مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2015) المجلد (31) ــ العدد 2 ــ الصفحات: 181-194

استخلاص أشباه الكاروتينات من خميرة *Rhodotorula* المعزولة من مصادر محلية

سمر عيسى[1] وأنور الحاج علي[2] ولينا الأمير[3]

الملخَّص

جمعت 50 عزلة خميرة من الجنس *Rhodotorula* من مصادر محلية متنوعة خلال عامي 2012 و2013، منها 13 عزلة من التربة و23 من أوراق الأشجار و14 من مواد غذائية. شخصت العزلات باستخدام تقانة API 20c AUX وتبيّن أنّ العزلات تنتمي إلى ثلاثة أنواع هي *R. mucilaginosa*، و*R. glutinis*، و*R. minuta* وبنسب 76% و20% و4%، على التوالي. استخدمت ست طرائق مختلفة لتحطيم خلايا الخميرة واستخلاص الصبغة وأظهرت النتائج فيما يخص كمية استخلاص أشباه الكاروتينات تفوق الطريقة المعدلة باستخدام DMSO والتحضين لمدة 24 ساعة مع التحريك عند 4°س على الطرائق الخمس الأخرى المستخدمة كافة. تميزت جميع العزلات بقدرتها على إنتاج أشباه الكاروتينات بكفاءات مختلفة حيث تفوقت العزلة A24 *R. mucilaginosa* المعزولة من الغذاء بكمية أشباه الكاروتينات المنتجة إذ بلغت 658.23 ميكروغرام/غ كتلة حيوية جافة للخلايا مقارنة ببقية العزلات الأخرى.

الكلمات المفتاحية: خمائر، تشخيص، استخلاص أشباه الكاروتينات، *Rhodotorula mucilaginosa*.

[1] طالبة دكتوراه، [2] أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.
[3] أستاذ مساعد في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سورية.

Extraction of carotenoids from *Rhodotorula* yeast isolated from local sources

S.Issa[(1)], A. Al-Haj Ali[(2)] and L. Al-Amir[(3)]

Abstract

***Rhodotorula* yeast was isolated from various local sources. Fifty isolates were collected during the years 2012-2013 where 13 were isolated from soil, 23 from tree leaves and 14 from food. The isolates AUX system. Were classified into three *Rhodotorula* species: *R. mucilaginosa, R. glutinis and R. minuta* with 76%, 20% and 4% respectively using API 20c. Six methods were applied in breaking down the yeast cells and extracting the carotenoids. It was shown the quantity of carotenoides extracted with the modified method by adding DMSO to the yeast biomass and incubating for 24 hrs at 4˚C yielded in higher quantities when compared with the other five methods. All isolates were able to produce carotenoides but they varied in their efficiency where the isolate A24 (*R.mucilaginosa*) isolated from food was distinguished by its high level of production which reached 658.23 µg/g dry weight compared with the others.**

Keywords: Yeasts, Classification, Carotenoids extraction, *Rhodotorula mucilaginosa*.

[(1)]Ph.D student, [(2)] Prof. Dept. Food Sci. Fac. Agri, Damascus Univ., Syria.
[(3)]Assistant professor، National Commission for Biotechnology, Dept.food and industrial biotechnol.Damascus, Syria.

المقدمة

يعدُّ لون الغذاء مهماً لإرضاء رغبة المستهلك وجذبه لشراء المنتج الغذائي، ويرجع سبب إضافة الملونات إلى فقدان اللون الطبيعي للغذاء نتيجة التعرض للضوء أو الهواء أو الحرارة أو الرطوبة أو فقدانه في أثناء التخزين الطويل. وتشمل الملونات مركبات طبيعية أو صنعية تضاف لإعطاء الأغذية ألواناً مميزة تكسبها مظهراً يلبي رغبة المستهلك ومن أهمها أشباه الكاروتينات (Kaur وزملاؤه، 2009).

تمتلك أشباه الكاروتينات خصائص حيوية هامة فضلاً عن كونها ملونات طبيعية فهي تعزز جهاز المناعة وتقلل من مخاطر الإصابة بالأمراض المزمنة كالسرطان وأمراض القلب الوعائية (Astorg، 1997) ومرض التنكس البقعي Macular degeneration (Bendich، 1994). كما تؤدي دوراً هاماً كمضادة للأكسدة وكاسحة للجذور الحرة. وتعد واحدة من أهم المركبات الملائمة للتطبيقات الصناعية في المجالات الصيدلانية، والكيميائية، والغذائية كما يمكن إضافتها إلى علائق الحيوان والأسماك مع الكتلة الحيوية المنتجة لأشباه الكاروتينات (Krinsky، 2001). هناك إجماع على ضرورة تدعيم وجبات الأسماك في المزارع المائية وخصوصاً مزارع أسماك السلمون والسلمون المرقط والقريدس بصبغة astaxanthin (Costa وزملاؤه، 2005) لإكساب لحوم هذه الأسماك باللون الأحمر أو البرتقالي المحبب لدى المستهلك، بالإضافة إلى فوائدها الصحية كمركبات مضادة للأكسدة ولها تأثير فعال جداً في تثبيط نشاط الأورام الخبيثة (Iriani وزملاؤه، 2005).

تعد أشباه الكاروتينات أكبر مجموعة مركبات الملونات العضوية التي توجد بشكل طبيعي في العديد من النباتات والأحياء الدقيقة. تقسم أشباه الكاروتينات إلى مجموعتين أساسيتين من الملونات، الأولى كاروتينات هيدروكربونية Hydrocarbon carotenes مثل بيتا كاروتين وتوريولين، أما المجموعة الثانية فتضم زانثوفيل مؤكسد Oxidized Xanthophyll مثل توريولارهودين torularhodin وأستاكزانثين astaxanthine (Raisainen وزملاؤه، 2002).

تزايد اليوم الاهتمام بإنتاج الملونات ذات الطبيعة الميكروبية لاستخدامها في مجالات متنوعة من التطبيقات الصناعية (Venil and Samy، 2009) لسهولة التعامل مع الأحياء الدقيقة وسرعة نموها وتكاثرها ورخص المواد الأولية اللازمة لتنميتها وتوافرها (Libkind وBrook، 2006)، فضلاً عن إمكانية تحسين إنتاجها من خلال التحكم في شروط النمو للوصول إلى الظروف البيئية والتغذوية المثلى للإنتاج (Francis، 2000) ومن أهم الأحياء الدقيقة المنتجة لأشباه الكاروتينات خمائر *Rhodotorula* species (Vijayalakshmi وزملاؤه، 2001).

تعدُّ الخمائر أكثر ملاءمة لإنتاج أشباه الكاروتينات بكميات كبيرة مقارنةً مع الفطور والطحالب الأخرى بسبب معدل نموها السريع، حيث تستخدم في إنتاج أشباه الكاروتينات على مستوى تجاري (Squina وزملاؤه، 2002). تختلف أنواع أشباه الكاروتينات المنتجة من الخمائر باختلاف النوع والسلالة وتركيب وسط النمو والظروف البيئية المحيطة (Longo وزملاؤه، 1992). تنتج خمائر *Rhodotorula* بشكل أساسي كلاً من بيتا كاروتين وتوريولين وتوريولارهودين (Simova وزملاؤه، 2004)، وبنسب مختلفة تتباين من سلالة لأخرى ضمن النوع الواحد (Davoli وزملاؤه، 2004). تنتشر هذه الخمائر الملونة انتشاراً واسعاً في الطبيعة، حيث توجد في التربة والهواء وأوراق النباتات (Maldonade وزملاؤه، 2006). عزل Aksu و Eren (2005) خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* من التربة وتمت عملية استخلاص أشباه الكاروتينات باستخدام Dimethylsulfo oxide (DMSO) لتحطيم جدار الخلية والحصول على الملونات الداخلية وتمت عملية قياس اللون باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طول موجة 460 نانو متر، بينما عزل El-Banna وزملاؤه (2012) 64 عزلة خميرة من مصادر محلية مختلفة وتمت عملية غربلتها لاختيار أفضلها قدرة على إنتاج أشباه الكاروتينات فكانت خميرة *Rhodotorula glutinis* المعزولة من زهرة الجربية (*Scabiosa atropurpura*) هي أفضل العزلات ثم تمت عملية استخلاص أشباه الكاروتينات الداخلية بعد تحطيم خلايا الخميرة باستخدام DMSO.

ونظراً للاستخدام الواسع للملونات الصنعية في الأغذية وخصوصاً أغذية الأطفال و التأثير السلبي على الصحة لاستهلاك تلك الملونات اتجهت أنظار الصناعيين عالمياً إلى استخدام أشباه الكاروتينات الطبيعية في الصناعات الغذائية، لذا **هدف البحث** إلى: عزل الخمائر من مصادر محلية مختلفة وتشخيصها واختبار عدة طرائق لتحطيم خلايا الخميرة بغرض استخلاص أشباه الكاروتينات الداخلية منها، واختيار أفضلها مع دراسة كفاءة العزلات على إنتاج أشباه الكاروتينات.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات: جمعت 50 عينة من مصادر محلية متنوعة (21 من أوراق الشجر، 13 من ترب مختلفة، 6 من اللحوم، 5 من اللبن واللبنة، 2 من لحاء الأشجار، 1 آيس كريم، 1 مخلل و1 حلويات شعبية) خلال عامي 2012-2013 ونقلت إلى مخبر الأغذية في الهيئة العامة للتقانات الحيوية لعزل الخمائر فيها وتشخيصها.

عزل الخمائر: حضرً معلق لكل عينة من العينات المختبرة، بوزن 2 غ منها وحلها في 20 مل ماء مقطر معقم ثم عزلت الخمائر منها بزرعها بعد أن خففت إلى الدرجة المناسبة وذلك تبعاً لنوع العينة، فعينات أوراق الأشجار ولحائها استخدم لها التخفيف

العشري الأول، بينما استخدمت التخافيف 10^{-3} إلى 10^{-5} للعينات المتبقية، ثم أخذ 100 مكروليتر من كل تخفيف ووزع على سطح وسط آغار مستخلص المولت Malt extract Agar في طبق بتري. حضنت الأطباق على درجة حرارة 30°س لمدة 3 أيام. واختيرت المستعمرات الصفراء والبرتقالية والحمراء لإعادة زرعها على الوسط نفسه مرة أخرى وتحضينها لمدة 3 أيام على الدرجة 30°م (Yehia وزملاؤه، 2013).

تشخيص الخمائر: شخصت الخمائر المعزولة عن طريق فحصها مجهرياً لدراسة الصفات المظهرية كالحجم والشكل والبرعمة وذلك بعمل محضرات مجهرية وصبغها بأحمر الميتيل. أما التشخيص الكيموحيوي والتصنيف النوعي فقد تم بطريقة API 20C AUX حسب Maldonade وزملائه (2006) التي تعتمد على قدرة الخمائر على تخمير 19 نوع من السكريات موزعة على شريحة API في فجوات خاصة ويضاف إليها 100 ميكروليتر من معلق الخميرة درجة عكارته (2 Macfrland). تغلق الشريحة وتحضن 24 و72 ساعة وتقرأ النتائج وتدون في دفتر بطاقات خاص بالطريقة المذكورة، ويقارن تسلسل الأرقام بدليل API الملحق لتحديد جنس الخميرة ونوعها.

غربلة الخمائر والتعرف على قدرتها في إنتاج أشباه الكاروتينات: تم انتقاء مستعمرات الخمائر الحمراء والبرتقالية والصفراء اعتماداً على العين المجردة وأجريت عليها عملية غربلة (إجراء مسح لاختيار الخميرة الملونة الأكثر كفاءة في إنتاج أشباه الكاروتينات) لدراسة قدرتها على إنتاج أشباه الكاروتينات من خلال زراعة الخميرة في دورق مخروطي سعته 250 مل ويحوي 50 مل من وسط سائل تركيبي مخصص لإنتاج أشباه الكاروتينات، والذي يتكون من 20 غ غلوكوز و4 غ خلاصة الخميرة و1 غ ثنائي فوسفات البوتاسيوم و0.5 غ كبريتات المغنيزوم في لتر ماء و5.5 pH الوسط (Yimyoo وزملاؤه 2011)، ثم حضنت الدوارق في حاضنة هزازة على درجة حرارة 28° م وسرعة دوران 130 دورة/د لمدة 48 سا.

طرائق استخلاص أشباه الكاروتينات من الخمائر المعزولة: استخلصت أشباه الكاروتينات من خلايا الخميرة A24 والمعزولة من أوراق أشجار والتي تم اختيارها اعتماداً على شدة لونها الأحمر الظاهر بالعين المجردة مقارنة بالعزلات الأخرى، وذلك بعد تثفيل 50 مل من المزرعة للحصول على الكتلة الحيوية باستخدام ست طرائق مختلفة بغرض اختيار أفضلها. وهذه الطرائق هي:

الطريقة الأولى: يضاف 5 مل من HCL إلى الكتلة الحيوية، ثم يوضع في حمام مائي درجة حرارته 70°س لمدة 1 ساعة، ويضاف بعدئذ 2 مل أسيتون و2 مل ميتانول، وتترك لليوم التالي، حيث تم التثفيل بسرعة 9000 دورة/د مع تبريد بدرجة 4 °س ولمدة 10 دقائق، ثم يتم فصل الطبقة العليا لأيثر البترول الحاوية على أشباه الكاروتينات عن

طبقات المذيبات الأخرى الحاوية على الماء والمركبات المنحلة وبقايا الخلايا وفق طريقة (Somashekar وJoseph، 2000).

الطريقة الثانية: أضيف 5 مل من Dimethyl sulfoxide (DMSO) إلى الكتلة الحيوية، ثم حضنت لليوم التالي في حاضنة هزازة بدرجة 5-10°س واستكمل تحطيم الخلايا باستخدام جهاز التحطيم بالأمواج فوق الصوتية sonicator بتردد 20 KH_Z لمدة 15 دقيقة وفق طريقة Kim وزملائه (2010).

الطريقة الثالثة: أضيف 5 مل من DMSO إلى الكتلة الحيوية مع إضافة 3 غ كرات معدنية مع الرج باستخدامVortex ثم حضنت لمدة ساعتين في حاضنة هزازة بسرعة دوران 130 دورة /دقيقة بدرجة 5-10°س وفق طريقة Kim وزملائه (2010).

الطريقة الرابعة: أضيف 5 مل من DMSO إلى الكتلة الحيوية وحضنت لليوم التالي من دون تحريك في درجة حرارة التبريد 5-10°س وهي طريقة مقترحة في هذه الدراسة.

الطريقة الخامسة: أضيف 5 مل من DMSO إلى الكتلة الحيوية وتركت مدة ساعة واحدة في حمام مائي 70°س، وهي طريقة مقترحة في هذه الدراسة.

الطريقة السادسة: أضيف 5 مل من DMSO إلى الكتلة الحيوية، ثم حضنت مدة ساعتين في حاضنة هزازة بسرعة دوران 130 دورة /دقيقة بدرجة 5-10°س وهي طريقة مقترحة في هذه الدراسة.

وبعد إتمام فترة الحضانة للطرائق السابقة أضيف 4 مل أسيتون، ثم 8 مل أيثر البترول و2 مل من ملح كلور الصوديوم 20% إلى الكتلة الحيوية المعاملة، ثم يرج المزيج جيداً ويثفل بسرعة 9000 دورة/د مع التبريد إلى درجة 4 °س، لمدة 10 دقائق وذلك لفصل المادة الملونة من الخلايا بشكل كامل، وفصلت الطبقة العليا لأيثر البترول الحاوية على أشباه الكاروتينات عن طبقات المذيبات الأخرى الحاوية على الماء والمركبات المنحلة وبقايا الخلايا.

تقدير أشباه الكاروتينات: قيست كمية أشباه الكاروتينات المستخلصة من الخمائر باستخدام جهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجة 460 نانومتر حسب طريقة Maldonade وزملائه (2006). وحسبت كمية أشباه الكاروتينات الكلية حسب طريقة Dung وزملائه (2010)، والتي تعتمد على العلاقة الآتية :

كمية أشباه الكاروتينات الكلية (ميكروغرام/غرام مادة جافة) = 5.405 A X / Y

حيث: 5.405: ثابت، A قيمة الامتصاصية الضوئية على طول موجة 460 نانو متر، وX حجم العينة (مل) وY تمثل الوزن الجاف للكتلة الحيوية (غ).

التحليل الإحصائي: حسبت المتوسطات الحسابية وانحرافاتها المعيارية بواقع ثلاثة مكررات بيولوجية لكل عزلة مع حساب فروقها المعنوية وذلك على مستوى ثقة 5% باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS الإصدار 17 (SPSS Statistics for Windows، Version 17.0).

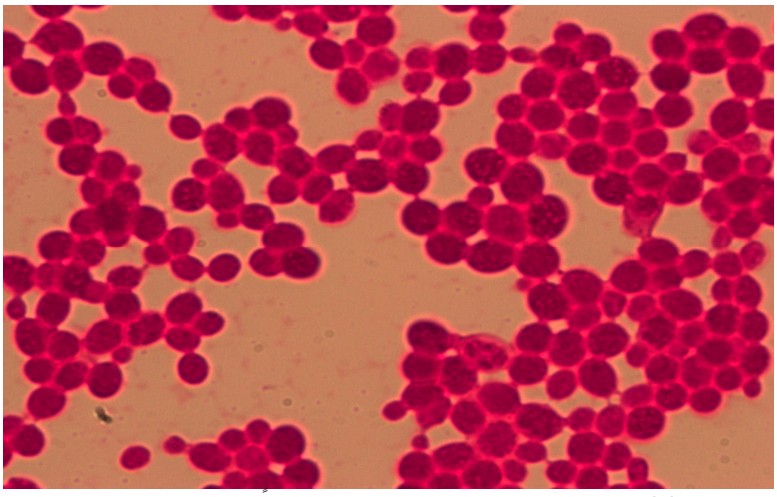
النتائج والمناقشة

عزل الخمائر وتشخيصها: بينت نتائج العزل أن الخمائر الملونة كانت بأعلى نسبة في أوراق الأشجار، تليها الترب المحلية، ويوضح الشكل (1) خميرة *Rhodotorula* المعزولة من أوراق الأشجار بالفحص المجهري حيث تظهر الخلايا بشكلها البيضوي كبير الحجم والبرعمة محيطية وهذا يتوافق مع Yehia وزملائه (2013). كما يوضح الجدول (1) مصدر العينات ونوع الخمائر المعزولة والمشخصة لإنتاج أشباه الكاروتينات باستخدام طريقة API حسب Maldonade وزملائه (2006).

الجدول (1) مصدر العينات والخمائر المشخصة المنتجة لأشباه الكاروتينات

الرقم	مصدر العينة	عدد العينات	*R. mucilaginosa*	*R. glutinis*	*R. minuta*
1	أوراق الشجر	21	18	3	-
2	ترب مختلفة	13	10	1	2
3	لحوم متنوعة	6	4	2	-
4	لبن ولبنة	5	5	-	-
5	لحاء الأشجار	2	-	2	
6	آيس كريم	1	-	1	-
7	مخللات	1	1	-	-
8	حلويات شعبية	1	-	1	-
المجموع		50	38	10	2
النسبة المئوية لمجموع العينات			**%76**	**%20**	**%4**

ويلاحظ بأن العزلات الخمسين تنتمي إلى ثلاثة أنواع مختلفة من خميرة *Rhodotorula* وهي *R. glutinis*، *R.mucilaginosa* و*R.minuta* وبنسب 76%، 20% و4% من مجموع العينات المعزولة على التوالي وهذه العزلات اختلفت فيما بينها بكمية أشباه الكاروتينات المنتجة على الرغم من انتمائها للجنس نفسه وهذا يتوافق مع Maldonade وزملاءه (2008) الذين أشاروا بأن إنتاج الخمائر للصبغة يختلف باختلاف النوع. كما بين Brook وLibkind (2006) أن أوراق الأشجار مصدر هام لعزل خميرة *Rhodotorula* بأنواعها المختلفة. وقد ظهر هذا الجنس من الخميرة في العينات الورقية بنسبة عالية مقارنة مع بقية عينات العزل المدروسة وهذا يتوافق مع نتائج بحثنا، كما يوضح الجدول (2) نتائج تخمير السكريات وفقاً لطريقة API 20C AUX.



الشكل (1) يوضح خميرة *Rhodotorula* مجهرياً (Olympus 1000X)

الجدول (2) تصنيف أنواع *Rhodotorula* وفقاً لطريقة API

الرقم المتسلسل	السكريات	*R. mucilaginosa*	*R. glutinis*	*R. minuta*
1	غلوكوز	+	+	+
2	غليسرول	-	+	+
3	2- كيتو - غلوكوز	+	+	-
4	أرابينوز	+	-	+
5	زايلوز	+	-	+
6	أدونيتول	+	-	-
7	زيليتول	+	-	-
8	غالاكتوز	-	-	-
9	اينوسيتول	-	-	-
10	سوربيتول	+	+	-
11	ميتيل غلوكوزيد	-	-	-
12	N اسيتيل غلوكوز	-	-	-
13	سلوبيوز	-	+	-
14	لاكتوز	-	-	-
15	مالتوز	+	+	-
16	سكروز	+	+	+
17	تريهالوز	+	-	-
18	مليزيتوز	+	+	+
19	رافينوز	+	+	-

مقارنة طرائق استخلاص أشباه الكاروتينات: يوضح الجدول (3) كمية أشباه الكاروتينات المستخلصة بالطرائق المختلفة. ويلاحظ من الجدول بأن اختلاف الطرائق أعطى نتائج متفاوتة معنوياً على مستوى ثقة 5% في كمية أشباه الكاروتينات المستخلصة حيث تراوحت بين الحد الأدنى في الطريقة الثانية المرجعية بقيمة 13.21 وبين الحد الأعلى في الطريقة السادسة المقترحة بقيمة 154.85، ميكروغرام/غ. وهذا يتوافق مع نتائج كل من Tinoi وزملائه (2006) وPark وزملائه (2007) بأن أفضل طرائق الاستخلاص كانت باستخدام الطريقة الكيميائية. وقد بينKim وزملاؤه (2010) أن طريقة التحطيم باستخدام الأمواج فوق الصوتية Sonicator في الطريقة الثانية كانت قليلة الكفاءة في استخلاص أشباه الكاروتينات حيث إن DMSO له قدرة أكبر في التأثير على جدران خلايا الخميرة من الأمواج فوق الصوتية وتحطيمها لاستخلاص أكبر كمية ممكنة من أشباه الكاروتينات الداخلية. لذلك اعتمدت الطريقة السادسة التي عدلناها في هذه الدراسة في تقدير كمية أشباه الكاروتينات لكافة العزلات المدروسة.

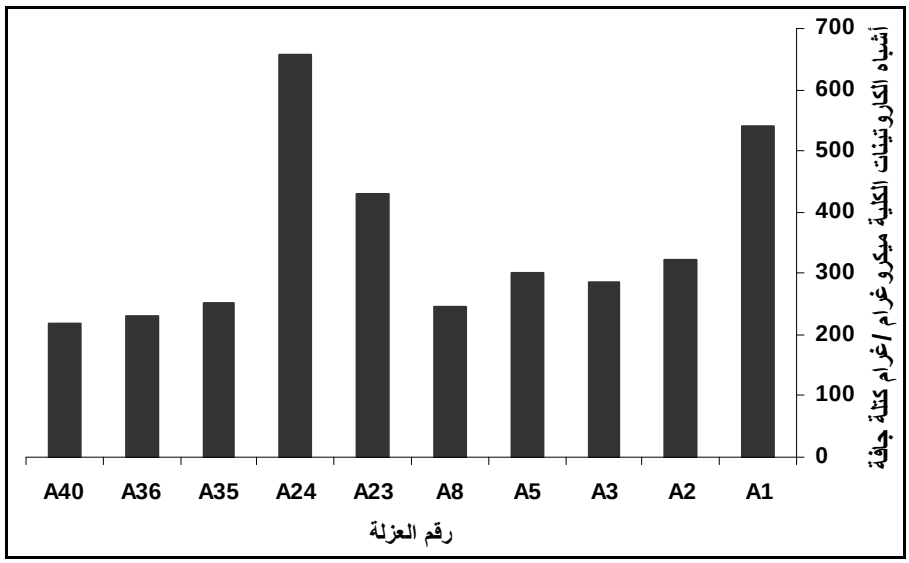
الجدول (3) تأثير طريقة الاستخلاص على كمية أشباه الكاروتينات

	طرائق الاستخلاص	متوسط كمية أشباه الكاروتينات (ميكروغرام/غ) ± الانحراف المعياري
1	5 مل من HCL +1 ساعة+ حمام مائي	0.80542 ± ^{d}55.28
2	5 مل DMSO +24 سا+حاضنة هزازة بدرجة 5- 10 م ثم تحطيم باستخدام جهازsonicator لمدة 15 د	1.69576 ± ^{a}13.21
3	5 مل DMSO +2 سا+ حاضنة هزازة 5- 10م +كرات معدنية	1.78048 ± ^{b}17.98
4	5 مل من DMSO +1 ساعة+ حمام مائي	2.95670 ± ^{c}27.77
5	5 مل من DMSO +24 ساعة دون تحريك	1.98030 ± ^{e}62.56
6	5 مل DMSO +2 ساعة+ حاضنة هزازة بدرجة 5- 10 م	1.48334 ± ^{f} 154.85

تشير الأحرف المختلفة ضمن العمود إلى وجود فروق معنوية على مستوى ثقة (5% > P).

غربلة عزلات الخمائر لإنتاج أشباه الكاروتينات: يبين الجدول (4) كمية أشباه الكاروتينات الكلية للعزلات مقدرة بالميكروغرام/غرام كتلة حيوية جافة، حيث يلاحظ من الجدول وجود فروق معنوية بين كميات أشباه الكاروتينات على مستوى ثقة 5% بعد استخدام تحليل التباين ANOVA، وباستخدام أقل فرق معنوي، حيث بلغت أدنى قيمة 13.612 ميكروغرام/غ للعزلة A28، بينما بلغت أعلى قيمة 658.227 ميكروغرام/غ للعزلة A24. وبلغ المتوسط الكلي العام لإنتاج أشباه الكاروتينات في الخمسين عزلة 141.74 ميكروغرام/غ. لذا اختيرت العزلات العشرة المتفوقة في كمية أشباه الكاروتينات عن بقية العزلات الأخرى. ويبين الشكل (2) كمية أشباه الكاروتينات الكلية للعزلات المتفوقة مقدرة بالميكروغرام/غرام كتلة جافة، ويلاحظ من الشكل أن أفضل 3 عزلات كانت A24 وA1 وA23 حيث أعطت 658.2 و539 و428.5 ميكروغرام/غ على

التوالي وكانت جميعها تنتمي إلى نوع واحد من الخمائر المشخصة وهي *R. mucilaginosa* علماً أن كل من A24 وA23 معزولتين من أوراق الأشجار بينما A1 معزولة من اللحم. هذه النتيجة تؤكد أن الأحياء الدقيقة تتباين وراثياً وإن انتمت إلى النوع نفسه فيما بينها من حيث خصائص نموها وفعاليتها الاستقلابية وهذا يكون نابعاً عن استجابة السلالات للظروف البيئية (Elander وChang، 1979)، فالبناء الوراثي بقدر ما يتصف بالثبات فإنه يتميز بمرونة كبيرة في الاستجابة للتغيرات البيئية وبالتالي في التعبير عن الصفات المظهرية للجينات. ومن ناحية أخرى هذل يتقارب مع Maldonade وزملائه (2008) حيث أعطت عزلات *R. mucilaginosa* في دراستهم المعزولة من التربة كميات متقاربة من أشباه الكاروتينات الكلية المقدر بنحو 590 و545 و487 ميكروغرام/غ على التوالي. وهذا يوافق مع Maldonade وزملائه (2008) الذين قاموا أيضاً باستخدام سلالات مختلفة من خميرة *R. mucilaginosa*، والتي أعطت نتائج متباينة في كمية أشباه الكاروتينات الكلية المنتجة، وبلغت أعلى قيمة 594 ميكروغرام/غ وأدنى قيمة 487 ميكروغرام/غ. وقد بين Aksu وEren (2005)، أن خميرة *R. mucilaginosa* المعزولة من ترب محلية أعطت كمية مرتفعة من أشباه الكاروتينات مقارنة مع السلالات الأخرى، حيث بلغت كمية أشباه الكاروتينات المنتجة 355 ميكروغرام/ غ كتلة حيوية جافة.



الشكل (2) كمية أشباه الكاروتينات الكلية في العزلات المتفوقة (ميكروغرام/غرام) كتلة حيوية جافة.

الجدول(4) كمية أشباه الكاروتينات الكلية للعزلات (ميكروغرام /غرام كتلة حيوية جافة)

العزلة	الامتصاصية 450 نانو متر	متوسط كمية أشباه الكاروتينات الكلية (ميكروغرام/غ كتلة حيوية جافة) ± الانحراف المعياري
A1	**0.379**	1.84388 ± **539.077**
A2	**0.383**	2.17753 ± **323.455**
A3	**0.338**	2.02137 ± **285.451**
A4	0.157	1.46707 ± 111.655
A5	**0.367**	1.67311 ± **300.550**
A5	0.357	0.71663 ± 109.635
A7	0.314	1.53577 ± 97.538
A8	**0.281**	1.62794 ± **244.968**
A9	0.337	0.68186 ± 91.994
A10	0.295	1.50429 ± 227.782
A11	0.183	0.79699 ± 65.941
A12	0.102	0.42299 ± 140.833
A13	0.148	2.07142 ± 95.230
A14	0.348	1.44908 ± 91.398
A15	0.091	1.67755 ± 111.785
A16	0.145	2.10433 ± 118.746
A17	0.540	1.95282 ± 214.610
A18	0.118	2.40987 ± 46.896
A19	0.066	1.35833 ± 66.061
A20	0.162	1.60446 ± 24.734
A21	0.083	1.45152 ± 43.136
A22	0.086	4.00766 ± 178.780
A23	**0.111**	3.58759 ± **428.539**
A24	**0.268**	0.84340 ± **658.227**
A25	0.071	1.44811 ± 42.639
A26	0.078	1.78044 ± 36.343
A27	0.082	0.71919 ± 34.093
A28	0.068	0.67231 ± 13.612
A29	0.059	2.72502 ± 43.093
A30	0.088	1.31193 ± 31.709
A31	0.057	2.68131 ± 20.539
A32	0.097	1.15846 ± 19.417
A33	0.065	1.79441 ± 14.395
A34	0.573	1.59908 ± 154.853
A35	**0.251**	1.58473 ±**251.232**
A36	**0.332**	1.97712 ± **230.580**
A37	0.092	2.01822 ± 52.900
A38	0.181	2.21676 ± 148.228
A39	0.184	1.89450 ± 138.127
A40	**0.201**	1.63076 ± **217.281**
A41	0.320	1.70728 ± 201.116

تتمة الجدول (4)...

2.08631 ± 39.529	0.098	A42
0.78525 ± 36.800	0.064	A43
1.15855 ± 23.480	0.053	A44
1.40597 ± 145.180	0.231	A45
1.12659 ± 195.411	0.282	A46
1.67859 ± 75.859	0.160	A47
1.10369 ± 94.887	0.158	A48
2.57443 ± 127.583	0.203	A49
2.08987 ± 81.075	0.108	A50

كما درس Naghavi وزملاؤه (2013) في بحث أجري في إيران العلاقة بين زمن التحضين وكمية أشباه الكاروتينات المنتجة باستخدام خميرة *R. mucilaginosa* المعزولة من مياه الصرف الصحي المعالجة، حيث أعطت هذه الخميرة كمية مرتفعة من أشباه الكاروتينات عند تحضينها مدة 48 ساعة.

واستنتج أن جميع الخمائر المعزولة المدروسة لها القدرة على إنتاج أشباه الكاروتينات بنسب متفاوتة وفوقت الطريقة السادسة عن بقية طرائق الاستخلاص المدروسة بكمية أشباه الكاروتينات المنتجة. كما تفوق النوع *R. mucilaginosa* عن باقي العزلات بكمية أشباه الكاروتينات المنتجة. ويوصى باختبار عدة أوساط مغذية رخيصة الثمن، كما يوصى باختبار عدة مصادر كربونية ومصادر نيتروجينية لتحسين الإنتاج، ومن ثم إجراء عملية تنقية لأشباه الكاروتينات المستخلصة بهدف استخدامها لاحقاً في تلوين الأغذية.

References المراجع

Aksu, Z. and A. T. Eren. 2005. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. Process Biochemistry .40:2985–2991.

Astorg, P. 1997. Food carotenoids and cancer prevention. An overview of current research. Trends Food Sci. Technol. 8:406-413.

Bendich, A. 1994. Recent advances in clinical research involving carotenoids. Pure Appl. Chem. 66: 1017-1024.

Costa, H. L., I.M. Martelli da Silva and D. Pomeroy. 2005. Production of β-carotene by a *Rhodotorula* strain. Biotechnol let. 9: 373-375.

Davoli, P., V. Mierau and R. W. Weber. 2004. Carotenoids and fat in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis.* Appl Biochem Microbiol. 40:392–397.

Dung. B. D., Huyen, H. T. B. and Quan, B.H.(2010). Optimization Carotenoids Production by Rhodotorula glutinis gbdou using design of placket-burman matrix and central composite design-Response Surface Methodology. Conference proceedings of Biotechnology for Green Solutions and Sustainable Environment: 19-25.

Elander, R. P. and L. T. Chang. 1979. Microbial Culture Selection. In Microbial Technology.2:60-66.

El-Banna, A., A.M. Abd El-Razek and A.R. El-Mahdy. 2012. Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis var. glutinis*. Food and Nutrition Sciences.3: 64-71.

Francis, F. J. 2000. Carotenoids as food colorants. Cereal Food World. 45:198-203.

Johnson, E. A and W. Schroeder. 1996. Microbial carotenoids. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnol. 53: 119-178.

Iriani, R. M., R. P. Adilma. B. Scamparini Delia and A. Rodriguez. 2005. Selection and characterization of carotenoid - producing yeasts from Campinas region. Braz J. Microbiol. 40: 2985-2991.

Kaur, B., D. Chakraborty and H. Kaur. 2009. Production and stability analysis of yellowish pink pigments from *Rhodotorula rubra* MTCC 1446. The Internet Journal of Microbiology. 7:78-88.

Kim, J. K., N.K. Lee. Y. T. Hahm. M.Y. Baik and Y. Kim. 2010. Extraction of β-carotene produced from yeast *Rhodosporidium* sp. and its heat stability. Food Sci. Biotechnol. 19: 263-266.

Krinsky, N. I. 2001. Carotenoid antioxidants. Nutr. 17: 815-817.

Libkind, D and M. van Brook. 2006. Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts. World J Microbiol Biotechnol. 22:687–692.

Longo, E., C. Siero. J.B. Velazquez. P. Calo. J. Cansado and T.G.Villa. 1992. Astaxanthin production from *Phaffia rhodozyma.* Biotechnol Forum Eur. 9:565–567.

Maldonade, I. R., A. R. P. Scamparini and D. B. Rodriguez-Amaya. 2008. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem, Food Chemistry. 107: 145–150.

Maldonade, I. R., A. R. P. Scamparini and B. Rodriguez-Amaya. 2006. Selection and characterization of carotenoids-producing yeast from campinas region, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 38:65-70.

Martin, A., C. Lu and T. Patel. 1993. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. J Ferment Bioeng 76:321–325.

Naghavi, F. P., M. Hanachi . A. Soudi .A. Saboora and A. Ghorbani. 2013. Evaluation of the Relationship between the Incubation Time and Carotenoid Production in *Rhodotorula Slooffiae* and *R. Mucilaginosa* Isolated from Leather Tanning Wastewater. Iranian journal of basic medical science. 16: 1114-1118.

Park, P. K., D. H. Cho. E. Y. Kim and K. H. Chu. 2007. Optimization of carotenoid production *by Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 429–434.

Raisainen, R. P. Nousiainen and P. H Hynninen. 2002. Dermorubin and 5-chloro-dermorubin natural anthra-quinone carboxylic acids as dyes for wool. Textile Res J. 72: 973-976.

Simova, E. D., G. I. Frengova and D. M. Beshkova. 2004. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultivated with yogurt starter cultures in whey ultra-wltrate. J. Indian Microbial Biotechnology. 31:115–121.

Somashekar, D and R. Joseph. 2000. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation *in R. gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. World Journal of Microbiology and Biotechnol. 16: 491-493.

SPSS Inc. Released. 2008. SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc.

Squina, F. M., F. Yamashita. J. L. Pereira and A. Z. Mercadante. 2002. Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in Culture Medium Supplemented with Sugar Cane Juice. Food Biotechnology. 16:227-235.

Tinoi, J.,N. Rakariyatham and R.L. Deming. 2006. Utilization of mustard waste isolated for improved production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrohous.* J. Indian Microbial Biotechnology. 33:309–314.

Venil, K. C and L. P. Samy. 2009. An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin. Electronic Journal of Biology. 5: 49-61.

Vijayalakshmi, G., B. Shobha. V. Vanajakshi. S. Divakar and B. Manohar. 2001. Response surface methodology for optimization of growth parameters for the production of carotenoids by a mutant strain of *Rhodotorula gracilis.* Eur Food Res Technol. 213:234–239.

Yehia, M., E. Al- Olayan. M. Elkhadragy. A. Khalaf- Allah and N. El-Shimi. 2013. Improvement of Carotenoid Pigments Produced by *Rhodotorula glutinis.* Life Science Journal .10:386-400.

Yimyoo, T., W. Yongmanitchai and S. limtong. 2011. Carotenoid production by *Rhodotorula paludigenum* DMKU3-LPK4 using glycerol as the carbon source. J. Nat.Sci. 45: 90-100.

Received	**2014/01/15**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2014/06/16**	**قبول البحث للنشر**