

1 - المقدمة introduction:

حدثت مع مطلع القرن العشرين قفزات نوعية تطويرية في تقانات إنتاج وصناعة المواد الغذائية كماً وكيفاً وعلى كافة المستويات, مما أدى بدوره إلى وفرة الغذاء وزيادة تداوله ونقله ليس بداخل البلد المنتج فحسب بل تجاوز الرقعة الجغرافية وعبر الحدود متخذاً في ذلك شكل تجارة دولية, الأمر الذي أدى بدوره إلى استحالة إعداد وتعبئة ونقل وتخزين وعرض كثير من المواد الغذائية دون إضافة مواد كيميائية تساعد في المحافظة على الجودة الغذائية والفيزيائية للطعام , كما تساعد على جعله أكثر جاذبية وقيمة غذائية مما يجعله مرغوباً بدرجة أكبر ومن هنا جاءت أهمية المواد المضافة . وتعرف المادة المضافة بأنها أية مادة تضاف إلى الغذاء وتعمل على تغيير صفة من صفاته كالنكهة أو اللون, أو تطيل من فترة حفظه وتحسن من خواصه.

تعد الملونات الغذائية إحدى أهم المواد المضافة للغذاء , قد تكون مصنعة كيميائياً أو ملونات طبيعية التي تعد من أهم المنتجات الثانوية التي يمكن الحصول عليها من بعض العائلات والفصائل النباتية وتمثل الملونات إحدى العناصر الرئيسية المسؤولة عن اللون المتميز للنباتات وأعضائها المختلفة, وتتميز بسهولة فصلها عن الأعضاء النباتية الكاملة لها بواسطة طرق الاستخلاص المختلفة ومعظم الملونات الطبيعية تنتج في صورة مواد سائلة أو مساحيق بعد استخلاصها ونادراً ما تكون في صورة صلبة ويتم استخلاصها من داخل سيتوبلازم الخلايا الحية للأنسجة النباتية المختلفة . تتواجد الملونات الطبيعية داخل قشور وثمار النبات وأيضاً داخل البراعم الزهرية . وبالمقابل تتواجد بعض الملونات الطبيعية في أجسام الحشرات مثل الكوشنيل Cochineal, الكارمن Carmine وحمض الكارمينيك Carminic acid عبارة عن أسماء لملون يستخرج من حشرة قشرية تسمى أيضاً "Dactylopius coccus" Cochineal

تتطفل على نبات الصبار من جنس *Opuntia* ويستخرج هذا الملون من جسم الحشرة وبيوضها, ويستخدم كملون غذائي في تلوين الكيك, المشروبات, المرببات, الجيلي ه , الأيس كريم, النقانق, اللبن وغيرها, ويتميز هذا الملون بأنه أكثر الملونات الطبيعية ثباتية أمام الضوء والحرارة ومقاومة للأكسدة. وأهمية الملونات المستخلصة تكمن في استخدامها خلال عمليات تلوين المنتجات الغذائية والحلويات ومن هذه الملونات أشباه الكاروتينات التي تضاف للغذاء ليس لغاية تزيينية فحسب, وإنما لزيادة قيمته وإغناؤه. وقد وجد في النباتات حوالي 600 نوع مختلف من أشباه الكاروتينات, لا يدخل منها في النظام الغذائي عند الإنسان سوى 50 نوع فقط, تم تحديد نحو 20 منها في جسم الإنسان, ومن أهمها: ألفا كاروتين, بيتا كاروتين, ليكوبين, لوتين, كريبينوزانين, زيكسانثين. تذوب جميع أشباه الكاروتينات في الدهون وهذا يعني أن الجسم بحاجة إلى بعض الدهون في النظام الغذائي لكي تمتص أشباه الكاروتينات وحالما يتم امتصاصها إلى مجرى الدم تحملها بروتينات خاصة تسمى الليبوبروتينات تنقل الكوليسترول إلى سائر الجسم. وأشباه الكاروتينات مثل بقية المواد الكيميائية النباتية ليست أساسية للحياة, لكن لها علاقة بتراجع خطر مجموعة من الأمراض الشائعة كمرض القلب والسرطان وبخاصة سرطان الرئة والمريء والمعدة والقولون والثدي والعنق واللسان ومرض الزهايمر, والداء السكري من النوع غير المعتمد على الأنسولين. كما أن أجسامنا تواجه هجوماً مستمراً من قبل الجذور الحرة , وبمرور الوقت تسبب هذه العملية تلفاً داخلياً للأنسجة في كل الجسم, ومن الممكن أن تؤدي إلى الإصابة بالأمراض السابقة. وتقوم أشباه الكاروتينات على تحييد الجذور الحرة بتقديم إلكتروناتها مما يوقف العملية التدميرية بطريقة فاعلة وتساعد على منع الخلايا من التلف.

1 1 أهمية البحث:

نظراً للاستخدام الواسع للملونات الصناعية في الأغذية وخاصة أغذية الأطفال، ونظراً للتأثير السمي لهذه الملونات، واتجاه الإنسان في هذه الأيام نحو استخدام كل ما هو طبيعي، ونظراً لعدم وجود دراسات سابقة في القطر العربي السوري على إنتاج أشباه الكاروتينات الطبيعية، واستيرادها بأسعار مرتفعة .

1 2 هدف البحث :

- 1 - تشخيص الخمائر المعزولة من مصادر محلية مختلفة مورفولوجياً وفيزيولوجياً.
- 2 - تحسين إنتاج الخميرة من أشباه الكاروتينات باستخدام التطفير .
- 3 - اختبار مصادر كربونية رخيصة الثمن لاختيار أفضلها في إنتاج أشباه الكاروتينات.
- 4 - أمثلة ظروف إنتاج أشباه الكاروتينات باستخدام التصميم الاحصائي RSM.
- 5 - التعرف على أنواع أشباه الكاروتينات المستخلصة وتنقيتها.
- 6 - دراسة ثباتية أشباه الكاروتينات باستخدام زيوت نباتية مختلفة.

2 - الدراسة المرجعية Literature review:

2-1- الملونات:

يعتبر لون الغذاء مهماً لإرضاء المستهلك وجذبه لشراء المنتج الغذائي، ويرجع سبب إضافة الملونات إلى فقدان اللون الطبيعي للغذاء نتيجة التعرض للضوء أو الهواء أو الحرارة أو الرطوبة أو أثناء التخزين. وتشمل الملونات جميع الصفات الطبيعية والصناعية والتي تضاف إلى الأغذية لإعطائها ألوان مميزة فتكسبها بذلك مظهراً جذاباً تسيطر به على رغبة المستهلك. وتستعمل هذه المواد بكثرة في صناعة الأغذية وخاصة مأكولات الأطفال وهنا تكمن الخطورة، فالملونات المصنعة بطريقة كيميائية تزيد احتمالية الإصابة بالسرطان وتشوه الأجنة، ويعود ذلك إلى أثرها التراكمي في مناطق محددة من الجسم الذي يعجز غالباً عن طرحها خارج الجسم، مما يؤدي مع زيادة الاستهلاك والزمن إلى ظهور خلل في النم و النسيجي وانتقاله إلى حالات من النمو العشوائي الذي يترافق مع حالات من الأمراض المختلفة. ولهذه الأسباب فقد تم منع استخدام هذه الملونات والتي كانت فيما مضى تستخدم لتلوين الأغذية، وتوجهت الدراسات الحديثة نحو إنتاج ملونات طبيعية بطرق مختلفة تتمتع بالمواصفات المطلوبة من حيث الذوبانية والثبات والتكاليف وتؤمن حاجة المستهلك الذي أصبح أكثر إدراكاً بمشاكل المضافات الغذائية الصناعية (Kaur et al., 2009).

تستخدم العديد من الملونات المركبة صناعياً في عمليات تصنيع المواد الغذائية، مستحضرات التجميل والمواد الصيدلانية (Maldonade et al., 2006). وبما أن استخدام الملونات الصناعية له تأثيرات ضارة، طورت عملية إنتاج الملونات لنتج من مصادر طبيعية، وقد ازداد استخدام الملونات الطبيعية في عمليات التصنيع المختلفة في السنوات السابقة الأخيرة

لتفادي التأثير الضار المرتقب من استهلاك الملونات الصناعية (Unagul *et al.*,2005). والملونات الطبيعية هي صبغات يستحصل عليها من مصادر طبيعية, وتخضع لنفس إجراءات التمحيص التي تتعرض لها الصبغات التركيبية الاصطناعية قبل التصريح باستخدامها في الأغذية, ولكن لا يطلب التحقق من نقاوتها كيميائياً. يمكن الحصول على الملونات الطبيعية من مصدرين أساسيين هما النبات والأحياء الدقيقة (Cho *et al.*,2002). ومن أهم هذه الملونات الطبيعية أشباه الكاروتينات والتي تشمل مجموعة من الصبغات ذات اللون الأصفر, البرتقالي والأحمر وهي غير ذوابة في الماء ولكن يمكن استخلاصها من الأنسجة النباتية باستخدام المذيبات العضوية المناسبة (مذيبات الدهون) وهي مسؤولة عن تلون أوراق الأشجار خلال فصل الخريف بألوان زاهية, وكذلك مسؤولة عن ألوان أوراق النباتات في الربيع مع كمية بسيطة من الكلوروفيل.

2-2- أشباه الكاروتينات :

2-2-1- تعريف أشباه الكاروتينات :

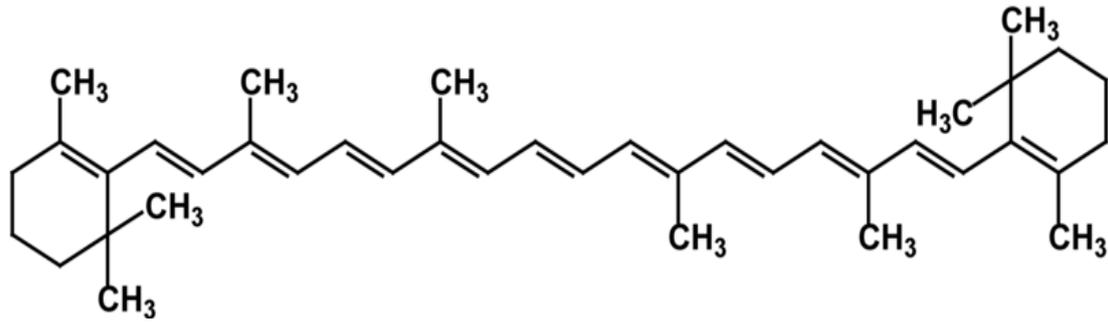
تعرف أشباه الكاروتينات بأنها عبارة عن صبغات عضوية تيتراتيريبيويدية (tetraterpenoid) صفراء اللون ، توجد بشكل طبيعي في الخضروات والفاكهة وتكثر في بعضها ، مثل الجزر و الطماطم و المشمش و الأناناس وغيرها. كذلك يعتبر صفار البيض مصدراً مهماً لأشباه الكاروتينات, ويمكن أن تكون أشباه الكاروتينات عبارة عن دهون مركبة وغيرها من عوامل الأيض (التمثيل الغذائي) في كل هذه الكائنات. وغالباً لا يمكن استخلاص أشباه الكاروتينات من الأنواع الموجودة ضمن المملكة الحيوانية (رغم أنه معروف أن أحد أنواع حشرة المن قد اكتسبت الجينات اللازمة لتركييب توريلين الكاروتينات من الفطر من خلال النقل

الجيني الأفقي) وتحصل الحيوانات على الكاروتينات من طعامها، ويمكن أن تقوم باستخدامها بطرق متعددة في عملية التمثيل الغذائي (Diplock *et al.*, 1998).

تضم أشباه الكاروتينات مجموعة مؤلفة من أكثر من 600 جزيء في النبات، تنجز وظائف متعددة ومتنوعة. وتوجد هذه الصبغات في بعض الثمار مثل الخوخ، قشر الموز، البندورة، الفليفلة، المشمش، والقرع، وفي أجزاء أخرى من النباتات كما في الجزر والبطاطا الحلوة، البرتقال، الزهور الحمراء، الغريفون وغيرها. وكذلك في بعض منتجات الحيوانات كالدوم، الحليب، صفار البيض، سمك السلمون الأحمر والزبدة (Johnson and Schroeder, 1995). ومن الناحية الكيميائية هي مركبات عضوية تتكون من هيدروكربونات لـ 40 ذرة كربون أو مشتقات أوكسجينية للهيدروكربونات (Britton, 1995). وتقسم أشباه الكاروتينات إلى الكاروتينات والكزانثوفيلات.

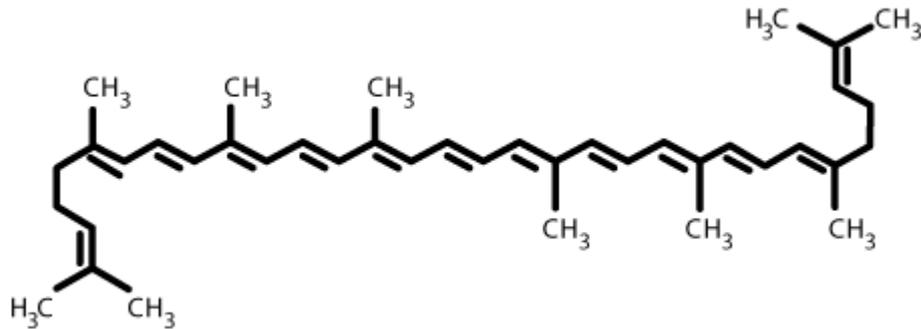
1 - الكاروتينات:

تعتبر الكاروتينات هيدروكربونات غير مشبعة ذوابة في إيثر البترول، وتقسم إلى ثلاثة أنواع هي α ، β و γ كاروتين وهي تختلف عن بعضها في التركيب الحلقى فقط، وهي مشتقات صفراء تميل إلى اللون البرتقالي. وتعد الكاروتينات هامة من الناحية الغذائية حيث أنها مصدر لفيتامين A في جسم الإنسان، يعطي β كاروتين جزيئين من فيتامين A بينما يعطي α و γ كاروتين جزيء واحد من فيتامين A (الخياط ومحمد، 2000).



التركيب الكيميائي لـ β كاروتين (Armstrong and Hearst,1996)

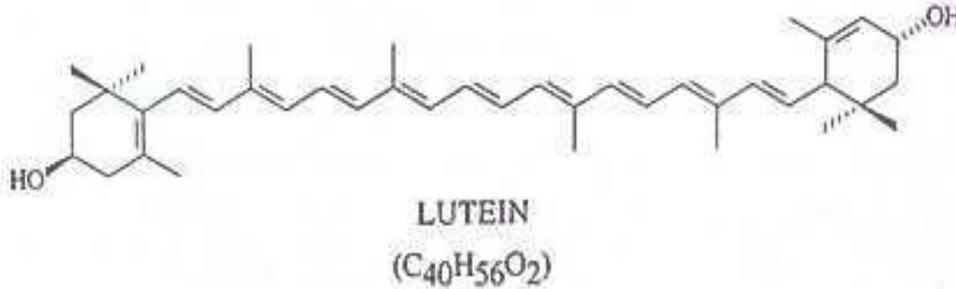
أما الليكوبين فهي الصبغة الحمراء الموجودة في البندورة والمسؤولة عن اللون الأحمر ولكنها توجد عادةً مع كاروتينات أخرى ، ويعد مركب الليكوبين مركباً مقاوماً للسرطان بشتى أنواعه وخاصة سرطان الثدي والبروستات . وهو من الأصباغ العضوية التي يمكن تحويلها إلى فيتامين A ومن المغذيات العضوية الموجودة في النباتات التي لها خاصية مضادة للأكسدة ومضادة للالتهاب ولا يمكن تصنيع هذه الصبغة من قبل جسم الإنسان ويجب أن تدخل في نظامنا الغذائي، وهو المغذيات القابلة للذوبان بالدهون.



التركيب الكيميائي لـ الليكوبين (Armstrong and Hearst,1996)

2 - الكزانثوفيلات :

هي أشباه الكاروتينات التي تحتوي على عنصر الأكسجين, ويوجد الأكسجين فيها على صورة هيدروكسيل. توجد عادةً في أوراق النباتات مترافقة مع الكاروتين منها: الزياكزانثين والكريبتوكزانثين وهي الصبغة الرئيسية في الذرة الصفراء, واللوتين الذي يعطي اللون المميز لتويجات أزهار النبات المخملية المنتصبة , يخزن مركب اللوتين والزياكزانثين في شبكية العين ولكن لا يخلا في تشكيل الفيتامين A , كما يعتبران من مضادات الأكسدة الفعالة, ويستخدمان في معالجة حالات التنكس البقعي . وهناك بعض أشباه الكاروتينات التي يوجد بها الأوكسجين على صورة أحماض كربوكسيلية أو هيدروكربوكسيلية.



التركيب الكيميائي لـ اللوتين (Armstrong and Hearst,1996)

2-2-2- أهمية أشباه الكاروتينات:

تمتلك أشباه الكاروتينات خصائص حيوية هامة إضافةً لكونها ملونات طبيعية تجذب المستهلك إلى المنتج, فهي تعزز جهاز المناعة, وتقلل من مخاطر الإصابة بالأمراض المزمنة كالسرطان وأمراض القلب الوعائية (Astorg,1997), ومرض التنكس البقعي Macular

degeneration الذي ينشأ نتيجة تدرّي الخلايا المخروطية الحساسة للضوء التي توجد في الباحة البقعية للشبكية، والبقعة macula هي موقع الرؤية على الشبكية الأكثر حساسية بالنسبة للتفاصيل والألوان، وفي التنكس البقعي يكون هناك فقد تدريجي لتفاصيل الرؤية ولمجال الرؤية المركزية (بعكس الزرق، حيث تُفقد الحواف الخارجية لمجال الرؤية) ، وهو يصيب كلا العينين، لكن إحدى العينين تتأثر به عادة قبل الاخرى بأسابيع قليلة وبالتالي تحافظ أشباه الكاروتينات على رؤية صحية وسليمة (Bendich,1994), كما تلعب أشباه الكاروتينات دور مضاد للأكسدة وكاسح للجذور الحرة. وتعد واحدة من أهم المركبات الملائمة للتطبيقات الصناعية مثل الصيدلانية، الكيمائية، الغذائية، كما تضاف إلى غذاء الحيوان مع الكتلة الحيوية المنتجة له (Krinky, 2001; Costa et al., 2005). وهناك إجماع على ضرورة تدعيم وجبات الأسماك في المزارع المائية وخصوصاً مزارع أسماك السلمون والسلمون المرقط، والجمبري بصبغة astaxanthin ، وذلك لإكساب لحوم هذه الأسماك اللون الأحمر أو البرتقالي المحبب لدى المستهلك، بالإضافة إلى فوائدها الصحية، حيث ثبت أنها مركب مضاد للأكسدة ولها تأثير فعال جداً في إيقاف نشاط الأورام الخبيثة (Iriani et al., 2005).

يُنصح الأشخاص الذين يتناولون وجبات غنية بأشباه الكاروتينات من الأطعمة الطبيعية، مثل الفواكه والخضروات (الجزر، والمشمش، والأناناس، والتفاح، والفلفل الاصفر)، بالصحة وتقل نسبة الوفيات بينهم، ذلك لأن الكاروتينات تمنع فاعلية الجذور الكيميائية الضارة للجسم (Diplock et al., 1998).

تساهم أشباه الكاروتينات في تعزيز صحة القلب وسلامته وذلك من خلال منع الكوليسترول السيئ LDL من التأكسد وهي العملية التي تجعل الدهون تلتصق بجدران الشرايين،

وتبين الدراسات أن الأشخاص الذين يرتفع لديهم مستوى أشباه الكاروتينات يقل لديهم خطر الإصابة بأمراض القلب مقارنة بهؤلاء ممن تتخفض لديهم هذه المركبات. وقد أشارت الدراسات أن المدخنين الذين سبق أن أصيبوا بنوبة قلبية واحدة يقل احتمال إصابتهم بنوبة قلبية ثانية إذا ارتفع في مستوى الدم لديهم نسبة أربعة أنواع مهمة من أشباه الكاروتينات هي البيتاكاروتين، الليوتين، والليكوبين، والزيكسانثين (Armstrong and Hearst, 1996).

2-2-2-1- أشباه الكاروتينات كمولدات لفيتامين A:

عرفت أشباه الكاروتينات منذ زمن بعيد كمولدات لفيتامين A (Tang *et al.*, 2009). تم التعرف على أكثر من 600 نوع طبيعي من أشباه الكاروتينات ، ومن هذه الأنواع فقط 50 نوع يمتلك خاصية مولد لفيتامين A (Aizawa *et al.*, 2011) ، ومن بين هذه الأنواع الخمسين تعتبر ثلاثة أنواع فقط الأكثر أهمية و الأكثر استخداماً كمولد لفيتامين A في جسم الإنسان وهي β - Cryptoxanthin ، α - Carotene ، β - Carotene (Carrillo-Lopez *et al.*, 2010) التي تتحول إلى فيتامين A عندما تصل إلى داخل الجسم بعد تحررها من المادة الغذائية المحتوية عليها بعد هضمها (Park *et al.*, 2005). تتواجد هذه الأنواع الثلاثة في العديد من الخضروات والفواكه وتلعب دوراً هاماً في حماية العين من العشا الليلي (Takahashi *et al.*, 2006).

2-2-2-2- أشباه الكاروتينات كمضادات للسرطان:

ينتشر حوالي 10 مليون مرض سرطاني على امتداد العالم وهذا العدد يتزايد بسرعة ، وقد تبين أن الناس النباتيين الذين يعتمدون في غذائهم على الخضروات والفواكه بشكل يومي ينخفض بينهم معدل الإصابة بالسرطان إلى أكثر من 20% (Basu *et al.* , 2001) ، حيث

أن النظام الغذائي المعتمد على الخضروات والفواكه بشكل أساسي يتميز بغناه بأشباه الكاروتينات وهذا يعزز أهميتها كمواد مضادة للسرطان (Rock, 2009) .

2-2-3- أشباه الكاروتينات كمضادات للأكسدة:

تلعب أشباه الكاروتينات في كل الكائنات الحية دور مركبات مضادة للأكسدة (Yeum *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2007) , وفي جسم الإنسان تعتبر أشباه الكاروتينات جزءاً هاماً من نظام الحماية ضد الأكسدة (Stahal and Sies, 2003) . تستطيع أشباه الكاروتينات إيقاف الأكسجين الحر بأسلوب مشابه لعمل التوكوفيرولات المعروفة كمضادات أكسدة عالية الأهمية (Stahal *et al.*, 2000) , كما تستطيع تثبيط أكسدة الجذور الحرة وذلك بواسطة ثلاثة تفاعلات عن طريق إضافة الكترولون ناقل ونقل ذرة هيدروجين (El-Agamey and Mcgarvey, 2008).

2-2-3- مصادر أشباه الكاروتينات:

استخلصت أشباه الكاروتينات قديماً من النباتات كالأناتو, الجزر, الفلفل والزعفران (Iriani *et al.*, 2005), إلا أن مستخلصات النباتات الطبيعية غير مستقرة نظراً لتأثرها بالتغيرات المناخية وفصول السنة, وتذبذب إنتاجها من منطقة جغرافية إلى أخرى, إضافة إلى أن مستوى اللون يقل أثناء الاستخلاص الكيميائي من النبات (De haan *et al.*, 1991) , كما أن الملونات المستخلصة من النباتات غير مستقرة تجاه الحرارة أو الضوء أو تغيرات الـ pH مقارنة مع الملونات الميكروبية المصدر التي تتميز بثباتها تجاه هذه العوامل (Raisainen *et al.*, 2002; Venil and Lakshmanaperumalsamy, 2009).

تزايد اليوم الاهتمام بإنتاج الملونات الميكروبية لتستخدم في مجال متنوع من التطبيقات الصناعية وذلك لسهولة التعامل مع الأحياء الدقيقة وسرعة نموها وتكاثرها ورخص وتوفر المواد الأولية اللازمة لتنميتها, فضلا" عن إمكانية تحسين إنتاجها من خلال التحكم في الظروف المزرعية للوصول إلى الظروف البيئية والتغذوية المثلى للإنتاج

(Francis, 2000; Johnson and Schroeder, 1996). ومن أهم الأحياء الدقيقة المنتجة

لأشباه الكاروتينات هي البكتريا مثل أجناس *Micrococcus* , *Sphingomonas* و *Flavobacterium* (Nelise and De Leenheer, 1991) والفطور مثل

Blakeslea trispora والطحالب مثل *Dunaliella* و *Haematococcus* (Frengova and Beshkova, 2009).

والخمائر مثل *Rhodotorula species* (Vijayalakshmi et al.,2001)

Rhodospiridium و *Phaffia genera* (Frengova and Beshkova, 2009) .

تعتبر الخمائر أكثر ملائمة لإنتاج أشباه الكاروتينات بكميات كبيرة مقارنةً مع الفطور والطحالب وذلك بسبب معدل نموها العالي والسريع وطبيعتها المسامية. ويتم تركيب أشباه الكاروتينات في الخمائر هوائياً ومعدل التهوية يعد هاماً لتمثيل الركيزة كما هو هاماً للنمو وتشكيل الكتلة الحيوية وتكوين أشباه الكاروتينات

(Longo et al., 1992; Martin.et al., 1993). ويختلف نوع أشباه الكاروتينات المنتجة

من الخمائر باختلاف النوع والسلالة وتركيب الوسط والظروف البيئية المحيطة

(Squina et al., 2002) . ويمكن إنتاج أشباه الكاروتينات من الخمائر بطريقة اقتصادية

باستخدام مواد أولية رخيصة كمصدر للكربون ومن هذه المواد مصّل الجبن

(Frengova *et al.*, 2004), المولاس (Bhosal and Gadre, 2001), بقايا صناعة

المعكرونة, مستخلص البطاطا الحلوة (Sntroshuk, 2004), عصير العنب وتقل العنب

(Buzzini, 2000), والغليسيرول الخام (Easterling *et al.*, 2009). يحتل جنسي

Rhodotorula و *Phaffia* المرتبة الأولى في إنتاج أشباه الكاروتينات, حيث تستخدم في

إنتاج أشباه الكاروتينات على مستوى تجاري. تنتج *Rhodotorula* بشكل أساسي كل من

Torularhodin و Torulene , β -Carotene

(Simova *et al.*, 2004 ; Libkind and Brook, 2006) وبنسب مختلفة تختلف من سلالة

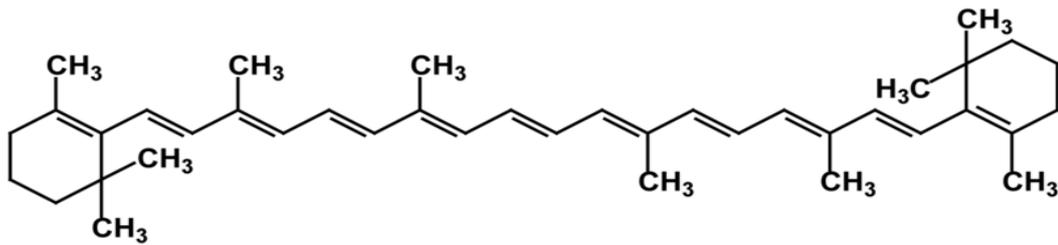
لأخرى ضمن النوع الواحد (Davoli *et al.*, 2004; Squina *et al.*, 2002).

أهم أشباه الكاروتينات المنتجة في الخمائر هي :

1 - β -Carotene : يستخدم هذا الجزيء كملون للغذاء أو كمادة مغذية حيث يتحول إلى

فيتامين A بتركيز تتراوح ما بين 2-50 ppm, كما يضاف إلى العصائر والمشروبات والزبدة

والجبنة والمارجرين (Armstrong and Hearst, 1996).

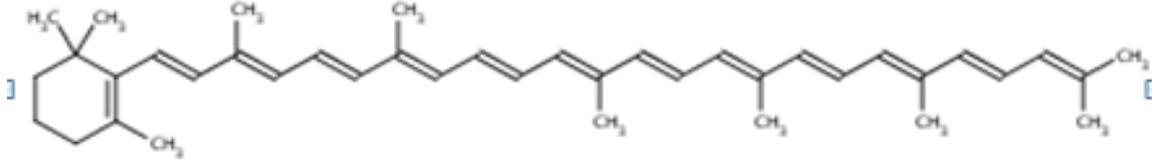


التركيب الكيميائي لـ β كاروتين (Armstrong and Hearst, 1996)

2 - Torulene: تحوي على 13 رابطة مضاعفة تكسيها خصائص هامة مضادة للأكسدة

أكثر فعالية من β -Carotene الذي يمتلك روابط مضاعفة أقل في تركيبه

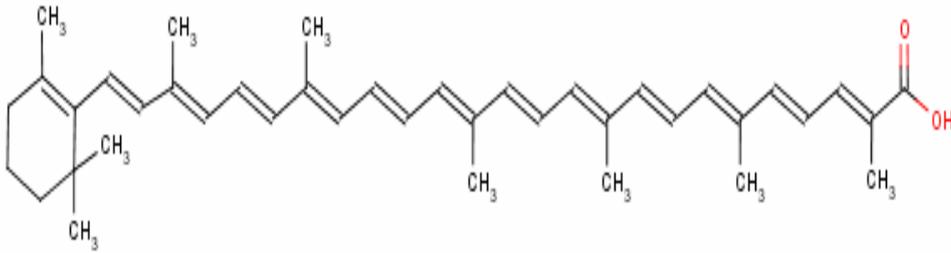
(Latha and Jeevaratnam, 2010)



التركيب الكيميائي للتوربولين Torulene (Latha and Jeevaratnam, 2010)

3 - Torularhodin: هي صبغة حمراء أرجوانية جذابة تستخدم كملون للأغذية عند

إضافتها بكميات قليلة إضافة لكونها مضاد أكسدة هام

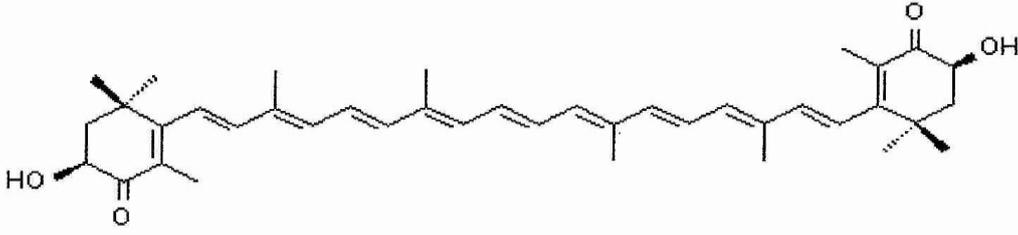


التركيب الكيميائي للتريولارهودين Torularhodin (Latha and Jeevaratnam, 2010)

4 - Astaxanthin : هي صبغة حمراء اللون تعطي لوناً أحمرأ جذاباً للأسماك والطيور

اللافقارية البحرية , كما تستخدم كملون لمزارع أسماك السلمون والروبيان والسمك المرقط

(Tinoi *et al.*,2006).



التركيب الكيميائي للأستاكسانثين (Latha and Jeevaratnam, 2010) Astaxanthin

بينما تنتج خميرة الـ *Phaffia* الكاروتين astaxanthin بشكل رئيسي

(Tinoi et al., 2006). وتختلف خميرة *Phaffia* تماماً عن باقي الخمائر المنتجة للصبغات

في نقطتين هامتين، الأولى هي أن هذه الخميرة تخمر سكر الجلوكوز والسكريات الأخرى،

والثانية أن هذه الخميرة تصنع بشكل رئيسي صبغة أستاكسانثين astaxanthin كإحدى صبغات

الكاروتين. أما باقي أجناس الخمائر المنتجة للصبغات مثل *Cryptococcus*

، *Rhodotorula*، *Rhodospiridium*، *Sporidiobolus*، و *Sporobolomyces*،

فإنها خمائر هوائية إجباري أي لا تستطيع تخمير السكريات إلى إيثانول وثاني أكسيد كربون، كما

أنها تصنع صبغات β -كاروتين، γ -كاروتين، توربولين Torulene، و توريلارهودين

Torularhodin بشكل رئيسي (Zheng et al., 2006). تنتشر هذه الخمائر الملونة انتشاراً

واسعاً في الطبيعة، حيث توجد في التربة والهواء وأوراق النباتات

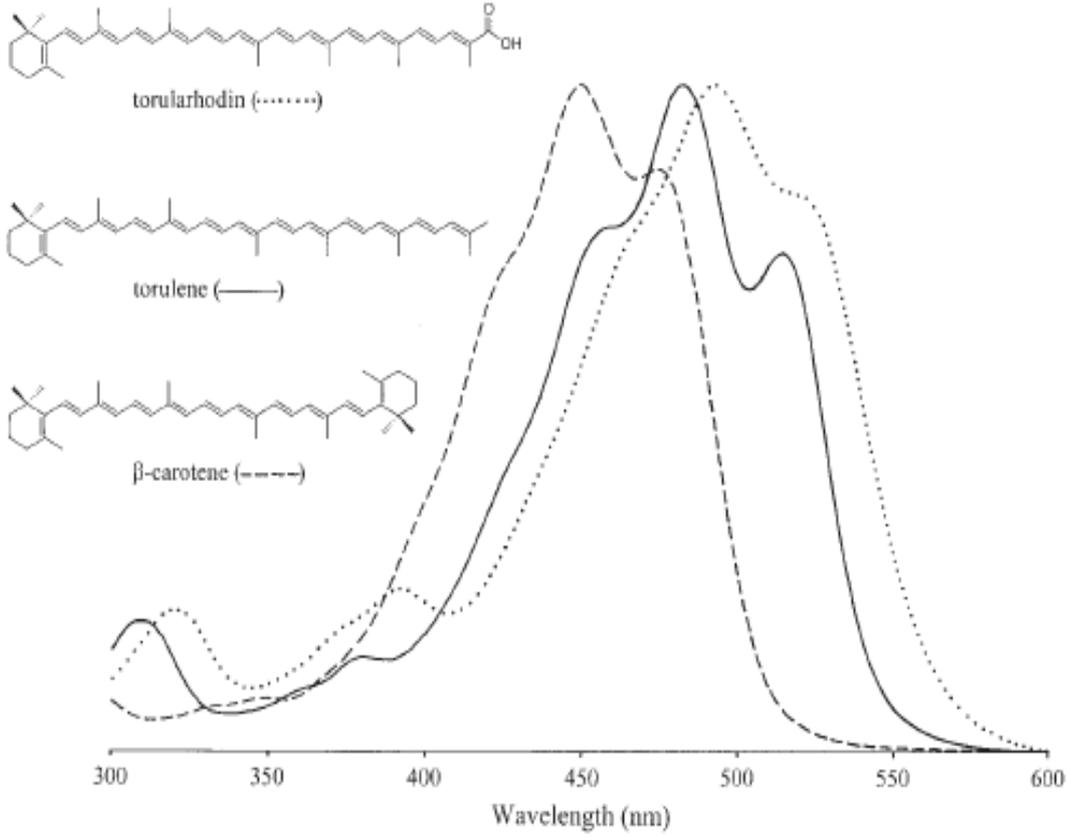
(Maldonade et al., 2006)، ويبين الجدول (1) أهم مصادر أشباه الكاروتينات الميكروبية.

الجدول (1) : المصدر الميكروبي لأشباه الكاروتينات

المرجع	الكائن الحي الدقيق
	الطحالب
Garcia-gonzalez <i>et al.</i> , 2005	<i>Dunaliella salina</i>
Mogedas <i>et al.</i> , 2009	<i>Dunaliella bardawil</i>
Lorenz and Cysewsk, 2000	<i>Haematococcus sp.</i>
DelCampo <i>et al.</i> , 2007	<i>Murielopsis sp.</i>
Kviderova and Henley, 2005	<i>Picochlorumoklahomensis</i>
	الفطور
Filotheou <i>et al.</i> , 2010	<i>Blakeslea trispora</i>
Papp <i>et al.</i> , 2009	<i>Mucor circinelloides</i>
Cerda-Olmedo, 2001	<i>Phycomyces blakesleanus</i>
Jones <i>et al.</i> , 2004	<i>Fusarium sporotrichoides</i>
Hansmann and Sandmann, 2000	<i>Neurosporacrassa</i>
Kivanc and Kahyaglu, 2008	<i>Phycomycesnitens</i>
	الخمائر
Wang <i>et al.</i> , 2008	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Buzzini <i>et al.</i> , 2000	<i>Rhodotorula glutinis DBVPG 3853</i>
Malisorn and Suntornsuk, 2009	<i>Rhodotorula glutinis DM28</i>
Buzzini <i>et al.</i> , 2005	<i>Rhodotorula graminis</i>
Simova <i>et al.</i> , 2003	<i>Rhodotorula rubra</i>
Juckyoung <i>et al.</i> , 2009	<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>
An <i>et al.</i> , 1991	<i>Xanthophyllomyces dendorhous</i>
Valduga <i>et al.</i> , 2008	<i>Sporodiobolus salmonicolor</i>
Maldonade <i>et al.</i> , 2008	<i>Sporobolomyces roseus</i>
Libkind and Broock, 2006	<i>Cryptococcus sp.</i>
Sperstad <i>et al.</i> , 2006	<i>Rhodospiridium babjevae</i>
	البكتريا
Asker <i>et al.</i> , 2007	<i>Sphingomonas jaspsi</i>
David, 1974	<i>Mycobacterium kansasii</i>
Bhosale and Bernstein, 2004	<i>Flavobacterium multivorum</i>
Krubasik and Sandmann, 2000	<i>Flavobacterium sp.</i>
. Salah and Ibrahim, 2008	<i>Micrococcus sp</i>

4-2-2 - الخصائص الفيزيائية لأشباه الكاروتينات :

تمتلك أشباه الكاروتينات طيف امتصاص مميز , حيث أن الروابط المضاعفة هي التي تكسبها الخصائص الطيفية والتي تمتص الضوء بشكل نموذجي في طول موجة ما بين 400-500 نانو متر (Armstrong and Hearst , 1996) كما هو موضح في الشكل (1) والجدول (2)



الشكل (1) : طيف الامتصاص لثلاثة أنواع من أشباه الكاروتينات

(Davoli and Weber, 2002)

الجدول (2) : طيف الامتصاص المثالي لأهم أشباه الكاروتينات الذائبة في ايثر البترول

طيف الامتصاص	أشباه الكاروتينات
467	Canthaxanthin
444	α -Carotene
452	β -Carotene
461	γ -Carotene
472	Lycopene
286	Phytoene
347	Phytofluene
451	Zeaxanthin

2-2-5- ثباتية واستقرار أشباه الكاروتينات :

قدم Scita (1992) دراسات منهجية مفصلة على العوامل التي يمكن أن تؤثر في استقرار أشباه الكاروتينات النقية تحت الظروف البيئية المختلفة بالإضافة إلى ذلك درس تأثير الأشعة فوق البنفسجية (Shi and Chen 1997; Dzulkefly and Hamdan, 1999), والضوء الأبيض (Biacs and Fekete, 1998) والهواء (Henry *et al.*, 1998) والحرارة والتعرض للحموض (Ancos *et al.*, 1999) .

تحدث مجموعة من التفاعلات الكيميائية أثناء عملية تحطم أشباه الكاروتينات

(Berset and Marty, 1992) وهي:

1 - تماكبات متعددة على روابط مضاعفة محددة تؤدي إلى إحداث تعديلات في شكل

الجزئي وبالتالي تعديل الاستقرار .

2 - أكسدة أشباه الكاروتينات تسبب تشكيل الإيبوكسي epoxy والهيدروكسيل والكيتون ketone .

3 - تمزق تأكسدي بسبب تقصير السلسلة الغير مشبعة.

يمكن الوقاية من تحطم أشباه الكاروتينات عن طريق استخدام المواد المضادة للأكسدة مثل الأنيسول و butylate dhydroxy toluene والتوكوفيرول (Orset and Young, 1999).
تضاف أشباه الكاروتينات في العديد من الصناعات الغذائية ويمكن أن يضاف أثناء تغليفها مواد تحسن من استقرار وثباتية أشباه الكاروتينات مثل الصمغ العربي (Leach et al., 1998) , مالتو ديكسترين (Desobry et al., 1999), ألجينات الصوديوم (Go et al., 1999) و الجيلاتين (Xuan et al., 1998).

2-2-6- التخليق الحيوي لأشباه الكاروتينات :

قام Simpson وزملائه في عام 1964 ثم فيما بعد Goodwin بشرح مسارات تخليق أشباه الكاروتينات بواسطة الخمائر الذي يتضمن ثلاثة خطوات وهي :

1 - تحويل ثلاثة جزيئات من Acetyl-CoA إلى 3-hydroxyl-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) بواسطة إنزيم HMG-CoA synthase حيث يتحول HMG-CoA إلى مركب سداسي ذرات الكربون C_6 وهو Mevalonic acid (MVA) الذي يعتبر أول مركب نوعي في مسار التخليق الحيوي للتربينات, يتحول فيما بعد إلى Isopentenyl pyrophosphate (IPP) بواسطة مجموعة تفاعلات فسفرة وبوجود إنزيم MVA Kinase تتبع بنوع مجموعة الكربوكسيل (Decarboxylation).

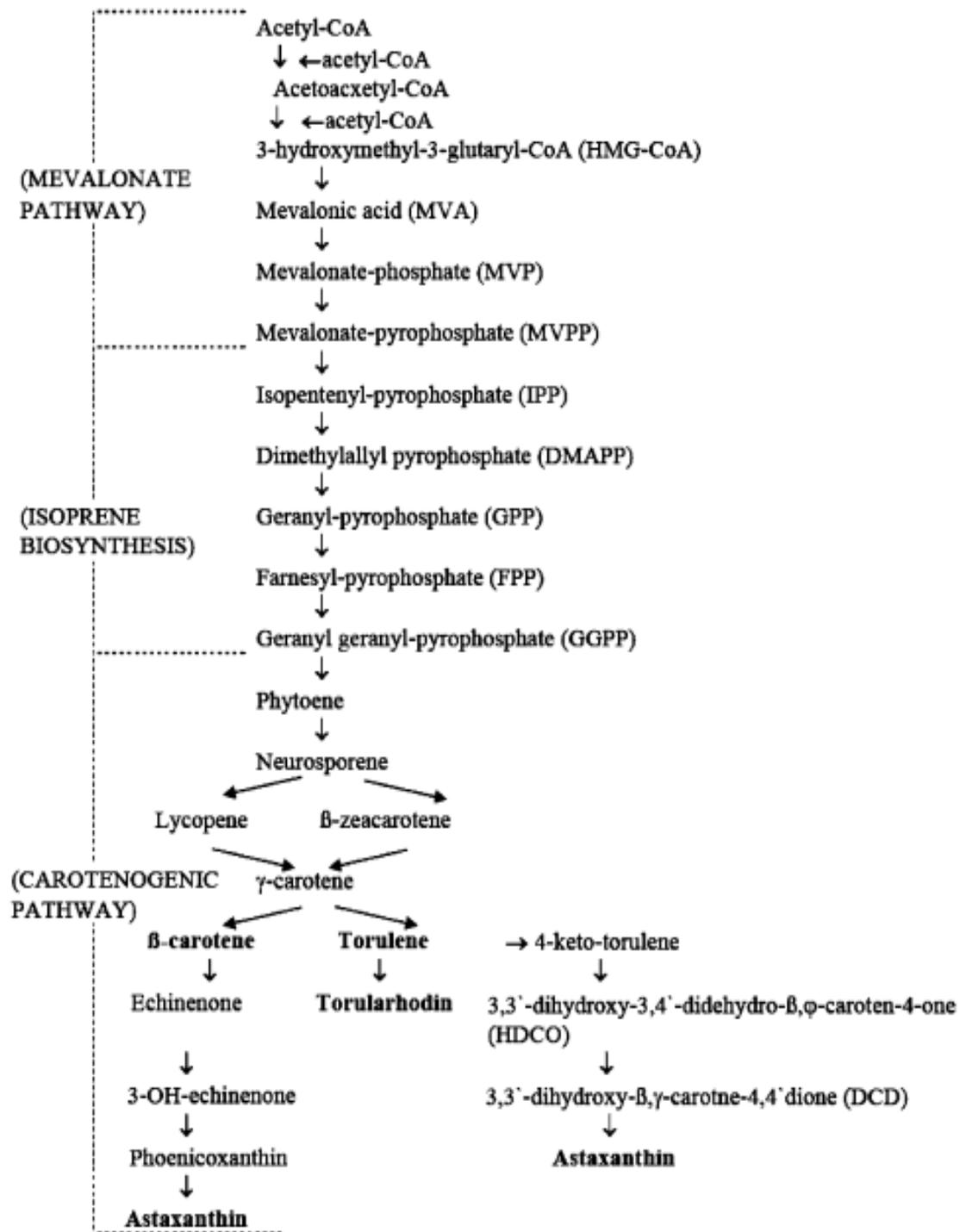
2 - يطرأ على مركب IPP عملية مماكبة (isomerization) إلى مركب آخر مماكب هو Dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) مع إضافات متتالية من ثلاث جزيئات IPP إلى DMAPP وهذه التفاعلات تتم بوساطة إنزيم Prenyltransferase لإنتاج مركب يحوي 20 ذرة كربون C₂₀ Geranyl Geranyl pyrophosphate (GGPP), يتكاثف جزيئان من GGPP ليعطي مركب جديد Phytoene وهو أول مركب C₄₀ (كاروتين) في مسار التخليق, والذي ييحب منه ذرة هيدرجين لتكوين الليكوبين Lycopene

3 - يعمل الليكوبين كمولد لأشباه الكاروتينات الملتفة حيث يطرأ عليه عدة تفاعلات استقلابية مثل Cyclization لتكوين β - Carotene , γ -Carotene , Torulene , Astaxanthin و Torularhodin .

يعمل γ -Carotene كنقطة تشعب رئيسية ومولد لـ β - Carotene و Torulene, ثم يطرأ على Torulene عمليتين هما Hydroxylation و Oxidation بوساطة مزيج من إنزيمات الأوكسيداز الوظيفية لتكون Torularhodin.

وفي عام 1967 اقترح Andrewes وزملائه أول مسار لتكوين Astaxanthin من خلال عدة خطوات تتضمن مركبات وسيطية مثل Lycopene و β - Carotene كما هو موضح في الشكل

(2)



الشكل (2) : التخليق الحيوي لأشباه الكاروتينات في جنس *Rhodotorula*

(Frengova and Beshkova, 2009)

2-3- الخمائر:

فصلت الخمائر كمجموعة بمفردها منذ بداية دراسة علم الأحياء الدقيقة لأهميتها الاقتصادية ومن المعروف أن الخمائر Yeasts تتبع الفطريات Fungi أساساً لكنها تدرس في قسم منفصل لأهميتها الخاصة و هي عبارة عن فطريات وحيدة الخلية لا تكوّن ميسيليوم مثل الفطريات الأخرى و إنما توجد كخلايا مفردة .

2-3-1- الصفات العامة للخمائر :

الخمائر عبارة عن كائنات وحيدة الخلية، تتكاثر معظمها خضرياً بالتبرعم Budding ولكن قليلاً منها يتكاثر بالانقسام الثنائي البسيط , تمتلك شكلاً كروياً أو بيضويّاً وقد تكون بشكل ثمرة الليمون أو اسطوانية أو مستطيلة , وتستطيل بعض أنواع خلايا الخمائر مكونة جسماً خيطياً حقيقياً أو غير حقيقياً. تكوّن الخمائر ذات المشيخة على الأوساط الزرعية الصلبة نمواً يشبه الفطريات يصعب غالباً تمييزه عن فطريات العفن، أما الخمائر وحيدة الخلية النموذجية فإنها تكوّن مستعمرات تشبه كثيراً المستعمرات التي تكوّنها البكتيريا (الخياط , 2005).

2-3-2- أنواع الخمائر : (صادق , 2004).

2-3-2-1- الخمائر الغشائية Film yeasts:

تنمو الخمائر الغشائية Film yeasts على سطح الأوساط الغذائية السائلة وتبقى عادة في هذا الوضع حتى ينكسر الغشاء أو يغوص عندما يتقل وزنه, تقوم الخمائر الغشائية بوجه عام بأكسدة الأغذية العضوية مثل السكريات و الكحولات و الأحماض العضوية منتجة منها غاز ثاني أكسيد

الكربون CO_2 و مؤدية إلى بعض التغيير في المواد الغذائية من ناحية الطعم والرائحة والشكل وتسمى مثل هذه الخمائر بالخمائر الكاذبة False yeasts و أحياناً يطلق عليها الخمائر الوحشية Wild yeasts .

2-2-3-2- الخمائر السطحية Top yeasts :

تتجمع خلايا الخمائر السطحية Top yeasts في كتل تطفو بفعل ارتباط فقاعات الغاز CO_2 بجدار خلايا الخميرة ويدفع بها إلى ارتفاع قريب من سطح السائل المتخمر، تخمر عادةً الأغذية الكربوهيدراتية منتجة غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 وكميات متفاوتة من الكحول الإيثيلي، تمتلك هذه الخمائر أهمية كبيرة في صناعة الخبز والمشروبات الكحولية والإنتاج الصناعي للكحول الإيثيلي ويطلق عليها اسم الخمائر الحقيقية True yeasts .

2-3-2-3- الخمائر القاعية Bottom yeasts :

تتفصل براعم الخمائر القاعية Bottom yeasts المتكونة عن بعضها البعض وتسقط في قاع السائل المتخمر، ويكون معظم نتاجها هو الكحول الإيثيلي مع جزء قليل من غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 ، وتشمل هذه المجموعة معظم الخمائر المستخدمة في الصناعة ، فالجنس Saccharomyces يمثل الخمائر التي تنتج الكحول الإيثيلي ، حيث تستخدم بعض سلالات الخميرة *S. cerevisiae* ذات الخلايا الدائرية في صناعة البيرة ، في حين تستخدم سلالات أخرى من الخميرة *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* ذات الخلايا البيضاوية في صناعة النبيذ .

2-3-3- تركيب خلية الخميرة (الخفاجي , 1990):

الخمائر عبارة عن مجموعة كبيرة غير متجانسة من الكائنات الحية الدقيقة ، وعدد قليل منها صغير الحجم لا يزيد حجمها عن حجم البكتيريا وتشابه الخميرة في تركيبها الداخلي الخلية النباتية حيث تتركب من:

2-3-3-1- الجدار الخلوي:

يحيط بالخلية جدار خلوي يحدد شكلها ، يحمي السيتوبلازم Cytoplasm من المؤثرات الخارجية، ويسمح بمرور بعض المواد دون غيره، وقد يكون الجدار الخلوي رقيقاً لا يتميز إلى طبقات، أو قد يكون سميكاً متميزاً إلى ثلاث طبقات. ويكون في بداية حياة الخلية رقيقاً أو مطاطياً إلى أن تتقدم الخلية في العمر فيصبح الجدار صلباً وتختلف هذه الطبقات عن بعضها بالتركيب الكيميائي. وتتألف الطبقات الثلاث كما يلي :

أ- الطبقة الخارجية Outer stratum : وتتكون أساساً من المانان "yeast Mannan gum" مع كميات محدودة من الكيتين Chitin.

ب- الطبقة الوسطى Middle stratum : تتكون من الغلوكان "yeast Glucan cellulose".

ج - الطبقة الداخلية Inner stratum : وتتكون من مواد بروتينية وتبقى محيطة بالغشاء السيتوبلازمي.

2-3-3-2- الغشاء السيتوبلازمي:

و هو جدار رقيق يلي الجدار الخلوي ويتكون أساساً من البروتينات الدهنية Lipoprotein ، وهو غشاء شبه نفوذ ينظم مرور المواد الغذائية الذائبة بالبيئة وخروج نواتج عمليات الإستقلاب الخلوي ويعد جزءاً من المادة الحية ويمكن رؤيته بالمجهر عند بلزمة الخلية حيث ينكمش السيتوبلازم ويظهر الجدار واضحاً.

2-3-3-3- الشبكة الإندوبلازمية:

توجد الشبكة الإندوبلازمية في السيتوبلازما ، وهي تشبه تلك الموجودة في الخلايا النباتية والحيوانية ، وترجع أهميتها لكونها تلعب دوراً هاماً في عملية التبرعم .

2-3-3-4- الحبيبات الدهنية:

توجد في السيتوبلازما و تحتوي بعض أنواع الخمائر على نسبة عالية من المواد الدهنية تصل إلى 50 % من الوزن الجاف و تستخدم بعضها في إنتاج المواد الدهنية . و تختلف كمية المواد الدهنية باختلاف ظروف التنمية.

2-3-3-5- الفجوة:

تتوضع في داخل خلية الخميرة فجوة كبيرة يوجد عند أحد أطرافها جسم صغير كثيف وهو النواة ، وتظهر الفجوة كجزء شفاف عند فحصها بالمجهر الضوئي ، وتشغل جزء كبير من الخلية . وقد توجد فجوة واحدة كبيرة أو عدة فجوات صغيرة ذات حجم متماثل. وتحتوي الفجوة على مواد دهنية

(البيدات) و فوسفات , كما أنها تحتوي على إنزيمات الحلمهة (التحلل المائي) مثل أنزيمات البروتياز وأنزيمات الاستيراز, وإذا ما تحررت هذه الإنزيمات من الفجوة إلى السيتوبلازما نتيجة لتعرض الخلايا لظروف غير مناسبة (مثل ارتفاع درجة الحرارة إلى 50°C) فإنها تسبب تحليل الحموض النووية والبروتينات الكربوهيدرات وتسمى هذه العملية بالتحلل الذاتي Autolysis .

2-3-3-6- الجسيمات الكوندرية:

هي جسيمات في السيتوبلازما وتعطيها المظهر الحبيبي . وتحتوي على أنزيمات الأكسدة و الإرجاع ويتراوح عددها بالخلية بين (4-24) موزعة قريبا من الغشاء السيتوبلازمي .

2-3-3-7- النواة:

يطلق عليها البعض المواد النووية وهي محاطة بغشاء نووي مثقب وتوضع ملامسة للفجوة , ولكن أثناء التبرعم فإنها تكون موجودة بين الفجوة والبرعم المتكون , حيث تنقسم النواة بالاستطالة إلى نواتين تتحرك إحداهما إلى البرعم و تظل الأخرى في الخلية الأم .

2-3-4- تكاثر الخمائر حسب (كشتعاري و صادق , 2005) :

2-3-4-1- التكاثر الخضري (اللاجنسي): وهو عدة أنواع:

2-3-4-1-1- التبرعم (البرعمة) :

وهو الطريقة الأكثر شيوعا لتكاثر الخمائر خضريا (لاجنسيا) , حيث يبرز بعض بروتوبلازما الخلية خارج الجدار (يتكون نتوء أو تمدد في الخلية الأصلية) , ثم لا يلبث أن ينمو البرعم و يصبح مماثلا للخلية الأم ثم ينفصل عن الخلية الأم .

2-3-4-1-2- الانقسام الثنائي البسيط :

ويشبه عملية الانقسام البسيط في البكتيريا , حيث تستطيل خلية الخميرة قليلا ثم يجري الانقسام النووي , وتنقسم الخلية إلى خليتين كل منهما تحوي نواة وسيتوبلاسما .

2-3-4-3-1- الأبواغ الكلاميدية :

في المزارع القديمة تكون خلايا بعض الخمائر جدران سميكة و تصبح ممثلة بالمادة الغذائية , ثم تذهب في طور من السكون الظاهري , وتسمى هذه الأبواغ الكلاميدية وهي أكثر مقاومة للجفاف من خلايا الخميرة الخضرية , وعندما تتوفر الظروف المناسبة فان هذه الأبواغ تثبت مكونة خلية خضرية واحدة جديدة بدون تكاثر .

2-3-4-4-1- الأبواغ المتبرعمة :

تكون بعض الخمائر المكونة للمشيجة (الخمائر التي باستطاعتها تكوين الميسيليوم) أبواغ ببيضاوية أو كروية في نهاية الهيفا شبيهة بالبراعم .

2-3-4-5-1- أبواغ مفصلية :

وهي نوع ثالث من الأبواغ اللاجنسية تكونها الخمائر المكونة للمشيجة والتي تنتج بتكسير إحدى الهيفات المقسمة.

2-4-3-2- التكاثر الجنسي: (الخياط , 2005)

يبدو أن جميع الخمائر التي تكون أبواغ زقية (أبواغ أسكية) تتكاثر بالطرائق الجنسية , ويوجد

نوعان أساسيان للخمائر المكونة للأبواغ الزقية :

2-4-3-2-1- خمائر خلاياها الخضرية أحادية الكروموزومات (أحادية الصيغة الصبغية):

وتسمى Haploid (نصف عدد الكروموزومات التي توجد في الأبواغ الجنسية) . وتتكون

الأبواغ الجنسية عند اتحاد (تزاوج) خليتين, وتبقى الأبواغ ثنائية الكروموزومات داخل الزق

(كيس أسكي) إلى أن تنقسم عند الإنبات لتكون خلايا خضرية أحادية الكروموزومات .

2-4-3-2-2- خمائر خلاياها الخضرية ثنائية الكروموزومات (ثنائية الصيغة

الصبغية Diploid) :

عندما يحدث الانقسام النووي داخل الخلية تتكون نويات تحتوي على نصف عدد الكروموزومات

العادي . ثم تحاط هذه النويات بجدران وتبقى داخل جدار خلية الأم وتسمى حينئذ بالزق (كيس

زقي) . وهذه الأبواغ أحادية الكروموزومات التي تصبح - عندما تبرز من الزق - خلايا

خضرية ، وفي بعض الحالات ينتفخ الزق وتتطلق منه الأبواغ الأحادية التي تتحد فيما بينها

مكونة لخلايا خضرية ثنائية الكروموزومات . يعتبر هذا النوع الأكثر شيوعاً بين الخمائر ذات

الأهمية الاقتصادية مثل *Saccharomyces cerevisia*

2-3-5- الخمائر المنتجة لأشباه الكاروتينات :

تنتج بعض أنواع الخمائر أشباه الكاروتينات مثل β - Carotene , Torulene , Torularhodin و Astaxanthin التي تكسبها لوناً يتدرج من الاصفر البرتقالي إلى الأحمر الأرجواني لذلك تسمى بالخمائر الحمراء, وهذه الخمائر تنتمي بأغلبها إلى شعبة Basidiomycota .

2-3-5-1- جنس *Sporobolomyces* :

يضم هذا الجنس 20 نوع من الخمائر ولكن أكثرها شهرة في إنتاج أشباه الكاروتينات *S.roseus* و *S.salmonicolor* (De Hoog, 2000) . تنمو بسرعة وتصل إلى مرحلة النضج بعد 5 أيام من التحضين, درجة حرارة نموها المثالية 25-30 ° م , المستعمرات ناعمة ومجعدة غالباً, بعضها لامع وبعضها الآخر باهت اللون. لونها أحمر ساطع إلى برتقالي وتشابه في لونها مستعمرات الجنس *Rhodotorula* . تتميز بخلاياها البيضوية إلى المتطاولة الشكل , بعضها تكون هيفات حقيقية وبعضها كاذبة , وتتكاثر خضرياً بطريقة التبرعم أحادي القطبية .

2-3-5-2- جنس *Phaffia* :

تنتمي خمائر هذا الجنس إلى شعبة basidiomycota , عزلت سابقاً من الوحل المتجمع حول بعض الأشجار عريضة الأوراق لغناها بالكربوهيدرات التي تحتاجها الخميرة لنموها, تتميز بلونها الوردي وسرعة نموها , ويعود لونها إلى إنتاجها لأشباه الكاروتينات وعلى وجه الخصوص Astaxanthin والذي لاينتج في أي جنس خميرة آخر, والذي يعتبر عنصر التغذية الأعلى ثمناً

في تربية الأحياء المائية لأنه يكسب بعض الأسماك لونها الوردي المميز مثل أسماك السلمون والروبيان والسّمك المرقط (Du et al., 2008).

2-3-5-3- جنس *Rhodotorula*

تتميز خمائر *Rhodotorula* بسهولة تحديدها وكشفها عند تنميتها على أطباق بتري حيث تتميز بألوان زاهية تتدرج ما بين الأصفر إلى الأحمر الوردي وهذا اللون ينتج عن الصبغات التي تخلفها خلايا الخميرة لحجب الموجات الضارة من الضوء وبالتالي لحماية نفسها. من الناحية المورفولوجية تتميز بخلاياها الكروية إلى بيضاوية الشكل، تنمو بسرعة مكونة مستعمرات لامعة أوباهتة وأحياناً خشنة. تتكاثر عادةً بالتبرعم من جميع الجهات، وتنتج أحياناً ما يشبه المشيخة الكاذبة، ولا تكون هذه الخمائر المادة اللزجة. تنتشر خمائر *Rhodotorula* في الطبيعة بشكل واسع فنجدها في التربة، أوراق الأشجار، الهواء، الماء وفي الكثير المنتجات الغذائية. ويتضمن هذا الجنس ثلاثة أنواع هامة في إنتاج أشباه الكاروتينات وهي *R. glutinis*، *R. minuta* و *R. mucilaginosa* (De Hoog, 2000) وتنتج ثلاثة أنواع هامة من أشباه الكاروتينات وهي β - Carotene، Torulene و Torularhodin كما تنتج كمية من الليبيدات (Perrier et al., 1995) ويمثل الجدول (3) التصنيف العلمي لخميرة *Rhodotorula*.

الجدول (3) : التصنيف العلمي لخميرة *Rhodotorula* (Maheshwari et al., 2000)

Fungi	المملكة
Basidiomycota	الشعبة
Urediniomycetes	الصف
Sporidiales	الرتبة
Sporidiobolaceae	العائلة
<i>Rhodotorula</i>	الجنس

2-3-6- نمو الخمائر :

تنشط عملية الأيض والنمو عند توفر المواد الغذائية والعوامل البيئية المطلوبة . ويحدث النمو على مستويين , الأول على مستوى الخلية حيث تحصل على حاجتها من الغذاء ويزداد حجمها. أما المستوى الثاني فهو زيادة عدد خلايا الخميرة حيث يطرأ على كل خلية انقسام (Talaro and Talaro, 2001).

يمر نمو الخميرة بعدة مراحل حيث تبدأ الخميرة بمرحلة النمو اللوغاريتمي تليها مرحلة النمو الأسّي وفيها يزداد النمو بمعدل لوغاريتمي, ثم يليها مرحلة الثبات وفيه تتوقف خلايا الخميرة عن النمو والإنقسام فترة من الزمن لتصل إلى المرحلة الأخيرة وهي مرحلة الموت وفيها يقل الغذاء وتتراكم الفضلات بسبب زيادة موت الخلايا (Walker, 1998) . يمكن للخميرة أن تنمو تحت الظروف المثالية (28° م , 100 د/د) لفترة زمنية تتراوح بين (5-6) أيام . تمر خميرة *R. glutinis* كغيرها من الخمائر الملونة المدروسة بمرحلتين نمو لوغاريتمي وأسي ومرحلة ثبات طويلة وهذا يعود إلى قدرتها على استهلاك مخازن الدهون المتشكلة خلال النمو كمصدر إضافي للطاقة (Marova et al., 2010) .

يتغير إنتاج أشباه الكاروتينات خلال مراحل نمو الخميرة بين ارتفاع وانخفاض و يكون الإنتاج المثالي في معظم سلالات الخمائر الملونة في مرحلة الثبات أي بعد 80 ساعة من الزراعة تقريباً. بمقارنة منحنيات النمو أمكن التوصل إلى بعض الاستنتاجات الجزئية حول نمو الخمائر الحمراء المنتجة لأشباه الكاروتينات (Marova *et al.*, 2010). وصلت جميع سلالات الخمائر المدروسة إلى مرحلة الثبات بعد حوالي 50 ساعة من الزراعة. يتم النمو الأعظمي الأول في معظم السلالات بعد 80 ساعة نمو, في حين كان بعد 105-140 ساعة من النمو في سلالات أخرى. تستهلك الخمائر الملونة المنتجة لأشباه الكاروتينات الركائز المتراكمة ذاتياً في بداية طور الثبات, ويترافق النمو الأعظمي للخمائر مع إنتاج أعظمي لأشباه الكاروتينات وغالباً ما يتحقق بعد 90 ساعة من زراعة الخمائر في وسط النمو. تم إنتاج أعلى كمية من أشباه الكاروتينات بعد زراعة الخميرة في وسط الإنتاج وبوجود بعض عوامل الإجهاد أو باستخدام ركائز النفايات بعد 80-90 ساعة من الزراعة للقضاء على مثبطات النمو المحتملة الناجمة عن فقر الوسط بالمواد المغذية أو التأثير السمي للفضلات المتراكمة, والزراعة لفترة أطول يمكن أن تكون غير جيدة بسبب ارتفاع معدل الموت مقارنة مع الخلايا الحية وبسبب ارتفاع تكاليف الإنتاج.

2-4- عزل الخمائر Isolation of yeast

تعتمد الخطوة الأولى في دراسة أي كائن مجهري على عزل هذا الكائن عن أشكال الحياة الأخرى, بحيث يصبح في بيئته الجديدة منفرداً عن غيره ونقياً, وتسمى هذه العملية بعملية العزل في مزارع نقية (isolation in pure culture) وتفيد هذه الخطوة لاحقاً في تجنب أخطاء التشخيص (Maheshwari *et al.*, 2000), وتسمى هذه المزرعة النقية بالعزلة (isolate) إلى

حين تشخيصها على مستوى الجنس والنوع من خلال دراسة خواصها المزرعية والمظهرية , وإذا ما أبدت عزلتان نقيتان تنتميان إلى نفس الجنس والنوع تبايناً في صفة معينة وكانت هذه الصفة أكثر وضوحاً في إحدهما مقارنة مع الأخرى توجب تسميتهما بسلالتين مختلفتين (Watanab, 2002), وتتطلب عملية عزل الفطريات معرفة مسبقة للصفة المرغوبة في الكائن والتي تعتبر الهدف الذي من أجله عزل ذلك الكائن, حيث يتخذ من هذه الصفة عامل إنتخاب عند عزل الكائنات الحية الدقيقة عن بيئاتها الطبيعية كالترية والماء والهواء وغيرها من المصادر (العاني, 1993; Beuchat, 1992 ; Jernejc and Cimerman, 2001).

2-5- الغرلة Screening

يقصد بعملية الغرلة إجراء مقارنة بين عدد كبير من عزلات الأحياء الدقيقة في صفة محددة كصفة إنتاج أشباه الكاروتينات بهدف تحديد أي منها أكثر فعالية وقدرتها على التعبير عن تلك الصفة وذلك من خلال اختبارات معينة لانتقاء العزلة الأكثر إنتاجاً واستكمال الدراسة المخبرية عليها واستخدامها لاحقاً على نطاق تجاري (عمر, 2006).

2-6- استخدام مصادر كربونية رخيصة الثمن :

تمكن مؤخراً الباحثون المهتمون بعمليات التقنية الحيوية الحصول على نواتج ذات قيمة تكنولوجية مرتفعة مثل أشباه الكاروتينات من مصادر ميكروبية ، تستخدمها مجالات صناعية مختلفة , وبالمقابل تنبوه إلى أن إنتاج أشباه الكاروتينات الميكروبية على نطاق صناعي يتطلب النظر إلى تخفيض تكاليف الإنتاج قدر الإمكان (Andre et al., 2010).

يعتبر مصدر الكربون عاملاً هاماً في إنتاج أشباه الكاروتينات, حيث أن عمليات الإستقلاب في الخمائر تعتمد على نوع المصدر الكربوني المستخدم, حيث يتم استقلاب سكر الغلوكوز واستقلاب السكاكر المتخمرة الأخرى في مسار استقلاب الغلوكوز والتخمير الكحولي (Thompson and He, 2006).

يبدأ إنتاج أشباه الكاروتينات في مرحلة الطور اللوغاريتمي لنمو الخميرة ويستمر في طور الثبات, وإن وجود مصدر كربوني مهم جداً في مرحلة الثبات. بإمكان الخمائر تركيب أشباه الكاروتينات إذا زرعت في وسط إنتاج تجاري حاوي على الغلوكوز, السكروز, الكزابلوز, السيليلبيوز والسيربيتول لكن وجود هذه السكاكر في الأوساط التجارية يسبب زيادة تكاليف الإنتاج نظراً لارتفاع أسعارها, لذلك اتجهت الدراسات نحو إيجاد مصادر كربونية بديلة رخيصة الثمن بهدف تخفيض تكاليف الإنتاج , فازداد اهتمام الباحثين باستخدام ركائز طبيعية مثل تفل العنب, مصل الجبن, المولاس, الغليسيرول الخام وغيرها من المصادر الطبيعية رخيصة الثمن. تتميز هذه الركائز إضافة لكونها مصادر كربونية رخيصة الثمن أن استخدامها في إنتاج أشباه الكاروتينات يساعد على التخفيف من ملوثات البيئة. فالغليسيرول الخام هو منتج ثانوي من صناعة الوقود الحيوي, كذلك ينتج من أسترة الزيوت النباتية وبكميات كبيرة, يوجد على شكل

إسترات في كل الدهون والزيوت (Pachauri, 2006), ومن كل 9 كغ من الوقود الحيوي نحصل على 1 كغ من الغليسيرول الخام (Dasari et al., 2005). يعد استخدام الغليسيرول الخام تحدياً كبيراً حيث أنه غير مناسب لصناعة الأغذية و الأدوية ومستحضرات التجميل (Kusdiyantini et al ., 1998) وإنما يمكن استخدامه كمصدر للكربون رخيص الثمن بدلاً عن استخدام السكاكر التي تعد مادة أولية غالية الثمن وبالتالي نخفض من تكاليف الإنتاج (Manowattana et al., 2012)

هنالك العديد من الدراسات بشأن استخدام الغليسيرول الخام لإنتاج الملونات مثل أشباه الكاروتينات من الأحياء الدقيقة (Da Silva et al., 2009). حيث تم الحصول على 33.7 مغ/ل من صبغة astaxanthin بعد 168 ساعة تخمير لخميرة *Phaffia rhodozyma* باستخدام الغليسيرول الخام كمصدر للكربون في وسط التخمير (Kusdiyantin et al., 1998) كما تم الحصول على أعلى إنتاجية من أشباه الكاروتينات من خميرة *Sporobolomyces ruberrimus* وبلغت 3.84 مغ/غ على درجة حرارة 19° م و pH تعادل 6 وباستخدام الغليسيرول الخام كمصدر وحيد للكربون (Razavi and Marc, 2006) . وفي دراسة مماثلة على خميرة *Rhodospiridium paludigenum* تم الحصول على أعلى إنتاجية من أشباه الكاروتينات وبلغت 3.43 مغ/ل بعد 132 ساعة تخمير على درجة حرارة 32° م باستخدام 40 غ/ل من الغليسيرول الخام (Yimyoo et al., 2011). ويبين الجدول (4) كمية أشباه الكاروتينات المنتجة من أنواع مختلفة من خميرة *Rhodotorula* باستخدام أوساط كربونية مختلفة رخيصة الثمن .

الجدول (4) : مقارنة كمية أشباه الكاروتينات المنتجة من أنواع مختلفة من خميرة

Rhodotorula باستخدام أوساط كربونية رخيصة الثمن

المرجع	المصدر الكربوني	كمية أشباه الكاروتينات /مغ/ غ	كمية أشباه الكاروتينات مغ/ل	نوع الخميرة
Marova <i>et al.</i> , 2011	غلوكوز	8.20	66.32	<i>R. glutinis</i>
Bhosale and Gaolre, 2001	غلوكوز	5.40	129	<i>R. glutinis</i> 32
Bhosale and Gaolre, 2001	مولاس الشوندر السكري	2.36	183	<i>R. glutinis</i> 32
Buzzini, 2001	مولاس قصب السكر	0.54	8.20	<i>R. glutinis</i> DBVPG 3853
Frengova and Beshkova, 2009	مصل الجبن	0.27	8.10	<i>R. glutinis</i> 22P
Aksu and Eren, 2005	مولاس الشوندر السكري	21.20	89	<i>R.</i> <i>mucilaginos</i> NRRL-2502
Aksu and Eren, 2005	مصل الجبن	29.20	70	<i>R.</i> <i>mucilaginos</i> NRRL-2502

2-7- العوامل المؤثرة في إنتاج أشباه الكاروتينات :

2-7-1- تأثير درجة الحرارة : Effect of Temperature

تؤثر درجة الحرارة في مختلف الفعاليات الحيوية للخلية , وكل فعالية حيوية تقوم بها الأحياء الدقيقة تتأثر بدرجة الحرارة , لذلك فإن تكون المنتجات الأيضية في الأحياء المجهرية يعتمد بشكل كبير على درجة الحرارة, ومن الحقائق المثبتة من قبل الكثير من الباحثين هو أن درجة الحرارة المثلى لنمو الأحياء المجهرية ليس من الضروري أن تكون ذاتها المثلى للتحويلات الأيضية لتلك الأحياء (السواح, 2002; Juffs, 1976).

يعتمد تأثير درجة الحرارة على نوع الكائن الحي الدقيق وبالتالي يحدث تباينات في إنتاج أشباه الكاروتينات المنتجة (Naghavi et al., 2014)

تباينت الدرجات الحرارية المستخدمة لنمو الأحياء المجهرية وإنتاجها لأشباه الكاروتينات، حيث ازداد إنتاج أشباه الكاروتينات ومعدل نمو خميرة *R. glutinis* ازدياداً ملحوظاً مع زيادة درجة الحرارة لتصل إلى أعلى إنتاج على درجة حرارة 30 °م ثم تناقص الإنتاج عند تجاوزها لهذه الدرجة (Aksu and Eren, 2007) . بينما كانت درجة الحرارة المثلى لنمو خميرة *R. glutinis* وإنتاجها لأشباه الكاروتينات بأعلى كمية ممكنة هي 25 °م (El Banna et al., 2012) . درس Harrison (1998) تأثير درجة الحرارة على خميرة *R. mucilaginosa* فتبين أن كمية أشباه الكاروتينات الناتجة والكتلة الحيوية الناتجة ازدادت بارتفاع درجة الحرارة وبلغت أعلى إنتاجية ممكنة على الدرجة 30 °م وتناقصت بعدها الإنتاجية مع ارتفاع درجة الحرارة , وتشابهت هذه النتيجة مع ما توصل إليه

(Aksu and Eren, 2005) في دراسة أخرى أيضاً على خميرة *R. mucilaginosa* حيث وصل إنتاج الخميرة من أشباه الكاروتينات أقصاه على الدرجة 30 °م أما في دراسة أخرى كانت درجة الحرارة المثالية لنمو خميرة *Sporobolomyces Pararoseus* وإنتاجها لأشباه الكاروتينات هي 23.9 °1 علماً أن عملية الأمثلة تمت باستخدام التصميم الإحصائي RSM (Manowattana et al., 2012) .

تعد درجة حرارة وسط النمو عاملاً هاماً في نمو خلايا الخميرة وقدرتها على إنتاج أشباه الكاروتينات حيث ازداد نمو وإنتاج خميرة *Rhodospiridium paludigenum* مع زيادة درجة الحرارة وبلغت أعلى نمو وإنتاجية على الدرجة 32°س (Yimyoo et al., 2011). بينما كانت الدرجة 30.3°س هي المثالية لنمو خميرة *R. glutinis* وإنتاجها أشباه الكاروتينات (Tinoi et al., 2005).

2-7-2- تأثير درجة الحموضة (pH):

لا يعد الرقم الهيدروجيني عاملاً مهماً في نمو الخمائر فقط وإنما في إنتاجها للمواد الأيضية الثانوية أيضاً، وإن السيطرة على الرقم الهيدروجيني من الأمور بالغة الأهمية لتحقيق إنتاجية مثلى (الحيدري والمصلح، 1989) ، إذ يؤثر pH الوسط الذي تنمو فيه الخمائر على نموها وفعاليتها الحيوية ، وكذلك في اتجاه سير عمليات الاستقلاب والتخليق وإنتاج أشباه الكاروتينات. تتميز الخمائر بشكل عام بقدرتها على النمو في مجال من الرقم الهيدروجيني يتراوح بين 3 و 10 ولكنها تفضل غالباً الوسط الحامضي (Harrison,1998). وفي دراسة حديثة أجريت في إيران على خميرة *R. mucilaginosa* تبين أن pH وسط النمو المثالي لإنتاج أشباه

الكاروتينات وكمية الكتلة الحيوية الجافة الناتجة كان 5 (Naghavi *et al.*, 2013) وهذه النتيجة تماثل ما توصل إليه (Shih and Hang, 1996) حيث كان pH المثالي هو 5 أيضاً لإنتاج أشباه الكاروتينات من خميرة *R. rubra*. بينما كان pH وسط النمو المثالي لإنتاج أشباه الكاروتينات من خميرة *R. glutinis* هو 4 (Maldonade *et al.* 2007). اختبر Mihalcea وزملائه (2011) تأثير درجات pH مختلفة تراوحت بين 3 و 8 على خميرة *R. rubra* فكانت 5 هي درجة الـ pH المثالية للنمو وإنتاج أعلى كمية من أشباه الكاروتينات. كما لوحظ زيادة نوعية في نمو خميرة *R. glutinis* وإنتاجها لأشباه الكاروتينات مترافقة مع ارتفاع معدل pH الوسط من 3 لتصل إلى أعلى نمو وإنتاجية عند وصولها إلى 6 ثم تناقص معدل نمو الخمائر وإنتاجها لأشباه الكاروتينات مع ارتفاع pH الوسط لمعدل أعلى من 6 (Aksu and Eren, 2007), وهذه النتيجة توافقت مع حيث كانت الدرجة 6 هي المثالية أيضاً لنمو خلايا خميرة *Rhodospiridium paludigenum* وإنتاجها لأشباه الكاروتينات (Yimyoo *et al.*, 2011). بينما ارتفعت درجة pH الوسط المثالية لنمو خميرة *R. mucilaginosa* وإنتاجها من أشباه الكاروتينات لتبلغ 7 في دراسة سابقة لـ Aksu and Eren (2005) كما تؤثر درجة pH الوسط تأثيراً معنوياً في نمو خميرة *R. glutinis* وإنتاجها لأشباه الكاروتينات, حيث بلغ أعلى نمو للخلايا وإنتاج أشباه الكاروتينات عند درجة pH تعادل 5.5 ثم بدأ بعد هذه الدرجة نمو الخلايا وإنتاجيتها بالإنحدار (Ferrao and Garg, 2012). أما في دراسة أخرى كانت الدرجة 5.64 هي المثالية لإنتاج أشباه الكاروتينات ونمو خميرة *Sporobolomyces Pararoseus* (Manowattana *et al.*, 2012). وفي دراسة أخرى لـ Tinoi وزملائه (2005) على خميرة

R. glutinis تبين أن نمو الخميرة يزداد وتزداد معه إنتاجيتها من أشباه الكاروتينات بارتفاع درجة pH الوسط لتبلغ أعلى كمية على الدرجة 5.91 (Tinoi et al., 2005).

2-7-3- تأثير تركيز الركيزة:

يلعب تركيز الركيزة الأولي دوراً هاماً في نمو الخميرة وفي تحديد الكمية الناتجة من أشباه الكاروتينات ووجود الركيزة بتراكيز مثالية في الوسط ضروري لحث الخميرة على زيادة إنتاجها (Stanbury and Witaker, 1984). حيث يمثل مصدر الكربون خلال التخمرات الميكروبية مصدراً هاماً للطاقة وعنصراً رئيسياً في بناء الخلية وتركيب متعدد السكاريد، ويؤثر استقلاب الكربون في عملية التكوين الحيوي وفي إنتاج مستقلبات أولية وثنائية، لذلك يعتبر وجوده في الوسط أمراً بالغ الأهمية للحصول على نواتج الاستقلاب المطلوبة (Stanbury et al., 1997).

استخدم في إنتاج أشباه الكاروتينات مصادر كربونية مختلفة واختلف معها التركيز المثالي للإنتاج، حيث استخدم الغلوكوز كمصدر للكربون في دراسة أجراها Chanchay وزملائه (2012) على خميرة *R. rubra* فكان التركيز 10 غ/ل هو التركيز المثالي لإنتاج أشباه الكاروتينات بأعلى كمية ممكنة. وفي دراسة Aksu and Eren (2005) بلغ إنتاج خميرة *R. mucilaginosa* أقصاه من أشباه الكاروتينات (89 مغ/ل) عند تركيز 20 غ/ل من المولاس الذي استخدم في الدراسة كمصدر كربوني رخيص الثمن. وكانت هذه النتيجة مطابقة تماماً لدراسة أخرى مشابهة أجراها نفس الباحثين Aksu and Eren (2007) على نوع خميرة مختلف وهو *R. glutinis* حيث بلغ الإنتاج المثالي لأشباه الكاروتينات (125 مغ/ل) عند تركيز 20 غ/ل من المولاس المستخدم كركيزة في الدراسة. بينما استخدم الغليسول كمصدر كربوني رخيص الثمن في دراسة أخرى على إنتاج أشباه الكاروتينات من خميرة *Rhodospiridium*

paludigenum وبلغ إنتاج أشباه الكاروتينات أقصاه (3.42 مغ/ل) عند استخدام الغليسرول بتركيز 40 غ/ل (Yimyoo et al., 2011). بينما أعطت خميرة *Sporobolomyces Pararoseus* أعلى نمو وإنتاجية من أشباه الكاروتينات عند استخدام الغليسرول كركيزة بتركيز 34 غ/ل (Manowattana et al., 2012). تم إجراء عملية أمثلة لتحديد التركيز المثالي من الجلوكوز اللازم لنمو خميرة *R. glutinis* المطفرة ولإنتاج أعلى كمية من أشباه الكاروتينات، ف لوحظ أن نمو الخميرة وإنتاجها ازداد بزيادة تركيز الجلوكوز وبلغ أقصاه عند التركيز 46 غ/ل (Bhosale and Gadre, 2001).

2-7-4- تأثير فترة التحضين :

تعد فترة التحضين من العوامل الهامة التي تؤثر في عملية التخمر من خلال تأثيرها على النمو وعلى عملية إنتاج أشباه الكاروتينات , و تتوقف الفترة المثلى لإنتاج أشباه الكاروتينات على نوع الكائن الحي الدقيق وعلى نوع الوسط الزراعي (الخفاجي، 1990).

تختلف الفترة الزمنية اللازمة للحصول على أقصى إنتاجية من أشباه الكاروتينات حيث ازداد نمو خميرة *Rhodospiridium paludigenum* وارتفع إنتاجها بزيادة فترة التحضين لتبلغ أقصاها (3.42 مغ/ل) بعد 132 ساعة من التحضين على الدرجة 32°م (Yimyoo et al., 2011). بينما ازدادت مدة التحضين المثالية في دراسة أخرى على خميرة *R. gracilis* لتصل إلى 9 أيام بلغت عندها كمية أشباه الكاروتينات أقصاها (Govindaswamy et al., 1999). ازداد نمو خميرة *Sporobolomyces Pararoseus* وازداد إنتاجها من أشباه الكاروتينات بزيادة مدة التحضين حيث بلغت أعلى كمية منتجة بعد 5 أيام من التحضين وتناقص بعد هذه المدة كل من نمو الخميرة وإنتاجيتها من أشباه الكاروتينات

(Manowattana *et al.*, 2012) , وهذه النتيجة توافق Maldonade وزملائه (2012) حيث تم الحصول على أفضل نمو لخميرة *R. mucilaginosa* وأعلى إنتاجية من أشباه الكاروتينات بعد 5 أيام من التحضين . درس تأثير مدة التحضين على نوعين من الخمائر وهي *R. mucilaginosa* و *R. slooffiae* فكانت المدة المثالية لإنتاج أعلى كمية من أشباه الكاروتينات هي 72 و 48 ساعة على التوالي (Naghavi *et al.*, 2013).

2-7-5- تأثير حجم اللقاح:

يعتبر تحضير اللقاح بالحجم المناسب أساسياً لإنتاج أشباه الكاروتينات بواسطة التخمر , حيث يعتمد نمو الخمائر وإنتاجها على اللقاح من ناحية الكمية و النوعية , و إن مكونات الوسط الغذائي المستخدم لتحضير اللقاحات تختلف عن مكونات الوسط الإنتاجي، فاللقاحات يجب أن تتمى في أوساط غذائية غنية لغرض ضمان الوصول إلى حالة فسيولوجية جيدة , وبطبيعة الحال فإن اللقاح يحضر على عدة مراحل ثم ينقل بعد ذلك إلى المخمرات الإنتاجية في ظروف معقمة (الحيدري و المصلح، 1989 والخفاجي، 1990) .

إن حجم العملية الإنتاجية هو الذي يحدد كمية اللقاح الواجب إضافتها، كما تتحدد كمية اللقاح المضاف بنوع الكائن الحي المستخدم، وتختلف كمية المنتج باختلاف حجم اللقاح فقد كان الحجم المثالي للإنتاج هو 10 مل من خميرة *R. mucilaginosa* (Maldonade *et al.*, 2012) بينما كان 2 مل في دراسة أخرى على خميرة *R. gracilis* (Govindaswamy *et al.*, 1999), كذلك كان الحجم 10 مل هو المثالي لإنتاج أشباه الكاروتينات من *Halorubrum sp.* (Hamidi *et al.*, 2014)

2-7-6- تأثير الضوء:

تحتاج الكائنات الحية المنتجة لأشباه الكاروتينات إلى الضوء , وتختلف شدة الإضاءة التي تحتاجها هذه الكائنات حسب نوع الكائن الحي, فالضوء يحفز من نشاط الأنزيمات التي تدخل في التركيب الحيوي لأشباه الكاروتينات ضمن الكائن الحي (Gomez *et al.*, 2014) تبين من تنمية الخميرة في الظلام والضوء أن الضوء لا يعتبر عامل محدد لنمو وإنتاج أشباه الكاروتينات من خميرة *R. glutinis* . بشكل عام يحفز الضوء من إنتاج أشباه الكاروتينات في معظم الكائنات الحية مثل *P.rhodozyma* التي أنتجت عند تعرضها للضوء كمية أكبر من astaxanthin (Ramirez *et al.*, 2006).

درس Moline وزملائه (2009) العلاقة بين ضوء لمبة الـ UV و كمية أشباه الكاروتينات المنتجة في خميرة *R. mucilaginoso*, فتبين أن الإنتاج ازداد بنسبة 250% بوجود ضوء لمبة الـ UV . كما درس Yen and Zhang (2011) تأثير ضوء لمبة light emitting (diode) في إنتاج أشباه الكاروتينات فبلغت كمية أشباه الكاروتينات المنتجة بوجود الضوء 24.6 ميكروغرام/غ بينما كانت 14.68 ميكروغرام/غ بغياب الضوء.

2-8- استخلاص أشباه الكاروتينات :

تبقى أشباه الكاروتينات المنتجة من أجناس الخمائر *Rhodotorula* sp. و *Phaffia rhodozyma* داخل الخلايا لذلك تحتاج إلى عمليات استخلاص للحصول على أكبر كمية ممكنة من أشباه الكاروتينات وقد استخدمت تقنيات ومحاليل متعددة لإجراء عملية الاستخلاص. اعتمد Bhosale و Gadre (2001) طريقة في استخلاص أشباه الكاروتينات

من خميرة *R. glutinis* تعتمد على نقع الكتلة الحيوية المستخلصة في مزيج من (أسيتو نتريل : أيزوبروبانول : أسيتات الايثيل) (20:40:40 ح/ح), ثم ثقل المستخلص ورشح باستخدام فلتر $\mu\text{m}0.45$ ليصبح جاهزاً للتحليل كما اعتمدت نفس الطريقة في دراسة أخرى لـ Yehia وزملائه (2013). في حين اعتمد Bhosale و Gadre (2002) طريقة مختلفة في استخلاص أشباه الكاروتينات من خميرة *R. glutinis* أيضاً, حيث نقع 500 مغ من الكتلة الحيوية الجافة في 20 مل من الأسيتون ومن ثم حطمت الخلايا باستخدام مطحنة Homogenizer وتم التخلص من الأسيتون بتبخيره تحت تفريغ لنحصل على الملون جاهزاً للتحليل اللاحق. Ferrao و Garg (2012) كان لهما طريقة مختلفة في الاستخلاص حيث حلت الكتلة الحيوية المستخلصة من *R. graimis* في 5 مل من محلول ملحي ثم أجري لها عملية تحطيم باستخدام الأمواج فوق الصوتية وجهاز Sonicator بسرعة اهتزاز 20 KHz ولمدة 10 دقائق. ثم أضيف للمزيج كل من DMSO واسيتون واثير البترول وترك على الدرجة 4°C لمدة 18 ساعة , ثم أجري لها عملية تثقيب وأخذت طبقة المذيب الحاوية على الملون لمتابعة الاختبارات المطلوبة عليها. ويبين الجدول (5) بعضاً من طرائق استخلاص أشباه الكاروتينات.

الجدول (5) : بعض من طرائق استخلاص أشباه الكاروتينات

المرجع	كمية أشباه الكاروتينات ميكروغرام/غ	طريقة الاستخلاص	الخميرة
Michelon <i>et al.</i> ,2012	93.13	تجميد + DMSO	<i>P. rhodozyma</i>
Michelon <i>et al.</i> ,2012	163.12	أمواج فوق صوتية	<i>P. rhodozyma</i>
Aksu and Eren,2007	125	الطحن مع الكرات المعدنية	<i>R. glutinis</i>
Park <i>et al.</i> ,2007	266.1	تجميد + تجفيف	<i>R. glutinis</i>
Valduga <i>et al.</i> ,2009	590.4	تجميد + أزوت سائل	<i>S. salmonicolor</i>
Taskin <i>et al.</i> ,2011	92	DMSO + أسيتون + ايثر بترول	<i>R. glutinis</i>
Gu <i>et al.</i> ,2008	479	HCL + أسيتون	<i>Rhodotobacter sphaeroides</i>
Buzzini,2001	803.2	DMSO + أسيتون + ايثر بترول	<i>R.graminis</i>

2-9- التحسين الوراثي لإنتاج أشباه الكاروتينات باستخدام التطفير :

تعتمد الصناعات الغذائية المختلفة والصناعات الأخرى على العديد من المواد المضافة من أجل تقليل تكلفة الإنتاج وتحسين نوعية المنتج, ولذلك فقد امتدت تطبيقات الهندسة الوراثية والتطفير لتشمل الأحياء المجهرية المنتجة لتلك المضافات الغذائية ومن المعروف أن معظم المضافات الغذائية تنتج بالطرق البيولوجية الإعتيادية إلا أن الحصول على هذه المواد بكميات كبيرة تلبى الطلب العالمي المتزايد لها علاوةً على تحسين مواصفاتها ونوعيتها وثباتها يتطلب استخدام طرائق ووسائل التطفير المختلفة (Ramachandran *et al.*, 2007).

ازداد في الآونة الأخيرة اهتمام الباحثين في تطوير سلالات جديدة من جنس خميرة *Rhodotorula* لها القدرة على إنتاج كميات كبيرة من أشباه الكاروتينات وذلك بعمليات التطفير والتتسيل , حيث تم تحسين إنتاجيتها من أشباه الكاروتينات باستخدام العديد من العوامل المطفرة والمقسمة لشقين رئيسيين هما العوامل الفيزيائية مثل الأشعة فوق البنفسجية وأشعة غاما والأشعة السينية, والعوامل الكيميائية مثل حمض النيتروزو و 5-bromouracil و Ethyl methyl sulphonate EMS و N-methyl-N-nitrose-N-Nitro-guanidine (NTG) , (Wang *et al.*, 2007; Bhosale and Gadre,2001) .

التطفير هو طريقة بديلة لتحسين قدرة سلالات الخمائر على إنتاج أشباه الكاروتينات , حيث تمكن Vijayalakshmi وزملائه من زيادة إنتاجية خميرة *R. gracilis* من أشباه الكاروتينات بمقدار 1.8 مرة مقارنة مع السلالة الأصلية وذلك عند تطفيرها بالـ UV وكانت نسبة β كاروتين بمقدار 60% من أشباه الكاروتينات الكلية (Vijayalakshmi *et al.*,2001) , كما ازدادت كمية

أشباه الكاروتينات الكلية المستخلصة من خميرة *R.rubra* 56-13 بمعدل 3.4 مرات و β كاروتين بمعدل 8.3 مرات مقارنة مع السلالة الأصلية عند تطهيرها باستخدام NTG (Frengova et al., 2004). تم الحصول على طفرة صفراء من خميرة *R.glutinis* الحمراء باستخدام أشعة UV, و أعطت كمية من أشباه الكاروتينات وصلت إلى 2.9 مغ/غ وهذه الكمية تفوقت بمعدل 24 مرة عن السلالة الأصلية غير المطفرة, كما أعطت β - Carotene بنسبة تفوق السلالة الأصلية بمعدل 120 مرة حيث بلغت 2.05 مغ/غ وشكل نسبة 82% من أشباه الكاروتينات الكلية المنتجة . بينما أعطت الخميرة المطفرة *R. glutinis* RG6P كمية من β - Carotene بلغت 10.01 مغ/غ وهذا يزيد بمعدل 57.89 % مقارنة مع السلالة الأصلية التي أعطت 6.38 مغ/ل من β - Carotene (Frengova and Beshkova, 2009). أعطت الطفرة الصفراء *P.rhodozyma* PG104 المطفرة باستخدام أشعة UV β - Carotene بنسبة 92% من كمية أشباه الكاروتينات الكلية بينما كانت نسبتها 2% من كمية أشباه الكاروتينات الكلية في السلالة الأصلية حيث بلغت 1.08 مغ/غ. تم الحصول على سلالتين مطفرتين منتجتين لأشباه الكاروتينات وهي JH1 , JH2 *X.dendrourhous* حيث أعطت الطفرة JH1 4.03 مغ /astaxanthin/غ كتلة جافة وهذه تزيد بمعدل 15 مرة عن السلالة الأصلية , بينما أعطت الطفرة الثانية JH2 0.27 مع β - Carotene/غ كتلة جافة وهذه تزيد بمعدل 4 مرات عن السلالة الأصلية (Kim et al., 2005) . وباستخدام أشعة غاما أمكن الحصول على الطفرة *P.rhodozyma* 2A2N والتي أعطت كمية من أشباه الكاروتينات بلغت 3.3 مغ/غ وهذه أعلى بنسبة 50% من كمية أشباه الكاروتينات المنتجة من السلالة الاصلية غير المطفرة (Marova et al., 2011).

وعلى الرغم من صعوبة الدراسة الوراثية وعزل الـ DNA من الخمائر حقيقية النوى بسبب جدارها السميك فقد أمكن عزل الـ DNA باستخدام بروتوكول طبق أولاً على خميرة *Saccharomyces cerevisiae* لسهولة التعامل معها مقارنة مع الخمائر حقيقيات النوى الأخرى (Carnecka, 2009).

2-10- فصل أشباه الكاروتينات :

2-10-1- فصل أشباه الكاروتينات باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC :

تعتبر طريقة TLC (Thin Layer Chromatography) طريقة بسيطة لفصل وتنقية المواد الكيميائية المختلطة. وفي كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة يتم فصل الخليط لمعرفة ألوانه لكن لا نحصل على مادة اللون بشكل محسوس وإنما نتعرف على محتويات الخليط ومكوناته ، و في هذه التقنية يأخذ الطور الثابت شكل طبقة رقيقة تغطي شريحة أو لوح زجاجي، بينما الطور المتحرك يكون على شكل سائل مذيب . حيث يتم وضع قطرة أو نقطة من العينة على اللوح الزجاجي بمسافة تبعد عن الحافة السفلية للوح الزجاجي تقريبا 3 سم و من ثم يتم تجفيف اللوح و بعد ذلك يوضع اللوح في وعاء يحتوي على مذيب، و أثناء انتقال المذيب من أسفل لأعلى خلال اللوح الزجاجي عن طريق الخاصية الشعرية ، فإنه يحمل معه العينة و هذه العينة أثناء انتقالها من أسفل لأعلى تتحلل حسب مكوناتها و تكون على شكل بقع ملونة على طول اللوح الزجاجي ، و بعد مرور فترة من الزمن يتم تجفيف اللوح و من ثم يتم تحديد و دراسة هذه البقع ، و من خلال حساب المسافة التي قطعها البقع مع حساب الزمن يمكن تحديد ومعرفة المواد المركبة للعينة.

يوجد العديد من الدراسات حول استخدام تقانة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC في فصل أشباه الكاروتينات قبل عام 1970, فهناك دراستان لـ Nelson و Livingston (1967) و Sanderson وزملائه (1971) استخلصوا أشباه الكاروتينات من أوراق الشاي وتم فصل المزيج اللوني باستخدام السيلكا جيل للتعرف على مكوناته. كذلك استخدمت السيلكا جيل لفصل أشباه الكاروتينات المستخلصة من نبات السبانخ (Csorba *et al.*, 1979). وأمكن تحسين عملية الفصل بإضافة سلفات الأمونيوم بنسبة 10% إلى السيلكا جيل, ويمكن استخدام العديد من المذيبات كطور متحرك حسب نوع الملون المراد فصله . يمكن أن تعتبر تقانة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC كطريقة متممة بعد عملية تنقية أشباه الكاروتينات باستخدام عمود التنقية المحشو بمادتي Hyflo Super Cel و Magnisium oxide حيث يؤخذ كل مكون لوني مفصول ويعاد التأكد من نقاوته باستخدام السيلكا جيل (Tee, 1991). كما تم فصل مكونات الملون المستخلص من خميرة *R. glutinis* باستخدام تقانة TLC إلى ثلاثة ملونات وبأزمنة R_f (Retention factor) 0.64 , 0.55 و 0.06 (Yehia *et al.*, 2013). فصل Abd El- Razek (2004) أيضاً مكونات الملون المستخلص من خميرة *Rhorotorula* إلى ثلاثة ملونات باستخدام مذيب من ايثيل الايثر وايثر البترول وباستخدام سيلكا جيل , وتم التعرف عليها فتبين أنها β -Carotene, Torulene, Torularhodin . تم الكشف عن مكونات الملون المستخلص من خميرة *R. glutinis* باستخدام تقانة TLC ومزيج من إيثر البترول : اسيتون (20:80 ح/ح) كطور متحرك, فتم الحصول على ثلاثة ألوان هي الأصفر , البرتقالي و الأحمر وبزمن وصول R_f 0.92 , 0.78 و 0.20 (Latha and Jeevaratnam, 2010) . كما تم الحصول على نفس الملونات ونفس أزمنة الوصول في دراسة أخرى على خميرة *R. glutinis* mutant 32 (Bhosale and Gadre, 2001) .

طورت طريقة فصل أشباه الكاروتينات باستخدام تقانة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC إلى طريقة جديدة أكثر دقة هي TLC العكوسة التي تجري باستخدام أطباق C₁₈ وباستخدام أسيتونتريل وإيثر البترول وأعطت هذه الطريقة نتائج فصل أفضل من طريقة TLC المعروفة .

استخدم Chanchay وزملائه (2012) طور متحرك مؤلف من هكسان, أسيتون,

كلوروفورم وأسيتونتريل (70:25:10:5) لفصل الكزانثوفيلات و بيتا كاروتين باستخدام السيلكا جيل, كما استخدمنا 5-10% أسيتون في إيثر البترول لفصل الكزانثوفيلات المستخلصة من الفاكهة على السيلكا جيل .

2-10-2- فصل وكشف أشباه الكاروتينات باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء

: HPLC

تعتبر تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC من أفضل طرائق التحليل الكيميائي المستخدمة لفصل مكونات مزيج لوني من أشباه الكاروتينات, وهي طريقة تتميز بسرعتها حيث لا يتجاوز سرعة التحليل (10-45 دقيقة) إضافة لحساسيتها ودقتها العالية (Toylor *et al.*, 1993).

تم تحليل المزيج اللوني المستخلص من خميرة *R. glutinis* باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC حيث أعطى ثلاثة قمم وهي Torulene,β-Carotene و Torularhodin عند الأزمنة 2.27, 3.21 و 3.64 دقيقة على التوالي. كما حصل Bhosal و Gadre (2001) على ثلاثة قمم تشير إلى وجود ثلاثة ملونات وهي

Torularhodin و Torulene,β-Carotene بأزمنة 2.39, 3.39 و 3.49 دقيقة على التوالي, وهذا يشابه أيضاً ما توصل إليه Perrier وزملائه (1995).

Frengova وزملائه (1994) استخدموا أيضاً تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC لفصل مكونات الملون المستخلص من خميرة *R. mucilaginousa* فتبين أنه يتكون من ثلاثة ملونات وهي Torulene,β-Carotene و Torularhodin . بينما تم التعرف على مكونات الملون المستخلص من خميرة *R. glutinis* DFR-PDY بعد تنقيتها باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي والحصول على ثلاثة ملونات نقية بلون أصفر , برتقالي وأحمر , تم الكشف عنها باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC والعمود RP-C18 و الطور المتحرك المؤلف من أسيتون نتريل: تيتراهدروفوران: ماء (50 : 38.5 : 11.5 ح/ح/ح) وعند تدفق 1 مل / دقيقة , فتبين أن اللون الأصفر هو β-Carotene وزمن فصله 0.9 واللون البرتقالي هو Torulene وبزمن فصل 0.7 واللون الأحمر هو Torularhodin وبزمن فصل 0.6 (Latha and Jeevaratnam, 2010). ويبين الجدول (6) الطرائق المختلفة لفصل أشباه الكاروتينات المستخلصة من نباتات مختلفة والتعرف عليها باستخدام HPLC (Oliver and Palou, 2000).

الجدول (6) : الطرائق المختلفة لفصل أشباه الكاروتينات من مصادر مختلفة

العمود	الطور المتحرك	سرعة التدفق مل/د	الكاشف (نانومتر)	العينة المدروسة
ODS-C18	ميثانول:إيثيل أسيتات 50:50	1.8	470	فلفل أحمر
5µm zorbax C18	أسيتون :ماء 25:75	1	460	فليفلة حمراء
10 µm chromsil C18	أسيتون : ماء 10:90	1	490	فليفلة حمراء
5µm ODS RP- 18	اسيتونتريل : 2-بروبانول 60:40	0.8	462	فلفل احمر
6µm LiChrosorb C18	اسيتونتريل:2- بروبانول:ميثانول:ماء 4:5:52:39	1.5-0.9	462	فلفل احمر, بندورة, جزر, برتقال
5µm sulphex pKB 100	ميثانول:اسيتونتريل:داي كلوروميثان:هكسان 5:2:2.5:85:10	0.7	462	يوسفي وبرتقال
YMC-Pack ODS-A	ميثانول:ايثيل أسيتات 38:62	1	470	قشر الموز
5µm Spherisorb ODS1	ميثانول:أسيتونتريل 50:50	1.5	450	فليفلة حمراء
5µm Ultrasphere C18	داي كلوروميثان :ميثانول: أسيتونتريل :ماء 4.5:5:5:85:5	1	450	طحالب (<i>Haematococcus pluvialis</i>)
5µm Spherisorb C18 ODS2	اسيتون:ماء 50:100	1	450	فليفلة حمراء
5µm Spherisorb C18 ODS2	اسيتون:ميثانول:ماء	1	450	فليفلة حمراء و عصير البرتقال

2-11- تنقية أشباه الكاروتينات :

تعرف تنقية أشباه الكاروتينات بأنها استخدام عمود تنقية محشو بمادة الفصل ومذيبات كيميائية متنوعة بهدف الحصول على الملونات مفصولة كل واحدة على حدة وبأكبر كمية ممكنة لمتابعة الدراسة على كل ملون مفصول والتعرف عليه .

تعد واحدة من أهم المشكلات التي تواجه عملية تحليل أشباه الكاروتينات هو عدم توفر المركبات المعيارية (Standers) حيث أن وجود مماكبات غير مستقرة للمجاميع هي أهم سبب لعدم توفر هذه المركبات تجارياً. أكثر أشباه الكاروتينات انتشاراً هي α - carotene , β - carotene , Lutein , Zeaxanthin , Lycopene و β -cryptoxanthin . بينما هناك أشباه كاروتينات نادرة مثل capsanthin و capsorubin (Ritter and Purcell, 1981). على أي حال لا يمكن الوصول إلى أشباه كاروتينات معيارية (Standers) إلا باتباع عدة خطوات من التنقية . حضرت أشباه الكاروتينات المعيارية سابقاً بطريقة محلية ذاتية وذلك باستخلاص أشباه الكاروتينات من الخضار والفاكهة وبتابع خطوات التنقية أمكن الحصول على أشباه كاروتينات محلية . استخدمت طرائق الفصل باستخدام TLC أو LC للحصول على أشباه كاروتينات معيارية أما حالياً تستخدم تقانة HPLC لهذا الغرض (Oliver and Palou, 2000) و للحصول على نقاوة كافية لأشباه الكاروتينات غالباً ما يتم إجراء مرحلتين إلى ثلاثة مراحل من التنقية ويستخدم أفضل مصدر لاستخلاص أشباه الكاروتينات فعلى سبيل المثال يعد الكرنب أفضل مصدر لمركب neoxanthin والسبانخ أفضل مصدر لمركب Violaxanthin والبطاطا لمركب antheraxanthin و أوراق الجزر لمركب α - cryptoxanthin و الفليفلة لمركبي capsanthin و capsorubin . تسمح الطرائق السبيكتروفوتومترية بتحديد وقياس أشباه

الكاروتينات المنقاة بينما يتم التأكد من درجة نقاوتها باستخدام تقانة HPLC. استخدمت طريقة تنقية وفصل أشباه الكاروتينات بالأعمدة المفتوحة والتي تعتبر من طرائق AOAC الرسمية واستخدمت عالمياً في عملية تنقية أشباه الكاروتينات (Britton, 1991).

تتطلب عملية التنقية بالعمود المفتوح استخدام حشوة مكونة من مركب كيميائي أو مزيج من عدة مركبات, وتعتبر الألومينا, السيليكا جيل, أكسيد المغنيزيوم, هيدروكسيد الكالسيوم, كربونات الكالسيوم, السيليت, وغيرها من أهم المركبات المستخدمة كحشوات لتنقية أشباه الكاروتينات وذلك باستخدام مذيبات مختلفة مثل ايثر البترول, ايثيل ايثر, الايثانول و حمض الخل, تستخدم بمفردها أو كمزيج (Oliver and Palou, 2000).

تستخدم عادة مادتي Hyflo Super Cel و أكسيد المغنيزيوم بنسبة (1:2 و/و) في عملية تنقية أشباه الكاروتينات سواء المستخلصة من النباتات أو من الأحياء الدقيقة المختلفة, حيث تم استخدامها في فصل أشباه الكاروتينات المستخلصة من خميرة *R. glutinis* DFR-PDY بعد تجفيفها بالحرارة ورسها في عمود الفصل الزجاجي بشكل جيد, ففصلت أشباه الكاروتينات إلى ثلاثة أجزاء لونية الأصفر (β -Carotene), والبرتقالي (Torulene) والأحمر (Torularhodin) باستخدام ايثر البترول , ايثر ايثيل وميتانول (1:10) و حمض الخل وايثيل ايثر (10:1) على التوالي, أما المركبات الذوابة في الماء فتزال بشطف العمود بالماء عدة مرات, وتجري على الأجزاء اللونية المفصولة عملية تصبن باستخدام ماءات البوتاسيوم- الكحول الميثيلي وبالتسخين لمدة 5 دقائق البخار . يضاف ايثر البترول إلى المزيج ثم يجفف عبر كبريتات الصوديوم اللامائية . يؤخذ اللون الأحمر والبرتقالي لتجفيفهما عبر المبخر الدوراني ويعاد تدويهما في الكلوروفورم و ايثر البترول (Latha and Jeevaratnam, 2010). كما

اتبعت نفس الطريقة في عملية تنقية أشباه الكاروتينات المستخلصة من خميرة *R. glutinis* 48-23T ولكن باستخدام مذيبات مختلفة وهي إيثر البترول , إيثيل إيثر والميتانول على التوالي (Simpson et al., 1964).

2-12- تطبيق أشباه الكاروتينات على المواد الغذائية:

إن مذاق الطعام لا يكون كما ينبغي أن يكون عليه إذا لم يكن ذا لون صحيح, ففي دراسة لـ (Hall,1958) اتضح أن لمظهر الطعام تأثيراً في تصوراتنا لرائحته ونكهته وحتى قوامه. شكل الباحث Hall لجنة تذوق قدم لكل عضو من أعضائها على انفراد عينة من الشراب المتلج ولم يوفق بين لون الشراب ونكهته ثم طلب تذوق صنف الشراب المقدم وتقويمه. وكانت النتيجة أن أصاب أعضاء اللجنة الإرتباك عندما قدم لهم شراب عديم اللون فلم يستطع أعضاء اللجنة التعرف على هذه النكهات وتمييز بعضها عن البعض الآخر بسبب غياب الألوان المميزة لها. لهذا يعد اللون الطبيعي للمادة الغذائية من أهم الخواص التي يهتم بها العاملون في مجال التصنيع الغذائي ومن الضروري إضافة الملونات إلى المادة الغذائية المصنعة نظراً للتغيرات التي تطرأ عليها أثناء عمليات التصنيع والتخزين والتي تفقدها لونها الطبيعي. وقد تزايد مؤخراً قلق المستهلكين من الملونات الصناعية نظراً لما تسببه من مشاكل صحية إذا تم استخدامها بكميات كبيرة وغير مضبوطة لذلك توجه المصنعون إلى استخدام الملونات الطبيعية في المنتجات الغذائية . تم تطبيق أشباه الكاروتينات المنتجة من خميرة *R. glutinis* على عدة منتجات غذائية مثل البوشار, الأيس كريم , البسكويت والكاتو, تم مزج أشباه الكاروتينات بتركيز مختلفة ثم أضيفت للمواد الغذائية (Latha and Jeevaranam, 2010). كما أمكن إضافة تراكيز مختلفة من أشباه الكاروتينات Torulene و β - carotene, Torularhodin المعزولة من الخمائر

إلى المارجرين , الزيت, الشوربات المجففة , الشوربات المعلبة , منتجات البيض وعصائر الفواكه
فأكسبتها لوناً جذاباً بالإضافة إلى ما تضيفه للمنتج من قيمة غذائية.

3- مواد البحث وطرائقه :

3-1- المواد :

3-1-1- جمع العينات:

جمعت 400 عينة من مصادر محلية متنوعة (أوراق الشجر، ترب مختلفة، لحوم ، لبن ولبنة، لحاء الأشجار، آيس كريم، مخمل و حلويات شعبية) خلال عامي 2012-2013 ونقلت إلى مخبر الأغذية في الهيئة العامة للتقانات الحيوية لعزل وتشخيص الخمائر الملونة فيها.

3-1-2- المستنبتات الغذائية المستخدمة:

3-1-2-1 - وسط أغار مستخلص المولت Malt Extract Agar :

وهو وسط جاهز استخدم لعزل الخمائر ومن ثم لتنشيط خلايا الخميرة على أطباق بتري قبل تشخيصها باستخدام شرائح الـ API حيث يعتبر هذه الوسط الأنسب لتنقية الخمائر.

3-1-2-2 - مرق مستخلص المولت Malt Extract Broth :

وهو وسط جاهز استخدم لتنشيط خلايا الخميرة في وسط سائل , كما استخدم لتحضير لقاحه من خلايا الخميرة لتلقيح وسط إنتاج أشباه الكاروتينات بالحجم المطلوب.

3-1-2-3 - وسط إنتاج أشباه الكاروتينات (Maldonade et al., 2006):

هو وسط سائل تركيبى مكون من:

غلوكوز	20 غ/ل
مستخلص الخميرة	4 غ/ل
KH_2PO_4 فوسفات البوتاسيوم الأحادية	1 غ/ل
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ كبريتات المغنيزيوم المائية	0.5 غ/ل

حضر الوسط في دورق 250 مل، ثم حضن في حاضنة هزازة على درجة حرارة 28° م، سرعة دوران 130 د/د ولمدة 48 ساعة، ثم قيست كمية أشباه الكاروتينات المنتجة باستخدام جهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجة 460 نانومتر. واختيرت العزلة التي أعطت أعلى كمية من أشباه الكاروتينات لاستخدامها في إنتاج أشباه الكاروتينات (Maldonade *et al.*, 2006).

الجدول (7): أهم المواد الكيميائية المستخدمة في تنفيذ البحث

الشركة المصنعة	المواد الكيميائية
SIGMA	غلوكوز D-Glucose
SIGMA	مستخلص المولت بروث
SIGMA	آغار مستخلص المولت
SIGMA	كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
SIGMA	كلور الصوديوم NaCl
SIGMA	فوسفات البوتاسيوم الأحادية KH_2PO_4
SIGMA	مستخلص الخميرة Yeast extract
MERCK	DMSO(Dimethyl sulfoxide)
MERCK	ايثر البترول
MERCK	ايثر ايتيلي
SIGMA	كحول ميثيلي (ميثانول)
SIGMA	حمض الخل
SIGMA	أسيتون

3-1-3- الأجهزة المستخدمة :

الجدول (8) : أهم الأجهزة المستخدمة في تنفيذ البحث

الشركة المصنعة	الجهاز المستخدم
Bio Air - Italy	غرفة زرع جرثومي Laminar flow
Shenan LDZX -50 FB- China	الصاد الموحد Autoclave
New Brunswick Scientific – U.S.A	حاضنة هزازة Rotary shaker
Heraeus – Germany	منقلة مبردة Bio Fuge
Hanna – Romania	مقياس الرقم الهيدروجيني pH-meter
Lab Tech – Kororia	حاضنة Incubator
Biochrom Libra S12	مقياس الضوء الطيفي Spectrophotometer
Mettler Toledo – Taiwan	ميزان حساس Sensitive balance
Mettler Toledo – Taiwan	ميزان Balance
Olympus – Philippines	مجهر ضوئي Microscope
Boeco – Germany	مسخن مع محرك مغناطيسي
G F L – Germany	جهاز تقطير الماء
KNAUER – Germany	كروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء HPLC
Bio Merieux- France	شرائح Api 20
Hanna – Romania	لمبة أشعة UV
Jasco- Germany	مطيافية تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء FTIR

3-2- طرائق العمل :

3-2-1- طريقة عزل الخمائر:

3-2-1-1- عزل الخمائر من التربة:

عزلت الخمائر باستخدام طريقة تخفيف محلول التربة حيث وضعت كمية 10 غرامات من التربة المغريلة ضمن دورق مخروطي سعة 250 مل يحوي على 90 مل من الماء المقطر ورجت بشكل متقطع لمدة 30 دقيقة ثم رُشحت محتوياته للحصول على تخفيف $1/10$. حضرت التخفيفات (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} و 10^{-5}) بأخذ 1 مل من كل تخفيف مع 9 مل من الماء المقطر والمعقم للحصول على تخافيف أدنى تركيزاً مع مراعاة الرج والتجانس قبل أخذ الحجم المحدد. ثم أخذ 100 ميكروليتر من كل تخفيف ووزع على سطح وسط آغار مستخلص المولت Malt Extract Agar في طبق بتري ثم حضنت الأطباق على درجة حرارة 30°C لمدة 3 أيام (Yehia *et al.*, 2013).

5-2-1-2- عزل الخمائر من أوراق ولحاء الأشجار:

عزلت الخمائر عن طريق وزن 2 غ من العينة وتعليقها في 20 مل ماء مقطر معقم ثم عزلت الخمائر منها بزرع 100 ميكروليتر من التخفيف العشري الأول ووزع على سطح وسط آغار مستخلص المولت في طبق بتري. حضنت الأطباق على درجة حرارة 30°C لمدة 3 أيام (Bhosale, 2001).

3-1-2-3- عزل الخمائر من العينات الغذائية:

عزلت الخمائر بتحضير معلق لكل عينة من العينات المختبرة، بوزن 2 غ من العينة وتعليقها في 20 مل ماء مقطر معقم ثم عزلت الخمائر منها بزرعها بعد أن خفت إلى الدرجة المناسبة 10⁻³ إلى 10⁻⁵ وذلك تبعاً لنوع العينة، ثم أخذ 100 ميكروليتر من كل تخفيف ووزع على سطح وسط آغار مستخلص المولت في طبق بتري. حضنت الأطباق على درجة حرارة 30°م لمدة 3 أيام. اختيرت المستعمرات الصفراء والبرتقالية والحمراء لإعادة زرعها على نفس الوسط مرة أخرى وتحضينها لمدة 3 أيام على الدرجة 30°م (Yehia et al., 2013).

3-2-2-3- تصنيف الخمائر :

3-2-2-3-1- تصنيف الخمائر مورفولوجياً: حسب (Barnet et al., 2000)

أ- تم التعرف على أشكال مستعمرات الخمائر النامية وتحديد صفاتها حسب (الحجم - الشكل - اللون - اللعان - طبيعة الحافة - طبيعة المستعمرة سطحية أو عميقة):

كما وصفت الخلايا مجهرياً حسب الشكل (بيضوية - كروية - اسطوانية) - طبيعة البرعمة - إمكانية تشكيل الميسيليوم حقيقي أم كاذب.

ب- اختبار النمو في أوساط سائلة:

حضر وسط مستخلص المولت السائل وضبط تركيز السكر عند 8 بالينغ ووزع الوسط ضمن زجاجات صغيرة معقمة سعتها 1 مل محكمة الغطاء . ثم لقت الزجاجات بالخميرة المراد تصنيفها باستخدام إبرة التلقيح وتمت مراقبة الزجاجات لمدة (3-7-14-21) يوم مع ملاحظة مايلي:

الراسب (خفيف- سميك- سميك جداً)

العكارة (خفيفة- كثيفة)

الحلقة (موجودة - غير موجودة)

الغشاء (سميك- خفيف- مرتفع أو منخفض عن السطح - قوامه - لونه)

ج- اختبار النمو في أوساط الزراعة الصلبة:

حضر وسط آغار مستخلص المولت وضبط تركيز السكر عند 8 بالينغ ووزع ضمن الأنابيب وتم تخطيط الخميرة على الآغار المائل وحضنت على درجة حرارة 28 °م لمدة يوم واحد وتم الإحتفاظ بها كعزلة احتياطية نقية.

د- اختبار تشكل الأبواغ الأسكية:

حضر وسط آغار مستخلص المولت مع تغيير نسبة السكر إلى 4 بالينغ، وذلك لتحفيز الخميرة على التبوغ في مثل هذه الظروف ، وخطت الخميرة على الآغار المائل وحضنت على درجة حرارة 28°م وتمت المراقبة لمدة (3 - 7 - 14 - 21) يوم ، وأجري الفحص المجهرى لمعرفة مايلي:

(عدد الأبواغ- شكلها- لونها- هل هي داخل الكيس الأسكي أم خارجه)

3-2-2-2- تصنيف الخمائر فيزيولوجياً:

تم التصنيف البيوكيميائي الفيزيولوجي للخمائر باستخدام شرائح 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 حيث وضع 5 مل من الماء المقطر في علبه بلاستيكية ذات حفر وذلك من أجل خلق جو رطب ، فتحت أمبولة وسط التعليق suspension medium ذات الـ 5 مل وتم التخلص من 3 مل و الإبقاء على 2 مل عن طريق ماصة ميكرومترية ، ثم أخذ جزء من مستعمرة خميرة نشيطة بعمر 24 ساعة و بواسطة

إبرة التلقيح، ووضعت ضمن أمبولة التعليق الحاوية على 2 مل من الوسط للحصول على معلق خميرة درجة عكارتة (2 Macfrland). و بعد الرج أخذ منها 100 ميكروليتر وضعت ضمن أمبولة أخرى تحوي على 7 مل من (وسط c) ورجت بشكل جيد ثم أخذ 100 ميكروليتر من الأمبولة الأخيرة و وضعت في حفر الشريحة الحاوية على السكاكر بحيث تملأ كل حفرة بـ 100 ميكروليتر و أغلقت الشريحة بغطائها الخاص ووضعت في الحاضنة لمدة 48-72 ساعة، أخذت النتائج ودوّنت الأرقام في دفتر الشيكات وجرت مقارنة تسلسل الأرقام بدليل الـ API الملحق للتعرف على جنس و نوع الخميرة المختبرة .

3-2-3- غربلة الخمائر والتعرف على قدرتها في إنتاج أشباه الكاروتينات :

أجريت على الخمائر الحمراء والبرتقالية والصفراء المعزولة والمشخصة مسبقاً عملية غربلة (إجراء مسح لاختيار الخميرة الملونة الأكثر كفاءة في إنتاج أشباه الكاروتينات) لدراسة قدرتها على إنتاج أشباه الكاروتينات من خلال زراعة الخميرة في ورق مخروطي سعته 250 مل ويحوي 50 مل من وسط (3-2-1-3) المخصص لإنتاج أشباه الكاروتينات (Yimyoo et al., 2011) , ثم حضنت الدوارق في حاضنة هزازة على درجة حرارة 28° م و سرعة دوران 130 دورة/د لمدة 48 ساعة.

3-2-4- طرائق استخلاص أشباه الكاروتينات من الخمائر المعزولة:

استخلصت أشباه الكاروتينات من خلايا الخميرة، وذلك بعد تثفيل 50 مل من المزرعة للحصول على الكتلة الحيوية باستخدام ستة 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° م لمدة 1 ساعة، ويضاف بعدئذ 2 مل أسيتون و 2 مل ميتانول، وتترك لليوم التالي،

حيث تم التثقيب بسرعة 9000 دورة/د مع تبريد بدرجة 4° م ولمدة 10 دقائق, ثم يتم فصل الطبقة العليا الحاوية على أشباه الكاروتينات عن طبقات المذيبات الأخرى الحاوية على الماء والمركبات المنحلة وبقايا الخلايا وفق طريقة (Somashekar and Joseph, 2000).

الطريقة الثانية : أضيف 5 مل من Dimethyl sulfoxide (DMSO) إلى الكتلة الحيوية, ثم حضنت لليوم التالي في حاضنة هزازة بدرجة 5-10° م و استكمل تحطيم الخلايا باستخدام جهاز التحطيم بالأموح فوق الصوتية sonicator بتردد 20 KHz لمدة 15 دقيقة وفق طريقة (Kim et al., 2010).

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

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

الطريقة الخامسة: أضيف 5 مل من DMSO إلى الكتلة الحيوية وتركت مدة 1 ساعة في حمام مائي 70° م, وهي طريقة مقترحة في هذه الدراسة .

الطريقة السادسة: أضيف 5 مل من DMSO إلى الكتلة الحيوية, ثم حضنت مدة 2 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة دوران 130 دورة /دقيقة بدرجة 5-10° م وهي طريقة مقترحة في هذه الدراسة.

و بعد إتمام فترة الحضانة للطرائق السابقة أضيف 4 مل أسيتون, ثم 8 مل أيثر البترول و 2 مل من ملح كلور الصوديوم 20% إلى الكتلة الحيوية المعاملة, ثم يرج المزيج جيداً ويتفل بسرعة 9000 دورة/د مع التبريد الى درجة 4° م, لمدة 10 دقائق وذلك لفصل المادة الملونة من

الخلايا بشكل كامل, وفصلت الطبقة العليا لأثير البترول الحاوية على أشباه الكاروتينات عن طبقات المذيبات الأخرى الحاوية على الماء والمركبات المنحلة ويقايا الخلايا.

3-2-5- تقدير أشباه الكاروتينات:

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

$$5.405 A X / Y = \text{ (ميكروغرام/غرام مادة جافة)}$$

حيث : 5.405 : ثابت , A قيمة الامتصاصية الضوئية على طول موجة 460 نانومتر ،
و X حجم العينة (مل) و Y تمثل الوزن الجاف للكتلة الحيوية (غ).

3-2-6- تطهير الخمائر باستخدام الأشعة فوق البنفسجية :

اختيرت أفضل عزلة في إنتاج أشباه الكاروتينات وأجريت عليها عملية تطهير باستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV. حيث أخذ 100 ميكروليتر من التخفيف السادس للعزلة المختارة, وزع باستخدام الماسح الزجاجي على كامل سطح طبق بتري (م الت آغار) ثم عرضت الأطباق للتطهير بالأشعة مع ترك طبق كشاهد لم يعرض للأشعة . تم تثبيت لمبة الأشعة UV (254 نانومتر) على مسافة 10 سم من الأطباق التي عرضت لأزمنة مختلفة (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5) دقائق , ثم حضنت الأطباق في الظلام على درجة 30° م ولمدة 48 ساعة (Bhosale and Gadre, 2001). أجريت عملية عد للمستعمرات المطفرة على كل طبق ثم اختبرت قدرة كل مستعمرة مطفرة على حدة على إنتاج أشباه الكاروتينات .

3-2-7- اختيار مصدر كربوني رخيص الثمن :

تم اختبار إنتاجية أشباه الكاروتينات باستخدام أربعة مصادر كربونية رخيصة الثمن وهي (الغليسيرول الخام ,المولاس, تفل العنب ومصل الجبن) لمعرفة أفضلها في الإنتاج , حيث أضيفت المصادر الكربونية كل واحدة على حدة إلى وسط إنتاج أشباه الكاروتينات (3-1-2-3) وباستبدال الجلوكوز بالمصادر الكربونية المدروسة.

3-2-8- دراسة الظروف المثلى لإنتاج أشباه الكاروتينات باستخدام التصميم الإحصائي

RSM:

درست الظروف المثلى لإنتاج أشباه الكاروتينات (درجة الحرارة ، درجة الحموضة ، مدة التحضين ، حجم اللقاح و تركيز الركيزة) باستخدام برنامج Minitab والتصميم الإحصائي Response Surface Methodology (RSM) كما هو موضح في الجدول (9). حيث درس كل متغير عند 5 مستويات (+2, +1, 0, -1, -2) لكل من درجات الحرارة (4, 4.5, 5, 5.5, 6) ، ودرجة مئوية، ودرجات الحموضة (pH) (4, 4.5, 5, 5.5, 6) ، ومدة التحضين (1, 2, 3, 4, 5) يوم، وحجم اللقاح المستخدم (6, 8, 10, 12, 14) مل وتركيز الركيزة (10, 15, 20, 25, 30) غ/ل. وبعدد 32 معاملة لكافة التصميم . و يبين الجدول (10) طريقة التصميم المعتمدة في هذه الطريقة . وتحليل نتائج الأمثلة يعبر عن العلاقة بين كمية أشباه الكاروتينات (Y) Response والمتغيرات الخمسة المدروسة Independent variables(X) بمعادلة من الدرجة الثانية كما يلي:

$$Y=a+bX_1+cX_2+dX_3+eX_4+fX_5+gX_1^2+hX_2^2+iX_3^2+jX_4^2+kX_5^2+lX_1X_2+mX_1X_3+nX_1X_4+oX_1X_5+pX_2X_3+qX_2X_4+rX_2X_5+sX_3X_4+tX_3X_5+uX_4X_5$$

حيث:

Response Y: العامل المدروس

a: الثابت constant

b, c, d, e, f: العامل المتغير Linear coefficient

G, h, I, g, k: العامل المتغير مربع square coefficient

L, m, n, o, p, q, r, s, t, u: العوامل المترابطة مع بعضها Interaction coefficient

الجدول (9): المتغيرات المدروسة ومستوياتها

المتغيرات					مستويات المتغيرات بصورة رمز
تركيز الركيبة (غ)	حجم اللقاحة (مل)	مدة التحضرين (يوم)	درجة الحرارة (س°)	درجة الحموضة	
10	6	4	20	4	$\alpha^- = -2$
15	8	6	25	4.5	-1
20	10	8	30	5	0
25	12	10	35	5.5	+1
30	14	12	40	6	$\alpha^+ = +2$

الجدول (10): التصميم الإحصائي للتجربة

المتغيرات					العدد
درجة الحرارة (°C)	درجة الحموضة	مدة التحضين/يوم	حجم اللقاح/مل	تركيز الركيزة/غ	
2-	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	2
0	0	0	2	0	3
0	0	0	0	0	4
1	1	-1	1	1-	5
0	0	0	0	0	6
0	0	2-	0	0	7
0	0	0	0	0	8
1-	1-	1	1	1	9
0	0	0	0	2	10
1-	1-	1	1-	1-	11
1-	1	1-	1	1	12
1-	1	1	1-	1	13
0	2	0	0	0	14
1	1-	1	1	1-	15
1-	1-	1-	1-	1	16
1	1-	1-	1-	1-	17
0	2-	0	0	0	18
0	0	0	2-	0	19
0	0	0	0	2-	20
1	1	1	1	1	21
1-	1	1	1	1-	22
1	1	1-	1-	1	23
1-	1	1-	1-	1-	24
1	1	1	1-	1-	25
0	0	0	0	0	26
1	1-	1-	1	1	27
1-	1-	1-	1	1-	28
0	0	0	0	0	29
0	0	2	0	0	30
2	0	0	0	0	31
1	1-	1	1-	1	32

3-2-9- تنقية أشباه الكاروتينات:

3-2-9-1- المحاليل المستخدمة:

1 -إيثر البترول

2 -إيثر ايثيلي : ميثانول (1:10)

3 -إيثر ايثيلي : حمض خل (1:10)

3-2-9-2- حشوة العمود المستخدمة :

استخدمت مادتي Hyflo Super Cel و أكسيد المغنزيوم بنسبة (1:2 و/و) في عملية

تنقية أشباه الكاروتينات المستخلصة من الخميرة , حيث تم خلطها بشكل جيد ومن ثم جففت

على الدرجة 105° م لمدة 4 ساعات لتخليصها من الرطوبة وأصبحت جاهزة لتعبئة العمود

(Latha and Jeevaratnam, 2010).

3-2-9-3- عمود التنقية :

استخدم للتنقية عمود زجاجي ارتفاعه 30 سم , وقطره 2.5 سم موصول بمفرغة هواء لإتمام

عملية التنقية وتعبئة العمود تحت تفريغ كما هو موضح في الشكل (3).

3-2-9-4- تعبئة عمود التنقية :

تمت تعبئة عمود التنقية وفق المراحل التالية :

1 تم إغلاق أسفل العمود المدبب باستخدام الصوف الزجاجي

2 أضيفت حشوة العمود (Hyflo Super Cel و أكسيد المغنزيوم بنسبة 1:2 و/و)

المجففة مسبقاً بهدوء وتحت التفريغ مع إجراء عملية كبس لها باستخدام مكبس مصنع

يدوياً, واستمرت عملية الإضافة والكبس حتى الوصول إلى ارتفاع 15 سم , تم تسوية

سطح الحشوة بشكل جيد ومن ثم أضيفت مادة سلفات الصوديوم اللامائية الماصة

للرطوبة على شكل طبقة سماكتها لا تتجاوز 1 سم لضمان التخلص التام من الرطوبة ضمن العمود.

3 أضيف ايثر البترول إلى العمود بهدوء مع استمرار عملية التفريغ ونستمر بالإضافة حتى نصل إلى 2-3 قطرات في الثانية من خلال التحكم بسرعة ضغط التفريغ .

4 أضيف 2-3 مل من الملون المستخلص من الخميرة إلى العمود بهدوء , وبعد مرور اللون بشكل كامل عبر طبقة سلفات الصوديوم اللامائية , أضيف المحلول (1) إلى العمود ليفصل أول حزمة لونية نستقبلها من أسفل العمود بأنبوب زجاجي . ثم أضيف المحلول (2) إلى العمود ليفصل ثاني حزمة لونية ونستقبلها أيضاً من أسفل العمود بأنبوب زجاجي . ثم أضيف المحلول (3) إلى العمود ليفصل آخر حزمة لونية نستقبلها من أسفل العمود بأنبوب زجاجي .

5 أخذت الأنابيب الحاوية على الألوان المنقاة لإتمام عملية التعرف عليها وتقدير كميتها باستخدام تقانة كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC .



الشكل (3) : عمود التنقية

3-2-10- فصل أشباه الكاروتينات :

3-2-10-1- فصل أشباه الكاروتينات باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC :

أخذ 2 ميكروليتر من عينة أشباه الكاروتينات المستخلصة وحددت كبقعة على اللوح الزجاجي الخاص بالفصل بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC ذو الأبعاد (20*20 سم) والمغطى بطبقة سماكتها (0.25 ملم) من السيلكا جيل (silicagel-60). بعد ذلك تم إجراء الفصل باستخدام طور متحرك (Mobile phase) مكون من إيثر البترول والأسيتون (20:80 ح/ح) لفصل كل ملون على حدة (Latha and Jeevaratnam, 2010).

3-2-10-2- فصل أشباه الكاروتينات باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء

: HPLC

استخدم في التقدير الكمي والنوعي لأشباه الكاروتينات جهاز كروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء (HPLC) ماركة KNAUER من ألمانيا والمزود بمضخة واحدة طراز LC-20AT وحجرة حقن Injection loop حجمها 20 ميكروليتر وفرن طراز CTO-20A وكاشف الأشعة فوق البنفسجية UV-PDA (Ultra Violet - Photo Diode Array) طراز SPD - M20A وحاسوب لتخزين النتائج المتحصل عليها من الكاشف ومعالجتها وفق نظام LC-Solution. وضبط الجهاز بدرجة حرارة العمود: 20 درجة مئوية وحرارة الكاشف: 40 درجة مئوية وتدفق الطور الحامل: 1 مل/دقيقة وزمن التحليل 10 دقيقة وحجم الحقنة 20 ميكروليتر ونظام الضخ الثابت Isogradient و العمود : OD-C18 (250 × 4.6 mm) من شركة تكنوكروما والطور المتحرك: أسيتونتريل : تتراهيدروفوران : ماء مقطر (50 : 38.5 : 11.5) (Radulescu et al.,2009).

3-10-2-3- التعرف على أشباه الكاروتينات باستخدام مطيافية فورييه ل لأشعة تحت

الحمراء FTIR:

تم التعرف على البناء الكيميائي لكل نوع من أشباه الكاروتينات المستخلصة من الخميرة و المنقاة بعمود التنقية باستخدام جهاز FT-IR نموذج 6300 ماركة Jasco ,حيث نقل حوالي 0.5 مل من أشباه الكاروتينات المنقاة إلى وحدة ATR المكونة من موشر مصنوع من مادة ZnSe مع تجنب تكوين الفقاعات وأجري المسح على درجة حرارة الغرفة ضمن مجال طيفي تراوح ماب بين (400 – 5000) Cm^{-1} , وباستخدام الماء المقطر كشاهد (Naumann *et al.*, 1991).

3-11-2-3- دراسة ثباتية أشباه الكاروتينات:

درست ثباتية أشباه الكاروتينات في ثلاثة أنواع من الزيوت النباتية وهي عباد الشمس, السمسم والفول السوداني على درجة حرارة الغرفة وبوجود الضوء وغيابه ولمدة وصلت إلى شهر. حيث أخذت عدة تخافيف من الملون وهي (50, 100, 1000) ميكروليتر وأضيف إلى 10 مل من الزيت النباتي وقيست الامتصاصية الضوئية للملون بعد (1, 3, 5, 7, 15, 30) يوم وبوجود الضوء وغيابه حسب (Latha and Jeevaratnam, 2010) .

3-13-2-3- 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) . في حين استخدم البرنامج الإحصائي Menitab والتصميم الاحصائي RSM في أمثلة ظروف إنتاج أشباه الكاروتينات .

4- النتائج والمناقشة :

4-1- عزل وتصنيف الخمائر:

بينت نتائج العزل أن الخمائر الملونة لم تتواجد في كافة العينات المجموعة والبالغة 400 عينة، إنما ظهرت في 50 عينة فقط، و تواجدت بأعلى نسبة في أوراق الأشجار حيث بلغت 21 عزلة ، تليها الترب المحلية 13 عزلة، ثم اللحوم المتنوعة 6 عزلات، ثم اللبن واللبننة بعدد 5 عزلات، ثم لحاء الأشجار عزل منها عزلتان، وأخيراً الأيس كريم ، المخللات والحلويات الشعبية عزل من كل منها عزلة واحدة فقط ، ويوضح الجدول (11) مصدر العزلات ونوع الخمائر المعزولة والمشخصة لإنتاج أشباه الكاروتينات باستخدام طريقة API حسب Maldonade وزملائه (2006).

الجدول (11): مصدر العزلات والخمائر المشخصة المنتجة لأشباه الكاروتينات

الرقم	مصدر العزلات	عدد العزلات الكلية	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. glutinis</i>	<i>R. minuta</i>
1	أوراق الشجر	21	18	3	-
2	ترب مختلفة	13	10	1	2
3	لحوم متنوعة	6	4	2	-
4	لبن ولبننة	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 العزلات		76%	20%	4%

ويلاحظ من الجدول (11) بأن العزلات الخمسين تنتمي إلى 3 أنواع مختلفة من خميرة *Rhodotorula* وهي *R.mucilaginosa* , *R. glutinis* و *R.minuta* وبنسب 76 % , 20 % و 4 % من مجموع العزلات الكلية على التوالي, وهذه العزلات اختلفت فيما بينها بكمية أشباه الكاروتينات المنتجة رغم انتمائها لنفس الجنس وهذا يوافق Maldonade وزملائه (2008) بأن إنتاج الخمائر للصبغة يختلف باختلاف النوع . كما بين Libkind و Brook (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 .

4-2- الوصف المورفولوجي للخمائر:

تبين بعد الرجوع إلى ما جاء في ملخص (Barnet et al.,2000) أن العزلات الخمسين تنتمي إلى الجنس *Rhodotorula* حيث تظهر الخلايا تحت المجهر بشكلها البيضي كبير الحجم والبرعمة محيطية, ولم تشكل ميسيليوم والراسب المتشكل منها ضعيف جداً والعكارة خفيفة , ولم تظهر حلقة أو غشاء عند زراعتها بوسط المالت السائل وأعطت بنموها على وسط مالت آغار نمواً بلون يتدرج ما بين البرتقالي إلى الوردى والأحمر كما هو موضح في الأشكال (4) و(5) و(6) .

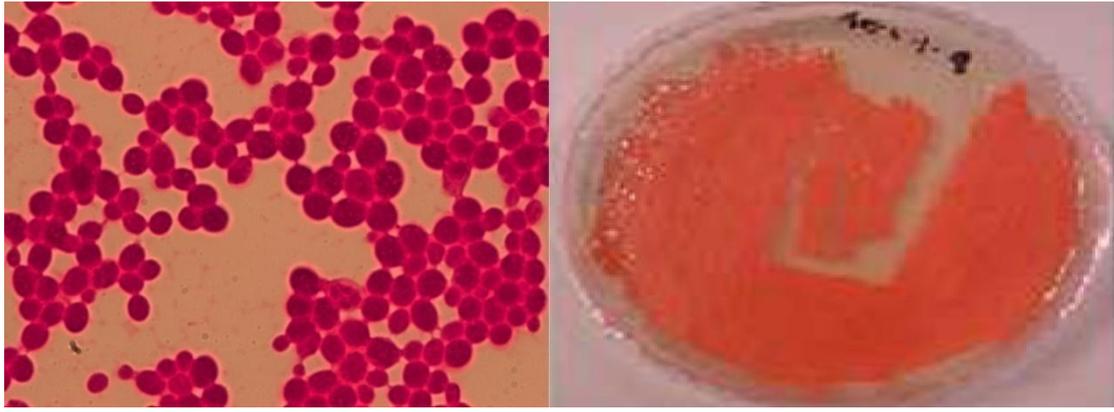
4-3- الوصف البيوكيميائي للخمائر بواسطة الـ API لتحديد النوع :

يبين الشكل (7) كيفية تصنيف بعض الخمائر عن طريق الـ API لتحديد جنس ونوع الخميرة بالاعتماد على المجموع الرقمي لكل من السكاكر المخمرة ذات الرمز الموجب (+) في كل خانة, مع إهمال المجموع الرقمي للسكاكر غير المخمرة ذات الرمز السالب (-) في كل خانة ,

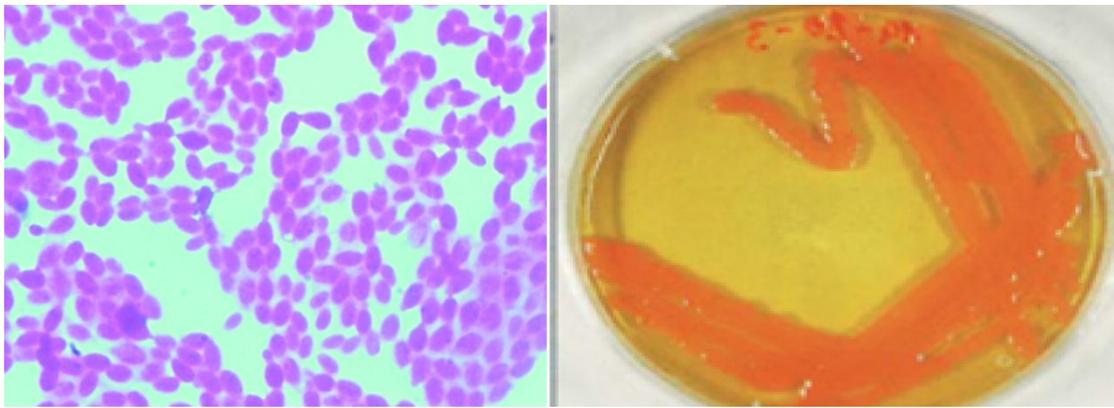
ومع ترتيب الأرقام من اليسار إلى اليمين, كما يوضح الجدول (12) نتائج تخمير السكريات وفقاً لطريقة API 20C AUX.

الجدول (12) : تصنيف أنواع *Rhodotorula* وفقاً لطريقة API

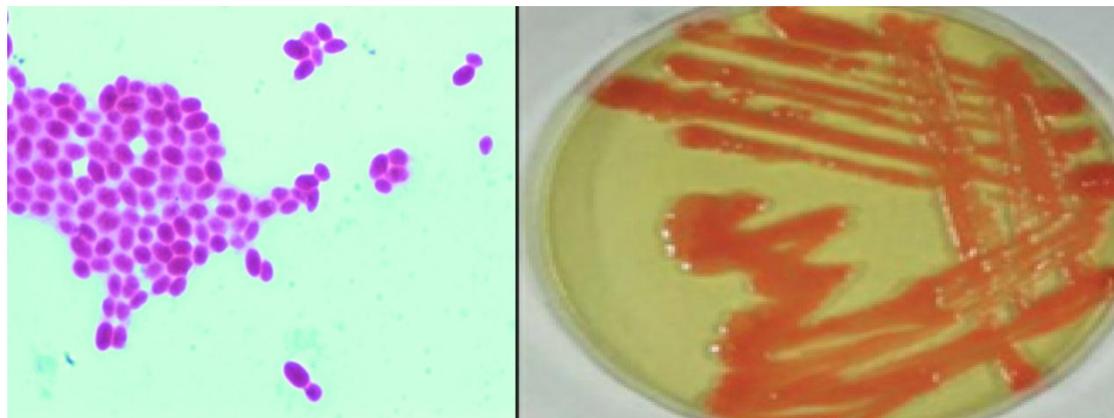
<i>R. minuta</i>	<i>R. glutinis</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	السكريات	الرقم المتسلسل
+	+	+	غلوكوز	1
+	+	-	جليسرول	2
-	+	+	2- كيتو - غلوكوز	3
+	-	+	أرابينوز	4
+	-	+	زايروز	5
-	-	+	أدونيتول	6
-	-	+	زيليتول	7
-	-	-	غالاكتوز	8
-	-	-	اينوسيتول	9
-	+	+	سوربيتول	10
-	-	-	ميتيل غلوكوزيد	11
-	-	-	N اسيتيل غلوكوز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



الشكل (4): خميرة *R. mucilaginosa* معزولة من أوراق الاشجار



الشكل (5) : خميرة *R. minuta* معزولة من التربة



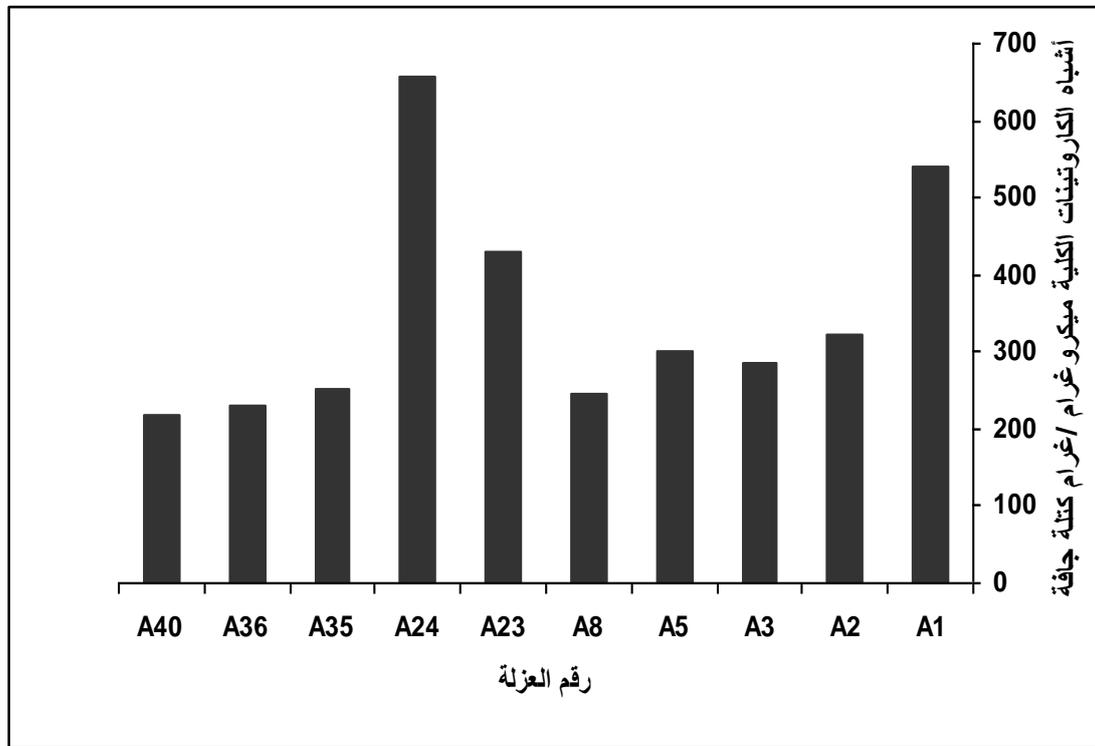
الشكل (6) : خميرة *R. glutinis* معزولة من أوراق الاشجار

4-4- غريلة الخمائر والتعرف على قدرتها في إنتاج أشباه الكاروتينات :

يبين الجدول (13) كمية أشباه الكاروتينات الكلية للعزلات مقدره 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. و يبين الشكل (8) كمية أشباه الكاروتينات الكلية للعزلات المتفوقة مقدره بالميكروغرام /غرام كتلة جافة , ويلاحظ من الشكل أن أفضل 3 عزلات كانت A24 و A1 و A23 حيث أعطت 658.2 و 539 و 428.5 ميكروغرام/غ على التوالي و كانت جميعها تنتمي إلى نوع واحد من الخمائر المشخصة وهي *R. mucilaginosa* علماً أن كل من A24 و A23 معزولتين من أوراق الأشجار بينما A1 معزولة من اللحم.

تؤكد هذه النتيجة أن الأحياء الدقيقة تتباين وراثياً وإن انتمت إلى نفس النوع فيما بينها من حيث خصائص نموها و فعاليتها الإستقلابية وهذا يكون نابعاً عن استجابة ال سلالات للظروف البيئية (Chang و Elander , 1979), فالبناء الوراثي بقدر ما يتصف بالثبات فإنه يتميز أيضاً بمرونة كبيرة في الاستجابة للتغيرات البيئية وبالتالي في التعبير عن الصفات المظهرية للجينات. ومن ناحية أخرى تقاربت نتائج دراستنا مع Maldonade وزملائه (2008) حيث أعطت عزلات *R. mucilaginosa* في دراستهم والمعزولة من التربة كميات متقاربة من أشباه الكاروتينات الكلية وهي 590 و 545 و 487 ميكروغرام / غ على التوالي . وقد توافقت نتائج دراستنا مع

نتائج دراسة 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 كل من Aksu و Eren (2005), بأن 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 (8) : كمية أشباه الكاروتينات الكلية في العزلات المتفوقة (ميكروغرام/غرام كتلة

حيوية جافة)

الجدول (13) : كمية أشباه الكاروتينات الكلية للعزلات (ميكروغرام / غرام كتلة حيوية جافة)

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

4-5- مقارنة طرائق استخلاص أشباه الكاروتينات:

يوضح الجدول (14) 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) و Park وزملائه (2007) بلبن أفضل طرائق الاستخلاص كانت باستخدام الطريقة الكيميائية . وقد بين أيضاً Kim وزملائه (2010) أن طريقة التحطيم باستخدام الأمواج فوق الصوتية Sonicator في الطريقة الثانية كانت قليلة الكفاءة في استخلاص أشباه الكاروتينات حيث أن DMSO له قدرة أكبر في التأثير في 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 (14) : تأثير طريقة الاستخلاص في كمية أشباه الكاروتينات

متوسط كمية أشباه الكاروتينات (ميكروغرام/غ) ± الانحراف المعياري	طرائق الاستخلاص
55.28 ^d ± 0.8	1 5 مل من HCL + 1 ساعة + حمام مائي 70°م
13.21 ^a ± 1.69	2 5 مل DMSO + 24 سا + حاضنة هزازة بدرجة 10 ⁻⁵ م ثم تحطيم باستخدام جهاز sonicator لمدة 15 د
17.98 ^b ± 1.78	3 5 مل DMSO + 2 سا + حاضنة هزازة 10 ⁻⁵ م +كرات معدنية
27.77 ^c ± 2.95	4 5 مل من DMSO + 1 ساعة + حمام مائي 70°م
62.56 ^e ± 1.98	5 5 مل من DMSO + 24 ساعة بدون تحريك
154.85 ^f ± 1.48	6 5 مل DMSO + 2 ساعة + حاضنة هزازة بدرجة 10 ⁻⁵ م

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

4-6- تطهير الخمائر باستخدام الأشعة فوق البنفسجية :

يبين الجدول (15) نتائج تطهير الخميرة *R.mucilaginosa* باستخدام أشعة الـ UV لمدة 5

دقائق وتأثيرها في إنتاجية أشباه الكاروتينات من كل مستعمرة مطفرة على حدا لمقارنتها مع

الخميرة الشاهد غير المعرضة للتطهير A24 والتي أعطت كمية إنتاج (658.23 ميكروغرام/ غ).

نلاحظ من الجدول أن عدد المستعمرات يقل بازدياد زمن التطهير مقارنة بعدد المستعمرات غير

المعرضة للتطهير وهذا يتوافق مع (Abd-alrazek (2004 حيث تناقص عدد مستعمرات

الخميرة المطفرة بازدياد مدة تعرضها لأشعة الـ UV وذلك من 20 مستعمرة عند تعرض الخميرة

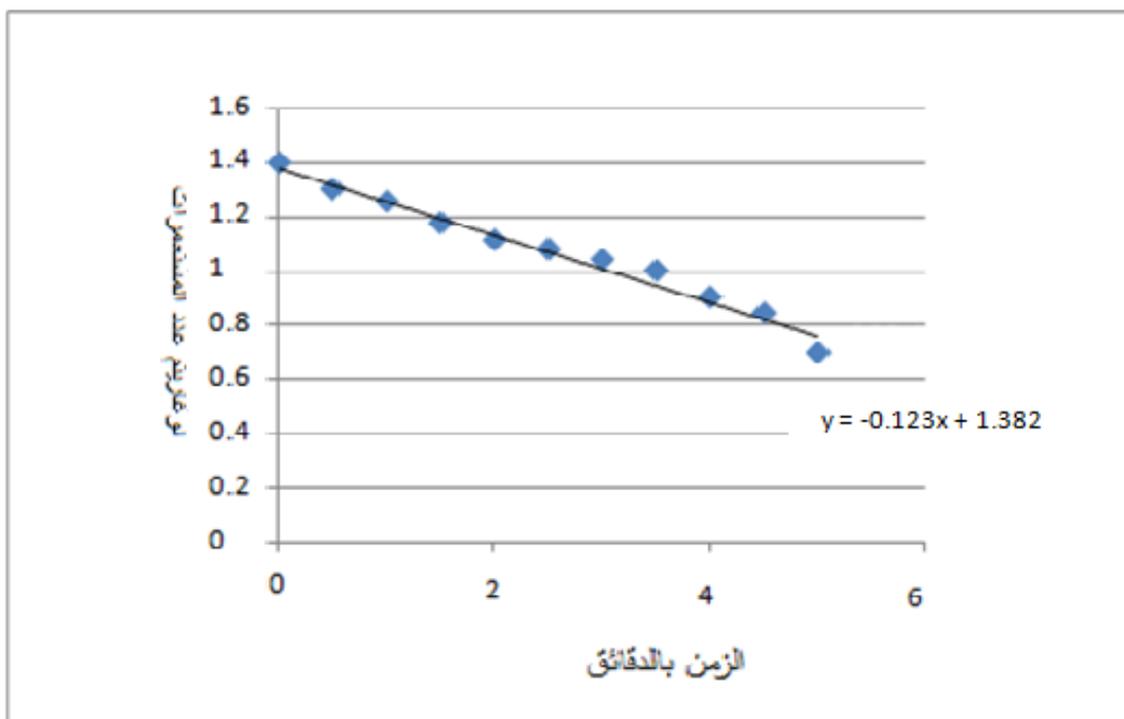
للأشعة لمدة 0.5 دقيقة لتصل إلى 5 مستعمرات فقط عند تعرضها لفترة 5 دقائق . كما نلاحظ

من الجدول أيضاً وجود طفرتين أعطتا إنتاجية أعلى من العزلة الشاهد وذلك للطفرة رقم 10 في زمن 3.5 دقيقة والطفرة رقم 2 في زمن 4.5 دقيقة وإنتاجية لأشباه الكاروتينات بلغت 670.71 و 734.58 ميكروغرام/غ على التوالي وتفوقت الطفرات في الزمن 4.5 دقيقة بمتوسطاتها على باقي الأزمنة الأخرى في كمية أشباه الكاروتينات 289.14 ميكروغرام/غ , بينما أعطت الطفرة في الزمن 2 دقيقة أدنى إنتاجية من أشباه الكاروتينات وهو 99.38 ميكروغرام / غ . وفي دراسة مشابهة لـ Yehia وزملائه 2013 أجرو التطهير على خميرة *R. glutinis* باستخدام أشعة الـ UV 254 نانو متر ومن ارتفاع 10 سم وتم التطهير باستخدام 10 أزمنة هي (0.5 , 1 , 1.5 , 2 , 2.5 , 3 , 3.5 , 4 , 4.5 , 5) دقيقة , حيث أعطت الطفرة في زمن 2 دقيقة أعلى إنتاجية وهذا لا يتوافق مع دراستنا على خميرة *R.mucilaginoso* . وفي دراسة أخرى عرضت خميرة *R. glutinis* NCIM 3353 إلى أشعة الـ UV 254 نانو متر ومن ارتفاع 8 سم بهدف تحسين إنتاجيتها وغرلت إنتاجية الطفرات من أشباه الكاروتينات فأعطت الطفرة الأفضل mutant 32 إنتاجية فاقت العزلة الأصلية بمعدل 15 مرة وذلك بعد تعريضها للأشعة لمدة 100 ثانية (Bhosale, 2001) . يبين الشكل (9) الزمن اللوغاريتمي للقتل اعتماداً على عدد مستعمرات الخمائر المتبقية بعد التطهير للأزمنة المدروسة , والمعادلة الناتجة عن الخط المستقيم هي: $Y=0.123X+1.382$

الجدول (15) : الطفرات الناتجة عن تعريض خميرة *R. mucilaginosa* لأشعة الـ UV

وكمية أشباه الكاروتينات المنتجة بعد التطهير

كمية أشباه الكاروتينات المنتجة بعد التطهير بالدقائق (ميكروغرام/غ كتلة حيوية)										رقم الطفرة
5	4.5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.5	
125.47	238.39	185.44	137.82	171.97	146.13	99.71	225.55	221.34	191.17	1
148.63	734.58	258.87	294.57	151.13	214.78	172.96	271.42	293.41	178.78	2
160.92	157.82	185.57	248.37	203.27	114.62	231.47	233.76	254.97	189.17	3
119.68	266.09	189.17	109.06	205.9	99.41	172.44	211.28	177.16	203.22	4
314.47	142.84	296.04	121.17	116.1	186.17	239.36	256.09	170.74	223.57	5
	257.96	190.07	121.02	260.42	203.91	254.03	269.02	213.49	131.43	6
	226.33	191.17	239.17	146.87	298.62	152.49	205.14	192.55	224.79	7
-	-	618.05	162.15	217.48	227.01	192.9	144.58	122.11	190.35	8
-	-	-	106.23	160.86	193.17	109.1	131.26	139.12	259.44	9
-	-	-	670.71	108.1	178.06	177.59	194.76	217.16	162.15	10
-	-	-	-	198.52	149.86	99.38	124.87	121.61	158.28	11
-	-	-	-	112.6	153.14	227.95	163.32	237.08	139.82	12
-	-	-	-	-	-	224.79	170.79	168.9	189.17	13
-	-	-	-	-	-	183.16	149.17	198.63	173.41	14
-	-	-	-	-	-	117.11	191.17	177.42	186.82	15
-	-	-	-	-	-	-	-	164.01	145.42	16
-	-	-	-	-	-	-	-	163.11	229.71	17
-	-	-	-	-	-	-	-	185.31	227.25	18
-	-	-	-	-	-	-	-	-	158.46	19
-	-	-	-	-	-	-	-	-	169.2	20
5	7	8	10	12	12	15	15	18	20	العدد المتبقي
173.83	289.14	264.2975	221.03	150.24	170.93	174.13	176.38	181.96	186.58	المتوسط العام



الشكل (9) : الزمن اللوغاريتمي للقتل

تم اختيار الطفرة التي أعطت أفضل إنتاجية (734.58 ميكروغرام/غ) وأعطيت الرمز A24-M حيث أعطت كمية من أشباه الكاروتينات أعلى من إنتاجية الخميرة الأصل A24 بمقدار 1.1 مرة وهذا يتوافق تقريباً مع Vijayalakshmi الذي تمكن من زيادة إنتاجية خميرة *R. gracilis* من أشباه الكاروتينات بمقدار 1.8 مرة مقارنة مع السلالة الأصلية وذلك عند تطهيرها بالـ UV (Vijayalakshmi et al.,2001). وتم التأكد من ثباتية الطفرة وذلك بزراعتها عدة مرات على وسط مالت آغار ووسط إنتاج أشباه الكاروتينات (3-2-1-3).

4-7- اختيار مصدر كربوني رخيص الثمن:

يبين الجدول (16) و الشكل (10) كمية أشباه الكاروتينات المنتجة من خميرة

R. mucilaginosa A24 وكذلك كمية أشباه الكاروتينات المنتجة من الطفرة

R. mucilaginosa A24 – M باستخدام 4 مصادر كربونية رخيصة الثمن وهي

(الغليسيرول الخام ,المولاس, تفل العنب ومصل الجبن) . نلاحظ من الجدول (16) والشكل

(10) اختلاف في المصدر الكربوني المثالي بين العزلة الأصلية والطفرة , حيث أعطت العزلة

A24 أفضل إنتاجية من أشباه الكاروتينات بلغت 534.44 ميكروغرام/غ عند استخدام المولاس

كركيزة , بينما أعطت الطفرة *A24 – M* أفضل إنتاجية بلغت 601.45 ميكروغرام/غ عند

استخدام الغليسيرول الخام كركيزة, وهذا يتوافق مع (Razavi and Marc, 2006) حيث تم

الحصول على أعلى إنتاجية من أشباه الكاروتينات من خميرة *Sporobolomyces*

ruberrimus وبلغت 3.84 مغ/غ باستخدام الغليسيرول الخام كمصدر وحيد للكربون. وفي

دراسة مماثلة على خميرة *Rhodosporidium paludigenum* تم الحصول على أعلى

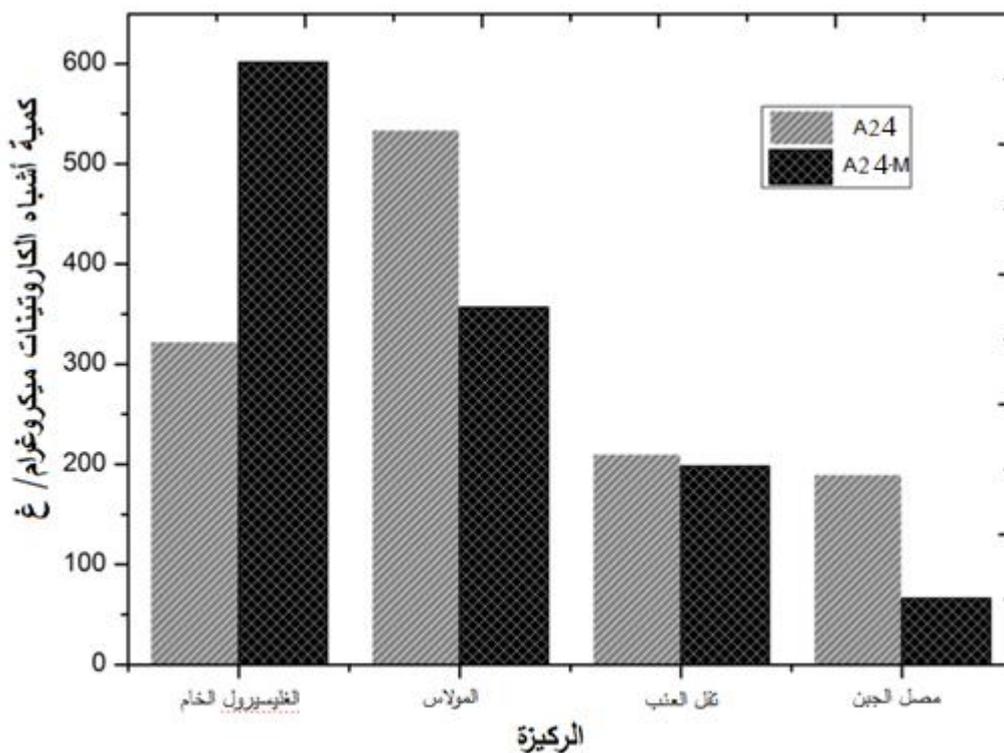
إنتاجية من أشباه الكاروتينات وبلغت 3.43 مغ/ل باستخدام الغليسيرول الخام

(Yimyoo *et al.*, 2011), في حين كان المولاس هو المصدر الكربوني الأفضل في دراسة

أخرى أجريت على خميرة 32 *R. glutinis* (Bhosale and Gadre, 2001) .

الجدول (16) : كمية أشباه الكاروتينات المنتجة من الخميرة الأصل والطفرة حسب الركيزة

كمية أشباه الكاروتينات المنتجة حسب الركيزة (ميكروغرام/غ)				
الخميرة	الغليسيرول الخام	المولاس	تفل العنب	مصل الجبن
A24	322.98	534.44	210.40	190.30
A24-M	601.45	356.77	198.30	66.42



الشكل (10) : كمية أشباه الكاروتينات المنتجة من الخميرة الأصل والطفرة حسب الركيزة

4-8- دراسة الظروف المثلى لإنتاج أشباه الكاروتينات باستخدام التصميم الإحصائي RSM:

يبين الجدول (17) نتائج كمية أشباه الكاروتينات المنتجة من خميرة

Rhodotorula mucilaginosa المطفرة (A24-M) بواسطة اشعة UV (254 nm)

حسب التصميم الإحصائي المعتمد في الجدول (10) من حيث تركيز الركيزة، حجم اللقاح، مدة

الحضن، درجة حموضة الوسط (pH) ودرجة الحرارة المثوية.

الجدول (17) : كمية أشباه الكاروتينات المنتجة من *Rhodotorula mucilaginosa*

(A24-M) بعد تعريضها لعدة متغيرات

التجارب	تركيز الركيزة (غرام)	حجم اللقاحة (ملييلتر)	زمن التخمر (يوم)	درجة الحموضة	درجة الحرارة (درجة مئوية)	كمية أشباه الكاروتينات (ميكروغرام/غرام)
1	20	10	3	5	20	314.4727
2	20	10	3	5	30	649.5977
3	20	14	3	5	30	561.1523
4	20	10	3	5	30	588.408
5	15	12	2	5.5	35	111.2489
6	20	10	3	5	30	235.8545
7	20	10	1	5	30	137.5443
8	20	10	3	5	30	599.9625
9	25	12	4	4.5	25	559.6557
10	30	10	3	5	30	396.7761
11	15	8	4	4.5	25	126.758
12	25	12	2	5.5	25	213.7432
13	25	8	4	5.5	25	584.7227
14	20	10	3	6	30	652.5534
15	15	12	4	4.5	35	112.6977
16	25	8	2	4.5	25	174.4341
17	15	8	2	4.5	35	132.6682
18	20	10	3	4	30	342.4955
19	20	6	3	5	30	505.8739
20	10	10	3	5	30	432.0932
21	25	12	4	5.5	35	133.0125
22	15	12	4	5.5	25	557.6977
23	25	8	2	5.5	35	116.6989
24	15	8	2	5.5	25	171.9773
25	15	8	4	5.5	35	44.5977
26	20	10	3	5	30	509.0602
27	25	12	2	4.5	35	67.0636
28	15	12	2	4.5	25	115.4705
29	20	10	3	5	30	321.8432
30	20	10	5	5	30	620.6148
31	20	10	3	5	40	4.9136
32	25	8	4	4.5	35	49.0989

4 8 1 - تحليل التجربة :

يبين الجدول (18) تأثير العوامل المدروسة (كل عامل على حدة, ومربع العوامل, والعلاقة بين العوامل) في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة كمايلي:

1- Linear effect وتعني تأثير كل عامل لوحده في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة:

تحتوي المعادلة على 5 متغيرات (درجة الحرارة - pH - مدة التحضين - حجم اللقاح - تركيز الركيزة), نلاحظ من الجدول أن قيمة P لكل من درجة الحرارة درجة الحموضة pH أقل من 0.05 ($P < 0.05$) وبالتالي هناك تأثير خطي معنوي لكل من هذ بين المتغيرين في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة , ومن جهة أخرى نلاحظ أن قيمة P لكل من مدة التحضين , حجم اللقاح و تركيز الركيزة كان أكبر من 0.05 ($P > 0.05$) وهذا يعني أنه ليس لهذه المتغيرات الثلاثة أي تأثير معنوي في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة.

2- Squares effect وتعني تأثير العوامل مربعة في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة:

تحتوي المعادلة على 5 متغيرات مربعة ونلاحظ من الجدول أن قيمة P لكل من درجة الحرارة , pH , مدة التحضين و حجم اللقاح مربعة كانت أقل من 0.05 ($P < 0.05$) وهذا يعني أن هناك تأثير معنوي لهذه العوامل الأربعة في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة , و العلاقة بين العوامل المربعة الأربعة و كمية أشباه الكاروتينات المنتجة على شكل منحنى (قطع مكافئ).

3- Interaction effect وتعني تأثير العوامل المترابطة (المتداخلة) في أشباه الكاروتينات

المنتجة:

يبين الجدول (18) أن علاقة درجة الحرارة كانت معنوية مع كل من درجة الحموضة pH و

مدة التحضين وعلاقة درجة الحموضة pH معنوية مع مدة التحضين وعلاقة مدة التحضين

معنوية مع حجم اللقاح ($P < 0.05$) بينما كانت العلاقات الأخرى غير معنوية .

معامل التحديد $R^2 = 93.8\%$ وهذا يدل على أن معادلة الإنحدار للعوامل المتغيرة تؤثر نسبة

93.8% على مقدار التغير في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة .

واعتماداً على الجدول (18) يمكن كتابة المعادلة كما يلي :

$$Y = -11833.4 + 331.1X_1 + 1993.8X_2 + 279.6X_3 + 292.6X_4 + 37.4X_5 - 5.7X_1^2 - 228.6X_2^2 - 73.7X_3^2 - 23.9X_4^2 - 0.6X_5^2 + 10.1X_1X_2 - 4.7X_1X_3 - 1.6X_1X_4 - 1.0X_1X_5 - 21.7X_2X_3 + 15.5X_2X_4 - 4.1X_2X_5 + 39.4X_3X_4 + 4.6X_3X_5 + 3.5X_4X_5$$

الجدول (18) : تأثير العوامل المدروسة في إنتاج أشباه الكاروتينات من

(A24-M) *Rhodotorula mucilaginosa*

P	T	SE Coef	Coef	Term
0.004	3.674-	3221.14	11833.4-	Constant
0.001	4.654	71.15	331.1	A
0.033	2.430	820.48	1993.8	B
0.415	0.847	330.04	279.6	C
0.118	1.694	172.75	292.6	D
0.590	0.555	67.38	37.4	E
0.000	8.234-	0.69	5.7-	A*A
0.007	3.293-	69.41	228.6-	B*B
0.001	4.250-	17.35	73.7-	C*C
0.000	5.519-	4.34	23.9-	D*D
0.397	0.881-	0.69	0.6-	E*E
0.005	1.075	9.40	10.1	A*B
0.036	1.006-	4.70	4.7-	A*C
0.502	0.694-	2.35	1.6-	A*D
0.301	1.085-	0.94	1.0-	A*E
0.003	0.462-	46.99	21.7-	B*C
0.524	0.658	23.50	15.5	B*D
0.669	0.439-	9.40	4.1-	B*E
0.006	3.350	11.75	39.4	C*D
0.347	0.983	4.70	4.6	C*E
0.166	1.485	2.35	3.5	D*E

A* درجة الحرارة, B درجة الحموضة, C مدة التحضين, D حجم اللقاحة, E تركيز الركيزة

يبين الجدول (19) وجود متغير واحد (Linear) على الأقل من المتغيرات المفردة الخمسة معنوي لأن $(P < 0.05)$, كما يوجد متغير مربع واحد (Square) على الأقل من المتغيرات المربعة الخمسة معنوي $(P < 0.05)$, ويوجد علاقة ترابط واحدة (Interaction) على الأقل من علاقات الترابط العشرة معنوية حيث $(P < 0.05)$.

Lack-of-Fit: تبين التغيرات الناتجة عن عدم صحة المعادلة ونلاحظ من الجدول أن $(P < 0.05)$ وبالتالي فهي معنوية التأثير وهذا دليل على أن المعادلة تشرح بشكل جيد التغير في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة.

الجدول (19): تحليل التباين

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	20	1475261	1475261	73763	8.35	0.000
Linear	5	370246	210585	42117	4.77	0.015
Square	5	936669	936669	187334	21.21	0.000
Interaction	10	168345	168345	16835	1.91	0.013
Residual Error	11	97165	97165	8833		
Lack-of-Fit	6	94454	94454	15742	29.03	0.000
Pure Error	5	2711	2711	542		
Total	31	1572426				

4 8 2 - أمثلة ظروف إنتاج أشباه الكاروتينات :

4-8-2-1- تأثير درجة الحرارة في إنتاج أشباه الكاروتينات :

تشير النتائج المبينة في الشكل (11) إلى ازدياد كمية أشباه الكاروتينات المنتجة بازدياد درجة الحرارة حتى 30° م والتي مثلت درجة الحرارة المثلى للإنتاج وإن ارتفاع درجة حرارة التحضين بعد ذلك عن 30° م قد رافقها انخفاض تدريجي في الإنتاجية، وهذا يعكس ما ذكره (السواح، 2002) بأن درجة الحرارة تؤثر بشكل مباشر في معدلات كل من النمو الميكروبي والتخليق الحيوي للمستقلبات إذ أن الانخفاض عن الحد الأمثل لدرجة حرارة الإنتاج يؤدي إلى تباطؤ النمو وتأخير تخليق المستقلبات المطلوبة وأن ارتفاعها عن حدها قد يؤثر سلباً في نمو الكائن الحي الدقيق وبالتالي في الإنتاج .

توافقت درجة الحرارة المثلى لإنتاج أشباه الكاروتينات من خميرة

R.mucilaginosa (A24-M) المتحصل عليها في هذه الدراسة مع ما توصل إليه

(Aksu and Eren, 2007) حيث ازداد إنتاج أشباه الكاروتينات ومعدل نمو خميرة

R. glutinis ازدياداً ملحوظاً مع زيادة درجة الحرارة لتصل إلى أعلى إنتاج على درجة حرارة 30

°م ثم تناقص الإنتاج عند تجاوزها لهذه الدرجة . توافقت نتائجنا أيضاً مع Harrison

(1998) الذي درس تأثير درجة الحرارة على خميرة *R. mucilaginosa* فتبين أن كمية أشباه

الكاروتينات الناتجة والكتلة الحيوية الناتجة ازدادت بارتفاع درجة الحرارة وبلغت أعلى إنتاجية

ممكنة على الدرجة 30 °م وتناقصت بعدها الإنتاجية مع ارتفاع درجة الحرارة. كما كانت الدرجة

30.3° م هي المثالية لنمو خميرة *R. glutinis* وإنتاجها أشباه الكاروتينات

(Tinoi et al., 2005)

اختلفت درجة الحرارة المثلى المتحصل عليها في هذه الدراسة مع درجة الحرارة المثلى التي توصل إليها (Yimyoo *et al.*, 2011) حيث ازداد نمو وإنتاج خميرة *Rhodosporidium paludigenum* مع زيادة درجة الحرارة وبلغت أعلى نمو وإنتاجية على الدرجة 32°م. كما كانت درجة الحرارة المثلى لنمو خميرة *R. glutinis* وإنتاجها لأشباه الكاروتينات بأعلى كمية ممكنة هي 25°س (El Banna *et al.*, 2012).

4-2-2- تأثير درجة الحموضة pH في إنتاج أشباه الكاروتينات :

تتميز الخمائر بحساسية عالية للتغير في قيمة pH الوسط، وبالتالي تتأثر كمية أشباه الكاروتينات المنتجة بتغير pH الوسط لذلك يعتبر تعيين pH الأمثل لإنتاج أشباه الكاروتينات خطوة هامة في عملية الإنتاج (عمر, 2006).

تحققت أعلى إنتاجية من أشباه الكاروتينات المنتجة من خميرة *R. mucilaginosa* (A24-M) المتحصل عليها في الدراسة الحالية عند درجة حموضة (pH) تساوي 5 كما هو موضح في الشكل (11) وهذا يتوافق مع ما توصل إليه Naghavi وزملائه (2013) في دراسة أجريت في إيران على خميرة *R. mucilaginosa* تبين أن pH وسط النمو المثالي لإنتاج أشباه الكاروتينات وكمية الكتلة الحيوية الجافة الناتجة كان 5 , بينما كان pH وسط النمو المثالي لإنتاج أشباه الكاروتينات من خميرة *R. glutinis* هو 4 (Maldonade *et al.* 2007) وهذه النتيجة تماثل ما توصل إليه Shih و Hang (1996) حيث كان pH المثالي هو 5 أيضاً لإنتاج أشباه الكاروتينات من خميرة *R. rubra* . كما توصل Mihalcea وزملائه (2011) أيضاً إلى أن 5 هي درجة الـ pH المثالية للنمو وإنتاج أعلى كمية من أشباه الكاروتينات من خميرة *R. rubra* . في حين خالفت نتائجنا ما توصل إليه Yimyoo وزملائه (2011) حيث

كانت الدرجة 6 هي المثالية لنمو خلايا خميرة *Rhodosporidium paludigenum* وإنتاجها لأشباه الكاروتينات. بينما ارتفعت درجة pH الوسط المثالية لنمو خميرة *R. mucilaginosa* وإنتاجها من أشباه الكاروتينات لتبلغ 7 في دراسة أخرى لـ Aksu and Eren (2005).

4-2-3- تأثير مدة التحضين في إنتاج أشباه الكاروتينات :

رافق تحضين خميرة *R.mucilaginosa* (A24-M) 4 أيام في هذه الدراسة الحصول على أقصى إنتاجية لأشباه الكاروتينات كما هو موضح في الشكل (11) تلا ذلك انخفاض في كمية أشباه الكاروتينات بزيادة فترة التخمير، ويعزى هذا الانخفاض إلى زيادة تركيز بعض المواد الوسطية الناتجة عن تمثيل المواد الغذائية الموجودة في الوسط المغذي والتي تؤثر بصورة سلبية في الإنتاج (عمر، 2006).

خالفت نتيجتنا ما توصل إليه Govindaswamy وزملائه (1999) حيث ازدادت مدة التحضين المثالية لخميرة *R. gracilis* لتصل إلى 9 أيام بلغت عندها كمية أشباه الكاروتينات أقصاها . ازداد نمو خميرة *Sporobolomyces Pararoseus* وازداد إنتاجها من أشباه الكاروتينات بزيادة مدة التحضين حيث بلغت أعلى كمية منتجة بعد 5 أيام من التحضين وتناقص بعد هذه المدة كل من نمو الخميرة وإنتاجيتها من أشباه الكاروتينات

(Manowattana et al., 2012) ، وهذه النتيجة توافق Maldonade وزملائه (2012) حيث تم الحصول على أفضل نمو لخميرة *R. mucilaginosa* وأعلى إنتاجية من أشباه الكاروتينات بعد 5 أيام من التحضين . درس تأثير مدة التحضين على نوعين من الخمائر وهي

R. mucilaginosa و *R. slooffiae* فكانت المدة المثالية لإنتاج أعلى كمية من أشباه الكاروتينات هي (3 و 2) يوم على التوالي (Naghavi et al., 2013).

4-2-8-4- تأثير حجم اللقاح في إنتاج أشباه الكاروتينات :

تحققت أعلى إنتاجية من أشباه الكاروتينات المنتجة من خميرة *R.mucilaginosa* (A24-M) المتحصل عليها في الدراسة الحالية عند استخدام حجم لقاح 12 مل (حوالي $10^7 * 2$ خلية) كما هو موضح في الشكل (11) .

تختلف كمية المنتج باختلاف حجم اللقاح فقد كان الحجم المثالي للإنتاج هو 10 مل من خميرة *R. mucilaginosa* (Maldonade et al., 2012) بينما كان 2 مل في دراسة أخرى على خميرة *R. gracilis* (Govindaswamy et al., 1999), كذلك كان الحجم 10 مل هو المثالي لإنتاج أشباه الكاروتينات من *Halorubrum* sp. (Hamidi et al., 2014)

4-2-8-4-5- تأثير تركيز الركيزة في إنتاج أشباه الكاروتينات :

استخدمت تراكيز مختلفة من الغ ليسيروول في الوسط المستخدم لتنمية الخميرة المنتجة لأشباه الكاروتينات *R.mucilaginosa* (A24-M) وتم قياس كمية أشباه الكاروتينات من أجل تحديد تركيز الغ ليسيروول المثالي, فكانت 30 غ/ل هي المثلى كما هو موضح في الشكل (11). استخدم الغليسيرول كمصدر كربوني رخيص الثمن في دراسة على إنتاج أشباه الكاروتينات من خميرة *Rhodospiridium paludigenum* وبلغ إنتاج أشباه الكاروتينات أقصاه (3.42 مغ/ل) عند استخدام الغليسيرول بتركيز 40 غ/ل (Yimyoo et al., 2011). بينما أعطت خميرة *Sporobolomyces Pararoseus* أعلى نمو وإنتاجية من أشباه

. (Manowattana *et al.*, 2012)

New	Hi	A	B	C	D	E
D	Cur	40.0	6.0	5.0	14.0	30.0
1.0000	Lo	[30.0]	[5.0]	[4.0]	[12.0]	[30.0]
		20.0	4.0	1.0	6.0	10.0

Carotene Maximum $y = 800.7872$ $d = 1.0000$	
---	--

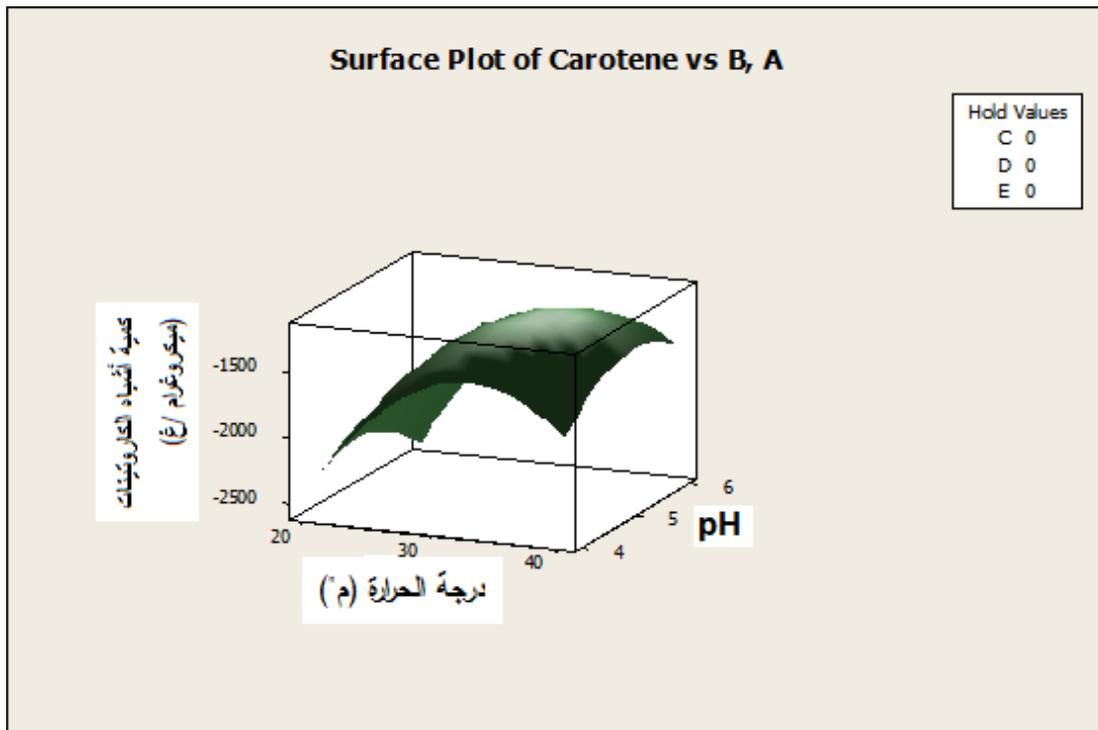
الشكل (11) الظروف المثلى لإنتاج أشباه الكاروتينات من خميرة *R.mucilaginosa*

RSM (A24-M) بواسطة البرنامج الإحصائي

يبين الشكل أن كمية أشباه الكاروتينات المثالية المتحصل عليها كانت (800.7872 ميكروغرام / غ) عند درجة حرارة 30°م ، درجة حموضة pH تساوي 5، مدة تحضين تعادل 4 أيام ، حجم لقاح 12 مل (حوالي 2×10^7 خلية) و تركيز غليسرول يعادل 30 غ/ل . بتطبيق هذه العوامل المثالية على خميرة *R.mucilaginosa* (A24-M) بلغت كمية أشباه الكاروتينات المنتجة (732.223 ميكروغرام / غ) في حين بلغت (582.566 ميكروغرام / غ) بتطبيق العوامل نفسها المثالية على خميرة *R.mucilaginosa* (A24).

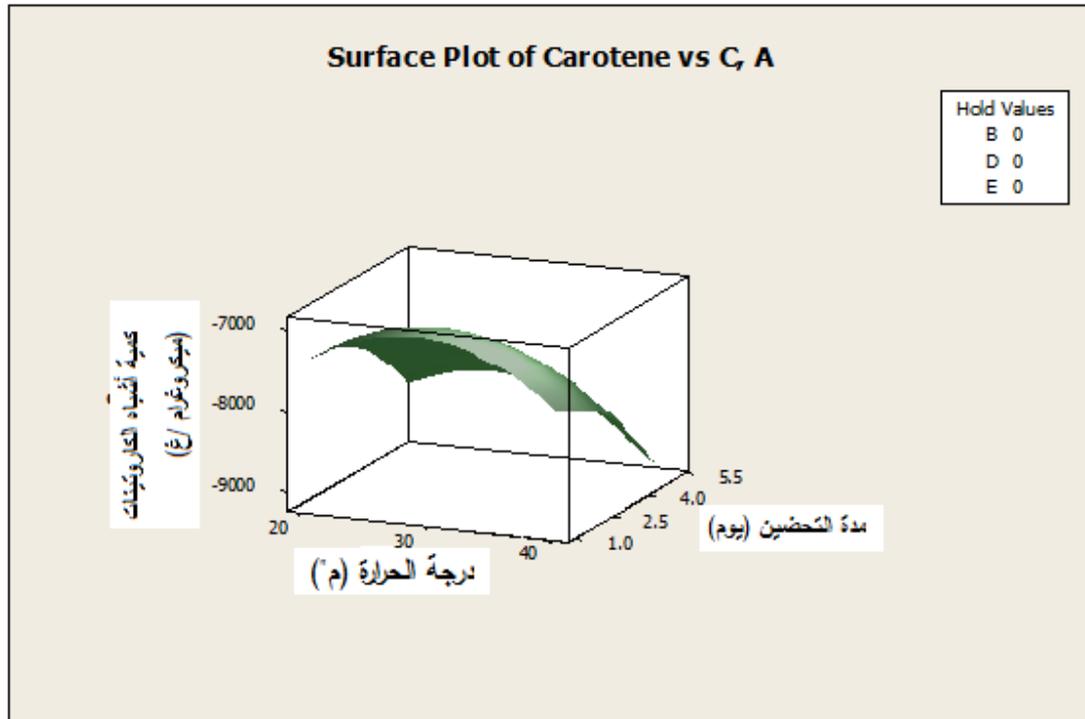
4-8-3- تأثير كل متغيرين معاً في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة :

يبين الشكل (12) تأثير اثنين من المتغيرات (pH ودرجة الحرارة) في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة مع تثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن كمية أشباه الكاروتينات تتأثر بارتفاع درجة الحموضة pH نظراً لأن تأثيرها معنوي في كمية أشباه الكاروتينات , وبلغت الإنتاجية أقصاها عند درجة pH تساوي 5 , كما ترتفع كمية أشباه الكاروتينات ارتفاعاً ملحوظاً بزيادة درجة الحرارة لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 30° م ثم تعود كمية أشباه الكاروتينات للانخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند 40° م وكانت العلاقة ما بين درجة الحرارة ودرجة الحموضة معنوية في كمية أشباه الكاروتينات.



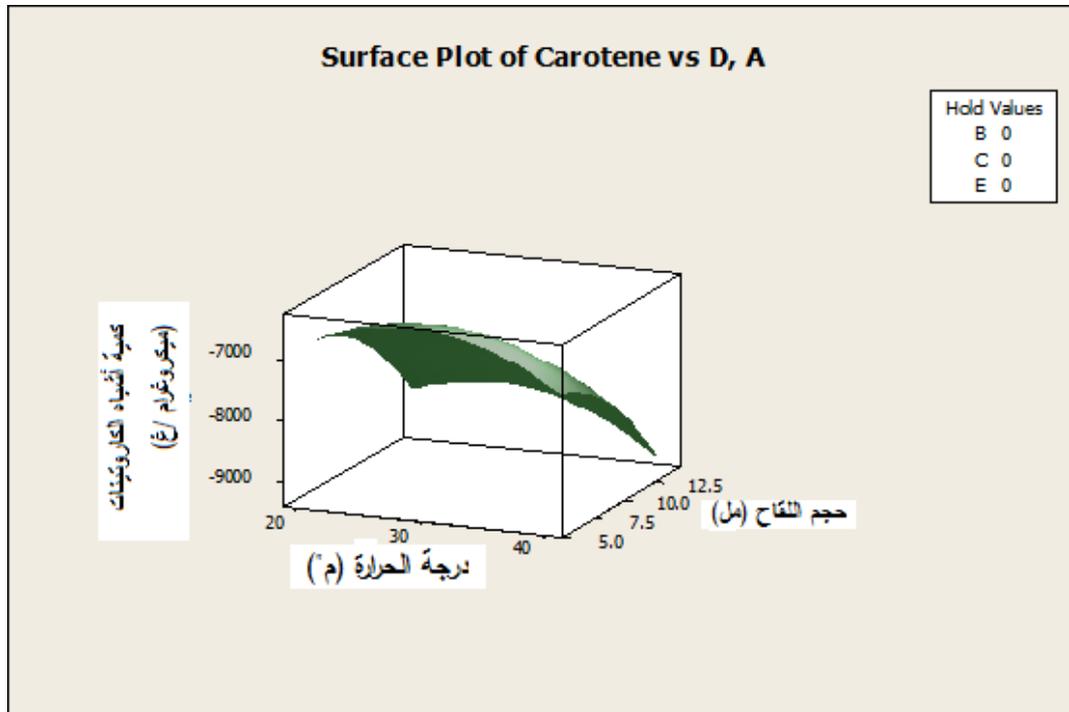
الشكل (12) : تأثير pH ودرجة الحرارة في كمية أشباه الكاروتينات

يبين الشكل (13) تأثير اثنين من المتغيرات (درجة الحرارة ومدة التحضين) في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة مع تثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن كمية أشباه الكاروتينات تزداد تدريجياً بازدياد مدة التحضين لتصل إلى أقصى قيمة لها عند التحضين لمدة 4 أيام ثم تعود كمية أشباه الكاروتينات للانخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند التحضين لمدة 5 أيام, كما وتزداد كمية أشباه الكاروتينات بازدياد درجة الحرارة لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 30° م, ثم تعود الإنتاجية للانخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند 40° م وكانت العلاقة ما بين درجة الحرارة ومدة التحضين معنوية في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة.



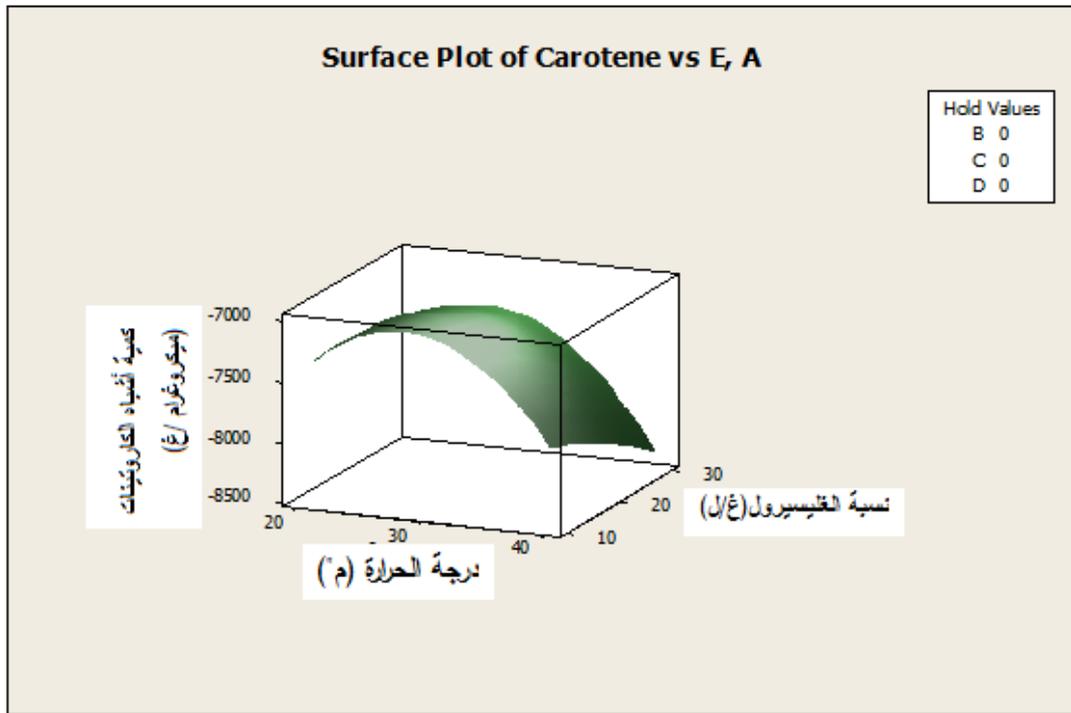
الشكل (13) : تأثير درجة الحرارة ومدة التحضين في كمية أشباه الكاروتينات

يبين الشكل (14) تأثير اثنين من المتغيرات (درجة الحرارة و حجم اللقاح) في كمية أشباه الكاروتينات مع تثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن كمية أشباه الكاروتينات المنتجة لم تتأثر كثيراً بزيادة حجم اللقاح نظراً لأن تأثيرها غير معنوي في كمية الإنتاج, بينما ترتفع الإنتاجية ارتفاعاً ملحوظاً بزيادة درجة الحرارة لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 30° م ثم تعود الإنتاجية للانخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند 40° م وكانت العلاقة ما بين درجة الحرارة وسرعة التهوية غير معنوية في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة.



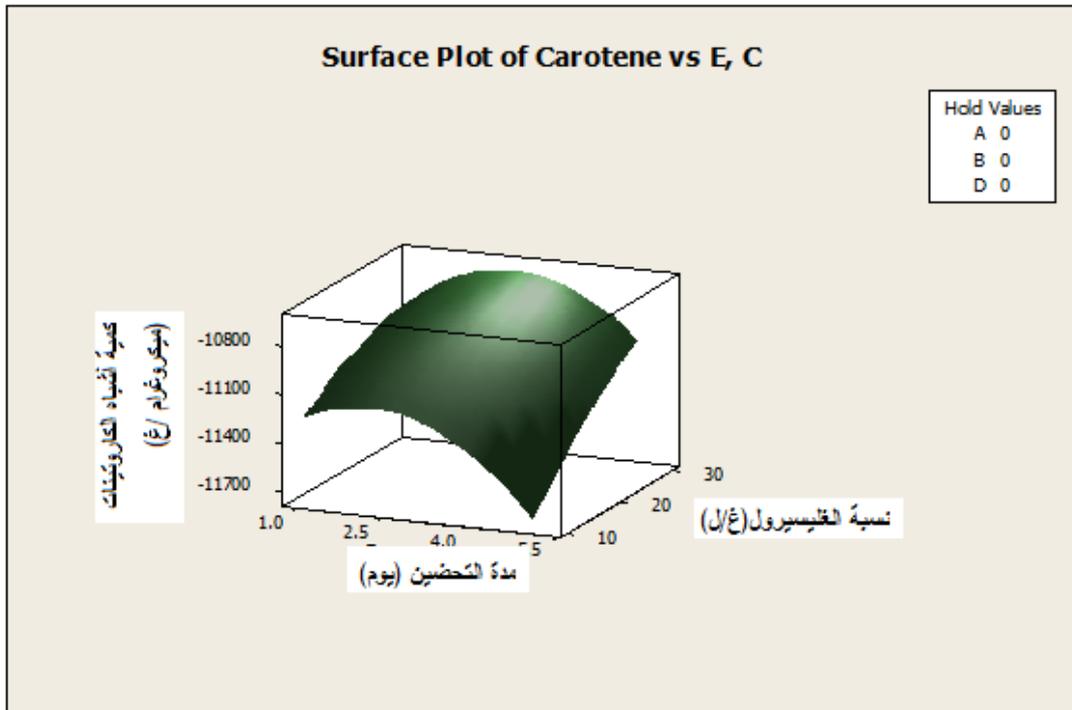
الشكل (14): تأثير درجة الحرارة وحجم اللقاح في كمية أشباه الكاروتينات

يبين الشكل (15) تأثير اثنين من المتغيرات (درجة الحرارة تركيز الغليسيرول) في كمية أشباه الكاروتينات مع تثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن كمية أشباه الكاروتينات لم تتأثر كثيراً بزيادة نسبة الغليسيرول لأن تأثيرها غير معنوي في الإنتاجية , في حين تزداد كمية أشباه الكاروتينات بازياد درجة الحرارة لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 30° م ثم تعود كمية أشباه الكاروتينات للانخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند 40° م وكانت العلاقة ما بين درجة الحرارة ونسبة الغليسيرول غير معنوية في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة.



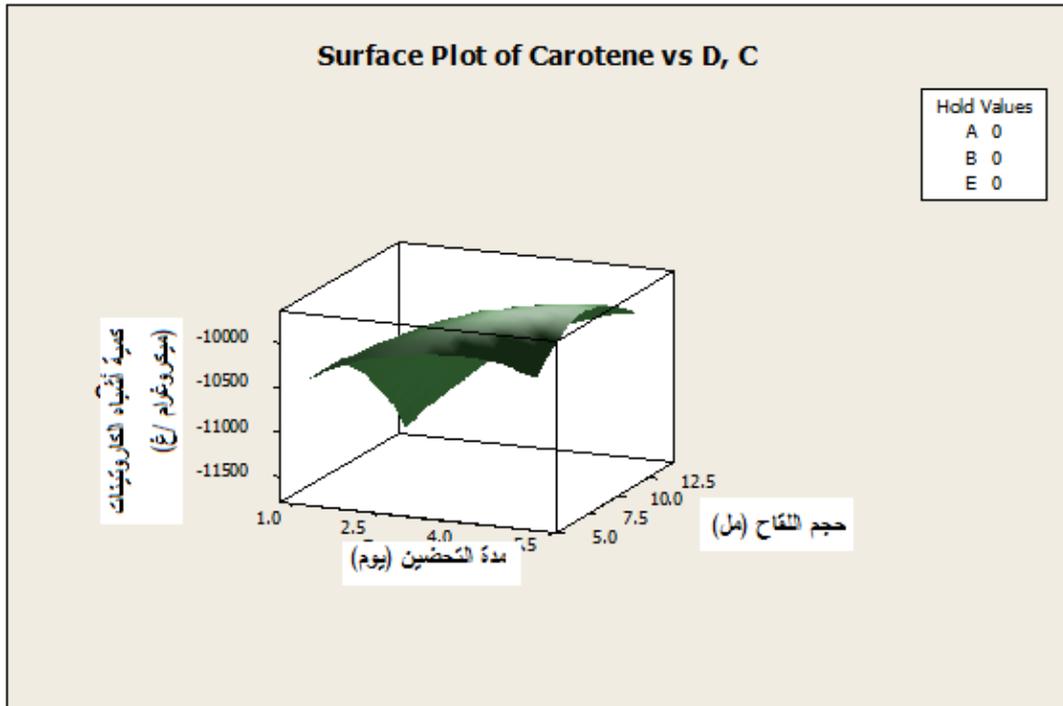
الشكل (15) : تأثير درجة الحرارة ونسبة الغليسيرول في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة

يبين الشكل (16) تأثير اثنين من المتغيرات (مدة التحضين ونسبة الغليسيرول) في كمية أشباه الكاروتينات مع تثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن كمية أشباه الكاروتينات لا تتأثر كثيراً بارتفاع نسبة الغليسيرول لأن تأثيرها غير معنوي في إنتاج أشباه الكاروتينات. كما أن كمية أشباه الكاروتينات لا تتأثر كثيراً بارتفاع بازدياد مدة التحضين لأن تأثيرها غير معنوي أيضاً في إنتاج أشباه الكاروتينات. بلغت الإنتاجية أقصى قيمة لها عند مدة تحضين 4 أيام و ثم عادت للانخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند التحضين لمدة 5 أيام , والعلاقة بين نسبة الغليسيرول ومدة التحضين غير معنوية في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة.



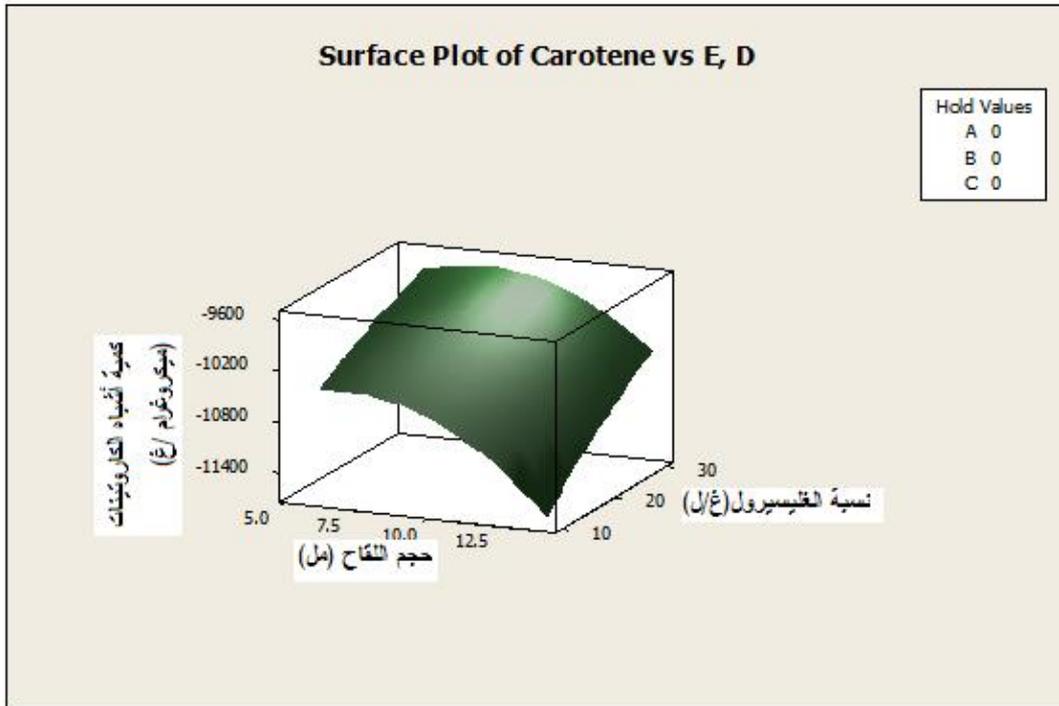
الشكل (16) : تأثير مدة التحضين ونسبة الغليسيرول في كمية أشباه الكاروتينات

يبين الشكل (17) تأثير اثنين من المتغيرات (مدة التحضين حجم اللقاح) في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة مع تثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن كمية أشباه الكاروتينات لا تتأثر كثيراً بزيادة مدة التحضين وبلغت الإنتاجية أقصى قيمة لها عند التحضين لمدة 4 أيام, كما لم تتأثر كمية أشباه الكاروتينات المنتجة كثيراً بزيادة حجم اللقاح نظراً لأن تأثيرها غير معنوي في الإنتاجية, والعلاقة بين مدة التحضين وحجم اللقاح كانت معنوية في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة.



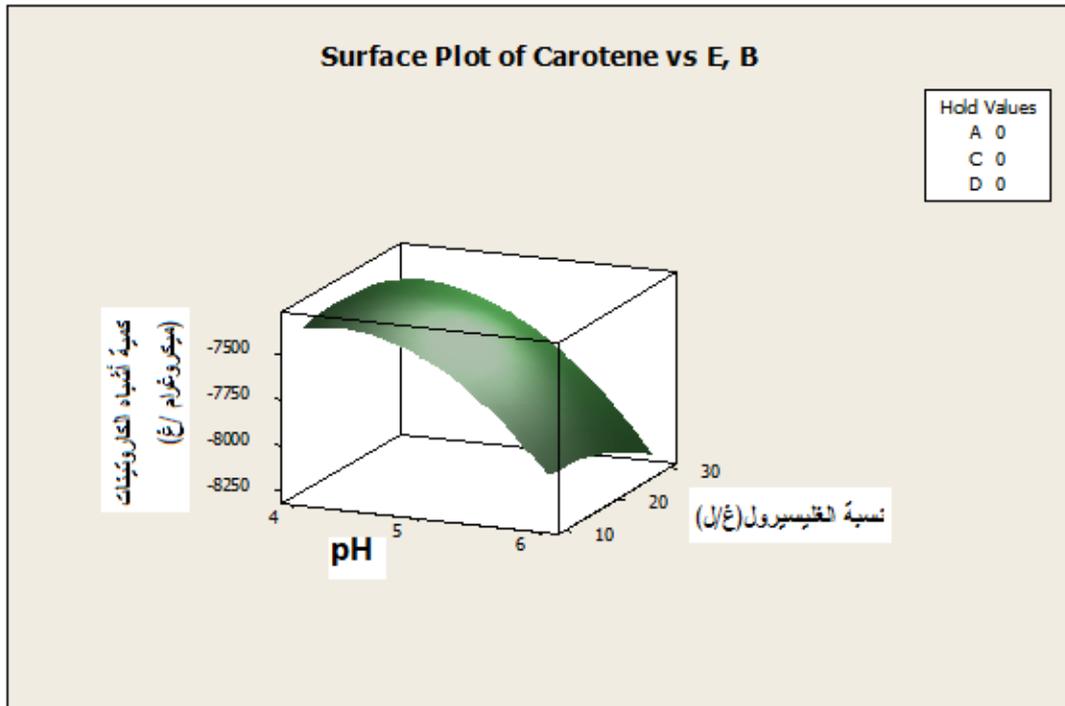
الشكل (17) : تأثير مدة التحضين حجم اللقاح في كمية أشباه الكاروتينات

يبين الشكل (18) تأثير اثنين من المتغيرات (نسبة الغليسيرول وحجم اللقاح) في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة مع تثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن كمية أشباه الكاروتينات لا تتأثر كثيراً بازدياد نسبة الغليسيرول وبلغت أقصى إنتاجية ممكنة عند استخدام 30 غ/ل من الغليسيرول, كما لم تتأثر كمية أشباه الكاروتينات كثيراً بازدياد حجم اللقاح نظراً لأن تأثيرها غير معنوي في الإنتاجية, وبلغت الإنتاجية حدها الأقصى عند حجم لقاح 12 مل/ل والعلاقة بين نسبة الغليسيرول وحجم اللقاح غير معنوية في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة.



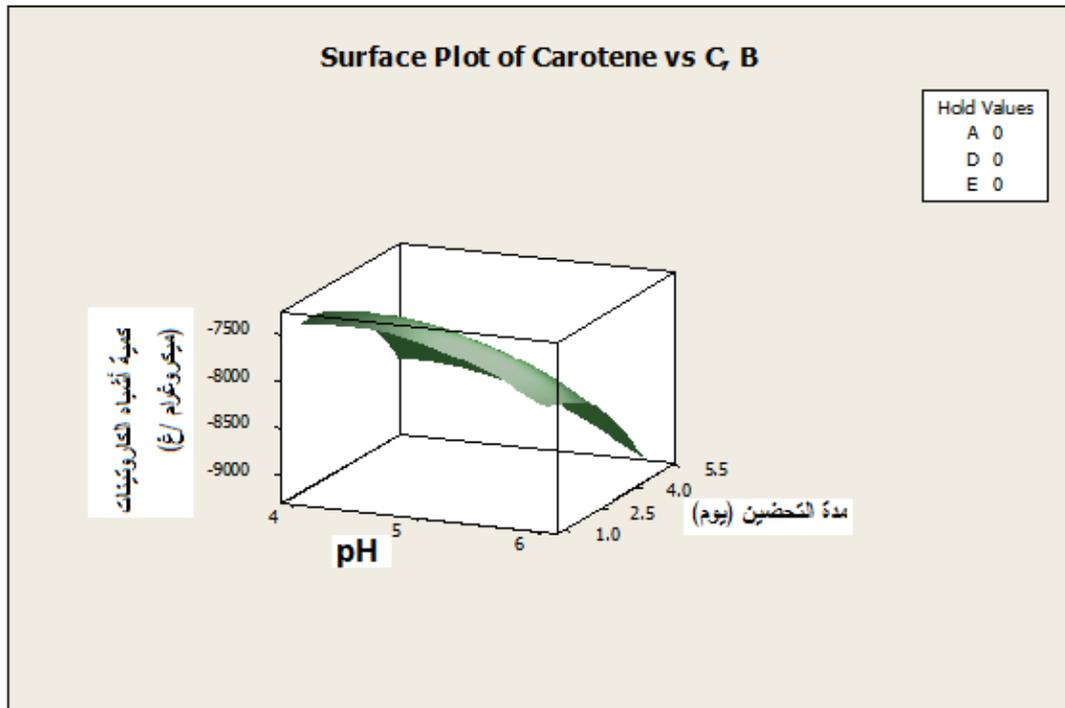
الشكل (18) : تأثير نسبة الغليسيرول و حجم اللقاح في كمية أشباه الكاروتينات

يبين الشكل (19) تأثير اثنين من المتغيرات (نسبة الغل يسيروول و pH) في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة مع تثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن كمية أشباه الكاروتينات لا تتأثر كثيراً بزيادة نسبة الغليسيرول وبلغت أقصى إنتاجية ممكنة عند استخدام 30 غ/ل من الغليسيرول, بينما نلاحظ من الشكل أن كمية أشباه الكاروتينات تتأثر بارتفاع درجة الحموضة pH نظراً لأن تأثيرها معنوي في كمية أشباه الكاروتينات , وبلغت الإنتاجية أقصاها عند درجة pH تساوي 5 , والعلاقة بين نسبة الغليسيرول ودرجة الحموضة غير معنوية في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة.



الشكل (19): تأثير نسبة الغليسيرول و pH في كمية أشباه الكاروتينات

يبين الشكل (20) تأثير اثنين من المتغيرات (مدة التحضين و pH) في كمية أشباه الكاروتينات مع تثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن كمية أشباه الكاروتينات لا تتأثر كثيراً بزيادة مدة التحضين وبلغت الإنتاجية أقصى قيمة لها عند التحضين لمدة 4 أيام , في حين تزداد كمية أشباه الكاروتينات بارتفاع درجة الحموضة pH نظراً لأن تأثيرها معنوي في كمية أشباه الكاروتينات , وبلغت الإنتاجية أقصاها عند درجة pH تساوي 5 , والعلاقة بين مدة التحضين ودرجة الحموضة معنوية في كمية أشباه الكاروتينات المنتجة.



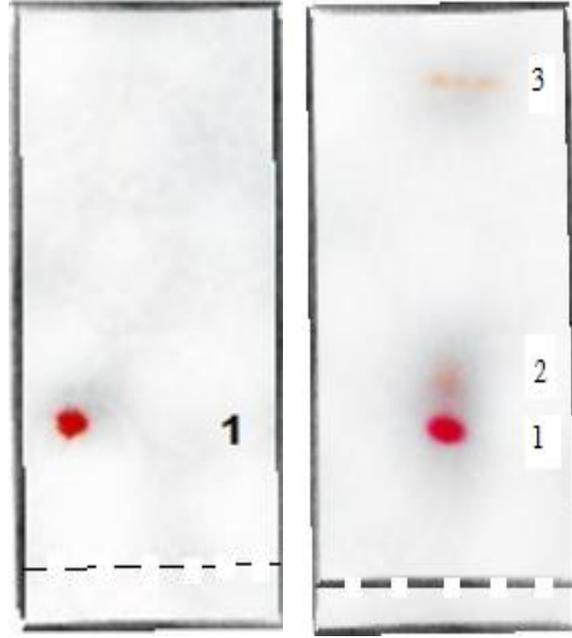
الشكل (20) : تأثير مدة التحضين و pH في كمية أشباه الكاروتينات

4 9 - فصل أشباه الكاروتينات :

4 9 1 - فصل أشباه الكاروتينات باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC :

طبقت تجربة TLC على كل من العزلة الأصلية *R.mucilaginosa* (A24) والطفرة *R.mucilaginosa* (A24-M) فتيين من ارتحال الملون المستخلص منهما أن العزلة الأصلية تتكون من ثلاثة ملونات حيث أعطت ثلاثة بقع لونية على السيلكا جيل بأزمنة مختلفة عند استخدام (إيثر البترول :الاسيتون) (80:20 ح/ح) كطور متحرك وهي بيتا كاروتين (β -Carotene) بقيمة $R_f = 0.9$ وتوربولين (Torulene) بقيمة $R_f = 0.3$ وتوريولارهودين (Torularhodin) بقيمة $R_f = 0.2$ وهذا يوافق ما ذكره Johnson و Schroeder (1996) من أن المستخلص اللوني الناتج عن خميرة *R. glutinis* DFR-PDY أعطى ثلاثة بقع لونية، بينما لم تعط الطفرة *R.mucilaginosa* (A24-M) إلا ملون واحد بارتحاليها على السيلكا جيل وهو توريولارهودين (Torularhodin) بقيمة $R_f = 0.2$ بارتحاليها على السيلكا جيل وباستخدام نفس الطور المتحرك . وهذا يدل على أن عملية التطهير بالأشعة فوق البنفسجية أثرت في أنواع الملونات التي تنتجها الخميرة *R.mucilaginosa*. بالنتيجة نقول أن عملية التطهير أثرت في نوعية أشباه الكاروتينات المنتجة ولم تعد الخميرة قادرة على إنتاج ثلاثة ملونات وإنما ملون واحد نحصل عليه بالتنقية عند إضافة المذيب (حمض الخل مع إيثر ايثيلي)، وهذا يدل على أن كل ملون مسؤولة عن إنتاجه مورثة وعند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية تأثرت المورثة المسؤولة عن إنتاج التوربولين (Torulene) والمورثة المسؤولة عن إنتاج بيتا كاروتين (β -Carotene) ففقدت الخميرة المطفرة قدرتها على إنتاج هذين الملونين ، في حين لم تتأثر المورثة المسؤولة عن إنتاج التوريولارهودين (Torularhodin) عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية

وبالتالي استمرت الخميرة في إنتاجها بعد التطهير . ويبين الشكل (21) عملية ارتحال الملون المستخلص من كل من العزلة الأصلية والطفرة على لوح السيلكا جيل .



(ب)

(أ)

1 توريولارهودين (Torularhodin) $R_f = 0.2$, 2 توريولين (Torulene) $R_f = 0.3$, 3 بيتا كاروتين (β -Carotene) $R_f = 0.9$

الشكل (21) : ارتحال المستخلص من العزلة الأصلية (أ) والطفرة (ب) على لوح السيلكا جي

فصل Yehia وزملائه (2014) أشباه الكاروتينات المستخلصة من خميرة *R. glutinis*

باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC على لوح السيلكا جيل 60A وباستخدام

الهكسان :ايثيل أسيتات (1:7) كطور متحرك وتم التعرف على الملونات من خلال قياس قيمة

R_f فكانت نتيجة الفصل ثلاثة بقع لونية هي بيتا كاروتين (β -Carotene) بلون أصفر

وتوريولين (Torulene) بلون برتقالي و توريولارهودين (Torularhodin) بلون أحمر وكانت

قيم R_f هي (0.64, 0.55 و 0.06 على التوالي) , وهذا تشابه مع ماتوصل إليه Banzatto

وزملائه (2013) حيث استخدموا تولوين : ايثر البترول بنسبة 9:1 ح/ح و تولوين : أسيتون: ميثانول بنسبة 75:20:5 ح/ح/ح كطور متحرك لفصل أشباه الكاروتينات المستخلصة من خميرة *R. rubra* إلى ثلاثة بقع لونية وهي هي بيتا كاروتين (β -Carotene) بلون أصفر وتوريولين (Torulene) بلون برتقالي وتوريولارهودين (Torularhodin) بلون أحمر على لوح السيلكا جيل 60G وهذا يماثل ما توصل إليه Park وزملائه (2007) حيث فصلت الملونات الثلاثة السابقة نفسها من مستخلص أشباه الكاروتينات من خميرة *R. glutinis* باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC على لوح السيلكا جيل 60A والطور المتحرك هكسان: أسيتون بنسبة 3:7 ح/ح . بينما فصل Abd El-razek وزملائه (2004) أشباه الكاروتينات إلى ثلاثة بقع لونية هي بيتا كاروتين (β -Carotene) بلون أصفر وتوريولين (Torulene) بلون برتقالي وتوريولارهودين (Torularhodin) بلون أحمر باستخدام داي ايثيل ايثر 25% في ايثر البترول (40-60)°م وعلى لوح السيلكا جيل 60G وبأزمنة فصل مختلفة حيث كانت قيم Rf (0.93, 0.60 و 0.25 على التوالي) , في حين تم الحصول على أربعة بقع لونية من نفس المستخلص اللوني عند استخدام بنزن 5 % في ايثر البترول (80-100)°م كطور متحرك على لوح السيلكا جيل 60G وهي بيتا كاروتين (β -Carotene) بلون أصفر وتوريولين (Torulene) بلون برتقالي ومماكب التوريولين بلون زهري وتوريولارهودين (Torularhodin) بلون أحمر و بقيم Rf (0.95, 0.18, 0.27 على التوالي). كما تمكن Perrier وزملائه (1995) من فصل واحد إلى عشرة بقع لونية من أشباه الكاروتينات المستخلصة من إحدى سلالات *Rhodotorula* باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC . أظهرت نتيجة الكشف عن أشباه الكاروتينات المستخلصة من خميرة *R. glutinis* باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC على لوح السيلكا جيل 60A بقعتان لونيتان تختلفان باختلاف الطور المتحرك

المستخدم , فعند استخدام ايثر البترول : البنزن بنسبة 95:5 أعطى المستخلص اللوني بقعتين لونيتين بلون أصفر وبرتقالي وبقيمة R_f 0.9 و 0.7 على التوالي . بينما اختلفت البقعان اللونيتان عند تغيير نسبة المذيبان في الطور المتحرك ايثر البترول : البنزن إلى 95:5 لتصبجان بلون زهري وأحمر وبقيمة R_f 0.4 و 0.94 على التوالي (Latha *et al.*, 2005).

تميز التوربولارهودين (Torularhodin) عن البيتا كاروتين (β -Carotene) والتوربولين (Torulene) بارتحاله البطيء على السيلكا جيل وهذا يعود إلى مجموعة الكربوكسيل الموجودة في نهاية الجزيء والتي تعطيه خصائص قطبية تجعله أكثر انجذاباً تجاه السيلكا جيل وبالتالي أبطء ارتحاله مقارنة مع الملونين الآخرين (Park *et al.*, 2007) .

4 9 2 - تنقية أشباه الكاروتينات:

نقيت أشباه الكاروتينات المستخلصة من الخميرة المطفرة *R.mucilaginosa* (A24-M) باستخدام عمود التنقية, حيث مرر 2 مل من المستخلص بعد تركيزه وتبخيره بالآزوت السائل وبعد تجاوزه طبقة سلفات الصوديوم اللامائية أضيف أول مذيب وهو ايثر البترول فلم تنفصل أي حزمة لونية , ثم أضيف ثاني مذيب وهو (ايثر ايثيلي وميثانول) فلم تنفصل أي حزمة لونية أيضاً. ولكن عند إضافة المذيب الثالث وهو (حمض الخل مع ايثر ايثيلي) فصلت حزمة لونية حمراء اللون تم استقبالها في أنبوب زجاجي أسفل عمود التنقية وحسب

(Latha and Jeevaratnam, 2010) فإن هذه الحزمة اللونية المنقاة هي التوربولارهودين Torularhodin. بالنتيجة نقول أن عملية التطهير أثرت في نوعية أشباه الكاروتينات المنتجة

ولم تعد الخميرة قادرة على إنتاج ثلاثة ملونات وإنما ملون واحد نحصل عليه بالتقنية عند إضافة المذيب (حمض الخل مع ايثر ايثيلي).

استخدمت مادتي Hyflo Super Cel و أوكسيد المغنيزيوم بنسبة (1:2 و/و) في عملية تنقية أشباه الكاروتينات المستخلصة من خميرة *R. glutinis* DFR-PDY أيضاً بعد تجفيفها بالحرارة ورسها في عمود الفصل الزجاجي بشكل جيد, ففصلت أشباه الكاروتينات إلى ثلاثة أجزاء لونية الأصفر (β -Carotene), والبرتقالي (Torulene) والأحمر (Torularhodin) باستخدام ايثر البترول , ايثر ايثيلي وميثانول (1:10) و حمض الخل وايثيل ايثر (10:1) على التوالي (Latha and Jeevaratnam, 2010). كما اتبعت نفس الطريقة في عملية تنقية أشباه الكاروتينات المستخلصة من خميرة *R. glutinis* 48-23T ولكن باستخدام مذيبات مختلفة وهي ايثر البترول , ايثيل ايثر والميثانول على التوالي (Simpson *et al.*, 1964).

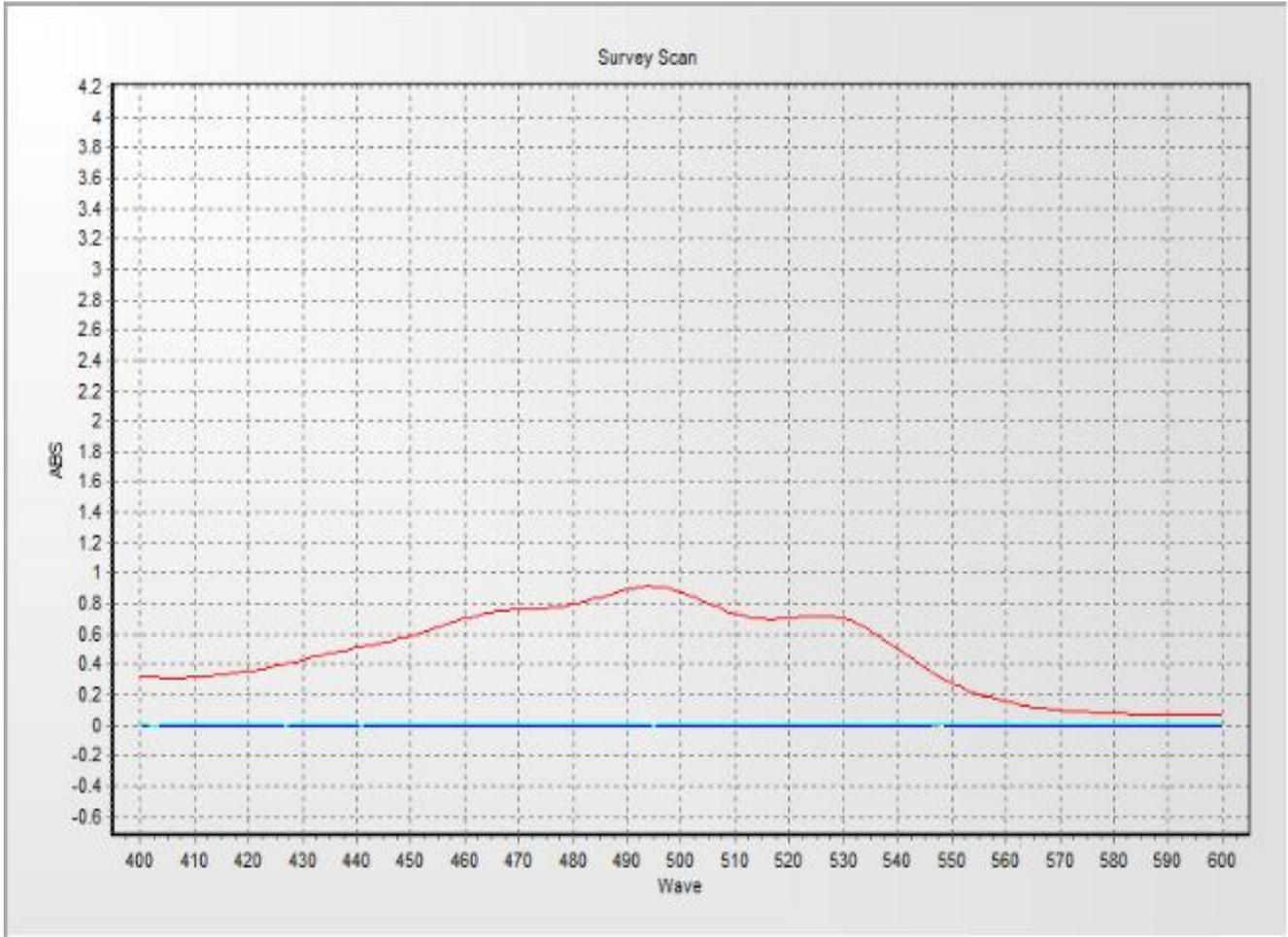
3 9 4 - التعرف على أشباه الكاروتينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي :

تم إجراء عملية مسح طيفي للمستخلص اللوني الناتج عن خميرة *R.mucilaginosa* (A24-M) فأعطت أعلى قمة طيفية عند طول موجة 495 نانومتر وهذا ما يوضحه الشكل (22) , وذلك بهدف استخدام طول الموجة المحدد لاحقاً في جهاز كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC للكشف عن أشباه الكاروتينات . في حين كانت أعلى قمة طيفية ناتجة عن المستخلص اللوني من خميرة *R.mucilaginosa* N22 و *R.laryngis* N23 تتراوح بين 280 و 300 نانومتر (Amaretti *et al.*, 2014). وفي دراسة أخرى أعطت أشباه الكاروتينات الثلاثة بينا كاروتين (β -Carotene) , تورولين (Torulene) وتورولارهودين

(Torularhodin) بالمسح الطيفي أعلى قمة عند طول موجة (452 , 485 و 515 نانومتر) على التوالي (Radulescu et al.,2009).

تم التعرف على الملونات المستخلصة من خميرة *R.glutinis* بالاعتماد على مقياس الطيف الضوئي فتبين أن بيتا كاروتين وهو المركب الأقل قطبية أعطى أعلى امتصاصية على طول موجة 450 نانومتر , يليه في القطبية ملون التوريولين الذي أعطى أعلى امتصاصية على طول موجة 484 نانومتر , بينما التوريولارهودين الذي تميز بأنه الأعلى قطبية بين الملونات الثلاثة المستخلصة أعطى أعلى امتصاصية على طول موجة 501 نانومتر (Park et al., 2007) .

أعطى مستخلص أشباه الكاروتينات من خميرة *Rhodotorula sp.* أعلى امتصاصية على طول موجة 501 نانومتر وهذا يشير إلى ارتفاع نسبة التوريولارهودين في هذا المستخلص والذي تنتجه عادة سلالات مختلفة من خميرة *Rhodotorula sp* بكميات مرتفعة (Ananda and Vadlani, 2010) .



الشكل (22) : مسح طيفي للمستخلص اللوني الناتج عن *R.mucilaginosa* (A24-M)

4 9 4 - التعرف على أشباه الكاروتينات باستخدام مطيافية تحويل فورييه للأشعة تحت

الحمراء FTIR:

يمثل الشكل (23) الطيف الذي يعطيه جهاز FTIR للمستخلص اللوني الناتج عن الخميرة

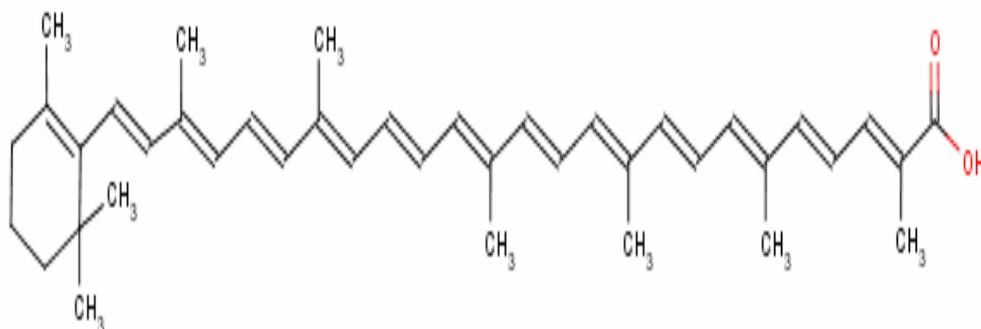
المطفرة *R.mucilaginosa* (A24-M) وذلك بعد تنقيته. نلاحظ من الشكل وجود قمة

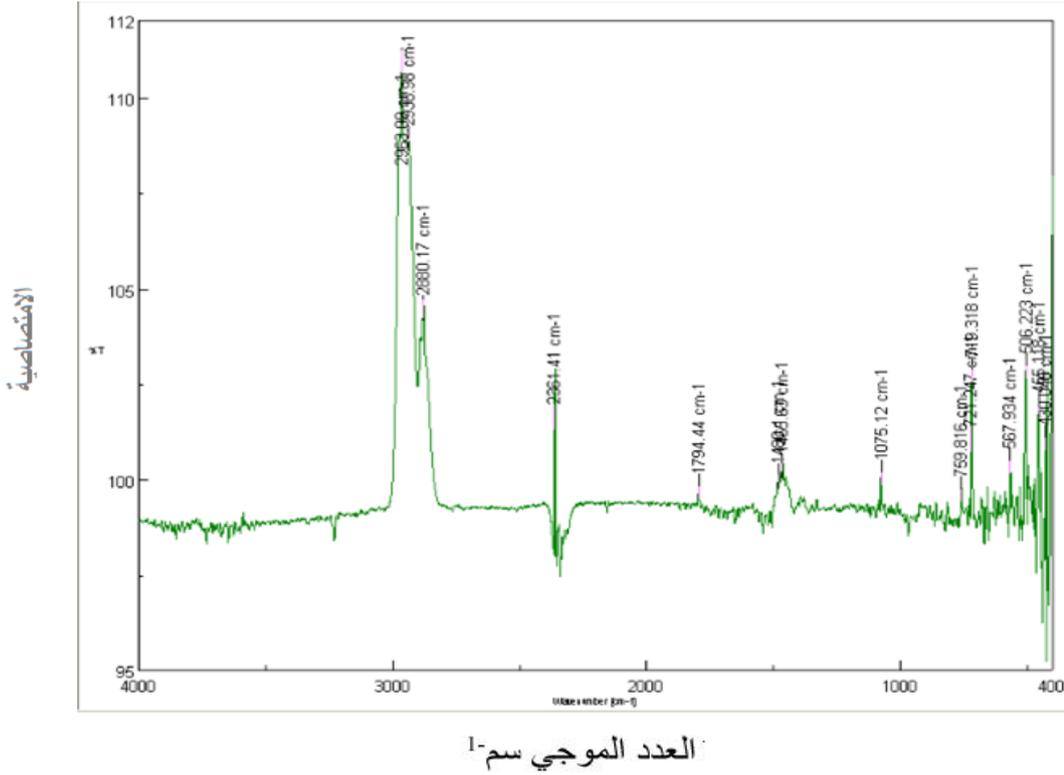
واضحة للطيف عند 2963 سم⁻¹ و 2938 سم⁻¹ (أي في المجال ما بين 2900 و 3500

سم⁻¹) وهذه تعود إلى وجود الرابطة O-H ضمن المركب وكما هو معروف يتميز

التوربولارهودين باحتوائه على مجموعة الكربوكسيل ومن السهل التعرف عليها من خلال تواجد

مجموعة الهيدروكسيل (Mihalcca *et al.*, 2011), كما نلاحظ وجود قمة أخرى عند العدد الموجي 2880 سم⁻¹ ناتجة عن اهتزازات مط الروابط الهيدروجينية في مجموعة C-H (Naumann *et al.*, 1991). أما القمة 2261 سم⁻¹ فهي تقع ضمن مجال الحزم (2000-2300) سم⁻¹ التي تعود إلى اهتزازات المط الخاصة بمجموعة C=C في المركب (Reuhs and Mauer, 2010). كما نلاحظ من الشكل وجود قمة عند العدد الموجي 1794 سم⁻¹ الواقعة ضمن مجال الحزم (1715-1740) سم⁻¹ التي تعود إلى الاهتزازات الناتجة عن تمدد C=O في المركب، والقمة 1075 سم⁻¹ تعود إلى الاهتزازات الناتجة عن الرابطة C-C (Naumann *et al.*, 1991). بالرجوع إلى التركيب الكيميائي لأشباه الكاروتينات ومقارنة الروابط التي كشفنا عنها بمطيافية FTIR مع روابط مركبات أشباه الكاروتينات نجد أن المركب هو التوريولارهودين الذي يتميز بالتركيب الكيميائي التالي:





الشكل (23) : الطيف التي يعطيها جهاز FTIR للمستخلص اللوني الناتج عن الخميرة

R. mucilaginosa (A24-M) وذلك بعد تنقيته

4 9 5 - فصل أشباه الكاروتينات باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC

تعتبر تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC من أهم طرائق الفصل

المستخدمة للتعرف على أشباه الكاروتينات فهي طريقة حساسة و سريعة حيث لا يستغرق

الكشف عن أشباه الكاروتينات أكثر من (10-45 دقيقة) (Taylor et al., 1993).

يمثل الشكل (24) الطيف الذي يعطيه جهاز HPLC للمستخلص اللوني الناتج عن

الخميرة المطفرة (*R. mucilaginosa* (A24-M) وذلك بعد تنقيته. حيث يلاحظ من الشكل بلأن

القمة الوحيدة التي ظهرت كانت بطول موجة امتصاص 495 نانومتر وبزمن امسك 2.7

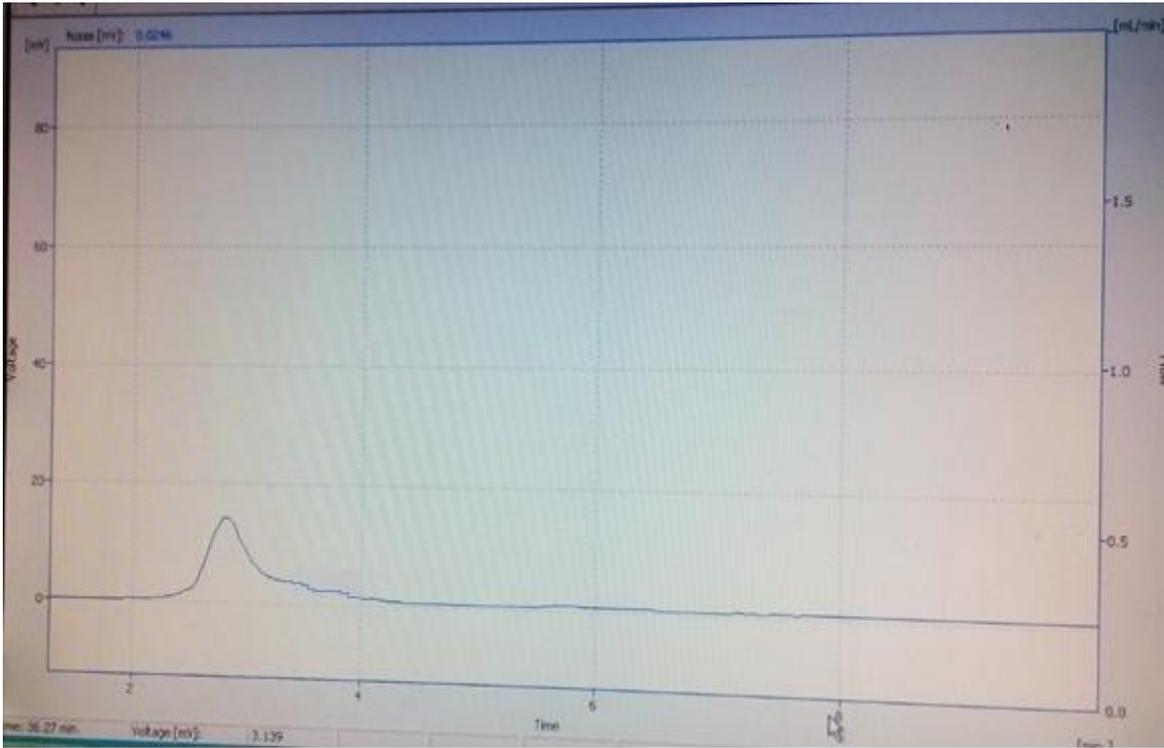
دقيقة, ولدى متابعة التحليل لم يتم ظهور أي قمم اخرى مما يدل على ان الطفرة

R.mucilaginosa (A24-M) أعطت ملونا وحيدا فقط وهذا يوافق ما توصلنا إليه في تجربة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC حيث أعطى المستخلص اللوني الناتج عن الخميرة المطفرة *R.mucilaginosa* (A24-M) ملون واحد بارتحاله على السيلكا جيل.

وبالمقارنة مع الدراسات المرجعية تبين أن الملون هو التوريولارهودين *Torularhodin*. ففي دراسة أجراها Bhosale و Gader (2001) على أشباه الكاروتينات المستخلصة من *R. glutinis* أعطت ثلاثة قمم كروماتوغرافية هي توريولارهودين *Torularhodin*, توريولين (Torulene) و بيتا كاروتين (β -Carotene) بأزمنة إمساك 2.39, 3.39 و 3.49 على التوالي , وتشابهت هذه النتيجة تقريبا مع Yehia وزملائه (2013) حيث أعطت أشباه الكاروتينات المستخلصة من *R. glutinis* نفس القمم الكروماتوغرافية لكن بأزمنة إمساك بلغت 2.27 , 3.21 و 3.64 على التوالي . أعطى مستخلص أشباه الكاروتينات من خميرة *R.rubra* ICC F220 قمة كروماتوغرافية واضحة عند موجة امتصاص 494 نانومتر وهذا يدل على أن القمة تعود إلى التوريولارهودين حسب (Radulescu *et al.*,2009) .

تم تحليل المزيج اللوني المستخلص من خميرة *R. glutinis* باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC حيث أعطى ثلاثة قمم وهي β -Carotene, Torulene و *Torularhodin* عند الأزمنة 2.27, 3.21 و 3.64 دقيقة على التوالي. كما حصل Bhosal و Gadre (2001) على ثلاثة قمم تشير إلى وجود ثلاثة ملونات وهي β -Carotene, Torulene و *Torularhodin* بأزمنة 2.39, 3.39 و 3.49 دقيقة على التوالي, وهذا يشابه أيضاً ما توصل إليه Perrier وزملائه (1995). استخدم Frengova وزملائه (1994) أيضاً تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC لفصل مكونات الملون المستخلص من خميرة *R. mucilaginousa* فتبين أنه يتكون من ثلاثة ملونات وهي

β-Carotene, Torulene و Torularhodin . بينما تم التعرف على مكونات الملون المستخلص من خميرة *R. glutinis* DFR-PDY بعد تنقيتها باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي والحصول على ثلاثة ملونات نقية بلون أصفر , برتقالي وأحمر , تم الكشف عنها باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC والعمود RP-C18 و الطور المتحرك المؤلف من أسيتون نتريل: تيتراهيدروفوران: ماء (50 : 38.5 : 11.5 ح/ح/ح) وعند تدفق 1 مل / دقيقة , فتبين أن اللون الأصفر هو β-Carotene وزمن فصله 0.9 واللون البرتقالي هو Torulene ويزمن فصل 0.7 واللون الأحمر هو Torularhodin ويزمن فصل 0.6 (Latha and Jeevaratnam, 2010).



الشكل (24) الطيف الذي يعطيه جهاز HPLC للمستخلص اللوني الناتج عن الخميرة المطهرة *R.mucilaginosa* (A24-M) وذلك بعد تنقيته

4 9 6 - دراسة ثباتية أشباه الكاروتينات في الزيوت النباتية :

درست ثباتية أشباه الكاروتينات المنتجة من الخميرة المطفرة (*R.mucilaginosa*(A24-M) في ثلاثة زيوت نباتية مختلفة لمدة 30 يوم من التخزين وهي (زيت السمسم , زيت دوار الشمس وزيت الفول السوداني) على درجة حرارة الغرفة وبوجود الضوء وبغيابه وباستخدام ثلاثة تخافيف مختلفة من أشباه الكاروتينات (50 , 100 , 1000) ميكروليتر وقيست الامتصاصية باستخدام المطياف الضوئي على طول موجة 450 نانومتر, واستخدمت ANOVA لتحليل المعطيات حسب الجدول (20).

الجدول (20): التحليل الاحصائي لثباتية أشباه الكاروتينات في الزيوت النباتية حسب

ANOVA

المتوسط الحسابي \pm الانحراف المعياري						المعاملة
اليوم الثلاثون	اليوم الخامس عشر	اليوم السابع	اليوم الخامس	اليوم الثالث	اليوم الاول	
^l 0.002±0.093	^k 0.001±0.217	^j 0.001±0.222	^m 0.001±0.243	^l 0.001±0.254	^h 0.001±0.262	سمسم 50 ض
^f 0.001±0.077	^l 0.001±0.222	^m 0.001±0.252	ⁿ 0.001±0.265	^k 0.001±0.277	^j 0.001±0.281	سمسم 50 ظ
^j 0.001±0.100	^l 0.001±0.207	^k 0.001±0.227	^l 0.001±0.232	^l 0.001±0.253	^j 0.001±0.282	سمسم 100 ض
^k 0.001±0.122	^j 0.001±0.213	^m 0.001±0.253	^o 0.001±0.283	^l 0.001±0.295	^k 0.001±0.317	سمسم 100 ظ
^j 0.001±0.102	^l 0.001±0.208	^l 0.001±0.232	^m 0.001±0.242	^j 0.001±0.263	^l 0.001±0.271	سمسم 1000 ض
^k 0.002±0.121	^m 0.002±0.264	ⁿ 0.001±0.292	^p 0.001±0.313	^m 0.001±0.332	^l 0.001±0.342	سمسم 1000 ظ
^a 0.001±0.043	^b 0.001±0.087	^d 0.001±0.117	^c 0.001±0.123	^b 0.001±0.132	^b 0.001±0.133	فول سوداني 50 ض
^b 0.001±0.045	^d 0.001±0.097	^f 0.001±0.133	^e 0.001±0.144	^d 0.001±0.156	^d 0.001±0.171	فول سوداني 50 ظ
^g 0.001±0.083	^g 0.001±0.120	^h 0.001±0.154	^l 0.001±0.173	^l 0.001±0.186	^e 0.001±0.193	فول سوداني 100 ض
^h 0.001±0.088	^g 0.001±0.122	ⁱ 0.001±0.164	^j 0.001±0.182	^g 0.001±0.194	^f 0.001±0.212	فول سوداني 100 ظ
^h 0.001±0.064	^h 0.001±0.086	^h 0.001±0.153	^l 0.001±0.174	^l 0.001±0.187	^e 0.001±0.192	فول سوداني 1000 ض
^e 0.001±0.087	^b 0.001±0.124	^c 0.001±0.108	^k 0.001±0.213	^h 0.001±0.233	^g 0.001±0.243	فول سوداني 1000 ظ
^a 0.002±0.043	^c 0.001±0.094	^b 0.001±0.104	^a 0.001±0.108	^a 0.001±0.112	^a 0.001±0.121	دوار الشمس 50 ض
^c 0.001±0.052	^h 0.001±0.122	^f 0.001±0.133	^f 0.001±0.148	^d 0.001±0.156	^c 0.001±0.154	دوار الشمس 50 ظ
^d 0.001±0.057	^a 0.001±0.081	^e 0.001±0.124	^d 0.001±0.132	^c 0.001±0.144	^c 0.001±0.152	دوار الشمس 100 ض
^d 0.001±0.057	^e 0.001±0.106	^g 0.001±0.144	^g 0.001±0.157	^e 0.001±0.172	^d 0.001±0.173	دوار الشمس 100 ظ
^a 0.001±0.042	^b 0.001±0.087	^a 0.001±0.101	^b 0.001±0.112	^b 0.001±0.133	^c 0.001±0.153	دوار الشمس 1000 ض
^c 0.001±0.052	^f 0.001±0.112	^g 0.001±0.143	^h 0.001±0.162	^e 0.001±0.172	^e 0.001±0.192	دوار الشمس 1000 ظ

*ض: ضوء , ظ: ظلام

*تشير الحروف المختلفة ضمن الجدول إلى وجود فروق معنوية على مستوى ثقة 5%

4 7 1 - دراسة تأثير نوع الزيت :

تبين النتائج الموضحة في الجدول (20) تفوق زيت السمسم معنوياً بمختلف تراكيزه المستخدمة وخلال فترات التخزين المختلفة بدءاً من يوم واحد وحتى شهر في المحافظة على ثباتية أشباه

الكاروتينات يليه زيت الفول السوداني ثم زيت دوار الشمس وهذا يوافق

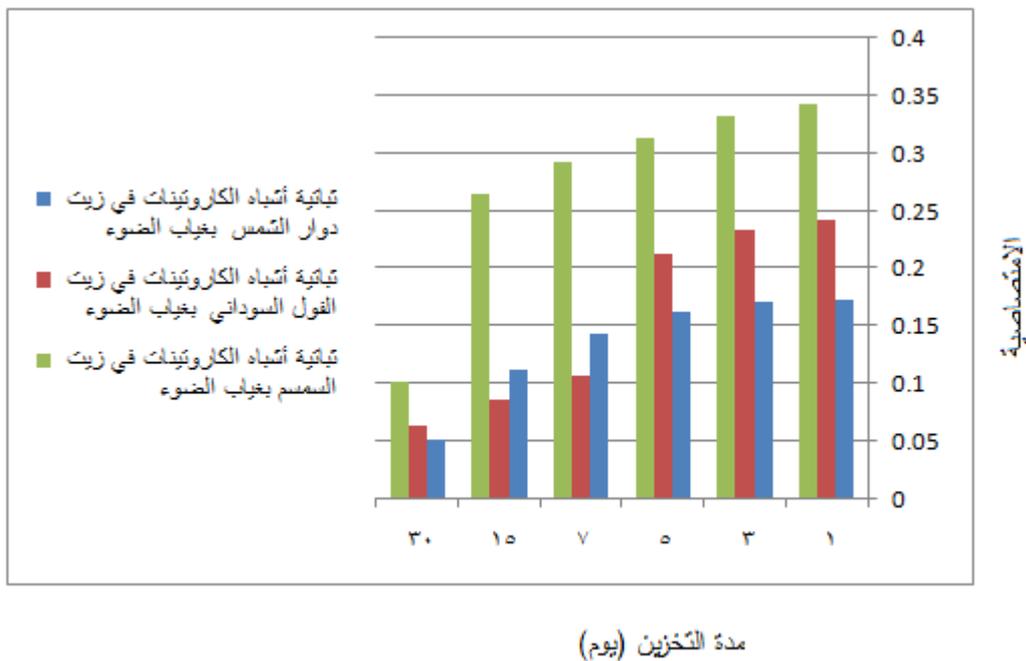
(Latha and Jeevaratnam, 2010) حيث كانت أشباه الكاروتينات أكثر ثباتية في زيت

السمسم يليه زيت الفول السوداني ثم زيت دوار الشمس ثم زيت النخيل وأخيراً زيت

القطن. ويوضح الشكل (25) تفوق زيت السمسم على الزيتين الآخرين في فترات التخزين المختلفة

وبغياب الضوء وهذا يعود إلى احتواءه نسبة أعلى من مضادات الاكسدة والاحماض الدهنية

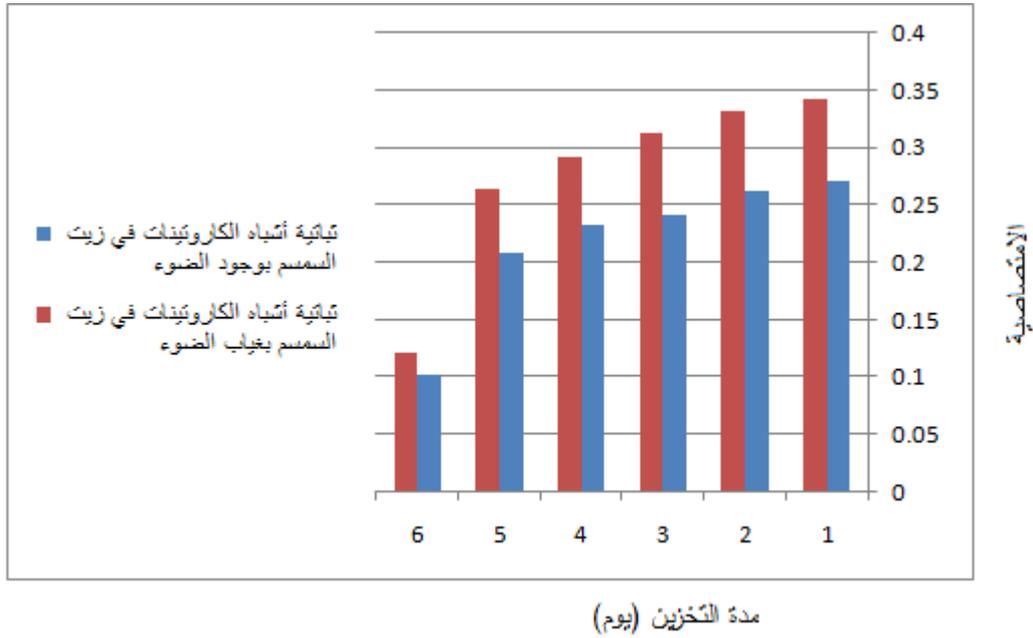
أحادية عدم الإشباع.



الشكل (25): ثباتية أشباه الكاروتينات في 3 أنواع من الزيوت بغياب الضوء

4 9 7 2 - دراسة تأثير الضوء:

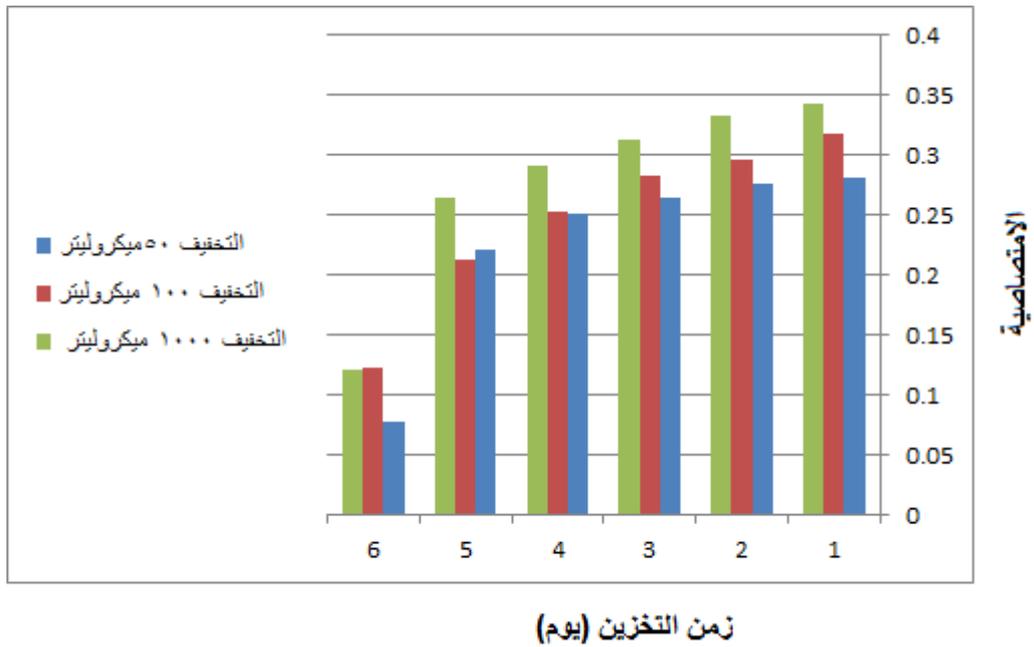
تبين النتائج الموضحة في الجدول (20) أن ثباتية أشباه الكاروتينات بغياب الضوء كانت أفضل مقارنة بثباتيتها بوجوده في جميع عينات الزيت وباختلاف فترات التخزين وبكافة التراكيز المستخدمة , ويبين الشكل (26) تفوق زيت السمسم معنوياً في المحافظة على ثباتية أشباه الكاروتينات بوجود الضوء خلال فترات التخزين المختلفة, وهذا أمر طبيعي حيث أن أشباه الكاروتينات حساسة للضوء وبالتالي فهي أقل استقراراً وثباتية عند تعرضها للضوء خلال تخزينها بالزيت مقارنة بثباتيتها في الظلام عند نفس درجة الحرارة , علاوة على ذلك فإن أشباه الكاروتينات المنتجة من الخمائر الملونة *Rhodotorula* تفقد خواصها الطبيعية عند تعرضها للضوء أو الحرارة أو الأوكسجين (Kauret al ., 2009).



الشكل (26): ثباتية أشباه الكاروتينات في زيت السمسم بغياب الضوء ووجوده

4 9 7 3 - دراسة تأثير تركيز الملون :

تبين النتائج الموضحة في الجدول (20) أن ثباتية أشباه الكاروتينات كانت أفضل عند إضافتها للزيوت بتركيز 1000 مل مقارنة بالتركيزين 100 مل و 50 ميكروليتر ,وهذا يوافق (Latha and Jeevaratnam, 2010) حيث ازدادت ثباتية أشباه الكاروتينات المستخلصة من خميرة *Rhodotorula glutinis*DFR-PDY والمضافة إلى الزيت بازدياد تركيزها المستخدم وكان التركيز 1000 ميكروليتر هو الأفضل. ويبين الشكل (27) تفوق التركيز 1000ميكروليتر لزيت السمسم على التركيزين الآخرين خلال فترات التخزين المختلفة وبغياب الضوء.

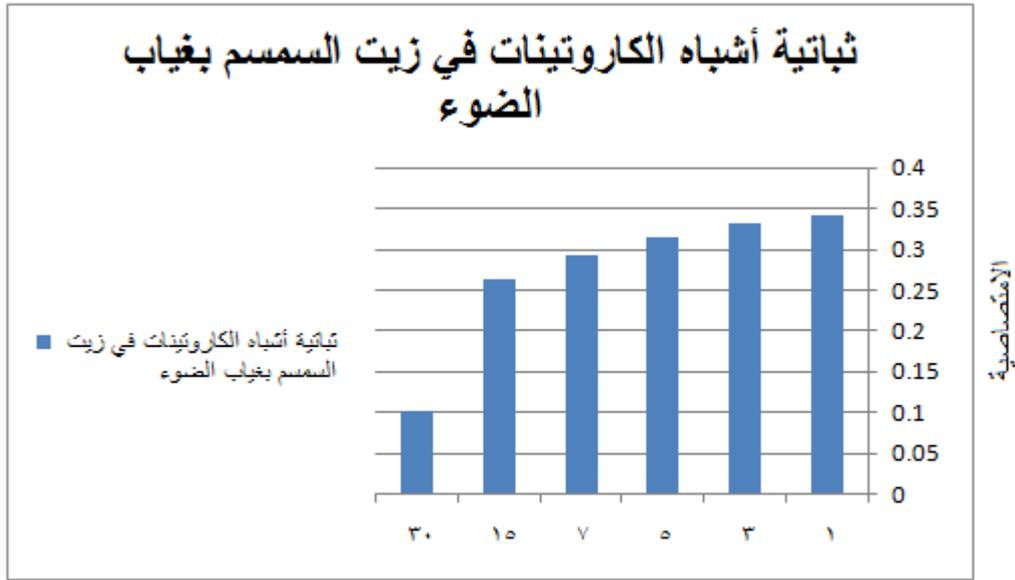


الشكل (27): تأثير التركيز في ثباتية أشباه الكاروتينات لزيت السمسم وبغياب الضوء

4 7 9 4 - دراسة تأثير فترة التخزين:

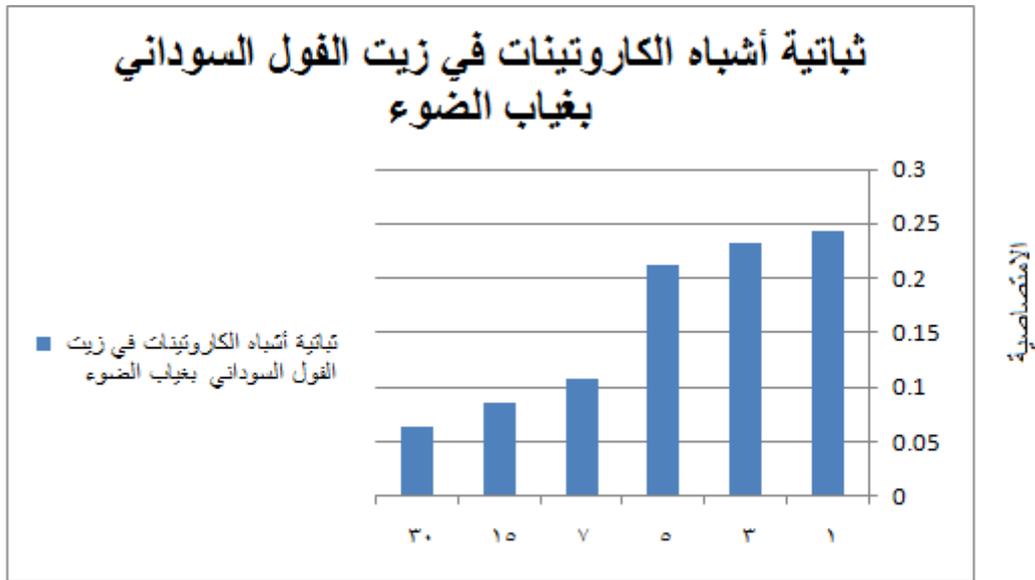
تبين النتائج الموضحة في الجدول (20) انخفاض ثباتية أشباه الكاروتينات مع زيادة مدة التخزين بوجود الضوء وغيابه وهذه يوافق (Bhosale, 2001). فعلى سبيل المثال انخفضت ثباتية أشباه الكاروتينات المضافة بتركيز 1000 ميكروليتر والمخزنة في زيت السمسم وغياب الضوء بنسبة 64.6% بعد تخزينها لمدة بلغت 30 يوم. وتوضح الأشكال (28)، (29) و (30) تأثير فترة التخزين على كل من زيت السمسم , زيت الفول السوداني وزيت عباد الشمس على التوالي وغياب الضوء.

تتميز أشباه الكاروتينات المنتجة من الخمائر الملونة بشكل عام بثباتية جيدة في الزيوت النباتية ويمكن استخدامها وهي في الزيت النباتي في العديد من المنتجات الغذائية كمضاف غذائي يكسب المنتج لوناً مميزاً , وهذه الخاصية تكسب أشباه الكاروتينات المنتجة من الخمائر الملونة إمكانية تطوير استخدامها لاحقاً في العديد من الصناعات الغذائية (Latha and Jeevaratnam, 2010).



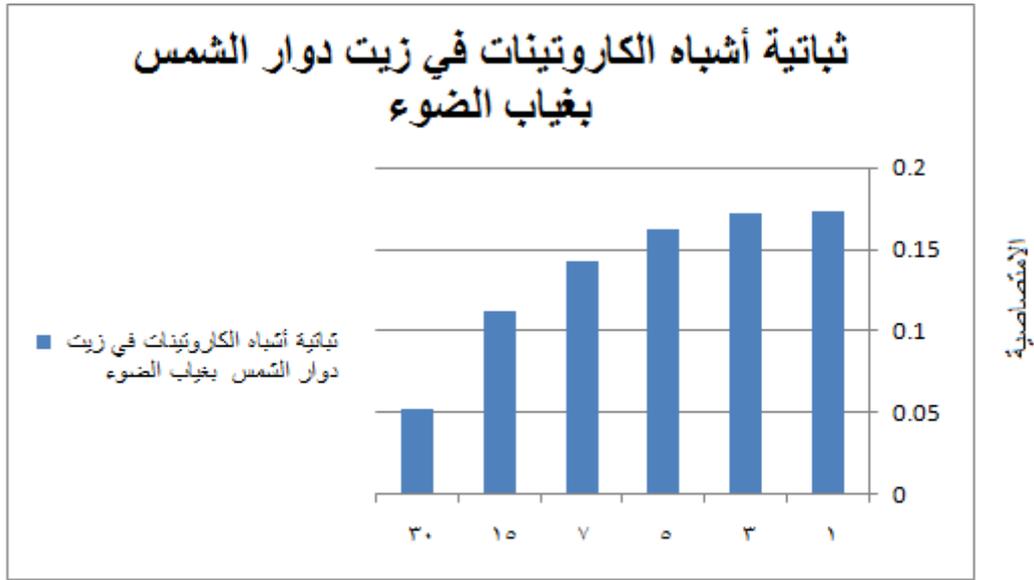
مدة التخزين (يوم)

الشكل (28) : ثباتية أشباه الكاروتينات في زيت السمسم خلال فترة التخزين وبغياب الضوء



مدة التخزين (يوم)

الشكل (29) : ثباتية أشباه الكاروتينات في زيت الفول السوداني خلال فترة التخزين وبغياب الضوء



مدة التخزين (يوم)

الشكل (30) : ثباتية أشباه الكاروتينات في زيت دوار الشمس خلال فترة التخزين وبغياب الضوء

5- الاستنتاجات :

- 1 تبين نتيجة تشخيص العزلات باستخدام تقانة API أنها تنتمي إلى ثلاثة أنواع من *Rhodotorula* هي *R. mucilaginosa* ، *R. glutinis* و *R. minuta* وبنسب 76% ، 20% و 4% من العينات المختبرة على التوالي.
- 2 تفوقت الطريقة المعدلة باستخدام DMSO والتحصين مدة 2 ساعة في حاضنة هزازة بسرعة دوران 130 دورة /دقيقة بدرجة 5-10° م على كافة الطرائق الخمس الأخرى المستخدمة لتحطيم خلايا الخميرة واستخلاص الصبغة.
- 3 تفوقت العزلة A24 *R. mucilaginosa* بكمية أشباه الكاروتينات المنتجة إذ بلغت 658.23 ميكروغرام /غ كتلة حيوية جافة للخلايا مقارنة ببقية العزلات الأخرى.
- 4 تفوقت الطفرة على الزمن 4.5 عن باقي الطفرات بكمية إنتاج بلغت 734.58 ميكروغرام /غ وأعطيت الرمز A24-M حيث أعطت كمية من أشباه الكاروتينات أعلى من إنتاجية الخميرة الأصل A24 بمعدل 1.1 مرة.
- 5 +أختلف المصدر الكربوني المثالي بين العزلة الأصلية والطفرة , حيث أعطت العزلة A24 أفضل إنتاجية من أشباه الكاروتينات بلغت 534.44 ميكروغرام/غ عند استخدام المولاس كركيزة , بينما أعطت الطفرة A24 - M أفضل إنتاجية بلغت 601.45 ميكروغرام/غ عند استخدام الغليسيرول الخام كركيزة.
- 6 أعطت الخميرة المطفرة *R.mucilaginosa* (A24-M) كمية إنتاج أشباه الكاروتينات كانت في حدها الأقصى بقيمة 800.79 ميكروغرام/ غرام كتلة حيوية جافة عند درجة حرارة 30°م ودرجة الحموضة (pH) 5 ومدة التحصين 4 أيام وحجم اللقاح 12 مل وتركيز ركيزة الغليسيرول الخام 30 غ/ل وذلك باستخدام البرنامج الإحصائي Minitab والتصميم الإحصائي Response Surface Methodology (RSM).
- 7 أعطت الخميرة الأصلية *R.mucilaginosa* (A24) ثلاثة بقع لونية باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وهي بيتا كاروتين (β-Carotene) بقيمة Rf=0.9 وتوريولين (Torulene) بقيمة Rf=0.3 وتوريولارهودين (Torularhodin)

- بقيمة $R_f=0.2$, بينما لم تعط الخميرة المطفرة *R.mucilaginosa* (A24-M) إلا بقعة لونية واحدة وهي توريولارهودين (Torularhodin) بقيمة $R_f=0.2$.
- 8 بينت نتائج تنقية أشباه الكاروتينات من الطفرة *R.mucilaginosa* (A24-M) باستخدام عمود التنقية الزجاجي وجود ملون واحد فقط بلون أحمر فصل باستخدام (حمض الخل مع إيثر ايثيلي) .
- 9 أكدت نتائج تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC على طول موجة 495 نانومتر وجود ملون واحد وهو توريولارهودين (Torularhodin).
- 10 - تم التعرف على البناء الكيميائي لأشباه الكاروتينات المستخلصة من الخميرة المطفرة و المنقاة بعمود التنقية باستخدام مطيافية فورييه للأشعة تحت الحمراء FTIR وضمن مجال طيفي تراوح ما بين (400 - 5000) سم⁻¹ فثنين من الروابط أن ناتج الفصل يعود إلى ملون واحد وهو توريولارهودين(Torularhodin).
- 11 - أبدت أشباه الكاروتينات المستخلصة ثباتيتها ضمن الزيوت المختبرة خلال فترات التخزين حتى شهر واحد , وتفوق زيت السمسم معنوياً بمختلف تراكيزه المستخدمة وخلال فترات التخزين المختلفة تلاه زيت الفول السوداني ثم زيت دوار الشمس.
- 12 - كانت ثباتية أشباه الكاروتينات بغياب الضوء أفضل مقارنة بوجوده في جميع عينات الزيت وباختلاف فترات التخزين وبكافة التراكيز المستخدمة.
- 13 - ثباتية أشباه الكاروتينات كانت أفضل عند إضافتها للزيوت بتركيز 1000 ميكروليتر مقارنة بالتركيزين 100 و 50 ميكروليتر.

6- المقترحات :

- 1- استخدام المخمر في إنتاج أشباه الكاروتينات لإنتاج الملونات على مستوى تجاري.
- 2 استخدام تقنيات وراثية كعملية التنسيل (Cloning) وهندسة البروتين لتطوير الإنتاج.
- 3 استخدام كائنات أخرى منتجة لأشباه الكاروتينات ومقارنة إنتاجها بانتاجية خميرة *Rhodotorula*.
- 4 استخدام أشباه الكاروتينات المنقاة في الصناعات الغذائية والطبية بعد التأكد من سلامتها وأمانها.

7-المراجع:

المراجع العربية

- الحيدري ، نظام كاظم والمصلح ، رشيد محجوب (1989). الأحياء المجهرية الصناعية ، الطبعة الأولى ، جامعة بغداد.
- الخفاجي, زهرة (1990). التقنية الحيوية .دار الحكمة للطباعة و النشر, الموصل .
- الخياط, غسان حمادة ومحمد, محمد (2000). كيمياء مكونات الأغذية. كلية الزراعة , جامعة دمشق.
- الخياط, غسان حمادة (2005). الصناعات الميكروبيولوجية. كلية الزراعة. جامعة دمشق, الطبعة الثانية, 7- 9.
- السواح, محمود محمد عوض الله (2002). الأنزيمات الميكروبية. دار النيل للطباعة . الطبعة الأولى , مصر.
- العاني, فائز عزيز (1993). التكنولوجيا الحيوية. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.
- صداق, شريف حسن (2004) الأحياء الدقيقة الصناعية (الجزء النظري). منشورات جامعة البعث, الجزء النظري.
- عمر, عادل (2006). إنتاج أنزيمات الأميلاز من الفطريات وتنقيتها واستعمالها في بعض المجالات التطبيقية. أطروحة دكتوراه في قسم علوم الأغذية, كلية الزراعة, جامعة دمشق, سوريا.
- كشتعاري , محمود و صداق , شريف حسن (2005)- علم الأحياء الدقيقة (الجزء النظري) .كلية الهندسة الكيميائية والبترولية , منشورات جامعة البعث .

- Abd El-Razek, A. M. (2004). Isolation, classification and mutagenesis of yeast carotenoids and optimizing factors affecting its production. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Alexandria University.
- Ananda, N and Vadlani, P.V.(2010). Production and optimization of carotenoid-enriched dried distillers grains with solubles by *Phaffia rhodozyma* and *Sporobolomyces roseus* fermentation of whole stillage, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **37**: 1183-1192.
- Aizawa, K., Iwasaki ,Y., Ouchi, A., Inakuma, T., Nagaoka,S., Terao, J andMukai,K.J. (2011).Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 2. Measurements of the SOAC values for carotenoids and food extracts.*Agric Food Chem***59**(8):3717-29.
- Andre, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M and Papanikolaou, S.(2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Ind Crop Prod*;**31**: 407-16.
- Aksu .Z. and Eren. A. Tug̃ba. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*:Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*.**40**;2985–2991.
- Aksu, Z andEren,A.T.(2007).Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, **35**, 107–113.

- Amaretti,A., Simone,M.,Quartieri,A., Masino,F., Raimondi ,S.,Leonardi,A and Rossi,M.(2014). Isolation of Carotenoid-producing Yeasts from an Alpine Glacier. *Chemical engineering transactions*.**38**:217-222.
- An, G.H., Bielich, J., Auerbach, R. and Johnson, E.A. (1991). Isolation and characterization of carotenoid hyper producing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnol.*, **9**: 70-73.
- Ancos, B.D., Cano, M.P., Hernandez, A. and Monreal, M. (1999). Effects of microwave heating on pigment composition and color of fruit purees. *J. Sci. Food. Agric.*,**79**,663-670.
- Armstrong, G. A. and Hearst ,J. E.(1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*. **10**(2): p. 228-237.
- Asker, D., Beppu, T. and Ueda, K. (2007). *Sphingomonas jaspsisp.nov.*, a novel carotenoid producing bacterium isolated from Misasa,Tottori, Japan. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*,**57**: 1435-1441.
- Astorg, P. (1997). Food carotenoids and cancer prevention. An overview of current research. *Trends Food Sci. Technol*; **8**, 406-413
- Banzatto,D., Freita,L.A. and Mutton,M.J.R. (2013). Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, **33**(1): 14-18.
- Barnet , J.A., Payne , R.W. & Yarrow , D., 2000. Yeast:characteristics and,identification, 3rd edition ed. Cambridge: University press.

- Basu, H.N., Vecchio, A.J.D., Flider, F and Orthoefer, F.T. (2001). Nutritional and Potential Disease Prevention Properties of Carotenoids. *J.A.O.C.S.*, **78**(7): 665-675.
- Bendich, A. (1994). Recent advances in clinical research involving carotenoids. *Pure Appl. Chem*; **66**: 1017-1024.
- Berset, C. and Marty, C. (1992) Formation of nonvolatile compounds by thermal degradation of β -carotene: protection by antioxidants. In: *Methods in Enzymology, Carotenoids Part A, Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation* **213**, 129-141 (Ed: Packer, L.). Academic press, INC, San Diego.
- Beuchat, R. (1992). Enumeration of fungi in grain flours and meals in floured by setting in diluents and by the recovery medium. *J. food protc.* **55**:899-901.
- Bhosale, P. (2001). Studies on yeast *Rhodotorula*, its carotenoids and their applications. Thesis Submitted to the university of pune for the degree of doctor of philosophy in microbiology. India.
- Bhosale, P. and Gadre, R.V. (2001). β -carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 327-332.
- Bhosale, P., and Gadre, R.V. (2002). Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced β -carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 349–353.
- Bhosale, P. and Bernstein, P.S. (2004). β -carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **31**: 565-571.

- Biacs, P.K. and Fekete, J. (1998). Carotenoid coloring matters in foodstuffs. Part II. *Elelmez.*, **52**, 113-114.
- Britton, G. (1991) .Biosynthesis of carotenoids. In:Plant pigments, **8**: 133-182(Ed: Goodwin, T.W.), Academic Press, San Diego.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to fuction. *FASEB J* ;**9**:1551–1558.
- Buzzini,P. (2000). An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectifid grape must as the sole carbohydrate source. *J Ind Microbiol Biotechnol*;**24**:41–45.
- Buzzini, P. (2001): Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotula glutinis* – *Debaryomyces castellii* co-cultures in corn-syrup. *Journal of Applied Microbiology.*,**90**: 843-847.
- Buzzini, P., Martini, A., Gaetani, M., Turchetti, B., Pagnoni, U.M. and Davoli, P. (2005). Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. *Enz. Microb.Technol.*, **36**: 687-692.
- Carnecka, M. (2009).Molecular study of intra cellular changes as response of microorganisms to environment. *Brano University of Technology*. 101-103.
- Carrillo-Lopez A, Yahia EM, Ramirez-Padilla GK. (2010).Bioconversion of Carotenoids in Five Fruits and Vegetables to Vitamin A Measured by Retinol Accumulation in Rat Livers. *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, **5**(2): 215-221.

- Cerda-Olmedo, E. (2001). Phycomyces and the biology of light and color. *Fed. Eur. Material Soc. Microbiol. Rev.*,**25**: 503-512.
- Chanchay, N., Sirisansaneeyakul,S., Chaiyasut,C and Poosaran,N.(2012). Optimal Conditions for Carotenoid Production and Antioxidation Characteristics by *Rhodotorula rubra*. *J Biochem.* 78:803–10.
- Cho,Y.J., Park, J.P., Hwang, H.J., Kim, S.W., Choi, J.W.and Yun, J.W. (2002) . Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces inclairii*. *Lett Appl Microbiol*;**35**: 195-202.
- Costa, H.L., Martelli da Silva, I.M. and Pomeroy, D. (2005). Production of β -carotene by a *Rhodotorula strain*. *Biotechnol let*; **9**: 373-375.
- Csorba, 1., Buzas, Z.oPolyak, B.andBoross, L. (1979).High-speed video-densitometric determination of chlorophylls and carotenes separated by thin-layer chromatography. *J. Chromat.*, **172**,287-93.
- Dasari, M.A., Kiatsimkul, P.P., Sutterlin, W.R andSuppes, G.J. (2005). Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *ApplCatal A Gen*;**281**(1): 225-31.
- Da Silva, G.P., Mack .M andContiero, J.(2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology, *Biotechnol Adv.*, **27**, 30-39.
- David, H.L. (1974). Biogenesis of β -carotene in *Mycobacterium kansasii*. *J. Bacteriol.*, **119**: 527-533.

- Davoli, P and Weber, W. S. (2002). Carotenoid pigments from the red mirror yeast, *Sporobolomyces roseus*. *Mycologist*, **16**(3): 102-108.
- Davoli, P., Mierau, V. and Weber, R.W.S. (2004). Carotenoids and fattyin red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Appl Biochem Microbiol* ; **40**:392–397.
- De Haan, A., Burke, R. M. and De Bont, J. A. M. (1991), Microbial production of food colorants. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*; **56**:1655-1660.
- De Hoog, G.S. (2000) . Atlas of Clinical Fungi Centra albureau voor Schimmel cultures, Utrecht, the Netherlands.
- DelCampo, J.A., Gonzalez, M.G. and Guerrero, M.G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**: 1163-1174.
- Desobry, S. A., Netto, F. M. and Labuza, T. P. (1999). Influence of maltodextrin systems at an equivalent 25DE on encapsulated β -carotene loss during storage. *J. Food Process. Preserv.*, **23**, 39-55.
- Diplock ,A.T., Charleux ,J.L., Crozier-Willi ,G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid ,M., Stahl,W and Viña-Ribes, J.(1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr.*; **80**(1): 77-112.

- Du, S. J., Mel, I. Y. Z. and HU, Y. H. (2008). Optimization of Culture Conditions for Producing Astaxanthin by *Phaffia rhodozyma*. *Food Science*, **29**(8) : 441–444.
- Dung, B. D., Huyen, H. T. B and Quan, B. H. (2010). Optimization Carotenoid 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, **2**(12):19-25.
- Dzulkefly, K. and Hamdan, S. (1999). Oxidative and non oxidative effects of low energy ultraviolet radiation on the stability of red palm oil. *Ultra Sci. Phys. Sci.*, **11**, 246-251.
- Easterling, E. R., French, W. T., Hernandez, R. and Licha, M. (2009). The effect of glycerol as sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour. Technol.* **100**: 356-361.
- El-Agamey A and Mcgarvey, D. J. (2008). Carotenoid radicals and Radical Ions. In Carotenoids: Natural Function. **4**(7), 34-51.
- Ender R. P. and Chang L. T. (1979). Microbial Culture Selection. In Microbial Technology. Vol. 2, New York.
- 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.
- Ferrao, M., and Garg, S. (2012). Shake flask optimization of β -carotene production in *Rhodotorula graminis* RC04. *African Journal of Biotechnology*. **11**: (52); 11431-11437.

- Filotheu, A., Nanou, K., Papaioannou, E.; Roukas, T., Kotzekidou, P and Liakopoulou-Kyriakides, M. (2010). Application of response surface methodology to improve carotene production from synthetic medium by *Blakesleatри spora* in submerged fermentation. *Food Bioprocess.Technol.*, **10**: 97-102.
- Francis, F.J.(2000). Carotenoids as Food Colourants. *Cereal Food World*; **45**: 198-203.
- Frengova, G., Simova, E.,Pavlova, K., Beshkova,D.and Grigorora,D. (1994) . Formation of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnology and Bioengineering*; **44**: 888-894.
- Frengova, G.I., Simova, E. and Beshkova, D.M.(2004). Use of whey ultrafiltrate as a substrate for production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula rubra*.*Appl. Biochem.Biotechnol.* **112**: 133-141.
- Frengova, G.I. and Beshkova, D.M.(2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*; **36**:163 – 180.
- Garcia-Gonzalez, M., Moreno, J., Manzano, C., Florencio, F.J. and Guerrero, M.G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *J.Biotechnol.*, **115**: 81-90.
- Go, K.M., Koo, J.S., Kim, Y.I. and Yang, J.H. (1999) .Preparation and stability of sodium alginate beads containing β -carotene. *Yakche Hakhoechi*, 29,323-327.

- Gomez,L.C.M., Montanez,G.C., Mendez-Zavala,A and Aguilar,C.(2014).
Biotechnological production of carotenoids by
yeasts: an overview.*Microbial Cell Factories*.**13**:2; 11-25.
- Govindaswamy, V., Vasudevan, V. and Divakar, S. (1999) Optimization
of growth parameters for the production of carotenoids by
Rhodotorula gracilis Zeitschrift fur Lebensmitt eluntersuchung
und Forschung A. **208**, 121-124.
- Gu,Z.,Chen,D.,Han,Y.,Chen,Z., and Gu,F.(2008).Optimization of
carotenoids extraction from *Rhodobacter shaeroides*. LWT,
41, 1082–1088.
- Hall, R.L. (1958). Flavor Study approaches at McCornick and co,Inc in
Ed.A.D. Little Flavor research and food acceplannce. New
York Reinhold . 224-240.
- Hamidi,M., Abdin,M.Z, Nazemyieh,H, Hejazi,M.A and Hejazi,M.S.
(2014). Optimization of Total Carotenoid Production by
Halorubrum Sp. TBZ126 Using Response Surface
Methodology. *MicrobBiochemTechnol*, **6**(5):56-71.
- Harrison, E.C.(1998). A systematic study of some torulae Trans. In The
yeasts: ataxonomic study, Eds. C.P. Kurtzman and J.W. Fell,
4th ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands,
9.22-820.
- Hausmann, A. and Sandmann, G. (2000). A single five-step desaturase is
involved in the carotenoid biosynthesis pathway to β -carotene
and torulene in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Biol.*,
30:147–153.

- Henry, L. K., Catignani, G. L. and Schwartz, S. J. (1998). Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9 cis and all trans β -carotene. *J. Am. Oil Chem.Soc.*, **75**,823-829
- Iriani, R.M., Adilma,R.P., Scamparini Delia, B. and Rodriguez, A. (2005). Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region. *Braz J. Microbiol*;**40**: 2985-2991.
- Jernejc, K and Cimerman, A. (2001). Morphological characteristics, Extracellular and Intracellular protein and enzyme patterns of Five *Aspergillus* species. *Food TechnolBiotechnol*.**39**(4):333-340.
- Jones, J.D., Hohn, T.M. and Leathers, T.D. (2004). Genetically modified strains of *Fusarium sporotrichioides* for production of lycopene and β -Carotene. *Soc. Ind. Microbiol*. **7**:891-917.
- Johnson ,E. and Schroeder, W. (1995) .In: Fiechter A (ed) Microbial carotenoids. *Advance>s in biochemical engineering/biotechnology*,**53**: 119–178.
- Johnson, E.A. and Schroeder,W. (1996). Microbial carotenoids. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnol*;**53**: 119-178.
- Juckyoung, O.H., Jeong, H. and Sejong, O.H. (2009). Characterization of optimal growth conditions and carotenoid production of strain *Rhodotorula mucilaginosa* HP isolated from larvae of Pierisrapae. *Entomol. Res.*, **39**: 380-387.

- Juffs, H.S. (1976). Effect of temperature and nutrient on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* in broth and milk. *J. Appl. Bacteriol.*, **9**(40):23-32.
- Kaur, B., Chakraborty, D. and Kaur, H. (2009). Production and stability analysis of yellowish pink pigments from *Rhodotorula rubra* MTCC 1446. *The Internet Journal of Microbiology*. **7**(1).22-41.
- Kim, J.H., Kang, S.W.; Kim, S.W. & Chang, H.I. (2005). High-level production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant JH1 using statistical designs. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **69**:1743–1748.
- Kim, J.H., Kang, S.W., Kim, S.W and Chang, H.I. (2010) .High-level production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant JH1 using statistical experimental designs. *Biosci Biotechnol Biochem* . **69**:1743–1748.
- Kivanc, M. and Kahyaoglu, M. (2008). Beta carotene production from industrial waste by *Phycomyces nitens*. *J. Biotechnol.*, **136**: 717-742.
- Krinsky, N.I. (2001). Carotenoid antioxidants. *Nutr*; **17**: 815-817.
- Kusdiyantini, E., Gaudin, P., Goma, G and Blanc, P.J. (1998). Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnol Lett*; **20**(10): 929-34.
- Kusdiyantini, E., Gaudin, P., Goma, G and Blanc, P.J. (1998). Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnol Lett*; **20**(10): 929-34.

- Krubasik, P. and Sandmann, G. (2000). A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Mol. Genetics*.**263**: 423-432.
- Kviderova, J. and Henley, W.J. (2005). The effect of ampicillin plus streptomycin on growth and photosynthesis of two halo tolerant chlorophyte algae. *J. App. Phycol.*, **17**: 301-307.
- Latha, B.V and. Jeevaratnam,K. (2010). Purification and Characterization of the Pigments from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY Isolated from Natural Source. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*;**5** (3): 166-174.
- Latha, B.V., Jeevaratnam,K., Murali,H.S and Manja, K.S. (2005). Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. *Indian Journal of Biotechnology*. **4**. 353-357 .
- Leach, G.C., Oliveira, G. and Morais, R. (1998) .Production of a carotenoid rich product by alginate entrapment and fluid bed drying of *D.salina*. *J. Sci.Food. Agric.*, 76, 298-302.
- Libkind, D. and van Brook, M .(2006). Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts. *World J Microbiol Biotechnol*; **22**:687–692.
- Longo, E., Siero, C., Velazquez, J.B., Calo ,P., Cansado, J. and Villa, T.G.(1992) Astaxanthin production from *Phaffia rhodozyma*.*Biotechnol Forum Eur*;**9**:565–567.

- Lorenz, R.T. and Cysewski, G.R. (2000). Commercial potential for *Hematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.*, **18**:160-167.
- Maheshwari,R.,Bharadwaj,G. and Bhat,M.(2000). Thermophilic Fungi: Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; **64**(3):461-488.
- Maldonade,I.R., Scamparini,A.R.P and Rodriguez-Amaya,D.B.(2006). Selection and characterization of carotenoids- producing yeast from campinas region, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* ; **38**:65-70.
- Maldonade, I.R., Scamparini, A.R.P and Rodriguez-Amaya, D.B. (2007). Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **38**: 65-70.
- Maldonade, I.R., Rodriguez-Amaya, D.B. and Scamparini, A.R.P. (2008). Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chem.*, **107**: 145-150.
- Maldonade, I.R., Rodriguez-Amaya, D. B. and Scamparini, A. R. (2012). Statistical Optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology.* , **1517**:109-115.
- Malisorn, C. and Suntornsuk, W. (2009). Improved β -caroteneproduction of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. *J. Biochemical Engg.*, **43**: 27-32.
- Manowattana, A., Seesuriyachan., Ph, Techapun, Chand Chaiyaso, Th. (2012). Optimization of Carotenoids Production by Red Yeast

Sporobolomyces pararoseus TISTR5213 Using Waste Glycerol as the Sole Carbon Source . *KKU Res. J*; **17**(4):607-621.

Marrova, I.,Carnecka, M.,Halienova, A.,Dvorakova, T and Haronikova, A. (2010). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. In *Journal of Environmental Management*. DOI:10.1016/j.jenvman.06.018.

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

Michelon, M., Borba, T.M., Rafael, R.S., Burkert, C.A.V., and Burkert, J.F.M.(2012).Extraction of carotenoids from*Phaffia rhodozymb*: a comparison between different techniques of cell disruption. *Food Sci. Biotechnol.* **21**, 1-8.

Mihalcea, A.,Ungureanu, C., Ferdes, M.,Chirvase, A., and Tanase, C . (2011). The Influence of Operating Conditions on the Growth ofthe Yeast *Rhodotorula rubra* ICCF 209 andon Torularhodin Formation. *REV. CHIM.Bucharest.* **62**(6): 659-665.

Mogedas, B., Casal, C., Forjan, E. and Vichez, C. (2009). β -carotene production enhancement by UV A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors. *J. Biosci. Bioengg.*, **108**(1):47-51.

Moline, M.,Libkind,D.,Dieguez,M.C and vanBroock,M.(2009). Photo protective role of carotenoids in yeasts:ResponsetoUV-B of pigmentedandnaturally-occurringalbinostains. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **95**, 156–161.

- Naghavi, F. P., M. Hanachi. A. Souidi .A. Saboora and A. Ghorbani. (2013). Evaluation of the Relationship between the Incubation Time and Carotenoid Production in *Rhodotorula Sloofiae* and *R. mucilaginosa* Isolated from Leather Tanning Wastewater. *Iranian journal of basic medical science*. **16**: 1114-1118.
- Naghavi,F., Hanachi,P and Saboora,A. (2014). Effect of Temperature, pH and Salinity on carotenoid production in *Rodotorula mucilaginosa*. *An International Journal*.**22**(7): 22-37.
- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H. and Giesbrecht, P. 1991. The Characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). Nelson, W.H. ed. Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis. *VCH, New York, NY*. Pp. 43-96.
- Nelis, H.J. and De Leenheer, A.P. (1991). Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Applied Bacteriol.*, **70**: 181-191.
- Nelson,J.W.,and Livingston,A.L.(1967). Stailization of xanthophylls and carotene by ethoxyquin during thin- layer chromatography.*J. Chromatography*.**28**:465-467.
- Oliver,J and Palou,A.(2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography*,**881**. 543–555.
- Orset, S. and Young, A.J. (1999). Low temperature induced synthesis of α -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Phycol.*,**35**,520-527.

- Pachauri, N. He. B.(2006) . Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: A survey of current research activities. Proceedings of ASABE annual international meeting. 9-12. Portland.
- Papp, T., Nagy, G., Csernetics, A., Szekeres, A. and Vagvolgy, C. (2009).Beta carotene production by mucoralean fungi. *J. Engg.*, **4**: 1584-2665.
- Park, P.K., Cho, D.H., Kim, E.Y and Chu, K.H.(2007). Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 429–434.
- Perrier, V., Dubreucq, E and Galzy, P. (1995) .Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch Microbiol.* **164**:173–179.
- Raisainen, R., Nousiainen, P. and Hynninen, P.H. (2002). Dermorub in and 5-chlorodermorub in natural anthraquinone carboxylic acids as dyes for wool.*Textile Res J*, **72**: 973-976.
- Radulescu,G., Mocanu,E., Cojcara,I., Damsa,F., Doncea,S.M and Ceclan, R.E.(2009).Studies on Biosynthetic pathways of obtaining carotenoid pigments. *Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering.* 16, 12-32.
- Ramachandran, J ., M Powers,T., Carpenter, S., Garcia-Lopez, A and Freyer, J.P. (2007). Light scattering and micro architectural differences between tumorigenic and non-tumorigenic cell models of tissue. *Optics express* **15** (7), 4039-4053

- Ramirez, J., Obledo, N., Arellano, M and Herrera, E. (2006).
Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a fed-batch culture using a low cost medium feeding. *E-Gnosis*, **4**:1–9.
- Rauss, K. and Vörös, S. 1959. The biochemical and serological properties of *Proteus morgani*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 6: 233-248.
- Razavi,S.H. and Marc, I.(2006). Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 using technical glycerol as carbon source, *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineerin*, **25**, 59-64.
- Reuhs .L and Mauer, L. J.(2010). Detection of E. coli O157:H7 from Ground Beef Using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy and Chemometrics . *Journal of Food Science* **75**, 6, 340–346.
- Ritter,E and Purcell,A.E. (1981). Carotenoid analytical methods in carotenoids as colorants. *Methods in microbiology*. 18, 173-289.
- Rock, C.L .(2009). Carotenoids and Cancer. In: Carotenoids: Nutrition and Helath. Vol.5. Ch.13. Britton, G., Liaaen-Jensen, F and Pfander, H(Eds.). Birkhauser Verlag Basel, ISBN 978-3-7643-7500-3, pp. 269-286.
- Salah, A. and Ibrahim, S. (2008). Production of carotenoids by a newly isolated marine *Micrococcus* sp. *J. Biotechnol.*, **1682**: 1-6.

- Sanderson, G., CO, W. H and. Gonzalez ,G. (1971).Biochimistry of tea fermentation :the role of carotenesin black tea aroma formation. **36(2):** 231–236.
- Scita G. (1992). Stability of β -carotene under different laboratory conditions. In:Methods in Enzymology, Carotenoids Part A, Chemistry, Separation, Quantitaion, and Antioxidation,**213:** 175-185 (Ed: Packer, L.). Academic press, San Diego.
- Shi, X.M. and Chen, F. (1997) Stability of lutein under various storage conditions. *Nahrung*, **41**:38-41.
- Shih, C.T and Hang, Y.D. (1996) . Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Saucrkaut brine. *Lebensmittel-Wissenschaft and technology*. **29**: 570-575.
- Simova, E.D., Frengova, G.I. and Beshkova, D.M. (2003). Effect of aeration on the production of carotenoid pigments by *Rhodotorula rubra-Lactobacillus casei* subsp. caseico-cultures in whey ultrafiltrate.*journal Naturforsch Biosci.*,**58**: 225-229.
- Simova, E.D., Frengova, G.I. and Beshkova, D.M. (2004) Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultivated with yogurt starter cultures in whey ultraWltrate. *JInd Microbiol Biotechnol* ;**31**:115–121.
- Simpson, K.L., Nakayama, T.O.M and Chichester, C.O. (1964). Biosynthesisof yeast carotenoids. *J Bacteriol***88**:1688–1694.
- Sntroshuk, W (2004). Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate. *J.Industrial. Microbiol .Biotechnol.*,**8**: 115-121.

- Somashekar, D. and Joseph, R.(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.
- Sperstad, S., Lutnaes, B.F., Stormo, S.K., Liaaen-Jensen, S. and Landfald,B. (2006). Torularhodin and torulene are the major contributors to the carotenoid pool of marine *Rhodospiridium babjevae*(Golubev). *J.Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33**: 269-273.
- Stahl W, Heinrich U, Jungmann H, Sies H, Tronnier (2000).Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*,**71**:795-798.
- Stahl W, Sies H (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.*, **24**: 345-351.
- Stanbury, P. E. and Wtaker, K. (1984). Principle of fermentation technology. 1st ed. Programon press. Oxford.
- Stanbury, P., Whitaker, A .and Hall, S. (1997). Principles of Fermentation Technology (Second edition), Aditya books Private Limited, New Delhi, India , 93–105.
- Squina, F.M. Yamashita, F., Pereira ,J.L. and Mercadante, A.Z. (2002). Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *Rhodotorula glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. *Food Biotechnol*;**16**:227–235.
- Takahashi ,M., Watanabe, H., Kikkawa, J., Ota, M., Watanabe, M., Sato, Y., Inomata, H and Sato, N. (2006). Carotenoids extraction from Japanese Persimmon (Hachiyakaki) Peels by Supercritical CO₂with Ethanol. *Anal. Sci.*, **22**: 1441-1447.

- Talaro, A and Talaro, K. P.(2001). Foundations in Microbiology. Pasadena:McGraw-Hill. 889 p. ISBN 0-07-248864-6.
- Tang, G., Qin, J., Dolnikowski,G.G., Russell ,R.M andGrusak, MG.(2009). Spinach or carrot can supply significant amounts of vitamin A as assessed by feeding with intrinsically deuterium-labeled vegetables. *Am J Clin Nutr*;**82**:821–8.
- Taskin,M.,Sisman,T.,Erdal,S and Kurbanoghu,E.B.(2011).Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. *European Food Research and Technology*, **233**, 657–665.
- Taylor ,R.F. (1993). Chromatography of carotenoids and retinoids. *AdvChromatogr.***22**:157-213.
- Tee, E. S. (1991). Carotenoids and Retinoids in Human Nutrition, ed. C. L.Lim& Y.H. Chong. Institute for Medical Research, Kuala Lumpur.
- Thakur, M. and Azmi,W. (2013). Nutraceutical β -carotene from natural non-conventional sources and its applications. *Ann.Phytomed.*,**2**(1):1 -15.
- Thompson, J.C and He, B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *ApplEng Agric*;**22**(2): 261-5.
- Tian, B., Xu,Z., Sun, Z., Lin, J andHua, Y. (2007). Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**: 902-911.

- Tinoi, J., Rakariyatham, N. and Deming, R.L. (2005). Utilization of mustard waste isolated for improved production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrohous*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **33**:309–314.
- Unagul, P., Wongsaporn, P., Kittakoop, P., Intamas, S., Srikiti-Kulchai, P. and Tanticharoen, M. (2005) Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordycepsunila teralis* BCC 1869. *J Ind Microbiol Biotechnol* ;**32**:135-140.
- Valduga, E., Valerio, A., Treichel, H., Junior, A.F. and Luccio, M.D. (2008). Optimization of the production of total carotenoids by *Sporidiobolus almonicolor* (CBS 2636) using response surface technique. *Food Bioprocess Technol.*, **10**:11927- 11947.
- Valduga, E., Valério, A., Treichel, H., Furigo, A. and Luccio, M. (2009). Optimization of the Production of Total Carotenoids by *Sporidiobolus almonicolor* (CBS 2636) Using Response Surface Technique. **2**(4):415-421.
- Venil, K. C. and Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin. *Electronic Journal of Biology.* **5**(3): 49-61.
- Vijayalakshmi, G., Shobha, B., Vanajakshi, V. Divakar, S. and Manohar, B. (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.

- Walker, G. M. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd. 362 p. ISBN 0-471-964468.
- Wang, S.L., Sun, J.S., Han, B.Z. and Wu, X.Z. (2007). Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology. *J Food Sci*; **72**:325–329.
- Wang, S.L., Sun, J.S., Han, B.Z. and Wu, X.Z. (2008). Enhanced beta carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure. *Kor. J. Chem. Engg.*, **25**(3): 513-516.
- Watanabe, T. (2002). *Pictorial Atlas of soil and feed fungi, Morphology of cultured fungi and key to Species*. 2nd. Ed. CRC press. London.
- Xuan Z., Xu, S. and Wang, Z. (1998) Gelatin as microencapsulating agent for β -carotene. *Shipin Yu Fajiao Gongye.*, 24,11-15.
- Yehia, A., Mahmoud, G., Atef Abo-Shady, M., Moustafa El-Sheekh, M. and Wlaa Hamza T. (2013). The role of some stress factors including hydrogen peroxide, methylene blue, sodium chloride and ultraviolet on *Rhodotorula glutinis* DBVPG # 4400 total carotenoids production. **4**(9): 10-19.
- Yen, H.W and Zhang, Z. (2011). Enhancement of cell growth rate by light irradiation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, 102, 9279–9281.
- Yeum, K.J., Aldini, G., Russell, R.M and Krinsky, N.I. (2009). Antioxidant/Pro oxidant Actions of Carotenoids. In: *Carotenoids: Nutrition and Health*. **5**(12):81-99.

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.

Zheng, Y.G., Hu, Z.C., Wang, Z. andShen, Y.C. (2006) .Large-scale production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Food Bioprod Process*;**84**:164–166.