The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.2, Ser. 68, Summer 2021, p. 95-111
Article type: Research paper

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۲، پیاپی ۶۸، تابستان ۱۴۰۰، ص ۹۵-۱۱۱
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۱ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۹/۲۹

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.31100.1366

ارزیابی محتوای کاروتنوئید تام و زیست‌توده‌ی میکروبی تولیدشده توسط *Deinococcus radiodurans R1* در پاسخ به منابع نیتروژنی و کربنی مختلف

عاطفه صالحی بختیاری[۱]، زهرا اعتمادی فر*[۱]، ماتیا سادات برهانی[۲]

چکیده

در مطالعه‌ی حاضر، اثر منابع کربنی و نیتروژنی مختلف بر زیست‌توده و رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی Deinococcus radiodurans به‌عنوان یکی از مقاوم‌ترین میکروارگانیسم‌ها به اشعه، با استفاده از رهیافت یک فاکتور در یک‌زمان موردبررسی قرار گرفت. همچنین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، سمیت سلولی و فعالیت ضدمیکروبی رنگیزه نیز بررسی شدند. رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی دارای نصف حداکثر غلظت مؤثر (EC_{50}= Half-maximal effective concentration) برابر با ۲۰/۱۹ µg/mL و ۳/۲۸mg/mL به ترتیب در تست‌های قدرت احیاکنندگی یون‌های آهن فریک و به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد بود. بر اساس رهیافت یک فاکتور در یک زمان، شرایط بهینه‌ی تولید کاروتنوئید به میزان ۳۷mg/L رنگیزه در محیط کشت حاوی منبع کربنی ۱ g/L گلوکز و منبع نیتروژنی۱g/L عصاره‌ی مخمر به‌دست آمد. همچنین این رنگیزه اثر سمی یا مهاری بر روی سلول‌های فیبروبلاستی انسان و بر روی دو باکتری Staphylococcus epidermidis و Escherichia coli نداشت.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، بهینه‌سازی، رنگیزه، رادیوفیل

۱- گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
*(نویسنده مسئول: z.etemadifar@sci.ui.ac.ir; zetemadifar@gmail.com)
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبدکاووس، گلستان، ایران

۱- این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوئی خانم عاطفه صالحی بختیاری به راهنمایی دکتر زهرا اعتمادی فر و همکاری خانم ماتیا سادات برهانی در دانشگاه اصفهان صورت گرفته است.

مقدمه

کاروتنوئیدها، رنگیزه‌های آلی ایزوپرنوئیدی به رنگ‌های زرد، نارنجی و قرمز می‌باشند. کاروتنوئیدها، از طریق شیمیایی و یا به‌صورت طبیعی توسط موجودات مختلف ازجمله باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها و گیاهان تولید می‌شوند. در سال‌های اخیر، کاروتنوئیدهای طبیعی به دلیل این‌که برخلاف کاروتنوئیدهای شیمیایی، اثرات جانبی بر سلامتی انسان ندارند و منجر به آلودگی‌های زیست‌محیطی نمی‌شوند، بسیار موردتوجه قرارگرفته‌اند. از کاروتنوئیدها در صنایع گوناگون مانند صنایع غذایی، غذای دام، داروئی، آرایشی و پزشکی استفاده می‌شود (Delgado-Vargas *et al*., 2000). بازار جهانی کاروتنوئیدها در حدود یک میلیارد دلار در سال ۲۰۱۰ بوده است و در حال حاضر نیز روند افزایشی قابل‌توجهی داشته است (Sandmann, 2014). بیش از ۱۱۰۰ نوع کاروتنوئید مختلف تاکنون گزارش‌شده است؛ هرچند، جستجو برای یافتن سویه‌های میکروبی با تولید بیشتر کاروتنوئید و یا تولید کاروتنوئیدهای منحصربه‌فرد ادامه دارد (Oliver & Palou, 2000).

میکروارگانیسم‌های اکسترموفیل مقاوم به اشعه، متابولیت‌های اولیه و ثانویه‌ی جالبی ازجمله کاروتنوئیدها را برای مقابله با پرتوها تولید می‌کنند؛ بنابراین، محتمل‌تر است که نسبت به سویه‌های میکروبی دیگر، کاروتنوئیدهای بیشتر و منحصربه‌فردی تولید کنند (Gabani& Singh, 2013). باکتری *Deinococcus radiodurans* یک میکروارگانیسم پلی‌اکسترموفیل و یکی از مقاوم‌ترین سویه‌های میکروبی در برابر اشعه‌های یونیزان و غیریونیزان است. این باکتری می‌تواند چیزی حدود ۵۰۰۰ گری (Grey) از پرتوهای یونیزان را بدون از دست دادن توانایی زنده ماندن تحمل کند (Ito *et al*., 1983). همچنین، باکتری*Deinococcus radiodurans R1* تولیدکننده‌ی رنگیزه‌ی قرمزرنگی به نام Deinoxanthin (داینوگزانتین) است. داینوگزانتین دارای ساختمان شیمیایی (۱ و ۲-دی هیدروکسی -۳ و ۴-دی هیدرو -۱ و ۲-دی هیدرو-βوψ-کاروتن) می‌باشد. بر اساس تحقیقات، نشان داده شده است که سویه‌های جهش‌یافته این باکتری، فاقد این رنگیزه و نسبت به اثرات مخرب ناشی از رادیکال‌های آزاد حساس هستند. این ویژگی نشان‌دهنده نقش مؤثر کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans* در مقاومت نسبت به تنش اکسیداتیو و حفاظت از DNA در مقابل آسیب ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد (Tian *et al*., 2009).

علاوه بر انتخاب مناسب سویه‌ی میکروبی مولد کاروتنوئید، بهینه سازی شرایط کشت مانند منابع کربنی، نیتروژنی، pH محیط کشت، دمای انکوباسیون، سرعت همزنی محیط کشت، میزان مایه تلقیح اولیه و ... در تولید کاروتنوئیدها بسیار حائز اهمیت است (Cabral *et al*. 2011; Kirti *et al*. 2014). از آن‌جائی که تولید متابولیت‌های ثانویه توسط هر سویه میکروبی وابستگی زیادی به نوع سویه و همچنین نیازمندی‌های غذایی خاص آن و نوع محیط کشت دارد، بنابراین ضرورت دارد که برای هر سویه میکروبی شرایط بهینه‌ی تولید یک محصول مورد بررسی قرار گیرد (Rajeswari *et al*. 2015).

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات شرایط مختلف کشت ازجمله منابع کربنی و نیتروژنی در تولید زیست‌توده و کاروتنوئید توسط باکتری *Deinococcus radiodurans R1* بوده است. به‌علاوه فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و سمیت سلولی کاروتنوئید تولیدی توسط این سویه نیز موردبررسی قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم، شرایط کشت، و تهیه مایه تلقیح

سویه‌ی موردبررسی در مطالعه‌ی حاضر به نام *Deinococcus radiodurans R1* با شماره‌ی دسترسی ATCC 13939 و IBRC-M10806 از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شده است. کشت خالص این باکتری، در محیط کشت تریپتون-گلوکز-عصاره مخمر آگار (pH۷/۲)، حاوی ۵ گرم بر لیتر تریپتون، ۱ گرم بر لیتر گلوکز، ۵ گرم بر لیتر عصاره‌ی مخمر و ۱۵ گرم بر لیتر آگار با استفاده از کشت خطی به‌دست آمد (Basha *et al*., 2009). سپس برای تهیه مایه تلقیح یک لوپ پر از باکتری در ۵mL محیط کشت مایع تریپتون-گلوکز-عصاره مخمر تلقیح و در دمای ۳۰C° گرمخانه گذاری شد تا کدورت محیط کشت معادل نیم مک فارلند یعنی CFU/mL $۱-۲ \times ۱۰^{۸}$ گردد. از این محیط برای تلقیح محیط‌های مختلف تولید کاروتنوئید، به میزان ۱ v/v درصد استفاده گردید.

بهینه‌سازی تولید کاروتنوئید

در مطالعه‌ی حاضر، منابع کربنی مانند گلوکز، سوکروز، مالتوز، نشاسته، زایلوز، سوربیتول و رافینوزو منابع نیتروژنی آلی و معدنی مانند عصاره‌ی مخمر، تریپتون، پپتون، کازئین، سولفات آمونیوم، نیترات کلسیم، نیترات پتاسیم و نیترات آمونیوم موردبررسی قرار گرفتند. محیط کشت بررسی اثر منابع کربنی بر تولید زیست‌توده و کاروتنوئید سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1*، یک محیط کشت مایع پایه حاوی ۱g/L عصاره مخمر، ۰/۱g/L پتاسیم دی فسفات (KH_2PO_4) و۱g/L از هر منبع کربنی است. همچنین، محیط کشت بررسی منابع نیتروژنی شامل ۱g/L گلوکز، ۰/۱g/L پتاسیم دی فسفات (KH_2PO_4) و ۱g/L از هر منبع نیتروژنی است. به علاوه، زیست‌توده و تولید کاروتنوئید سویه موردمطالعه در یک محیط کشت مقرون‌به‌صرفه یعنی محیط کشت آب‌پنیر (شرکت پگاه) در غلظت‌های ۴۰، ۵۰ و ۶۰ گرم بر لیتر نیز موردبررسی قرار گرفت. سترون کردن و پروتئین‌زدایی این محیط کشت در سه مرحله‌ی زیر انجام گرفت. ابتدا یک تیمار حرارتی به‌منظور پروتئین زدایی این محیط کشت در دمای ۱۱۰ C° به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو انجام شد. سپس با استفاده از کاغذ فیلتر شماره‌ی ۴۰ واتمن و همچنین با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه، رسوبات پروتئینی از مابقی محیط کشت جدا شدند؛ سپس محیط کشت حاصل، در دمای ۱۱۰ C° به مدت ۱۵ دقیقه دوباره اتوکلاو شد. سپس محیط های کشت آب پنیر مختلف، به میزان ۱ v/v درصد با

باکتری آماده شده (در بخش ۲-۱) تلقیح شد. در نهایت، تولید کاروتنوئید و میزان زیست‌توده‌ی میکروبی، پس از گذشت ۵ روز در انکوباتور ۳۰C° و با سرعت همزنی ۱۲۰rpm موردبررسی قرار گرفت (Khodaiyanet al., 2008).

استخراج کاروتنوئید

حلال‌های مختلف، شامل استون، متانول، کلروفورم، اتانول و N-هگزان برای جداسازی رنگیزه‌ی کاروتنوئید سویه موردمطالعه استفاده شدند. بدین منظور *Deinococcus radiodurans R1* در محیط کشت مایع تریپتون-گلوکز-عصاره مخمر تلقیح و به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ C° و سرعت همزنی ۱۲۰ rpm گرمخانه‌گذاری شد. سپس رسوب باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه به‌دست آمد. به رسوب باکتریایی به‌دست‌آمده حلال اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس و سپس در۱۰C° به مدت ۴۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس مخلوط حلال و رسوب باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع روئی حاصله جمع‌آوری گردید و به باقی‌مانده رسوب باکتریایی دوباره حلال اضافه شد. مراحل ذکرشده بعد از افزودن حلال دوباره تکرار گردید تا زمانی که رسوب باکتریایی بی‌رنگ شود. سپس مایع رویی (Supernatants) در۴۰C° خشک و در یخچال۴°C ذخیره‌سازی شد تا مورد سنجش قرار گیرد (Zamanian& Etemadifar, 2017). طیف جذبی عصاره کاروتنوئیدی به‌دست‌آمده توسط اسپکتروفوتومتر UV/Vis (Biochrom WPA BiowaveII, ZEISS Specord, Germany) در طول‌موج محدوده ۶۰۰nm-۳۰۰ به‌دست آمد تا تأیید شود با استفاده از کدام حلال بالاترین بازده کاروتنوئید بدون تغییر در ساختار اصلی به‌دست‌آمده است. به‌علاوه کروماتوگرافی لایه‌نازک (silica gel GF254 plate; Merck, Germany) نیز با استفاده از نسبت حلال ۲:۸ اتیل استات و N-هگزان انجام شد تا فرآیند استخراج کاروتنوئید تأیید گردد (Squillaci et al., 2017).

اندازه‌گیری میزان کاروتنوئید و زیست‌توده‌ی میکروبی

به‌منظور تعیین زیست‌توده‌ی میکروبی در محیط کشت آب‌پنیر، ۱۰۰ml از محیط کشت مربوطه، به میزان ۱ v/v درصد کشت باکتری آماده شده (در بخش ۱-۲) تلقیح شد و همچنین ۱۰۰ml از محیط کشت کنترل که حاوی تمام ترکیبات محیط کشت فوق اما بدون تلقیح باکتری است، به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل از هر دو محیط کشت در دمای ۷۰C° به مدت ۷۲ ساعت خشک گردید. سپس رسوبات حاصله وزن شدند. زیست‌توده‌ی میکروبی از تفاضل وزن رسوب حاصل از محیط کشت حاوی سویه‌ی باکتریایی و وزن رسوب حاصل از محیط کشت کنترل به دست آمد.

میزان کاروتنوئید تولیدشده در محیط‌های کشت مختلف ازنظر منابع کربنی و نیتروژنی، با استفاده از ۱۰ml محیط کشت تلقیح شده و بر اساس معادله شماره ۱ به دست آمد (NasriNasrabadi&Razavi, 2010).

$$Total\ cartonoides\ \left(\frac{\mu g}{L}\right) = \frac{(A_{474}) \times (V_S) \times (10^9)}{(A^{\%1}_{1\,cm}) \times (100)} \qquad (1)$$

در معادله شماره ۱، $A_{474}Vs$، و $A^{1\%}_{1\,cm}$ به‌ترتیب برابر با حداکثر جذب کاروتنوئید تام در اتانول در طول‌موج ۴۷۴nm، حجم نمونه و ضریب جذب ویژه‌ی کاروتنوئید تام در محلول ۱ درصد آن در اتانول و در یک کووت یک سانتی‌متری (برابر با ۲۲۰۰) می‌باشد.

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی سویه‌ی موردمطالعه، با استفاده از تست‌های به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاکنندگی آهن بر طبق روش کار منابع ذکرشده با اندکی تغییرات بررسی شد (Benzie & Szeto,1999; Sharma & Bhat, 2009).

به‌منظور انجام تست به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد، از رادیکال‌های ترکیبی به نام ۲و ۲- دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH=diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals-2 ,2) استفاده شد. DPPH یک رادیکال آزاد لیپوفیل است که حداکثر جذب آن در ۵۱۷ nm است. این تست بر این اصل استوار است که محلول متانولی DPPH که به رنگ بنفش است، با استفاده از توانایی الکترون دهندگی و یا آنتی‌اکسیدانی رنگیزه‌ی مورد آزمایش، به زرد تغییر می‌کند و بنابراین حداکثر جذب آن در ۵۱۷ nm به‌صورت خطی کاهش می‌یابد. به‌منظور انجام تست به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد، غلظت‌های مختلف رنگیزه استخراج‌شده (۰/۰۵-۱۰ mg⁄ml) در۱mL آب دوبار تقطیر حل و سپس به آن‌ها ۱ml از محلول متانولی DPPH در غلظت ۰/۱mM اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفت و درنهایت جذب محلول در ۵۱۷nm اندازه‌گیری شد (Ferreira et al., 2007).

روش احیای آهن، روشی سریع و مناسب برای اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی ترکیبات است و می‌تواند به‌عنوان شاخصی از قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مورداستفاده قرار گیرد. توانایی رنگیزه‌ها برای احیای آهن سه‌ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی در این تست سنجیده می‌شود. عوامل احیا کننده (آنتی‌اکسیدان)، منجر به احیای کمپلکس‌های فری سیانید و تبدیل آن‌ها به فرم فروس (Fe^{2+}) می‌گردد که بسته به ظرفیت احیاکنندگی رنگیزه‌های مورد بررسی، با تغییر رنگ محلول از زرد به درجات مختلفی از رنگ‌های آبی همراه است. به‌منظور بررسی قدرت احیاکنندگی به میزان ۰/۵-۱۰ µg⁄ml رنگیزه به ۱ml آب دو بار تقطیر افزوده شد و همراه ۲/۵ml بافر سدیم فسفات ۲۰۰ mM(pH۶/۶) و ۲/۵ml پتاسیم فری سیانید ۱ درصد و به مدت ۲۰ دقیقه در۵۰C° گرم‌خانه گذاری شدند. بعد از گذشت زمان گرم‌خانه گذاری، ۲/۵ml تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به محلول اضافه شد و محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس ۵ ml از محلول رویی به یک فالکون تازه منتقل و با ۵ ml آب دو بار تقطیر استریل و ۱ ml کلرید فریک ۰/۱ درصد مخلوط شد و بلافاصله جذب آن در

nm ۷۰۰ قرائت شد. افزایش جذب نسبت به محلول شاهد، نشان‌دهنده‌ی قدرت احیاکنندگی رنگیزه است. هرچه میزان جذب خوانده شد بیشتر باشد، قدرت احیاکنندگی نیز بیشتر خواهد بود (Tsai et al., 2006).

در هر دو تست، آسکوربیک اسید به‌عنوان نمونه کنترل مورداستفاده قرار گرفت. همچنین در هر دو تست، غلظتی از رنگیزه که توانائی مهار رادیکالی و یا احیای یون آهن به میزان ۵۰ درصد را دارا بود، توسط نموداری که محور افقی آن شامل غلظت‌های مختلف رنگیزه‌ی موردبررسی و محور عمودی آن بیانگر میزان مهار رادیکالی و یا احیای یون آهن بود، محاسبه گردید و به‌عنوان EC_{50} (Half-maximaleffective concentration) بررسی شد. بدیهی است که هر چه این عدد کوچک‌تر باشد قدرت آنتی‌اکسیدانی رنگیزه بیشتر است (Sasidharan et al., 2013; Tsai et al. 2006).

بررسی خاصیت ضد میکروبی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی

در این مطالعه از *Staphylococcus epidermidis PTCC 1114* و *Escherichia coli ATTCC 25922* برای بررسی خاصیت ضدمیکروبی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی از روش انتشار در چاهک استفاده شد. بدین منظور ۱۰۰ µl از محیط کشت مایع که باکتری در آن تلقیح شد و کدورتی معادل نیم مک فارلند داشت (معادل $۱-۲\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) بر روی پلیت حاوی مولرهینتون آگار به‌صورت کشت چمنی پخش و سپس چاهک گذاری گردید. سپس ۵۰ µl از رنگیزه‌ی استخراج‌شده درون چاهک اضافه گردید. از متانول به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷C° گرمخانه‌گذاری شد. درنهایت قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری اندازه‌گیری و گزارش شد (Manimala and Murugeston, 2014).

بررسی خاصیت سمیت سلولی رنگیزه کاروتنوئیدی

به‌منظور بررسی خاصیت سمیت سلولی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی، از تستMTT (3--2,5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) diphenyl tetrazolium bromide) و رده‌ی سلولی فیبروبلاست انسانی (HFB) موجود در آزمایشگاه کشت سلولی دانشگاه اصفهان استفاده گردید. 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. بدین منظور، $۱۰^{۴}$ سلول به همراه ۲۰۰ µl محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. سپس، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷C° و ۵ درصد CO_2، گرمخانه‌گذاری شد تا سلول‌ها رشد داشته باشند. غلظت‌های مختلف رنگیزه‌ی استخراج‌شده از *Deinococcus*

radiodurans R1 (۵۰۰µg/ml، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰)، با استفاده از محیط کشت استریل رقیق‌سازی و برای تیمار سلول‌ها استفاده گردید.

به‌منظور بررسی آماری نتایج برای هر تیمار سه تکرار (چاهک) در نظر گرفته شد. سه چاهک حاوی سلول‌های بدون هرگونه تیمار نیز به‌عنوان کنترل استفاده شدند. پس از گرمخانه گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷C° و ۵ درصد گاز CO_2، محیط کشت چاهک‌ها جدا و به‌جای آن ۱۰۰ µL محلول MTT (با غلظت ۰/۵mg/ml) به هر چاهک اضافه شد. سپس پلیت‌ها دوباره درون گرمخانهCO_2دار به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷C° گرمخانه‌گذاری شدند تا کریستال‌های نامحلول فورمازان درون چاهک‌ها تشکیل شود. سپس، چاهک‌ها به‌دقت تخلیه شد و به هر چاهک ۱۵۰ µl DMSO اضافه گردید تا کریستال‌های فورمازان حل گردد. درنهایت، میزان جذب هر چاهک در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با کمک دستگاه خواننده میکروپلیت اندازه‌گیری شد. از نسبت میزان جذب سلول‌های تیمار شده به میزان جذب سلول‌های کنترل (تیمار نشده) برای محاسبه‌ی قابلیت زنده ماندن سلول‌ها استفاده شد (Rezaeeyan*et al*., 2017).

آنالیزهای آماری

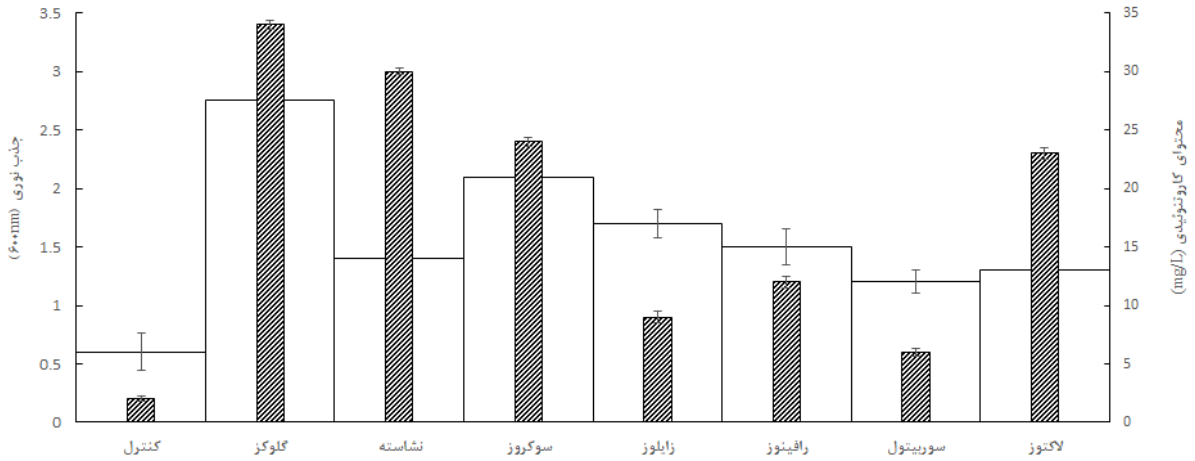
تست آنالیز واریانس و تست دامنه چندگانه دانکن (Duncan multiple range) توسط نرم افزار SPSS با سطح معنادار آماری ۹۵درصد به‌منظور بررسی معنادار بودن تفاوت‌های مشاهده‌شده بین نمونه‌های کنترل و تیمار شده مورداستفاده قرار گرفت. تمامی آزمایش‌ها به‌منظور بررسی‌های آماری به‌صورت سه تکرار انجام شدند.

نتایج و بحث

امروزه کاروتنوئیدها به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد خود ازجمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار موردتوجه قرارگرفته‌اند. این ترکیبات به دلیل خواص درمانی، ضد سرطانی، ضد انگلی، ضد باکتریائی، ضد آلرژی و همچنین به دلیل رنگ‌زا بودن، دارای اهمیت فراوانی در میان سایر ترکیبات ایزوپرنوئیدی می‌باشند (da Costa Cardoso et al., 2017; Briton and Khachik 2009; Chiste et al., 2014). عوامل مختلفی در تولید کاروتنوئیدها مؤثرند که از بین آن‌ها منابع کربنی و نیتروژنی و به‌طورکلی ترکیب محیط کشت بسیار اهمیت دارد (Shariati *et al*., 2019)؛ بنابراین در این مطالعه، به بررسی بهترین منبع کربنی و نیتروژنی که بتواند تولید کاروتنوئید را در سویه اکسترموفیل مقاوم به اشعه *Deinococcus radiodurans R1* افزایش دهد، پرداخته شده است.

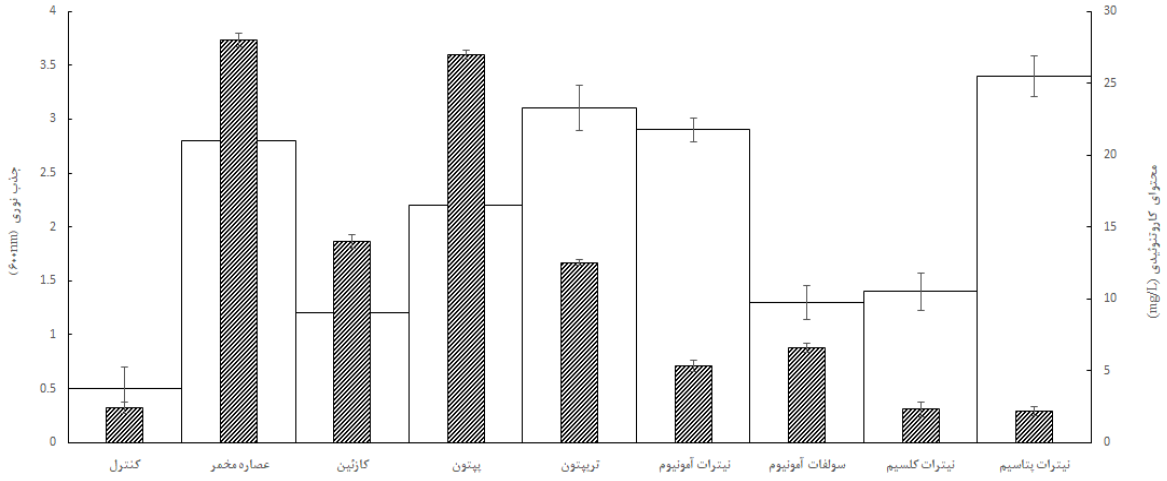
تمامی منابع کربن موردبررسی در این مطالعه، بر روی زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1* اثر معناداری از نظر آماری داشته‌اند. هرچند در مقایسه با کنترل، اثر گلوکز، سوکروز و گزیلوز بر روی زیست‌توده و همچنین اثرگلوکز، نشاسته و زایلوز بر روی تولید کاروتنوئید این سویه نسبت به بقیه منابع کربنی چشمگیرتر بوده است (شکل ۱).

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بااینکه نشاسته نسبت به سوکروز و زایلوز اثر افزایشی کمتری بر روی زیست‌توده‌ی باکتری داشته است، اما بیش از سوکروز و زایلوز منجر به افزایش تولید کاروتنوئید در سویه‌ی موردمطالعه شده است. در بین منابع کربنی، سوربیتول کمترین اثر مثبت را بر روی زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1* داشته است.



شکل ۱: اثر منابع کربنی مختلف بر زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1*. ستون‌های هاشور خورده مربوط به تولید کاروتنوئید و ستون‌های بدون هاشور نشان‌دهنده زیست‌توده‌ی میکروبی هستند.

نتایج بررسی منابع نیتروژن آلی و معدنی بر روی زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1* در شکل ۲ آورده شده است. تمام منابع نیتروژنی از نظر آماری بر روی زیست‌توده‌ی *Deinococcus radiodurans* اثر معناداری در سطح p-value <0.05 داشته‌اند. بااین‌حال، تولید کاروتنوئید توسط *Deinococcus radiodurans R1* در حضور نیترات پتاسیم و نیترات کلسیم افزایش معنادار آماری نشان نداده است. در مقایسه با کنترل، اثر نیترات پتاسیم، تریپتون، عصاره مخمر و نیترات آمونیوم بر روی زیست‌توده‌ی سویه‌ی موردبررسی و اثر عصاره مخمر و پپتون بر روی تولید کاروتنوئید چشمگیرتر بوده است.



شکل ۲: اثر منابع نیتروژنی مختلف بر زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1*. ستون‌های هاشور خورده مربوط به تولید کاروتنوئید و ستون‌های بدون هاشور نشان‌دهنده زیست‌توده‌ی میکروبی هستند.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در مورد نشاسته و نیترات پتاسیم بر سویه‌ی موردبررسی، می‌توان بیان کرد که ارتباط مستقیمی بین میزان تولید زیست‌توده‌ی میکروبی و تولید کاروتنوئید وجود ندارد. هرچند، وجود یک رابطه مستقیم بین میزان زیست‌توده‌ی میکروبی و تولید کاروتنوئید در مطالعات قبلی گزارش‌شده و به نظر منطقی می‌رسد (El-Banna *et al*., 2012).

از میان منابع کربنی و نیتروژنی موردبررسی، به ترتیب گلوکز و عصاره مخمر بیشترین افزایش را در تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1* داشتند. حداکثر میزان تولید کاروتنوئید به ترتیب در محیط کشت حاوی گلوکز (۳۴ mg/L)> نشاسته (۳۰ mg/L)>عصاره مخمر (۲۸ mg/L) > و پپتون (۲۷ mg/L) بوده است؛ بنابراین از بین منابع کربنی و نیتروژنی، می‌توان گفت به ترتیب گلوکز و عصاره مخمر بیش از منابع موردبررسی دیگر تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1* را افزایش داده‌اند. نتیجه مشابهی در مطالعه Zhao و همکاران (۲۰۰۲) بر روی سویه‌ی مخمری *Rhodotorula* sp. RY1801 مشاهده‌شده است (Zhao *et al*., 2002).

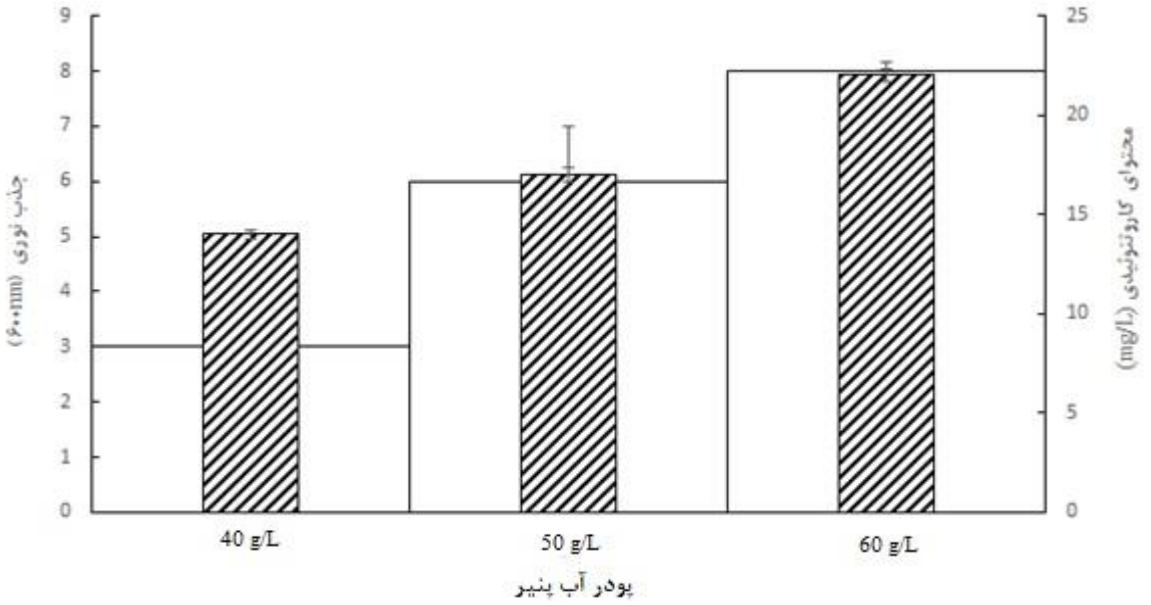
در مجموع می‌توان گفت منابع کربنی و به عبارت بهتر گلوکز بیشتر از منابع نیتروژنی برافزایش تولید کاروتنوئید در سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* اثرگذار بودند. به‌طوری‌که افزودن گلوکز در محیط تخمیر اولیه، تولید کاروتنوئید را تا ۱۷ برابر افزایش داده است. این نتیجه برخلاف نتایج قبلی گزارش‌شده پیرامون مهار کاتابولیتی گلوکز بر سنتز کاروتنوئید است. برای مثال Gmoser و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کرده‌اند که تولید کاروتنوئید توسط *Neurospora Intermedia* در حضور گلوکز به‌شدت کاهش می‌یابد (Gmoser *et al*., 2018)؛ اما مطالعات قبلی دیگری نیز بوده‌اند که نشان داده‌اند مهار کاتابولیتی گلوکز بر روی کاروتنوئید سنتز شده توسط سویه‌های میکروبی موردبررسی، وجود نداشته است (Alcaíno*et al*., 2016; Mitra *et al*., 2015).

همچنین از بین منابع نیتروژنی آلی و معدنی، منابع نیتروژنی آلی بیشتر از منابع نیتروژنی معدنی، منجر به افزایش تولید کاروتنوئید در سویه‌ی R1 شدند. از طرفی با توجه به شکل ۲ می‌توان دریافت یون‌های مختلف نیترات مانند نیترات آمونیوم، نیترات کلسیم و نیترات پتاسیم اثرهای متفاوتی بر تولید کاروتنوئید و زیست‌توده‌ی سویه میکروبی داشتند. درحالی‌که از میان منابع نیتروژنی معدنی، آمونیوم سولفات بیشتراز بقیه‌ی منابع نیتروژنی معدنی منجر به افزایش تولید کاروتنوئید شده است. نتیجه‌ی مشابهی در مطالعه‌ی El-Banna و همکاران (۲۰۱۲) بر روی سویه‌ی *Rhodotorula glutinis* به‌دست‌آمده است (El-Banna *et al*., 2012)؛ بنابراین همان‌طور که مشاهده می‌شود در دو سویه‌ی *Rhodotorula* sp. RY1801 و *Rhodotorula glutinis* به ترتیب بهترین منبع نیتروژنی مؤثر بر تولید کاروتنوئید عصاره مخمر و آمونیوم سولفات است. از طرفی، هرچند نیترات پتاسیم اثر کمی در افزایش تولید کاروتنوئید سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* داشته است، اما این منبع نیتروژنی بهترین منبع نیتروژنی برای سویه‌های مولد کاروتنوئید از *Micrococcus* بوده است (Mohana *et al*., 2013)؛ بنابراین، می‌توان گفت در مورد هر سویه‌ی میکروبی ممکن است منبع کربنی یا نیتروژنی متفاوتی برای تولید کاروتنوئید مؤثر باشد و نیازمندی هر سویه‌ی میکروبی با وجود اینکه ممکن است ارتباط فیلوژنتیکی نزدیکی با هم داشته باشند، بسیار متفاوت است.

بررسی تولید کاروتنوئید در محیط کشت حاوی منبع کربنی ۱ g/L گلوکز و منبع نیتروژنی۱g/L عصاره‌ی مخمر نشان داد که تولید کاروتنوئید به میزان ۳۷mg/L رسیده و بنابراین به عنوان محیط کشت بهینه‌ی تولید کاروتنوئید بر اساس رهیافت یک فاکتور در یک زمان در نظر گرفته شد.

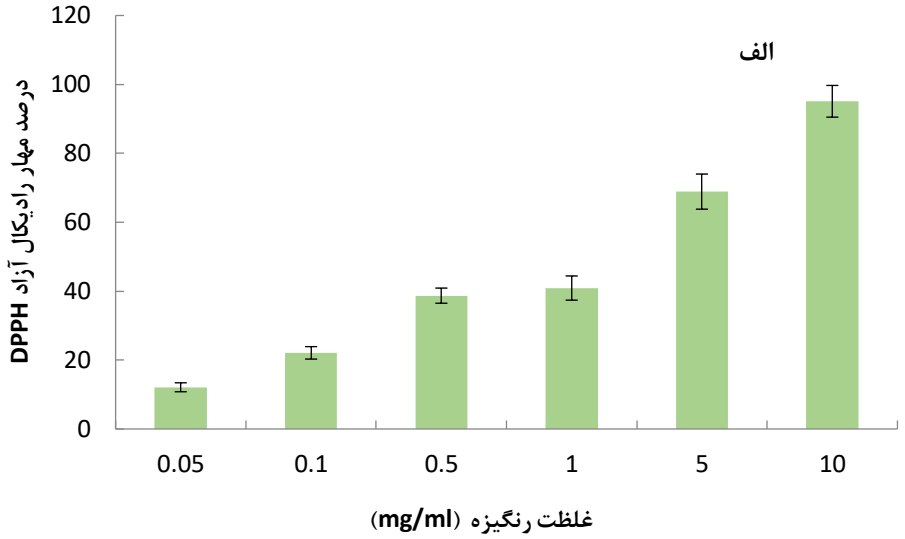
در مطالعه‌ی حاضر از محیط کشت آب‌پنیر نیز به‌عنوان محیط کشت تخمیری اولیه استفاده شده است. علاوه بر مقرون به صرفه بودن، که لازمه‌ی انتخاب محیط کشت برای تولید صنعتی یک محصول صنعتی است، این محیط کشت حاوی مواد مغذی فراوانی به‌منظور تولید زیست‌توده و تولید محصولات تجاری پیچیده می‌باشد. نتایج مربوط به میزان تولید زیست‌توده و کاروتنوئید درمحیط کشت آب‌پنیر در شکل ۳ به نمایش درآمده است. با توجه به این شکل، حداکثر میزان تولید هم از نظر زیست‌توده و هم ازنظر تولید کاروتنوئید در غلظت۶۰g/L محیط کشت پودرآب‌پنیر بوده است. محیط کشت آب‌پنیر، حاوی ۴/۵ درصد لاکتوز و ۰/۸ درصد کازئین می‌باشد (Siso, 1996)؛ بنابراین محیط کشت پودرآب‌پنیرg/L ۶۰ حدود ۲/۷ گرم لاکتوز به‌عنوان منبع کربن و ۰/۴۸ گرم کازئین به‌عنوان منبع نیتروژن در هرml ۱۰۰دارد و تقریباً محیط کشتی غنی از منابع کربنی و نیتروژنی محسوب می‌شود. از طرفی، نتایج این مطالعه نشان داده است که هم لاکتوز و هم کازئین بر افزایش تولید کاروتنوئید اثر مثبتی داشته‌اند (شکل ۱ و ۲) اگرچه میزان کاروتنوئید تولیدی در محیط کشتg/L ۶۰ پودرآب‌پنیر (۲۲ mg/L) کمتر از محیط کشت پایه حاوی گلوکز (۳۴mg/L) بوده است، استفاده از محیط کشت آب‌پنیر به‌منظور تولید مقرون‌به‌صرفه برای تولید صنعتی این کاروتنوئید پیشنهاد می‌گردد. از طرف دیگر، آب‌پنیر یک محصول جانبی در صنایع لبنی است که دورریزی آن

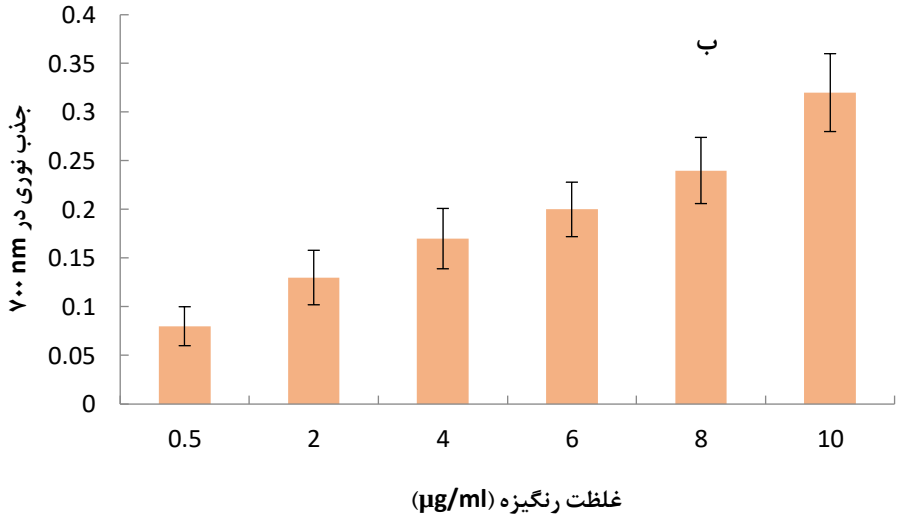
می‌تواند منجر به افزایش آلودگی‌های محیطی به دلیل افزایش مواد آلی در منابع آبی گردد؛ بنابراین استفاده از آب‌پنیر به حفظ محیط‌زیست نیز کمک خواهد کرد (Kanzy *et al*., 2015).



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف محیط کشت آب‌پنیر بر زیست‌توده و تولید کاروتنوئید *Deinococcus radiodurans R1*. ستون‌های هاشور خورده مربوط به تولید کاروتنوئید و ستون‌های بدون هاشور نشان‌دهنده زیست‌توده‌ی میکروبی هستند

در مقایسه با دیگر سویه‌های میکروبی مولد کاروتنوئید که در مطالعات قبلی گزارش‌شده‌اند میزان کاروتنوئید تولیدی توسط سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* در این مطالعه بیشتر بوده است (El-Banna*et al*., 2012; Mohana *et al*., 2013; Zhao *et al*., 2002). علت این امر می‌تواند مربوط به مقاومت این سویه در برابر اشعه‌های یونیزان و غیر یونیزان و اثر حفاظتی رنگیزه در برابر تنش‌های فوق باشد. به علاوه، رنگیزه‌ی تولیدی توسط این باکتری در تست‌های مربوط به خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز نتایج خوبی را نشان داد (شکل ۴). نتیجه بررسی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی تولیدشده توسط *Deinococcus radiodurans R1*، *درتست* قدرت احیاکنندگی یون‌های آهن فریک دارای EC_{50} (نصف حداکثر غلظت مؤثر) برابر با ۲۰/۱۹ µg/ml و در تست به دام اندازی رادیکال‌های آزاد برابر با ۳/۲۸mg/ml بوده است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی کاروتنوئید سویه R1 از خاصیت آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک اسید به‌عنوان شاهد بیشتر بود.



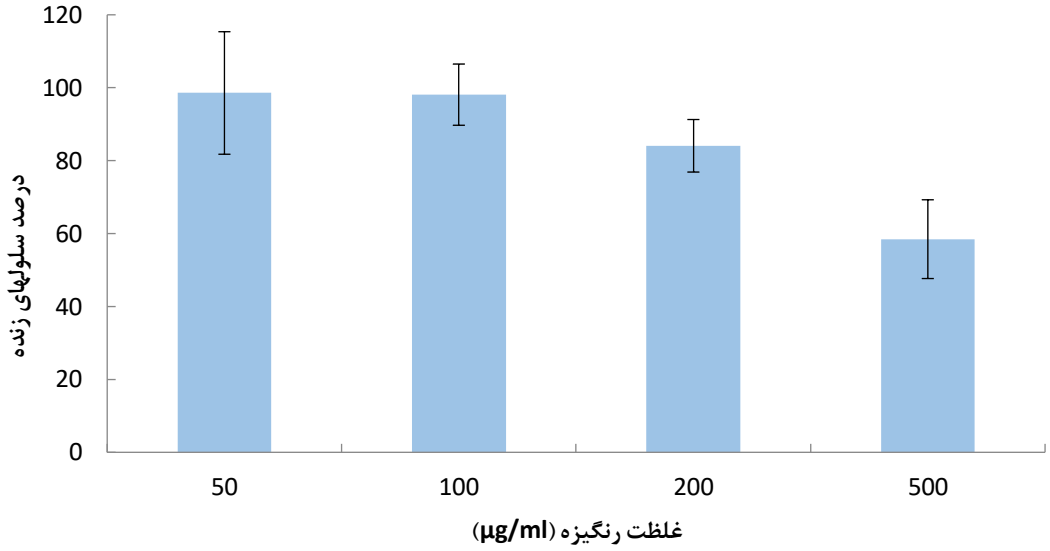


شکل ۴: بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگیزه کاروتنوئیدی *Deinococcus radiodurans R1* توسط تست‌های مهار رادیکال-های آزاد DPPH (الف) و بررسی میزان احیاکنندگی آهن فریک (ب)

با توجه به شکل ۴ –الف، با افزایش غلظت رنگیزه کاروتنوئیدی مورد مطالعه، میزان مهار رادیکال‌های آزاد در تست DPPH افزایش یافته است. به نحوی که در غلظت ۱۰ mg/mL این رنگیزه حداکثر مهار حاصل گردید. نتایج مشابهی نیز در مورد تست احیای یون‌های فریک مشاهده می‌شود (شکل ۴-ب). هر دو تست، نتایج تست آنالیز واریانس را تأیید می‌کند و با افزایش غلظت کاروتنوئید، خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز به طور معناداری افزایش می‌یابد.

نتایج تست MTT به منظور بررسی خاصیت سمیت سلولی، رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی تولیدی توسط سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* بر روی رده‌ی سلولی فیبروبلاست انسانی نشان داد که در غلظت‌های ۲۰۰ µg/ml≤ کاروتنوئید،

میزان زنده ماندن سلول‌های کشت در حضور رنگیزه‌ی مورد بررسی، بالاتر از ۶۰ درصد بوده است و در نتیجه در این محدوده‌ی غلظت، رنگیزه‌ی مورد مطالعه، اثرات مهاری چندانی بر رشد رده‌ی سلولی فیبروبلاست انسانی نشان نداده است (شکل ۵).



شکل ۵: نتایج بررسی سمیت سلولی رنگیزه‌ی کاروتنوئیدی *Deinococcus radiodurans R1* بر روی رده‌ی سلولی فیبروبلاست انسانی با استفاده از تست MTT

همچنین رنگیزه‌ی مورد مطالعه، خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های *Staphylococcus epidermidis* و *Escherichia coli* از خود نشان نداد و هاله‌ی عدم رشد تشکیل نگردید. این نتیجه تایید کننده این مطلب است که در صورت استفاده از این رنگیزه در صنایع غذایی یا در محصولات آرایشی، فلور طبیعی بدن در پوست و گوارش تحت تاثیر قرار نمی‌گیرند.

نتیجه‌گیری کلی

حداکثر میزان تولید کاروتنوئید توسط *Deinococcus radiodurans R1* به ترتیب توسط منبع کربنی و نیتروژنی ۱g/L گلوکز (۳۴ mg/L) و ۱g/L عصاره مخمر (۲۸ mg/L) به دست آمد. عصاره کاروتنوئیدی حاصل از سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیر بوده است. به‌علاوه، با توجه به نتایج این مطالعه، از مزایای دیگر این کاروتنوئید می‌توان به عدم سمیت آن بر روی سلول‌های نرمال بدن انسان و بر روی دو باکتری فلور میکروبی بدن اشاره کرد؛ بنابراین سویه‌ی *Deinococcus radiodurans R1* را می‌توان به‌عنوان کاندیدی مناسب در تولید رنگیزه‌ی موردنیاز صنایع غذایی و دام و یا به‌عنوان تولید کننده‌ی رنگیزه‌ی موردنیاز در تهیه کرم‌های ضد آفتاب معرفی کرد.

سپاسگزاری: حمایت مالی این تحقیق، توسط دانشگاه اصفهان بوده است. همچنین از خانم سیده نرجس زمانیان برای انجام تست آنتی‌اکسیدان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Alcaíno, J., Bravo, N., Córdova, P., Marcoleta, A. E., Contreras, G., Barahona, S., and Cifuentes, V. (2016). The involvement of Mig1 from *Xanthophyllomyces dendrorhous* in catabolic repression: an active mechanism contributing to the regulation of carotenoid production. PloS one, 11(9): e0162838-62.

Basha, N. S., Rekha R., Komala M., and Ruby S. (2009). Production of extracellular anti-leukaemic enzyme lasparaginase from marine actinomycetes by solidstate and submerged fermentation: Purification and characterisation. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 8(4): 353-360.

Benzie, I. F., and Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. Journal of agricultural and food chemistry, 47(2): 633-636.

Britton, G., and Khachik, F. (2009). Carotenoids in food. Carotenoids, 45-66.

Cabral, M. M. S., Cence, K., Zeni, J., Tsai, S. M., Durrer, A., Foltran, L. L., ... and Treichel, H. (2011). Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. European Food Research and Technology, 233(1), 159-166.

Chisté, R.C., Freitas, M., Mercadante, A.Z., and Fernandes, E. (2014). Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes. Life Sciences 99, 52-60.

da Costa Cardoso, L.A., Kanno, K.Y.F., and Karp, S.G. (2017). Microbial production of carotenoids A review. African Journal of Biotechnology 16, 139-146.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., and Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Critical reviews in food science and nutrition, *40*(3): 173-289.

El-Banna, A. A., El-Razek, A. M. A., and El-Mahdy, A. R. (2012). Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. glutinis. Food and Nutrition Sciences, 3(01): 64-71.

Ferreira ICFR, Barros L, Soares ME, et al. (2007) Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. Food Chemistry 103: 188-195

Gabani, P., and Singh, O. V. (2013). Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. Applied microbiology and biotechnology, 97(3): 993-1004.

Gmoser, R., Ferreira, J., Lundin, M., Taherzadeh, M., and Lennartsson, P. (2018). Pigment production by the edible filamentous fungus *Neurospora intermedia*. Fermentation, 4(1): 11-26.

Ito, H., Watanabe, H., Takehisa, M., and Iizuka, H. (1983). Isolation and identification of radiation-resistant cocci belonging to the genus *Deinococcus* from sewage sludges and animal feeds. Agricultural and biological chemistry, *47*(6): 1239-1247.

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. Biochemical Engineering Journal. 40, 415-422.

Kanzy, H. M., Nasr, N. F., El-Shaz, H. A. M., and Barakat, O. S. (2015). Optimization of carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4(1): 456-469.

Kirti, K., Amita, S., Priti, S., Mukesh Kumar, A., and Jyoti, S. (2014). Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. Advances in Biology, 2014.

Manimala MR, and Murugesan R. (2014). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of carotenoid pigment extracted from *Sporobolomyces* sp. isolated from natural source. Journal of Applied and Natural Science. 6(2): 649-653.

Mitra, R., Samanta, A. K., Chaudhuri, S., and Dutta, D. (2015). Growth kinetics and carotenoid production of a newly isolated bacterium on glucose as a carbon source during batch fermentation. 5th Annual International Conference on Advances in Biotechnology (BioTech 2015), 13-15 March, Kanpur, India.

Mohana, D., Thippeswamy, S., andAbhishe, R. (2013). Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. Radiation Protection and Environment, 36(4): 168-174.

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. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 27(4): 517-529.

Oliver, J., and Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. Journal of chromatography A, 881(1-2): 543-555.

Rajeswari, P., Jose, P. A., Amiya, R., &Jebakumar, S. R. D. (2015). Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. Frontiers in Microbiology, 5, 753.

Rezaeeyan, Z., Safarpour, A., Amoozegar, M. A., Babavalian, H., Tebyanian, H., andShakeri, F. (2017). High carotenoid production by a halotolerant bacterium, *Kocuria* sp. strain QWT-12 and anticancer activity of its carotenoid. Excli journal, 16: 840-851.

Sandmann, G. (2014). Carotenoids of biotechnological importance. Pages 449-467 in Biotechnology of Isoprenoids, Springer.

Sasidharan P, Raja R, Karthik C, Ranandkumar S, and Indra Arulselvi P. (2013) Isolation and characterization of yellow pigment producing *Exiguobacterium* sps. Journal of Biochemical Technology 4(4): 632-635.

Shariati, S., Zare, D., &Mirdamadi, S. (2019). Screening of carbon and nitrogen sources using mixture analysis designs for carotenoid production by *Blakesleatrispora*. Food science and biotechnology, 28(2), 469-479.

Sharma, O. P., and Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. Food chemistry, 113(4): 1202-1205.

Siso, M. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresource Technology, 57(1), 1-11.

Squillaci, G., Parrella, R., Carbone, V., Minasi, P., La Cara, F., and Morana, A. (2017). Carotenoids from the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*: Identification and antioxidant activity. *Extremophiles*, *21*(5): 933-945.

Tian, B., Sun, Z., Shen, S., Wang, H., Jiao, J., Wang, L., and Hua, Y. (2009). Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. Letters in applied microbiology, 49(6): 689-694.

Tsai S-Y., Huang S-J., and Mau J-L., (2006) Antioxidant properties of hot water extracts from Agrocybecylindracea. Food Chemistry 98: 670-677.

Zhao, J. H., Bai, F. Y., Guo, L. D., and Jia, J. H. (2002). *Rhodotorula pinicola* sp. nov., a basidiomycetous yeast species isolated from xylem of pine twigs. FEMS yeast research, 2(2): 159-163.

Zamanian, S. N., and Etemadifar, Z. (2017). Radical scavengering of pigments from novel strains of *Dietzia schimae* and *Microbacteriumest eraromaticum.* Progress in Biological Sciences, 6(2): 159-170.

Evaluation of Biomass and Total Carotenoids Content of *Deinococcus radiodurans R1* in Response to Different Carbon and Nitrogen Sources

A. Salehi Bakhtiyari[1], Z. Etemadifar[1*], M. S. Borhani[2]

Received:2020.4.20
Accepted:2021.12.19

Abstract

In the present study, the effect of different carbon and nitrogen sources on the microbial biomass and carotenoid production of *Deinococcus radiodurans*, one of the most radiation-resistant microorganisms, was evaluated using one-factor-at-a-time approach. The antioxidant, cytotoxicity and antibacterial properties of the pigment were also evaluated. The carotenoid pigment had EC_{50} (Half maximal effective concentration) of 20.19µg/mL and EC_{50} =3.28mg/mL in the ferric reducing antioxidant power and free radical scavenging assay, respectively. The maximum amount of carotenoid pigment was achieved in the presence of 1g/L glucose (34 mg/L) and 1g/L yeast extract (28 mg/L). Based on the approach of one factor at a time, the optimal conditions for carotenoid production were obtained as 37 mg/L pigment in culture medium containing 1 g/L glucose carbon source and 1 g/L nitrogen source of yeast extract. Besides, the pigment had no toxic or inhibitory effects on the human fibroblast cell line and two bacteria *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*.

Keywords: *Antioxidant, Optimization, Pigment, Radiophile*

1- Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
*(Corresponding author: z.etemadifar@sci.ui.ac.ir)
2- Department of Biology, Faculty of Science, Gonbad Kavous University, Golestan, Iran