Archive of SID

Nova Biologica Reperta 6(1): 61-69 (2019)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۱، صفحات ۶۱ الی ۶۹ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.61]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 14:46 IRDT on Monday June 8th 2020

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های تولیدکنندهٔ کاروتنوئید

راضیه سادات سلوکی‌نژاد[۱]، حانیه اسعدی[۲]، یاسر اسحاقی میلاسی[۳] و سجاد یزدان ستاد[۴]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران؛ [۲] گروه میکروب‌شناسی و انگل‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران؛ [۳] مرکز تحقیقات بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۴] گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول: سجاد یزدان ستاد، s.yazdansetad@goums.ac.ir

چکیده. تولید رنگدانه از باکتری‌ها به علت مقرون به صرفه بودن، محصول بیشتر و استخراج آسان‌تر نسبت به سایر منابع از اهمیت خاصی برخوردار است. کاروتنوئیدها، از مهمترین رنگدانه‌ها با خواص آنتی‌اکسیدانی، پیش‌ساز ویتامین A، افزایش‌دهنده تولید آنتی‌بادی، ضد تومور و پیشگیری کننده از بیماری‌های قلبی-عروقی هستند. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های تولیدکنندهٔ رنگدانه کاروتنوئیدی و آنالیز آن با روش HPLC بود. تعداد ۲۰ نمونه خاک از مناطق مختلف شهر تهران جمع‌آوری شد. پس از رقت‌سازی، نمونه‌ها بر روی محیط BHI آگار کشت و در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد گرماگذاری شد. باکتری‌های تولیدکننده رنگدانه برای شناسایی بیشتر انتخاب و استخراج رنگدانهٔ آنها به وسیلهٔ متانول انجام شد. غربالگری باکتری‌های تولیدکنندهٔ رنگدانه در دو سطح انجام گرفت: انتخاب سویه‌ها با استفاده از رنگ قابل مشاهده؛ آنالیز عصاره‌ها با طیف سنجی UV-VIS و تأیید توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC). ابتدا، جدایه‌ها با استفاده از روش‌های فنوتیپی شناسایی شد و ژن 16S rDNA آنها با روش PCR تکثیر و تعیین توالی شد. *Staphylococcus epidermidis*، *Micrococcus aloeverae*، *Citricoccus alkalitolerans*، *Rhodococcus zopfii*، *Arthrobacter agilis*، *Dietzia natronolimnaea* و *Rhodococcus ruber* به‌عنوان سویه‌های تولیدکنندهٔ کاروتنوئید شناسایی شدند. بالاترین میزان جذب با استفاده از آنالیز طیف‌سنجی UV-VIS در *Staphylococcus epidermidis* و *Dietzia natronolimnaea* مشاهده شد. آنالیز HPLC نشان داد که کاروتنوئیدهای تولید شده در مقایسه با منحنی بتا-کاروتن استاندارد، متعلق به بتاکاروتن هستند. میکروارگانیسم‌ها منبع بالقوه‌ای برای تولید کارتنوئیدها هستند. در این مطالعه، ما دو جنس باکتری (*Staphylococcus epidermidis* و *Dietzia natronolimnaea*) با توانایی بالای تولید کارتنوئید معرفی کردیم.

واژه‌های کلیدی. بتاکاروتن، رنگدانه، کاروتنوئید، کروماتوگرافی، طیف سنجی

Isolation and molecular identification of carotenoid-producing bacteria

Razieh Sadat Solouki Nezhad[1], Hanieh Asaadi[2], Yaser Eshaghi Milasi[3], Sajjad Yazdansetad[4]

[1]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran; [2]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran; [3]Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran; [4]Department of Microbiology, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
Correspondent author: Sajjad Yazdansetad, s.yazdansetad@goums.ac.ir

Abstract. The production of pigments from bacteria is significant due to the low cost, high yield and ease of extract compared with other sources. Carotenoids are one of the most important pigments with antioxidant properties which are the precursor of vitamin A synthesis and have antibody overproduction ability, anti-tumor activity and inhibitory effect on the cardiovascular disease. The present study aimed to isolate and identify carotenoid-producing bacteria by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of their carotenoid pigments. Twenty soil samples were collected from different regions of Tehran. After serial dilution each sample was cultured on BHI agar medium and incubated at 37°C. The pigment-producing bacteria were selected for further identification and their pigments were extracted by

Received 17.07.2017/ Revised 02.09.2017/ Accepted 15.09.2018/ Published 01.05.2019 دریافت ۱۳۹۶/۰۴/۲۶/ ویرایش ۱۳۹۷/۰۶/۱۱/ پذیرش ۱۳۹۷/۰۶/۲۴/ انتشار ۱۳۹۸/۰۲/۱۱

www.SID.ir

Archive of SID

methanol. The screening was carried out at two levels: i) selection of the strains by visual color inspection, ii) analysis of the pigment extracts by UV-VIS spectroscopy and HPLC. The isolates were identified by phenotypic methods and their 16S rDNA gene was amplified by PCR method and sequenced. *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus aloeverae*, *Citricoccus alkalitolerans*, *Rhodococcus zopfii*, *Arthrobacter agilis*, *Dietzia natronolimnaea* and *Rhodococcus ruber* were identified as carotenoid-producing strains. The highest rate of absorption was observed using UV-VIS analysis in *Staphylococcus epidermidis* and *Dietzia natronolimnaea*. The comparison of HPLC analysis with the standard β-carotene curve showed that the carotenoids were beta-carotene. Micro-organisms are a potential source in the production of pigments. In this study we introduced two genera of bacteria (*Staphylococcus epidermidis* and *Dietzia natronolimnaea*) with carotenoid-producing ability.

Keywords. β-carotene, carotenoids, chromatography, pigment, spectrophotometry

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.61]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 14:46 IRDT on Monday June 8th 2020

مقدمه

بسیاری از رنگ‌های سنتتیک که امروزه در صنایع مختلف غذایی، دارویی و غیره به کار می‌روند دارای اثرات مضر متعددی هستند. نتایج حاصل از تحقیقات نشان می‌دهد که رنگ‌های سنتتیک فاقد ارزش غذایی بوده و علاوه بر آن عامل ایجاد کننده اختلالاتی از قبیل فشارخون، سرطان‌زایی، تومورهای بدخیم، واکنش‌های آنافیلاکسی و آلرژی هستند. از این‌رو با توجه به مشکلات ناشی از مصرف رنگ‌های مصنوعی، جستجو برای یافتن پیگمان طبیعی مناسب، به عنوان رنگ‌های افزودنی آغاز شد (Rymbai *et al.*, 2011; Seifzadeh *et al.*, 2016). رنگدانه‌های آلی طبیعی به طور کلی از میوه‌ها، سبزیجات، دانه‌ها، ریشه‌ها و میکروارگانیسم‌ها استخراج می‌شوند و گاهی اوقات به علت منشاء زیستی آنها، رنگ‌های زیستی نامیده می‌شوند (Parmar & Phutela, 2015). این رنگدانه‌ها اثرات سوء ذکر شده برای رنگ‌های مصنوعی را نداشته و در تحقیقات مختلف تأثیر مفید آنها بر سلامت عمومی به دفعات مورد تأیید قرار گرفته است. مطالعات اخیر نشان داده است که برخی از این رنگدانه‌ها دارای عملکردهای بیولوژیکی مهم از قبیل فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی، ضدقارچی، ضدتوموری و پیشگیری از بیماری‌های قلبی‌عروقی بوده و بسیاری از آنها دارای اثرات شیمی‌درمانی بالقوه‌ای هستند (Astuti *et al.*, 2016). علاوه براین، متابولیت‌های رنگی کاربردهای متنوعی در صنایع داروسازی، لبنی، شیلات، چاپ و نساجی دارند (Samyuktha & Mahajan, 2016). رنگدانه‌های میکروبی یک جایگزین امیدوارکننده برای سایر رنگ‌های افزودنی هستند که از سبزیجات یا حیوانات استخراج می‌شوند. دلیل اصلی علاقه به استفاده از میکروارگانیسم‌ها در تولید رنگدانه، تکثیر و تولید بالا با استفاده از دستکاری‌های زیستی و ژنتیکی است. بعلاوه، تولید رنگ‌های طبیعی از طریق تخمیر میکروبی دارای مزایای زیادی از قبیل تولید ارزان‌تر، بازدهی بالاتر، استخراج آسان‌تر، تغییرات فصلی کمتر و سهولت در کنترل تولید است (Sinha *et al.*, 2017; Naziri *et al.*, 2014). در میان رنگدانه‌ها، کاروتنوئیدها به علت انتشار گسترده، تنوع ساختاری و نقش‌های متعدد یکی از مهمترین گروه‌های رنگدانه‌ای هستند (Asker *et al.*, 2007). کاروتنوئیدها رنگدانه‌های تتراترپنوئیدی و محلول در چربی‌اند که به صورت طبیعی در کلروپلاست و کروموپلاست‌های گیاهان و بعضی از میکروارگانیسم‌ها مثل جلبک‌ها و بعضی از گونه‌های قارچی و باکتریایی یافت می‌شوند (Paniagua-Michel *et al.*, 2012). گزارش‌های مختلفی از باکتری‌های تولیدکننده کاروتنوئید از جمله *Exiguobacterium* sp. (Balraj *et al.*, 2014)، *Halorubrum* sp. (Naziri *et al.*, 2014)، *Serratia marcescens*، *Streptomyces coelicolor* و *Chromobacterium violaceum* (Ahmad *et al.*, 2012) وجود دارد. این مطالعه، با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولید کنندهٔ کاروتنوئید از خاک و آنالیز رنگدانه تولید شده با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

تعداد ۲۰ نمونهٔ خاک به مدت یک ماه از اردیبهشت تا خرداد سال ۱۳۹۵ از مناطق مختلف شهر تهران (شامل پارک‌ها و فضای سبز و پارک‌های جنگلی) جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری از عمق ۱۰ سانتیمتری خاک انجام و در کیسه‌های پلاستیکی استریل ریخته شد. رقت های 10^{-1} تا 10^{-9} از نمونه‌های خاک تهیه گردید و از هر رقت در محیط آگار عصارهٔ مغز و قلب (Brain Heart Infusion Agar) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شد.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولید کننده رنگدانه

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.61]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 14:46 IRDT on Monday June 8th 2020

باکتری‌های تولید کنندهٔ رنگدانه ابتدا از نظر مورفولوژی و روش بیوشیمیایی بررسی شده و سپس با روش مولکولی تکثیر و توالی-یابی ژن 16S rDNA، تعیین هویت شدند. بطور خلاصه، کلنی-های رنگی ظاهر شده روی محیط BHI آگار جهت بررسی بیشتر روی نوترینت آگار کشت مجدد داده شد. سویه‌های خالص شده از نظر مشخصات کلنی مانند اندازه، شکل، رنگ و بو مورد بررسی قرار گرفتند. سپس جهت شناسایی باکتری‌ها رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی از جمله تست اندول، حرکت، متیل رد، وگس پرسکائر، سیمون سیترات، تست اکسیداز، تست کاتالاز و تست تخمیر قندها انجام شد. جهت استخراج DNA ژنومی، ابتدا باکتری‌ها در محیط BHI Broth تلقیح و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. DNA ژنومی باکتری‌ها با استفاده از کیت Expin Combo GP (GeneAll, Korea) و طبق پروتکل شرکت سازنده استخراج شد.

پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه شامل پرایمرهای یونیورسال 16S rDNA باکتریایی (forward 5′-AGAGTTTCCTGGCTCAG-3′) و (reverse 5′-ACGGCTACCTTGTTACGATT-3′) بودند (Lane, 1991). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر ریورس و فوروارد، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، یک واحد آنزیم *Taq* DNA پلیمراز انجام شد. واکنش PCR در دستگاه اپندرف آلمان (Mastercycler® nexus; Eppendorf, Germany) در شرایط دمایی واسرشت سازی اولیه در ۹۶ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت-شدن در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه انجام شد. محصول PCR به جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. توالی‌های تعیین شده توسط نرم افزار Chromas بررسی و به صورت آنلاین در پایگاه اطلاعاتی NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)، هم‌ردیف-سازی و توالی‌های هومولوگ و درصد همسانی آنها مطالعه شد.

جداسازی رنگدانه

باکتری‌های تولید کننده رنگدانه در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شد و در انکوباتور شیکردار به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بعد از ۷۲ ساعت سلول‌ها در g× ۷۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب با کمک آب مقطر استریل، دو بار شستشو داده شد و هر بار به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت رنگدانه با استفاده از متانول خالص استخراج گردید. به این ترتیب که به ازای هر گرم توده سلولی ۵ میلی‌لیتر متانول به رسوب اضافه شد. سپس، در بن‌ماری در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه تا استخراج تمامی رنگدانه‌های موجود، گرماگذاری گردید و نهایتاً در g× ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن مایع رنگی رویی جدا و با کمک کاغذ صافی فیلتر گردید. عصاره رنگی توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۵۰ تا ۷۰۰ نانومتر بررسی گردید (Arulselvi *et al.*, 2013).

آنالیز رنگدانه با HPLC

رنگدانه‌های جدا شده از باکتری‌ها با استفاده از دستگاه HPLC مدل D-14163 ساخت کمپانی KNAUER آلمان، طرح ایزوکراتیک با ستون C_{18} به طول ۶۵ سانتی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر در طول موج ۲۸۵ نانومتر و سرعت جریان ۱ mL/min آنالیز گردید. مرحله متحرک با محلول استونیتریل–متانول به نسبت ۹۰:۱۰ انجام شد. از هر نمونه، مقدار ۱ میکرولیتر با سرنگ همیلتون به دستگاه تزریق شد. طیف جذب تمام پیک‌های مربوطه با کمک آشکارساز به صورت عکس دیجیتال ثبت گردید.

نتایج

شناسایی جدایه‌های باکتریایی

باکتری‌های تولیدکنندهٔ رنگدانه ابتدا با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی، میکروبیولوژیکی، بیوشیمیایی و بر اساس رنگدانه‌ای که تولید کردند، در ۷ گروه مختلف تقسیم‌بندی شدند. تکثیر قطعهٔ ژنی 16S rDNA و الکتروفورز آن، سایز مورد انتظار در حدود ۱۵۰۰ جفت‌باز را نشان داد. شناسایی مولکولی جدایه‌ها با تعیین توالی قطعهٔ ژنی 16S rDNA انجام گرفت (شکل ۱).

آنالیز اسپکتروفتومتری

باکتری‌های *Staphylococcus epidermidis* و *Rhodococcus ruber* و *Dietzia natronolimnaea* رنگدانه نارنجی، *Micrococcus aloeverae* و *Citricoccus alkalitolerans*

www.SID.ir

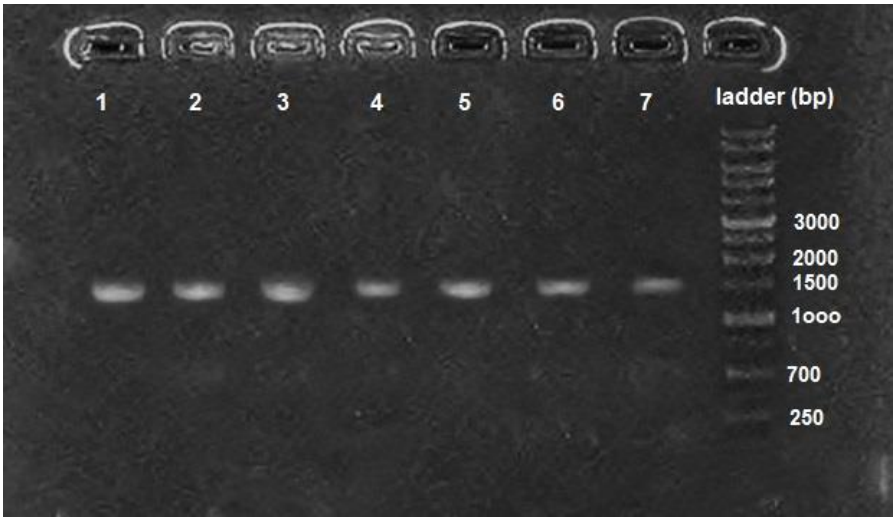
Archive of SID

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.61]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 14:46 IRDT on Monday June 8th 2020

رنگدانه زرد، *Arthrobacter agilis* رنگدانه قرمز و *R. zopfii* رنگدانه صورتی تولید کردند (شکل۲). آنالیز جذب نوری پیگمان با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS نشان داد که میزان جذب نوری پیگمان استخراجی جدایه‌ها در طول موج‌های ۷۰۰-۳۵۰ نانومتر بود که بیشترین میزان جذب در جدایه‌های *S. epidermidis* در طول موج ۴۴۲ نانومتر (۱/۰۹) و *D. natronolimnaea* در ۴۵۰ نانومتر (۱/۸۷۲) مشاهده شد (شکل ۳).

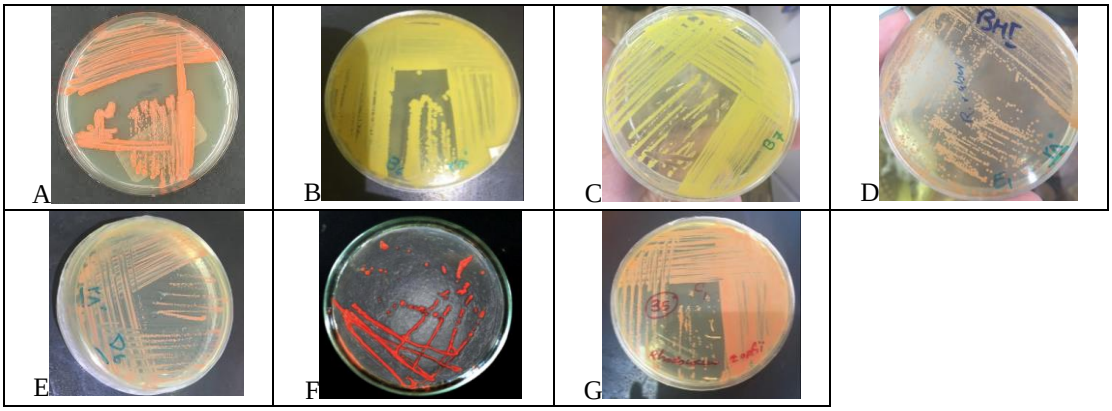
آنالیز HPLC

آنالیز رنگدانه‌های جدایه‌های باکتریایی با استفاده از روش HPLC نشان داد که رنگدانه تولید شده توسط *S. epidermidis* و *D. natronolimnaea* بتاکاروتن بود. در منحنی مربوط به *S. epidermidis*، ۸ پیک مشاهده شد که بیشترین میزان تولید بتاکاروتن در زمان بازداری (Ret time) ۶/۴۸۶ بود. همچنین در منحنی *D. natronolimnaea* دو پیک مشاهده گردید که در Ret time ۶/۳۴۲ دارای بیشترین میزان تولید بتاکاروتن بود که با



شکل ۱- تکثیر قطعهٔ 16S rDNA جدایه‌های باکتریایی. **۱.** استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس. **۲.** میکروکوکوس آلوئورا. **۳.** سیتریکوکوس آلکالیتولرانس. **٤.** رودوکوکوس زوفتی. **۵.** آرتروباکتر اجیلیس. **٦.** دیتزیا ناترونولیمنا. **۷.** رودوکوکوس روبر.

Fig. 1. Amplification of 16S rDNA fragment of bacterial isolates. **1.** *S. epidermidis*. **2.** *M. aloeverae*. **3.** *C. alkalitolerans*. **4.** *R. zopfii*. **5.** *A. agilis*. **6.** *D. natronolimnaea*. **7.** *R. ruber*.



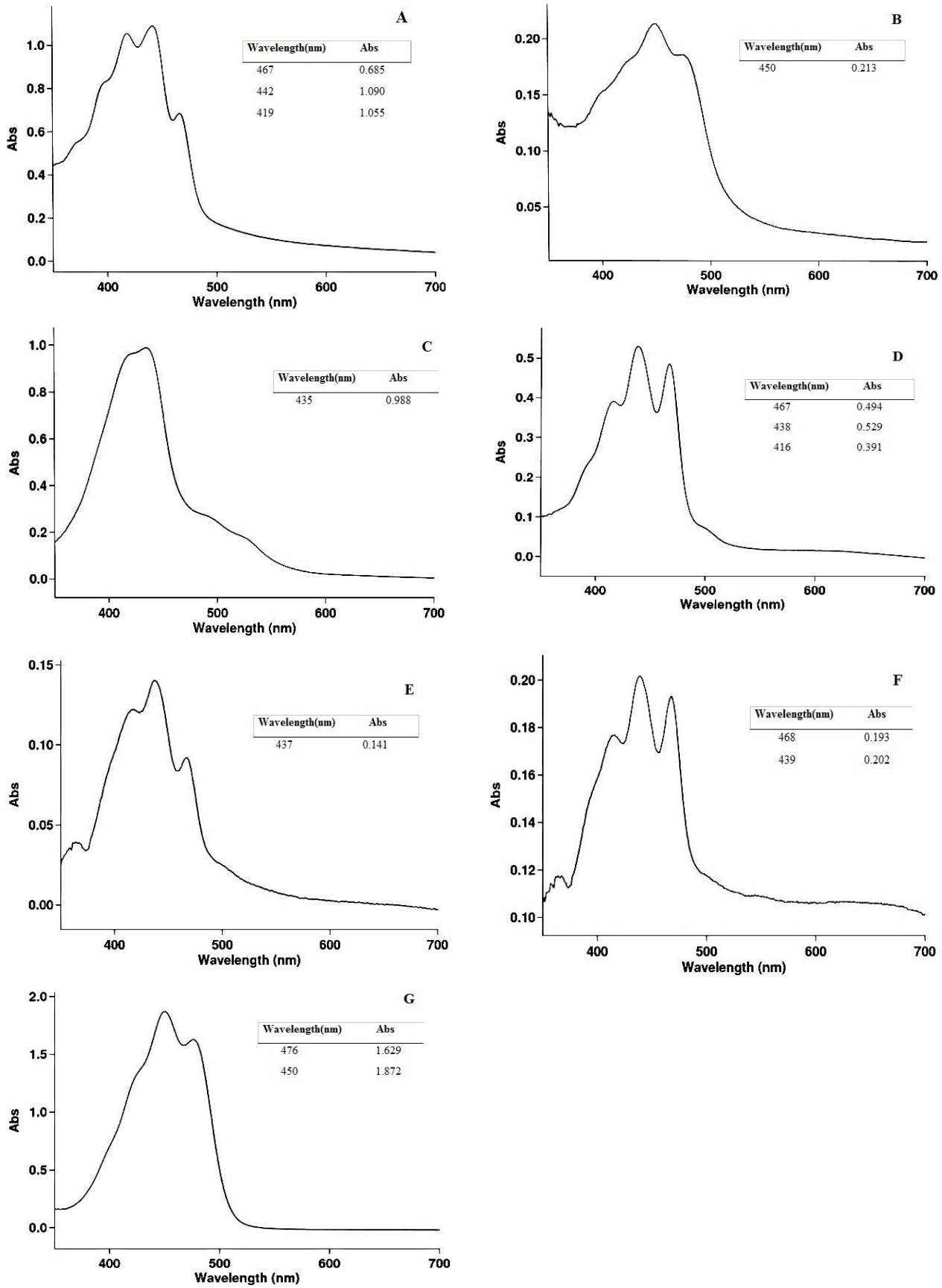
شکل ۲- کلنی‌های باکتری‌های تولیدکننده رنگدانه روی محیط Brain heart infusion (BHI). **A.** استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس. **B.** میکروکوکوس آلوئورا. **C.** سیتریکوکوس آلکالیتولرانس. **D.** رودوکوکوس روبر. **E.** دیتزیا ناترونولیمنا. **F.** آرتروباکتر اجیلیس، **G.** رودوکوکوس زوفتی.

Fig. 2. The colonies of pigment-producing bacteria on BHI agar. **A.** *S. epidermidis*. **B.** *M. aloeverae*. **C.** *C. alkalitolerans*. **D.** *R. ruber*. **E.** *D. natronolimnaea*. **F.** *A. agilis*. **G.** *R. zopfii*.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.61]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 14:46 IRDT on Monday June 8th 2020



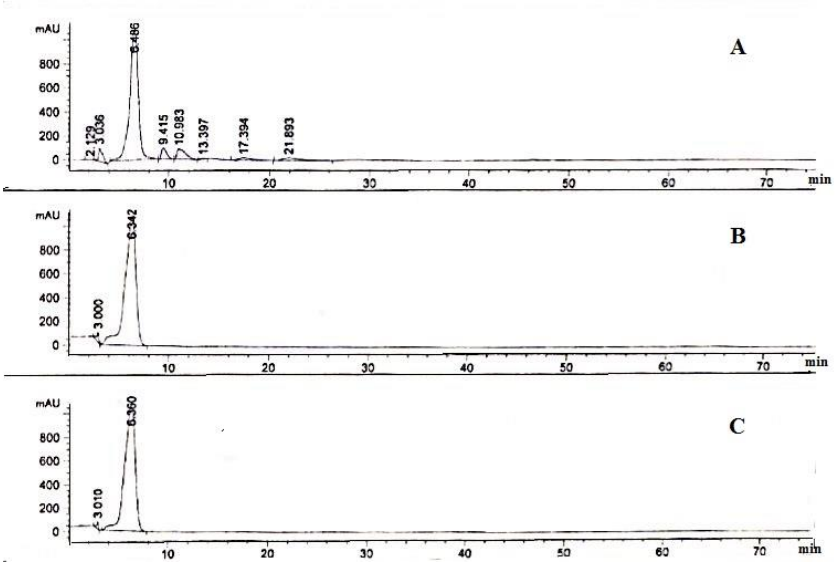
شکل ۳- آنالیز طیف سنجی UV-VIS. **A.** استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس. **B.** آرتروباکتر اجیلیس. **C.** رودوکوکوس زوفتی. **D.** رودوکوکوس روبر. **E.** میکروکوکوس آلوئورا. **F.** سیتریکوکوس آلکالیتولرانس. **G.** دیتزیا ناترونولیمنا.

Fig. 3. UV-VIS spectroscopy analysis. **A.** *S. epidermidis*. **B.** *A. agilis*. **C.** *R. zopfii*. **D.** *R. ruber*. **E.** *M. aloeverae*. **F.** *C. alkalitolerans*. **G.** *D. natronolimnaea*.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.61]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 14:46 IRDT on Monday June 8th 2020



شکل ٤- دیاگرام آنالیز پیگمان بتا کاروتن در دو باکتری *S. epidermidis* و *D. natronolimnaea* در مقایسه با بتاکاروتن استاندارد با HPLC. **A**. *S. epidermidis* .**B** . *D. natronolimnaea* .**C** standard beta-carotene.

Fig.4. Beta-carotene pigment analysis in the two bacteria *S. epidermidis* and *D. natronolimnaea* compared with standard beta-carotene by HPLC method. **A.** *S. epidermidis*. **B.** *D. natronolimnaea*. **C:** standard beta-carotene.

جدول ١- نتایج آنالیز پیگمان بتاکاروتن با روش HPLC در دو باکتری *S. epidermidis* و *D. natronolimnaea* و مقایسه آن با نمونه استاندارد بتاکاروتن.

Table 1. The results of the analysis of beta-carotene pigment by HPLC method in two strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Dietzia natronolimnaea* and comparison with the standard beta-carotene sample.

Signal 1: *Staphylococcus epidermidis*, Sig:485

Peak #	Ret Time (min)	Type	Width (min)	Area (mAU*S)	Height (mAU)	Area %
1	2.129	BB	0.3004	38.90742	1.70379	0.0477
2	3.036	BB	0.3582	3062.71753	110.91557	3.7514
3	6.486	BB	0.9121	6.51254e4	1091.43066	79.7698
4	9.415	BB	0.5694	3294.02783	92.06458	4.0347
5	10.983	BB	0.8241	5251.63623	86.03801	6.4325
6	13.397	BB	0.4627	246.31612	6.70303	0.3017
7	17.394	BB	1.2017	1883.46155	19.69509	2.3070
8	21.893	BB	1.3765	2739.23340	23.45526	3.3552
Total:				8.16417e4	1432.00599	

Signal 2: *Dietzia natronolimnaea*, Sig:485

Peak #	Ret Time (min)	Type	Width (min)	Area (mAU*S)	Height (mAU)	Area %
1	3.000	BB	0.1868	198.56511	14.59161	1.3368
2	6.342	BB	1.0815	1.46556e4	195.28575	98.6633
Total:				1.48541e4	209.87736	

Signal 3: standard sample(betacarotene), Sig:485

Peak #	Ret Time (min)	Type	Width (min)	Area (mAU*S)	Height (mAU)	Area %
1	3.010	BB	0.1628	81.39305	7.15234	0.8653
2	6.360	BB	1.0553	9324.85156	128.09224	99.1347
Total:				9406.24461	135.24458	

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.61]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 14:46 IRDT on Monday June 8th 2020

Ret time بتاکاروتن استاندارد (۶/۳۶۰) در شرایط یکسان آزمایش در یک محدوده بودند (شکل ۴). جدول ۱ نتایج آنالیز پیگمان بتاکاروتن با روش HPLC در دو سویه *S. epidermidis* و *D. natronolimnaea* و مقایسه آن با نمونه استاندارد بتاکاروتن به عنوان شاخص کاروتنوئیدی را نشان می‌دهد.

بحث

احتمالاً اهمیت و فراوانی کاروتنوئیدها در طبیعت به علت مسیر نسبتاً ساده بیوسنتز آنها است که این امر در گیاهان عالی و جلبک‌ها ثابت شده است و در باکتری‌ها و مخمرها هم دیده می‌شود. میکروارگانیسم‌های تولیدکننده کاروتنوئید از منابع محیطی مختلف از قبیل دماهای بسیار پایین، شوری بالا، نور قوی، شرایط اسیدی و قلیایی جدا شده است (Asker *et al.*, 2012). در مطالعهٔ حاضر ۷ گونهٔ مختلف باکتری‌های تولیدکننده کاروتنوئید ازخاک جداسازی و با استفاده از آنالیز 16S rDNA شناسایی شدند. این باکتری‌ها شامل *S. epidermidis*، *M. aloeverae*، *C. alkalitolerans*، *R. zopfii*، *R. ruber* و *D. natronolimnaea* بودند که رنگدانهٔ شاخص با استفاده از روش طیف‌سنجی و HPLC، بتاکاروتن معرفی شد. در مطالعه Ibrahim (2008) ۷۵ سویه باکتریایی از نمونه‌های رسوب دریا جداسازی شد که از بین این ۷۵ نمونه ۴ سویه تولیدکنندهٔ کاروتنوئید بودند. آنالیز 16S rDNA نشان داد که این سویه‌ها *Halomonas aquimaris*، *Bacillus* sp. و *Micrococcus luteus* هستند. کاروتنوئیدهای اصلی در *Micrococcus* sp. شناسایی و به وسیله LC/MS و طیف سنجی UV بررسی گردید. آنالیز این رنگدانه نشان داد که این کاروتنوئیدها از خانواده دکاپروگزانتین شامل دکاپروگزانتین دی‌گلوکساید، دکاپروگزانتین مونوگلوکساید و دکاپروتانتین است و بیشترین جذب آنها به ترتیب در طول موج‌های ۴۱۸، ۴۴۰ و ۴۷۰ نانومتر است. Dharmaraj و همکاران (2009) اکتینومیست‌های دریایی به نام *Mytilorum mycale* از سواحل جنوب غرب هند و با کمک محیط گلیسرول آسپارژین آگار (ISP-5) جداسازی نمودند. سویه‌های *استرپتومایسس* جداسازی شده از نظر خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بررسی شدند و جهت تأیید رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از روش HPLC، TLC و طیف سنجی UV استفاده شد. نتایج آنالیز طیف سنجی، بیشترین میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر را نشان داد. در بررسی HPLC، تنها یک پیک مشاهده شد که در مقایسه با نمونهٔ استاندارد، فیتوئن بود. مطالعهٔ مشابهی بر روی دو سویه *استرپتومایسس* جدا شده از رسوبات آب‌های دریایی و دو سویهٔ دیگر از آب‌های شیرین انجام شد و جهت شناسایی رنگدانه‌های این باکتری‌ها از روش‌های طیف سنجی UV و TLC و HPLC استفاده شد. نتایج نشان داد که در سویه‌های دریایی رنگدانه‌های آلفاکاروتن، بتاکاروتن و فیتوئن و در سویه‌های آب‌های شیرین رنگدانه‌های بتاکاروتن، فیتوئن، فیتوفلوئن وجود دارد که از بین این رنگدانه‌ها، فیتوئن دارای بیشترین میزان جذب بود (Baskar *et al.*, 2010). Naziri و همکاران (2014) به بررسی تولید کاروتنوئیدها توسط ایزوله‌های باکتریایی جدا شده از دریاچه ارومیه پرداختند. کاروتنوئیدهای تولید شده توسط باکتری *Halorubrim chaviater* با استفاده از حلال استون/متانول استخراج گردید. پس از غربالگری اولیه کاروتنوئیدها، با استفاده از روش‌های طیف سنجی UV-VIS و LC-MS و TLC مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی، سه نوع کاروتنوئید باکتریوروبرین، لیکوپن و بتاکاروتن شناسایی شد. بیشترین جذب در طول موج‌های ۴۶۶، ۴۹۵ و ۵۲۸ نانومتر برای باکتریوروبرین، ۴۴۸، ۴۷۴ و ۵۲۸ نانومتر برای لیکوپن و ۴۲۵، ۴۵۵ و ۴۸۲ نانومتر برای بتاکاروتن بود که با میزان عدد جذب بتاکاروتن در مطالعهٔ ما مطابقت داشت. Arulselvi و همکاران (2013) باکتری‌های تولیدکننده پیگمان نارنجی را از خاک جداسازی نمودند. آنالیز این رنگدانه‌ها با کمک HPLC مشخص کرد که تعداد چهار جدایهٔ باکتری، تولید کنندهٔ آستاگزانتین بودند. مطالعهٔ بیوشیمیایی و بررسی ژن 16S rDNA این چهار جدایهٔ باکتری نشان داد که دو جدایهٔ *Exiguobacterium aurantiacum* و دو جدایهٔ *Exiguobacterium profundum* بودند. در تحقیق دیگر، Arulselvi و همکاران (2014) به جداسازی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده پیگمان‌های کاروتنوئیدی از منابع محیطی مختلف پرداختند. در آن مطالعه، ۴۱ نمونهٔ خاک از منابع مختلف جمع‌آوری گردید که دارای شرایط محیطی مختلف بودند. پیگمان این میکروارگانیسم‌ها با استفاده از متانول استخراج گردید و با استفاده از روش اسپکتروفتومتری حضور بتاکاروتن در باکتری‌های

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.61]
Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 14:46 IRDT on Monday June 8th 2020

تولیدکنندهٔ کاروتنوئید بررسی گردید و مشخص شد که رنگدانه-های مورد بررسی دارای بیشترین جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر بودند. Goswami و Bhowal (2014) باکتری‌های تولید کنندهٔ پیگمان قرمز را از خاک جداسازی کردند. طبق بررسی‌های انجام شده با کمک روش‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و پارامترهای بیوشیمیایی مشخص شد که اغلب این جدایه‌ها متعلق به جنس *باسیلوس* بودند. رنگ قرمز این باکتری‌ها با کمک اتانول اسیدی استخراج گردید و سپس جذب آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتری UV-VIS مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین میزان جذب آنها بطور متوسط در ۷۴۰ نانومتر بود. امروزه، تولید رنگدانهٔ کاروتنوئید از منابع میکروبی دارای مزایای فراوانی است. سهولت شرایط تکثیر میکروارگانیسم‌ها و تولید انبوه این فرآورده با استفاده از دستکاری‌های زیستی و ژنتیکی میسر است. با بومی-گزینی سویه‌های باکتریایی تولید کنندهٔ کاروتنوئید و بهینه‌سازی شرایط تولید آن با روش‌هایی همچون تاگوچی، می‌توان در جهت صنعتی‌سازی این محصول باارزش گام برداشت.

سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Ahmad, W.A., Ahmad, W.Y.W., Zakaria, Z.A. and Yusof, N.Z. 2012. Isolation of pigment-producing bacteria and characterization of the extracted pigments. In: Application of bacterial pigments as colorant. – Springer, Berlin, Heidelberg 25-44.

Arulselvi, I., Sasidharan, P., Raja, R., Karthik, C. and Gurumayum, R.S. 2013. Isolation and characterization of yellow pigment producing *Exiguobacterium* sp. – J. Biochem. Technol. 4: 632-635.

Arulselvi, I.P., Umamaheswari, S., Sharma, R.G., Karthik, C. and Jayakrishna, C. 2014. Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate. – J. Food Process Technol. 5: 292.

Asker, D., Awad, T.S., Beppu, T. and Ueda, K. 2012. Isolation, characterization, and diversity of novel radiotolerant carotenoid-producing bacteria. In: J.-L. Barredo (ed). Microbial carotenoids from bacteria and microalgae: methods and protocols. –Humana Press, New York. pp: 21-60.

Asker, D., Beppu, T. and Ueda, K. 2007. Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Misasa, a radioactive site in Japan. – Appl. Microbiol. Biotechnol. 77: 383-392.

Astuti, W., Radjasa, O. K., Karwur, F.F. and Rondonuwu, F.S. 2016. Identification of Carotenoids in Halimeda macroloba Reef Associated Bacteria. – Indonesian J. Marine. Sci. Ilmu Kelautan 21: 151-160.

Balraj, J., Pannerselvam, K. and Jayaraman, A. 2014. Isolation of pigmented marine bacteria *Exiguobacterium* sp. from peninsular region of India and a study on biological activity of purified pigment. – Int. J. Sci. Technol. Res. 3: 375-384.

Baskar, V., Madhanraj, P., Kanimozhi, K. and Panneerselvam, A. 2010. Characterization of carotenoids from Streptomyces sp. of marine and fresh water environment.– Arch. Appl. Sci. Res. 2: 380-388.

Dharmaraj, S., Ashokkumar, B. and Dhevendaran, K. 2009. Fermentative production of carotenoids from marine actinomycetes. – Iranian J. Microbiol. 1: 36-41.

Goswami, B. and Bhowal, J. 2014. Identification and characterization of extracellular red pigment producing bacteria isolated from soil. – Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3: 169-176.

Ibrahim, A.S.S. 2008. Production of carotenoids by a newly isolated marine *Micrococcus* sp. – Biotechnol. 7: 469-474.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. Eds. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, 115-147.

Naziri, D., Hamidi, M., Hassanzadeh, S., Tarhriz, V., Zanjani, B.M., Nazemyieh, H., Hejazi, M.A. and Hejazi, M.S. 2014. Analysis of carotenoid production by Halorubrum sp. TBZ126; an extremely halophilic archeon from Urmia Lake. – Adv. Pharm. Bull. 4: 61-67

Paniagua-Michel, J., Olmos-Soto, J. and Ruiz, M.A. 2012. Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae. – Methods Mol. Biol. 892: 1-12.

www.SID.ir

Archive of SID

Parmar, M. and Phutela, U.G. 2015. Biocolors: the new generation additives. – Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 4: 688-694.

Rymbai, H., Sharma, R. and Srivastav, M. 2011. Biocolorants and its implications in Health and Food Industry-A Review. – Int. J. Pharm. Tech. Res. 3: 2228-2244.

Samyuktha, S. and Mahajan, S.N. 2016. Isolation and identification of pigment producing bacteria and characterization of extracted pigments. – Int. J. App. Res. 2: 657-664.

Seifzadeh, M., Khanipour, A. and Morady, Y. 2016. The evaluation of the quality of beta-carotene derived from Azolla Filiculoides in the Anzali Wetland using the alkaline hydrolysis method in summer. – Iran. Sci. Fisheries J. 25: 75-86.

Sinha, S., Choubey, S., Ajay Kumar, A. and Bhosale, P. 2017. Identification, characterization of pigment producing bacteria from soil and water and testing of antimicrobial activity of bacterial pigments. – Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 42: 119-124.

*****

How to cite this article:

Solouki Nezhad, R.S., Asaadi, H., Eshaghi Milasi, Y. and Yazdansetad, S. 2019. Isolation and molecular identification of carotenoid-producing bacteria. – Nova Biol. Reperta 6: 61-69.

سلوکی‌نژاد، ر.س.، اسعدی، ح.، اسحاقی میلاسی، ی. و یزدان ستاد، س. ۱۳۹۸. جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های تولیدکنندهٔ کاروتنوئید. – یافته-های نوین در علوم زیستی۶: ۶۹-۶۱.

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.61]

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 14:46 IRDT on Monday June 8th 2020

www.SID.ir