المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (10) العدد (1)
لسنة 2018

تحديد الظروف المثلى لانتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rodotorula mucilagenosa* M. المعزولة محلياً والمطفرة كيميائياً.

زهراء عبد احمد[1]*، الهام اسماعيل الشمري[2]
[1] قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق zahraaorkeda@gmail.com
[2] استاذ مساعد دكتور، قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق Elhmfadhil@yahoo.com

تاريخ استلام البحث: 2017/10/3 تاريخ قبول النشر: 2017/11/28

الخلاصة

الهدف من هذه الدراسة هو زيادة انتاج الكاروتينويدات الطبيعية من العزلة المحلية *Rodotorula mucilagenosa* M. بواسطة تحديد الظروف المثلى للنمو والانتاج لهذه المواد لتشجيع استعمالها في التطبيقات الغذائية بدلاً عن الصبغات الصناعية الضارة بصحة المستهلك والبيئة. درست الظروف المثلى لإنتاج الكاروتينويدات من خميرة *R. mucilagenosa* M، واظهرت النتائج ان افضل مصدر كاربون ونتروجين للإنتاج هما الكلوكوز ومستخلص الخميرة، اذ بلغت كمية الكاروتينويدات المنتجة 47430 مايكروغرام/ لتر و47460 مايكروغرام/ لتر على التوالي، في حين كانت درجة الحرارة المثلى 30م والرقم الهيدروجيني 6، حيث كانت كمية الكاروتينويدات 47470 مايكروغرام/ لتر و 47670 مايكروغرام/ لتر على التوالي، وبلغت افضل مدة حضن 120 ساعة وكمية كاروتينويدات بلغت 47690 مايكروغرام/ لتر، وافضل انتاجية تم الحصول عليها عند معدل تهوية 150 دورة/ دقيقة وبكمية كاروتينويدات بلغت 47710 مايكرو غرام/ لتر، وبلغ افضل حجم لقاح 6% وبكمية كاروتينويدات بلغت 47730 مايكروغرام/ لتر.

الكلمات المفتاحية: انتاج ، الظروف المثلى، الكاروتينويدات

DETERMINATION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR CAROTENOIDS PRODUCTION BY CHEMICAL MUTANAT LOCAL ISOLATE *RHODOTORUL MUCILAGENOSA* M.

Zahraa A. Ahmed[1] , Elham I. Al-shamary[2]
[1]Food Science Department, Colleg of Agriculture, University of Bhaghdad, Bhaghdad, Iraq, zahraaorkeda@gmail.com
[2]Assis. Prof. Dr. Food Science Department, Colleg of Agriculture, University of Bhaghdad, Bhaghdad, Iraq, Elhmfadhil@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this study was to increasing natural carotenoides production by a locally isolate *Rodotorula mucilagenosa* M. by determination of the optimal conditions for growth and production of this agents, for encouragest to use it in food application permute artificial pigments which harmfull for consumer health and envieronmental. The optimal condition of carotenoides production from *Rhodotorula mucilaginosa* M were studied. The results shows the best carbon and nitrogen source were glucose and yeast extract. The carotenoids a mount production was 47430 microgram/ litter and 47460 microgram/ litter, respectively, and the optimum temperature was 30°C, PH 6, that the carotenoides a mount was 47470 microgram/ litter and 47670 microgram/ litter, respectively. The best incubation time was 120 hours .That the carotenoides a mount 47690 microgram/ litter. The highest carotenoides a mount was obtained upon 150 rpm/ min, That the carotenoids a mount was 47710 microgram/ litter, and the best size of inoculums was 6%, that the carotenoids a mount was 47730 microgram/ litter.

Keywords: Produce, Optimum condition, Carotenoids.

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول.

المقدمة INTRODUCTION:

من الضروري جداً فهم التداخل ما بين العوامل التغذوية والفيزيائية والكيميائية مثل طبيعة وتركيز مصادر الكاربون والنتروجين ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والمعادن والاضاءة المؤثرة في نمو الخلايا والتي تعطي اعلى انتاجية من المركبات الحيوية بضمنها الكاروتينويدات ومن المستحيل تحديد ظروف عامة لإنتاج اي مادة لذلك لابد من تحديد الظروف المثلى بصورة منفردة حسب الكائن المجهري المستعمل والمادة المراد انتاجها (**Ferrao & Garg, 2011; Squina *et al.*, 2002**). اشار **Maldonade *et al.* (2012)** الى ان انتاج الكاروتينويدات يعتمد على السلالات التي تنتج بدورها كميات متفاوتة من الكاروتينويدات المختلفة، اضافة الى تأثير الظروف المزرعية في نمو الخميرة وطبيعة المواد الايضية المنتجة، كما اشار الى امكانية تغيير التراكيز النسبية للصبغات عن طريق تحوير ظروف التخمير مثل الرقم الهيدروجيني ومصدري الكاربون والنتروجين ودرجة الحرارة والاضاءة والتهوية ومستويات تواجد الاملاح وغيابها.

اشار **Naghavi *et al.* (2013)** الى امكانية اختزال تكاليف الانتاج بتوفر الظروف المثلى للإنتاج واستعمال احياء مجهرية عالية الانتاج واعتماد المنتجات العرضية للعمليات التصنيعية رخيصة الثمن مصدراً للمغذيات، واوضح **Korumilli & Susmita, (2014)** بان العوامل التي تعد مفتاح نجاح عملية الانتاج الحيوي للكاروتينويدات باستعمال التخمرات الحيوية هي توافر الظروف المثلى مثل نوع المادة الاساس المستعملة وتنوع المغذيات والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة ، كما اشار الى ان جنس *Rhodotorula* هي من اكثر الانواع المعول عليها لانتاج الكاروتينويدات.

المواد وطرائق العمل MATERIALS AND METHODS:

النماذج SAMPLES

تم الحصول على عزلة خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M وذلك بعزلها محلياً من ازهار عين البزون من قبل **Ahmed & EL-Shammari (2017)**/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد.

تم الحصول على صبغة البيتا كاروتين القياسية الامريكية المنشأ من شركة Sigma-Aldrch.

قدرت الظروف المثلى لانتاج الكاروتينويدات من العزلة المحلية لخميرة *Rhodotorula mucilaginousa* M حسب ما مذكور ادناه:

مصدر الكاربون CARBON SOURCE:

لقحت دوارق حجم (250 مل) حاوية على (100 مل) من وسط Sabouraud Dextrose Broth (SDB) المحور باستبدال مصدر الكاربون بمصادر اخرى شملت لاكتـوز، كالاكتوز، مالتوز، كلوكوز، فركتوز، سكروز كلاً على انفراد ولقح بعد التعقيم بــ (5 مل) من لقاح خميرة *R.mucilaginosa* M. المطفرة كيميائياً بمادةAcridine orange، إذ يحوي (1مل) على 10^7خلية، وحضنت الدوارق بدرجة حرارة 30°م لمدة 5 أيام في حاضنة هزازة بعدد دورات 150 دورة/ دقيقة.

مصدر النتروجين NITROGEN SOURCE:

حضر وسط SDB باستبدال مصدر النتروجين الاصلي (Pepton) بمصادر نتروجينية اخرى عضوية ولا عضوية شملت كبريتات الامونيوم، كلوريدات الامونيوم، خلاصة اللحم، خلاصة الخميرة، اليوريا، تربتون كلاً على انفراد ولقح بعد التعقيم ب (5 مل) من خميرة *R. mucilagenosa* M. المطفرة كيميائياً، بحيث يحوي (1مل) على 10^7 خلية. حضنت الدوارق لمدة 5 ايام في حاضنة هزازة بعدد دورات 150 دورة/ دقيقة مع مراعاة الظروف المثلى المستحصل عليها من التجربة السابقة.

درجة الحرارة المثلى OPTIMAL TEMPERATURE:

لقحت دوارق حجم (250 مل) حاوية (100مل) من الوسط بعد التعقيم ب (5 مل) من خميرة *R. mucilagenosa* M. المطفرة كيميائياً، إذ يحوي (1 مل) على 10^7 خلية، وحضنت بدرجات حرارية مختلفة شملت (20، 25، 30 ، 35،40 و 45)° م في حاضنة هزازة بعدد دورات 150 دورة /دقيقة لمدة 5 ايام مع مراعاة الظروف المستحصل عليها من التجارب السابقة.

مدة الحضن INCUBATION TIME:

لقحت دوارق حجم (250 مل) حاوية (100مل) من الوسط بعد التعقيم ب (5 مل) من خميرة *R. mucilagenosa* M. المطفرة كيميائياً، إذ يحوي (1مل) على 10^7 خلية، حضنت الدوارق في حاضنة هزازة لفترات مختلفة شملت (24، 48، 72، 96، 120, 144، 168) ساعة مع مراعاة الظروف المثلى المستحصل عليها من التجارب السابقة.

التهوية AGITATION:

لقحت دوارق حجم (250 مل) حاوية (100مل) من الوسط بعد التعقيم بـ (5 مل) من خميرة *R. mucilagenosa* .M المطفرة كيميائياً، إذ يحوي (1مل) على 10^7 خلية، حضنت الدوارق في حاضنة الهزازة بعدد دورات مختلفة شملت (100، 150، 200، 250، 300) دورة/ دقيقة مع مراعاة الظروف المستحصل عليها من التجارب السابقة.

الرقم الهيدروجيني pH:

لقحت دوارق حجم (250 مل) حاوية (100مل) من الوسط بعد التعقيم بـ (5 مل) من خميرة *R. mucilagenosa* .M المطفرة كيميائياً، إذ يحوي (1مل) على 10^7 خلية، بأرقام هيدروجينية مختلفة شملت (3، 4، 5، 6، 7 و8) مع مراعاة الظروف المثلى المستحصل عليها من التجارب السابقة.

حجم اللقاح THE SIZE OF THE INCULUM:

لقحت دوارق حجم (250 مل) حاوية (100مل) من الوسط بعد التعقيم بـ (5 مل) من خميرة *R. mucilagenosa* .M المطفرة كيميائياً، إذ يحوي (1مل) على 10^7 خلية، لقحت بحجوم لقاح مختلفة شملت (1، 2، 3، 4، 5 ، 6، 7، 8، 9 و 10)% مع مراعاة الظروف المثلى المستحصل عليها من التجارب السابقة.

قدرت كمية الكاروتينويدات المنتجة من جميع تجارب الظروف المثلى حسب الطريقة المذكورة من قبل **Park *et al.* (2005)** في استخلاص الكاروتينويدات من مزرعة التخمير، بإجراء عملية النبذ المركزي عند 3500 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة، تم التخلص من الراشح وغسل الراسب مرتين بالماء المقطر، ثم تم التخلص من ماء الغسل بالنبذ المركزي بعد كل عملية غسل. أضيف بعدها (10 مل) من محلول (0.5) عياري من حامض الهيدروكلوريك لراسب الخلايا، وسخن في حمام مائي على بدرجة حرارة (100م) لمدة (10) دقائق، ثم برد في الماء المثلج لمدة (10) دقائق، ثم اجريت عملية استخلاص الصبغات باستعمال كميات معلومة ومحددة من الأسيتون أضيفت إلى عالق الخلايا مع التحريك بقوة، لضمان تحطيم الخلايا والاستخلاص الكامل للصبغات، أضيفت كميات إضافية من الأسيتون للتأكد من إكمال عملية الاستخلاص وتحول الخلايا إلى عديمة اللون. ثم أضيفت كميات من الهكسان مساوية لكمية الأسيتون المستخدم، ولفصل طبقة الاسيتون عن الهكسان أضيف محلول كلوريد الصوديوم البارد (15%)، ثم نقلت المكونات إلى قمع فصل وأخذت طبقة الهكسان وقيست الكثافة الضوئية عند طول موجي 450 نانومتر بجهاز المطياف الضوئي UV light visible Spectrophotometer، وتم قياس كمية الصبغات المنتجة بالاعتماد على المنحنى القياسي للبيتا- كاروتين المحضر مسبقاً والموضح ادناه.

تحضير المنحنى القياسي للبيتا- كاروتين:

حضر المنحنى القياسي للبيتا- كاروتين القياسي بتراكيز متدرجة شملت (6، 12، 18، 24، 30، 36 ، 42، 48) مايكروغرام/ مل، اذ حضر المحلول القياسي بوزن (0.5 غرام) من البيتا- كاروتين القياسي في دورق حجمي، أذيبت الكمية باستعمال قليل من الهكسان في دورق حجمي سعة (100 مل) وبعد تمام الذوبان أكمل الحجم إلى العلامة، سمي بالمحلول (A)، ثم سحب مقدار(1مل) منه إلى دورق حجمي آخر سعة (100 مل) واكمل الحجم إلى العلامة باستعمال الهكسان ثم مزجت الكمية بصورة جيدة لتحضير المحلول (B) اذ ان كل (1 مل) من المحلول B يحتوي (50 مايكروغرام) من البيتا- كاروتين القياسي، بعدها تم تحضير مجموعة من التخافيف بالتراكيز المذكورة اعلاه واكمل الحجم بالهكسان وكما مبين في (جدول، 1):

جدول(1): تحضير تخافيف المنحنى القياسي للبيتا كاروتين.

التركيز مايكروغرام/ مل	محلول B(مل)	هكسان (مل)	الامتصاصية 450 نانوميتر
6	12	88	0.194
12	24	76	0.394
18	36	64	0.580
24	48	52	0.772
30	60	40	0.962
36	72	28	1.148
42	84	16	1.332
48	96	4	1.520

قرأت بعدها الامتصاصيةعلى طول موجي 450 نانومتر ورسم المنحنى القياسي كما في (الشكل، 1) ، وطبق القانون التالي لحساب كمية الكاروتين الكلية:

$$M= (RFV_S * 1000) / V_S$$

اذ ان :

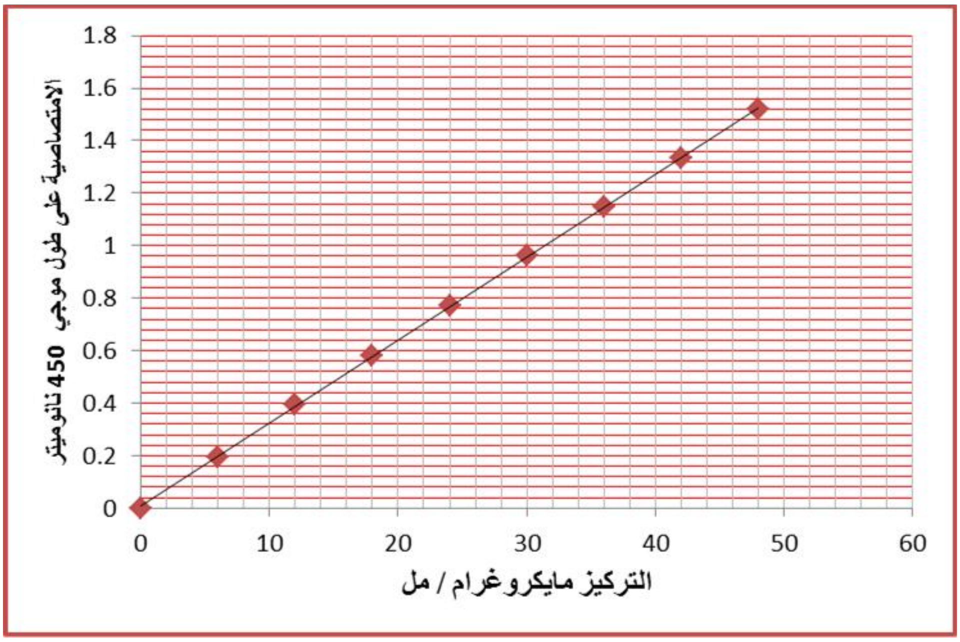
M= كمية الكاروتين الكلي (مايكروغرام/ لتر)

R= قراءة المطياف الضوئي(نانوميتر)

F= معامل قيمته 4.80 مايكروغرام كاروتين/ مل مذيب

V_S= حجم المذيب الكلي(مل)

V_C= حجم المزرعة (مل)



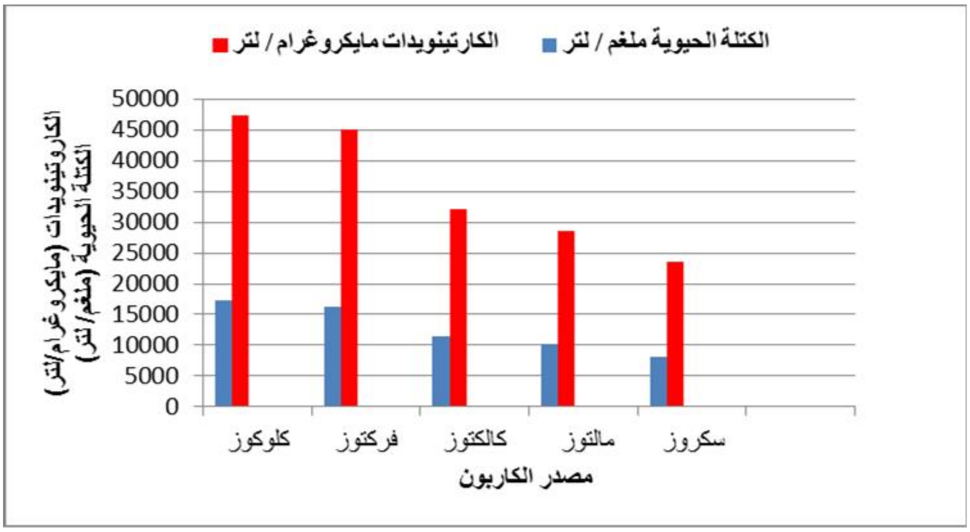
شكل (1): المنحنى القياسي لتقدير البيتا كاروتين القياسي.

النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION:

درست بعض العوامل المؤثرة في إنتاج الكاروتينويدات من خميرة M. *R. mucilogenosa* المطفرة والتي تتضمن ما يتعلق بتركيب الوسط الزرعي فضلاً عن العديد من العوامل البيئية المؤثرة، وذلك لتحديد أفضل الظروف التي يمكن من خلالها الوصول إلى الإنتاجية الأكفأ من الصبغة، أشار **Sakaki *et al.*, (1999)** بأن عملية تخليق الكاروتينويدات في الخمائر تتأثر بالعديد من العوامل المتعلقة بظروف الوسط والعوامل البيئية.

مصدر الكاربون CARBON SOURCE :

يوضح (الشكل، 2) تاثير مصدر الكاربون في انتاجية خميرة M. *R. mucilogenosa* المطفرة من الكاروتينويدات، باستعمال مصادر كاربونية شملت الكلوكوز والفركتوز والكالكتوز والمالتوز والسكروز واللاكتوز، حيث اعطت الخميرة اعلى انتاجية عند استعمال الكلوكوز مصدراً للكاربون، يليه الفركتوز فالكالكتوز والمالتوز واخيراً السكروز بكميات بلغت 47430 و 45120 و32120 و 28650 و23550 مايكروغرام/ لتر على التوالي، في حين لم يعطي اي نمو باستعمال اللاكتوز، كما يلاحظ زيادة معدل نمو الخميرة ايضاً عند استعمال الكلوكوز مصدراً للكاربون إذ بلغت الكتلة الحيوية الجافة في نهاية مدة الحضن والبالغة 5 ايام 17.2 غم/ لتر، مما يشير الى ان السكريات سريعة الاستهلاك مثل الكلوكوز يعزز من سرعة نمو الخلية وزيادة الكتلة الحيوية والذي يتناسب طردياً مع كمية الكاروتينويدات المنتجة.



شكل(2): تاثير مصادر كاربونية مختلفة في الكتلة الحيوية وانتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula* M . *mucilagenosa*.

هناك العديد من الدراسات التي تؤكد ايضاً على ان الكلوكوز هو افضل مصدر كاربوني لإنتاج الكاروتينويدات من الخميرة اضافة لكونه يشجع على النمو ويحدث زيادة في الكتلة الحيوية، حيث اوجد **Chanchay *et al.* (2012)** ان الكلوكوز هو افضل مصدر كاربوني لانتاج كاروتينويدات، كما اشار الى ان الزيادة في تركيز السكر في وسط النمو يزيد من نمو الخميرة وتخليق الكاروتينويدات.

كما أكد **Voaides and Dima, (2011)** أن الكلوكوز افضل مصدر كاربوني للنمو وإنتاج الصبغة بالمقارنة مع المصادر الكاربونية الاخرى المختبرة. كما وجد **Ferrao & Garg, (2011)** أن أفضل مصدر للنمو وأنتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula* sp. هو الكلوكوز، في حين وجد **Ferdes *et al.* (2011)** ان خميرة *Rhodotorula rubra* ICCF 209 تعطي اعلى انتاجية من الكاروتينويدات عند استعمال الكلوكوز أو الفركتوز مصدراً للكاربون مقارنة مع السكروز الذي اعطى نسبة منخفضة تحت ظروف التنمية نفسها.

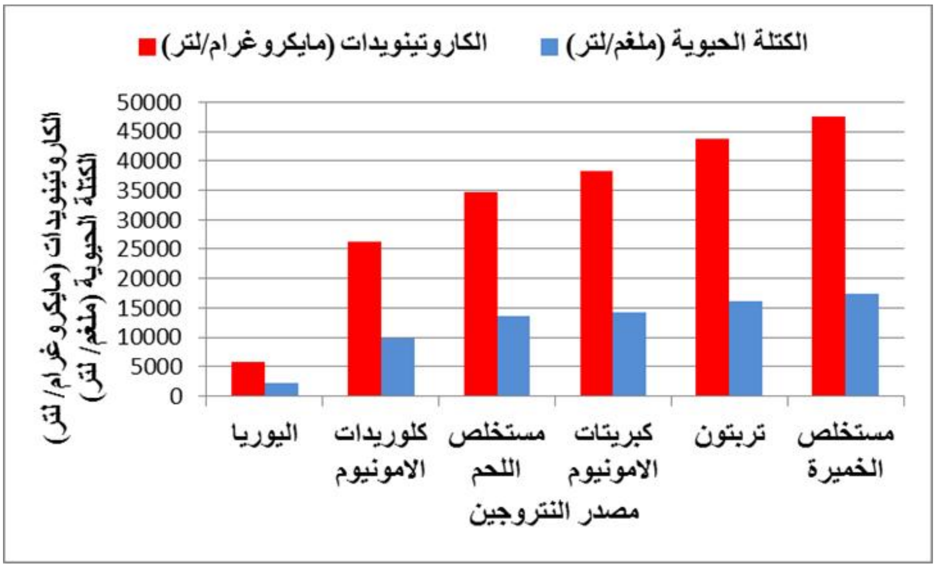
اشار **Latha & Jeevaratnam, (2010)** الى ان افضل مصدر كاربون للنمو وانتاج الكاروتينويدات هو الفركتوز ويليه الكلوكوز والكالكتوز، اما اللاكتوز فانه لم يعطي أي نمو لخلايا الخميرة إذ أشار الباحثين الى ان الخمائر المحللة لسكر اللاكتوز نادرة جداً تحت الظروف الطبيعية وان خميرة *R. lactis* هي النوع الوحيد الذي يستطيع أن يهضم اللاكتوز من بين 163 سلالة من خميرة *Rhodotorula*. وجد **Choudhari & Singhal, (2008)** ان الكلوكوز والفركتوز هما افضل مصدري كاربون لإنتاج البيتا- كاروتين من *Blakeslea trispora* .

مصدر النتروجين NITROGEN SOURCE:

يعد عنصر النتروجين من العناصر الأساسية والمهمة في بناء الخلايا ونموها وتكوين الكتلة الحيوية حيث لا يمكن الحصول على كتلة حيوية مناسبة وبالتالي إنتاج المادة المطلوبة بدون إضافة مصدر نتروجيني إلى وسط التنمية .يدخل النتروجين في تركيب الأحماض الأمينية والقواعد النتروجينية وبعض الفيتامينات **(Chanchay *et al.*, 2012).**

يوضح (الشكل، 3) ان افضل مصدر نتروجيني لانتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula* M. *mucilogenosa* هو مستخلص الخميرة ويليه التربتون اذ بلغت اعلى كمية من الكاروتينويدات المنتجة 47460 و 43850 مايكروغرام/ لتر وكمية الكتلة الحيوية 17.4 و 16.1 غم/ لتر على التوالي، وقد يعود السبب في ذلك لكون مستخلص الخميرة ليس فقط مصدراً للنيتروجين وانما يوفر متطلبات الكائن المجهري من العناصر الدقيقة بما فيها الفيتامينات التي تحتاجها الخميرة للنمو والانتاج **(Ferrao & Garg, 2011).**

اوجد **Chanchay *et al.* (2012)** أيضاً ان افضل مصدر نتروجيني لإنتاج الكاروتينويدات كان مستخلص الخميرة إذ بلغت اعلى انتاجية (30.39 ميكروغرام/ غرام) من وزن الخلية الجاف.

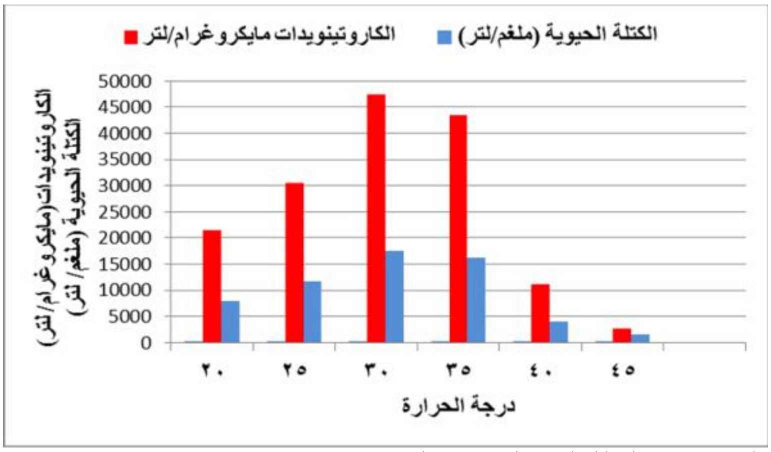


شكل (3): تاثير مصادر نتروجينية مختلفة في الكتلة الحيوية وانتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula mucilagenosa* M.

في حين وجد **Latha & Jeevaratnam, (2010)** ان نترات الصوديوم هو افضل مصدر نتروجيني لإنتاج الكاروتينويدات وبلغت كميتها 3.3 ملغم/ لتر عند تنمية خميرة *R. glutinis* PDY-DFR .
وجد **Ferrao & Garg, (2011)** ان اعلى انتاجية للكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula graminis* RCO4 باستعمال مصادر نتروجين لاعضوية كان عند اضافة نترات البوتاسيوم مصدراً للنيتروجين حيث اعطى نمواً جيداً اضافة الى انتاجية جيدة من البيتا- كاروتين في حين انخفض مستوى النمو ومستوى انتاج البيتا- كاروتين عند استعمال نترات الصوديوم ونترات الكالسيوم مصدراً للنتروجين كلاً على انفراد، واشار الى ان اعلى انتاجية للكاروتينويدات من خميرة *R.graminis* RCO4 كانت باستعمال نترات البوتاسيوم مصدراً للنتروجين، في حين وجد ان مستخلص الخميرة من بين المصادر العضوية التي اعطت اعلى انتاجية من الكاروتينويدات مع اعلى تراكم للكتلة الحيوية.

تأثير درجة الحرارة EFFECT OF TEMPERATURE:

تعد درجة حرارة الحضن عامل مهم يؤثر على كلا من النمو وانتاج الكاروتينويدات من سلالات الخمائر، ويوضح (الشكل، 4) ارتفاع نسبة الكاروتينويدات المنتجة مع ارتفاع درجة الحرارة لحين الوصول الى درجة حرارة 30 °م والتي تمثل الحرارة المثلى للانتاج اذ بلغت كمية الكاروتينويدات المنتجة 47470 مايكروغرام/ لتر والكتلة الحيوية الجافة (17.5 غم/لتر) وارتفاع درجة الحرارة عن 30° م رافقها انخفاض في الكمية المنتجة من الكاروتينويدات، وقد يعزى ذلك الى تأثر الانزيمات المشتركة في عملية الانتاج الحيوي للكاروتينويدات بارتفاع درجة الحرارة مما يؤثر سلباً على كمية الكاروتينويدات المنتجة.



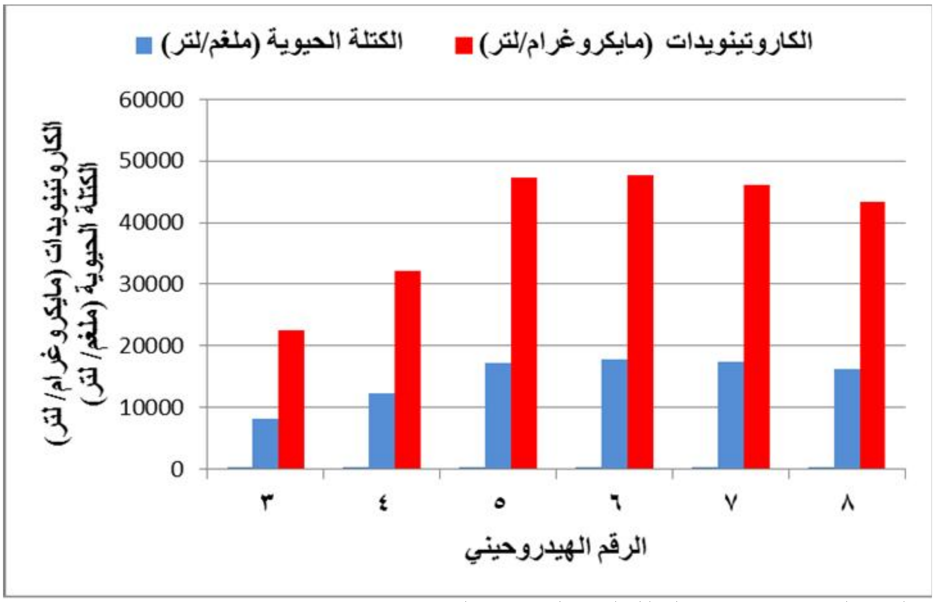
شكل (4): تأثير درجة الحرارة في الكتلة الحيوية وانتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula mucilagenosa* M

اشار **Latha & Jeevaratnam, (2010)** الى تأثير درجة الحرارة في فعالية ونشاط الأحياء المجهرية حيث أنها تؤثرعلى كل من النمو والأيض والفعاليات الأنزيمية والأنشطة الحيوية لأنواع الخمائر المختلفة. ويعتمد تأثير درجة الحرارة على الخمائر المنتجة للكاروتينويدات على النوع بصورة خاصة وخصائص سلالات الاحياء المجهرية. واشار **Bhosale & Gadre, (2002)** الى ان درجة الحرارة تؤثر في نسبة الكاروتينويدات المنتجة وبالتالي في لون الخلايا، كما اشار الى ان زيادة درجة الحرارة الى اكثر من 30°م يزيد من محتوى البيتا- كاروتين ويخفض محتوى كل من التورولين والتورولارودين.

تأثير الرقم الهيدروجيني EFFECT OF pH:

تتميز الخمائر بحساسية عالية للتغير في قيمة الرقم الهيدروجيني، وبالتالي تتأثر كمية الكاروتينويدات المنتجة بتغير الرقم الهيدروجيني للوسط، وعليه يعد تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لأنتاج الكاروتينويدات خطوة مهمة في عملية الانتاج **(Omar, 2006)**. يبين (الشكل، 5) تأثير الرقم الهيدروجيني على انتاج الكتلة الحيوية وبالتالي انتاج الكاروتينويدات، اذ وجد ان افضل رقم هيدروجيني هو 6، حيث بلغت كمية الكاروتينويدات والكتلة الحيوية 47670 مايكروغرام / لتر و 17.7 غم/ لتر على التوالي.

يوضح (الشكل، 5) الزيادة الحاصلة في كمية الكاروتينويدات مع ارتفاع الرقم الهيدروجيني وصولاً الى الرقم الهيدروجيني الامثل 6، كما شهدت هذه القيم انخفاضاً كلما ابتعد الرقم الهيدروجيني عن هذه القيمة صعوداً او نزولاً، وقد يعزى السبب في ذلك الى ان درجة حموضة وسط التخمير تعد أحد العوامل المهمة والمؤثرة في عمل الأنظمة الأنزيمية ومعدل النمو لمختلف الأحياء المجهرية ومنها الخمائر.



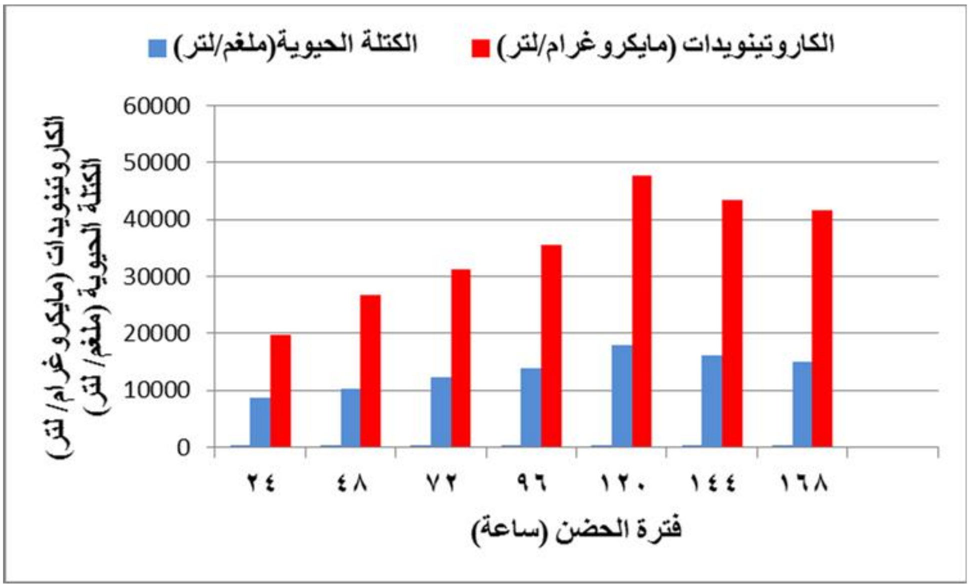
شكل (5): تأثير الرقم الهيدروجيني في الكتلة الحيوية وانتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula mucilogenosa* M.

كانت نتيجة هذه الدراسة قريبة لما توصل اليه **Nasrabadi & Razavi, (2011)** عند تنمية الخميرة المطفرة *Rhodotorula acheniorum* في الشرش المفلتر اذ وجد ان اعلى انتاجية للكاروتينويدات حصل عليها عند رقم هيدروجيني 5.85 بمقدار 262.12 ملغم/ لتر، ومتطابقة مع ما وجده **Yimyoo *et al.* (2011)** في ان اعلى انتاج للكاروتينويدات تم الحصول عليه من خميرة *Rhodosporidium paludigenum* كان عند رقم هيدروجيني 6 .أشارت النتائج التي توصل اليها **Kanzy *et al.* (2015)** إلى أنه مع رفع الرقم الهيدروجيني يزداد إنتاج الكاروتينويدات الكلية بشكل كبير وصولاً إلى اعلى انتاجية عند رقم هيدروجيني 6.6. كما وجد كلاً من **Aksu & Eren, (2005)** و **Aksu & Eren, (2007)** أن أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج الكاروتينويدات كان 7 من خميرة *R. mucilagenosa* (Y 17485) و 6 من خميرة *R. glutinis* . اشار **Voaides & Dima, (2011)** الى ان قيمة الرقم الهيدروجيني لوسط النمو لاتؤثر فقط في فعالية التخليق الحيوي للوسط وإنما تؤثر ايضاً في معدل النمو. وأشارت التجارب الى أن درجة الحموضة المثلى لإنتاج الكاروتينويدات الأولية هي 6– 6.5، وان هذه القيم تنخفض لتصل الى 1 –2 أثناء عملية تشكيل الكاروتينويدات، تؤكد هذه النتائج ان السلوك العام للخمائر هو تفضيلها للحامضية القليلة القريبة من 6، لوحظ ان الارقام الهيدروجينية المنخفضة تحدث تأخر في مرحلة التأقلم lag phase وخفض معدل النمو.

اكد كلاً من **Aksu & Eren, (2005)** و **Choudhari & Singhal, (2008)** و **Maldonad *et al*. (2008)** أنه مع زيادة الرقم الهيدروجيني ترتفع معدلات النمو وإنتاج الكاروتينويدات وتصل حدها الاقصى في رقم هيدروجيني يتراوح بين 6.8- 7 مع اعلى قيم للكتلة الحيوية الجافة.كما توصل **Mihalcea *et al.* (2011)** الى ان الرقم الهيدروجيني الامثل للنمو وانتاج الكاروتينويدات من خميرة *R.rubra* هو 5 وجاءت نتائجه متوافقة مع ما وجده **Naghavi *et al.* (2013)** في ان الرقم الهيدروجيني الافضل لنمو وانتاج الكاروتينويدات من خميرة *R.mucilaginosa* هو 5.

تأثير فترة الحضن EFFECT OF INCUBATION TIME:

يبين (الشكل، 6) تأثيرمدة الحضن على معدل النمو وانتاج الكاروتينويدات من قبل خميرة *R. mucilaginosa* M. حيث نلاحظ حصول الزيادة التدريجية للكاروتينويدات المنتجة والكتلة الحيوية مع ازدياد مدة الحضن وصولاً الى 120 ساعة حيث اعطت اعلى انتاج من الكاروتينويدات والكتلة الحيوية بلغ 47590 مايكروغرام/ لتر و 17.8غم/ لترعلى التوالي.

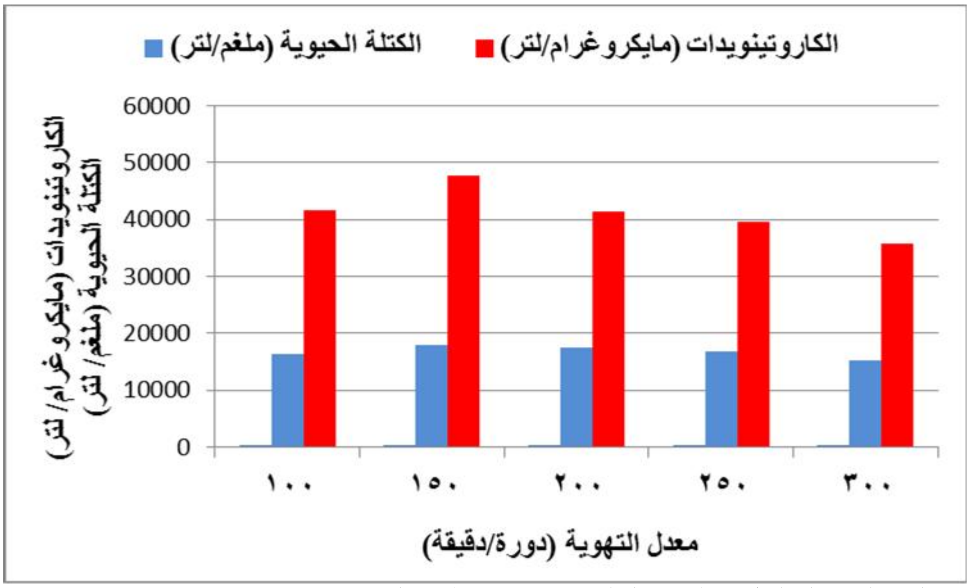


شكل(6): تأثيــر مدة الحضن فــي الكتلة الحيوية وانتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula mucilagenosa* M.

تطابقت نتيجة هذه الدراسة مع ماتوصل اليه **Kanzy *et al.* (2015)** عند مقارنة نمو سلالات خميرة *Rhodotorula* sp. حيث وجدوا أن انتاج الكاروتينويدات الكلية والنمو من سلالات الخميرة ازداد بشكل كبير بعد 120 ساعة من الحضن وانخفضت بشكل ملحوظ بعد 144 ساعة، واكد **El-Banna *et al.* (2012)** أن إنتاج الكاروتينويدات من خميرة *R. glutinis* RCMB 028001 يبدأ بعد نهاية مرحلة النمو اللوغاريتمي، ثم يزداد خلال مرحلة الثبات ليصل إلى الحد الأقصى في اليوم الخامس. أشار **Omar, (2006)** الى ان سبب انخفاض كمية الكاروتينويدات بزيادة مدة التخمير يعود الى زيادة تركيز بعض المواد الوسطية الناتجة عن تمثيل المواد الغذائية الموجودة في الوسط المغذي والتي تؤثر ايضاً في الانتاج. كما أكد **Banzatto *et al.* (2013)** ان خلال 24 ساعة الأولى من الحضن اظهرت الخمائر نمواً سريعاً وبعدها بدأت تتجه نحو الثباتية و هذه هي المرحلة التي كان فيها أعلى إنتاج من الكاروتينويدات بسبب التغيرات الأيضية من النمو الحيوي الى انتاج الاصباغ .

تأثير معدل التهوية EFFECT OF AGITATION:

يبين (الشكل،7) تأثير معدلات التهوية على كلاً من انتاج الكاروتينويدات والنمو من خميرة *R. mucilagenosa* M. إذ وجد ان افضل انتاج من الكاروتينويدات والكتلة الحيوية قد تم الحصول عليه عند معدل تهوية 150 دورة/ دقيقة حيث بلغت 47610 مايكروغرام/ لتر و 18غم/ لتر على التوالي.



شكل (7): تأثير التهوية في الكتة الحيوية وكمية الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilagenosa* M.

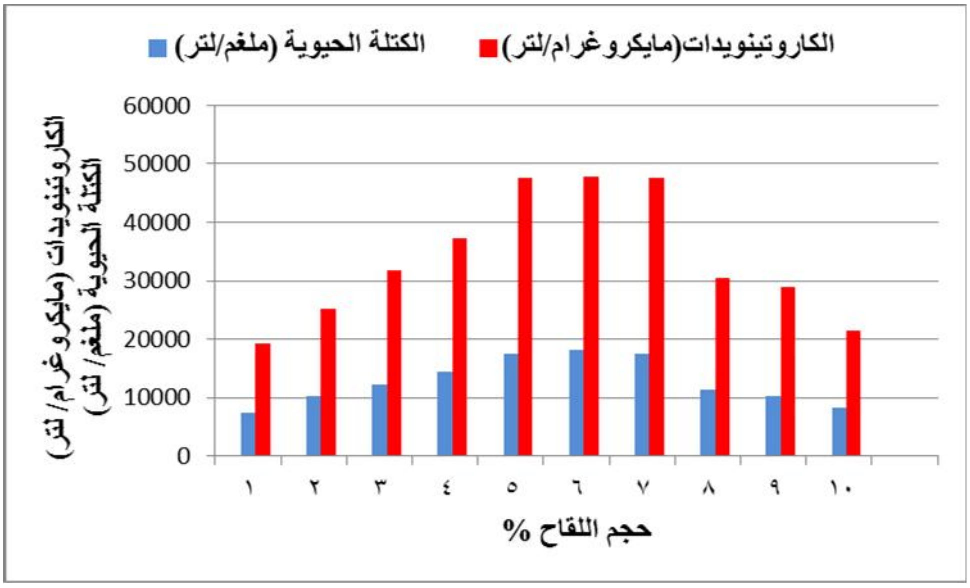
اذ يلاحظ من الشكل ارتفاع كمية الكاروتينويدات المنتجة والكتلة الحيوية مع ارتفاع معدل التهوية وصولاً الى 150 دورة/ دقيقة، حيث كلما ازدادت سرعة الدوران يزداد الاوكسجين الذائب في الوسط وبالتالي يزداد النمو وانتاج الكاروتينويدات من الخميرة، حيث أن لسرعة الدوران أهمية بالغة في خلط مكونات الوسط وتوفير المغذيات والأوكسجين للخلايا النامية لتتمكن من إداء فعالياتها الأيضية ونشاطها الحيوي على أكمل وجه. وبالمثل كلما ازدادت سرعة الدوران عن القيمة المثلى سوف ينخفض انتاج الكاروتينويدات والكتلة الحيوية ويعود السبب في ذلك الى ان سرعة الخلط العالية تؤدي الى تكوين قوى قص عالية وبالتالي اصطدام الخلايا في جداران المخمر مما يؤدي الى ضرر الخلايا وبالتالي موت الخلية ونضوح مكوناتها الخلوية بما فيها الكاروتينويدات الى وسط الانتاج.

اتفقت نتيجة هذه الدراسة مع ماتوصل اليه **Korumilli, (2014)** حيث وجد ان افضل انتاج للكاروتينويدات والكتلة الحيوية كان عند سرعة 150 دورة/ دقيقة. تعد خميرة *Rhodotorula.sp* من الأحياء المجهرية الهوائية وتعتمد في انتاجها على الطاقة والتخليق الحيوي على الاوكسجين ومن هنا جاءت اهمية تهوية وسط التخمير لإنجاح عملية التخمير.

حجم اللقاح THE SIZE OF THE VACCINE :

يعد حجم اللقاح من العوامل المهمة في أي عملية إنتاج حيوي وذلك لضمان الحصول على أعلى إنتاجية فضلاً عن اختصار الفترة الزمنية اللازمة للوصول إلى مرحلة الإنتاج النهائي. إذ يعتبر تحضير اللقاح بالحجم المناسب اساساً لإنتاج الكاروتينويدات بواسطة عملية التخمير، اذ يعتمد نمو الخمائر وانتاجها على اللقاح من الناحية الكمية والنوعية، وان مكونات الوسط الغذائي المستخدم لتحضير اللقاحات تختلف عن مكونات الوسط الانتاجي، فاللقاحات يجب ان تنمى في اوساط غذائية غنية لغرض ضمان الوصول الى حالة فسيولوجية جيدة، وبطبيعة الحال فان اللقاح يحضر على عدة مراحل ثم ينقل بعد ذلك الى المخمرات الانتاجية في ظروف معقمة **(Al-Haidari & Al-Musallah, 1989 ; Al-Khafaji, 1990).**

ويبين (الشكل، 8) تأثير استخدام حجوم لقاح مختلفة على انتاج الكاروتينويدات والكتلة الحيوية المنتجة من خميرة *R mucilagenosa* M. اذ تم الحصول على أعلى انتاجية من الكاروتينويدات والكتلة الحيوية عند حجم لقاح (6%) اذ بلغت الكمية المنتجة (47730/ لتر) و (18.2 غم/ لتر) على التوالي. تطابقت نتيجة هذه الدراسة مع ما توصل اليه **Frengova *et al.* (1994)** أذ وجد ان في جميع أوساط التخمر التي درس حجم اللقاح الأمثل معها كانت ذات أعلى إنتاجية مع حجم لقاح مستخدم بلغ (6 %).



شكل (8): تأثير استخدام حجوم لقاح مختلفة على انتاج الكاروتينويدات والكتلة الحيوية المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilagenosa* M.

يلاحظ من خلال الشكل ازدياد كمية الكاروتينويدات المنتجة والكتلة الحيوية مع ازدياد حجم اللقاح وصولاً الى حجم اللقاح الامثل 6 %، اذ يلاحظ من الشكل حدوث انخفاضاً واضحاً في كمية الكاروتينويدات المنتجة والكتلة الحيوية عند 1 % و2 % كحجم لقاح مستخدم في عملية التخمير، وقد يعود ذلك الى عدم التناسب بين حجم اللقاح إلى حجم وسط التخمر وبذلك سوف يحتاج اللقاح فترة طويلة لتكوين الأعداد المطلوبة لإنتاج الكتلة الحيوية للخلايا والتي من خلالها نحصل على اعلى إنتاجية للكاروتينويدات، وكلما ازدات المدة التي يحتاجها اللقاح لزيادة العدد ستؤدي إلى استهلاك معظم المواد اللازمة للنمو والتكاثر دون الوصول إلى أعداد الخلايا المطلوبة للإنتاج، وقد وجد ايضاً انه بالابتعاد عن هذه النسبة صعوداً يحدث انخفاض شديد في كمية الكاروتينويدات المنتجة والكتلة الحيوية ويعود السبب في ذلك الانخفاض إلى حدوث التنافس الشديد بين الخلايا للحصول على الأوكسجين والمغذيات وعوامل النمو في وسط التخمر واستهلاك معظم المواد الموجودة في الوسط، الأمر الذي قد يؤدي الى تغير سريع في ظروف وسط التخمر فتصبح غير ملائمة لعملية الإنتاج.

ان حجم العملية الانتاجية هو الذي يحدد كمية اللقاح الواجب إضافته، كما تتحدد كمية اللقاح المضاف بنوع الكائن الحي المستخدم، وتختلف كمية الكاروتينويدات المنتجة باختلاف حجم اللقاح فقد وجد ان الحجم المثالي للانتاج هو (10 مل) من خميرة *R. mucilaginosa* **(Maldonade *et al.*, 2012)**، بينما وجد **Govindaswamy *et al.* (1999)** ان حجم اللقاح الامثل لإنتاج الكاروتينويدات من خميرة *R. gracilis* هو (2 مل). كما وجد **Hamidi *et al.* (2014)** ان (2 مل) هو افضل حجم لقاح لإنتاج الكاروتينويدات من *Halorubrum* sp. .

المصادر REFERENCES:

I. Ahmed, Z. A., & EL-Shammari, E. I. (2017). *Production of carotenoids from locally isolated Rhodotorula mucilaginosa yeast* (under publication).
II. Aksu, Z., & Eren, A. T. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Pro. Bio*, *40*, 2985-2991.
III. Aksu, Z., & Eren, A. T. (2007). Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Bio. Eng. J.*, *35*, 107-13.
IV. Al-Haidari, N. K., & Al-Musallah, R. M. (1998). *Industrial Microbiology*, First Edition, University of Baghdad.
V. An, G. H., Schuman, D. B., & Johnson, E. A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *App. and enviro. Micro.*, *55*, 116-124.

VI. Banzatto, D., Freita, L. A. D., & Mutton, M. J. R. (2013). Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. *F. Sci. and Techno. (Campinas), 33*, 14-18.

VII. Bhosale, P., & Gadre, R. V. (2002). Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced β-carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. *Lett. in App. Micro., 34*, 349-353.

VIII. Chanchay, N., Sirisansaneeyakul, S., Chaiyasut, C., & Poosaran, N. (2012). Optimal conditions for carotenoid production and antioxidation characteristics by *Rhodotorula rubra*. *Int.Sch. and Sci. Re & In., 6*, 621-625.

IX. Choudhari, S., & Singhal, R. (2008). Media optimization for the production of β-carotene by *Blakeslea trispora*: A statistical approach. *Bio. Tech., 99*, 722-730.

X. El-Banna, A. A., Abd El-Razek, A. M., & El-Mahdy, A. R. (2012). Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *F.and Nut. Sci., 3*, 64-71.

XI. EL-Khafaji, Z. (1990). *Biotechnology*. Dar Al-Hikma for Printing and Publishing, EL-Mosul.

XII. Ferdes, M., Ungureanu, C., Mihalcea, A., Chirvase, A. A., & Mocanu, E. (2011). The influence of the carbon source on torularhodin pigment biosynthesis. *Rev. Chim., 62*, 339-343.

XIII. Ferrao, M., & Garg, S. (2011). Studies on effect of media components on growth and β-carotene production by *Rhodotorula graminis* RC04. *J.of Ce. and Ti. Res., 11*, 2551-2556.

XIV. Frengova, G. I., Simova, E. D., & Beshkova, D. M. (1995). Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co cultivated with lacto acid bacteria in whey ultrafiltrate. *Bio. Le., 17*, 1001-1006.

XV. Frengova, G., Simova, E., Pavlova, K., Beshkova, D., & Grigorova, D. (1994). Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biot.and Bioen., 44*, 888-894.

XVI. Govindaswamy, V., Vasudevan, V., & Divakar, S. (1999). Optimisation of growth parameters for the production of carotenoids by *Rhodotorula gracilis*. *Zeit. für Leb.und For. A., 208*, 121-124.

XVII. Hamidi, M., Abdin, M. Z., Nazemyieh, H., Hejazi, M. A., & Hejazi, M. S. (2014). Optimization of Total Carotenoid Production by *Halorubrum* sp. TBZ126 using response surface methodology. *J. Micro. Techl., 6*, 286-294.

XVIII. Kanzy, H. M., Nasr, N. F., El-Shazly, H. A. M., & Barakat, O. S. (2015). Optimization of carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. *Int. J. Curr. Microbiol. and App. Sci., 4*, 456-469.

XIX. Korumilli, T. (2014). Studies on Pigment Production by Microorganisms Using Raw Materials of Agro Industrial Origin. Citeseer.

XX. Korumilli, T., & Susmita, M. (2014). Carotenoid production by *Rhodotorula sp*. on fruit waste extract as a sole carbon source and optimization of key parameters. *Ira. J. of Che. and Che. Eng*. (IJCCE), *33*, 89-99.

XXI. Latha, B .V., & Jeevaratnam, K. (2010**)**. Purification and characterization of the pigments from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY isolated from natural source. *Glo. J. of Biote & Bioch, 5*, 166-174.

XXII. Maldonade, I. R., Rodriguez-Amaya, D. B., & Scamparini, A. R. P. (2008**)**. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Che., 107*, 145-50.

XXIII. Maldonade, I. R., Rodriguez-Amaya, D. B., & Scamparini, A. R. P. (2012). Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa. Bra. J.of Micro., 43*, 109-115.

XXIV. Mihalcea, A., Ungureanu, C., Ferdes, M., Chirvase, A., & Tanase, C. (2011). The influence of operating conditions on the growth of the yeast *Rhodotorula rubra* ICCF 209 and on *Torularhodin formation*. *Rev. Chim. Bucharest., 26*, 659-665.

XXV. Naghavi, F. S., Hanachi, P., Soudi, M. R., Saboora, A., & Ghorbani, A. (2013). Evaluation of the relationship between the incubation time and carotenoid production in *Rhodotorula slooffiae* and *R. mucilaginosa* isolated from leather tanning wastewater. *Ira. J. of Ba. Me. Sci., 16*, 1114-1118.

XXVI. Nasrabadi, M. R. N., & Razavi, S. H. (2011). Optimization of β-carotene production by a mutant of the lactose positive yeas*t Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate. *Food Sci. and Biote*., *20*, 445-454.

XXVII. Omar, A. (2006). *Production of Enzymes of Fungi from Fungi and Their Purification and use in Some Applied Fields*. PhD Thesis, Damascus University, Faculty of Agriculture, Department of Food Science.

XXVIII. Park, P. K., Cho, D. H., Kim, E. Y., & Chu, K. H. (2005). Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. *W. J. of Micr. and Bio., 21*, 429-34.

XXIX. Sakaki, H., Nochide, H., Nakanishi, T., Miki, W., Fujita, T., & Komemushi, S. (1999). Effect of culture condition on the biosynthesis of carotenoids in *Rhodotorula glutinis* no 21. *Sci., 77*, 55-59.

XXX. Squina, F. M., Yamashita, F, Pereira1, J. L., & Mercadante, A. Z. (2002). Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *R. glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. *F. Bio., 16*, 227-235.

XXXI. Voaides, C., & Dima, R. (2011). Effect of carbon source on carotenoid production by *Rhodotorula sp. Ar. Zoo*., *14*, 75-83.

XXXII. Yimyoo, T., Yongmanitchai, W., & Limtong, S. (2011). Carotenoid production by *Rhodosporidium paludigenum* DMKU3-LPK4 using glycerol as the carbon source. *J. Nat. Sci., 45*, 90-100.