جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان 1390، دوره سوم، شماره نهم، صفحه 28-19

جداسازی و شناسایی مولکولی میکروارگانیسم های تولید کننده رنگدانه و بررسی سمیت حاد رنگدانه ها

معصومه محرابی[1]، علی ناظمی[1]، آیت الله نصرالهی[1]

1. گروه میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد واحد تنکابن

نویسنده مسؤول: دکتر علی ناظمی، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن. alinazemy@yahoo.com

دریافت: 90/4/1 پذیرش: 90/6/15

چکیده

زمینه و هدف: تولید رنگدانه توسط میکروارگانیسم ها نسبت به منابع دیگر بسیار اهمیت دارد، زیرا میکروارگانیسم ها با رشد سریع ، بازدهی بالاتر و استخراج راحت تر مزایای بیشتری دارند. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی میکروارگانیسمهای تولید کننده رنگدانه از خاکهای مناطق غرب استان مازندران در نیمه دوم سال 1389 و بررسی اثرات سمی رنگدانه ها می باشد.

روش بررسی: 70 نمونه خاک از کوههای غرب استان مازندران جمع آوری و پس از تهیه رقت، هرنمونه بر روی محیط نوترینت آگار و سابورود دکستروز آگار کشت داده شد. سپس کلنی هایی با تولید رنگدانه انتخاب شدند. استخراج رنگدانه از طریق عصاره گیری رسوب بوسیله متانول انجام شد. تعداد ترکیبات عصاره رنگی بوسیله TLC شناسایی گردید. شناسایی مولکولی میکروارگانیسم ها از طریق rDNA PCR Sequencing انجام شد. همچنین سمیت حاد خوراکی رنگدانه ها بر موش های سوری ارزیابی گردید.

یافته ها: 7 میکروارگانیسم شامل *Aspergillus sp*، *Aerococcus* viridans، *Methylobacterium sp*، *Bacillus sp*، *Eurotium rubrum* ، *Microbacterium testaceum* و *Acinetobacter johnsonii* شناسایی شدند. بررسی سمیت رنگدانه میکروارگانیسم ها بر روی موش در حداکثر دوز فاقد مرگ ومیر بود. بررسی آنزیم های کبدی و هیستوپاتولوژی نشان دهنده اثرات سمی اما قابل برگشت در حداکثر دوز بر بافت کبد بوده است.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه رنگدانه های طبیعی در دوز مناسب سالم تر از نوع شیمیایی هستند، استفاده آنها در صنایع مختلف مفید می باشد. همچنین با تعیین ساختار رنگدانه ها و حذف گروههای سمی رنگدانه ها می شود در صنایع مختلف استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: rDNA PCR Sequencing ، رنگدانه ، سمیت حاد خوراکی

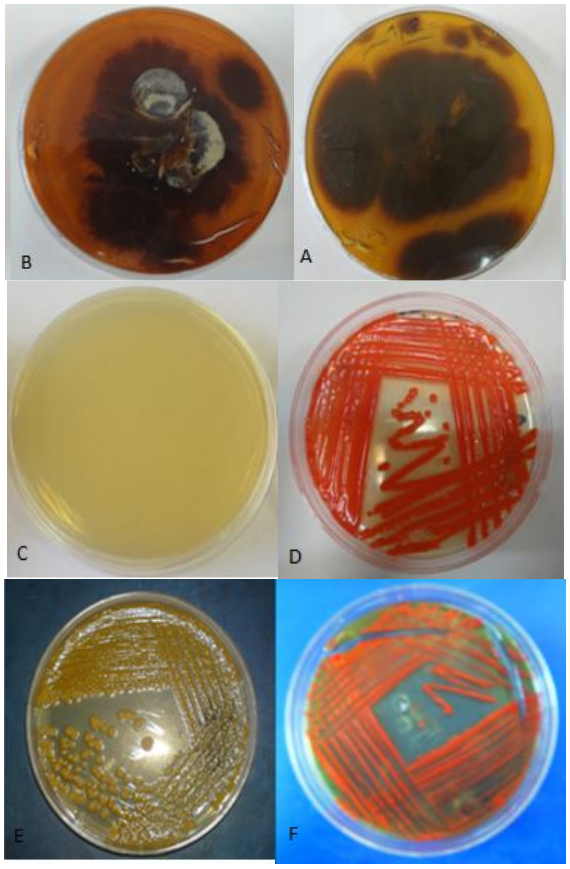
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

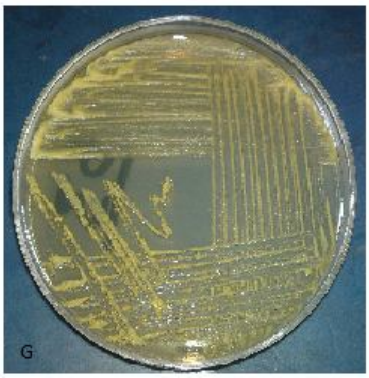
بسیاری از رنگدانه هایی که امروزه در در روند تولید مواد غذایی، مواد رنگی ،آرایشی و دارویی بکار می روند شامل تاثیرات مضر متعددی هستند ، به منظور مقابله با این تاثیرات زیان آور گرایشی جهانی نسبت به تولید رنگدانه ها از منابع طبیعی ایجاد شده است (1). رنگدانه های طبیعی از دو منبع مهم گیاهان و میکروارگانیسم ها حاصل می شوند (2). رنگدانه های مجاز خوراکی و طبیعی با منشاء گیاهی اشکالات متعددی از قبیل بی ثباتی در برابر نور ، گرما ،pH ، حلالیت کم و اغلب عدم دسترسی آسان در طول سال را در پی دارند (۳،۴). تولید رنگدانه از میکروارگانیسم ها با توجه به رشد سریع و آسان ، محیط کشت ارزان ، استخراج راحت تر، عدم وابستگی به شرایط جوی و گستردگی تنوع رنگ بیشتر نسبت به سایر منابع زیستی دارای مزایای بیشتری است (5). بسته به نوع ترکیبات، آنها عملکردهای متفاوت و متنوعی برای میزبان دارند بطور مثال عمل حفاظتی در برابر فتو اکسیدانت های کشنده مثل کارتنویید ها ، حفاظت در برابر استرس های محیط مثل ملانین ها و به عنوان کوفاکتور در کاتالیز آنزیم ها مثل فلاوین ها را دارند(۶،۷). برای مثال پرودیجیوسین رنگدانه ی حاوی پیرول که معمولاً در سراشیا ، استرپتومایسس و گونه های ویبریو یافت شده خواص ضد باکتریایی را به خوبی نشان داده است. بطور مشابه ویولاسین بنفش از گونه ی کروموباکتریوم علاوه بر داشتن خواص ذاتی آنتی بیوتیکی، توانایی مقاومت در برابر شکار توسط پروتوزوا را دارد(8). رنگ های تخمیری که امروزه کاربرد دارند از میکروارگانیسم هایی همچون *D. salina* ، *B. trispora* ، Spirolina و *Monascus* استخراج می شوند(9). مطالعات اخیر نشان داده که برخی از این رنگدانه ها دارای عملکردهای بیولوژیکی مهمی از جمله فعالیت آنتی بیوتیکی، ضد قارچی ، ضد توموری ، تضعیف کنندگی سیستم ایمنی هستند از اینرو بسیاری از آنها اثرات شیمی درمانی بالقوه ای دارند. بطور کلی متابولیت های رنگی میکروارگانیسم ها کاربرد های متنوعی در صنایع مختلف دارند، هدف از این مطالعه جداسازی میکروارگانیسم ها یا سویه های جدید تولید کننده رنگدانه و همچنین بررسی سمیت حاد رنگدانه های حاصل در مدل حیوان آزمایشگاهی می باشد.

روش بررسی

نمونه گیری: 70 نمونه خاک جنگلی از مناطق مختلف واقع درغرب استان مازندران جمع آوری شد. با محلول نرمال سالین 0/9% از یک گرم خاک سوسپانسیون و سریال رقت تهیه شد و رقت های 10^{-1} تا 10^{-7} برروی محیط Nutrient Agar و از سوسپانسیون اصلی نمونه (نمونه فاقد رقت) تا رقت 10^{-3} بر روی محیط کشت Sabouraud Dextros Agar بصورت سفره ای کشت داده شدند، بعد از کشت ، محیط S.D.A در دمای اتاق و در جای تاریک و محیط N.A در دمای 30 درجه سانتی گراد انکوبه شد. دوره انکوباسیون برای نمونه‌های قارچی در S.D.A به مدت 10 الی 20 روز و برای نمونه‌های باکتریایی در N.A به مدت 48 تا 72 ساعت بوده است. بعد از دوره انکوباسیون کلنی هایی که بیشترین شدت رنگ را داشتند انتخاب شدند(شکل 1) و سپس برای استخراج رنگدانه مجددا کشت داده شدند.



جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



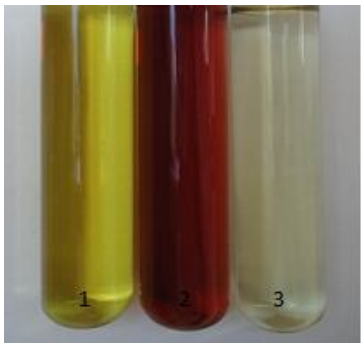
شکل 1. شکل ظاهری ایزوله های باکتریایی و قارچی
A= *Aspergillus sp* , B= *Eurotium rubrum* ,
C= Control , D= *Acinetobacter johnsonii* ,
E= *Bacillus sp* , F=*Microbacterium testaceum* ,
G= *Aerococcus* viridans

rDNA- PCR Sequencing: به منظور استخراج DNA از باکتریها و قارچ های تولید کننده رنگدانه از روش CTAB استفاده گردید(10). تکثیر بخشی از ژن rDNA طبق روش Zheng برای نمونه های باکتریایی و White برای نمونه های قارچی با پرایمرهای ارائه شده در جدول 1 در دستگاه BioRad (My Cycler) انجام شد(۱۱،۱۲). حجم کلی واکنش برای نمونه های باکتریایی 50 µl بوده و 100 ng از هر نمونه DNA با 5µl 10Xbuffer، 2mM $MgCl_2$، dNTPs ، 0/2 Mm از هر یک از پرایمرها 1/25 واحد از آنزیم Taq ترکیب شد. شرایط انجام واکنش شامل دناتوراسیون اولیه در 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه و سپس 35 سیکل شامل 94 درجه به مدت 60 ثانیه ، 59 درجه به مدت 60 ثانیه و 72 درجه به مدت 90 ثانیه و گسترش نهایی در72 درجه به مدت 15 دقیقه انجام شد. جهت شناسایی مولکولی DNA های قارچی حجم کلی واکنش 50 µl بوده و 100ng از هر نمونه DNA با 5 µl 10Xbuffer، 6 µl 25mM $MgCl_2$، mM dNTPs ، 0/2 pmol 25 از هر یک از پرایمرها و 2/5 واحد از آنزیم Taq ترکیب شد. شرایط انجام واکنش شامل دناتوراسیون اولیه 95 درجه به مدت 5 دقیقه و سپس 35 سیکل شامل 95 درجه به مدت 40 ثانیه ، 55 درجه به مدت 60 ثانیه 72 درجه به مدت60 ثانیه گسترش نهایی در 72 درجه به مدت 5 دقیقه انجام شد. سپس محصولات تکثیر برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

جدول1. پرایمر استفاده شده برای rDNA – PCR

پرایمر	توالی از '3-'5	اندازه تکثیر	منبع
پرایمرهای باکتریایی	(U8F)AGAGTTTGATCCTG GCTCAG	1400 bp	11
	(U1390R)GACGGGCGGTGT GTACAA		
پرایمرهای قارچی	(ITS1)TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	550 bp	12
	(ITS4)TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		

استخراج رنگدانه: به منظور استخراج رنگدانه ابتدا میسلیوم‌ها ی قارچی و سلول های باکتریایی از محیط کشت از طریق سانتریفوژ در دور 3500 rpm به مدت 15 دقیقه رسوب داده شد. رنگدانه از سلولها با استفاده از متانول 99/8% (Merck) استخراج گردید. عمل استخراج به این ترتیب انجام گرفت که به ازای هر گرم توده سلولی 5 میلی لیتر متانول به رسوب اضافه گردید و به مدت 24 ساعت در دمای اطاق روی شیکر با دور 200 rpm مخلوط گردید. سپس محلول رویی رنگی پس از سانتریفوژ در دور 3500 rpm به مدت 15 دقیقه جدا (شکل 2) و درون آون با دمای 30 درجه سانتی گراد تا حذف کامل حلال نگهداری شد.



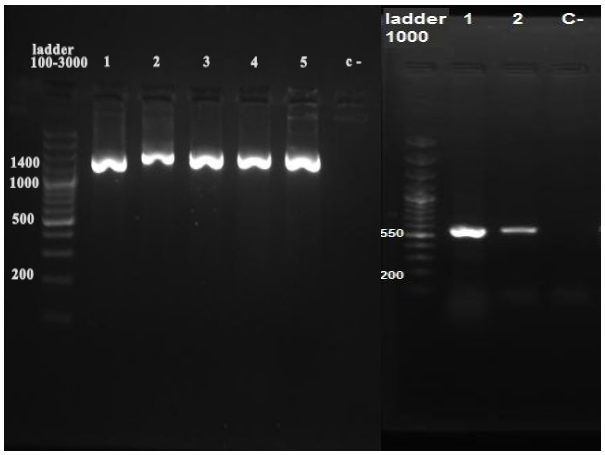
شکل 2. رنگ دو نمونه قارچ به همراه محیط شاهد.1) رنگدانه ی استخراج شده از قارچ *Eurotium rubrum* ، 2) رنگدانه ی استخراج شده از قارچ *Aspergillus sp* و 3) محیط شاهد(محیط کشت S.D.B)می باشد.

کروماتوگرافی لایه نازک: تعداد ترکیبات موجود در رنگدانه ی میکروارگانیسم ها به وسیله ی روش کروماتوگرافی لایه نازک سنجیده شد. پودر هر یک از رنگدانه های خام مجددا در 100میلی گرم بر میلی لیتر متانول حل شدند و کروماتوگرافی لایه نازک به کمک مخلوط حلال دی کلرو متان، اتیل استات و متانول(5:5:1) انجام شد. سپس تیغه TLC تحت طول موج UV مشاهده و بررسی شد.

بررسی اثر سمیت حاد رنگدانه‌ها بر روی موش سوری: از 7 میکروارگانیسم جداسازی شده، اثر سمیت 5 مورد که حاوی بیشترین رنگدانه بودند روی موش سوری نژاد آلبینو بررسی گردید. بدین منظور 18 موش بالغ جوان و سالم از مرکز انیستیتو پاستورایران خریداری شد. جنسیت تمام آنها ماده، میانگین سنی آنها حدود 30-25 روز و میانگین وزنی موش ها 28-30gr اندازه گیری شد. کلیه موشها قبل از آزمایش به مدت 12 ساعت از خوردن غذا و همچنین به مدت 3 تا 4 ساعت از آشامیدن آب محروم بودند. تمام مطالعات انجام شده بر روی حیوانات مطابق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (OECD/OCDE) صورت پذیرفت (13). در ابتدا طبق پروتکل OECD/OCDE برای تجویز دهانی رنگدانه از حداکثر دوز یعنی 2000 mg/kg استفاده شد. مقدار معینی از عصاره خشک رنگدانه ها در1 میلی لیترآب مقطر استریل حل شدند واز فیلتر غشایی 0/45 میکرون عبور داده شد. برای هر رنگدانه و شاهد 3 موش مورد استفاده قرار گرفت. رنگدانه ها در یک دوره زمانی 3 روزه (روز اول 2000 mg/kg ، روز دوم 2000 mg/kg ، روز سوم mg/kg 5000) به صورت دهانی و از طریق غذا تجویز شدند. گروه شاهد در طی 3 روز فقط آب مقطر استریل را دریافت نمودند. به منظور ارزیابی آنزیم های کبدی موشها ، نمونه خون (0/5 میلی لیتر) توسط لوله مویینه از سینوس رترواوربیتال در موقعیت خلفی چشم گرفته شد و با استفاده از سانتریفیوژ در دور 2000xg به مدت 10 دقیقه پلاسمای آنها جهت فعالیت آنزیم های کبدی اعم ازALT(آلانین آمینو ترانسفراز) ، AST (آسپارتات آمینو ترانسفراز) ، ALP(آلکالین فسفاتاز) و BIL Total و BIL Direct(بیلی روبین کل و مستقیم) با استفاده از کیت های آنزیمی شرکت پارس آزمون اندازه گیری شد. سپس حیوانات درروز چهاردهم به روش قطع نخاعی با رعایت کلیه نکات اخلاقی کشته شدند و بعد از کالبد شکافی کبد حیوانات برداشته شد و پس از پردازش و رنگ آمیزی بافت بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی از نمونه های بافت انجام شد.

یافته ها

پس ازغربالگری نمونه های خاک جنگلی و جداسازی ماکروسکوپی میکروارگانیسمهای تولید کننده رنگدانه ، 7 ایزوله متفاوت تولید کننده رنگدانه جدا سازی گردید. پس از اجراء PCR (شکل 3) و سپس تعیین توالی آنها و ردیف سازی با Blast در سایت www.ncbi.nlm.nih.gov، دو گونه قارچی و 5 گونه باکتریایی شناسایی شد. گونه های قارچی *Eurotium rubrum* و*Aspergillus sp* به ترتیب رنگدانه قرمز مایل به قهوه ای و زردو باکتری های *Bacillus sp*، *Microbacterium testaceum*، *viridians Aerococcus* رنگدانه زرد و باکتری های *Acinetobacter johnsoni*، *Methylobacterium sp* به ترتیب رنگدانه های قرمز-صورتی و قرمز را نشان دادند(شکل 1). پس از کروماتوگرافی لایه نازک و بررسی آن زیر نور ماوراء بنفش در تمامی عصاره ها تنها یک لکه رنگی بر روی کاغذ TLC نمایان شد و این موضوع بیانگر حضور یک ترکیب خالص می باشد.



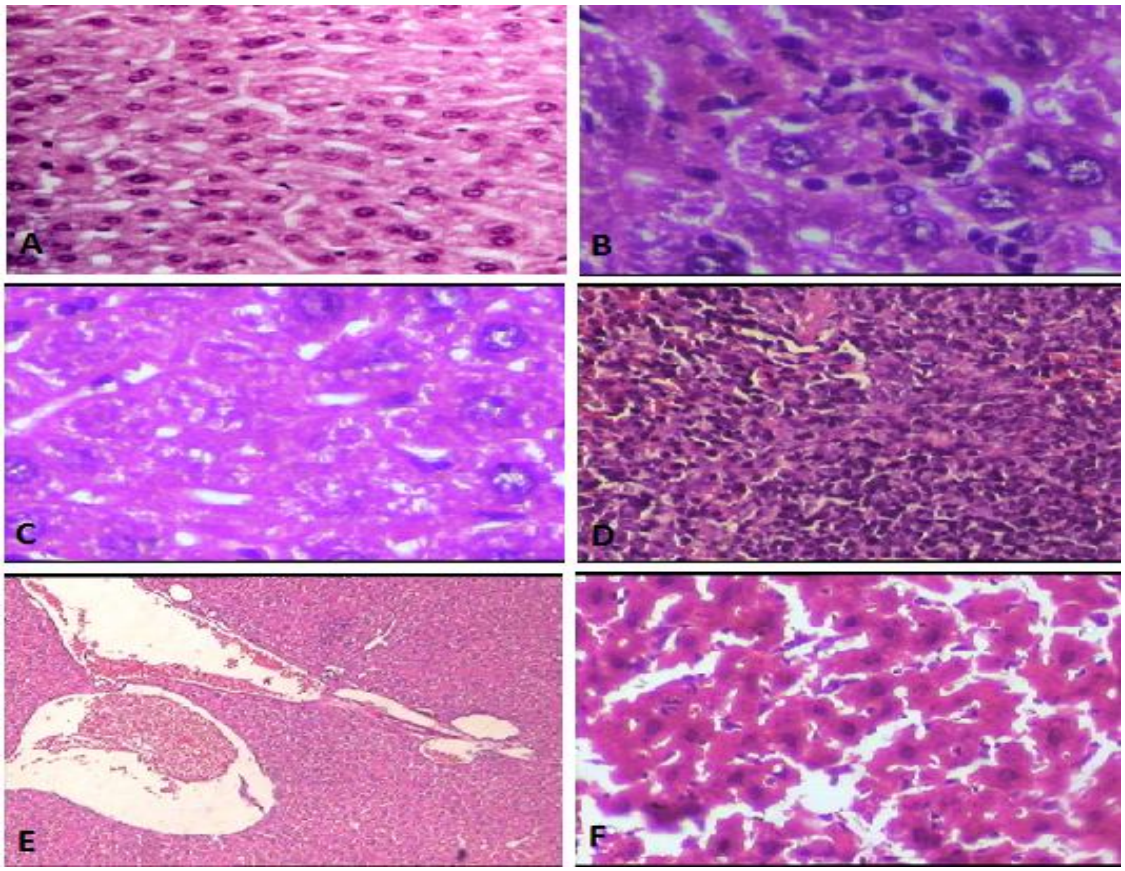
شکل 3 . نتایج تکثیر قطعه 1400 bp از ژن 16SrDNA در باکتری(سمت چپ) و تکثیرقطعه 550 bp ژن 5 SrDNA در قارچ(سمت راست) شکل سمت سمت چپ : 1) مربوط به باکتری *Bacillus sp*، 2) *Aerococcus viridans*، 3) *Methylobacterium sp* ، 4) *Microbacterium testaceum* 5) *Acinetobacter johnsonii* و -c کنترل منفی می باشد. شکل سمت سمت راست 1) مربوط به قارچ *Aspergillus sp* ، 2) *Eurotium rubrum* و -c کنترل منفی می باشد.

جدول 2. میانگین افزایش میزان آنزیمهای کبدی در موش سوری ماده درحداکثر دوز

نام میکروارگانیسمی که رنگدانه از آن استخراج شده / نام آزمایش		AST(U/L)	ALT(U/L)	ALP(IU/L)
Bacillus sp	روز 3	211	70	285
	روز 7	320	121	309
	روز14	515	380	387
Eurotium rubrum	روز 3	128	74	390
	روز 7	260	140	420
	روز14	556	261	472
Methylobacterium sp	روز 3	149	115	194
	روز 7	286	178	258
	روز14	468	230	396
Aerococcus viridans	روز 3	124	125	188
	روز 7	241	193	236
	روز14	343	252	320
Aspergillus sp	روز 3	159	137	241
	روز 7	226	273	372
	روز14	253	436	430
محدوده نرمال برای گروه شاهد		79-109	77-110	163-220

همچنین پس از تجویز دهانی عصاره ها وضعیت حیوانات در طی زمانهای مشخص، نرمال ارزیابی شدند و هیچ گونه مرگ و میری در طی 14 روز مشاهده نشد. نتایج فعالیت های آنزیم های کبدی نشان می دهند که مصرف رنگدانه های فوق در موش سوری درحداکثر دوز (5000mg/kg) باعث افزایش فعالیت آنزیمهای کبدی AST، ALT و ALP در مقایسه با گروه شاهد می گردد (جدول 2). نتایج حاصل از خروج بیلی روبین به داخل خون نرمال گزارش شد. از آنجائیکه سطح بیلی روبین سرمی در آسیب های شدید کبدی افزایش می یابد نتایج حاصل آسیب شدید کبدی را گزارش نمی کند. نتایج بدست آمده از تستهای کبدی پیش بینی آسیب کبد حاصل از مصرف رنگدانه بدون هر گونه مرگ ومیر را در موش گزارش می کند. در بررسی میکروسکوپی بافت کبد ، نمونه شاهد دارای بافت نرمال، کبد با فضای پورت و ورید های مرکز لوبولی طبیعی می باشد اثری از نکروز و ارتشاح التهابی یا بدخیمی مشهود نیست. در بررسی میکروسکوپی از کبد موش های که رنگدانه مصرف کرده اند، ساختمان لوبولی حفظ شده را نشان می دهد. کانونهای لکه ای کوچک از نکروز سلول های کبدی همراه با ارتشاح نوتروفیلی با توزیع نا منظم قابل مشاهده می باشد. سینوزوئید ها و ورید های مرکزی متسع و کانونهای کوچک و نامنظم نکروز انعقادی بدون ارتشاح سلولهای التهابی نیز قابل مشاهده می باشد. فضای پورت دارای ارتشاح خفیف نوتروفیلی و لنفوسیتر و رسوب فیبرین می باشد. هپاتوسیتها نمای رژنراتیو را نشان می دهند. تغییرات ذکر شده به ترتیب از رنگدانه میکروارگانیسم های *Methylobacterium sp* ، *Aerococcus viridans*، *Bacillus sp*، *Eurotium rubrum* تا *Aspergillus sp* شدید تر می شود. این موضوع تخریب شدیدتر را در رنگدانه های قارچی نسبت به رنگدانه های باکتریایی را نشان می دهد. در هیچکدام از نمونه ها اثری از بدخیمی، پرولیفراسیون مجاری صفراوی یا رسوب رنگدانه دیده نمی شود وتمام موارد ذکر شده آسیب قابل برگشت گزارش شدند.

شکل 4. تصاویر پاتولوژی بافت کبد



A : بافت نرمال کبد ، B : تجمع سلولهای التهابی اطراف ورید مرکزی ، C : کانونهای نکروز (ارتشاح نوتروفیل در لوبول) ، D : نکروز انعقادی در لوبول، E: بافت سروزی التهابی متصل به کپسول کبد ، F : اتساع وریدها

بحث

در سالهای اخیر توجه زیادی به رنگدانه های میکروارگانیسم ها و مسیر های بیوسنتز آنها شده است. از لحاظ عملی تخمیر میکروارگانیسم هایی همچون قارچ ها و باکتری ها می تواند یک منبع با ارزش برای تولید مواد رنگی بوده باشد و می توانند بعنوان رنگسار های اصلی با طیفی گسترده بکار روند . تولید رنگهای مصنوعی شاید از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه باشد اما رنگهای مصنوعی با چالشهایی از جمله وابستگی به منابع نفتی غیر قابل احیا ، سمیت محیطی ، مسائل بهداشتی و عدم بازیافت روبه رو هستند، در حالیکه رنگهای طبیعی مصرف شده می توانند بازیافت شده و هیچ بوی نا مطبوعی ندارند ، بنابراین جستجوی منابع قابل احیا که از لحاظ زیست محیطی هم سازگار باشند برای تولید مواد رنگی یک نیاز ضروری است.

موفقیت هر روند تولید رنگدانه حاصل از تخمیر بستگی به قابلیت پذیرش آن در بازار دارد همچنین تأیید مراکز ناظر و قانون‌گذار و سطح سرمایه گذاری مورد نیاز برای عرضه محصول به بازار و همچنین تصور و شناخت عموم مردم نسبت به فراورده‌های حاصل از بیوتکنولوژی را نیز باید مدنظر قرار داد.

در تحقیقات بویانگ و همکارانش در سال 2010 در هند ، آنها جداسازی و شناسایی 5 قارچ رشته ای بنام های *پنیسیلیوم* ، *فوزاریوم* ، *امریسیلا* ، *موناسکوس پوروروس* و *ایساریا* از153 نمونه خاک رشته کوههای تامیل نادو هند را گزارش نمودند ، بررسی های انجام شده بهینه سازی شرایط رنگرزی چرم توسط این 5 گونه قارچی بوده است ، هدف این تحقیق کاهش آلودگی در رابطه با رنگ های مصنوعی و معرفی رنگ های طبیعی برتر بوده است و اینکه از این رنگدانه های قارچی می شود به

فرم اسپری و یا پودر خشک استفاده کرد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که غلظت بهینه رنگدانه 6% وزن چرم بوده و شرایط بهینه برای رنگ آمیزی دمای 70 و5= PH وزمان 120 دقیقه بوده است حداکثر جذب رنگدانه در این مطالعه مربوط به قارچ *موناسکوس پورپوروس* (94,70%) و کمترین جذب رنگ مربوط به قارچ گونه *ایساریا* بوده است(14).

کوماری و همکاران در سال 2009 روی سمیت حاد و تحت مزمن رنگدانه قارچ *موناسکوس پورپوروس* بر روی موش نژاد آلبینو بررسی هایی انجام دادند و در بررسی سمیت حاد مقدار دوز داده شده به حیوان به ترتیب 500 ، 1000 ، 2500 و 5000mg/kg بر وزن حیوان بوده که علاوه بر اینکه هیچ گونه علائم سمیت و مرگ و میر در حیوان مذبور ایجاد نشده بلکه سطح سرمی آنزیم های بالینی بین گروه تجربی و کنترل تفاوت معنی داری وجود نداشت، همچنین موشهای تغذیه شده با این رنگدانه کاهش قابل توجهی در کلسترول و تری گلیسیرید در سرم و کبدشان دیده می شد(15). سویوشی و همکارانش در سال 2008 اثبات کردند که رنگدانه های تولید شده توسط گونه های موناسکوس شامل 11 ترکیب مختلف اند که این ترکیبات تحت شرایط مختلف کشت احیا می شوند، یکی از نوآوری های این مطالعه استفاده از تکنیک LCMS برای تجزیه و تحلیل مستقیم و همزمان اجزای رنگدانه موناسکوس قبل از تفکیک و تخلیص می باشد(16). آلان در سال 2006 روی رنگدانه های طبیعی استخراج شده از منابعی تجدید پذیر مثل گیاه ، حشره ،جلبک ،سیانوباکتر ها و قارچها کار کرد و طی بررسی که روی تغییرات فرمولی رنگدانه ها جهت افزایش پایداری آنها انجام داد به این نتیجه رسید که اضافه کردن آنتی اکسیدان ها ا(آلفا توکوفنل ،اسید اسکوربیک) و موادی مانند صمغ ، پکتین ، ژلاتین و... به علت محلول شدن در چربی و محافظت فیزیکی از تخریب و... در جهت افزایش پایداری موثر است(17).

با توجه به نتایج حاصل از ردیف سازی توالی های بدست آمده در بانک ژنی NCBI ، 5 مورد از 7 میکروارگانیسم های این مطالعه به عنوان میکروارگانیسم های جدید شناسایی شدندو در وب سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)به ثبت رسیدند. این میکروارگانیسم ها تحت عنوان *Bacillus sp. NRRL B-14911* با شماره دسترسی JF495108 ، *باکتری Acinetobacter johnsonii strain Mehrabi2668* با شماره دسترسی JN032756 ،*قارچEurotium rubrum strain Mehrabi65* با شماره دسترسی JN032757 و باکتری *Microbacterium testaceum strain Mehrabi* با شماره دسترسی JF930144 نام گرفتند. همچنین باکتری *Methylobacterium sp* با هومولوژی 80% که به احتمال قوی به عنوان یک گونه ی جدید باکتریایی می باشد در حال ثبت و پردازش اطلاعات در همین سایت می باشند.قارچ *E.rubrum* حاوی برخی متابولیت های مهم از جمله Neoechinulin می باشد که دارای فعالیت cytoprotection بر علیه پراکسی نیتریت ناشی از مرگ سلولهای p12 وsin1 می باشد(۱۸،۱۹). و فعالیت های قابل توجهی برعلیه DPHH دارد. همچنین پیشنهاد شده که Neoechinulin A می تواند به عنوان یک محافظ در برابر مرگ سلولی نورون ها در بیماریهای تخریب سلولهای عصبی استفاده شود. Neoechinulin A نیز فعالیت آنتی اکسیدانتی بالاتری نسبت به توکوفرول نشان داده و می توان انتظار داشت که به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی عمل کند. رنگدانه زرد-نارنجی روشن که در اکثر گزارش ها به عنوان flavoglaucin شناخته شده از متابولیت های معمول *E.rubrum* می باشد که علاوه بر فعالیت رادیکال پاک کنندگی بر علیه DPHH دارای فعالیت انتی اکسیدانتی می باشد(20) و گزارش شده که که با توکوفرول سینرژیسم دارد. Flavoglaucin و Echinulin نیز به عنوان یک عامل سایتوتوکسیک ضعیف در برابر سلولهای Hela گزارش شده(21) که باعث آسیب متوسط کبدی در خرگوش های ماده شد اما بوسیله تست آزمون ترمیم DNA در کشت اولیه هپاتوسیت های جدا شده از کبد موش در مقدار 10^{-4} M ، ژنوتوکسیک نبوده است(22). Epiheveadride اولین گزارش از یک محصول طبیعی در گونه ی *E.rubrum* می باشد که فعالیت ضد قارچی قوی در برابر *Penicillium marneffei, Trichophyton rubrum* و *T. mentagrophytes* نشان داده است (23).

قارچ آسپرژیلوس یکی از میکروارگانیسم های تولید کننده رنگدانه است که رنگدانه هایش معمولاً به رنگ زرد، زرد متمایل به قهوه ای و قهوه ای مایل به سیاه ویا سبز دیده می شود که همه ی این رنگ ها از نوع آنتراکینون بوده و نشان داده شده که عصاره رنگی آسپرژیلوس قویترین فعالیت آنتی اکسیدانتی و ضد قارچی را دارد(24).

از دیگر میکروارگانیسم های جدا شده در این مطالعه جنس *باسیلوس* و *میکروباکتریوم* می باشند که می توانند طیف وسیعی از رنگدانه های کارتنوئیدی C40 و C30 را تولید

کنند. گونه های میکروباکتریوم تولید رنگدانه های زرد، نارنجی، زرد روشن و زرد نزدیک به سفید می کنند. Trutko و همکاران گزارش کردند که گونه های *میکروباکتریوم* با رنگهای زرد، نارنجی و قرمز یافت شده دارای طیف جذبی معمول از کارتنوأیدهای C_{40} است(25). با توجه به آنالیز ساختاری مربوط به این رنگدانه توسط تکنیک های کروماتوگرافی و طیف سنجی، تا کنون بیش از 700 ساختار کارتنوئیدی از گیاهان ، باکتری ها و قارچ ها گزارش شده است. این رنگدانه ها بزرگترین و متنوع ترین نوع محصولات طبیعی شناخته شده برای انسان می باشند، همچنین این باکتری ها می توانند به عنوان پروبیوتیک عمل کنند و به عنوان یک مکمل خوراکی برای انسان و آبزیان و طیور مورد استفاده قرار بگیرند. به عنوان مثال رژیم غذایی همراه با لیکوپن و پروویتامین B-کاروتن اخیراً جهت درمان برخی سرطان ها مثل سرطان پروستات استفاده می شود(26). اهمیت یافته های فوق ضمن شناسایی سویه و گونه های جدید ، تمرکز تحقیقات با اهداف صنعتی است. با توجه به اینکه رنگدانه های حاصل از این میکروارگانیسم ها دارای اثرات سمی قابل برگشت بر روی موش بودند اما با بررسی های بیشتر و تعیین ساختار ترکیبات این رنگدانه ها و با حذف ترکیبات سمی از این رنگدانه ها یقیناً می توان از این رنگدانه ها استفاده های بهینه نمود.

نتیجه گیری

جدا سازی منابع طبیعی تولید کننده رنگدانه و سپس شناسایی ساختمان آنها به ما در تولید سنتتیک رنگدانه ها کمک فراوانی می نماید. همچنین رنگدانه های جدید با رویکرد مصرف در مواد غذایی باید تحت سازمانهای نظارت بر مواد غذایی قرار بگیرند تا با بررسی های صورت گرفته از داده های سم شناسی و مسمومیت های غذایی، مقدار دوز معین که فاقد هر گونه مسمومیت باشد را تعیین کنند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن اجراء گردید و بدین وسیله از کلیه کسانی که در اجراء این پروژه ما را یاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

References

1. Unagul P, Wongsa P, Kittakoop P, Intamas S, Srikiti-Kulchai P, Tanticharoen M. *Production of red pigments by the insect pathogenic fungus Cordyceps unilateralis BCC 1869.* J Ind Microbiol Biotechnol.2005; 32: 135-140.
2. Mizukami H, Konoshima M, Tabata M. *Variation in pigment production in Lithospermum erythrorhizon callus cultures.* Phytochem.1978; 17: 95-97.
3. Raisainen R, Nousiainen P, Hynninen P H. *Dermorubin and 5-chlorodermorubin natural anthraquinone carboxylic acids as dyes for wool.* Textile Res J.2002; 72: 973-976.
4. Kim C H, Kim S W, Hong S I. *An integrated fermentation separation process for the production of red pigment by Serratia sp. KH-95.* Process Biochem.1999; 35: 485-490.
5. Parekh S, Vinci V A, Strobel R J. *Improvement of microbial strains and fermentation processes.* Appl Microbiol Biotechnol.2000; 54: 287-301.
6. Baker RA, Tatum JH. *Novel anthraquinones from stationary cultures of Fusarium oxysporum.* Jornal of Ferment Bioeng.1998; 85: 359–361.
7. Perez-Tomas, Montaner R , Llagostera B , Soto-Cerrato V. *The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties.* Biochem Pharmacol.2003; 66: 1447– 1452.
8. Lopes SC, Blanco YC, Justo GZ, Nogueira P A, Rodrigues, FL, Goelnitz U, Wunderlich G, Facchini G et al. *Violacein extracted from Chromobacterium violaceum inhibits Plasmodium growth in vitro and in vivo.* Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 2149–2152.
9. Hendry G A F, Houghton J D. (Eds.). *Natural Food Colorants*, 2nd ed., Blackie Academic, London. 1996; 25:14-19.
10. Graham G C, Mayer P, Henry RJ. *A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis.* Biotechniques, January.1994; 1: 48-50.
11. Zheng D, Alm EW, Stah DA, Raskin L. *Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies.* Appl Environ Microbiol.1996; 62: 4504-4513.
12. White TJ, Bruns T, Lee S, Tailor S. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In PCR protocols. A guide to methods and applications.* Academic Press, Inc., San Diego, Calif.1990; pp: 315–322.
13. OECD, *Guidance Document on Acute Oral Toxicity.* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment.2000; No 24.
14. Palanivel V,Seralathan k, Vellingiri b, Perumalsamy l, Jong C , Byung T. *Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather.* Carbohydrate Polymers. 2010;79: 262–268.
15. Kumari HP, Naidu KA, Vishwanatha S, Narasimhamurthy K, Vijayalakshmi G. *Safety evaluation of Monascus purpureus red mould rice in albino rats, Department of Food Microbiology.* Central Food Technological Research Institute. 2009;47(8): 1739-46.
16. Tsuyoshi m, Isato k, Nobuyuki n, and Hiroyuki s. *Analysis of Pigment Compositions in Various*

Monascus Cultures .Food Sci. Technol. Res. 2008; 14 (2):194 – 197.
17. Mortensen A. *Carotenoids and other pigments as natural colorants*. Pure Appl Chemistry. 2006;78:1477-1491.
18. Kiyotoshi M, Takashi O, Kenji Y, Yasushi S, Fumio S, Takao A. *Protective properties of neoechinulin A against SIN-1-induced neuronal cell death*. Journal of Biochemistry (Tokyo,Japan). 2004;136: 81–87.
19. Kuniaki K, Toshiaki A, Yasushi S, Shinji K, Fumio S, Kouji K ,etal. *Structure– activity relationships of neoechinulin A analogues with cytoprotection against peroxynitrite-induced PC12 cell death*.Journal of Antibiotics. 2007;60:614–621.
20. Yong L, Xifeng L, Uk L, Jung Sook K, Hong Dae C, Byeng Wha S. *A new radical scavenging anthracene glycoside, asperflavin ribofuranoside, and polyketides from a marine isolate of the fungus Microsporum*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 2006;54: 882–883.
21. Umeda M, Yamashita T, Saito M, Skeita S, Takahashi C,Yoshihira K, etal. *Chemical and cytotoxicity survey on the metabolites of toxic fungi*. Japanese Journal of Experimental Medicine.1974; 44: 83–96.
22. Mori H, Kawai K, Ohbayashi F, Kuniyasu T, Yamazaki M, Hamasaki T, Williams G. *Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture/DNA repair test using rat and mouse hepatocytes*. Cancer Research. 1984; 44: 2918–2923.
23. Hosoe T, Fukushima K, Itabashi T, Nozawa K, Takizawa K. *A new nonadride derivative, dihydroepiheveadride, as characteristic antifungal agent against filamentous fungi, isolated from unidentified fungus IFM 52672*. Journal of Antibiotics,2004; 57: 573–578.
24. Yeo Hong Y, Min Woo H, Dong Yeon S, Yong Min K, Seong H. *Identification and Characterization of Eurotium rubrum Isolated from Meju in Korea*. Department of Microbiology and Institute of Basic Sciences.2009; 37(4): 251-257.
25. Trutko S, Dorofeeva L, Evtushenko L, Ostrovski D, Hintz M, Wiesner J, Jomaa H, Baskunov B , Akimenko V. *Isoprenoid pigments in representatives of the family Microbacteriaceae*, Microbiology. 2005; 74: 284-289.
26. Umeno D, Tobias A V , Frances H. *Evolution of the 30C carotenoid synthase CrtM for function in a 40C pathway*. J. Bacteriol. 2002; 184: 6690-6699.