Archive of SID

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۷، شماره ۲، تابستان ۹۶، صفحات ۱۲۶ تا ۱۳۲

Original Article

جداسازی و بررسی رنگدانه باکتری‌های سرمادوست با هدف کاربرد در صنایع غذایی

حدیثه پازکی[۱]، پرستو پورعلی[۲]

[۱] کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، نیشابور، ایران
[۲] استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *امروزه استفاده از رنگدانه‌های آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها با توجه به ماهیت و ایمنی آنها در حال افزایش است. این رنگدانه‌ها در طبیعت و خواص خود متفاوت هستند. هدف از مطالعه حاضر، استخراج رنگدانه‌های تولید شده در سرما توسط باکتری‌های سرمادوست است.*

روش بررسی: *۱۰ نمونه خاک از مناطق مختلف شهر طرقبه جمع‌آوری و کشت داده شدند. ۱۰ روز بعد، تعداد ۱۴ کلنی باکتریایی که مولد رنگدانه بودند انتخاب شدند و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و PCR مورد شناسایی قرار گرفتند. با استفاده از متانول و پودر شیشه رنگدانه‌های باکتریایی استخراج شدند و به منظور خالص سازی آنها TLC بر روی نمونه‌ها انجام گرفت. دو رنگدانه مربوط به سویه‌های A8 و A13 که دارای خلوص مناسب بودند، جهت بررسی سمیت سلولی بر روی ۳ رده سلولی HepG2، فیبروبلاست جنین انسان و سرطان معده استفاده شدند.*

یافته‌ها: *از میان ۱۴ باکتری دارای رنگدانه مربوط به سویه A8 که Aeromonas hydrophyla بود، بر روی رده‌های مختلف کشت سلولی باعث ممانعت از رشد سلول‌ها شد. همچنین رنگدانه نامیده شده A13، بر روی رده‌های سلولی هیچ سمیتی نداشت و می‌توان از آن به عنوان یک رنگ طبیعی در صنایع غذایی استفاده کرد.*

نتیجه‌گیری: *همان گونه که نتایج نشان دادند، بر اساس خواص بیولوژیکی رنگدانه‌های باکتریایی استخراج شده می‌توان از آنها در زمینه‌های مختلف پزشکی و تکنولوژی استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: *باکتری‌های سرمادوست، رنگدانه، صنایع غذایی، اثر ضدسرطانی.*

مقدمه

محیط‌های سرد از گسترده‌ترین مناطق زمین محسوب می‌شوند. این محیط‌ها شامل اقیانوس‌ها، خاک‌ها و بیابان‌های سرد و همچنین غارها هستند. باکتری‌های سرمادوست در فساد مواد غذایی مثل گوشت، مرغ، ماهی و محصولات لبنی نقش داشته و در دمای نزدیک به صفر تکثیر و رشد می‌کنند. این باکتری‌ها قادر به زندگی در مکان‌های اکولوژیکی متفاوت هستند و در تعداد زیاد می‌توان آنها را از خاک، هوا، آب‌های شور و شیرین، غذاهای معمول و ... جداسازی کرد. باکتری‌های سرمادوست وابسته به میزان درجه حرارتی که در آن رشد بهینه دارند، به دو دسته باکتری‌های Psychrophile (سرمادوست اجباری) و باکتری‌های Psychrotroph (سرمادوست اختیاری) تقسیم می‌شوند (۳). اغلب سرما دوست‌های اختیاری متعلق به جنس *Pseudomonas* و همچنین متعلق به جنس *Flavobacterium*، *Achromobacter*، *Alcaligenes*، و به میزان کمتر *Micrococcus*، *Lactobacillus* و *Aerobacter* هستند (۳).

رنگدانه‌های زیستی گروه خاصی از رنگدانه‌ها هستند که به عنوان متابولیت ثانویه توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. ترکیب رنگدانه‌ها به طور قابل توجهی متفاوت است و

آدرس نویسنده مسئول: شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، پرستو پورعلی
(**email**: Parastoo_pourali@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۷/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۱/۱۳

www.SID.ir

Archive of SID

این تفاوت به عواملی همچون نوع مواد غذایی در دسترس میکروارگانیسم و شرایط و عوامل محیط بستگی دارد. اصطلاحات "رنگدانه" و "رنگ" اغلب به صورت مترادف استفاده می‌شوند. با این حال صرفا، رنگدانه به مواد نامحلول در محیط کشت گفته می‌شود، در حالی که رنگ ترکیبی محلول است (۱). امروزه برخی از رنگدانه‌های طبیعی مشتق شده از میکروارگانیسم‌ها به عنوان رنگ خوراکی و مکمل‌های تغذیه‌ای، نشان دهنده حضور و اهمیت جایگاه آنها در بازار است، به طوری که مصرف کنندگان حاضر به پرداخت بهای بیشتر برای استفاده از مواد طبیعی هستند (۱). بنابراین با توجه به فراوانی میکروارگانیسم‌ها، ارزش تجاری رنگدانه‌ها، فرآیندهای زیستی مقرون به صرفه و تقاضا برای توسعه آنها در صنایع مختلف، استفاده از آنها روز به روز رو به افزایش است (۵). استفاده از رنگ‌های مصنوعی در صنایع غذایی برای سال ها موضوع مورد بحث است که بررسی‌ها و ارزیابی‌های دقیق رنگ‌های خوراکی مصنوعی، منجر به جایگزینی رنگ‌های طبیعی توسط مصرف کنندگان شده است (۵). با ظهور مقررات سخت‌گیرانه قانونی و آگاهی رو به رشد مردم در مورد ایمنی غذایی، استفاده از رنگ‌های طبیعی با منشا زیستی روز به روز با استقبال بیشتری در میان مصرف کنندگان روبروست (۱۲). لذا در مقاله حاضر با توجه به کمبود مطالعات در این زمینه به خصوص در ایران، سعی شده است به بررسی و جداسازی میکروارگانیسم‌های سرمادوست با توانایی تولید رنگدانه پرداخته شود تا در آینده بتوان از رنگدانه‌های استخراج شده جهت استفاده در صنایع غذایی بهره برد.

مواد و روشها

نمونه برداری و جداسازی باکتری‌های مولد رنگدانه

در این تحقیق، از خاک مناطق مختلف شهر طرقبه در استان خراسان رضوی نمونه برداری انجام شد. سپس رقت‌های مختلف از خاک‌ها تهیه شد و بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از رشد باکتری‌ها، کلنی‌های رنگی انتخاب و روی محیط جدید کشت داده شدند.

شناسایی باکتری‌ها

جهت به دست آوردن اطلاعات مرفولوژیک جدایه‌ها، برای هر یک از آنها رنگ آمیزی گرم انجام گرفت. همچنین از آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی فنوتیپی و واکنش زنجیره پلیمراز برای شناسایی ژنوتیپی استفاده شد.

آزمون‌های بیوشیمیایی

به دلیل ناشناخته بودن باکتری‌ها و به منظور شناسایی نسبی هر یک از آنها، آزمون‌های بیوشیمیایی از جمله آزمون تحرک، کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز، DNAآز، سیترات، H2S، OF، MR-VPو اندول انجام گرفت.

شناسایی ژنوتیپی

استخراج DNA باکتری‌ها با روش Boiling انجام گرفت. سپس واکنش PCR در حجم کلی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش تکثیر شامل ۲۵ میکرولیتر Master Mix شرکت ampliqon (حاوی dNTPs ، $Mgcl_2$، Taq DNA Polymerase)، پرایمرهای پیشرو و پیرو هر کدام ۲/۵ میکرولیتر، DNA استخراج شده از باکتری ۲/۵ میکرولیتر و آب مقطر دوبار تقطیر شده ۱۷/۵ میکرولیتر بود (حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر). به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون مربوط به بخشی از ژن 16S rRNA بود که قطعه‌ای به طول ۱۲۹۹ جفت باز از DNA را تولید می‌کرد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است (۸).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعات 16S rRNA

توالی پرایمر	نام پرایمر	نوع پرایمر
5´- CAGGCCTAACACATGCAAGTC -3´	63F	F
5´- ACGGGCGGTGTGTACAAG -3´	1389R	R

مرحله دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه انجام شد و سپس ۳۰ چرخه دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، مرحله اتصال در ۵۹/۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه انجام شد. در انتها مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. محصولات تکثیر شده به وسیله الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE (حاوی ۱۲/۱۱ گرم تریس، ۶/۱۸ گرم اسید بوریک و ۴ میلی لیتر EDTA ۰/۵ مولار در pH 8) و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) مشاهده و عکس برداری شد (شکل ۱). در نهایت، محصول PCR به همراه پرایمر پیشرو، جهت انجام تعیین توالی یک جهته قطعات به شرکت سیناکلون فرستاده شد. نتایج حاصل

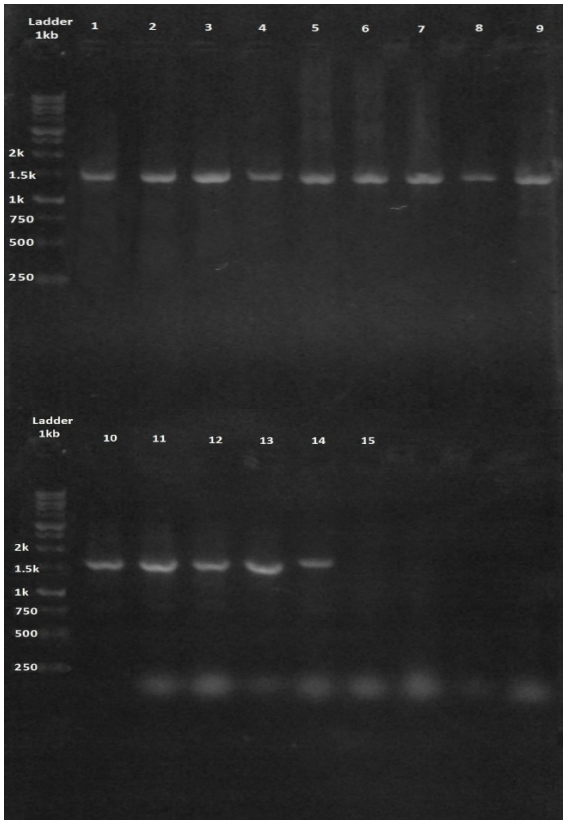
www.SID.ir

Archive of SID

از تعیین توالی با فرمت Fast A و در سایت EZ Taxon با بانک توالی‌های 16S rRNAمقایسه شدند (۸).

استخراج رنگدانه

به منظور استخراج رنگدانه سلول‌های باکتریایی از محیط کشت، ابتدا از طریق سانتریفیوژ در دور 3500 rpm به مدت ۱۵ دقیقه سلول‌ها رسوب داده شدند. سپس رنگدانه از سلول‌ها با استفاده از متانول ۹۹/۸٪ و پودر شیشه استخراج شد. عمل استخراج به این صورت انجام گرفت که به ازای هر گرم توده سلولی، ۵ میلی لیتر متانول به رسوب اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت.



شکل۱. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره پلیمراز در ژل آگارز ۱٪. چاهک اول Ladder 1kb و چاهک‌های ۱ تا ۱۴ نشان دهنده محصول واکنش زنجیره پلیمراز برای هر نمونه است. چاهک شماره ۱۵ نیز به عنوان کنترل منفی و فاقد DNA الگو است. باندهای تشکیل شده، قطعه ۱۲۹۹ را نشان می‌دهند.

سپس محلول رویی رنگی پس از سانترفیوژ در دور 3500 rpm به مدت ۱۵ دقیقه جدا شد و برای حذف کامل حلال از دستگاه Rotary Evaporation استفاده شد. همچنین از دستگاه Freez dryer به منظور تهیه پودر از رنگدانه ها استفاده شد.

کشت رده سلولی سرطان کبد (HepG2)

در طی مرحله قبل ۱۴ رنگدانه از باکتری های مختلف جداسازی شدند که به منظور بررسی اثر آن ها، از رده سلولی سرطان کبد به همراه آزمون سمیت سلولی با روش MTT استفاده شد. جهت کشت رده سلول سرطان کبد، ابتدا محیط CM10 تهیه شد. برای این کار، ۱۰ میلی لیترFBS ، 1میلی لیتر محلول پنیسیلین-استرپتومایسین و مابقی تا حجم ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت RPMI1640 استریل اضافه شد. سپس رده سلولی به همراه محیط کشت تهیه شده، در فلاسک T25 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور CO_2٪۵ انکوبه شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰٪، سطح آنها به وسیله بافر PBS شستشو داده شد و با اضافه کردن تریپسین -EDTA، سلول‌های چسبیده به کف فلاسک جدا شدند. سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه و در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و با افزودن مجدد محیط کشت بر روی رسوب سلولی، اثر تریپسین خنثی شد (۱۰). سلول‌ها توسط رنگ تریپان بلو و لام نئوبار در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست شمارش شدند و جهت بررسی اثر رنگدانه‌ها بر روی سلول‌های $HepG_2$، ابتدا برای رده سلولی سرطان کبد ۵۰۰۰ سلول در پلیت کشت سلول ۹۶ خانه کشت داده شد و میزان ۲۰۰µl محیط کشت مورد نیاز آنها اضافه شد. جهت رسیدن به تراکم تک لایه سلول‌ها، پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در معرض $\underline{CO_2}$٪۵ گرمخانه گذاری شد. هنگامی که سلول‌ها به ۸۰ تا ۹۰٪ تراکم رسیدند، محیط کشت خارج شد؛ سطح سلول‌ها توسط بافر PBS شستشو داده شد و دوباره در تمام چاهک‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از همان محیط کشت وارد شد. از ۱۴ نمونه رنگدانه، در هر چاهک، از چاهک ۱ تا چاهک ۱۱ به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رنگدانه استریل حل شده در CM10، در غلظت‌هایی به صورت نصف وارد شد. همچنین چاهک شماره ۱۲ به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که فقط حاوی سلول و ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت بود. پلیت دوباره در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در معرض CO_2٪۵ قرار داده شد. پس از اتمام زمان گرمخانه گذاری، دوباره محیط کشت رویی خارج شده و به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از رنگ تترازولیوم با غلظت ۵mg/ml اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در گرمخانه $\underline{CO_2}$ قرار داده شد.

کروماتوگرافی لایه نازک

از میان نمونه های مختلف رنگدانه که رفتار آن ها در کشت سلولی بررسی شده بود، ۴ رنگدانه با خواص سمی و ۱ رنگدانه

www.SID.ir

Archive of SID

غیر سمی انتخاب و به وسیله روش کروماتوگرافی لایه نازک خالص بودن آن ها بررسی شد. تعداد ترکیبات موجود در رنگدانه میکروارگانیسم‌ها به وسیله روش کروماتوگرافی لایه نازک سنجیده شد. پودر هر یک از رنگدانه های خام دوباره در ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر متانول حل شدند و کروماتوگرافی لایه نازک به کمک مخلوط حلال اتیل استات- متانول (۵:۵) انجام شد. سپس برای تشخیص لکه های رنگی بر روی کروماتوگرام، از ترکیب معرف‌های سولفوریک اسید ۵٪ و وانیلین ۱٪ استفاده شد.

کشت رده سلول فیبروبلاست جنین انسان (HFF-PI 34) و سرطان معده (AGS)

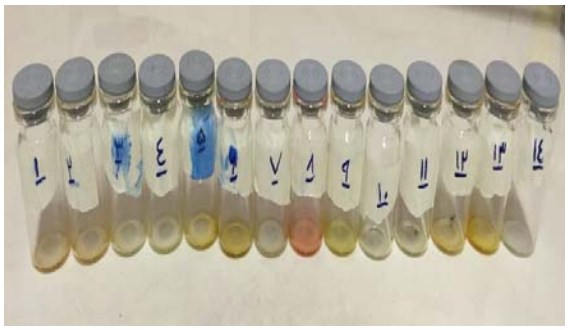
رنگدانه هایی که خلوص آن ها توسط کروماتوگرافی لایه نازک تایید شده بود مجددا جهت بررسی های بیشتر بر روی سایر رده های کشت سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. برای کشت سلول‌های فیبروبلاست از محیط کشت DMEM و برای سلول‌های سرطان معده از محیط CM10 جهت تکثیر سلول‌ها استفاده شد. سلول‌ها به همراه محیط کشت به فلاسک T25 منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. پس از اینکه سلول‌ها به تراکم سلولی ۸۰٪ رسیدند، نمونه‌ها در معرض تریپسین-EDTA قرار گرفتند. پس از گذشت ۳ دقیقه در انکوباتور، سلول‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی شدند و پس از مطمئن شدن از وجود سلول‌های کنده شده از کف فلاسک، آنها را به مدت ۵ دقیقه و با دور 2000 rpm سانترفیوژ کرده و بلافاصله محیط قدیم را دور ریخته و جهت غیر فعال شدن تریپسین، روی سلول‌ها محیط جدید اضافه شد (۱۰). سپس رنگ آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلولی انجام گرفت و جهت بررسی اثر دو رنگدانه A8 و A13 بر روی این دو رده سلولی، دوباره از روش MTT استفاده شد.

یافته‌ها

از نمونه‌های کشت داده شده بر روی نوترینت آگار، ۱۴ کلنی رنگی که دارای رنگدانه‌های قوی‌تری بودند، انتخاب شدند (شکل ۲). جهت شناسایی نمونه‌های باکتریایی از تست‌های بیوشیمیایی و آزمون PCR استفاده شد که نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی بر روی کلنی‌های رشد کرده روی محیط کشت نوترینت آگار بررسی شد.

پس از تعیین توالی، برای مقایسه شباهت نمونه‌های باکتریایی با ژن‌های به دست آمده از سایر باکتری‌ها، در سامانه اینترنتی Ez-Taxon جستجو انجام شد. نتایج این بررسی در جدول ۲ آمده است. با استفاده از متانول و دستگاه Rotary، استخراج رنگدانه‌های باکتریایی انجام شد. شکل ۳ تصویری از رنگدانه‌ها پس از حذف متانول از آنها را نشان می‌دهد.

پس از بررسی رفتار رنگدانه‌ها در کشت سلول و بر روی رده سلولی سرطان کبد (HepG2)، میزان IC_{50} هر یک از رنگدانه ها مشخص شد که از ۱۴ نمونه مورد آزمایش ۴ نمونه دارای اثر سمیت مناسب بر روی رده سلول سرطان کبد بودند و یک نمونه هیچ‌گونه سمیتی بر روی سلول‌های سرطانی نشان نداد. بر روی ۵ رنگدانه انتخاب شده، کروماتوگرافی لایه نازک انجام گرفت که بهترین رنگدانه از نظر خلوص، کیفیت رنگدانه و میزان تولید آن در محیط کشت، مربوط به نمونه A8 با رنگدانه صورتی پررنگ و باکتری *Aeromonas hydrophila* و همچنین نمونه A13 با رنگدانه زرد- نارنجی و باکتری *Brevondimonas bullata* بود. ۲ رنگدانه انتخاب شده جهت تکمیل مطالعات بر روی دو رده سلولی فیبروبلاست جنین انسان و سرطان معده مورد بررسی قرار گرفتند که با توجه به نتایج به دست آمده از آنها، رنگدانه A8 بر روی رده سلولی فیبروبلاست، در چاهک اول (با غلظت ۰/۲ میلی گرم/ میلی لیتر) و برای سلول‌های سرطانی معده در چاهک دوم (با غلظت ۰/۱ میلی گرم/ میلی لیتر) دارای IC50 بود. همچنین رنگدانه A13 هیچگونه سمیتی بر روی رده‌های سلولی فیبروبلاست و سرطان معده نشان نداد.



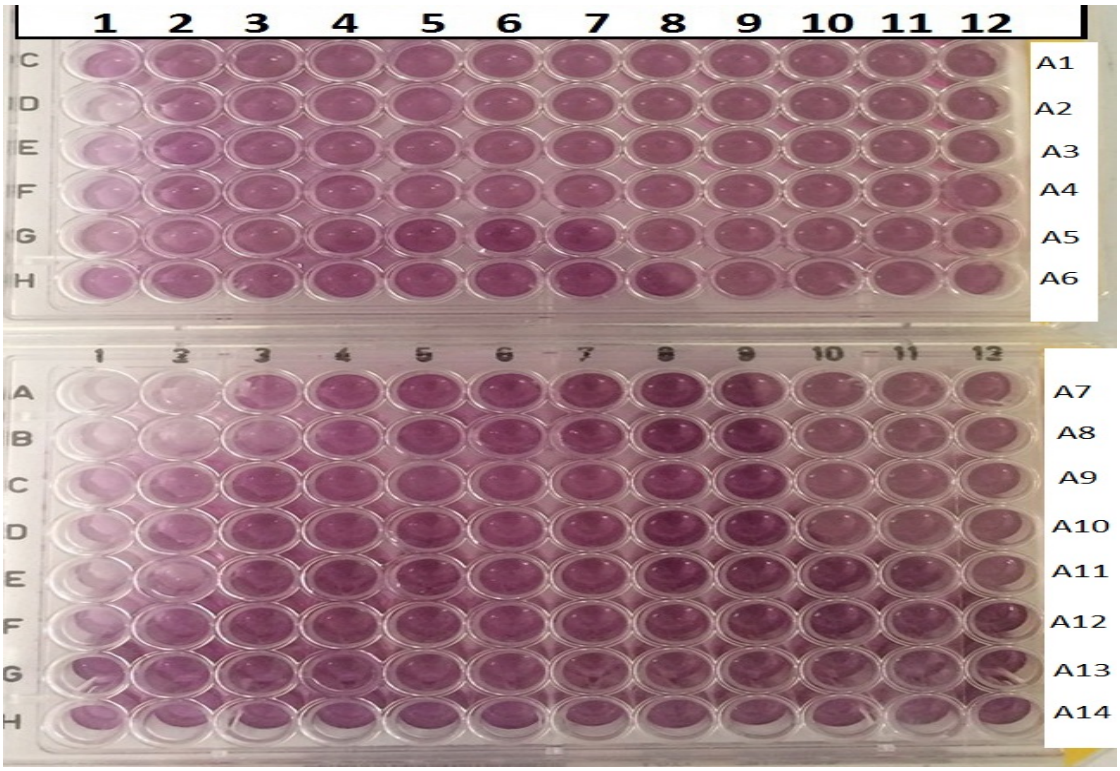
شکل ۲. محلول رنگدانه‌های غلیظ شده توسط دستگاه روتاری

بحث

صنایع غذایی، صنعتی رو به رشد و بسیار کلیدی در زندگی امروز است. در این میان می‌توان جایگاه ویژه‌ای برای نوشیدنی‌ها و خوراکی‌های رنگی قائل شد، چرا که به عنوان گزینه‌های اصلی در رژیم غذایی خانواده‌های شهری جای گرفته‌اند. لذا پژوهش در این حوزه از اهمیتی حیاتی و فزاینده

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. کشت رده سلول $HepG_2$ پس از افزودن رنگدانه‌ها و رنگ تترازولیوم

جدول ۲. نشان دهنده نتایج تعیین توالی ۱۴ نمونه باکتری رنگدانه‌دار می باشد

شماره نمونه	باکتری	شماره سویه	درصد شباهت
A۱	*Brevibacterium halotolerant*	DSM 8802	۱۰۰
A۲	*Brevibacterium halotolerant*	DSM 8802	۸۲/۷
A۳	*Brevibacterium halotolerant*	DSM 8802	۱۰۰
A۴	*Massiliatimonae*	CCUG 45783	۹۲/۵
A۵	*Pseudomonas peli*	R-20805	۹۹/۳
A۶	*Sphingobacteriumyamdrokense*	3-0-1	۷۰
A۷	*Aeromonashydrophila subsp. ranae*	LMG 19707	۹۸/۸
A۸	*Aeromonashydrophila subsp. ranae*	LMG 19707	۹۹/۶
A۹	*Aeromonassalmonicida subsp. achromogenes*	NCIMB 110	۱۰۰
A۱۰	*Chryseobacteriumaahli*	T 68	۸۱/۶
A۱۱	*Sphingobacteriumfaecium*	DSM 11690	۸۳/۴
A۱۲	*Chryseobacteriumgregarium*	P 461/12	۸۸/۸
A۱۳	*Brevundimonasbullata*	IAM 13153	۱۰۰
A۱۴	*Stenotrophomonaschelatiphaga*	LPM-5	۹۹/۷

برخوردار است و زمینه تولید محصولات جایگزین سالم، از ورای اثبات سودآوری و مزیت‌های نسبی آنها توسط تحقیقات آزمایشگاهی فراهم می‌شود. باتوجه به فن‌آوری سبز، تلاش برای استفاده از محصولات با سمیت کمتر و مواد طبیعی بیشتر، شروع مناسبی برای خطوط تولید امروز است. باتوجه به موج بیماری‌ها و سرطان‌های پیش رو و همچنین اثر دفع زباله‌های صنعتی در اکوسیستم، تولید برخی از رنگ‌های مصنوعی ممنوع شده است (۱۳). اولین ویژگی کیفی ماده غذایی که توسط مصرف‌کننده مورد توجه قرار می‌گیرد، خصوصیات ظاهری آن است. در حقیقت مصرف کننده قبل از آنکه اطلاعی از سایر خصوصیات از قبیل طعم یا بو داشته

www.SID.ir

Archive of SID

باشد، به ظاهر خوراک توجه می‌کند. بنابراین مشخصات ظاهری یک فرآورده غذایی عامل مهمی است که مخصوصاً در اولین برخورد خریدار، نقش اساسی و تعیین‌کننده‌ای دارد.

رنگ عامل موثر در جلب نظر و انتخاب ماده غذایی است که از طریق احساس، دریافت می‌گردد و وجود آن در تشخیص سریع و پذیرش نهایی هر فرآورده غذایی موثر است، زیرا باعث جذابیت ماده غذایی می‌شود. از موارد مصرف رنگ‌های طبیعی در صنایع غذایی می‌توان به استفاده از رنگ بتائین برای سس-ها، رنگ کارامل برای نوشابه‌های گازدار، از کاروتنوئیدها برای رنگین نمودن پنیر، نوشابه‌های پرتقالی، بستنی و از بتاکاروتن در ماکارونی، کره و مارگارین اشاره کرد (۴). در این تحقیق سعی بر این بود که شکست سلول‌ها و استخراج پیگمان‌های باکتریایی توسط متانول صورت گیرد. متانول به تنهایی حلال بسیار خوبی برای استخراج پیگمان‌ها محسوب می‌شود (۲). البته روش‌های دیگری نیز مورد امتحان قرار گرفت که از جمله آنها استفاده از اتانول به جای متانول در مرحله اول بود. اتانول نیز یکی از حلال‌های رایج برای استخراج رنگدانه از سلول‌های مختلف محسوب می‌شود، اما در اغلب موارد کارایی آن به اندازه متانول نیست. استفاده از روش‌های فیزیکی در کنار متانول، برای افزایش بازده کار انجام گرفت. بدین منظور هم زمان با متانول، پودر شیشه نسبتا نرم نیز مورد استفاده قرار گرفت. با اضافه کردن متانول و پودر شیشه به توده سلولی و ورتکس کردن آنها، رنگدانه‌ها به طور قابل قبولی از توده سلولی خارج شدند. پس از شناسایی باکتری‌ها و به منظور بررسی رفتار رنگدانه آنها در کشت سلول، از رده سلولی سرطان کبد ($HepG_2$) به روش MTT استفاده شد. دلیل انتخاب این رده سلولی این بود که کبد به عنوان عضوی مهم و فعال در بدن، وظایف متعددی از جمله وظیفه پاکسازی بدن را برعهده دارد. از ۱۴ نمونه مورد آزمایش ۴ نمونه دارای اثر سمیت بر روی رده سلول سرطان کبد بودند و نمونه A13 هیچگونه سمیتی بر روی سلول‌های سرطانی نشان نداد. ۵ رنگدانه انتخاب و برای آزمون های بیشتر، مورد بررسی قرار گرفتند. بر روی ۵ رنگدانه انتخاب شده، کروماتوگرافی لایه نازک انجام گرفت که بهترین رنگدانه از نظر خلوص، کیفیت رنگدانه و میزان تولید آن در محیط کشت، مربوط به نمونه A8 با رنگدانه صورتی پررنگ و باکتری *Aeromonas hydrophila* با ۹۹/۶٪ شباهت و همچنین نمونه A13 با رنگدانه زرد- نارنجی و باکتری *Brevondimonas bullata* با ۱۰۰٪ شباهت بود.

جنس *Aeromonas* را در دو شاخه تقسیم‌بندی می‌کنند. گروه سایکروفیلیک که در ۳۷ درجه سانتی گراد رشد نمی-کنند و بنابراین از نظر بالینی اهمیتی ندارند و گروه مزوفیلیک، که اعضای این گروه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کنند و متحرک هستند و به طور قابل ملاحظه‌ای برای انسان پاتوژن قوی هستند (۱۵).

در مطالعه‌ای که توسط Burke و همکاران انجام شد، میزان جداسازی گونه‌های *Aeromonas* از آب‌های کلردار به خوبی آب‌های سطحی است و در زمان جداسازی این گونه‌ها دمای آب ۱۴/۵ درجه سانتی‌گراد و بالاتر است (۱۶).

Ivanova و همکارانش در سال ۲۰۰۰ انتشار گونه‌های *Vibrio* را در آب های آشامیدنی شهر ولادی وستوک (Vladivostok) در روسیه بررسی کردند که ۲۵٪ باکتری های جدا شده را گونه‌های *Aeromonas* تشکیل می دادند (۱۴).

از این مطالب می‌توان نتیجه گرفت که جداسازی باکتری‌های خانواده *Aeromonas* از محیط، به دلیل حضور فراوان آنها در مناطق مختلف و همچنین توانایی رشد این جنس از باکتری در بازه دمایی متفاوت، کار دشواری نخواهد بود و با تکیه بر این مطلب که رشد آنها در محیط‌های حداقل نیز امکان پذیر خواهد بود، می‌توان گونه‌های مختلف از جنس *Aeromonas* را برای تحقیقات بیشتر بر روی رنگدانه آنها مدنظر قرار داد.

با بررسی رفتار رنگدانه A8 بر روی رده‌های سلولی فیبروبلاست و سرطان معده مشخص شد که میزان IC_{50} برای رده فیبروبلاست ۰/۲ mg/ml و برای سلول‌های سرطان معده ۰/۱ mg/ml بود. بنابراین با استفاده از این رنگدانه خالص در مواد غذایی، علاوه بر استفاده از ظاهر رنگی که به مواد غذایی می‌دهد، می‌توان از خواص ضد سرطانی آن نیز بهره‌مند شد. همچنین بررسی رفتار رنگدانه A13 نیز هیچگونه سمیتی را روی رده‌های سلولی فیبروبلاست و سرطان معده نشان نداد. بنابراین رنگدانه A13 را به عنوان یک رنگ طبیعی که تنها در جهت اهداف رنگ آمیزی غذا مصرف شوند، می‌توان معرفی کرد. البته برای استفاده‌های تجاری از این رنگدانه‌ها، باید آزمایش‌های دقیق‌تری بر روی آنها انجام گیرند. محققین، باکتری‌های رنگدانه‌دار زیادی را در سراسر جهان شناسایی کرده‌اند که تنها برخی از آنها مجوز تولید و استفاده در صنایع مختلف را کسب کرده‌اند. بنابراین با استفاده از روش‌های مختلف می‌توان از فواید و مزایای میکروارگانیسم‌های موجود در طبیعت از جمله گیاهان، قارچ‌ها، جلبک‌ها و باکتری‌ها به عنوان یک منبع رنگی طبیعی و در دسترس بهره مند شد. اما پرورش و انتخاب گونه‌های پر بازده به احتمال زیاد تنها منجر

www.SID.ir

Archive of SID

به پیشرفت‌های جزئی خواهد شد. گام بعدی در پیشرفت‌های دستکاری ژنتیک و تخمیر به دست آورد.
عمده برای تولید رنگدانه‌های طبیعی را می‌توان با ترکیب

REFERENCES

1. Aberoumand A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. World J Dairy Food Sci 2011;6:71-8.

2. Asker D, Awad T, Ohta Y. Lipids of *Haloferax alexandrines* strain TM: an extremly *Halophilic canthaxanthin* producing archaeon. Biosci and Bioengin 2001;93:37-43.

3. D'Amico S, Collins T, Marx JC, Feller G, Gerday C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. EMBO Rep 2006 ;7:385-89.

4. Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing and stability. Crit Rev Food Sci Nutr 2000;40:173-289.

5. Dufossé L. Microbial Production of Food Grade Pigments. Food Technol. Biotechnol 2006;44:313-21.

6. Ingraham JL, stokes JL. Psychrophilic Bacteria 1959; 12: 167.

7. Joshi VK, Attri D, Bala A, Bhushan S. Microbial pigment. Indian J Biotechnol 2003;2:362-9.

8. Maheswarappa G, Kavitha D, Vijayarani K, Kumanan K. Prodigiosin as anticancer drug Produced from bacteria of termite gut. Indian Journal of Basic and Applied Medical Research 2013;1: 257-66.

9. Malik K, Tokkas J, Goyal S. Microbial Pigments: A review. International Journal of Microbial Resource Technology 2012;1: 2238-78.

10. McLimans W. Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture. Academic Press 1972;1:119-28.

11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Meth 1983;65:55-63.

12. Sharma D. Understanding Biocolour-A Review. International journal of scientific & technology research 2014;3: 2277-86.

13. Venil CK, Zakaria ZA, Ahmad WA. Bacterial pigments and their applications. Process Biochemistry 2013; 1065-79.

14. Ivanova EP, Zhukova NV, Gorshkova NM, Chaikina EL. Characterization of Aeromonas and Vibrio species isolated from a drinking water reservoir. J Appl Microbiol 2001;90:919-27.

15. Koneman E, Allen S, Janda W, Winn W, Procop G, Scheekenberger P, et al. Atlas and textbook of diagnostic microbiology.6th ed. Philadelphia: Lippincott; 2006. P.417.

16. Burke V, Robinson J, Gracey M, Peterson D, Partridge K. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. Appl Environ Microbiol 1984;48:361-6.

17. Kumar A, Vishwakarma HS, Singh J, Dwivedi S, Kumar M. Microbial pigments: production and their applications in various industries. International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences 2015;2: 2249-9504.

18. Lu Y, Wang L, Xue Y, Zhang C, Xing XH, Lou K, et al. Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. Biochemical Engineering Journal 2009;1:135-141.

www.SID.ir