إنتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* المعزولة محليا

CAROTENOIDS PRODUCTION FROM LOCAL ISOLATE *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*

زهراء عبد احمد[1] , د. الهام اسماعيل الشمري[2]

1- قسم علوم الاغذية, كلية الزراعة, جامعة بغداد, العراق zahraaorkeda@gmail.com

2- قسم علوم الاغذية, كلية الزراعة, جامعة بغداد, العراق Elhmfadhil@yahoo.com

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- Food Science Department, Colleg of Agriculture, University of Bhaghdad, Bhaghdad, Iraq, Elhmfadhil@yahoo.com

المستخلص

هدفت هذه الدراسة الى عزل خميرة *Rhodotorula mucilaginousa* المنتجة للكاروتينويدات وتشخيصها بالطرق الجزيئية. تم الحصول على 20 عزلة من مصادر مختلفة , خضعت العزلات الى غربلة كمية لإختيار العزلة الاكفأ في إنتاج الكاروتينويدات وأختيرت العزلة Z1 , شخصت جزيئياً وبنسبة تطابق بلغت 86 % مع الخميرة العالمية والمسجلة في بنك الجينات NCBI ID: KU609508.1 *Rhodotorula mucilaginousa*.

الكلمات المفتاحية : الكاروتينويدات, *Rhodotorula*, عزل, التشخيص الجزيئي

ABSTRACT

This study aimed to isolated *Rhodotorula mucilaginousa* which produce carotenoides and identified by molecular identification method . 20 Isolates of yeast were obtaind from different sources, These isolates were subjected to quantitave screening to selection the most efficient isolates in carotenoids production , Z1 isolate was select for the present study. This isolate was subject to molecular identification, This isolate was almost genetically identical 86% with *Rhodotorula mucilaginousa* ID: KU609508.1 .

Keyword: Carotenoids, *Rhodotorula*, isolated, molecular identification

- **مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول.**

المقدمة

تمتلك الكثير من الاحياء المجهرية القدرة على إنتاج أنواع مختلفة من الصبغات , ولكن عملية إنتاج معظم الصبغات المايكروبية لا تزال في مرحلة البحث والتطوير وقد بذلت الكثير من الجهود لتخفيض تكاليف إنتاج الصبغات المايكروبية مقارنة مع الصبغات الصناعية والصبغات المستخلصة من مصادر طبيعية أخرى عن طريق عزل احياء ذات قدرة عالية على الانتاج او توفير ظروف ملائمة واوساط رخيصة لعملية الانتاج Venil وآخرون (33) . اشار Aberoumand (1) الى ان الصبغات ذات الاصل المايكروبي تعد مصدر جيد، والاحياء المجهرية مصدرا واعدا للملونات الغذائية ومن اهم الصبغات التي انتجت من الاحياء المجهرية والاكثر اهمية هي الكاروتينويدات والفلافونويدات وبعض الزانثوفيليز, وتعد البيتا كاروتين هي الصبغة الاكثر استعمالا في الصناعات الغذائية والتي يتم الحصول عليها من الطحالب الدقيقة وبعض انواع البكتريا والخمائر. أشار Mortensen (25) الى ان انتاج الصبغات باستعمال الاحياء المجهرية بواسطة عملية التخمير من شانه ان يقدم حلولا لمشاكل الصناعات المختلفة وخاصة صناعة ملونات الغذاء .

أشار بعض الباحثين (4 و 11) الى امكانية انتاج الكاروتينويدات الطبيعية من قبل الاحياء المجهرية المختلفة بما في ذلك البكتريا والخمائر والفطريات الخيطية والطحالب الدقيقة, وتعد الخمائر اكثر ملائمة لانتاج الكاروتينويدات من الاحياء المجهرية الاخرى بالنظر لكونها كائنات وحيدة الخلية فضلا عن معدل نموها السريع وتتميز خميرة *Rhodotorula* التابعة للفطريات البازيدية والتي ينطوي تحتها اكثر من

35نوع بقدرتها على تخليق الكاروتينويدات Querol و Fleet (28) .
اشار Tinoi وآخرون (32) الى ان خمائر *Rhodotorula* المنتجة للكاروتينويدات هي *R.glutinis* و *R.gracilis* و *R.rubra* و *R.graminis*, والكاروتينويدات الرئيسية المنتجة هي تورولين و تورولورودين وبيتا كاروتين, كما اشار عدد من الباحثين (18, 21, 24) الى ان خمائر *Rhodotorula minuta* و*R.glutinis* و*R.mucilaginosa* و*R.acheniorum* و *R.graminis* معروفة بإنتاجها للكاروتينويدات اضافة لخمائر *Sporobolomyces roseus* و *Sporobolomyces salmonicolor* و *Sporobolomyces*. كما اشار Tinoi وآخرون (32) الى إن الكاروتينويدات المنتجة من جنس *Rhodotorula sp.* موزعة على نطاق واسع في الطبيعة مقارنة بالمصادر المايكروبية الاخرى.
ينتمي جنس *Rhodotorula* الى عائلة *Sporidiobolaceae* (*Phylum* *Basidiomycota*), وتعد خمائر*R.rubar* و *R.glutinis* هي من اكثر انواعها شيوعا في الطبيعية (21,17). يمكن التعرف عليها بسهولة من خلال تمييز مستعمراتها بالوان مميزة تتمثل بالاصفر والبرتقالي الى الاحمر وذلك لقدرتها على انتاج الكاروتينويدات ذات الالوان الزاهية Yadav و Prabha (34) . اشار (3 و 5) الى ان جنس *Rhodotorula* يشمل 34 نوع ويعد *R.glutinis* الاكثر انتشارا.

المواد وطرائق العمل

عزل خميرة *Rhodotorula* : اخذت نماذج العزل من مصادر مختلفة ومتنوعة شملت انواع مختلفة من الازهار وأوراق اشجار مختلفة وترب مختلفة وفواكه تالفة ومنتجات البان ومخللات , ويمثل الجدول (1) مصادر واماكن وعدد عينات نماذج العزل لخميرة *Rhodotorula* .

جدول (1) مصادر واماكن وعدد عينات نماذج العزل لخميرة *Rhodotorula*

مصادر العزل	عدد العينات الكلي		مكان العزل
الازهار	38		
1	عين البزون	6	مشاتل السيدية, حدائق مستشفى الهلال الاحمر
2	الجعفري	8	حدائق كلية العلوم , كلية التربية للبنات
3	الجوري	5	كلية العلوم , كلية علوم بنات , كلية تربية بنات
4	داوودي	5	كلية تربية بنات
5	دفلة	5	حدائق جامعة بغداد
6	ورد الصباح	4	حدائق منطقة الدورة
7	جمال	2	مشاتل السيدية
8	قرنفل	3	مشاتل السيدية
اوراق الاشجار	15		

1	ارااليسة	3	مشاتل السيدية
2	مطاط	3	مشاتل السيدية, حدائق منطقة الدورة
3	مكحلة	3	مشاتل السيدية
4	امزون	3	مشاتل السيدية
5	كابرس	3	مشاتل السيدية
فواكه تالفة	15		
1	موز	3	منطقة الدورة
2	برتقال	3	منطقة الدورة
3	عنب	3	منطقة الدورة
4	تفاح	3	منطقة الدورة
5	مشمش	3	منطقة الدورة
منتجات البان	4		منطقة الدورة
مخللات	3		منطقة الدورة
تربة	5		كلية العلوم وكلية التربية للبنات

حضرت النماذج حسب الطريقة التي اوردها Roberts و Greenwood (29) حيث مزج 25 غم منها مع 225مل من ماء البيتون المعقم في دورق حجمي سعة 500مل وحضنت لمدة 3 ساعات بدرجة حرارة 30 م للسماح بتنشيط الخمائر الموجودة في العينات ، سحب 0.1مل من كل عينة بعد التحريك ووضع في أطباق بتري ، وصب وسط Sabouraud Dextrose Agar (SDA) وبعد التحريك بالطريقة التي تضمن تجانس العينات تركت الاطباق ليتصلب الوسط ثم حضنت بصورة مقلوبة في الحاضنة بدرجة حرارة 30 م لمدة 48 ساعة .اجريت عملية تنقية مستعمرات الخمائر الملونة ذات اللون (البرتقالي - الاصفر) بالتقاطها بصورة منفردة ونقلها الى اطباق تحتوي على PDA و زرعها بطريقة التخطيط (Streaking method) وحضنت الاطباق بدرجة 30م لمدة 48 ساعة وكررت العملية لحين ظهور مستعمرات نقية ومتشابهة من ناحية المظهر والفحص المجهري باستعمال صبغة المثيل الزرقاء Kurtzman و Fell (16) .

الغربلة الكمية لتحديد العزلة الاكثر إنتاجا:

1- تحضير لقاح عزلات الخميرة :حضر لقاح عزلات الخميرة حسب الطريقة التي اوردها Cappuccino و Sherman (6) وحسب عدد الخلايا في اللقاح وفق المعادلة التالية :

وحدة تكوين المستعمرة / مللتر=معدل عدد المستعمرات × 1/ معامل التخفيف × 10

Colony forming unit(CFU/ ml)

وأختير التخفيف الحاوي على 10^7 خلية / مل لأجراء الخطوة اللاحقة.

2-انتاج الكاروتينويدات

أخذ 2 مل من تخفيف 10^7 المحضر في الفقرة السابقة ونقل إلى دورق بحجم 250 مل حاوي على 50مل من وسط SDB المعقم , وحضنت بالحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 30 م لمدة 5 ايام .

3- 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 100مل وبعد تمام الذوبان أكمل الحجم إلى العلامة ، سمي بالمحلول (A) ، ثم سحب مقدار1 مل 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 1مل من المحلول B يحتوي 50 مايكروغرام من البيتا كاروتين القياسي ، بعدها تم تحضير مجموعة من التخافيف بالتراكيز المذكورة اعلاه واكمل الحجم بالهكسان وكما في الجدول التالي :

جدول (2)تحضير تخافيف المنحنى القياسي لتقدير البيتا 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 الطول الموجي 450 نانومتر ورسم المنحنى القياسي كما في الشكل(1) .

شكل (1) يوضح المنحنى القياسي لتقدير البيتا كاروتين

4- تقدير كمية الكاروتينويدات المنتجة من العزلات

اتبعت الطريقة المذكورة من قبل Park وآخرون (27) في استخلاص الكاروتينويدات من مزرعة التخمير بإجراء عملية النبذ المركزي بسرعة 3500 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة ، اهمل الراشح وغسل الراسب مرتين بالماء المقطر وتم 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 درجة حرارة 100 م 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 . 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 450نانومتر بجهاز المطياف الضوئي UV light Spectrophotometer , وتم قياس كمية الصبغات المنتجة بالاعتماد على المنحنى القياسي المحضر سابقا . قدرت كمية الكاروتينويدات المنتجة ولجميع طرق الاستخلاص وذلك بقياس الكثافة الضوئية عند طول موجي 450 نانومتر بجهاز المطياف الضوئي UV/light Spectrophotometer , وتم قياس كمية الصبغات المنتجة بالاعتماد على المنحنى القياسي المحضر سابقا .

تحليل الكاروتينويدات للعزلة المنتخبة باستعمال جهاز HPLC

أستعمل جهاز HPLC في تحليل الكاروتينويدات عند طول موجي 436 نانومتر. استخلصت الكاروتينويدات بطريقة الاستخلاص المذكورة سابقا في 3 من الفقرة (3-6) , نقي المستخلص من خلال مرشح غشائي 0.25مايكرومتر ونبذ الراشح مركزياً , حضرت صبغة البيتا كاروتين القياسية بتراكيز مختلفة شملت (12.5 و 25و 75 و 100 و 125) مايكروغرام / مل بإذابتها في المثيلين كلورايد methylene chloride, عمود C18, طور متحرك يتكون من acetoinitrile : methylene chloride :methanol بنسبة (16:12:82) , ومعدل تدفق 1مل / دقيقة , حجم الحقنة 25 مايكروغرام Shrikumar وآخرون(30)

تشخيص العزلة على المستوى الجيني Isolate of Genomic Identification

نميت عزلة الخميرة المعزولة محلياً (Z1) على وسط Sabouraud Dextrose Broth (SDB)وحضنت في الحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة / دقيقة على درجة حرارة 30 م لمدة 48 ساعة. نقل 1 مل من مزرعة خلايا الخميرة المنشطة الى أنبوبة ابندروف Eppendorf و بعدد تقريبي 1×10^8 خلية / مل ثم نبذت مركزيا وبواقع ست مكررات بجهاز النبذ المركزي بسرعة 13000 دورة /الدقيقة ولمدة دقيقة واحدة , أهمل الرائق وأخذ الراسب (الكتلة الحيوية) .استعملت عدة الاستخلاص DNA Extraction Mini kit المجهزة من شركة intron biotechnology , cat.no. 17045 الكورية في استخلاص DNA من الخميرة وحسب طريقة الاستخلاص التي المذكورة في كت الاستخلاص.

تفاعل تضخيم السلسلة (PCR) Polymerase chain reaction

أستعملت تقنية تفاعلات السلسلة البلمرة الانزيمية PCR لتضخيم المنطقة البينية ITS للجين الرايبوسومي 5.8S rRNA للتأكد من نوع العزلة المنتخبة والمتمثلة بالمنطقتين ITS1 و ITS4 , استخدمت البوادئ بالاعتماد على الطريقة المذكورة من قبل(15) Kanzy *et al.* , حيث استخدم بادئ الامامي 5`- TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3` للمنطقة البينية ITS1 و بادئ عكسي 5`- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3` للمنطقة البينية ITS4.

حضر خليط التفاعل بحجم نهائي 25 مايكروليتر في أنبوبة ابندورف , والحاوي على PCR PreMix kit (i-Taq) المجهز من شركة (Intron , korea) كما في الجدول (3).

جدول (3) مكونات خليط تفاعل تضخيم السلسلة PCR

المواد المستعملة في عدة تضخيم PCR	الحجم (مايكروليتر)
Taq PCR PreMix	5
Forward primer بتركيز 10 بيكومول	1
Reverse primer بتركيز 10 بيكومول	1
مستخلص DNA	1.5
Distill water	16.5
الحجم الكلي	25

مزجت محتويات خليط التفاعل لعدة ثوانٍ بوساطة المازج Vortex , وضعت الأنبوبة في جهاز التفاعل PCR Thermo cycler , بعد برمجته حسب الجدول (4) وأجري تفاعل تضخيم السلاسل لDNA العزلة المستخلص .

جدول (4) الظروف المعتمدة في تضخيم 5.8S rRNA -ITS

No.	Step	Temperature	Time	No. of cycle
1	Initial Denaturation	94°C	3 min.	1 cycle
2	Denaturation	94°C	45 sec	35cycle
3	Annealing	52°c	45 sec	
4	Extension-1	72°C	45 sec	
5	Extension -2	72°C	10Min	1 cycle
6	Holding	4 C°	∞	1 cycle

بعد انتهاء وقت التفاعل سحب 5 مايكروليتر من نواتج تضخيم 5.8S rRNA ،اجري الترحيل الكهربائي حيث حملت نواتج PCR ومستخلص DNA على هلام الأكاروز 1 % و باستعمال وحدة الترحيل الكهربائي الافقي ، استعمل 5 مايكروليتر من نواتج PCR و 2 مايكروليتر من دارئ التحميل Loading buffer لكل 5 مايكروليتر من مستخلص DNA ، مزجت جيدا ووضعت في الحفر المخصصة لوضع النماذج على الهلام ، رحلت نماذج DNA كهربائياً لمدة 90 دقيقة بفولتية 90 فولت وبشدة تيار كهربائي 70 ملي أمبير لتبدأ الحركة من القطب السالب الى القطب الموجب ، تم الكشف عن حزم DNA المفصولة بعد انتهاء عملية الترحيل الكهربائي وذلك بتحميل قالب الهلام على جهاز UV light transilluminator.

تحديد تتابعات القواعد النيتروجينية

لتحديد تتابعات القواعد النيتروجينية في نواتج تفاعلات تضخيم السلسلة لمنطقة ITS لعزلة الخميرة النقية ، أرسلت نواتج الجين المضخم مع البوادئ الى شركة (Macrogen) الكورية ليتم تحديد تتابعات القواعد النتروجينية DNA Sequenceing . واعتمدت تلك التتابعات بمقارنتها مع ما يتوفر من المعلومات حول هذا الجين في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية NCBI من خلال الموقع الالكتروني (lnt.3) وحسب برنامج BLAST Nucleotide وذلك للتعرف على نوع العزلة المنتخبة .

النتائج والمناقشة Results and Discussion

عزل خميرة Rhodotorula

تعد عملية العزل وانتخاب الكائن المجهري في مثل هذه الدراسات مفصلا اساسيا تنبثق منه المفاصل الاخرى للدراسة ، اذ تمثل عملية العزل الخطوة الاولى في دراسة أي كائن مجهري بعد عزل ذلك الكائن عن أشكال الحياة في بيئة مختبرية ليغدو في بيئته الجديدة معزولا عن غيره من الكائنات الحية ، وتسمى هذه العملية بعملية العزل في مزارع نقية ، وهي خطوة لها أهميتها الاستثنائية لتجنب الاخطاء في التشخيص والدراسات الفسلجية والحيوية . تسمى المزرعة النقية هذه بالعزلة Isolate لحين تشخيصها على مستوى الجنس والنوع من خلال دراسة خواصها المظهرية والمزرعية والفسلجية وغيرها . تم الحصول في هذه الدراسة على 20 عزلة ذات الوان تتراوح مابين البرتقالي والاصفر اخذت من مواقع مختلفة من بغداد كما موضح في الجدول (5) ،اذ يوضح الجدول ان 5 عزلات ملونة تم الحصول عليها من ازهار عين البزون (المأخوذة من حدائق مشاتل السيدية وحدائق مستشفى الهلال الاحمر) في حين 4 عزلات من ازهار الجعفري (المأخوذة من حدائق كلية العلوم) و 3 من ازهار الجوري (المأخوذة من حدائق كلية العلوم للبنات وكلية التربية للبنات) و3 من ازهار الداوودي (المأخوذة من حدائق كلية التربية للبنات) في حين كانت عزلتين من أزهار الدفلة (المأخوذة من حدائق جامعة بغداد) وعزلة واحدة من القرنفل (المأخوذة من حدائق مشاتل السيدية) , اما التربة فقد تم الحصول على 2 عزلات ملونة (المأخوذة من حدائق كلية العلوم), اما بقية نماذج العزل المشار اليها في الجدول (1) فلم يتم الحصول منها على اي عزلات ملونة وتم اهمالها. وبذلك تكون الازهار المختلفة المأخوذة من مصادر مختلفة هي المصدر الاساس الذي اعتمدت عليه عملية العزل في هذه الدراسة.

جدول (5) مصادرعزلات الخميرة وعدد العزلات الملونة المستحصل عليها ورمزها ومكان العزل

	مصدر العزل	عدد العزلات الملونة	رمز العزلة	مكان العزل
	الازهار	18		
1	عين البزون	5	Z1-Z2-Z3-Z4-Z5	حدائق مشاتل السيدية, حدائق مستشفى الهلال الاحمر
2	الجعفري	4	A1-A2-A3-A4	حدائق كلية العلوم
3	الجوري	3	G1-G2-G3	حدائق كلية العلوم للبنات وكلية التربية للبنات
4	داوودي	3	S1-S2-S3	حدائق كلية التربية للبنات
5	دفلة	2	H1-H2	حدائق جامعة بغداد
6	قرنفل	1	M1	حدائق مشاتل السيدية
	تربة	2	N1	حدائق كلية العلوم

اشار Jernejc و Cimerman (14) الى ان عملية العزل تتطلب معرفة مسبقة للصفة المرغوبة في الكائن والتي تعتبر الهدف الذي عزل من اجله هذا الكائن , حيث يتخذ من هذه الصفة عامل إنتخاب عند عزل الاحياء المجهرية عن بيئاتها الطبيعية كالتربة والماء والهواء وغيرها من المصادر. ان تواجد عزلات الخمائر الملونة بكثرة على الازهار يتفق مع ذكره Deak و (Beuchat 7) بأن المستعمرات ذات اللون الاحمر لخميرة *Rhodotorula* قد وجدت بشكل شائع على الثمار والأزهار.

تمكن Issa وآخرون (13) من عزل خميرة *Rhodotorula* من مصادر محلية مختلفة اذ بلغ العدد الكلي 50 عزلة (اخذت من مصادر مختلفة شملت أوراق الأشجار و التربة واللحوم و منتجات الألبان) . اعتمد في الغربلة الاولية على اختيار المستعمرات المنتجة للصبغة على وسط SDA وكذلك على الفحص المورفولوجي والخواص المزرعية لها .

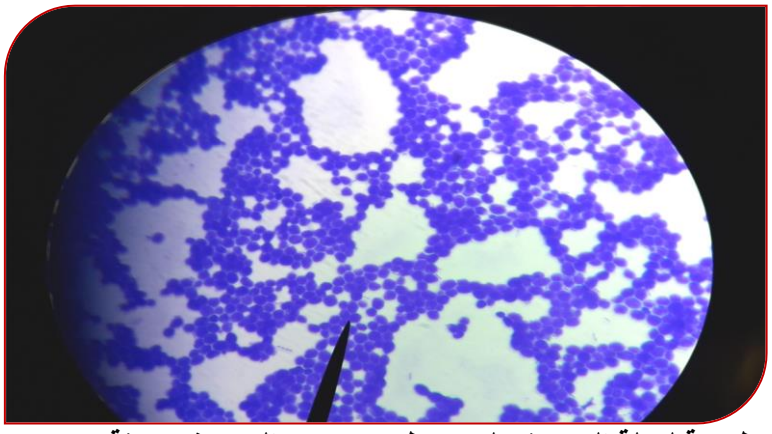
صفات عزلات الخميرة المنتجة للصبغات

بالإعتماد على شدة اللون البرتقالي للعزلات على وسط SDA تم اختيار 10عزلات من اصل 20عزلة درست خواصها المزرعية والمظهرية اذ ظهرت جميع العزلات على وسط SDA ذات لون برتقالي غامق , وهذا ينطبق مع ما ذكره Kurtzman و Fell (16) في ظهور لون مستعمرات الخميرة المنتجة للصبغة ما بين الاصفر والبرتقالي الداكن والأحمر في بعض الانواع , مستعمراتها دائرية محدبة منتظمة الحواف , ذات مظهر مخاطي ناعم لماع شكل (2) و جدول (6).

ظهرت خلايا الخميرة تحت المجهر بيضوية الى مستديرة الشكل مع وجود براعم في العديد من جوانب الخلايا شكل (3). وبناءا على ما تقدم اعلاه من صفات مزرعية ومظهرية يمكن الاستنتاج بأنه قد تكون العزلات العشرة تحت الأختبار قادرة على انتاج الكاروتينويدات وتنتمي الى جنس *Rhodotorula* Nunes *et al.* (26) .

يوضح الجدول (4) الخواص المزرعية على وسط SDA, والمظهرية بعد التصبيغ بصبغة Methylen Blue بأستعمال المجهر الضوئي للعدسة بقوة تكبير 100x للعزلات المستحصل عليها من عملية العزل.

شكل (2) مستعمرات عزلة الخميرة على وسط SDA بعد 48 ساعة من الحضن



شكل (3) الخواص المظهرية لعزلة الخميرة على وسط SDA بعد التصبيغ بصبغة Methylen Blue بأستعمال المجهر الضوئي للعدسة بقوة تكبير 100x.

جدول (6) الخواص المزرعية على وسط SDA والمظهرية بأستعمال العدسة بقوة تكبير 100x

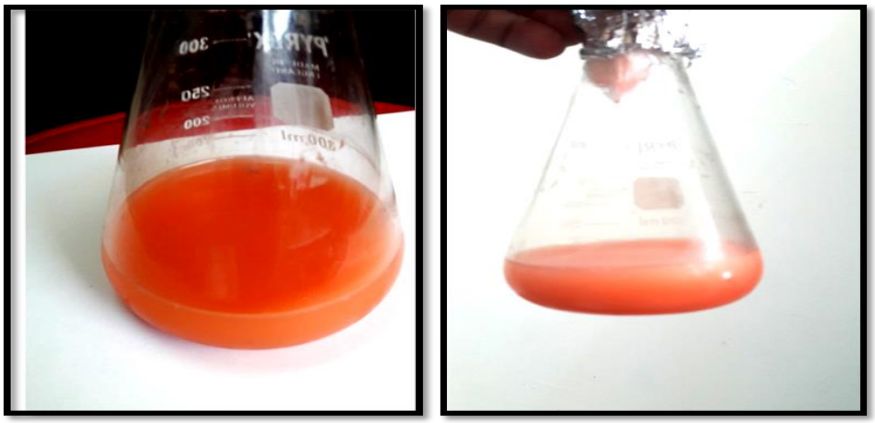
الصفات المزرعية على وسط SDA	
لون المستعمرة	برتقالي و برتقالي غامق / لماع
ملمس المستعمرة	ناعم مخاطي
سطح المستعمرة	محدب
حافة المستعمرة	منتظمة
الصفات المظهرية	
لون المستعمرة تحت المجهر	ازرق
شكل المستعمرة	بيضوية او مستديرة تحوي في بعض اطرافها براعم

تمكن Aksu و Eren (2) من عزل خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* من التربة ذات انتاجية بلغت 355 مايكروغرام / غم كتلة حيوية جافة , في حين عزل Maldonade *et al.*(20) الخميرة ذاتها من التربة ولكن بأنتاجية بلغت 590 مايكروغرام / غم كتلة حيوية جافة, وتمكن Maldonade *et al.*(19) من عزل الخميرة ذاتها بأنتاجية بلغت 745 مايكروغرام / لتر.

الغربلة الكمية للعزلات : تعد الغربلة الكمية اختبارا مهما لاعطاء صورة اوضح وتقييم حقيقي عن كفاءة الاحياء المجهرية المعزولة ، وتعطي تقييم حقيقي لقدرة الاحياء المجهرية من التطبيق على المستوى الصناعي , ولتحديد العزلة الأكفأ من العزلات المنتخبة أعلاه في انتاج الكاروتينويدات , أجريت هذه التجربة بأستعمال طريقة تخمرات الحالة السائلة وباستعمال وسط SDB , أختيرت العزلة الكفوءة في الانتاج على أساس وزن الكتلة الحيوية الجافة Dry cell biomass وكمية الصبغة المنتجة ، يلاحظ من النتائج في الجدول (7) التفاوت في قابلية العزلات على انتاج الكاروتينويدات وان اعلى تركيز للصبغة تم الحصول عليه كان 39890 مايكروغرام / لتر للعزلة Z1 حيث بلغت الامتصاصية 1.261 نانوميتر على طول موجي 450 نانوميتر في حين بلغ وزن الكتلة الحيوية الجافة للعزلة 16.6غم/لتر, وبناءً على النتائج المستحصل عليها من الغربلة الكمية اعتمدت العزلة Z1 لإكمال تجارب الدراسة الحالية بعد اخضاعها الى التشخيص الجيني . ويوضح الشكل (4) العزلة Z1 في نهاية عملية التخمير والبالغة 7 ايام .

جدول (7) يوضح نتائج الغربلة الكمية للعزلات المنتجة

ت	رمز العزلة	الامتصاصية عند 450	تركيز الكاروتينويدات مايكروغرام / لتر	وزن الكتلة الحيوية الجافة غم / لتر
1	G3	0.716	22890	10.2
2	A1	0.840	26400	11.4
3	A3	0.136	4200	2.6
4	S1	0.278	8650	4.2
5	Z4	0.476	14600	6.8
6	G2	0.682	21400	10.4
7	H1	0.516	16200	7.5
8	M1	0.482	15100	6.8
9	Z3	0.861	26700	11.4
10	Z1	1.261	39890	16.6



شكل (4) يوضح عزلة *Rhodotorula* sp. Z1 المنماة على وسط SDB بعد 7 ايام من الحضن

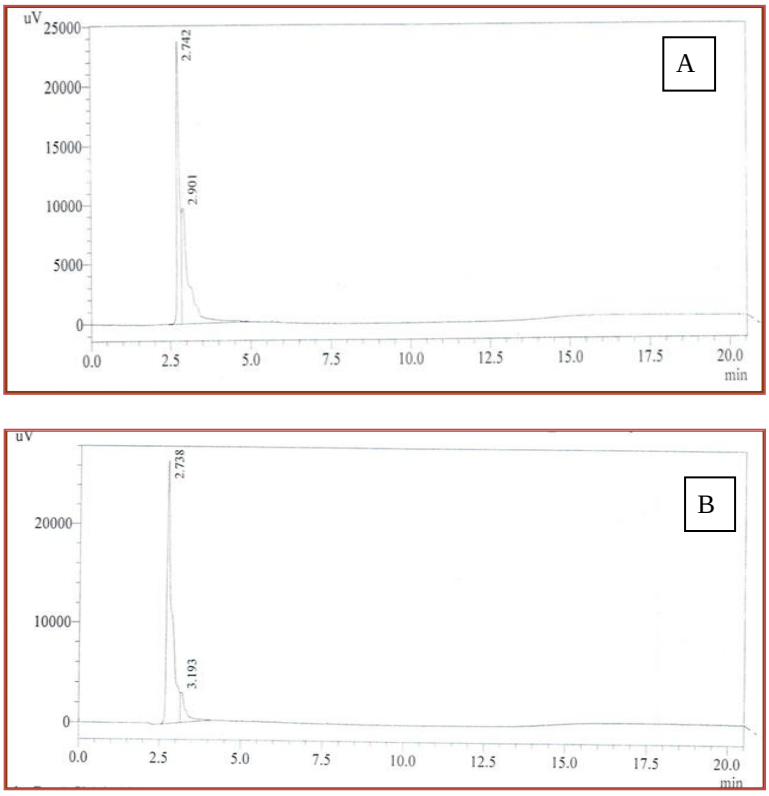
اشار Elander و Chang (8) الى ان تباين الاحياء المجهرية فيما بينها وراثيا وان انتمت الى نفس النوع من حيث خصائص نموها وفعاليتها الاستقلابية ويعود السبب في ذلك الى استجابة السلالات للظروف البيئية , فالبناء الوراثي بقدر إتصافه بالثبات الا انه يتمتع بمرونة كبيرة في الاستجابة للتغيرات البيئية وبالتالي التعبيرعن الصفات المظهرية للجينات.

تمكن Maldonade (18) وآخرون . من الحصول على ثلاث عزلات من خميرة *Rhodotorula mucilagenosa* من التربة وبقدرات متباينة على انتاج الكاروتينويدات , وقد بين Aksu و Eren (2) بان خميرة *R.mucilagenosa* المعزولة من ترب محلية اعطت كمية مرتفعة من الكاروتينويدات مقارنة بالسلالات الاخرى.

4- تحليل الكاروتينويدات للعزلة المنتخبة باستعمال جهازHPLC

يوضح الشكل (5) مرتسم استخدام تقنية HPLC في تشخيص الكاروتينويدات المنتجة من العزلة المحلية Z1 *Rhodoturula* sp. ومقارنته مع مرتسم البيتا كاروتين القياسي وحسب ظروف الفصل المعتمدة , اذ ظهر ان زمن الاحتجاز للبيتا كاروتين القياسي هو 2.742 دقيقة , والذي تطابق مع زمن الاحتجاز للقمة الاولى من مرتسم

عزلة الخميرة *Rhodotorula* sp.Z1 والذي ظهر في الدقيقة 2.738 مما يؤكد على ان الصبغة المنتجة من هذه الخميرة هي من الكاروتينويدات مثمثلة بالبيتا كاروتين ومن الممكن ان تكون القمة الاخرى الظاهرة تمثل انواع اخرى من الكاروتينويدات.

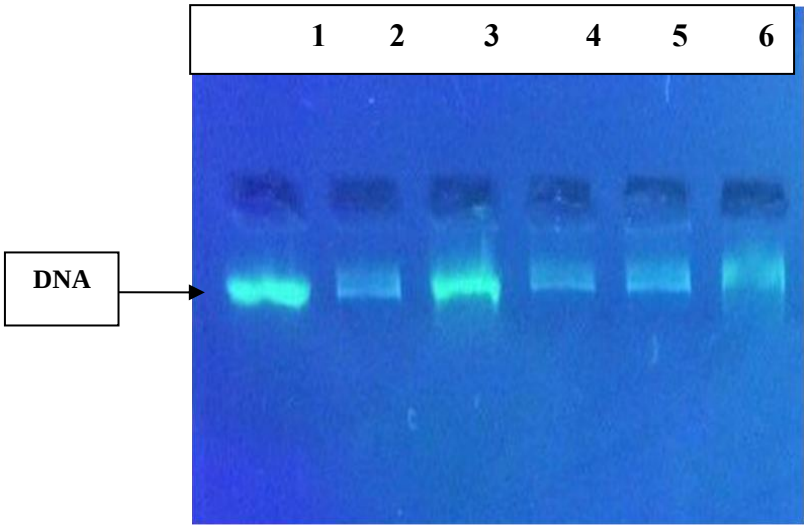


شكل (5) يوضح مرتسم الامتصاصية بأستخدام جهاز HPLC على الطول الموجي 436 nm : (A) البيتا كاروتين القياسي , (B) الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula* sp.Z1

تشخيص العزلة على المستوى الجيني Genomic Identification of Isolate

استخلاص DNA

اجري استخلاص للمادة الوراثية DNA من خميرة *Rhodotorula* sp.Z1 وتم التأكد من نقاوة المستخلص بواسطة جهازNano Drop , بترحيله على هلام الاكروز بتركيز 1 %, أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي ظهور حزم واضحة لDNA المستخلص وتبين انه كان بنقاوة كافية لأجراء تفاعل تضخيم السلسلة PCR وكما موضح في الشكل (شكل 6) ، وقد اشار Green و Sambrook (10) الى إن عملية تضخيم السلسلة (PCR) لاتتطلب كمية كبيرة من DNA , اذ ان الكمية الكبيرة قد تؤدي إلى تكوين نواتج تضخيم غير محددة في حين أن الكمية القليلة تقلل من دقة التضخيم .



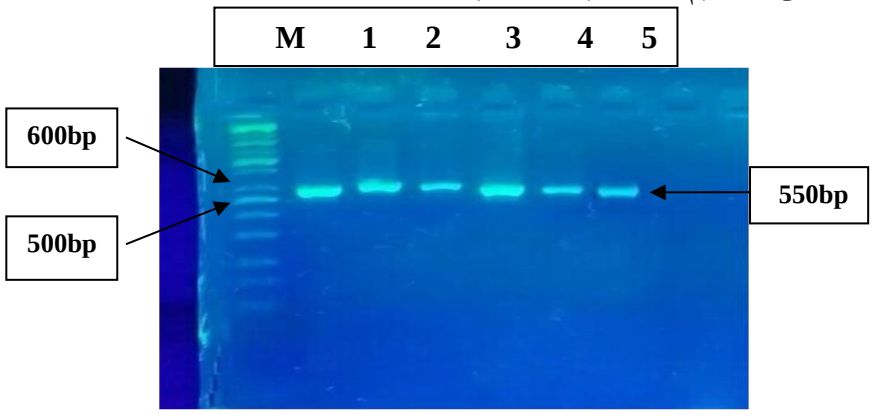
شكل (6) نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز ل DNA المستخلص من العزلة المحلية لخميرة*Rhodotorula* sp.Z1 يلاحظ من الشكل ظهور DNA المستخلص من خميرة *Rhodotorula* sp.Z1 بشكل حزم عند الترحيل الكهربائي ولست مكررات

تفاعل تضخيم السلسلة Polymerase Chain Reaction

تعد المنطقة البينية ITS في الوحدة الرايبوسومية 5.8S rRNA من اهم المناطق المستعملة في تشخيص الانواع والسلالات المختلفة وذلك لامكانية تحليل النشوء والتطور للانواع وثيقة الصلة والمتقاربة جدا بأستعمال الفاصل البيني ITS (ITS1 و ITS4) الموجود في الوحدات الرايبوسومية 5.8S rRNA و 18S rRNA و 26S rRNA ويكون هذا الفاصل البيني دقيق جدا مما يجعل التشخيص للتمييز بين الانواع وتشخيصها ضمن الجنس الواحد للخمائر ناجح جدا وعالي الدقة Heras-Vazquezوآخرون (12) .

أجري تفاعل تضخيم السلسلة ل DNA العزلة المحلية لخميرة *Rhodotorula* sp.Z1 للقطع البينية الفاصلة internal transcribed spacer (ITS) والمتمثلة بالـ ITS1 وITS4 باستعمال بادىء أمامي لتضخيم جين ITS1 وبادىء عكسي لتضخيم جين ITS 4 , تبين من خلال نتائج الترحيل على هلام الاكاروز بتركيز 1 % بعد الفحص باستخدام الاشعة فوق البنفسجية ظهور حزمة واضحة ناتجة من تضخيم هذه الجينات مما يدل على ارتباط البوادئ بالجين المستهدف شكل (6) . قدر الحجم الجزيئي لهذه الحزمة وجد أنه كان مقاربا الىbp 550 مقارنة بالدليل الحجمي لل DNA المرحل على نفس الهلام وتحت نفس الظروف . تطابقت نتيجة هذه الدراسة مع ما توصل اليه Mohamed وآخرون (22) الذي اشار الى ان الحجم الجزيئي لتضخيم نفس المنطقة (ITS) تراوح مابين بين bp 530 – 588 , علما انه اثبت في دراسته ان الحجم الجزيئي لهذه المنطقة بلغ 554bp لجميع عزلات خمائر *Rhodotorula* sp. قيد الدراسة والبالغة 6 عزلات .

كما وأكد Nunes *et al.*(26) في دراسته ان 51 عزلة من الخمائر تم تأكيد تشخيصها وعائديتها الى جنس *Rhodororula* اعتمادا على نتائج التضخيم لمنطقة ITS والتي اوجد فيها ان الحجم الجزيئي لجميع العزلات بلغ 560bp , ويذكران تسلسل المنطقة البينية ITS تستخدم بنجاح في تمييز الانواع المختلفة من خمائر *Rhodotorula* sp. وتعطي نتائج حاسمة في التشخيص,وهو اكثر دقة من الاختبارات الوصفية التقليدية .



شكل(6) الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم القطع البينية ITS بتقنية PCRعلى هلام الاكاروز, M : يمثل الدليل الحجمي 1Kb زوج قاعدة ، التسلسل من(1-6) يمثل نموذج DNA المستخلص من عالق الخميرة للعزلة المحلية *Rhodotorula* sp. Z1 .

تحليل تتابعات نواتج التضخيم Sequence analysis of amplification products

درست تتابعات القواعد النتروجينية للمنطقة البينية ITS1 للعزلة المحلية لخميرة *Rhodotorula* sp. وذلك بإرسال نواتج التضخيم الى شركة Macrogen الكورية , يظهر شكل (7) نتائج تتابعات القواعد النتروجينية والبالغ 893 زوج قاعدة للعزلة قيد الدراسة. اجري تقييم لنوعية التتابعات الواردة وبإستعمال برنامج Codon Code Aligner software ، إذ شذبت التتابعات لازالة الاجزاء ذات النوعية المنخفضة والتي تمثلها القمم غير المنتظمة, قد يعود تكوين هذه الأجزاء الى أزدواج البوادىء أوبعض نواتج عملية التضخيم الصغيرة التي لاتظهر عند الترحيل الكهربائي على هلام الاكروز. استخدم بعد ذلك برنامج BLAST لإيجاد التماثل أو التطابق الجيني مع بنك المعلومات في NCBI, وعند مقارنة تتابعات القواعد النتروجينية لمنطقة ITS1 للعزلة المحلية مع ما يتوفر من المعلومات في بنك الجينات NCBI , أظهرت النتائج أن هناك تطابق بين هذه العزلة وبنسبة 86 % مع تتابعات العزلة العالمية ID: KU609508.1 والمسجلة في موقع NCBI والمسجلة في الولايات المتحدة الامريكية USA والتي تعود الى *Rhodotorula mucilaginosa* Garay وأخرون (9). شكل (8).

ITS1- Forward

TAGGGGAAACGCGCCGAGAAACACCTTACAACTTGGGAAATCCGACTCTCCTTT
CTACCCTGTGCATTTGTTTGGGATAGTAACTCTCGCAAGAGGGCTGCGTTCTTCA
TCGATGCAACGCATACTCTATGACTGTATTAGCTTTTATAACTTAATTGAACTTTC
GACATTCGGATCTCTTGGCTGCGTTCTTCATCTATGCACGTTCTTCATCGATGCAC
AACTCACTCATCCCCCCACCGACGCGCTATCGCCCCCGCTCCTCCCACTCTCACT
CTACGGACGAAAAAGCAGACCAGCCTGCTTGCTCGCCCTGCTGACCGACCCCTC
CGAGAGCAAAGGCATCTCCACTCGTGTTGCTTGTTGAAGTCTTTCCGCTCCCCGC
ACCGATACGGGCTCGTTCCTCTTCATTCCGCGAAGCGCGCTGTCCGCTCGAGGAT
TCTGCCATTCGCCGTCTTCCGCTATTCTATTACTTAATATGCTACGCTACGTACCT
CACCGGGCACGCCTCACGTATGCTCGTAGGACGTGATCCTGGAGGACCATGATG
GCGATCTACGACTGGACGACGATCACCATCACCTCGAGCAAGTCGGACTCGGTC
TACAGCGCGCGTGATGCCGGAGGGCGCTGGGTACGATGGGCGTTTCGATGCGCC
GTGGCAGAGGCGGGAGCTGGAGACCAGTGCAAGATTTGGACGATCGGTGGAGG
AGGAGGCCAGGAGCGAGGGCGCGCAGATAGAGGAGGGCTGGGAGGGAGGGGA
TCCGAGGACTCGGATTTTCATGGAACTGAGGCGAGGGGGGTTTAGGCGGGGGGC
CGGGATGGGGTGCTGGGAGGCGGGTGAGATGGGGTTGAGTCAAGGGTGGCGTG
GTGTGCGCGGAGCCTAGGGGGGGGTCTAGGTTCGTCGCCGAGG

شكل(7) يوضح تتابعات القواعد النتروجينية لناتج تضخيم المنطقة البينية الفاصلة ITS1 للعزلة المحلية *Rhodotorula* sp. Z1

Rhodotorula mucilaginosa strain UCDFST 13-478 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: KU609508.1Length: 578Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
171 bits(92)	6e-39	136/158(86%)	0/158(0%)	Plus/Plus

Query 1
AACTTGGAATCCGACCTCTCACTTTCTAACCCTGTGCATTTGTTTGGGATAG
TAACTCTC 60

Sbjct 34
AACTTGGAGTCCGACCTCTCACTTTCTAACCCTGTGCATTTGTTTGGGATAG
TAACTCTC 93

Query 61
GCAAGAGGGCTGCGTTCTATTCATCGATGCAACGCATACTCTATGACTGTAT
TAGCTTTT 120

Sbjct 94
GCAAGAGGGCGAACTCCTATTCACTTATAAAACGCAAAGTCTATGAATGTATT
AAATTTT 153

Query 121 ATAACTTAATTGAACTTTCGACATCGGATCTCTTGGCT 158

Sbjct 154 ATAACAAAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT 191

شكل (8) تطابق تتابعات القواعد النتروجينية للمنطقة البينية ITS 1 من الجين 5.8S rRNA من خميرة العزلة المحلية*Rhodotorula* sp. Z1 مع تتابعات القواعد النتروجينية في بنك الجينات NCBI مع خميرة *Rhodotorula mucilaginosa*

REFERENCES

ا
المصادر الانكليزية

1. **Aberoumand, A.** (2011). A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. World Journal of Dairy & Food Sciences, 6: 71-78.
2. **Aksu, Z. and Eren, A. T.** (2005). Carotenoids Production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. Process Biochemistry, 40: 2985-91.
3. **Aksu, Z. and Eren, A. T.** (2007). Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. Biochemical Engineering Journal, 35: 107-13.
4. **Berman, J.; Zorrilla-López, U.; Farré, G.; Zhu, C.; Sandmann, G.; Twyman, R. M.; Capell, T. and Christou, P.** (2015). Nutritionally important carotenoids as consumer products. Phytochemistry Reviews, 14: 727-43.
5. **Biswas, S. K.; Yokoyama, K.; Nishimura, K. and Miyaji, M.** (2001). Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related *basidiomycetous* yeasts inferred

International Food Research Journal, 23: 873-78.

14. **Jernejc, K. and Cimerman, A.** (2001). Morphological characteristics, extracellular and intracellular protein and enzyme patterns of five *Aspergillus species*. Food technology and Biotechnology, 39: 333-40.
15. **Kanzy, H. M.; Nasr, N. F.; El-Shazly, H. A. M. and Barakat, O. S.** (2015). Optimization of carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. Int J Curr Microbiol and App Sci, 4.69-456 :
16. **Kurtzman, C. P. and Fell, J. W.** (1998). "The yeasts, a taxonomic study", 4th Edition, Elsevier, Amsterdam. : 77-102.
17. **Lanzafame, M.; De Checchi, G.; Parinello, A. and Cattelan, M. T. A. M.** (2001). *Rhodotorula glutinis*-related meningitis .Journal of clinical microbiology, 39: 410-10.
18. **Maldonade, I. R.; Rodriguez-Amaya, D. B. and Scamparini, A. R. P.** (2008). Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. Food Chemistry, 107: 145-50.
19. **Maldonade, I. R.; Rodriguez-Amaya ,D. B. and Scamparini, A. R. P.** (2012). Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. Brazilian Journal of Microbiology, 43: 109-15.
20. **Maldonade, I. R.; Scamparini, A. R. and Rodriguez-Amaya, D. B.** (2007) .Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 38: 65-70.

from the mitochondrial cytochrome b gene. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 51: 1.99-191

6. **Cappuccino, J. G. and Sherman, N.** (2002). Microbiology a laboratory manual 8th ed., San Francisco Boston. New York: 335-37.
7. **Deak, T. and Beuchat, L. R.** (1996). "Handbook of Food Spoilage Yeasts," CRS Press, New York, : 111-54.
8. **Elander ,R. P. and Chang, L. T.** (1979). Microbial culture selection. Microbial technology, 2: 60-66.
9. **Garay, L. A.; Sitepu, I. R.; Cajka, T.; Chandra, I.; Shi, S.; Lin, T.; German, J. B.; Fiehn, O. and Boundy-Mills, K. L.** (2016). Eighteen new oleaginous yeast species. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 43: 887-900.
10. **Green, M. R. and Sambrook, J.** (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition. In.: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
11. **Henríquez, V** ;.**Escobar, C.; Galarza, J. and Gimpel, J.** (2016). 'Carotenoids in microalgae.' in, Carotenoids in Nature (Springer).
12. **Heras-Vazquez, F. J. L.; Mingorance-Cazorla, L.; Clemente-Jimenez, J. M. and Rodriguez-Vico, F.** (2003). Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. FEMS Yeast Research, 3: 3-9.
13. **Issa, S.; Alhajali, A. and Alamir, L.** (2016). Improving carotenoid pigments production in *Rhodotorula mucilaginosa* using UV irradiation.

21. **Malik, K.; Tokkas, J. and Goyal, S.** (2012). Microbial pigments: a review. *Int J* Microbial Res Technol, 1: 361.65-
22. **Mohamed, M. A. E.; Abdel-Razik, A. B. and Ibrahim, S. A.** (2014). Identification of different species of *Rhodotorula* using internal transcribed spacers. Open Repos Agri: e45011822.
23. **Mokhtari, M.; Etebarian, H.; Mirhendi, S. and Razavi, M.** (2011). Identification and phylogeny of some species of the genera *Sporidiobolus* and *Rhodotorula* using analysis of the 5.8 s rdna gene and two ribosomal internal transcribed spacers. Archives of Biological Sciences, 63: 79-88.
24. **Moliné, M.; Flores, M. R** ;.**Libkind, D.; del Carmen Diéguez, M.; Farías, M. E. and van Broock, M.** (2010). Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa:* the role of torularhodin. Photochemical & Photobiological Sciences, 9: 1145-51.
25. **Mortensen, A** .(2006) .Carotenoids and other pigments as natural colorants. Pure and Applied Chemistry, 78: 1477-91.
26. **Nunes, J. M.; Bizerra, F. C.; e Ferreira, R. C. and Colombo, A. L.** (2013). Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Profile, and Biofilm Formation of Clinical and Environmental *Rhodotorula* Species Isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy, 57: 382-89.
27. **Park, P. K.; Cho, D. H.; Kim, E. Y. and Chu, K. H.** (2005). Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21: 429-34.
28. **Querol, A. and Fleet, G.** (2006). Yeasts In Food And Beverage. Springer-9 Verlag Berlin Heideberg, Printed in Germany: 14-303.
29. **Roberts, D. and Greenwood** ,**M. E.** (2003). Practical food microbiology: 273 - 74 Blackwell.
30. **Shrikumar, S.; Sukumar, M.; Suganthi, A. and Ravi, T. K.** (2005). A HPLC determination of betacarotene in the fruit juice of Passiflora edulis sims. Indian journal of pharmaceutical sciences.
31. **Soliev, A. B.; Hosokawa, K. and Enomoto, K.** (2011). Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011.
32. **Tinoi, J.; Rakariyatham, N. and Deming, R.** (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. Process Biochemistry, 40: 2551-57.
33. **Venil, C. K.; Zakaria, Z. A. and Ahmad, W. A.** (2013). Bacterial pigments and their applications. Process Biochemistry, 48: 1065-79.
34. **Yadav, K. S. and Prabha, R.** (2014). Extraction of Pigments from *Rhodotorula* Species of Dairy Environment. Indian Journal of Science and Technology, 7: 1973-77.