (شدید دوست) مقاوم به اشعه یا رادیوفیل‌ها، برای تولید کاروتنوئیدها بسیار مهم هستند. علت این امر این است که این میکروارگانیسم‌ها برای مقابله با استرس اکسیداتیو ناشی از پرتوهای مختلف، میزان بیشتری از مواد آنتی‌اکسیدانی از جمله کاروتنوئید تولید می‌کنند [7]. در مطالعه حاضر، از یک سویه مقاوم به اشعه فرابنفش به نام *دیتریا ماریس سویه NM* استفاده شد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که کاروتنوئید اصلی این باکتری کانتاگران‌تین یا 4-4 دی‌کتو - بتاکاروتن یک کتو کاروتنوئید و یکی از مهم‌ترین گزانتوفیل‌ها می‌باشد که باعث ایجاد رنگ زرد-نارنجی می‌شود. کلونی‌های این سویه به دلیل حضور این رنگ‌دانه نارنجی هستند. این کاروتنوئید همچنین در زرده تخم‌مرغ و بسیاری از میکروارگانیسم‌ها و حیوانات دریایی نیز یافت می‌شود [8]. در مطالعه دیگر بر روی این سویه که توسط زمانیان و همکاران (2016) صورت گرفته است، مشخص شد که این سویه تولیدکننده خوبی برای تولید کاروتنوئید است. به‌علاوه، خاصیت آنتی‌اکسیدانی کاروتنوئید تولیدی توسط این سویه، براساس نتایج تست‌های به دام اندازی رادیکال‌های آزاد توسط تست 2

سپس توسط اتوکلاو استریل گشت [10]. برای تهیه محیط کشت آب پنیر 6 درصد، به میزان 6 گرم پودر آب پنیر (تهیه شده از شرکت پگاه) توزین و به آن 100 میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. اتوکلاو در دمای °C 110 به مدت 15 دقیقه به منظور پروتئین زدایی انجام و بعد از خنک شدن محیط کشت با کاغذ واتمن (شماره 40) فیلتر شد. محلول حاصل در 4000 rpm به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد و به حجم‌های مورد نیاز در فلاسک توزیع شد. سپس مرحله دوم استریل در دمای °C 110 به مدت 15 دقیقه انجام گرفت. از محلول‌های سدیم هیدروکسید و اسید کلریدریک 1 مولار برای تنظیم pH استفاده شد. این محیط کشت حاوی 4/5 درصد لاکتوز، 0/8 درصد پروتئین، 1 درصد نمک کلرید سدیم، 0/1-0/8 درصد لاکتیک اسید و اندکی ویتامین می‌باشد [11].

#### بهبودسازی تولید رنگدانه با روش آماری سطح پاسخ (RSM)

به منظور شناسایی و بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر در تولید کاروتنوئید سویه دیتزیا ماریس NM، از روش شناسی پاسخ سطح با به‌کارگیری طرح مرکب مرکزی استفاده شد. پنج فاکتور مؤثر انتخاب شده، شامل: سترات، سوکسینات و ملات به‌عنوان واسطه‌های چرخه کریس، گلوتامات و pH محیط کشت می‌باشند. سپس هر فاکتور در پنج سطح با استفاده از 32 آزمایش طرح مرکب مرکزی با شش تکرار در نقطه مرکزی مورد بررسی قرار گرفتند. برای طراحی آزمایش از نرم‌افزار Minitab 16 استفاده شد. مقادیر کد شده و مورد آزمایش پنج سطح هر متغیر مستقل در جدول 1 آورده شده است.

و 2- دی فنیل-1-پیکریل هیدرازیل (به اختصار<sup>1</sup>DPPH) و همچنین تست قدرت احیاکنندگی یون‌های فریک، نشان داد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی کاروتنوئید تولیدی توسط سویه مورد مطالعه چشم‌گیر است [9]. بنابراین این سویه می‌تواند به‌عنوان سویه تولید صنعتی برای تولید رنگدانه مورد استفاده در صنایع غذایی و یا آرایشی مطرح شود. بنابراین، در مطالعه حاضر، به افزایش تولید کاروتنوئید توسط سویه مورد نظر به‌وسیله روش بهینه‌سازی آماری پاسخ سطح در قالب مرکب مرکزی چرخش پذیر در محیط ارزان قیمت و قابل دسترس آب پنیر پرداخته شده است. هدف اصلی از این مطالعه این بوده است که ارتباط بین واسطه‌های چرخه کریس همچون سترات، سوکسینات و ملات بر تولید کاروتنوئید دیتزیا ماریس مورد ارزیابی قرار گیرد.

#### 2- مواد و روش‌ها

##### میکروارگانیزم و شرایط کشت

این تحقیق در سال 1396 با استفاده از دیتزیا ماریس سویه NM اجرا شده است. سویه فوق که قبلاً توسط زمانیان و اعتمادی فر جداسازی شده و توالی ژن 16S rDNA آن در پایگاه داده‌ای بانک ژن<sup>2</sup> با شماره دسترسی KP222293 به ثبت رسیده است، به منظور تولید رنگدانه در محیط ارزان قیمت استفاده شد [9]. برای فعال کردن سویه مورد مطالعه در این تحقیق از محیط کشت TGY براث تریپتیک گلوکز نیست اکستراکت براث<sup>3</sup> استفاده شد. به طوری که نمونه منجمد شده در °C -70 به این محیط انتقال و در دمای °C 30 به مدت 5 روز در شیکر انکوباتور با سرعت 120 rpm انکوبه شد. برای تهیه محیط کشت TGY براث، 5 گرم عصاره مخمر، 1 گرم گلوکز و 5 گرم تریپتون در یک لیتر آب مقطر حل و

1. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH)

2. GeneBank

3. Tryptic glucose yeast extract

جدول 1- سطوح متغیرهای مستقل مؤثر بر تولید کاروتنوئید دیتزیا ماریس NM بر اساس مقادیر کد شده و واقعی

شماره متغیر	نام متغیر	-α	-1	0	+1	+α
X <sub>1</sub>	سیترات	7/5	10	12/5	15	17/5
X <sub>2</sub>	مالات	7/5	10	12/5	15	17/5
X <sub>3</sub>	سوکسینات	7/5	10	12/5	15	17/5
X <sub>4</sub>	گلوتامات	7/5	10	12/5	15	17/5
X <sub>5</sub>	pH	6	7	8	9	10

استفاده از آنالیز واریانس و تست دامنه چندگانه دانکن توسط نرم افزار SPSS 20 مورد بررسی های آماری قرار گرفتند. زمانی تفاوت نتایج از نظر آماری معنی دار گزارش شد که *P-value* به دست آمده کمتر از 0/05 باشد. ترسیم نمودارها توسط نرم افزار Excel 2016 صورت گرفت. همچنین نرم افزارهای Minitab 16 و RSM به ترتیب برای طراحی آزمایش و مطالعات بهینه سازی با روش آماری سطح پاسخ استفاده شده است.

#### استخراج کاروتنوئید

ابتدا یک لوپ پر از باکتری دیتزیا ماریس در 20 mL محیط TGY براث، تلقیح و در دمای °C 37 گرمخانه گذاری شد تا کدورت محیط کشت معادل نیم مک فارلند (2-1×10<sup>8</sup> CFU/mL) شود. از این محیط برای تلقیح محیط های مختلف تولید کاروتنوئید، به میزان 1 درصد (v/v) استفاده شد. پس از گذشت 5 روز در انکوباتور °C 30 و با سرعت همزنی rpm 120 تولید کاروتنوئید و میزان زیست توده میکروبی مورد بررسی قرار گرفت.

برای استخراج کاروتنوئید، ابتدا زیست توده حاصله با استفاده از سانتریفیوژ در دور rpm 4000 به مدت 15 دقیقه جداسازی و سپس به آن متانول 95 درصد اضافه شد. پس از انجام 10 دقیقه ورتکس، 10 دقیقه انکوباسیون در دمای °C 45 صورت گرفت. سپس

آزمایش های طرح مرکب مرکزی بر طبق مقادیر هر متغیر اجرا و در پایان مقدار زیست توده و کاروتنوئید بعد از 5 روز گرمخانه گذاری در دمای °C 30 و با سرعت همزنی rpm 120 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار Design Expert 7 (Stat-Ease, Minneapolis, USA) و با استفاده از تست آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سپس یک معادله درجه دوم بر طبق معادله شماره 2 که رابطه متغیر وابسته یا پاسخ (مقدار کاروتنوئید) و متغیرهای مستقل را توصیف کند، به دست آمد.

$$Y(\text{response}) = b_0 + \sum_{i=1}^5 b_i X_i + \sum_{i=1}^5 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^5 \sum_{j<i} b_{ij} X_i X_j \quad \text{معادله 2}$$

در این معادله،  $b_0$  عدد ثابت،  $b_i$  ضرایب خطی ( $b_1, b_{11}, b_{22}, b_2, b_3, b_4, \text{ and } b_5$ ) و  $b_{ii}$  ضرایب درجه دوم ( $b_{12}, b_{13}, b_{14}, b_{15}, b_{23}, b_{24}, b_{25}, b_{34}, b_{35}, \text{ and } b_{45}$ ) می باشند. نتایج مربوط به هر آزمایش، بر اساس میانگین سه تکرار بیان شده اند. سطح معناداری آماری 95 درصد در نظر گرفته شد.

#### آنالیز آماری داده ها

تمامی آزمایشات به منظور بررسی های آماری به صورت سه تکرار انجام شدند. نتایج به دست آمده با

توده باکتری‌های کشت داده شده در محیط آب پنیر مشابه روش ذکر شده عمل شد. در نهایت با کسر وزن کل از وزن رسوبات محیط، وزن دقیق زیست توده باکتری محاسبه شد [14].

#### بررسی قدرت ضدباکتریایی رنگدانه

ابتدا به میزان 100 میکرولیتر از محیط مایع که باکتری در آن تلقیح شده و کدرورتنی معادل نیم‌مک فارلند دارد بر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار پخش و سپس چاهک‌گذاری کرده است، به میزان 50 میکرولیتر از رنگدانه استخراج شده درون چاهک ریخته و از حلال به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد. پلیت به مدت 24 ساعت در دمای °C 37 گرمخانه‌گذاری شده و سپس هاله عدم رشد اندازه‌گیری و گزارش شد. در این تحقیق از استافیلوکوکوس ارئوس و اشرشیا کلی برای بررسی خاصیت ضدباکتریایی رنگدانه استفاده شد [15].

#### بررسی اثر رنگدانه‌های استخراج شده بر روی کشت سلولی

در این مطالعه از دو رده سلولی سرطانی انسان شامل سرطان سینه (Human breast cancer cells یا MCF-7) و سرطان دهانه رحم (Human cervical cancer cells یا HeLa) و همچنین رده سلولی نرمال فیبروبلاست انسانی استفاده شد. برای کشت سلول‌ها از محیط کشت RPMI 1640 حاوی 10 درصد سرم جنین گاوی و 1 درصد مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین استفاده شد و فلاسک حاوی سلول‌ها درون گرم‌خانه در دمای °C 37 حاوی 5 درصد گاز CO<sub>2</sub> به‌صورت شبانه گرم‌گذاری شد. تعداد 4 × 10<sup>4</sup> سلول به همراه 500 میکرولیتر محیط کشت حاوی 10

در rpm 4000 سانتریفیوژ شد. محلول رویی جمع‌آوری و به زیست توده باقی مانده به‌طور مجدد متانول اضافه گشت و مراحل فوق تکرار شد تا زیست توده کاملاً بی‌رنگ شد. محلول رویی جمع‌آوری شده در دمای °C 40 خشک و سپس در یخچال نگه‌داری گشت [12].

#### اندازه‌گیری مقدار کل کاروتنوئید

برای تعیین میزان کل کاروتنوئیدهای استخراج شده، ابتدا استخراج رنگدانه از 10 میلی‌لیتر از محیط کشت صورت گرفت. سپس کاروتنوئید استخراجی به میزان یک درصد در حلال متانول حل شد. در نهایت جذب آن توسط اسپکتوفتومتر در طول موج 470 نانومتر قرائت و از طریق معادله 1 میزان کل کاروتنوئید محاسبه شد [13].

$$\text{معادله 1} \quad \text{Total carotenoids} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{(A_{474}) \times (V_S) \times (10^9)}{(A_{1\text{cm}}^{1\%}) \times (100)}$$

در معادله شماره 1، A<sub>474</sub> و V<sub>S</sub> و A<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> به ترتیب برابر با حداکثر جذب کاروتنوئید تام در اتانول در طول موج 474nm، حجم نمونه و ضریب جذب ویژه کاروتنوئید تام در محلول 1 درصد آن در اتانول و در یک کووت یک سانتی‌متری (برابر با 2200) می‌باشد.

#### اندازه‌گیری زیست توده در محیط آب پنیر

محیط کشت آب پنیر حاوی مقادیری رسوب می‌باشد، بنابراین برای تعیین وزن خالص زیست توده باکتری‌ها، نیاز به برآورد این میزان رسوبات می‌باشد. به این منظور حدود 100 میلی‌لیتر از محیط کشت بدون باکتری را برداشته به مدت 5 دقیقه در rpm 4000 سانتریفیوژ و رسوب حاصله به مدت 72 ساعت در °C 70 خشک شد. سپس رسوب حاصله وزن شد. برای تعیین زیست

شد. سه چاهک حاوی سلول‌های بدون هرگونه تیمار نیز به‌عنوان کنترل استفاده شدند. پس از گرمخانه گذاری به مدت 48 ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و 5 درصد گاز  $\text{CO}_2$ ، محیط کشت چاهک‌ها جدا و به‌جای آن  $100 \mu\text{L}$  محلول MTT (با غلظت  $0/5 \text{ mg/mL}$ ) به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت‌ها دوباره درون گرمخانه  $\text{CO}_2$  دار به مدت 4 ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرمخانه گذاری شدند تا کریستال‌های نامحلول فورمازان درون چاهک‌ها تشکیل شود. بنابراین، چاهک‌ها به‌دقت تخلیه شد و به هر چاهک  $150 \mu\text{L}$  DMSO اضافه شد تا کریستال‌های فورمازان حل شود. درنهایت، میزان جذب هر چاهک در طول موج 570 نانومتر با کمک دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد. از نسبت میزان جذب سلول‌های تیمار شده به میزان جذب سلول‌های کنترل (تیمار نشده) برای محاسبه قابلیت زنده ماندن سلول‌ها استفاده شد [16].

### 3- نتایج

بهینه‌سازی تولید رنگدانه و زیست توده با روش آماری سطح پاسخ (RSM)

در بهینه‌سازی تولید کاروتنوئید و زیست توده با استفاده از روش سطح پاسخ یا RSM در قالب طرح مرکب مرکزی چرخش پذیر، در مورد سویه دیتزیا ماریس پنج عامل شامل سه ترکیب از واسطه‌های کریس (مالات، سوکسینات، سترات)، غلظت‌های متفاوت گلوتامات، و pHهای متفاوت در پنج سطح (2، +1، 0، -1، -2) مورد بررسی قرار گرفتند. جدول 2 نتایج سطح پاسخ تولید کاروتنوئید و زیست توده دیتزیا ماریس را نشان می‌دهد.

درصد سرم و 1 درصد آنتی بیوتیک به هر چاهک در پلیت 24 خانه اضافه و به مدت 24 ساعت درون گرمخانه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  حاوی 5 درصد گاز  $\text{CO}_2$  گرماگذاری شد. سپس رنگدانه با غلظت‌های مختلف (50، 100، 200، 500 میکروگرم بر میلی لیتر) به محتویات هر چاهک اضافه شدند و مورفولوژی سلول‌ها پس از 48 ساعت زیر میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شد. مورفولوژی سلول‌های تیمار نشده نیز در شرایط مشابه بررسی و با سلول‌های تیمار شده مقایسه شد. به‌منظور بررسی خاصیت سمیت سلولی رنگدانه کاروتنوئیدی، از تست MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) و رده سلولی فیبروبلاست انسانی استفاده شد. در این تست، قابلیت زنده ماندن سلول‌ها در حضور یک ترکیب شیمیایی، با استفاده از توانایی آنزیم‌های میتوکندریایی اکسیدوردوکتاز وابسته به NAD(P)H سلول، در احیای یک رنگ تترازولیوم به نام MTT و تبدیل آن به فرم نامحلول بنفش‌رنگ به نام فورمازان، تخمین زده می‌شود و به‌این‌ترتیب خاصیت سمی ترکیب موردنظر، سنجیده می‌شود. به این منظور  $10^4$  سلول به همراه  $200 \mu\text{L}$  محیط کشت RPMI 1640 حاوی 10 درصد سرم جنین گاوی و 1 درصد مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، به هر چاهک پلیت 96 خانه اضافه شد. سپس، به مدت 24 ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و 5 درصد  $\text{CO}_2$  گرمخانه گذاری شد تا سلول‌ها رشد داشته باشند. غلظت‌های مختلف رنگدانه استخراج شده ( $50, 100, 200, 500 \mu\text{g/mL}$ )، با استفاده از محیط کشت استریل، رقیق‌سازی و برای تیمار سلول‌ها استفاده گردید و به‌منظور بررسی آماری نتایج برای هر تیمار سه تکرار (چاهک) در نظر گرفته

جدول 2- نتایج مشاهده شده متغیر پاسخ با بکارگیری طرح مرکب مرکزی در ارتباط با زیست توده و تولید کاروتنوئید دیتزیا ماریس

	سیترات $X_1$	مالات $X_2$	سوکسینات $X_3$	گلوتامات $X_4$	pH $X_5$	زیست توده (g/L)	کاروتنوئید (mg/L)
1	12/50	12/50	12/50	12/50	8/00	7/03	56/181
2	10/00	10/00	10/00	10/00	9/00	6/32	8/818
3	15/00	10/00	10/00	15/00	9/00	6/875	15/681
4	12/50	12/50	12/50	12/50	8/00	7/123	68/045
5	12/50	12/50	12/50	12/50	8/00	8/78	92/545
6	10/00	15/00	10/00	10/00	7/00	8/456	42/636
7	15/00	15/00	15/00	15/00	9/00	6/987	14/818
8	12/50	12/50	12/50	7/50	8/00	9/352	59/623
9	15/00	10/00	10/00	10/00	7/00	8/968	9/454
10	12/50	12/50	12/50	12/50	8/00	8/321	56/181
11	12/50	7/50	12/50	12/50	8/00	5/463	15/59
12	15/00	10/00	15/00	15/00	7/00	8/729	56/314
13	10/00	15/00	15/00	10/00	9/00	5/321	26/192
14	12/50	12/50	12/50	12/50	8/00	8/124	92/636
15	15/00	10/00	15/00	10/00	9/00	6/365	16/753
16	12/50	12/50	17/50	12/50	8/00	8/124	35/5
17	10/00	15/00	15/00	15/00	7/00	9/931	39/818
18	12/50	12/50	12/50	17/50	8/00	6/126	23/636
19	15/00	15/00	10/00	10/00	9/00	6/145	47/903
20	12/50	12/50	7/50	12/50	8/00	7/221	42/636
21	12/50	12/50	12/50	12/50	6/00	7/341	18/136
22	12/50	12/50	12/50	12/50	10/00	4/002	11/818
23	15/00	15/00	10/00	15/00	7/00	8/138	21/545
24	12/50	12/50	12/50	12/50	8/00	8/136	92/636
25	17/50	12/50	12/50	12/50	8/00	7/148	59
26	10/00	10/00	15/00	15/00	9/00	5/368	11/7363
27	10/00	10/00	15/00	10/00	7/00	9/924	38/636
28	15/00	15/00	15/00	10/00	7/00	8/657	52/7983
29	10/00	15/00	10/00	15/00	9/00	5/151	8/272
30	7/50	12/50	12/50	12/50	8/00	5/352	16/59
31	10/00	10/00	10/00	15/00	7/00	5/187	24/402
32	12/50	17/50	12/50	12/50	8/00	6/689	40/045

ماریس مناسب در نظر گرفته شد ( $p\text{-value}=0/0036$ ). در جدول 3 نتایج آنالیز واریانس زیست توده دیتزیا ماریس با

از میان مدل‌های پیشنهادی توسط نرم‌افزار Design Expert 7، مدل درجه دوم برای متغیر زیست توده دیتزیا

جدول 4 نتایج آنالیز مدل به دست آمده در ارتباط با زیست توده دیتزیا ماریس را نشان می‌دهد.

$$\begin{aligned} & 7/55 + (0/33 * X_1) + (0/17 * X_2) + (0/25 * X_3) - (0/42 * X_4) - (1/00 * X_5) - \\ & (0/12 * X_1 X_2) - (0/25 * X_1 X_3) + (0/25 * X_1 X_4) + \\ & (0/12 * X_1 X_5) - (0/12 * X_2 X_3) + (0/38 * X_2 X_4) - \\ & (0/25 * X_2 X_5) + (0/25 * X_3 X_4) - (0/38 * X_3 X_5) + (0/12 \\ & * X_4 X_5) - (0/30 * X_1^2) - (0/42 * X_2^2) + (0/08 * X_3^2) + \\ & (0/08 * X_4^2) - (0/42 * X_5^2) \end{aligned} \quad \text{معادله 3}$$

روش سطح پاسخ آورده شده است. نتایج آنالیز واریانس نشان می‌دهد که سیترات، گلوتامات و pH بر زیست توده دیتزیا ماریس تاثیر معناداری داشته‌اند، در حالی که سوکسینات و ملات تاثیر معناداری بر زیست توده این سویه نداشته‌اند. معادله درجه دو در ارتباط با زیست توده دیتزیا ماریس به دست آمد (معادله 3). در این معادله،  $X_1$  نشان دهنده غلظت سیترات،  $X_2$  نشان دهنده غلظت ملات،  $X_3$  نشان دهنده غلظت سوکسینات،  $X_4$  غلظت گلوتامات، و  $X_5$  نیز نشان دهنده میزان pH می‌باشد.

جدول 3- نتایج آنالیز واریانس تولید زیست توده سویه دیتزیا ماریس با روش سطح پاسخ

عامل (زیست توده)	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-value	P-value	ضرایب رگرسیون
مدل	55/10	20	2/76	5/25	0/0036	
سیترات ( $X_1$ )	2/67	1	2/67	5/08	0/0456	0/33
ملات ( $X_2$ )	0/67	1	0/67	1/27	0/2837	0/17
سوکسینات ( $X_3$ )	1/50	1	1/50	2/86	0/1190	0/25
گلوتامات ( $X_4$ )	4/17	1	4/17	7/94	0/0167	-0/42
pH ( $X_5$ )	24/00	1	24/00	45/73	< 0/0001	-1/00
$X_1 X_2$	0/25	1	0/25	0/48	0/5044	-0/12
$X_1 X_3$	1/00	1	1/00	1/91	0/1949	-0/25
$X_1 X_4$	1/00	1	1/00	1/91	0/1949	-0/25
$X_1 X_5$	0/25	1	0/25	0/48	0/5044	0/12
$X_2 X_3$	0/25	1	0/25	0/48	0/5044	-0/12
$X_2 X_4$	2/25	1	2/25	4/29	0/0627	0/38
$X_2 X_5$	1/00	1	1/00	1/91	0/1949	-0/25
$X_3 X_4$	1/00	1	1/00	1/91	0/1949	-0/25
$X_3 X_5$	2/25	1	2/25	4/29	0/0627	-0/38
$X_4 X_5$	0/25	1	0/25	0/48	0/5044	0/12
$X_1^2$	2/56	1	2/56	4/88	0/0493	-0/30
$X_2^2$	5/19	1	5/19	9/88	0/0094	-0/42
$X_3^2$	0/19	1	0/19	0/35	0/5641	0/08
$X_4^2$	0/19	1	0/19	0/35	0/5641	0/080
$X_5^2$	5/19	1	5/19	9/88	0/0094	-0/42
باقی مانده (Residual)	5/77	11	0/52			0/33
عدم برازش (Lack of Fit)	4/44	6	0/74	2/77	0/1413	
خطای خالص (Pure Error)	1/33	5	0/27			
مجموع مربعات کل (CorTotal)	60/88	31				



جدول 4- نتایج آنالیز مدل تولید زیست توده دیتزیا ماریس با استفاده از روش RSM

0/72	انحراف معیار (Std. Dev)	0/9052	ضریب تشخیص (R-Squared:R <sup>2</sup> )
6/81	میانگین (Mean)	0/7328	ضریب تشخیص تعدیل شده (Adj R-Squared)
10/63	ضریب تغییرات (C.V. %)	-0/8607	ضریب تشخیص پیش بینی (Pred R-Squared)
113/27	مجموع مربعات خطای پیش بینی (PRESS)	8/31	دقت کافی (Adeq Precision)

دوبعدی اثر متقابل متغیرهای مستقل مختلف بر تولید کاروتنوئید توسط سویه دیتزیا ماریس در شکل 1 به تصویر کشیده شده است.

$$\begin{aligned} \text{کاروتنوئید } (\mu\text{g/l}) = & +72/06 + (6/57 * X_1) + \\ & (3/46 * X_2) + (5/76 * X_3) - (3/52 * X_4) - (4/58 * X_5) \\ & + (2/73 * X_1 X_2) - (1/51 * X_1 X_3) - (1/54 * X_1 X_4) + \\ & (0/46 * X_1 X_5) - (0/86 * X_2 X_3) - (5/09 * X_2 X_4) + \\ & (3/39 * X_2 X_5) - (0/68 * X_3 X_4) - (8/67 * X_3 X_5) - \\ & (5/36 * X_4 X_5) - (8/52 * X_1^2) - (11/02 * X_2^2) - \\ & (5/96 * X_3^2) - (7/57 * X_4^2) - (14/23 * X_5^2) \end{aligned}$$

از میان مدل‌های پیشنهادی توسط نرم افزار Design Expert، مدل درجه دوم برای متغیر تولید کاروتنوئید در سویه دیتزیا ماریس مناسب در نظر گرفته شد ( $P\text{-value} = 0/0347$ ). نتایج آنالیز واریانس تولید کاروتنوئید این سویه در جدول 5 آورده شده است. معادله درجه دو در مورد تولید کاروتنوئید دیتزیا ماریس مطابق معادله 4 به دست آمد.  $X_1$  نشان دهنده غلظت سیترات،  $X_2$  نشان دهنده غلظت ملات،  $X_3$  نشان دهنده غلظت سوکسینات،  $X_4$  غلظت گلو تامات، و  $X_5$  نیز نشان دهنده میزان pH می‌باشد. نتایج به دست آمده از آنالیز مدل تولید کاروتنوئید در جدول 6 نشان داده شده است. همچنین نمودارهای پاسخ سطح

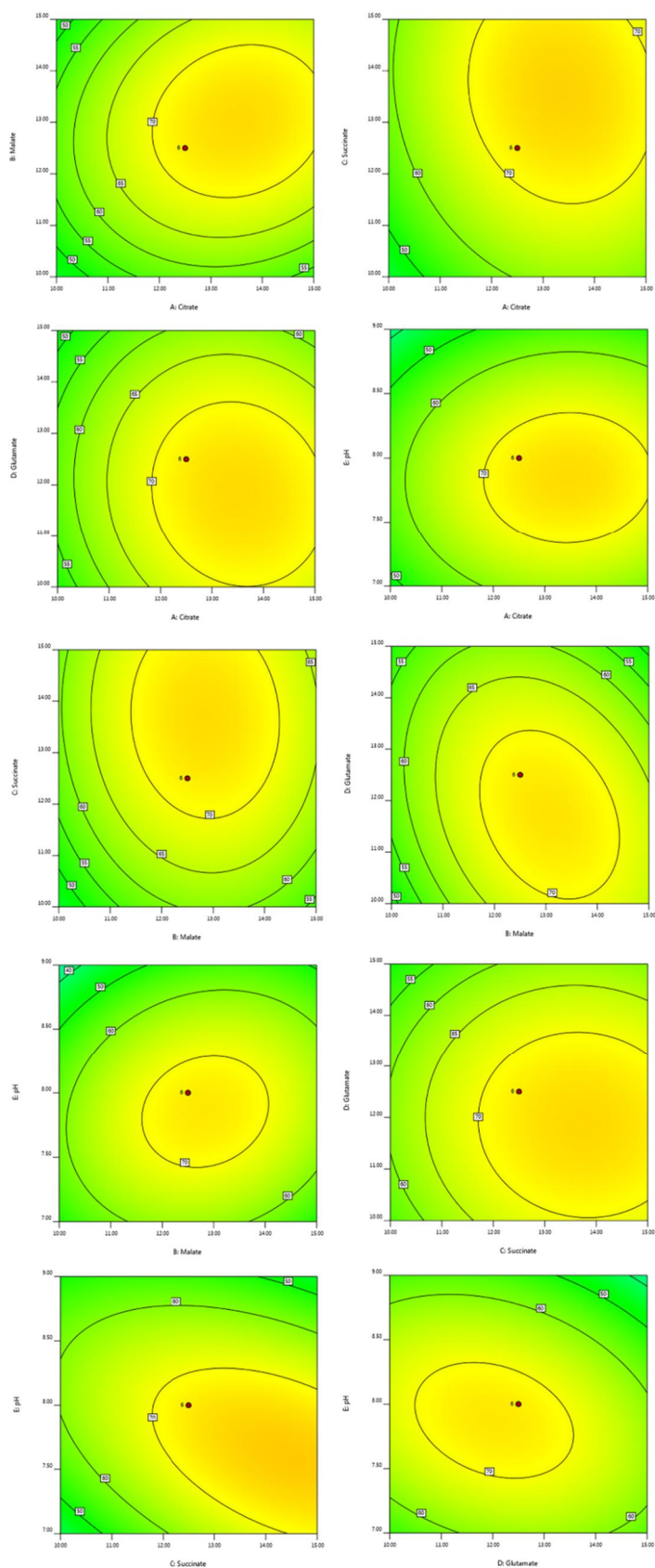
جدول 5- نتایج آنالیز واریانس تولید کاروتنوئید سویه دیتزیا ماریس با روش سطح پاسخ

عامل (کاروتنوئید)	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-value	P-value	ضرایب رگرسیون
مدل	16581/75	20	829/09	2/94	0/0347	
سیترات ( $X_1$ )	1035/86	1	1035/86	3/68	0/0814	6/57
ملات ( $X_2$ )	287/04	1	287/04	1/02	0/3344	3/46
سوکسینات ( $X_3$ )	795/42	1	795/42	2/82	0/1210	5/76
گلو تامات ( $X_4$ )	297/46	1	297/46	1/06	0/3261	-3/52
pH ( $X_5$ )	503/88	1	503/88	1/79	0/2080	-4/52
$X_1 X_2$	119/00	1	119/00	0/42	0/5290	2/73

$X_1 X_3$	36/72	1	36/72	0/13	0/7249	-1/51
$X_1 X_4$	37/76	1	37/76	0/13	0/7212	-0/54
$X_1 X_5$	3/44	1	3/44	0/012	0/9140	0/46
$X_2 X_3$	11/78	1	11/78	0/042	0/8417	-0/86
$X_2 X_4$	414/79	1	414/79	1/47	0/2503	-5/06
$X_2 X_5$	184/31	1	184/31	0/65	0/4357	3/39
$X_3 X_4$	7/40	1	7/40	0/026	0/8742	-0/68
$X_3 X_5$	1203/88	1	1203/88	4/27	0/0630	-8/67
$X_4 X_5$	460/10	1	460/10	1/63	0/2275	-5/36
$X_1^2$	2131/55	1	2131/55	7/57	0/0188	-8/52
$X_2^2$	3561/50	1	3561/50	12/65	0/0045	-11/02
$X_3^2$	1040/64	1	1040/64	3/70	0/0808	-5/96
$X_4^2$	1679/09	1	1679/09	5/96	0/0327	-7/57
$X_5^2$	5938/92	1	5938/92	21/09	0/0008	-14/23
باقی مانده (Residual)	3097/71	11	281/61			
عدم برازش (Lack of Fit)	859/22	6	143/20	0/32	0/9011	
خطای خالص (PureError)	2238/49	5	447/70			
مجموع مربعات کل (CorTotal)	19679/46	31				

جدول 6- نتایج آنالیز مدل‌های بدست آمده با استفاده از روش RSM تولید کاروتنوئید دیتزیا ماریس

16/78	انحراف معیار (Std. Dev)	0/8426	ضریب تشخیص (R-Squared:R <sup>2</sup> )
36/59	میانگین (Mean)	0/5564	ضریب تشخیص تعدیل شده (Adj R-Squared)
45/86	ضریب تغییرات (C.V. %)	-0/3319	ضریب تشخیص پیش بینی (Pred R-Squared)
26210/70	مجموع مربعات خطای پیش بینی (PRESS)	4/893	دقت کافی (Adeq Precision)

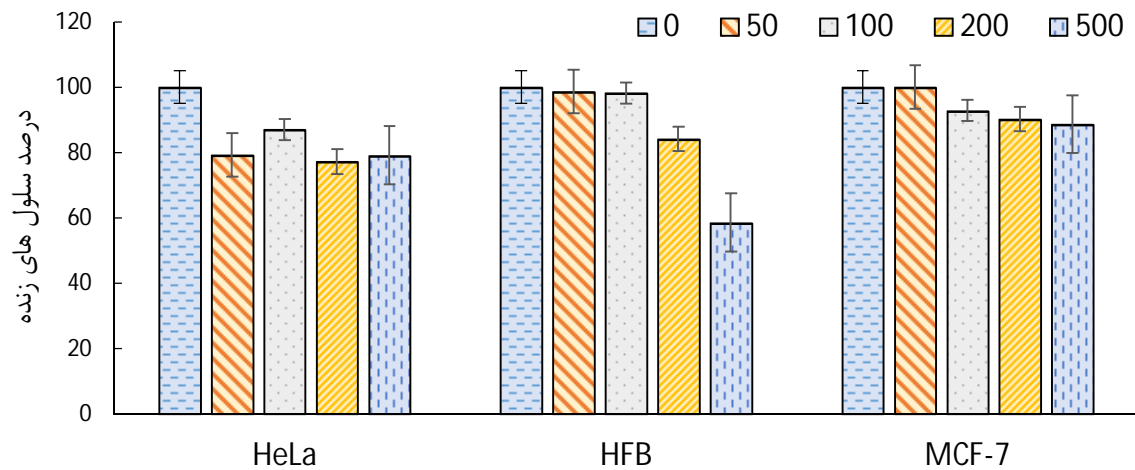


شکل 1- نمودارهای پاسخ سطح دو بعدی اثر متقابل متغیرهای مستقل مختلف بر تولید کاروتنوئید توسط سویه دیتریا ماریس

### بررسی تأثیر رنگدانه بر روی کشت سلول و خاصیت ضدباکتریایی آن

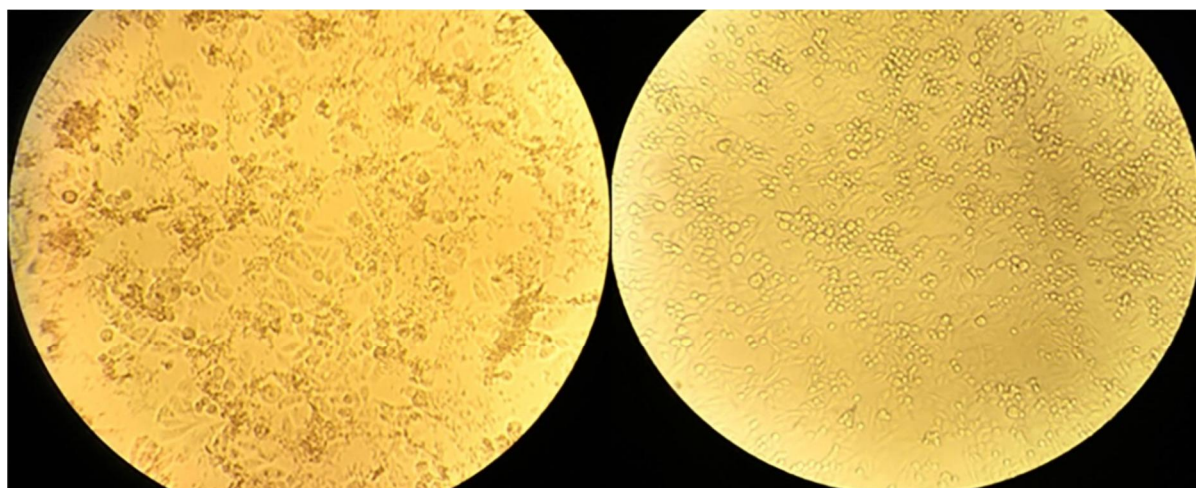
مطالعات رنگدانه دیتزیا ماریس بر روی سلول‌های HFB نشان داده است که این رنگدانه هیچ گونه اثر سمی بر روی این دسته از سلول‌ها نداشته است. همچنین بررسی این رنگدانه بر روی سلول‌های سرطانی Hela و MCF-7 نشان داد رنگدانه مورد مطالعه دارای خاصیت ضد

سرطانی نمی‌باشند (شکل 3). نتایج مشاهده تصویر میکروسکوپی سلول‌های HFB، MCF-7، و Hela شاهد و پس از تأثیر رنگدانه استخراج شده در کشت سلولی در شکل 3 نشان داده شده است. همچنین بررسی اثر رنگدانه حاصل بر روی استافیلوکوکوس آرتوس و اشرشیا کلی نشان داد رنگدانه مورد مطالعه فاقد خاصیت ضدباکتریایی می‌باشد.



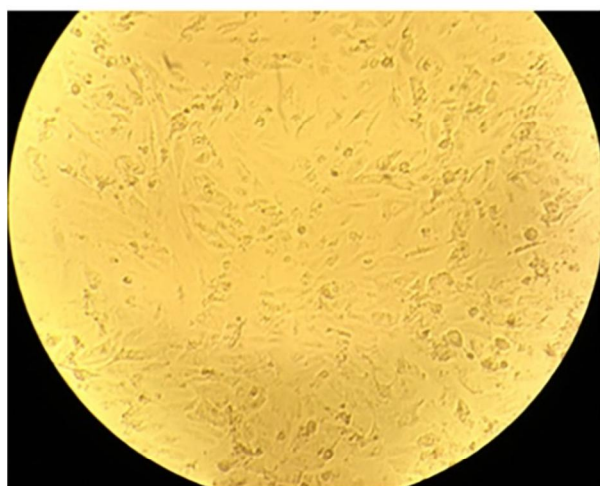
اثر غلظت‌های مختلف رنگدانه کاروتنوئیدی (میکروگرم بر میلی لیتر) دیتزیا ماریس بر رده‌های سلولی

شکل 2- نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت‌های مختلف رنگدانه (میکروگرم در میلی لیتر) دیتزیا ماریس بر کشت سلول‌های Hela، HFB و MCF-7

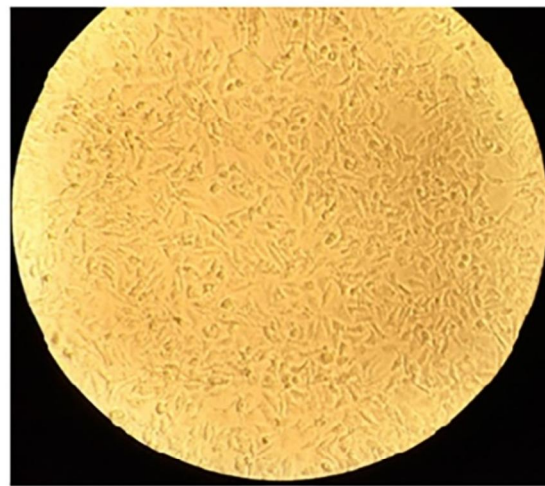


HFB شاهد

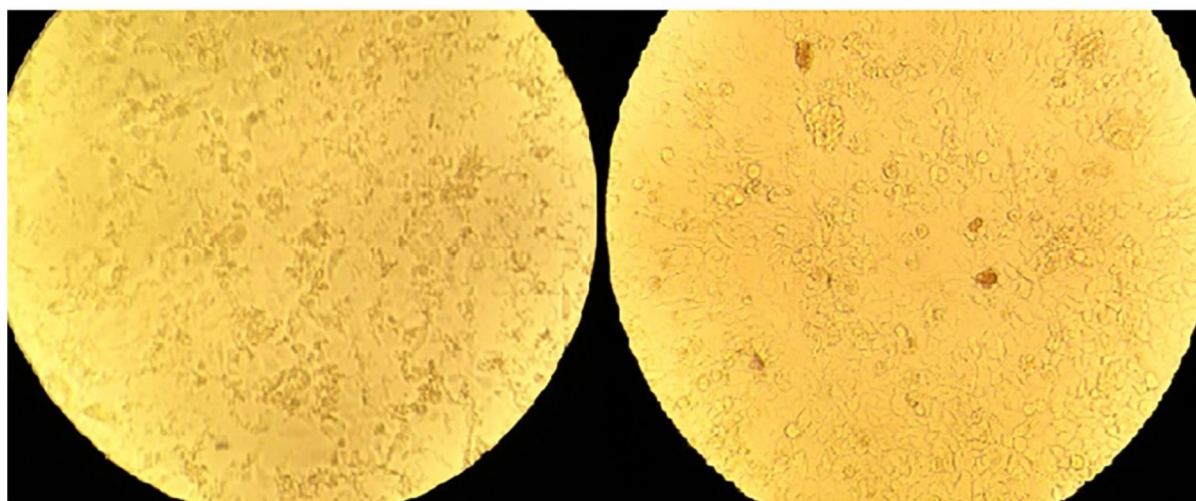
HFB + رنگدانه



MCF-7 شاهد



MCF-7 + رنگدانه



HeLa شاهد

HeLa + رنگدانه

شکل 3- تصویر میکروسکوپی سلول های HFB، MCF-7 و HeLa شاهد و پس از تأثیر رنگدانه استخراج شده در کشت سلولی

## 4- بحث و نتیجه گیری

عوامل زیادی بر تولید کاروتنوئیدهای میکروبی مؤثرند که از جمله می توان به منابع کربنی، منابع نیتروژنی، دمای کشت، pH محیط کشت، طول مدت گرمخانه گذاری، سرعت همزنی و ... اشاره داشت [17]. به همین دلیل بهینه سازی عوامل مؤثر بر تولید کاروتنوئیدها امری اجتناب ناپذیر است. روش یک فاکتور در یک زمان، یکی از روش های سنتی بهینه سازی تولید محصولات صنعتی است. در این روش، در هر زمان، یک فاکتور تغییر داده می شود و فاکتورهای دیگر همگی در یک سطح ثابت باقی می ماند. این روش نیاز به تعداد زیادی آزمایش دارد و بنابراین هزینه بر و زمان بر است و از طرفی میانگین بین فاکتورهای مؤثر را در نظر نمی گیرد، بنابراین برای بهینه سازی فاکتورها روش مطلوبی محسوب نمی شود؛ اما این روش در شناسایی فاکتورهای مؤثر و به دلیل ساده بودن اجرا می تواند مفید باشد [18]. معمولاً به منظور بهینه سازی یک فرایند صنعتی، از روش های آماری مانند روش پاسخ سطح استفاده می شود. در این روش میانگین بین فاکتورها در نظر گرفته می شود و از طرفی به دلیل انجام تعداد معدودی آزمایش از نظر هزینه و زمان مقرون به صرفه است [19]. از آن جایی که هر میکروارگانیسم و به عبارت بهتر هر سویه دارای نیازمندی های غذایی ویژه خود برای تولید یک محصول می باشد، بنابراین بهینه سازی شرایط تولید محصول برای هر سویه میکروبی ضروری است تا بتوان با حداقل هزینه ممکن به حداکثر نتیجه مطلوب دست یافت [20]. بنابراین در مطالعه حاضر به بهینه سازی آماری تولید کاروتنوئید و زیست توده سویه دیتزیا ماریس با استفاده از روش شناسی پاسخ سطح پرداخته شد تا بتوان با به دست آوردن مدل ریاضی، به فهم روابط بین متغیرهای مختلف مؤثر بر تولید کاروتنوئید و زیست توده میکروبی کمک کرده و امکان تولید بیشتر

محصول مورد نظر را با استفاده از هزینه های کمتر فراهم ساخت. به این منظور از روش سطح پاسخ یا RSM در قالب طرح مرکب مرکزی چرخش پذیر استفاده شد. از میان مدل های پیشنهادی توسط نرم افزار Design Expert 7، با توجه به مقادیر  $R^2$  (ضریب تشخیص) مربوط به مدل های مختلف، مدل درجه دوم برای متغیرهای پاسخ مورد مطالعه مناسب در نظر گرفته شد. سپس از رگرسیون، به منظور تعیین یک مدل سطح پاسخ، بر اساس برابند پاسخ های خطی، درجه دوم و اثرات متقابل متغیرهای مستقل استفاده شد.

در این مطالعه، معنادار بودن مدل های آماری به دست آمده با استفاده از  $F$ -test و  $P$ -value مورد بررسی قرار گرفت. در مورد سویه دیتزیا ماریس میزان  $F$ -value مدل برای تولید کاروتنوئید 2/94 و  $P$ -value آن در حدود 0/0347 به دست آمد و در مورد مدل زیست توده این سویه  $F$ -value آن 5/25 و  $P$ -value معادل 0/0036 به دست آمد که نشان دهنده معنادار بودن مدل برای این سویه می باشد. به منظور بررسی صحت مدل های مورد مطالعه، از ضریب تشخیص ( $R^2$ ) و تست عدم برازش (Lack of fit test) استفاده شد. معنادار بودن تست عدم برازش برای یک مدل، به این معناست که نقاط به خوبی اطراف مدل قرار نگرفته و در نتیجه نمی توان از مدل برای پیشگویی مقادیر متغیر پیوسته استفاده کرد. مقدار تست عدم برازش تولید کاروتنوئید و زیست توده دیتزیا ماریس به ترتیب 0/9011 و 0/1413 به دست آمد که معنادار به دست نیامد. این امر نشان دهنده آن است که نتایج به دست آمده به خوبی با مدل سازگار هستند. از طرفی ضریب تشخیص در مورد تولید کاروتنوئید و زیست توده دیتزیا ماریس به ترتیب 0/9050 و 0/8426 به دست آمد. ضریب تشخیص به طور معمول عددی بین 0 و 1 است و در حالت مساوی با 1 به این معناست که مدل مورد نظر، همه داده های آزمایشی را برآورد می کند و در حالت

موردمطالعه، در محیط تخمیری (pH 8) حاوی سیترات (12/5 mM)، گلوتامات (12/5 mM)، ملات (12/5 mM) و سوکسینات (12/5 mM) می‌باشد؛ به عبارت دیگر حداکثر تولید کاروتنوئید در نقطه مرکزی بوده است. این در حالی است که در تحقیق مشابه با تحقیق حاضر، اثر واسطه‌ها بر تولید کانتاگزاتین در دیتزیا ناترونولیمنا مورد بررسی و حداکثر تولید کانتاگزاتین 2871 میکروگرم بر لیتر گزارش شده بود [21]. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده محیط کشت آب پنیر در شرایط بهینه می‌تواند به عنوان بستر ارزان قیمت و مناسب برای تولید کانتاگزاتین توسط دیتزیا ماریس مورد استفاده قرار گیرد. اثرات محرک بودن حد واسطه‌های چرخه کربس بر روی تولید کاروتنوئید می‌تواند توسط دلایل زیر توجیه شود. نخست حد واسطه‌های چرخه کربس باعث افزایش میزان اگزالواتات می‌شوند. این ترکیب دکربوکسیله شده و به پیرووات تبدیل می‌شود. افزایش پیرووات می‌تواند مخزن استیل کوآ را افزایش می‌دهند. واحدهای استیل کوآ از دکربوکسیلاسیون پیرووات و در موجودات با تنفس هوازی، در مرحله قبل از ورود به چرخه کربس ساخته می‌شود. از آن جایی برای ساخت ترکیبات ایزوپرنی و از جمله کاروتنوئیدها، استیل کوآ مورد نیاز است، بنابراین حد واسطه‌های چرخه کربس می‌توانند باعث افزایش تولید این رنگدانه شوند. دوم، آنزیم‌های کلیدی در مسیرهای سنتز زیستی کاروتنوئیدها مانند تیولاز و استیل کوآ کربوکسیلاز می‌توانند تحت تأثیر حد واسطه‌های چرخه کربس قرار گیرند [22]. با این حال An (2001) گزارش کرده است که حد واسطه‌های چرخه کربس می‌توانند تولید کاروتنوئید را کاهش دهند و یا اثر خاصی بر تولید آنها نداشته باشند. به علاوه در مطالعه An (2001) میزان کاهش تولید کاروتنوئید مخمر فافیا

مساوی با صفر به این معناست که بر آورد مدل به طور کامل اشتباه است. برای آنکه یک مدل توانایی خوبی برای برازش اطلاعات داشته باشد، لازم است که مقدار آن بالای 0/8 باشد. نزدیک بودن مقدار  $R^2$  به یک، نشان دهنده قوی بودن مدل به دست آمده خواهد بود. از طرف دیگر مقدار  $R^2$  Adjusted determination) یا ضریب تشخیص تعدیل/تنظیم شده مدل، در مورد تولید کاروتنوئید دیتزیا ماریس 0/5564 و زیست توده آن 0/7328 به دست آمد. باید توجه داشت که هم  $R^2$  و هم ضریب تشخیص تنظیم شده این قابلیت را دارند که نشان دهند چه تعدادی از نقاط مربوط به داده‌های تجربی در خط رگرسیون قرار می‌گیرند. ضریب تشخیص پیش بینی یا  $R^2$  Predicted determination coefficient) که از بیش‌برازش (Overfitting) مدل جلوگیری می‌کند، می‌تواند حتی مفیدتر از ضریب تشخیص تنظیم شده باشد. در توضیح باید گفت که بیش‌برازش به پدیده نامطلوبی در آمار گفته می‌شود که در آن درجه آزادی مدل بسیار بیشتر از درجه آزادی واقعی انتخاب شده می‌باشد و در نتیجه اگر چه مدل روی داده‌های موجود بسیار خوب نتیجه می‌دهد، اما بر روی داده‌های جدید دارای خطای زیاد است. در صورتی که برای سنجش مؤثر بودن مدل، نه تنها کارایی آن بر روی نمونه‌های برازش را می‌سنجد، بلکه توانایی مدل بر روی نمونه‌هایی دیده نشده نیز در نظر گرفته می‌شود. بنابراین هر چقدر مقدار ضریب تشخیص پیش بینی بیشتر باشد، مدل توانایی پیش‌بینی بیشتری خواهد داشت. مقدار اندک ضریب تغییرات یا C.V. (Coefficient of variation) نیز نشان دهنده دقت و قابل اعتماد بودن داده‌های به دست آمده است.

در مطالعه حاضر پس از بهینه‌سازی شرایط تولید، حداکثر تولید رنگدانه در سویه مورد مطالعه دیتزیا ماریس 92/636 میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد. شرایط بهینه کشت برای سنتز زیستی کاروتنوئید توسط سویه

رودوزیما<sup>1</sup> در حضور اسیدآمین‌های مشتق شده از چرخه کربس مانند گلوتامات، بیشتر از اسیدهای تری کربوکسیلیک حد واسط در این چرخه می‌باشد. افزایش میزان تنفس و فعالیت چرخه کربس همراه با تولید میزان زیادی از گونه‌های فعال اکسیژن است. با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و به عبارت دیگر استرس اکسیداتیو در سلول، تولید کاروتنوئید افزایش پیدا می‌کند؛ بنابراین فراهم کردن اسیدآمین‌های مشتق از چرخه کربس، در واقع فعالیت چرخه کربس و در نتیجه تولید کاروتنوئید را کاهش می‌دهد [23]. بنابراین، می‌توان به طور کلی گفت نتایج مطالعه حاضر و اکثر مطالعات قبلی تأیید می‌کنند که واسطه‌های چرخه کربس می‌توانند اثرگذاری مؤثری بر تولید کاروتنوئیدهای میکروبی داشته باشند. با این حال ضروری است که غلظت و نوع واسطه‌های کربس مؤثر بر تولید کاروتنوئید برای هر سویه میکروبی جداگانه مورد بررسی قرار گیرد. علاوه بر بهینه‌سازی تولید رنگدانه، بررسی اثرهای سمیت سلولی رنگدانه‌ها بر رده‌های سلول و همچنین خواص ضد باکتریایی آنها به منظور به دست آوردن خواص زیستی کاروتنوئیدها ضروری است. مطالعات نشان داده است که کاروتنوئیدها در پیشگیری از سرطان و گرفتگی عروق نقش دارند در نتیجه مطالعه این ترکیبات بر روی کشت سلول می‌تواند کمک کننده باشد [24]. از طرف دیگر، بیماری‌های عفونی علت عمده مرگ و میر در سراسر جهان است. سالانه حدود 25 درصد از کل مرگ و میر جهان را به خود اختصاص داده است. در حال حاضر مقاومت در برابر داروهای مورد استفاده در درمان بیماری‌های عفونی در حال افزایش است. از جمله پاتوژن‌های مقاوم در برابر دارو، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین (MRSA)، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم در برابر ونکومايسين

(VRSA) می‌باشند. برخی از کاروتنوئیدها دارای خاصیت ضدباکتریایی می‌باشند. برای مثال، کاروتنوئید جدا شده از *استرپتومایسس هیگروزکوپیکوس*<sup>2</sup> می‌تواند بر علیه پاتوژن‌های ذکر شده مورد استفاده قرار گیرد. قارچ *آسپرژیلوس* یکی از میکروارگانیسم‌های تولید کننده رنگدانه زرد، زرد متمایل به قهوه‌ای و قهوه‌ای مایل به سیاه و یا سبز از نوع آنتراکینون می‌باشد. مطالعات بر روی رنگدانه این قارچ نشان داده است که عصاره رنگی *آسپرژیلوس* قوی‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی را دارد [25, 26]. در تحقیق حاضر اثر ضد باکتریایی و ضد توموری در ارتباط با رنگدانه مورد مطالعه دیده نشد. با این وجود، کاروتنوئید تولید شده توسط سویه *دیتزیا ماریس*، اثرات سمیت سلولی بر روی رده سلولی نرمال فیروبلاتست انسانی نیز نشان نداد. این نتایج نشان می‌دهد از کاروتنوئید سویه مورد مطالعه می‌توان به جای استفاده از صنایع دارویی در صنایع غذایی و آرایشی استفاده کرد.

با توجه به افزایش چشمگیر در تولید کاروتنوئید *دیتزیا ماریس* توسط روش‌های بهینه‌سازی آماری در مقایسه با شرایط بهینه نشده، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استراتژی روش‌شناسی پاسخ سطح بهینه‌سازی تولید کاروتنوئید مؤثر بوده است. با این وجود، از محدودیت‌های مطالعه حاضر، می‌توان به عدم غربالگری متغیرهای مؤثر دیگر برای افزایش تولید کاروتنوئید سویه *دیتزیا ماریس* NM اشاره داشت؛ بنابراین نویسندگان مقاله پیشنهاد می‌کنند که دیگر اسیدهای کربوکسیلیک و همچنین دیگر اسیدآمین‌های حاصل از چرخه کربس که بسیار کم در مطالعات گذشته مورد بررسی قرار گرفته‌اند، نیز در تولید کاروتنوئید سویه‌های میکروبی مدنظر قرار گیرند.

1. *Phaffia rhodozyma*2. *Streptomyces hygroscopicus*



strains of *Dietzia schimae* and *Microbacterium esteraromaticum*. *Progress in Biological Sciences*, **6**(2), 159-170.

11. Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., and Oliveira, R. (2006). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochem. Eng. J.*, **32**(3), 135-142.

12. Howe, J. A., and Tanumihardjo, S. A. (2006). Evaluation of analytical methods for carotenoid extraction from biofortified maize (*Zea mays* sp.). *J Agric Food Chem*, **54**(21), 7992-7997.

13. Nasri Nasrabadi, M. R., and Razavi, S. H. (2010). Enhancement of canthaxanthin production from *Dietzia natronolimnaea* HS-1 in a fed-batch process using trace elements and statistical methods. *Braz J Chem Eng*, **27**(4), 517-529.

14. Marova, I., Carnecka, M., Haličková, A., Certík, M., Dvorakova, T., and Haronikova, A. (2012). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *J. Environ. Manage*, **95**, S338-S342.

15. Mohana, D., Thippeswamy, S., and Abhishe, R. (2013). Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. *Radiat Prot Environ*, **36**(4), 168-174.

16. Rezaeeyan, Z., Safarpour, A., Amoozegar, M. A., Babavalian, H., Tebyanian, H., and Shakeri, F. (2017). High carotenoid production by a halotolerant bacterium, *Kocuria* sp. strain QWT-12 and anticancer activity of its carotenoid. *EXCLI journal*, **16**, 840.

17. Chen, D., Han, Y., and Gu, Z. (2006). Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Process Biochem*, **41**(8), 1773-1778.

18. Panda, B.P., Ali, M., and Javed, S. (2007). Fermentation process optimization. *Res. J. Microbiol*, **2**(3), 201-208.

19. Hamidi, M., Abdin, M. Z., Nazemyieh, H., Hejazi, M. A., and Hejazi, M. S. (2014). Optimization of total carotenoid production by *Halorubrum* Sp. TBZ126 using response surface methodology. *J. Microb. Biochem. Technol*, **6**, 286-294.

20. El-Banna, A.A., El-Razek, A.M.A., El-Mahdy, A.R. (2012). Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *Food Nutr Sci*, **3**(01), 64.

## 5- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مسئولین محترم دانشگاه اصفهان برای حمایت مالی تحقیق حاضر در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد تشکر و قدردانی می کنند.

## 6- منابع

- Sathasivam, R., and Ki, J. S. (2018). A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Mar drugs*, **16**(1), 26.
- Mortensen, A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Appl chem*, **78**(8), 1477-1491.
- Sandmann, G. (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch Biochem Biophys*, **385**(1), 4-12.
- Rao, A. V., and Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacol res*, **55**(3), 207-216.
- Yoshida, K., Inoue, K., Takahashi, Y., Ueda, S., Isoda, K., Yagi, K., and Maeda, I. (2008). Novel carotenoid-based biosensor for simple visual detection of arsenite: characterization and preliminary evaluation for environmental application. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(21):6730-6738.
- Vachali, P., Bhosale, P., and Bernstein, P. S. (2012). Microbial carotenoids. In *Microbial carotenoids from fungi* (pp. 41-59). Humana Press, Totowa, NJ.
- Tian, B., and Hua, Y. (2010). Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus-Thermus* bacteria. *Trends microbiol*, **18**(11), 512-520.
- Nasrabadi, M. R. N., and Razavi, S. H. (2010). Use of response surface methodology in a fed-batch process for optimization of tricarboxylic acid cycle intermediates to achieve high levels of canthaxanthin from *Dietzia natronolimnaea* HS-1. *J. Biosci. Bioeng*, **109**(4), 361-368.
- Zamanian, N. and Etemadifar, Z. (2016). Isolation and molecular identification of a UV-resistant strain of *Dietzia maris* and antioxidant activity of pigment. *Biological Journal of Microorganism*. **5**(18): 83-94.
- Zamanian, S. N., and Etemadifar, Z. (2017). Radical scavenging of pigments from novel

24. Matos, H.R., Mascio, P., and Medeiros, M.H. (2000). Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch. Biochem. Biophys*, **383**(1): 56-59.
25. Geweely, N.S. (2011). Investigation of the optimum condition and antimicrobial activities of pigments from four potent pigment-producing fungal species. *J. Life Sci*, **5**(9): 201.
26. Coppens, I. (2013). Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. *Nat. Rev. Microbiol*, **11**(12): 823.
21. Khodaiyan, F., Razavi, S.H. and Mousavi, S.M. (2008). Optimization of canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 from cheese whey using statistical experimental methods. *Biochem. Eng. J.*, **40**(3):415-422.
22. Bhosale, P. (2004). Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biot*, **63**(4), 351-361.
23. An, G.H. (2001). Improved growth of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), in the presence of tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biotechnol. Lett*, **23**(12), 1005-1009.

# Production optimization of canthaxanthin pigment from radioresistant *Dietzia maris* and evaluation of its effect on cell culture

Atefeh Salehi Bakhtiary<sup>1</sup>, Zahra Etemadifar<sup>2\*</sup>, Matia Sadat Borhani<sup>2</sup>

1-M.Sc., Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2-Associate Professor, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3-Assistant Professor, Biology Department, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran

\*Corresponding author

E-mail address: z.etemadifar@sci.ui.ac.ir

Postal Code: 8174673441

Received: 2020/2/10

Accepted: 2020/12/30

## Abstract:

**Background:** Carotenoids are biological antioxidants and play important roles in protecting the body from diseases and aging. Canthaxanthin is one of the most widely used carotenoids in the industry and medicine. This study aimed to investigate the biological properties of canthaxanthin pigment as well as its production optimization in a low-cost medium using a radioresistant microbial strain named *Dietzia maris*.

**Materials and methods:** Bacterial carotenoids were extracted and its antibacterial, anti-tumor, and cytotoxicity properties were investigated. Then, the effect of Krebs intermediates and pH on the production of pigment and microbial biomass in the whey medium was investigated using the response surface methodology.

**Results:** Maximum pigment production was found to be 92/54 mg/l in whey culture medium at pH 8 and in the presence of 12.5 mM of each of citrate, glutamate, malate, and succinate by the response surface method. The pigment did not show any cytotoxic effect on Hela, HFB, and MCF-7 cell lines. Besides, the pigment did not have any antibacterial properties.

**Conclusion:** Radioresistant microbial strains are better candidates for microbial pigment production due to their stability and high antioxidant activity. In this study, a whey culture medium was used to reduce the production cost of canthaxanthin. The addition of Krebs intermediaries in the fermentation medium increased the pigment production by *Dietzia maris* significantly.

**Keywords:** Carotenoids, Canthaxanthin, *Dietzia maris*, Radioresistant, Whey