فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۸۲- ۶۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۱۴

بررسی اثر منابع کربن و نیتروژن بر تولید کاروتنوئیدها در سویهٔ بومی *آئورانتیوکیتریوم Ch25*

مهدیه اسمی‌زاده: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، mahdiyeesmizade@gmail.com
شهریار شاکری *,**: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، sh.shakeri@kgut.ac.ir
محمود ملکی** : استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، maleki.li@gmail.com

چکیده

مقدمه: میکروارگانیسم‌ها، کاروتنوئیدها را در پاسخ به استرس‌های محیطی تولید می‌کنند. کاروتنوئیدها کاربردهای زیادی در سلامتی انسان دارند که از جمله آن‌ها می‌توان به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، محافظت نوری و به‌عنوان پیش‌ساز هورمون‌ها اشاره کرد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش اثر منابع مختلف کربن و نیتروژن بر تولید کاروتنوئیدها در سویه بومی *آئورانتیوکیتریوم Ch25* بررسی شد. اثر منابع کربن و نیتروژن مختلف بر میزان رشد و تولید کاروتنوئیدها بررسی شد. سپس کاروتنوئیدها استخراج شدند و با روش TLC، اسپکتروفتومتری و HPLC آنالیز شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند که گلیسرول بهترین منبع کربن برای تولید محتوی زیاد کاروتنوئید است. محیط انتخاب شده شامل ۱/۵٪ v/v گلیسرول، ۱ g/l پپتون، ۱ g/l عصاره مخمر و ۵۰درصد آب دریا است. مقدار کل کاروتنوئید تولیدشده در این محیط برابر با (µg/g CDW) ۱۳۴/۸ محاسبه شد. آنالیز TLC نشان داد که عصاره کاروتنوئیدی حاوی بتاکاروتن، آستاگزانتین مونواستر، آستاگزانتین دی‌استر و آستاگزانتین آزاد است. نتایج حاصل از HPLC، حضور کاروتنوئیدهای آستاگزانتین، کانتاگزانتین، اکیننون و بتاکاروتن در عصاره کاروتنوئیدی را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: در این پژوهش، تولید کاروتنوئیدها در سویه بومی *آئورانتیوکیتریوم* بررسی شد و پروفایل کاروتنوئیدهای تولیدشده شامل آستاگزانتین، کانتاگزانتین، اکیننون و بتاکاروتن بودند.

واژه‌های کلیدی: کاروتنوئیدها، *آئورانتیوکیتریوم*، منابع کربن، منابع نیتروژن

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات
** پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

کاروتنوئیدها رنگدانه‌های چربی‌دوست با رنگ زرد یا قرمز هستند که به طور گسترده در طبیعت وجود دارند. این رنگدانه‌ها در همه موجودات زنده اعم از باکتری‌ها، مخمرها، جلبک‌ها، گیاهان و حیوانات عالی وجود دارند. این ترکیبات بیش از ۷۰۰ رنگدانه طبیعی را شامل می‌شوند و مسؤول تنوع گسترده‌ای از رنگ‌ها در طبیعت هستند. در میان همه رنگ های طبیعی، کاروتنوئیدها گسترده‌ترین و متنوع‌ترین عوامل رنگی به‌لحاظ ساختاری هستند (۱ و ۲). این رنگدانه‌های طبیعی دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدچاقی هستند؛ اثر آنابولیکی بر اجزای استخوان و پیش‌ساز هورمون‌ها دارند و باعث افزایش فعالیت پروویتامین A و حفاظت نوری می‌شوند(۱ و ۲). در حال حاضر، کاروتنوئیدها به صورت تجاری به عنوان مواد افزودنی خوراکی، مکمل‌های غذای دام، رنگ‌های طبیعی غذایی ، مکمل مغذی و اخیراً برای اهداف آرایشی- بهداشتی و دارویی استفاده شده‌اند. (۱ و ۳). آستاگزانتین (3,3′-dihidroxy-β,β-carotene-4,4′-dione) یک رنگدانه کاروتنوئیدی حاوی اکسیژن است که مسئول رنگ نارنجی-قرمز در میگوها، خرچنگ‌ها، ماهی سالمون، قزل‌آلا و همچنین در پرندگانی مانند فلامینگو و بلدرچین، است(۴ و ۵). آستاگزانتین به‌عنوان جاذب رادیکال‌های آزاد اکسیژن که DNA را تخریب و پروتئین‌ها را اکسید می کنند، عمل می کند (۴، ۶ و ۷). این ترکیب دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به ویتامین C و E است (۶، ۸ و ۹). این رنگدانه در حال حاضر از طریق سنتز شیمیایی و همچنین بیولوژیکی تولید می‌شود (۱۰). منبع تولیدکننده آن‌ها از نظر بیوتکنولوژی، ریزجلبک *هماتوکوکوس* است (۳). این ریزجلبک اتوتروف است و برای تولید آستاگزانتین نیاز به نور و دی اکسید کربن دارد. اخیراً با توجه به مشکلات استفاده از اتوتروف‌ها در تولید آستاگزانتین، به ریزجلبک‌های هتروتروف توجه شده است؛ ترائوستوکیتریدها از آن نوع هستند. ترائوستوکیتریدها، میکروارگانیسم های هتروتروف دریازی هستند که در کلاس لابیرینتولا[1] و از سلسله کرومیستا[2] طبقه‌بندی شده‌اند (۶ و ۱۱). از نظر رده‌بندی با جلبک‌های هتروکنت[3] در یک راستا قرار دارند و معمولاً در محیط های دریایی و دهانه رودها یافت می شوند. در محیط زیست دریایی به‌عنوان گندزی از مواد آلی تغذیه می کنند. در جنگل‌های حرا، این میکروارگانیسم‌ها وابسته به برگ‌های پوسیده حرا هستند و به‌طور فعال نقش مهمی را در تجزیه مواد آلی بازی می کنند (۱۱). توان جمع آوری و انباشتن مقدار زیادی از کاروتنوئیدها به ویژه آستاگزانتین و اکینون، در ترائوستوکیتریدها به خوبی شناخته شده است و به‌عنوان افزودنی غذا در آبزی‌پروری نیز استفاده می‌شوند (۴ و ۶). این سویه‌ها برای اولین بار در سال ۲۰۰۳ به‌عنوان تولیدکننده های جدید کاروتنوئیدها با پتانسیل بالای تولید معرفی شدند (۶). *شیزوکیتریوم لیماسینوم*[4] و *ترائوستوکیتریوم اورئوم*[5] حاوی رنگدانه های کاروتنوئیدی به‌ویژه آستاگزانتین هستند (۴). همچنین سویه *شیزوکیتریوم KH105* سطوح قابل توجهی از بتاکاروتن و زانتوفیل ها شامل کانتاگزانتین و آستاگزانتین را جمع آوری می کند که این گونه خاص از ترائوستوکیتریدها به عنوان یک منبع امیدبخش برای زانتوفیل‌ها با کاربرد در صنایع غذایی، مطرح شده است(۶). سویه *شیزوکیتریوم SB04* کلنی های به‌رنگ کرم کم‌رنگ تولید می کند که پس از چند روز انکوباسیون به نارنجی تبدیل می‌شود درحالی که سویهٔ

SB11 کلونی های کم‌رنگ، به‌رنگ نارنجی روشن تولید می کند که به‌دلیل حضور کاروتنوئیدها است. سویه *شیزوکیتریوم SB04* حاوی مونواسترهای آستاگزانتین، دی‌استرهای آستاگزانتین، آستاگزانتین آزاد است درحالی که سویه *SB11* دارای اکیننون، لوتئین، مونواسترهای آستاگزانتین و دی‌استرهای آستاگزانتین است (۱۱). به نظر می رسد مسیر بیوسنتز آستاگزانتین در ترائوستوکیتریدها مشابه باکتری‌های دریایی مانند آگروباکتریوم[۶] و آلکالیژنز[۷] باشد (۶). بیوسنتز آستاگزانتین از تبدیل پیش‌سازهای ایزوپرنوئید رایج فارنسیل پیروفسفات و ایزوپنتنیل پیروفسفات به جرانیل جرانیل پیروفسفات توسط GGPP سنتاز، شروع می شود. سپس دو مولکول GGPP به‌شکل فیتوئن متراکم می شوند که این کار با فیتوئن سنتاز کاتالیز می شود (۱۲). برای تشکیل فرم لیکوپن، توسط فیتوئن دساچوراز و گاما کاروتن دساچوراز ۴ پیوند دوگانه به فیتوئن عرضه می‌شود. لیکوپن به گاماکاروتن تبدیل می‌شود و سپس با فعالیت لیکوپن سیکلاز، بتاکاروتن از طریق تبدیل دو انتهای مارپیچی لیکوپن به حلقه های بتا، ساخته می شود (۱۳). پس از آن، دو گروه کتو به‌صورت متوالی توسط کتولاز بتاکاروتن برای تبدیل بتاکاروتن به اکیننون و سپس کانتاگزانتین، عرضه می‌شوند که درنهایت به‌طور متوالی برای تشکیل فرم آدونیروبین و آستاگزانتین از طریق فعالیت کاروتنوئید هیدروکسیلاز، هیدروکسیله می شوند (۶). هدف از این پژوهش، یافتن منابع کربن و نیتروژن مناسب جهت افزایش تولید کاروتنوئیدها در سویه *آئورانتیوکیتریوم Ch25* است. همچنین پروفایل کاروتنوئیدهای تولیدشده شامل آستاگزانتین، کانتاگزانتین، اکیننون و بتاکاروتن در این سویه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

فعال سازی و تلقیح سویه به محیط مایع: در این پژوهش از سویه بومی *آئورانتیوکیتریوم* (KP792759) استفاده شد. برای کشت مایع سویه جهت تولید کاروتنوئیدها، از سویه فعال استفاده شد. فعال‌سازی سویه *آئورانتیوکیتریوم* بر روی محیط GYP[۸] انجام گرفت. این محیط کشت حاوی، ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱ گرم بر لیتر پپتون، ۱ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۰/۳ گرم بر لیتر پنی سیلین، ۰/۳ گرم بر لیتر استرپتومایسین، ۲۰ گرم بر لیتر آگار و ۵۰درصد آب دریا است. به‌دلیل اینکه سویه مدنظر دریازی است، در محیط کشت آن از آب دریا استفاده شد. سویه در این محیط تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. سپس از این سلول‌های فعال برای تلقیح محیط کشت‌های جامد و مایع استفاده شد (۱۴).

بررسی رشد و تولید توده سلولی در منابع متفاوت کربن: به‌منظور بررسی اثر منابع کربن، به محیط های کشت آگاردار حاوی ۱ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۱ گرم بر لیتر پپتون، ۲۰ گرم بر لیتر آگار و ۵۰درصد آب دریا، منابع مختلف کربن شامل: ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱٪ v/v گلیسرول، ۱۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۱۰ گرم بر لیتر اسکیم میلک (شیر چربی گرفته‌شده[۹]) و توین ۸۰[۱۰] ۱٪ v/v اضافه شد. در این مرحله ۵ محیط کشت جامد و مایع با منابع متفاوت کربن ساخته شد که سویه در آن‌ها تلقیح داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در تاریکی انکوبه شد. در نهایت، نتایج رشد سویه روی محیط‌ها از نظر رشد کلنی‌ها و ازطریق اندازه‌گیری میزان رشد و تولید توده سلولی با یکدیگر مقایسه شد و بهترین منبع کربن جهت رشد سویه شناسایی شد.

بررسی رشد و تولید تودهٔ سلولی در منابع متفاوت نیتروژن: به‌منظور بررسی اثر منابع نیتروژن، به محیط کشت حاوی گلوکز، پپتون، آگار و آب دریا با غلظت‌های مشابه محیط کشت استفاده‌شده در بالا به‌ترتیب هرکدام از منابع نیتروژن که شامل عصاره مالت، اوره، کلرید آمونیوم، سدیم گلوتامات و عصاره مخمر هستند، به‌میزان ۱ گرم بر لیتر اضافه شد. سویه روی محیط‌های کشت جامد تلقیح‌داده‌شده و با شرایط دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و در تاریکی به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. رشد سویه روی محیط ها از نظر رشد کلنی ها و مقدار توده سلولی تولیدشده با هم مقایسه شد و بهترین منبع نیتروژن مشخص شد.

بررسی تأثیر کلرید آمونیوم بر رشد سویه: دو محیط کشت شامل ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۲ گرم بر لیتر کلرید آمونیوم، ۱ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲۰ گرم بر لیتر آگار و ۵۰درصد آب دریا و دیگری شامل ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۲ گرم بر لیتر کلرید آمونیوم، ۲۰ گرم بر لیتر آگار و ۵۰درصد آب دریا تهیه شدند. این دو محیط کشت، به منظور بررسی تأثیر کلرید آمونیوم در حضور و یا نبودِ عصاره مخمر بر رشد سویه تهیه شدند. بعد از تلقیح، محیط کشت‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در تاریکی انکوبه می شود. درنهایت، نتایج رشد سویه روی محیط ها با یکدیگر مقایسه شد و تأثیر کلرید آمونیوم و عصاره مخمر بر روی رشد سویه و تولید توده سلولی بررسی شد.

بررسی تأثیر منابع کربن و نیتروژن بر رشد سلولی و تولید کاروتنوئیدها: از بین منابع مختلف کربن و نیتروژن بهترین منبع انتخاب شد. برای مشخص‌شدن تأثیر این منابع بر تولید توده سلولی و کاروتنوئیدها، محیط کشت‌های مایع طراحی شدند. ۶ نوع محیط کشت ساخته شد که در جدول ۱ میزان و نوع ترکیبات نشان داده شده است. بعد از تلقیح سویه‌ها، ارلن‌ها در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور ۱۵۰ rpm و تحت تاریکی قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت رشد در تاریکی، نور فلورسنت با شدت ۲۰۰۰ لوکس اعمال شد. تابش نور فلورسنت به‌مدت ۶ روز (۱۴۴ ساعت) ادامه یافت تا سویه رشد کند و کاروتنوئید تولید کند. سپس توده سلولی برای بررسی وزن خشک سلولی و استخراج کاروتنوئید استفاده شد. نتایج حاصل سه تکرار از آزمایشات هستند (۱۴).

جدول ۱- محیط کشت‌های ترکیبی (برحسب g/l و v/v٪)

شماره محیط کشت	گلوکز	گلیسرول	سدیم گلوتامات	آمونیوم کلرید	عصاره مخمر	پپتون	آب دریا (SW)
۱	۱۵	---	---	---	۱	۱	٪۵۰
۲	۱۵	---	---	۱	۱	۱	٪۵۰
۳	۱۵	---	۱	---	۱	۱	٪۵۰
۴	---	٪۱/۵	---	---	۱	۱	٪۵۰
۵	---	٪۱/۵	---	۱	۱	۱	٪۵۰
۶	---	٪۱/۵	۱	---	۱	۱	٪۵۰

استخراج کاروتنوئیدها: محتویات ارلن به یک فالکن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و با دور ۴۵۰۰ rpm سانتریفیوژ می شود. توده سلولی در ته فالکن تجمع می یابد و سوپرناتانت حذف می‌شود. توده سلولی به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده می شود تا وزن خشک سلولی به دست آید. سپس ۷ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه می‌شود و به مدت ۲۰ ثانیه با دور ۶۰ rpm ورتکس می شود. در این مرحله فالکن به‌مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شده و سپس برای تخریب سلولی، به مدت ۸ دقیقه با شدت ۲۴ KHz التراسونیک انجام گرفت. سوسپانسیون حاصل، به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۴۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت حذف شد. حلال کلروفرم (Chl) و متانول (Me) با نسبت ۳(Chl):۱(Me) به حجم ۲ میلی‌لیتر اضافه شد و توده سلولی توسط مگنت و دستگاه همزن با دور ۷۵۰ rpm و به مدت ۳ ساعت هم زده شد. سپس سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه و با دور ۴۵۰۰ rpm انجام شد. حاصل کار، تشکیل سه فاز است که شامل مایع شفاف در بالا، توده سلولی تخریب‌شده در وسط و عصاره حاوی کاروتنوئید در ته فالکن است. عصاره به فالکن دیگری منتقل شد و سپس در دمای اتاق به‌مدت ۲ روز قرار داده شد تا حلال‌ها تبخیر شوند. پس از تبخیر حلال‌ها، کاروتنوئیدها ته فالکن باقی ماندند و تا زمان آنالیز در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۵).

آنالیز کاروتنوئیدها با روش TLC: مقداری از عصاره کاروتنوئید برداشته می‌شود و روی کاغذ TLC با فاصله یک سانتی‌متر از انتهای کاغذ، لکه گذاری می‌شود. در یک بشر ۲۵۰ میلی لیتری، حدود ۵ میلی لیتر از حلال های هگزان (He) و استون (A) به‌ترتیب با نسبت ۷(He):۳(A) ریخته می شود و کاغذ لکه گذاری‌شده به‌مدت ۳۰ دقیقه درون حلال‌ها قرار می گیرد. سپس کاغذ برداشته می شود و روی آن باندهای زرد و قرمز و نارنجی با فواصل متفاوت از محل لکه گذاری دیده می شود. با استفاده از فرمول ۱ و جدول ۲، مقدار R_f هریک از باندهای ظاهرشده محاسبه شد. با مقایسه R_f محاسباتی و R_f استاندارد، نوع هریک از کاروتنوئیدها تعیین شد (۱۶).

$$(1)\ \text{Retention Factor} = \frac{Z_s}{Z_f - Z_0}$$

در فرمول بالا Z_s فاصله بین باند ظاهرشده با نقطه شروع نمونه بر حسب میلی‌متر، Z_f فاصله‌ای که فاز مایع از سطح حلال پیموده برحسب میلی متر و Z_0 فاصله بین سطح حلال و نقطه شروع برحسب میلی‌متر است.

جدول ۲- مقدار R_f استاندارد ارائه‌شده برای کاروتنوئیدها (۱۶)

Carotenoids	R_f Value
β-Carotene	۰/۹۹
Echinenone	۰/۸۷
Astaxanthin Diesters	۰/۷۵
Astaxanthin Monoesters	۰/۵۰
Canthaxanthin	۰/۴۰
Astaxanthin Free	۰/۳۳
Lutein	۰/۲۵

تعیین کل کاروتنوئیدها و بررسی طیف جذبی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر: برای بررسی طیف جذبی کاروتنوئیدها از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. در این مرحله به اندازه حجم عصاره استخراج‌شده، به کاروتنوئیدها استون اضافه می شود. علاوه بر بررسی طیف جذبی کاروتنوئیدهای موجود در عصاره، مقدار

کل کاروتنوئیدهای تولیدی نیز با استفاده از فرمول ۲ محاسبه شد.

$$\text{کل کاروتنوئیدها } (\mu\, g/g\ biomass) = \frac{A_{470nm} V_{extract}\ DF}{0.2 W_{sample}} \quad (۲)$$

در فرمول بالا، A_{470nm} مقدار جذب کاروتنوئید استخراج‌شده از نمونه در ۴۷۰ نانومتر است، $V_{extract}$ حجم عصاره کاروتنوئید هنگام استخراج است، DF فاکتور رقت است، ۰/۲ ارزش جذب ۱ میکروگرم در میلی لیتر آستاگزانتین استاندارد در ۴۷۰ نانومتر و W_{sample} وزن خشک نمونه‌ای که کاروتنوئیدها از آن استخراج شده‌اند، است (۱۵).

آنالیز کاروتنوئیدها با استفاده از دستگاه HPLC[11]: عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از سویهٔ *آئورانتیوکیتریوم* شامل چندین کاروتنوئید مختلف است که با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)، نوع و میزان هرکدام از کاروتنوئیدها در مقایسه با استانداردها مشخص می‌شود. جهت آماده‌سازی نمونه برای انجام HPLC، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه که حاوی حلال استون است، در یک میکروتیوب ریخته می‌شود و در زیر هود قرار داده می‌شود تا استون کاملاً تبخیر شود. سپس ۸۰۰ میکرولیتر اتیل استات به کاروتنوئیدهای خشک‌شده اضافه می‌شود و برای حل کردن کاروتنوئیدها در حلال، پیپتاژ صورت می گیرد. نمونه ها از فیلتر ۰/۲ گذرانده شدند و سپس به دستگاه HPLC با ستون فاز معکوس $C_{۱۸}$ با اندازه ۲۵ سانتی‌متر × ۴/۶ میلی‌متر ساخت شرکت Agilent، تزریق شدند. فازهای متحرک HPLC نیز شامل آب، اتیل استات و متانول است. نتایج به‌دست‌آمده از دستگاه شامل چندین پیک هستند که هرکدام در زمان مشخصی نمایان شده‌اند و بیانگر وجود کاروتنوئید خاصی هستند. تشخیص نوع کاروتنوئیدها با استفاده از استانداردها (آستاگزانتین، سیگما، A9335، بتاکاروتن، سیگما، 22040) انجام گرفت و مقدار هرکدام از آن‌ها با توجه به کل کاروتنوئیدهای تولیدشده در هر محیط کشت، تعیین شد (۱۴).

آنالیز آماری: تمام داده‌ها حاصل سه تکرار از آزمایشات هستند. آنالیزهای آماری نتایج نیز با نرم‌افزار SPSS (version 16) انجام شد ($P<0.05$).

نتایج

بررسی رشد کلنی‌ها و مقدار توده سلولی تولیدشده با منابع مختلف کربن: رشد سویه *آئورانتیوکیتریوم* روی پلیت ها با منابع مختلف کربن و همچنین در محیط های مایع بررسی شد. ملاک مقایسه، رشد کلنی ها و میزان تولید توده سلولی بعد از ۲۴ ساعت است. سویه *آئورانتیوکیتریوم* روی محیط کشت شامل گلوکز بهترین رشد را نشان داد. همچنین کلنی ها بسیار بزرگ و لعابی بودند. رنگ کلنی‌ها بر روی این محیط نارنجی پررنگ بود. همچنین مقدار توده سلولی تولیدشده ۲/۱ گرم در لیتر محاسبه شد. سپس توین ۸۰ و بعد از آن گلیسرول بهترین رشد سویه را نشان دادند. سویه‌های رشدداده‌شده بر روی محیط حاوی گلیسرول نیز کلنی‌های نارنجی‌رنگ داشتند. محیط کشت‌های حاوی ساکارز و اسکیم میلک (شیر چربی گرفته‌شده) کمترین میزان رشد را داشتند و کلنی‌های کوچک مشاهده شدند، بااین‌حال، رشد در ساکارز کمی بیشتر از شیر بدون چربی بود. مقدار توده سلولی تولیدی در هر محیط نیز در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- مقایسه رشد سویه در منابع مختلف کربن

منبع کربن / زمان	گلوکز	ساکارز	گلیسرول	توین ۸۰	اسکیم میلک (شیر چربی گرفته‌شده)
وزن خشک سلولی (گرم بر لیتر)	۲/۱±۰/۲	۰/۵۸±۰/۱۱	۰/۹۵±۰/۱۰	۱/۷±۰/۳۲	۰/۵۲±۰/۰۶

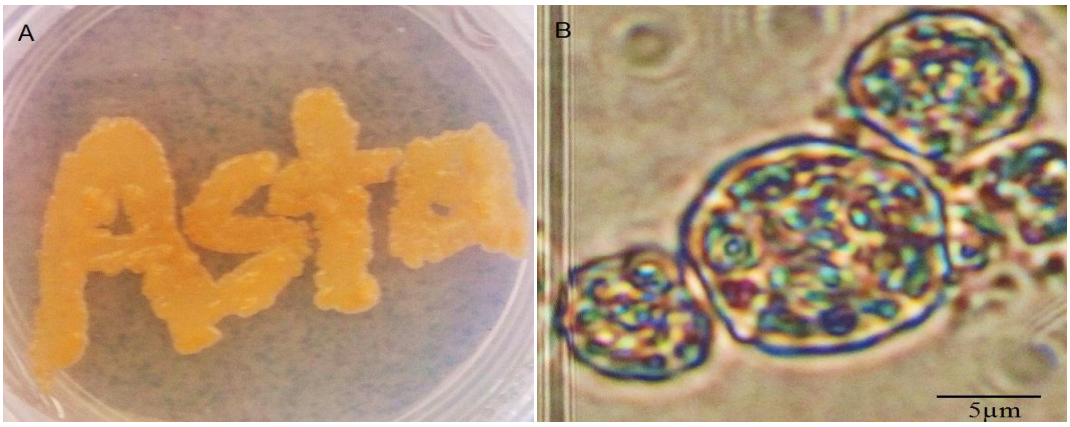
جدول ۴- رشد سویه در منابع مختلف نیتروژن

منبع نیتروژن / زمان	سدیم گلوتامات	عصاره مخمر	NH_4Cl	اوره	عصاره مالت
وزن خشک سلولی (گرم بر لیتر)	۱/۶۳±۰/۱۱	۱/۹±۰/۱۵	۰/۴۵±۰/۰۶	۱/۳۹±۰/۲۷	۱/۳±۰/۱۰

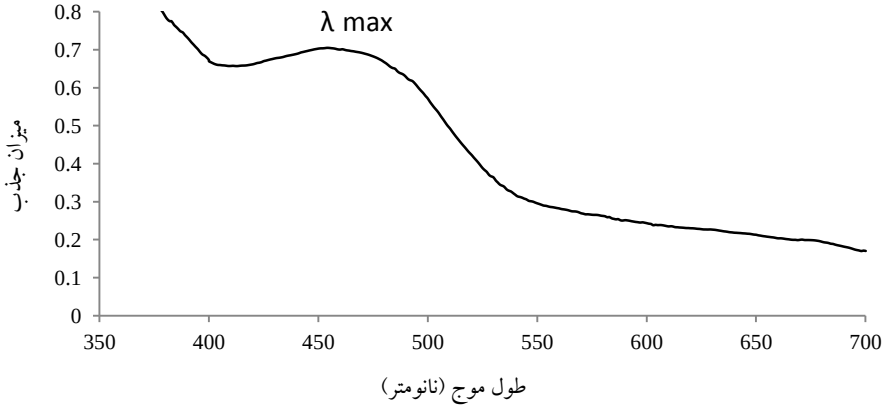
بررسی رشد کلنی‌ها و مقدار توده سلولی تولیدشده با منابع مختلف نیتروژن: با بررسی رشد کلنی ها بعد از ۲۴ ساعت، مشخص شد که سویهٔ *آئورانتیوکیتریوم* در تمام محیط ها به‌طور یکسان رشد کرده است. رشد سویه روی محیط های مختلف بعد از ۴۸ ساعت افزایش یافت. سویه مدنظر بر روی محیط حاوی سدیم گلوتامات بهترین رشد را داشت و کلنی آن به رنگ نارنجی مشاهده شد. مقدار توده سلولی تولیدشده در این محیط ۱/۶۳ گرم بر لیتر گرم بر لیتر گزارش شد. پس از آن، سویه در محیط حاوی عصاره مخمر بیشترین رشد را داشت. مقدار توده سلولی تولیدی در این محیط ۱/۹ گرم در لیتر محاسبه شد. دو محیط اوره و عصاره مالت به‌طور یکسان باعث رشد سویه شدند (جدول ۴). همچنین کمترین رشد مربوط به محیط حاوی کلرید آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن بود.

بررسی رشد و تولید کل کاروتنوئیدها در محیط‌های ترکیبی: عصاره‌های کاروتنوئیدی استخراج‌شده، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری و مقدار کل کاروتنوئیدها با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (جدول ۵). شکل ۲ نمونه ای از طیف جذبی کاروتنوئیدهای استخراج‌شده از محیط شماره ۱ توسط دستگاه اسپکتروفتومتری را نشان می‌دهد که حداکثر جذب آن در طول موج بین ۴۷۰ تا ۴۸۰ نانومتر است. از بین ۶ محیط کشت با ترکیبات نیتروژن و کربن متفاوت، محیط کشت‌های شماره ۱ به‌ترتیب حاوی گلوکز، عصاره مخمر، پپتون و محیط شماره ۴ حاوی گلیسرول، عصاره مخمر، پپتون، بهترین رشد سویه و تولید کاروتنوئید را داشتند. مقدار توده سلولی تولیدی در این محیط‌ها به‌ترتیب ۲/۳ و ۰/۷۱ گرم در لیتر محاسبه شد (جدول ۵). تفاوت این دو محیط، در نوع رشد سویه و رنگ توده سلولی تولیدی در محیط کشت است. به این ترتیب که سویه در محیط کشت حاوی گلوکز به‌صورت توده‌ای رشد می کند، به‌راحتی ته‌نشین می‌شود و رنگ توده سلولی نارنجی و پررنگ‌تر از محیط شماره ۴ است. مقدار کل کاروتنوئید تولیدشده در این دو محیط نیز به‌ترتیب برابر با ۱۳۴/۸ و ۳۳۲/۸ میکروگرم‌درگرم وزن خشک است. سویهٔ *آئورانتیوکیتریوم* در محیط کشت حاوی گلیسرول، به‌صورت سوسپانس رشد می کند و برای جداسازی توده سلولی از محیط کشت باید حتماً سانتریفیوژ انجام گیرد. چون توده سلولی در محیط کشت پخش شده است، کم‌رنگ‌تر به نظر می‌رسد و کل محیط کشت به‌رنگ نارنجی کم‌رنگ یا قرمز کم‌رنگ دیده می‌شود (شکل ۱). اندازه سلول‌ها در این محیط بین ۲۰ تا ۳۰ میکرومتر

هستند و گرانول‌های داخل سلولی کاروتنوئیدها در سلول‌ها به‌خوبی قابل مشاهده هستند. سویه *آئورانتیوکیتریوم* در محیط کشت‌های شماره ۳ و ۶ که تنها تفاوتشان در نوع منبع کربن (گلوکز و گلیسرول) است و حاوی سدیم گلوتامات هستند، تقریباً یکسان رشد کرده‌اند و به یک اندازه تولید کاروتنوئید کرده‌اند. محیط‌ها تغییر رنگ بسیار کمی داشته‌اند و سویه هم به‌صورت توده ای و هم به‌صورت سوسپانس در هر دو محیط رشد کرده‌اند. محیط کشت شماره ۲، حاوی گلوکز، کلرید آمونیوم، عصاره مخمر و پپتون، تغییر رنگ بسیار بسیار کمی داشته اما رشد سویه و تولید توده سلولی تقریباً به اندازه محیط های شماره ۳ و ۶ است. سویه در این محیط هم به‌صورت سوسپانس و هم به‌صورت توده‌ای رشد کرده است. کمترین مقدار کل کاروتنوئید (۳۹/۹ میکروگرم در گرم وزن خشک) در این محیط تولید شده بود. درنهایت محیط کشت شماره ۵، حاوی گلیسرول، کلرید آمونیوم، عصاره مخمر و پپتون، بدون هیچ تغییر رنگی دیده می‌شود. سویه در محیط به‌صورت توده‌ای رشد کرده اما تولید توده سلولی آن از سایر محیط‌ها کمتر بوده است و به‌راحتی ته‌نشین می شود. محیط کشت کاملاً شفاف و توده سلولی سفیدرنگ است.



شکل ۱- تغییر رنگ نارنجی کلنی‌های *آئورانتیوکیتریوم Ch25* بر روی محیط ترکیبی شماره ۴ به‌دلیل تولید کاروتنوئیدها تحت استرس نوری A) مورفولوژی سلول‌های حاوی گلبول‌های داخل سلولی کاروتنوئیدها B)

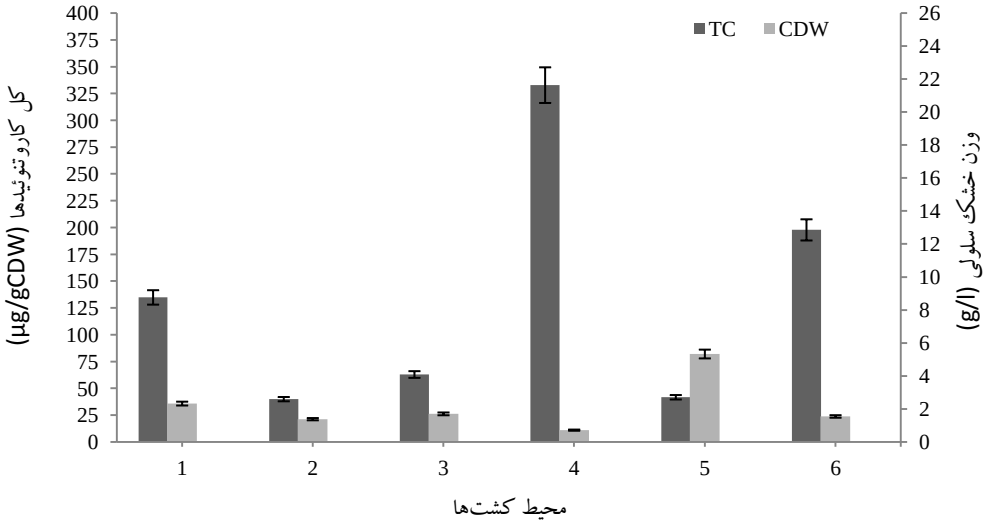


شکل ۲- طیف جذبی کاروتنوئیدهای سویهٔ *آئورانتیوکیتریوم Ch25* در محیط شماره ۱. این پیک و جذب در طول موج ۴۷۰ تا ۴۸۰ نانومتر در کاروتنوئیدهای استخراج‌شده از بقیهٔ محیط‌ها نیز مشاهده شد.

در جدول ۵ میزان وزن خشک سلولی و مقدار کل کاروتنوئیدهای تولیدشده در هر محیط کشت ترکیبی نشان داده شده است. بیشترین مقدار کل کاروتنوئید برابر با ۳۳۲/۸ میکروگرم در گرم وزن خشک سلولی است که مربوط به محیط شماره ۴ است. سویهٔ *آئورانتیوکیتریوم* در این محیط گلیسرول را به‌عنوان منبع کربن و برای منبع نیتروژن از عصاره مخمر و پپتون استفاده می کند. پس از محیط شماره ۴، محیط های ۶ و ۱ به‌ترتیب با تولید ۱۹۷/۷ و ۱۳۴/۸ میکروگرم در گرم وزن خشک سلولی، دارای بیشترین مقدار کل کاروتنوئید هستند. با توجه به وزن خشک سلولی و تولید کاروتنوئید، می‌توان گفت محیط شماره ۴ با کمترین وزن خشک سلولی (۰/۷۱ گرم در لیتر) دارای بیشترین مقدار تولید کاروتنوئید است. در شکل ۳ مقدار وزن خشک سلولی و کل کاروتنوئیدها در محیط ها با یکدیگر مقایسه شده است.

جدول ۵- مقدار وزن خشک سلولی و کل کاروتنوئیدهای به‌دست‌آمده از محیط‌های ۱ تا ۶

شماره محیط کشت	وزن خشک سلولی (g/l)	کل کاروتنوئیدها ($\mu g/g_{CDW}$)
۱	۲/۳±۰/۲	۱۳۴/۸
۲	۱/۴±۰/۱۷	۳۹/۹
۳	۱/۷±۰/۱۳	۶۲/۹
۴	۰/۷۱±۰/۰۸	۳۳۲/۸
۵	۵/۳±۰/۴	۴۱/۷
۶	۱/۵±۰/۳۲	۱۹۷/۷



شکل ۳- مقادیر تولیدی وزن خشک سلولی و کاروتنوئیدها در محیط‌های ترکیبی

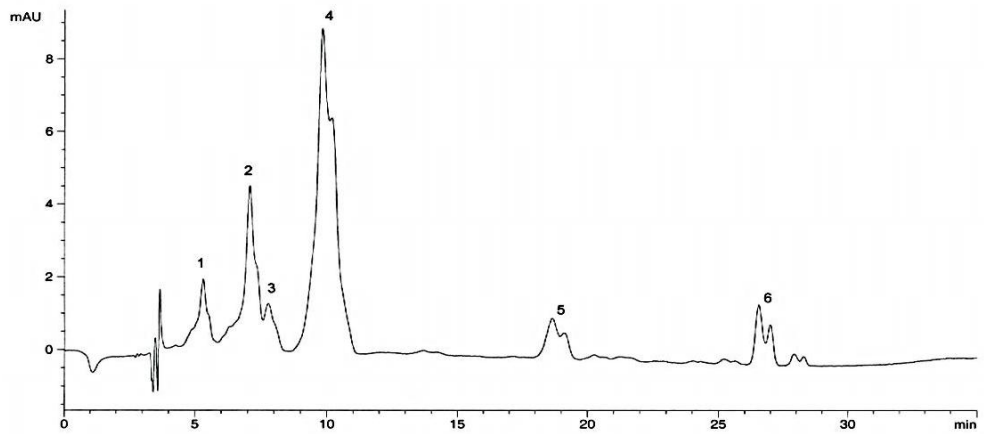
آنالیز TLC: با توجه به نتایج به‌دست آمده و مقایسه کل کاروتنوئیدهای ۶ محیط کشت، محیط کشت شماره ۴ به‌عنوان بهترین فرمولاسیون محیط کشت برای رشد سلول ها و تولید کاروتنوئیدها شناخته شد. ازاین‌رو، برای شناسایی ترکیبات کاروتنوئیدی این محیط، آنالیز TLC انجام گرفت. با استفاده از رابطه (۲) مقدار R_f هر یک از باندها محاسبه شد و برای شناسایی ترکیبات، R_f محاسباتی با R_f استاندارد مقایسه شد (جدول ۶).

جدول ۶- مقدار R_f و نوع کاروتنوئیدهای تولیدشده در محیط کشت شماره ۴

شماره باند	Carotenoids	R_f استاندارد	R_f نمونه
۱	Astaxanthin Free	۰/۳۳	۰/۳۶
۲	Astaxanthin Monoesters	۰/۵	۰/۴۹
۳	Astaxanthin Diesters	۰/۷۵	۰/۷۶
۴	β-Carotene	۰/۹۹	۰/۹۸

بررسی تولید آستاگزانتین، کانتاگزانتین، اکیننون و بتاکاروتن توسط HPLC: برای تأیید نوع ترکیبات مشخص شده و همچنین تعیین مقدار هریک از آن ها، آنالیز HPLC انجام گرفت که شکل ۴ نتایج حاصل را نشان می‌دهد.

با استفاده از آنالیز HPLC چهار کاروتنوئید آستاگزانتین، کانتاگزانتین، اکیننون و بتاکاروتن شناسایی شدند (جدول ۷). اولین پیک مشاهده‌شده مربوط به کاروتنوئید آستاگزانتین است که ۶/۷۷درصد از کل کاروتنوئیدها یعنی ۱۷/۶۸ میکروگرم در گرم وزن خشک سلولی را به خود اختصاص داده است. پیک دوم، نشان از حضور کانتاگزانتین با مقدار ۳۷/۴۸ میکروگرم در گرم وزن خشک سلولی (۱۴/۳۴درصد) است. مقدار کاروتنوئیدهای اکیننون و بتاکاروتن نیز در عصاره کاروتنوئیدی به‌ترتیب ۱۶۴/۸۸ و ۱۸/۸۶ میکروگرم در گرم وزن خشک سلولی است. نتایج حاصل‌شده نشان می دهد که کاروتنوئید اکیننون دارای بیشترین درصد در عصاره کاروتنوئیدی است و آستاگزانتین نزدیک به ۷درصد از کل کاروتنوئیدها را تشکیل داده است.

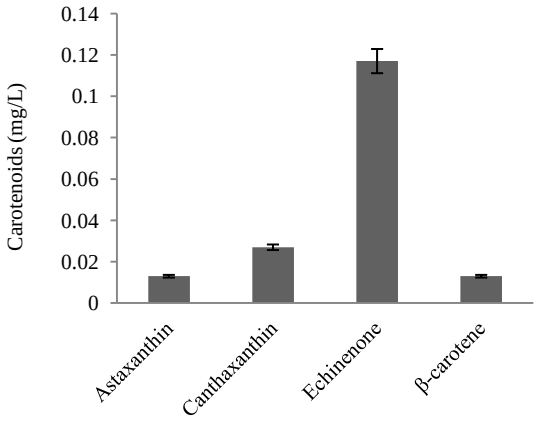


شکل ۴- کروماتوگرام مربوط به کاروتنوئیدهای استخراج‌شده از توده سلولی. پیک شماره ۱ مربوط به کاروتنوئید آستاگزانتین، شماره ۲: کانتاگزانتین، شماره ۴: اکیننون و شماره ۶ مربوط به بتاکاروتن است.

جدول ۷- نوع و مقدار کاروتنوئیدهای تولیدشده توسط سویه *آئورانتیوکیتریوم Ch25*

نوع کاروتنوئید	شماره پیک	مقدار کاروتنوئید (٪)	مقدار کاروتنوئید mg/L	مقدار کاروتنوئید ($\mu g/g_{biomass}$)
آستاگزانتین	۱	۶/۷۷	۰/۰۱۳	۱۷/۶۸
کانتاگزانتین	۲	۱۴/۳۴	۰/۰۲۷	۳۷/۴۸
اکینون	۴	۶۳/۱۱	۰/۱۱۷	۱۶۴/۸۸
بتاکاروتن	۶	۷/۲۲	۰/۰۱۳	۱۸/۸۶

مقدار تولید اکینون در این سویه در محیط شماره ۴ بیشتر از سایر کاروتنوئیدهای شناسایی شده است (شکل ۵). بعد از اکینون، بیشترین مقدار کاروتنوئید تولیدشده در سویه *آئورانتیوکیتریوم*، کانتاگزانتین است و مقدار کاروتنوئیدهای آستاگزانتین و بتاکاروتن نیز تقریباً برابر است.



شکل ۵- نمودار هریک از کاروتنوئیدهای تولیدشده توسط سویه *آئورانتیوکیتریوم* بر حسب میلی‌گرم در لیتر

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر ترائوستوکیتریدها جزء سویه‌های تولیدکننده کاروتنوئیدها معرفی شده‌اند. با توجه به جدیدبودن این سویه‌ها بررسی نقش منابع کربن و نیتروژن در تولید کاروتنوئیدها مهم است. گلوکز به‌طور گسترده‌ای برای تخمیرهای صنعتی استفاده می‌شود و نسبت به سایر منابع کربن دارای عملکرد بالا در تولید توده سلولی و بهره‌وری لیپید است (۱۷). همچنین استفاده از گلیسرول به‌عنوان یک منبع کربن جایگزین به جای گلوکز، به‌علت فراوانی و هزینه‌های نسبتاً کم آن در مقایسه با گلوکز از اهمیت زیادی برخوردار است (۱۸). در این بررسی نیز گلیسرول به‌عنوان بهترین منبع کربن برای رشد و تولید کاروتنوئیدها در این سویه معرفی شد. در محیط غنی‌شده با گلیسرول مقدار کل کاروتنوئید تولیدشده برابر با ۳۳۲/۸ میکروگرم در گرم وزن خشک سلولی است درحالی‌که میزان کاروتنوئید تولیدی در محیط مشابه اما غنی‌شده با گلوکز ۱۳۴/۷۸۱ میکروگرم در گرم وزن خشک سلولی است. هنگامی که در کشت سویه‌های *شیزوکیتریوم S31*، *ترائوستوکیتریوم AMCQS5-3*، *ترائوستوکیتریوم AMCQS5-5* و *شیزوکیتریوم AMCQS1-9* به جای گلوکز از گلیسرول به‌عنوان منبع کربن در محیط کشت استفاده شد، تولید توده سلولی، کاروتنوئید و محتوای لیپید در آن‌ها به‌مقدار قابل توجهی بالاتر از محیط‌های تغذیه‌شده با گلوکز بود (۱۷). همچنین اسکات[۱۲] و همکاران مشاهده کردند زمانی که محیط کشت با گلیسرول به جای گلوکز تغذیه شود، افزایش در تولید توده سلولی و محتوای لیپید ترائوستوکیتریدها قابلِ‌ملاحظه خواهد بود (۱۹). در پژوهش دیگری

استفاده از گلیسرول به‌عنوان منبع کربن، منجر به افزایش محتوای کاروتنوئیدها در *شیزوکیتریوم S31* از ۱۶/۸ به ۲۰/۲۸ میکروگرم در گرم شد. افزایش محتوای کاروتنوئید در دو سویه *ترائوستوکیتریوم AMCQS5-3* و *ترائوستوکیتریوم AMCQS5-5* به‌ترتیب از ۱۶ و ۱۷ به ۵۰ و ۶۰ میکروگرم در گرم، یعنی حدود ۳ برابر مشاهده شد (۱۷) درحالی‌که آرمنتا[۱۳] و همکاران محتوای کاروتنوئید را تا ۵۰ میکروگرم در گرم با استفاده از منبع کربن گلوکز در تخمیر *ترائوستوکیتریوم* سویه *ONC-T18*، گزارش داده‌اند (۱۵). شرایط نور در محیط نیز برای تأثیر بر بیوسنتز آستاگزانتین و رشد ترائوستوکیتریدها اثبات شده است. سویه *آئورانتیوکیتریوم Ch25* نیز برای تولید کاروتنوئیدها باید در محیط دارای استرس قرار بگیرد. ازاین‌رو در این بررسی برای ایجاد استرس در محیط رشد سلول‌ها، از نور فلورسنت با شدت ۲۰۰۰ لوکس استفاده شد. این سویه در تاریکی نیز رشد می‌کند و مقدار کاروتنوئید ناچیزی تولید می‌کند اما با اعمال استرس نوری تولید کاروتنوئیدها در سلول‌ها بسیار افزایش می‌یابد و باعث تغییر رنگ محیط می‌شود. اثر نور شدید فلورسنت (۱۵۰۰ لوکس)، نور قرمز، آبی، مادون قرمز نزدیک و تاریکی بر سنتز رنگدانه و رشد *ترائوستوکیتریوم CHN-1* مطالعه و مشخص شد که نور فلورسنت بهترین اثر تحریک بر رشد را دارد درحالی‌که نور آبی برای ارتقاء بیوسنتز آستاگزانتین طی روشنایی طولانی ۱۵ روز، بهتر است (۲۰). همچنین در این مطالعه مشاهده شد که سویه *آئورانتیوکیتریوم Ch25* در محیط کشت فاقد عصاره مخمر و دارای کلرید آمونیوم رشد کمی دارد. در حقیقت وجود عصاره مخمر در محیط های کشت یکی از فاکتورهای مهم و ضروری برای رشد این سویه است و کلرید آمونیوم نمی تواند جایگزین عصاره مخمر باشد و جوابگوی نیازهای سویه برای رشد نیست. با بررسی‌های انجام‌شده مشخص شد که سویه *آئورانتیوکیتریوم Ch25* توانایی تولید کاروتنوئیدهای آستاگزانتین، کانتاگزانتین، اکیننون و بتا کاروتن را دارد. در نتایج حاصل‌شده از آنالیز عصاره کاروتنوئیدی با استفاده از HPLC، پیک شماره ۴ مربوط به اکیننون است که نسبت به سایر کاروتنوئیدهای موجود، دارای بیشترین مقدار است. در سویه *آئورانتیوکیتریوم Ch25*، اکیننون به‌عنوان کاروتنوئید غالب شناخته شد که در محیط حاوی گلیسرول، ۶۳/۱۱درصد از کل کاروتنوئیدهای تولیدشده را به خود اختصاص داده است. اکیننون مانند بتاکاروتن و آستاگزانتین به‌عنوان یک رنگدانه خوراکی، آنتی‌اکسیدان و پرویتامین A، استفاده می شود. معمولاً اکیننون به‌عنوان یک محصول واسطه تولید آستاگزانتین با استفاده از میکروارگانیسم ها تولید می‌شود و ممکن است از بتاکاروتن ازطریق اکسیداسیون و تجزیه شیمیایی، مشتق شود (۲۱). تولید کاروتنوئیدهای آستاگزانتین، اکیننون، کانتاگزانتین، فوئنیکوزانتین و بتاکاروتن در سویه *ترائوستوکیتریوم CHN-1* بررسی شده است. محتوای کاروتنوئیدی در این سویه با میزان رشد سلولی یا توده سلولی ارتباط مستقیم دارد. تولید توده سلولی و کاروتنوئیدها برای این سویه پس از ۸ روز انکوباسیون به حداکثر خود رسید. انکوباسیون ۱۴روزه سویه *ترائوستوکیتریوم CHN-1* نه تنها سبب افزایش در توده سلولی و عصاره کاروتنوئیدی نشد بلکه کاهش در مقدار این دو فاکتور را نیز نشان داد. در روز هشتم محتوای کل بتاکاروتن در *ترائوستوکیتریوم CHN-1* کاهش یافته بود، درحالی‌که مقدار آستاگزانتین افزایش نشان داد. به‌طورکلی، مقدار

کل کاروتنوئیدها (کاروتنوئیدهای هیدروکربنی) در طی فازهای تأخیری و ثابت کاهش می‌یابد درحالی‌که محتوای زانتوفیل ها (کاروتنوئیدهای اکسیژن‌دار) افزایش می یابد. مشاهده تغییرات پی‌درپی در محتوای بتاکاروتن و همچنین کتوکاروتنوئیدها، اکیننون، فوئنیکوزانتین و کانتاگزانتین، امکان تبدیل بین این کاروتنوئیدها را در سویه *ترائوستوکیتریوم CHN-1* نشان می‌دهد (۱۴). در مطالعه‌ای که Gupta و همکاران بر سویه‌های ترائوستوکیترید انجام دادند، مشخص شد که همه ترائوستوکیتریدهای جداشده که نارنجی‌رنگ هستند، آستاگزانتین یا کانتاگزانتین را به‌عنوان کاروتنوئید غالب و مقداری اکیننون تولید می‌کنند. کاروتنوئیدهای دیگر مانند لوتئین، زآزانتین یا بتاکریپتوزانتین در این ترائوستوکیتریدها مشاهده نشدند. سویه *شیزوکیتریوم S31* دارای مقدار آستاگزانتین و اکیننون قابلِ‌توجه به ترتیب ۲۹/۷ و ۳۳/۲۱ میکروگرم در گرم همراه با مقداری کانتاگزانتین (۱۴/۶۳ µg/g) است. در این محیط کشت تبدیل مؤثر بتاکاروتن به زانتوفیل‌ها در فاز تأخیری باعث می‌شود که در مجموعه کاروتنوئیدی، بتاکاروتن مشاهده نشود. بااین‌حال غیبت بتاکاروتن و حضور معنی‌دار آستاگزانتین و اکیننون، سرعت اکسیداسیون بتاکاروتن به اکیننون و به دنبال آن با استفاده از اکسیداسیون/هیدروکسیداسیون به آستاگزانتین، از طریق مسیر کانتاگزانتین را نشان می‌دهد (۱۷). همچنین آرمنتا و همکاران مجموعه‌ی کاروتنوئیدی مشابهی را در *ترائوستوکیتریوم ONC-T18* گزارش کردند که حضور کانتاگزانتین، اکیننون و بتاکاروتن و مقدار کمی آستاگزانتین را نشان می‌دهد (۱۵). با توجه به یافته‌های گوپتا[۱۴] و همکاران، می‌توان وجود کانتاگزانتین را به‌عنوان کاروتنوئید عمده در *ترائوستوکیتریوم* و آستاگزانتین را در *شیزوکیتریوم*، بیان کرد. سویه *آئورانتیوکیتریوم Ch25* همچنین توانایی تولید بتا کاروتن را دارد. در مسیر سنتز کاروتنوئیدها، ابتدا کانتاگزانتین از بتا کاروتن مشتق می شود و سپس آستاگزانتین تولید می‌شود. ازاین‌رو، می‌توان این موضوع را به‌عنوان یکی از دلایل احتمالی اینکه میزان کانتاگزانتین تولیدی در سویه بیشتر از میزان آستاگزانتین تولیدی آن است، در نظر گرفت. همچنین غیرفعال‌شدن آنزیم بتاکاروتن هیدروکسیلاز که مسئول اضافه‌کردن گروه های هیدروکسیل به اسکلت کانتاگزانتین است، می‌تواند منجر به معیوب‌شدن سنتز آستاگزانتین و تجمع کانتاگزانتین شود (۱۷). البته بررسی آنزیم های دخیل و ژن‌های آن‌ها در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها در این سویه در دست بررسی است. سویه *آئورانتیوکیتریوم Ch25* استفاده‌شده در این پژوهش قبلاً طی یک فرآیند جداسازی و غربالگری وسیع برای یافتن ترائوستوکیتریدهای بومی ایران با قابلیت تولید کاروتنوئیدها، جداسازی و شناسایی شد (۲۲). به طورکلی با توجه به تجمع کاروتنوئیدهای با ارزش مثل بتاکاروتن، اکیننون، کانتاگزانتین و آستاگزانتین در این سویه بومی، بهینه‌سازی محیط کشت از روش‌های تاگوچی و غیره، ضروری به نظر می‌رسد تا بتوان به تولید بیشتر کاروتنوئیدها دست یافت.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های این پژوهش از محل گرنت پژوهشی دانشگاه، تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته (کد طرح: ۴۱۹۴۰۱ و شماره ۷/۹۰۰) تأمین شد که قابل تقدیر است.

References

(1) Noviendri D., Hasrini RF., Octavianti F. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011; 5 (33): 7119- 31.

(2) Lorenz RT., Cysewski GR. Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in biotechnology* 2000; 18 (4): 160- 7.

(3) Bhosale P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004; 63 (4): 351- 61.

(4) Chatdumrong W., Yongmanitchai W., Limtong S., Worawattanamateekul W. Optimization of docosahexaenoic acid (DHA) production and improvement of astaxanthin content in a mutant *Schizochytrium limacinum* isolated from mangrove forest in Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 2007; 41: 324- 34.

(5) Chattopadhyay P., Chatterjee S., Sen SK. Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. *African Journal of Biotechnology* 2008; 7 (17): 2972- 85.

(6) Aki T., Hachida K., Yoshinaga M., Katai Y., Yamasaki T., Kawamoto S., et al. Thraustochytrid as a potential source of carotenoids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2003; 80 (8): 789- 94.

(7) Guerin M., Huntley ME., Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *TRENDS in Biotechnology* 2003; 21 (5): 210- 6.

(8) Yamasaki T., Aki T., Mori Y., Yamamoto T., Shinozaki M., Kawamoto S., et al. Nutritional enrichment of larval fish feed with thraustochytrid producing polyunsaturated fatty acids and xanthophylls. *Journal of bioscience and bioengineering* 2007; 104 (3): 200- 6.

(9) Cifuentes AS., Gonzalez MA., Vargas S., Hoeneisen M., Gonzalez N. Optimization of biomass., total carotenoids and astaxanthin production in Haematococcus pluvialis Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research* 2003; 36 (3/4): 343- 58.

(10) Guedes AC., Amaro HM., Malcata FX. Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs* 2011; 9 (4): 625- 44.

(11) Atienza G., Arafiles K., Carmona M., Garcia J., Macabago A., Peñacerrada B., et al. Carotenoid analysis of locally isolated Thraustochytrids and their potential as an alternative fish feed for Oreochromis niloticus (Nile tilapia). *Mycosphere* 2012; 3(4): 420- 428.

(12) Steinbrenner J., Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga Haematococcus pluvialis. *Plant Physiology* 2001; 125 (2): 810- 7.

(13) Martín JF., Gudiña E., Barredo JL. Conversion of β-carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Microbial Cell Factories* 2008; 7 (1): 3.

(14) Carmona ML., Naganuma T., Yamaoka Y. Identification by HPLC-MS of carotenoids of the Thraustochytrium CHN-1 strain isolated from the Seto Inland Sea. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67 (4): 884- 8.

(15) Armenta RE., Burja A., Radianingtyas H., Barrow CJ. Critical assessment of various techniques for the extraction of carotenoids and co-enzyme Q10 from the thraustochytrid strain ONC-T18. *Journal of agricultural and food chemistry* 2006; 54 (26): 9752- 8.

(16) Lorenz Todd R. Thin-Layer Chromatography (TLC) system for Natu Rose Carotenoids. *Natu Rose Technical Bulletin* 1998; 3: 1- 3.

(17) Gupta A., Singh D., Barrow CJ., Puri M. Exploring potential use of Australian thraustochytrids for the bioconversion of glycerol to omega-3 and carotenoids production. *Biochemical Engineering Journal* 2013; 78: 11- 7.

(18) Abad S., Turon X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology advances* 2012; 30 (3): 733-41.

(19) Scott SD., Armenta RE., Berryman KT., Norman AW. Use of raw glycerol to produce oil rich in polyunsaturated fatty acids by a thraustochytrid. *Enzyme and microbial technology* 2011; 48 (3): 267- 72.

(20) Yamaoka Y., Carmona ML., Oota S. Growth and carotenoid production of *Thraustochytrium* sp. CHN-1 cultured under superbright red and blue light-emitting diodes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2004; 68 (7): 1594- 7.

(21) Matsuura H., Watanabe MM., Kaya K. Echinenone production of a dark red-coloured strain of Botryococcus braunii. *Journal of Applied Phycology* 2012; 24 (4): 973- 7.

(22) Gerami M. Study of carotenoids production in unicellular marine protist strain [Dissertation]. Kerman: Graduat University of Advanced Technology. 2013.

[1]- Labyrinthula
[2]- Chromista
[3]- Heterokont
[4]- *Schizochytrium limacinum*
[5]- *Thraustochytrium aureum*
[6]- *Agrobacterium*
[7]- *Alcaligenes* sp.
[8]- Glucose, Yeast extract, Pepton
[9]- Skim milk
[10]- Tween 80
[11]- High-performance liquid chromatography
[12]- Scott
[13]- Armenta
[14]- Gupta

Effect of carbon and nitrogen sources on carotenoids production by native strain of *Aurantiochytrium Ch25*

Mahdiye Esmizade
M.Sc. of Agricultural biotechnology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, mahdiyeesmizade@gmail.com
Shahryar Shakeri *
Assistant Professor of Microbiology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, sh.shakeri@kgut.ac.ir
Mahmood Maleki
Assistant Professor of Agricultural biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, maleki.li@gmail.com

Abstract

Introduction: Microorganisms produce carotenoids as a part of their response to environmental stresses. Carotenoids have many applications in human health, such as antioxidant, anti-cancer, light protection activity and as a precursor for hormones.

Materials and methods: In this study, the effect of different carbon and nitrogen sources was evaluated on carotenoids production by native *Aurantiochytrium* strain. The effects of different carbon and nitrogen sources were studied on biomass and carotenoid production. Then, carotenoids were extracted and analyzed by TLC, spectrophotometry and HPLC methods.

Results: Results showed that glycerol is the best carbon source for production of high carotenoids content. Selected medium contained: glycerol (1.5% v/v), peptone (1g/l), yeast extract (1g/l) and 50% of sea water. Total carotenoids content was 134.8 $\mu g/g_{CDW}$ in this medium. TLC analysis showed that the extracted carotenoid is included: beta-carotene, astaxanthin monoester, astaxanthin diester and free astaxanthin. The results of HPLC analysis showed presence of astaxanthin, canthaxanthin, echinenone and β-carotene in the carotenoid extract.

Discussion and conclusion: In this research, production of carotenoids was investigated in native strain of *Aurantiochytrium* and carotenoids profile was included astaxanthin, canthaxanthin, β-carotene and echinenone.

Key words: Carotenoids, *Aurantiochytrium*, Carbon sources, Nitrogen sources

* Corresponding author
Received: January 3, 2015 / **Accepted:** August 5, 2015