مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (26) العدد (1)2004
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research- Basic Science Series Vol (26) No (1) 2004

إنتاج الأصبغة الكاروتينية بالطريقة البيوتكنولوجية

الدكتور مفيد ياسين*

(قبل للنشر في 2004/3/16)

□ الملخّص □

ينتج كثير من الأحياء الدقيقة المواد الكاروتينية مثل البكتريا (اصطناع ضوئي أو لاضوئي) والفطور والخمائر والأشنيات وتستطيع هذه الأحياء أن تصطنع حيوياً المواد الكاروتينية بأشكالها كافة وبتراكيز عالية من خلال النمو على أوساط مختلفة والتي يمكن أن تستخدم في عملية الإنتاج على المستوى الصناعي والتجاري .

أغلب هذه المنتجات الكاروتينية هي β – كاروتين وأستاكزانتين التي تعتبر مواد حيوية هامة تستخدم على المستوى الصناعي بوصفها مواد ملونة في المنتجات الغذائية والصيدلانية أو كمواد فعالة بيولوجياً كفيتامينات ومنشطات وتستطيع هذه الكائنات أن تنتج تراكيز عالية انطلاقاً من مواد (سوبسترات) متوافرة في الطبيعة والمخلفات التصنيعية بتحويلها إلى مواد ذات فائدة كبيرة .

في ورقة العمل هذه أدرس بعض السلالات المحلية المعزولة من مناطق مختلفة في القطر العربي السوري على شكل مزارع نقية بعد أن تم تحديد الشروط اللازمة لنمو هذه السلالات باستخدام أوساط زراعية مختلفة ومن ثم فصل وتحديد هذه المواد باستخدام الطرق الكيميائية والفيزيائية.

تمت الدراسة في مخابر قسم الهندسة الغذائية في كلية الهندسة الكيميائية والبترولية في جامعة البعث وقد تم عزل فطر .Epicoccum sp الذي أنتج حوالي 10-86 مغ % غ مادة جافة من β – كاروتين بالزراعة الساكنة على أوساط مختلفة ومحلول مغذي (تشابك) أو مولاس .

بينما أعطت سلالات معزولة من خمائر الـ Rhodotorula حوالي 14– 115 مغ% غ مادة جافة من β– كاروتين ومركبات كاروتينية أخرى وأيضاً أعطت سلالات من خميرة الـ Phaffia حوالي 18–60 مغ % غ مادة جافة من أستاكزاتين في الزراعة على الهزاز وفي أوساط مختلفة مصادر الكربون.

لذلك يمكن أن تستخدم هذه الأحياء الدقيقة في عمليات الإنتاج التجاري بالزراعة على أوساط مختلفة ولاسيما باستخدام أوساط مغذية من مصادر زراعية أو تصنيعية وباستخدام التقانات الحيوية يمكن تحسينها حيوياً ووراثياً وبالتالي تحسين شروط الإنتاج وتطبيق هذه المنتجات في عمليات التصنيع الغذائي والصيدلاني وغيره من الصناعات .

* مدرس في قسم الكيمياء التحليلية و الغذائية– كلية الصيدلة– جامعة تشرين– اللاذقية– سوريا

مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (26) العدد (1)2004
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research- Basic Science Series Vol (26) No (1) 2004

Production of Carotenoid Pigments by Biotechnological Methods

Dr. Moufid Yassine *

(Accepted 16/3/2004)

□ ABSTRACT □

Carotenoids from microbial sources, which are the most widely disributed classe of pigments in nature and have essential biological function in animals, create a large market.

Synthetic carotenoids (β-caroten, astaxanthin, ... etc) are not approved by food and drug administration for addition.

Carotenoid pigments are responsible for the distinctive orange to red pigmantation of marin invertebrates (lobsters, crab and shrimp), fish (salmon and trout), birds, microorganisms (algae, fungi, bacteria).

Animals are unable to synthesis carotenoids but must uptake in their food sources they must be added to feeds of farmed animals, usually considerable expense to the farmer.

The principal carotenoid biological sources being considered are given microalgae (Haematococcus, Chlorella, Dunaliella, Spirulina), yeasts (Phaffia, Rhodotorula) moulds (phycomyces blakesleenus, Blakesla trispora, Epicoccum sp., penicillium, morchellci), and bacteria (Flavo bacterium, Brovibacterium, pseudomonas).

This research was about isolation and selection of biological sources of carotenoids in Syria. I evaluated and studied some carotenoid productions in different conditions and cultivations.

This is done to identify strains of Epicoccum sp., which produce 10-86 mg of ß-carotene%g dry substance in static conditions on the different mediums and Czapek solution or molasses.

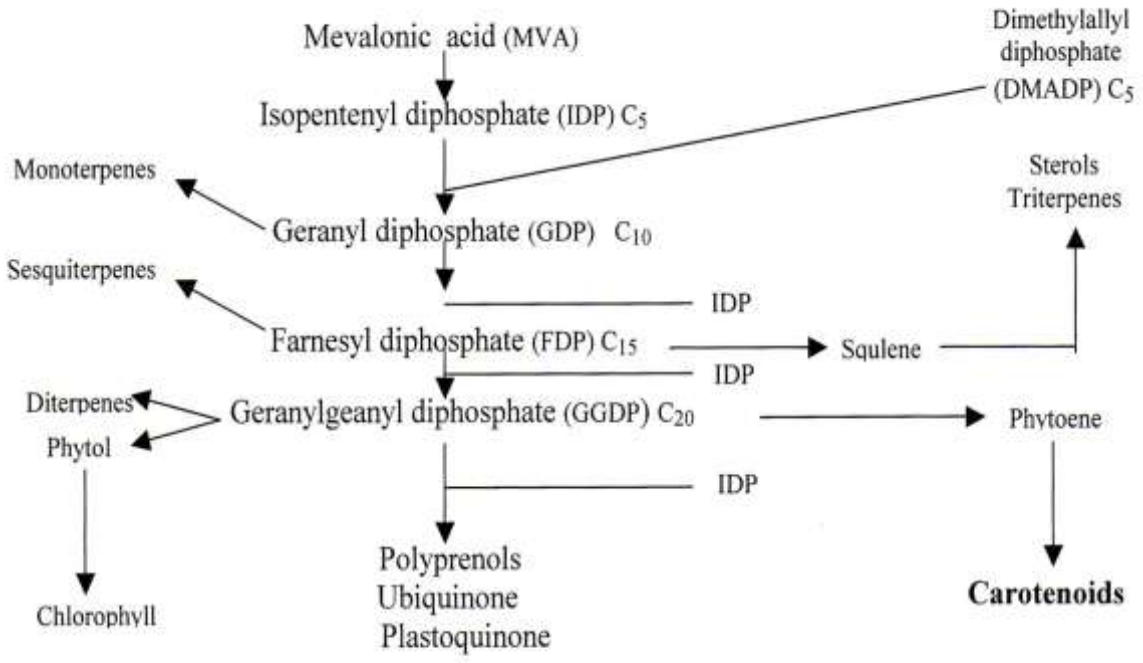
The yeast Rhodotorula gracili has heterotophic cultivation and produce high content of β-caroten (14-115 mg of ß-carotene/100g dry substance) other coumponds of carotenoid and Phaffia rhodozyma have heterotrophic metabolism and produces of astaxanthin (18-60 mg of astaxanthin %g dry substance) in submerged conditions on the different mediums.

***Lecturer, Analytical And Food Department, Faculty Of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria**

مقدمة:

المواد الكاروتينية Carotenoids هي مجموعة من المركبات الكيميائية الطبيعية الواسعة الانتشار في العالم النباتي والحيواني لها لون أصفر أو برتقالي أو أحمر و تعتبر ملونات غير سامة ويعرف حتى الآن أكثر من 600 مركب كاروتيني تدخل في كثير من الصناعات الغذائية والصيدلانية والطبية والتجميلية والكيميائية وغيرها، حيث تؤدي إلى جانب صفتها الملونة أدوار بيولوجية هامة على المستوى الاستقلابي للخلايا و لذلك تكون هامة من حيث الإنتاج والتداول، أما من حيث البنية فهي عبارة عن مركبات هيدروكربونية تملك 40 ذرة كربون تسمى **الكاروتينات**Carotene أما مشتقاتها التي تحتوي على وظائف أوكسجينية (أغلبها مجموعات هيدروكسي أو كيتو أو إيبوكسي أوميتوكسي أوكاربوكسيل) فتسمى **الكزانتوفيلات** Xanthophyll ومنها يكون لا حلقي مثل الليكوبين وأغلبها يحتوي في إحدى أو كلتا نهايتيه على حلقة إما سداسية أو خماسية ووظيفتها اللونية تأتي من خلال وجود الروابط المضاعفة و توزعها الفراغي حيث تعطي خاصية امتصاص اللون وأهمها تغذوياً β–كاروتين والمركبات الأخرى المحتوية على الحلقة – β وتسمى بروفيتامينA التي تعطي فيتامينA بسلسلة من التحولات الحيوية تشكل الكاروتينات أصبغه ملونة منتشرة في النباتات و البكتريا والفطور والأشنيات وفي الحيوانات ولاسيما الطيور والأسماك و اللافقاريات البحرية.(Rouseff R.,1995) (Dan V. 1998)

يتم التصنيع الحيوي للكاروتينات في النباتات العليا و الأشنيات و الفطور و البكتريا أما الحيوانات فلا تستطيع اصطناعها و إنما استقلابها و تحويلها إلى كاروتينات أخرى ويكون التصنيع الحيوي حسب المخطط في الشكل (1) (Johnson E., 1995)



الشكل (1) يوضح مخطط الاصطناع الحيوي للمواد الكاروتينية في الأحياء المصنعة للكاروتينات

تعتبر الكاروتيئيدات مستخلصات طبيعية من الفواكه والأزهار والأوراق الخضراء ومع ازدياد الطلب التجاري عليها اتجهت الدراسات نحو مصادر جديدة للحصول على أكبر كمية وأفضل نوعية مع كلفة اقتصادية منخفضة لاستخدامها على المستوى التجاري وبذلك ازداد اهتمام وتوجه الباحثين نحو علوم البيوتكنولوجيا لإنتاج الكاروتيئيدات بواسطة الأحياء الدقيقة.(Johnson E., et al., 1991)

تعتبر المواد الكاروتينية من المواد الحيوية الهامة و المسؤولة عن الكثير من الوظائف الفيزيولوجية والعمليات البيوكيميائية في الأحياء ولاسيما عند الحيوان و الإنسان الذي لايستطيع تصنيعها وتدخل في العديد من المنتجات الغذائية والصيدلانية والتجميلية كمواد ملونة أو مواد فعالة بيولوجياً (فيتامينات، منشطات، مواد حماية كيميائية،....إلخ) (Rouseff R.,et al. 1995)

تم الحصول عليها من الأعفان المنتجة للكاروتينات Carotenogenic moulds مثل *phycomyces blakesleenus* و *Blakesla trispora* وغيرها بعزلها وتحسينها ودراسة شروط الزرع وطورت هذه الأحياء لإنتاج كميات كبيرة من الكاروتينات ثم تلى ذلك دراسة الخمائر الحمراء Red yeasts مثل *Phaffia rhodozyma* كمصدر هام لـ Astaxanthin . (Haard N. F., 1988, Dan et al.1992)

تطور إنتاج الكاروتينات في السنوات الأخيرة بستخدام الطريقة البيوتكنولوجية بالحصول عليها من الأشنيات الدقيقة مثل جنس *Dunaliella (D.bardawi, D.Salina)* و *Haematococcua sp.* تحت شروط جديدة فالأشنيات الخضراء تصبح برتقالية بسبب إنتاج كميات كبيرة من الكاروتيئدات الثانوية خارج الكلوروبلاست (الصانعات الخضراء) في الجدار الخلوي أو في الفقاعات الزيتية وتستطيع *Dunaliella* إنتاج كميات عالية من β–كاروتين (10% مادة جافة). (Costa I., et al, 1987)

أدخلت التحورات الوراثية (الطفرات) على الكائنات الحية المنتجة للكاروتئيدات لإنتاج أكبر كمية وبأقل الأسعار فتعتبر بعض البكتريات هامة لإنتاج الكاروتيئدات ومثال على ذلك سلالات *Flavo bacterium & Brovibacterium* وباستخدام تطبيقات الوراثة الجزيئية لإدخال بعض الجينات المسؤولة عن الاصطناع الحيوي للكاروتيئدات في البكتريات المنتجة مثل *E.Col* و *Erwini* إلى خميرة *Saccharomyces cervisiea* حيث أنتج كميات كبيرة من β– كاروتين. (Verdoes J. 1999)

ومازال علم البيوتكنولوجيا يضيف الكثير من الأبحاث المتطورة من عزل وتنقية وهندسة وراثية (طفرات ونقل مورثات، تهجين، استنساخ) ودراسة شروط الزرع وغيرها لإنتاج كميات كبيرة وقيمة من المواد باستخدام عمليات بسيطة من مواد أولية منخفضة الثمن.

تزرع الأحياء الدقيقة في كثير من البلدان في شروط ملائمة للإنتاجية والحصول على منتجات مجففة غنية بالكاروتينات أو مستخلصات زيتية أو مستحضرات وتستخدم حالياً مفاعلات حيوية Bioreactors لاصطناع كميات كبيرة من المستحضرات الكاروتينية العالية القيمة ذات الأسعار المنخفضة.

تستطيع الأحياء الدقيقة اصطناع الكاروتينات بكميات مختلفة اعتماداً على أوساط زرعيه تحتوي مواد أولية متوفرة في الطبيعة أو مخلفات تصنيعية (غذائية، زراعية، ....) بتحويلها إلى مواد عالية الفائدة.

وقد تم في هذا البحث عزل ودراسة بعض السلالات المحلية من مناطق مختلفة في القطر العربي السوري على شكل مزارع نقية وتم دراسة الشروط الإنتاجية والنمو لهذه السلالات باستخدام أوساط زرعيه تجريبية مختلفة على المستوى المخبري ومن ثم فصل وتحديد هذه المواد الحيوية الناتجة باستخدام الطرق الكيميائية والفيزيائية.

تمت الدراسة في مخابر قسم الهندسة الغذائية في كلية الهندسة الكيميائية والبترولية في جامعة البعث، عام (2002–2003) وقد تم عزل سبع مزارع من الأحياء الدقيقة الملونة وتصنيف ثلاث منها.

فأنتج فطر *Epicoccum* المعزول حوالي 10–86 مغ/ 100غ مادة جافة من β– كاروتين على وسط من مطحون قشور الحمضيات ومحلول تغذوي، بينما أعطت سلالات من الخمائر المعزولة من الـ *Rhodotorula* حوالي 14–115مغ% غ مادة جافة من β– كاروتين على أوساط مختلفة مصادر الكربون وأعطت سلالات من خميرة الـ *Phaffia* حوالي 18–60 مغ % غ مادة جافة من أستاكزاتين على أوساط مختلفة في مصدر الكربون.

لذلك يمكن أن تستخدم هذه الأحياء الميكروبية في عمليات الإنتاج التجاري بزراعتها على أوساط مختلفة وباستخدام التقانات الحيوية يمكن تحسينها حيوياً ووراثياً وبالتالي تحسين شروط الإنتاج وتطبيق هذه المنتجات في عمليات التصنيع الغذائي والصيدلاني وغيره من الصناعات .

المواد والطرق:

1. الأحياء الدقيقة Microorganisms

تم عزل الأحياء الدقيقة المنتجة للمواد الحمراء الملونة من أوساط في مناطق مختلفة من سورية (مخلل زيتون، عصير ليمون، خشب محلل بالماء، مكدوس، جبن، مياه راكدة، مستنقعات، تربة، لبنة) وأهم الأحياء الدقيقة المعزولة:

1. نوع *Epicoccum* sp. يعتبر من الفطور الخيطية والذي عزل من تربة مستنقعات (حمص وحماة) والمنتج للصبغات الكاروتينية أما من الناحية المورفولوجية فيكون بشكل هيفات ثخينة مقسمة وتعطي بعض الانتفاخات عند التفرع مشكلة مستعمرات ملونة (بيضاء – صفراء) إلى النضج وتنتج المستعمرات في الوسط الزرعي صبغات بنية محمرة تتحول إلى صلب.
2. نوع *Rhodotorula gracilis* عزل من محلول مخلل الزيتون (حمص) و لبنة (حماة)، يعتبر من الخمائر المنتجة للكاروتينات وتأخذ الخلايا شكل بيضوي أحمر–مصفر وتنتج بأغلبه β– كاروتين ومنتجات ثانوية من torulene و torulonic acid ومواد أخرى.
3. نوع *Phaffia rhodozyma* المعزول من عصير ليمون (اللاذقية) ولبنة (حماة) وهو عبارة عن خميرة كروية متبرعمة الشكل تعطي اللون الأحمر داخل الخلايا وهي من الأحياء الدقيقة الهامة في إنتاج الأستاكزانتين (Astaxanthin).

2. الأوساط الزرعية المستخدمة: Cultural medium

- **وسط العزل و التنقية: Isolated & selected medium**

تمت عملية العزل و التنقية ودراسة الصفات المورفولوجية والفيزيولوجية على وسط تشابك آغار (Czapek-agar) والمؤلف من (سكروز، K_2HPO_4، $MgSO_4.7H_2O$، KCl، $NaNO_3$، $FeSO_4$).

- **أوساط دراسة شروط النمو والإنتاجية:Productivity medium**

1. أوساط دراسة فطر *Epicoccum sp.* من الناحية الانتاجية والمؤلفة من أوساط شبه صلبة من منتجات القمح والذرة و قشور ثمار البرتقال مع محلول تغذوي (مولاس ، يوريا، محلول تشابك ،

أملاح)، أما الزراعة فتمت في شروط ساكنة لمدة 10 أيام/ 25^{o}م و بعد التجفيف والطحن حصل على مطحون بلون بني محمر مع صفات حسية جيدة .

2. أوساط دراسة خميرة *Phaffia rhodozyma* الذي يحتوي على الأملاح التالية (KH_2PO_4، $MgSO_4.7H_2O$، $CaCl_2$, NH_4NO_3)ومستخلص الخميرة و مصدر للكربون (غلوكوز، فركتوز، سكروز، مالتوز، غالاكتوز، لاكتوز).
3. أوساط زراعة *Rhodotorula gracilis* ويحتوي على الأملاح التالية (KH_2PO_4، $MgSO_4.7H_2O$، $CaCl_2$, NH_4NO_3) ومستخلص الخميرة و مصدر للكربون.

3. طرق التحليل:Analytical methods

*** الأجهزة والأدوات المستخدمة**

جهاز الـpH، المثقلة، فرن تجفيف كهربائي، جهاز HPLC، مجاهر كهربائية، جهاز سبيكتروفوتومتر، أطباق بتري، أنابيب أختبار.

*** المواد والكواشف المستخدمة**

وسط تشابك آغار (Czapek-agar) ، منتجات القمح والذرة و قشور ثمار البرتقال ، مولاس ، يوريا، مستخلص الخميرة، غلوكوز، فركتوز، سكروز، مالتوز، غالاكتوز، لاكتوز، أملاح من (K_2HPO_4 ، KCl، $NaNO_3$، $FeSO_4$،KH_2PO_4، $CaCl_2$,NH_4NO_3,$MgSO_4.7H_2O$) أسيتون، ميتانول ،ايتانول، أسيتونتريل، كلوروفورم، أوساط للحصول على الأحياء الدقيقة (مخلل زيتون، مكدوس، جبنة، خشب محلل، لبنة، عصير ليمون، مياه مستنقعات، تربة شاطئية)

*** التحاليل المجراة**

- تحديد الحموضة بواسطة جهاز الـ pH
- تحديد الكتلة الحيوية بجمع المزارع بواسطة المثقلة 6000 دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق.
- تحديد السكريات المرجعة بطريقة شيفر – سوموجي.
- جففت العينات بعد الغسيل و التثفيل إلى درجة حرارة 30^{o}م في الظلام.
- تحديد الرطوبة بواسطة التجفيف بالكحول للدرجة 50^{o}م في الظلام.
- تعداد الخلايا بطريقة التمديد و الزرع بأطباق بتري.
- تحديد اللون المرئي للمزارع.
- تحديد الكاروتينات

➢ بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC جهاز ماركة Shimadzu (RF-10 AXL) العمود Bondapak C_{18} والطور المتحرك: أسيتونتريل، كلوروفورم، ميتانول، ماء بالنسب (5:10:25:60) وحجم العينة 10μl التدفق1 مل/دقيقة والزمن 25 دقيقة في حرارة الغرفة و Photodiode Detector إلى الموجات (480) نانومتر.

➢ بالسبكتروفوتومتر الى الموجة 472 نانومتر لمركب أستاكزانتين و460 نانومتر لـ β− كاروتين.

وتحسب الكاروتينات بالعلاقة التالية

$$Carotene(g\%) = \frac{A}{99330} \times \frac{536.89}{1000} \times \frac{V}{w} \times 100$$

$$Astaxanthin(g\%) = \frac{A}{121700} \times \frac{596.8}{1000} \times \frac{V}{w} \times 100$$

حيث أن: A : الأمتصاصية المقاسة بالسبيكتروفوتومتر V : حجم العينة المأخوذ منها W : وزن العينة الماخوذة للتحليل

4. استخلاص المواد الكاروتينية:Extraction of carotenoids

تستخلص الكاروتينات بسرعة من الأنسجة مع التقليل من التخرب بالأكسدة أو بالأنزيمات ويكون الاستخلاص باستخدام المحلات العضوية القابلة للمزج مع الماء وغالباً أسيتون، ميتانول أوايتانول ويفضل الاستخلاص من الأنسجة المجففة بعد تقطيعها ميكانيكاً و مجانستها مع المحل العضوي في خلاط كهربائي ثم الترشيح والمادة الصلبة يعاد استخلاصها (2−3) مرة ثم يركز مباشرة وفي حالة احتوائه على الليبيدات يستخلص أولاً وبشكل سريع بالإيتر ثم يغسل بالماء (2−3) مرة ويبخر حتى الجفاف و يتم استخلاص وتحديد المواد الكاروتينية حسب المخطط في الشكلان (2) و(10)

الشكل (2) مخطط يبين طريقة استخلاص الكاروتينات من مزارع الأحياء الدقيقة

النتائج والمناقشة:

1. عزل وتنقية الأحياء الدقيقة المنتجة للكاروتينات Carotenoid microbial isolation & screening

تم جمع العينات للأحياء الدقيقة من مواد ومناطق مختلفة من سورية [مخلل زيتون (حمص)، مكدوس (اللاذقية)، جبنة (دمشق)، خشب محلل (اللاذقية)، لبنة (حمص)، عصير ليمون (اللاذقية)، مياه مستنقعات (حمص وحماة)، تربة شاطئية (اللاذقية)].

تمت دراسة عملية العزل والتنقية في مخبر الكيمياء الحيوية و الغذائية في قسم الهندسة الغذائية في كلية الهندسة الكيميائية و البترولية في جامعة البعث بزراعة العينات المجمعة في أطباق بتري على وسط تشابك–آغار والعزل على عدة مرات في نفس الوسط حتى تم الحصول على 7 مزارع نقية منتجة للأصبغة الحمراء و البرتقالية وحفظت في أنابيب تحتوي وسط تشابك–آغار.

تم تحديد ذاتية الأحياء الدقيقة المعزولة بواسطة دراسة الصفات المورفولوجية والفيزيولوجية من خلال المجهر الكهربائي ودراسة شروط النمو والمقارنة مع أحياء دقيقة مشابهه، فقد توصل إلى تصنيف ثلاثة نماذج من الميكروبات المنتجة للكاروتينات وهي (*Rhodotorula gracilis, Phaffia rhodozyma,* *Epicoccum sp*) أما العينات الباقية لم يتم تصنيفها بالرغم من أنها منتجة للأصبغة الحمراء أو الشبيهة بالحمراء كما هو موضحاً في الجدول(1)

الجدول (1) يوضح الأحياء الدقيقة المعزولة والمنتجة للكاروتينات

الحي الدقيق	النوع	الشكل الخلايا	لون المزرعة	الكاروتين المنتج
Epicoccum sp	أعفان	خيطي مقسم	أحمر بني	β– كاروتين
Phaffia rhodozyma	خميرة	كروي متبرعم	أحمر فاتح	أستاكزانتين
Rhodotorula gracilis	خميرة	بيضوي متبرعم	برتقالي	β– كاروتين

يلاحظ من خلال الدراسة بأن الطبيعة السورية غنية بالمصادر الحيوية المتنوعة والمتأقلمة للتعايش في هذه البيئة والتي يمكن جمعها وعزلها وانتقاء أصناف وأنواع من الأحياء الدقيقة عالية الإنتاجية والفائدة والتي تشكل مصدراً هاماً للحصول على أنواع متعددة من المواد الحيوية ذات الفعالية العالية.

2. دراسة إنتاجية الأصبغة الكاروتينية للأحياء الدقيقة المعزولة

Carotenoid microbial productivity

1. دراسة إنتاجية فطر *Epicoccum sp.* للأصبغة الكاروتينية

يكون النمو الهوائي للفطور ملائماً لزيادة النسبة بين سطح الزرع و سماكة الطبقة السائلة مع التذكير بإعطاء البادئ إلى السطح وهذه الشروط يمكن أن تكون محققة من خلال الزرع السطحي على أوساط شبه صلبة حيث تملك وفرة بالأكسجين مما يثبت الميسيليوم في هذه الطبقة وتسهل عملية التجفيف السريع الذي يؤدي إلى استخلاص كامل للأصبغة الناتجة عن الاصطناع الحيوي (داخل أو خارج الخلية) و من خلال زراعة الـ *Epicoccum sp.* على أوساط مختلفة حيث كان الوسط المغذي الصلب عبارة عن مطحون حبوب القمح أو قشور القمح أو مطحون الذرة أو مطحون قشور

الحمضيات بينما كان السائل المغذي عبارة عن (مولاس، يوريا، أملاح) و بعد 10 أيام من الزرع في درجة حرارة 25°م تم الحصول على النتائج المدونة في الجدول (2)

الجدول (2) يبين الاصطناع الحيوي للأصبغة الكاروتينية بنظام SSF (زراعة ساكنة 10 أيام/25°م)

التجربة	تركيب الوسط			الرطوبة	المحتوى β- كاروتين	
	الوسط السائل	سوبسترات صلبة	النسبة	وسط متخمر%	مغ/غ مادة جافة	مغ/كغ منتج
1	محلول تشابك- آغار	سكروز	1: 0,02	12,34	0,103	90,26
2		مولاس	0,2: 1	9,81	0,123	110,93
3	وسط مع مولاس، يوريا، أملاح	قشور القمح	4 : 1	13,55	0,318	274,9
4		مطحون القمح	4 : 1	14,19	0,163	139,8
5		مطحون الذرة	2,5 : 1	8,44	0,234	214,2
6		مطحون القمح+ مطحون الذرة(1:1)	3 : 1	10,20	0,140	125,7
7	أملاح تشابك	مطحون قشور الحمضيات	2,8 : 1	8,91	0,866	789,70
8	مولاس	مطحون قشور الحمضيات	2,8 : 1	10,49	0,504	450,78

كانت أفضل النتائج في هذه الشروط مع مطحون من قشور الحمضيات في وسط تشابك وأيضاً مع المولاس وكانت نسبة الزيادة للمحتوى في β-كاروتين تقريبا 2,8 -7 مرات مقارنة مع المزارع في الوسط مع قشور أو مطحون القمح أو الذرة في نظام SSF ويفسر ذلك باحتواء قشور الحمضيات على مركبات أولية تدخل في عملية اصطناع الكاروتينات من قبل هذا الفطر وهذا ما يؤمن وسط منخفض الثمن من المواد المغذية و المنتج المتخمر الجاف يمكن حفظه حتى لحظة استخلاصه بالمقارنة مع الأوساط السائلة التي يتطلب تجفيفها جهداً وعملاً أكثر.

2. دراسة إنتاج الكاروتينات بواسطة الخمائر المعزولة Carotenoid yeast productivity

- **دراسة إنتاجية خميرة *Phaffia rhodozyma* للأصبغة الكاروتينية**

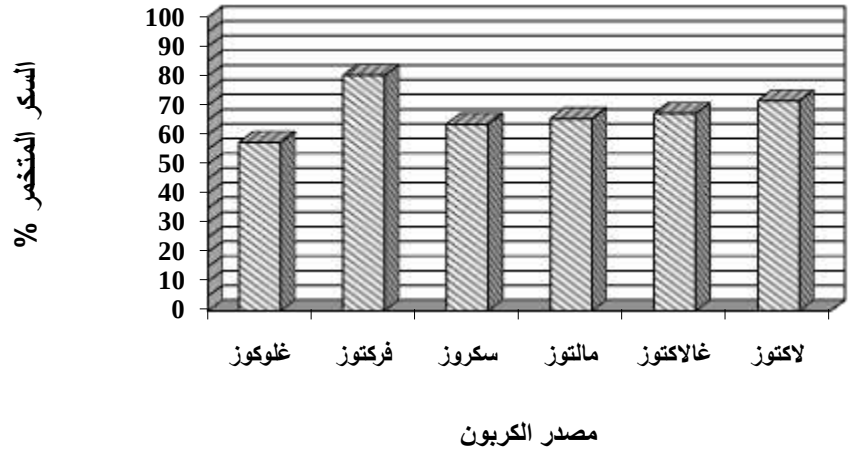
تنتج هذه الخميرة المواد الكاروتينية داخل الخلايا وتعتبر هامة من الناحية التجارية حيث تنتج مركب الـAstaxanthin بكميات كبيرة و يعتبر هذا المركب ذو فعالية حيوية عالية كمضاد أكسدة في الصناعة الصيدلانية و التجميلية واتجهت الأبحاث حالياً لإنتاج الأستاكزانتين من هذه الخميرة في شروط ملائمة للنمو و الإنتاجية لاسيما وأن انتشار هذه الخميرة واسع في سورية وهي تنمو في أوساط تحتوي على مصادر مختلفة من الكربون ودرجات حرارة بين 18-22°م.

تم تحضير البادئ لخميرة *Phaffia rhodozyma* المعزولة من عصير ليمون (اللاذقية) ومنتجات الألبان (حماة) و المحفوظ في أنابيب اختبار بنقل الخلايا إلى أرلينماير سعة 500 مل تحتوي 100 مل من وسط النمو والتي تحضن على الهزاز بالدرجة(18−20°م) لمدة 24 ساعة.

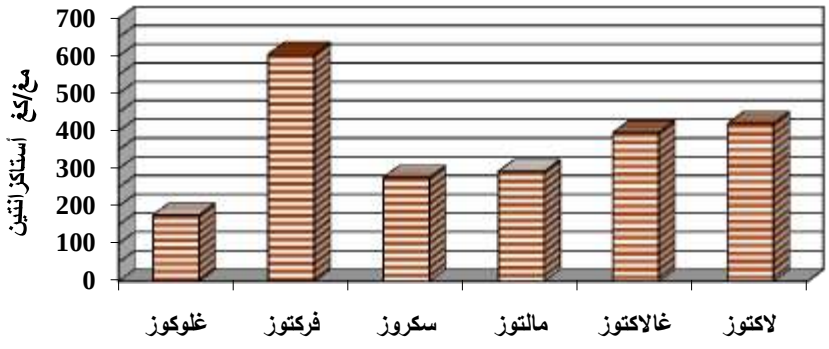
كان الوسط المنتقى لتحضير البادئ و الوسط الزرعي مؤلفاً من (KH_2PO_4، $MgSO_4.7H_2O$، $CaCl_2$) ومستخلص الخميرة و مصدر للكربون 2% من السكريات (غلوكوز، فركتوز، سكروز، مالتوز، غالاكتوز، لاكتوز)، تم تحضير المحلول وضبط الـpH على 4.8 باستخدام HCl و 0.1n, NaOH ووزع على أرلينماير بعد التعقيم بالاوتوكلاف (121م° /20 دقيقة) أعطي البادئ بتركيز ($CFU/mol = 5.1x10^6$) وحضنت على هزاز 200 دورة/دقيقة بدرجة18°م لمدة خمس أيام وكانت النتائج مدونة في الجدول (2) والأشكال (3)و(4)و(5) والشكل (6) يوضح مخططات التحليل الكروماتوغرافي لهذه النتائج

الجدول (2) يوضح كمية أستاكزانتين الناتج من زراعة خميرة *Phaffia rhodozyma* على أوساط مختلفة بمصدر من الكربون (هزاز 5 أيام/18°م)

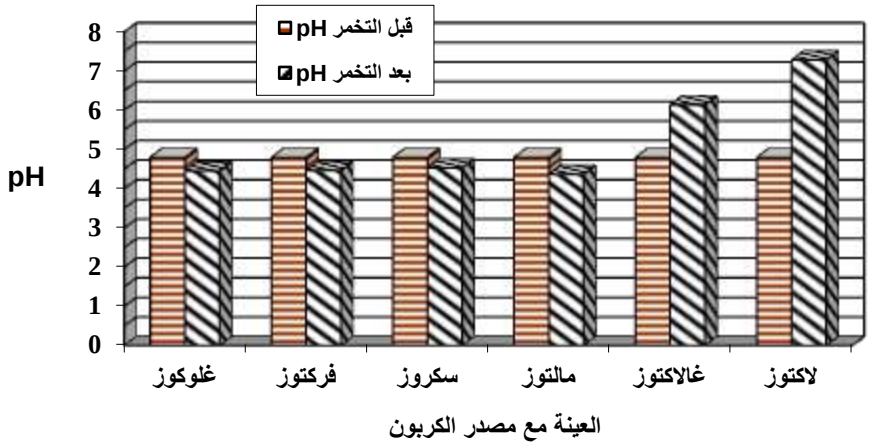
رقم تجربة	مصدر الكربون	كمية السكريات مغ%مل		كمية السكريات المتخمرة%	كمية أستاكزانتين	
		قبل	بعد		مغ%غ مادة جافة	مغ/كغ مادة جافة
1	غلوكوز	2154.32	918.82	57.35	17.656	176.56
2	فركتوز	1948.88	387.24	80.13	60.492	604.92
3	سكروز	2063.91	752.29	63.55	27.637	276.37
4	مالتوز	1896.67	655.68	65.43	29.276	292.76
5	غالاكتوز	2107.74	691.13	67.21	39.633	396.33
6	لاكتوز	2007.30	570.67	71.57	41.975	419.75



الشكل (3) يبين النسبة المئوية للسكريات المتخمرة بواسطة *Phaffia rhodozyma* في وسط إنتاج أستاكزانتين (هزاز 5 أيام/18°م)



الشكل (4) يبين كمية أستاكزانتين المنتجة بواسطة *Phaffia rhodozyma* (هزاز 5 أيام/18°م)



الشكل (5) يبين نتائج تغير قيم الـ pH خلال التخمر بواسطة خميرة *Phaffia rhodozyma* (هزاز 5 أيام/18°م)

تبين النتائج الموضحة في الجدول (2) و الأشكال (3، 4، 5) بأن الخميرة *Phaffia rhodozyma* المعزولة من البيئة السورية تملك المقدرة على إنتاج الأصبغة الكاروتينية في الشروط العادية والتجريبية بتغيير شروط النمو وبالتالي يمكن الحصول على نتائج عالية من الأستاكزانتين و لاسيما في الوسط الذي يحتوي على الفركتوز حيث أعطى حوالي (600 مغ/كغ وسط جاف) بالزراعة على أوساط شبه صلبة وأيضاً أعطت نتائج جيدة في الوسط الذي يحتوي على اللاكتوز و الغالاكتوز (400 مغ/كغ وسط جاف) وتوافق هذه النتائج العلاقة بين إنتاج هذه الخميرة ومصدر الحصول عليها من منتجات الألبان أو العصائر.

يلاحظ بأن نفس الخميرة تستهلك كميات كبيرة من السكريات في الأوساط التي أعطت كميات أكبر من الأستاكزانتين وهذا ما يوضح انخفاض الحموضة في الأوساط الذي يحتوي على اللاكتوز والغالاكتوز بينما تبقى ثابتة تقريباً في باقي الأوساط.

- **دراسة الإنتاجية للكاروتينات بواسطة خميرة *Rhodotorula gracilis***

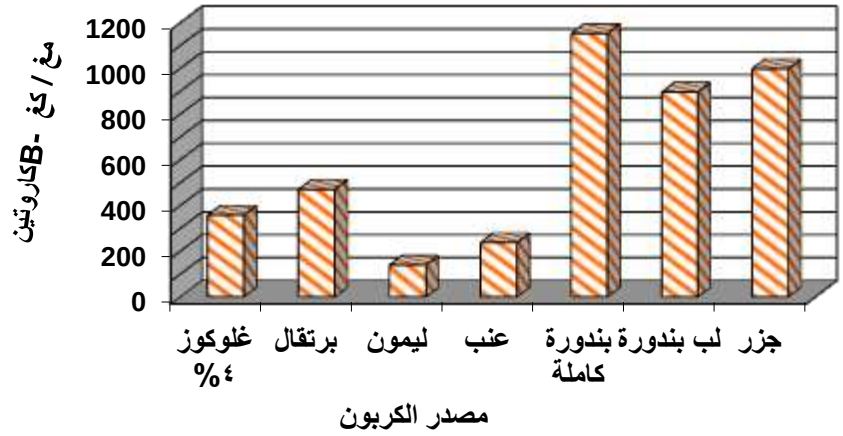
تنتج هذه الخميرة في الشروط الملائمة بشكل رئيسي الـ β- كاروتين و مركب التورولين و حمض التوروليك بشكل ثانوي. تستخدم الكاروتينات كملونات غذائية أو تضاف في علف الحيوانات و لا سيما (الأغنام و الطيور و الأسماك) و تدخل في المنتجات الطبية و الصيدلانية والمنتجات التجميلية وبعض الصناعات الكيميائية.

تم الانطلاق من محلول مخلل الزيتون (حمص) وخضار(حمص) لتحضير البادئ لخميرة *Rhodotorula gracilis* المحفوظ في أنابيب اختبار بنقل الخلايا إلى أرلينماير سعة 500 مل تحتوي 100 مل من وسط النمو 1% غلوكوز وحضن على الهزاز لمدة 48 ساعة وفي درجة حرارة الغرفة. كان الوسط المنتقى لتحضير البادئ و الوسط الزرعي مؤلفاً من (KH_2PO_4، $CaCl_2$, (NH_4NO_3، $MgSO_4.7H_2O$ ومستخلص الخميرة و مصدر للكربون الذي هو عبارة عن مستخلص من الخضار والفواكه (برتقال، ليمون، عنب، بندورة، جزر، وشاهد 4% غلوكوز).

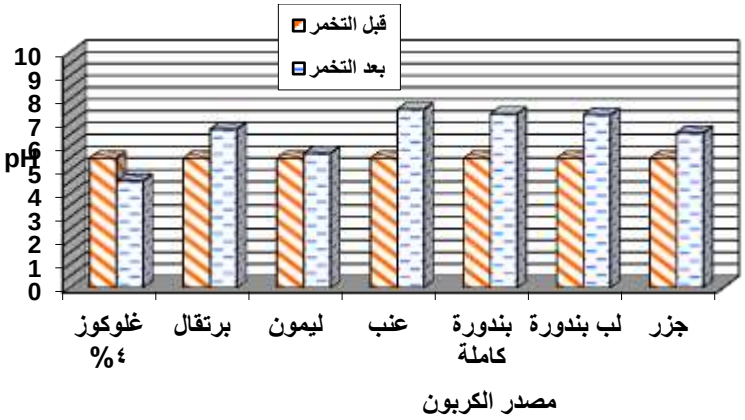
تم تحضير المحلول وضبط الـpH على 5.5 باستخدام HCl و 0.1n, NaOH ووزع على أرلينات بعد التعقيم (121م° /20 دقيقة) أعطي البادئ ($CFU/mol =3.2 x10^6$) وحضنت على هزاز 200 دورة/دقيقة بدرجة حرارة الغرفة لمدة خمس أيام.وكانت النتائج مدونة في الجدول (4) والأشكال (7) و (8) والشكل (9) يوضح مخططات التحليل الكروماتوغرافي لهذه النتائج.

الجدول (4) يبين نتائج تاثير مصدر الكربون (خضار و فواكه) على انتاج β- كاروتين بواسطة خميرة *Rhodotorula gracilis* (هزاز 5 أيام/25°م)

رقم تجربة	مصدر الكربون	pH		β- كاروتين	
		قبل	بعد	مغ%غ	مغ/كغ
1	غلوكوز 4%	5.5	4.53	35.778	357.78
2	برتقال	5.5	6.73	47.059	470.59
3	ليمون	5.5	5.71	13.963	139.63
4	عنب	5.5	7.57	23.763	237.63
5	بندورة كاملة	5.5	7.38	115.199	1151.99
6	لب بندورة	5.5	7.33	89.586	895.86
7	جزر	5.5	6.57	99.767	997.67



الشكل (6) يبين نتائج تاثير مصدر الكربون (خضار و فواكه) على انتاج β- كاروتين بواسطة خميرة *Rhodotorula gracilis* (هزاز 5 أيام/25°م)



الشكل (7) يبين نتائج تغير قيمة pH خلال التخمر بواسطة خميرة *Rhodotorula gracilis* (هزاز 5 أيام/25°م)

تبين النتائج الموضحة في الجدول (4) والشكلان (6) و(7) بأن الخميرة *Rhodotorula gracilis* تنتج كميات كبيرة من الكاروتينات لتصل إلى (0.9 –1.15 غ/كغ مادة جافة) عند إضافة مستخلص البندورة أو الجزر أو البرتقال إلى الوسط بينما إلى المستخلصات الأخرى كان نسبياً أقل وهذا ما يفسر احتواء منتجات البندورة و الجزر وقشور الحمضيات على مركبات خماسية ذرات الكربون والتي تدخل في سلسلة الاصطناع الحيوي للكاروتينات كما هو موضحاً في الشكل (1) ولاسيما مركب β- كاروتين الذي تصنعه هذه الخميرة بكميات كبيرة في جدرها الخلوية بالإضافة إلى المركبات الكاروتينية الأخرى مقارنة مع الشاهد الذي يحتوي على الغلوكوز فقط..

- **مقارنة الإنتاجية بين السلالات المعزولة**

يبين الجدول (5) المقارنة بين المزارع التي تم عزلها و دراسة إنتاجيتها على أوساط مختلفة والتي أعطت تراكيز عالية من المواد الكاروتينية

الجدول (5) يبين أفضل النتائج التي حصل عليها من زراعة الفطور المعزولة لإنتاج الكاروتينات

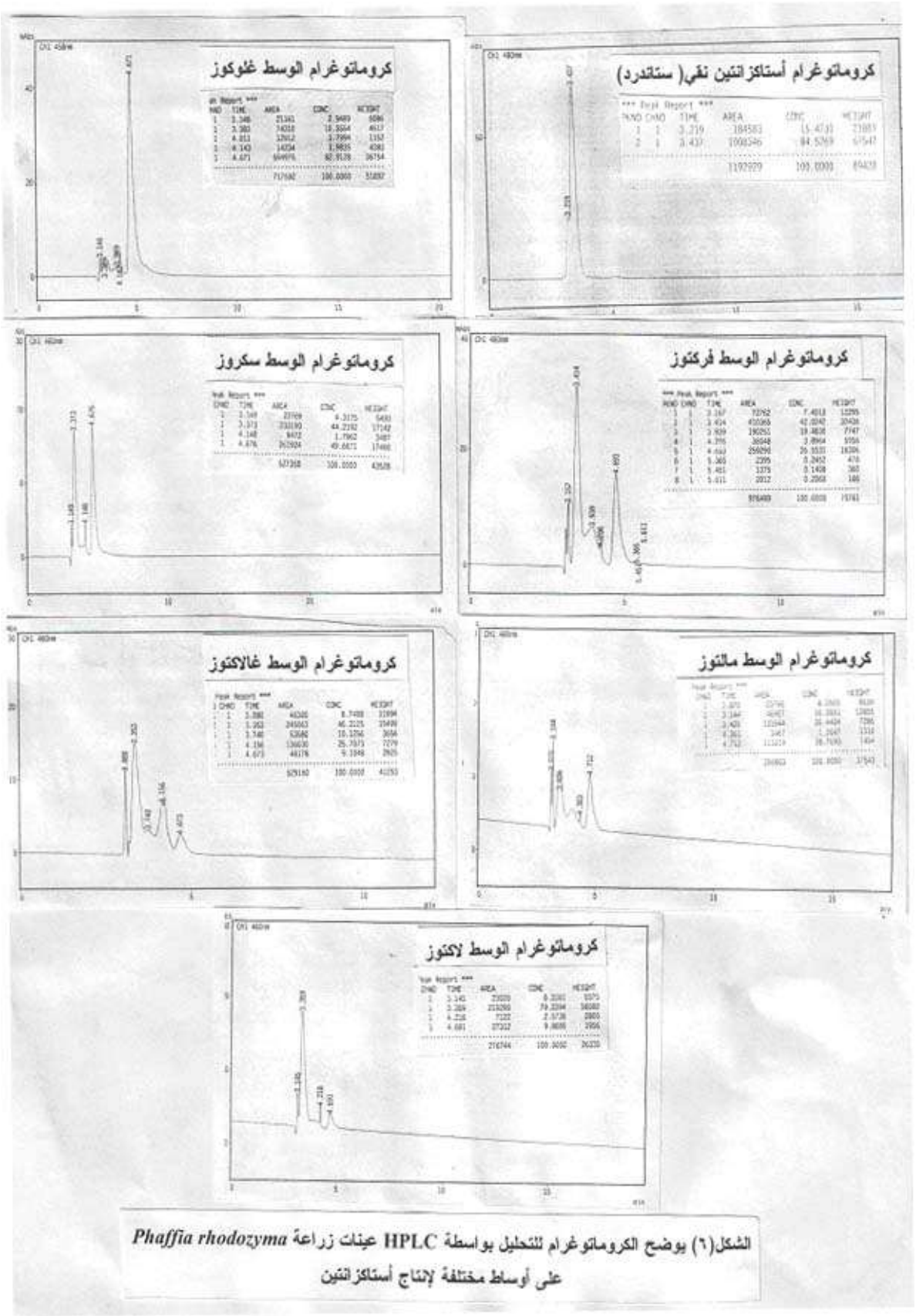
تجربة	السلالة	تصنيف	وسط الزرع	المنتج الكاروتيني	كمية الكاروتين مغ/كغ
1	*Epicoccum sp.*	أعفان	مطحون قشور حمضيات + أملاح تشابك	β- كاروتين	789,70
2			مطحون قشور حمضيات + مولاس	β- كاروتين	450,78
3	*Phaffia rhodozyma*	خميرة	فركتوز + أملاح	أستاكزانتين	604.92
4			غالاكتوز + أملاح	أستاكزانتين	396.33
5			لاكتوز + أملاح	أستاكزانتين	419.75
6	*Rhodotorula gracilis*	خميرة	بندورة كاملة + أملاح	β- كاروتين	1151.99
7			لب بندورة + أملاح	β- كاروتين	895.86
8			جزر+ أملاح	β- كاروتين	997.67
9			برتقال + أملاح	β- كاروتين	470.59

تبين النتائج في الجدول (5) بأن زراعة الفطور المعزولة من البيئة السورية تعطي كميات عالية من المواد الكاروتينية ولاسيما عند استخدام أوساط مغذية أو مواد ثانوية في الوسط الزرعي (قشور حمضيات، منتجات بندورة، منتجات جزر،....) حيث تحتوي على مركبات وسيطية تدخل في عملية الاصطناع الحيوي للمواد الكاروتينية أو تحرض على تشكيلها.

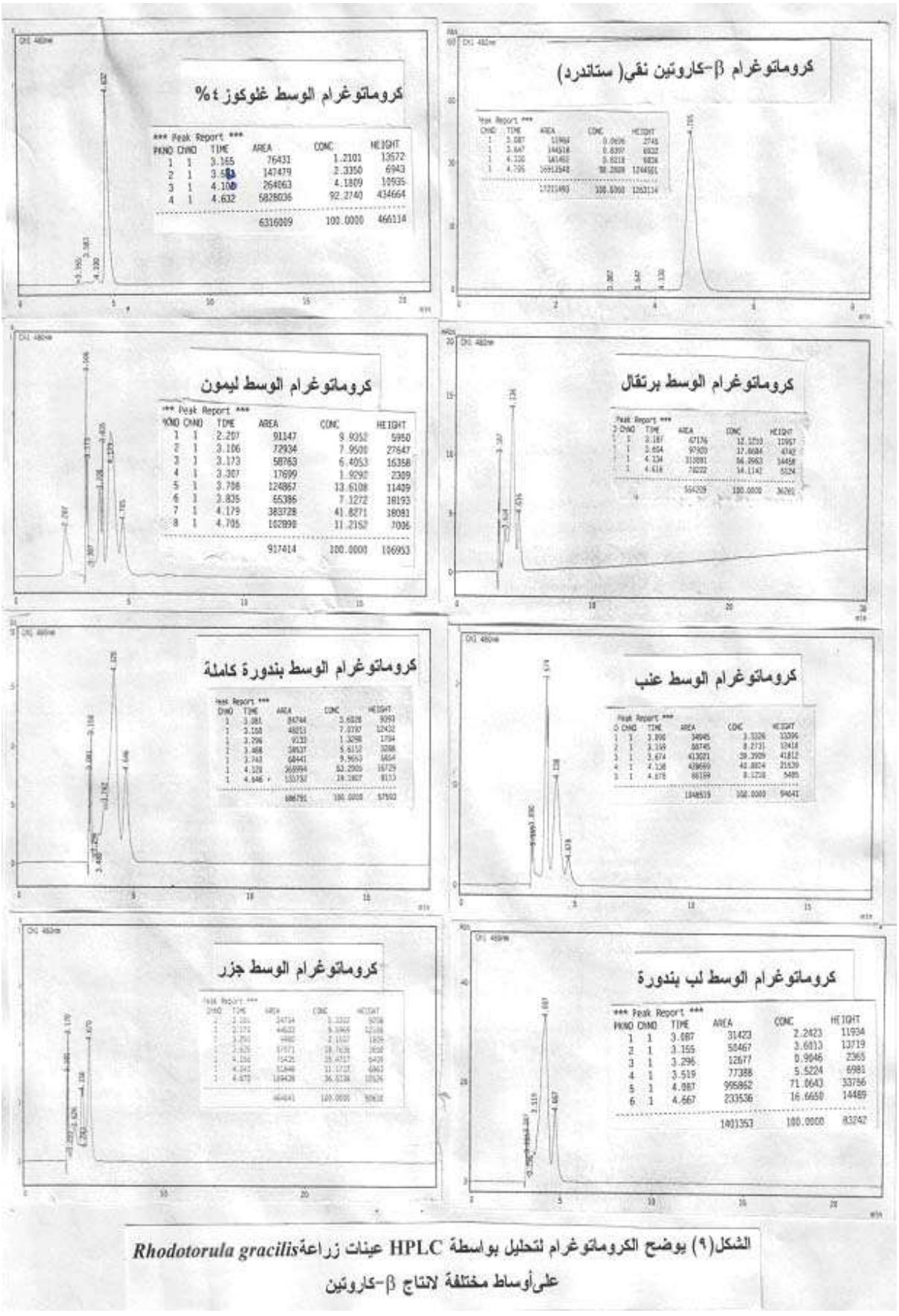
النتائج

1. تبين الدراسة بأن الطبيعة السورية غنية بالمصادر البيئة الحيوية المتنوعة والتي يمكن الاعتماد عليها في جمع وعزل وانتقاء أصناف وأنواع من الأحياء الدقيقة عالية الفائدة والتي تشكل المصدر الهام للحصول على شتى أنواع المواد الحيوية ذات الفعالية العالية.

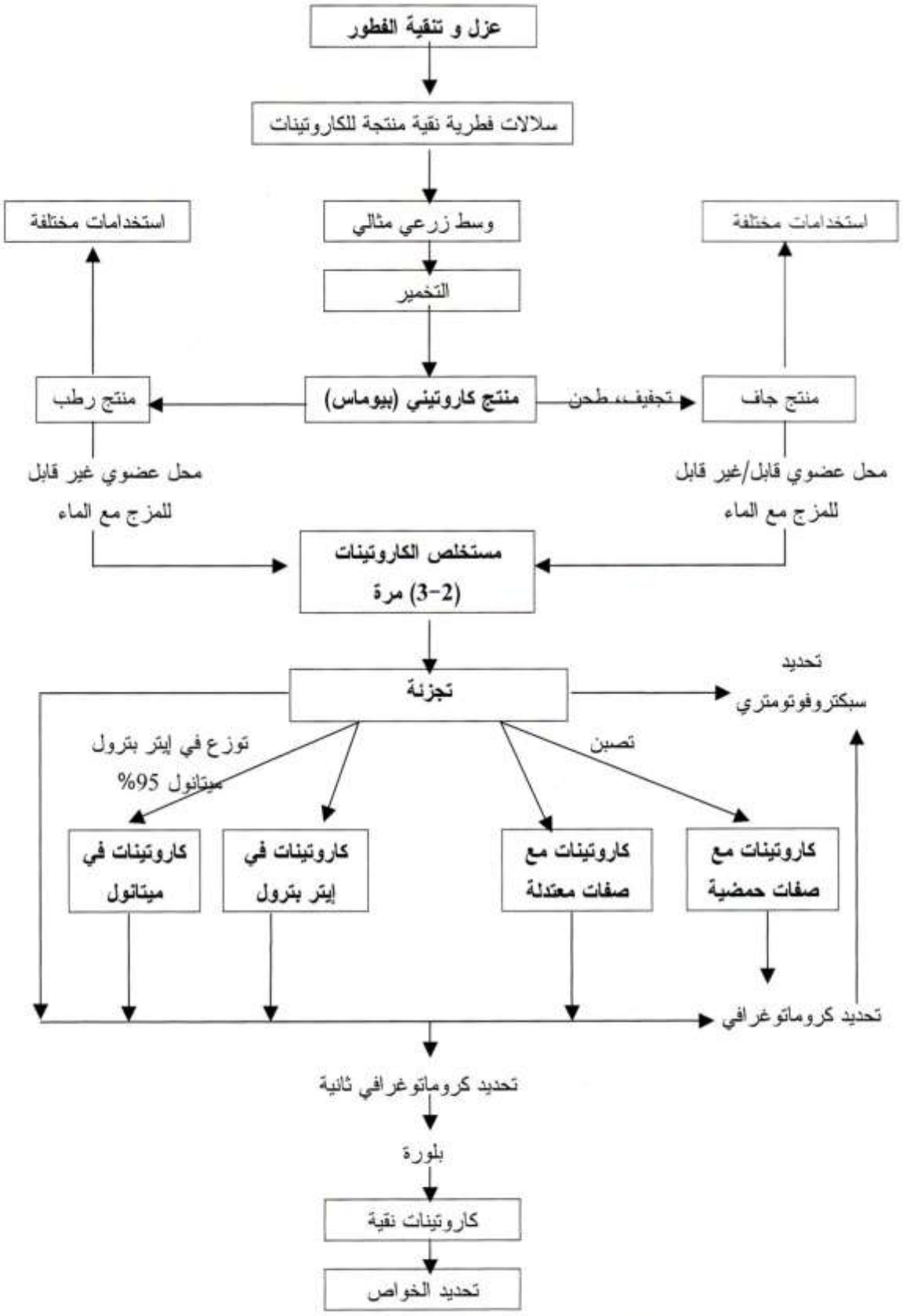
2. تم عزل 7 مزارع نقية منتجة للأصبغة الحمراء و البرتقالية من بعض المنتجات الزراعية والغذائية وحفظت في أنابيب تحتوي وسط تشابك–آغار.
3. تم تصنيف ودراسة ثلاثة نماذج من السلالات المنتجة للكاروتينات وهي (*Epicoccum sp*, *Rhodotorula gracilis*, *Phaffia rhodozyma*).
4. من خلال دراسة فطر *Epicoccum sp* كانت أفضل النتائج في هذه الشروط مع مطحون من قشور الحمضيات في وسط تشابك ويليها مع المولاس وكانت نسبة الزيادة للمحتوى في β– كاروتين تقريبا 5–7 مرات مقارنة مع المزارع في الوسط مع قشور أو مطحون القمح أو الذرة في نظام SSF .
5. تملك الخميرة *Phaffia rhodozyma* المعزولة من البيئة السورية المقدرة على إنتاج الأصبغة الكاروتينية في الشروط العادية والتجريبية بتغيير شروط النمو وبالتالي الحصول على نتائج عالية من الأستاكزانتين و لاسيما في الوسط الذي يحتوي على الفركتوز حيث أعطى حوالي (600 مغ/كغ وسط جاف) بالزراعة على أوساط شبه صلبة وأيضاً أعطت نتائج جيدة في الوسط الذي يحتوي على اللاكتوز و الغالاكتوز حوالي (400 مغ/كغ وسط جاف).
6. تنتج الخميرة *Rhodotorula gracilis* كميات كبيرة من الكاروتينات لتصل إلى (0.9 –1.15 غ/كغ مادة جافة) عند إضافة مستخلص البندورة أو الجزر أو البرتقال.
7. تعطي زراعة الفطور المعزولة كميات عالية من المواد الكاروتينية باستخدام أوساط زرعية من أوساط مغذية أو مواد ثانوية في (قشور حمضيات، منتجات بندورة، منتجات جزر،.....) حيث تحتوي على مركبات وسيطية مختلفة عدد ذرات الكربون (C_5 –C_1) تدخل في عملية الاصطناع الحيوي للمواد الكاروتينية أو تحرض على تشكيلها.
8. يمكن استخدام و تحسين المخلفات التصنيعية بالطريقة البيوتكنولوجية للحصول على المواد الكاروتينية الغير سامة بهدف استخدامها في تطبيقات غذائية وصيدلانية و تجميلية.



الشكل(٦) يوضح الكروماتوغرام للتحليل بواسطة HPLC عينات زراعة *Phaffia rhodozyma* على أوساط مختلفة لإنتاج أستاكزانتين



الشكل(٩) يوضح الكروماتوغرام لتحليل بواسطة HPLC عينات زراعة*Rhodotorula gracilis*
على أوساط مختلفة لانتاج β-كاروتين



الشكل (10) يوضح مخطط تكنولوجي عام لكيفية إنتاج والحصول على الكاروتينات ابتداءمن المزارع الفطرية المنتجة لها

المراجع:

.....

1. AN, G. H., et al., (2000)- Quantification of carotenoids in cells of *Phaffia rhodozyma* by autofluorescence. **Biotechnology Letters**, 22, 1031-1034.

2. ANDREWES, A. G., et al., (1976)- Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a Red-Pigmented Fermenting Yeast. **Phytochemistry**, 15:1003-1007.

3. CALO, P. & GONZALEZ, T**.** (1995)- The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin. **Microbiologia**, 11: 386-388

4. COSTA, I., et al., (1987) Production of β-carotene by a *Rhodotorula* strain. **Biotechnology Letters**, 9: 5, 373-375.

5. DAN, V., GORGESCU, M., (1992)- microbial pigment production. **Revesta microbiana**, Bucharest, Romania, p 435-441

6. DAN, V., BAHRIM, G., NICOLAU, A., (1998)- New food colorants rich in β-carotene obtained from microbial source. **A VI-a Conf. of Food Technology**, Tessalonic, Greece.

7. GIRARD P, FALCONNIER B, BRICOUT J & VLADESCU B. (1994)- beta-carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. **Microbiol. Biotechnol**. 41:183-191

8. GOLUBEV, W. I., (1995) Perfect State of Rhodomyces dendrorhous (*Phaffia rhodozyma*). **Yeast**, 11:101-110,.

9. HAARD, N. F., (1988)- Astaxanthin formation by the yeast on molasses. **Biotechnology Letters**, 10: 9, 609-614.

10. JOHNSON E. A., (1991)- Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, 11:297-326.

11. JOHNSON, E.,& SCHROEDER, W., (1995)- Microbial carotenoids. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 53:119-178

12. ROUSEFF, R. & NAGY, S., (1994)- Health and Nutritional Benefits of Citrus Fruit Components. **Food Technology,** Nov. p.125 –132

13. VERDOES, J. & VANOOYEN, A., (1999)- Isolation of the isopentenyl diphosphate isomerase encoding gene of *Phaffia rhodozyma*; improved carotenoid production in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters** 146:43-53

14. YASSINE M., (1999)- biotechnological method of citrus waste**.** **Proceed. of Sci. Com. Meeting of Aurel Vlaicu University**, vol.9, p.379 -386.