المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (11) العدد (1)
لسنة 2019

دراسة الفعالية البايولوجية للكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* المعزولة محليا وتحديد الظروف المؤثرة في ثباتيتها

http://dx.doi.org/10.28936/jmracpc11.1.2019.(7)

الهام اسماعيل الشمري[1]، زهراء عبد احمد[2*]
[1] استاذ مساعد دكتور، قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق، Elhamfadhil@yahoo.com
[2] طالبة دراسات عليا، ماجستير، قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق، xxxxxxxxx@yahoo.com

تاريخ استلام البحث: 2019/2/19 تاريخ قبول النشر:2019/4/15

الخلاصة

درست الفعالية البايولوجية للكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* المعزولة محليا والمطفرة كيميائيا واظهرت النتائج امتلاك الكاروتينويدات فعالية تثبيطية مختلفة ضد بعض الانواع البكتيرية المرضية شملت *Staphylococcus aureus* و*Escherichia coli* و*Bacillus subtilis* و*Salmonella typhi*، اذ انخفضت العدد من 2×10^7 خلية/ مل الى 2×10^4 و5×10^4 و2×10^5 و9×10^5 خلية/ مل على التوالي بعد 24ساعة، واوضحت الدراسة امتلاك الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* المعزولة محليا والمطفرة كيميائيا فعالية مضادة للاكسدة، اذ بلغت النسبة المئوية لكسح الجذور الحرة 85.6% باستعمال طريقة جذور DPPH، واظهرت الكاروتينويدات اعلى ثباتية في مذيب البترولييوم ايثر لمدة 30 يوم بدرجة حرارة الغرفة، كما وجد ان الصبغة اكثر ثباتية في زيت السمسم مقارنة بزيت زهرة الشمس وزيت جوز الهند، واظهرت الصبغة ثباتية عالية في الظلام مدة 30 يوم مقارنة بثباتيتها في الضوء سواء كانت مخزنة بالبترولييوم ايثر او زيت السمسم، مع ملاحظة الثباتية العالية للصبغة بدرجة حرارة الثلاجة 4م والثباتية الجيدة بدرجة حرارة الغرفة 25م.

الكلمات المفتاحية: الكاروتينويدات، الفعالية البايولوجية، *Rhodotorula mucilaginosa*

BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE CAROTENOIDS WHICH ARE PRODUCED FROM LOCAL ISOLATE *Rhodotorula mucilaginosa* AND DETRERMINATION THE CONDITIONS AFFECTING THEIR STABILITY

***ElhamIsmaeel Al-shamary*[1], *Zahraa Abed Ahmed*[2]**
[1]Assist. Prof. PhD. Department of Food Sciences, Collegeof of Agricultural Engineering, University of Baghdad, Baghdad, Iraq. Elhamfadhil@yahoo.com
[2]Department of Food Sciences, Collegeof of Agricultural Engineering, University of Baghdad, Baghdad, Iraq. xxxxxxxxx@yahoo.com

ABSTRACT

Biological activity of the carotenoids which are produced fromchemically-mutaed local isolate of *Rhodotorula mucilaginosa*was studied. The results showed variation of inhibition activity of caritenoids against different types of pathogenic bacteria include, *Staph aureus, E. coli, B. subtilis and Salmo. typh.*, the number declined from 2×10^7cell/ml to 2×10^4, 5×10^4, 2×10^5, 9×10^5 cell/ml respectively after 24hour. The produced carotenoids from alocal mutant *Rhodotorula mucilaginosa* revealed an antioxidant activity as free radical removal of 85.6%. Carotinoides revealed a highest stability in petroleum ether solvent for 30 days at room temperature. It found that the pigment was more stability in sesame oil compared with sun flower and coconut oil. The pigment revealed a high stability in the dark for 30 days compared with its stability in the light either were stored in petroleum ether or sesame oil with note the pigment high stability at refrigerator temperature (4ºC) and the good stability at room temperature (25ºC).

Key words: Carotenoids, Biological activity, *Rhodotorula mucilaginosa*.

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

المقدمة INTRODUCTION

تمتلك الكثير من الاحياء المجهرية القدرة على إنتاج أنواع مختلفة من الصبغات، ومن أهم الصبغات التي أنتجت من الاحياء المجهرية والاكثر أهمية هي الكاروتينويدات والفلافونويدات وبعض الزانثوفيلات، وتعد البيتا كاروتين هي الصبغة الاكثر إستعمالا في الصناعات الغذائية والتي يتم الحصول عليها من الطحالب الدقيقة وبعض أنواع البكتريا والخمائر **(Venil *et al.*, 2013; Soliev *et al.*, 2011).**

أشار **Berman *et al.* (2015)** و **Henríquez *et al.* (2016)** الى إمكانية إنتاج الكاروتينويدات الطبيعية من الاحياء المجهرية المختلفة بما في ذلك البكتريا والخمائر والفطريات الخيطية والطحالب الدقيقة، وتعد الخمائر اكثر ملائمة لإنتاج الكاروتينويدات من الاحياء المجهرية الاخرى بالنظر لكونها كائنات وحيدة الخلية فضلاً عن معدل نموها السريع وطبيعتها المسامية، وتتميز خميرة *Rhodotorula* التابعة للفطريات البازيدية، والتي ينظوي تحتها اكثر من 35 نوع بقدرتها على تخليق الكاروتينويدات **(Querol & Fleet 2006)**، وقد إزداد الاهتمام في السنوات القليلة الماضية بالكاروتينويدات الطبيعية لما تمتلكه من خواص بايولوجية وعلاجية ووقائية عديدة، إذ تعد البادئ Precursor لفيتامين A داخل جسم الانسان ولاسيما البيتا كاروتين، مما يشجع على زيادة الاهتمام بإنتاجها إذ بلغ أكبر سوق للبيتا كاروتين حوالي 261 مليون دولار أمريكي في عام 2010 ومن المتوقع ان ينمو الى 343 مليون دولار بحلول عام 2018، إذ أن نقص أخذ فيتامين A يعد من المشاكل التغذوية المنتشرة عالمياً، ويؤدي نقصه الى جفاف العين مما يؤدي الى حدوث العمى ولاسيما لدى الاطفال كما إن نقصه يؤدي الى إضعاف الجهاز المناعي **(Bai *et al.*, 2011; Farré *et al.*, 2011)**، وأشارت الكثير من الأدلة والنتائج التجريبية الى أن تناول الكاروتينويدات الطبيعية يمنع من ظهور الكثير من الامراض مثل تصلب الشرايين وإعتام عدسة العين وكذلك السرطان، والذي يحفز أساساً بسبب وجود الجذور الحرة التي تعد من المنتجات الثانوية لعملية التمثيل الغذائي، وتنتج ايضا من الملوثات البيئية مثل ثنائي اوكسيد النتروجين، والاوزون في الهواء الملوث، والمعادن الثقيلة، والهيدروكربونات الهالوجينية، والاشعة المؤينة، ودخان السكائر، وتلحق الضرر بالتركيب الوظيفي لاغشية الخلايا والاحماض النووية والبروتينات، وتتركز خطورتها في تفاعلاتها الإنتقائية وقدرتها على الانتشار في النظام البايولوجي، وتعد الكاروتينويدات مواد وقائية وعلاجية للكثير من الامراض عن طريق كسحها للجذور الحرة ، ومنع الضرر المتسبب عنها **(Chanchay *et al.*, 2012)** بالنظر لما تمتلكه من طبيعة مضادة للأكسدة تمنحها تأثير مضاد للسرطان **(Berman *et al.*, 2015; Yadav & Prabha 2014)** ، وبينت بعض الدراسات الى إمتلاك الكاروتينويدات الى الكثير من الآليات التي تؤهلها أن تكون بمثابة مواد مضاد للأكسدة من خلال قدرتها على أن تعمل كمواد حماية من الآثار الضارة للضوء أو الاوكسجين أو مركبات مضادة للتفاعلات الكيميائية التي تحدث داخل الخلية ، والقادرة على إحداث ضرر تأكسدي **(da Costa Cardoso *et al.*, 2017; Farré *et al.*, 2011)**، كما لاحظ **DellaPenna & Pogson (2006)** الى أن تناول الكاروتينويدات يمنع من الشيخوخة وحروق الشمس على الجلد، شرط تناولها لعدة اسابيع لزيادة مستوياتها في الدم ومن ثم زيادة الحماية، لذا فقد هدفت الدراسة الحالية دراسة الفعالية البايولوجية المضادة للاحياء المجهرية والمضادة للاكسدة للكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M المعزولة محليا والمطفرة كيميائيا وتحديد ثباتيتها باستعمال انواع مختلفة من المذيبات والزيوت ودراسة ثباتيتها بدرجات حرارية مختلفة و مدى تأثير الاضاءة عليها لتحديد مدى امكانية استعمالها في المنتجات الغذائية المناسبة.

المواد وطرائق العمل Materials and methods:

تقدير الفعالية المضادة للاحياء المجهرية للكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M
Determination of antimicrobial activity of carotenoids produced from yeast *Rhodotorula mucilaginosa* M

استعملت في هذه الدراسة مجموعة من الاحياء المجهرية شملت:

1. خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M: تم الحصول عليها من **Almainy & Al-Shamary (2017).**
2. بكتريا *Bacillus subtilis* و*Staphylococcusaureus* و*Escherchia coli* و*Salmonella typhi* والتي حصل عليها جميعاً من كلية الطب البيطري / جامعة بغداد.

طريقة العمل method:

أختبرت الفعالية التثبيطية للكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M والمستخلصة حسب الطريقة التي اشارت لها **Almainy (2017)** ضد العديد من الاحياء المجهرية المرضية والتي شملت بكتريا *Bacillus subtilis* و*Staphylococcusaureus* و*Escherchia coli* و*Salmonella typhi* حسب الطريقة التي أوردها **Balouiri *et al.* (2016)**، حيث حضرت الكاروتينويدات بتركيز 0.5مايكروغرام/ مل، وأجريت سلسلة من التخافيف العشرية بأستعمال الانابيب الحاوية كل منها على 9 مل من ماء البيتون المعقم للعزلات المرضية المنشطة على الوسط المغذي السائل Nutrient Broth للحصول على العدد 10^7 خلية/ مل لكل نوع من انواع البكتريا بطريقة صب

الاطباق بإستعمال الوسط المغذي الصلب المعقم Nutrient agar، سحب 1 مل من محلول الصبغة وأضيف الى التخفيف الحاوي على 10^7 خلية/ مل لكل نوع من أنواع البكتريا المرضية وحضنت الانابيب بدرجة حرارة الغرفة (25م) ولمدد زمنية مختلفة شملت (8 و12 و24) ساعة وحسبت الاعداد المتبقية بعد الحضن بطريقة صب الاطباق بإستعمال الوسط المغذي الصلب N.A.

تقدير الفعالية المضادة للإكسدة للكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M

Determination of the antioxidant activity of carotenoids produced from yeast *Rhodotorula mucilaginosa* M

قدرت الفعالية المضادة للإكسدة للكاروتينويدات قيد الدراسة حسب الطريقة التي أوردها **Arora & Chandra (2011)** بالإعتماد على كسح الجذور الحرة DPPH، إذ حضر محلول DPPH بإذابته في الأيثانول بتركيز 0.1 ملي مولار، وسحب منه 1 مل وأضيف له 2 مل ماء مقطر ومن ثم أضيف 0.5 مل من مستخلص الصبغة ومزجت جيداً وتركت بدرجة حرارة الغرفة (25م) لمدة 30 دقيقة، زوال اللون لمادة DPPH تحدد بقياس الانخفاض بالامتصاصية على طول موجي 517 نانومتر، قدر معدل الكسح للجذور الحرة على وفق المعادلة الاتية:

$$\text{معدل الكسح \%} = [1 - \frac{A2 - A1}{A0}] \times 100$$

A1 = تمثل امتصاصية خليط التفاعل.

A2 = تمثل الامتصاصية بدون DPPH (أستبدال DPPH بالماء المقطر).

A0 = تمثل امتصاصية معاملة السيطرة (DPPH بدون مستخلص).

دراسة ثباتية الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M **في ظروف مختلفة**

Study the stability of carotenoids produced from *Rhodotorula mucucilaginosa* M yeast in different conditions

أعتمدت الطرائق التي وردت في (**Latha & Jeevaratnam (2010** في دراسة ثباتية الكاروتينويدات في ظروف مختلفة.

دراسة ثباتية الكاروتينويدات في مذيبات مختلفة

Studying the stability of carotenoids in different solvents

درست ثباتية الكاروتينويدات في مذيبات مختلفة شملت الاسيتون والبترووليوم ايثر، إذ أذيب 45.4 مايكروغرام من الصبغة لكل 1 مل من المذيبين كلاً على إنفراد وحفظت بدرجة حرارة الغرفة 25 م لمدة 30 يوم، ومتابعة الثباتية من خلال القراءة المستمرة للامتصاصية على طول موجي 474 نانومتر بعد (صفر و5 و10 و15 و20 و25 و30) يوم من الحفظ وسجلت النتائج.

دراسة ثباتية الكاروتينويدات في بعض الزيوت النباتية

Studying the stability of carotenoids in some vegetable oils

درست ثباتية الكاروتينويدات في زيوت نباتية مختلفة شملت زيت الذرة وزيت السمسم وزيت زهرة الشمس، إذ أذيب 45.4 مايكروغرام من الصبغة لكل 1 مل من الزيوت المختلفة كلا على إنفراد وخزنت النماذج بدرجة حرارة الغرفة 25م لمدة 30 يوم مع قراءة مستمرة للإمتصاصية على طول موجي 474 نانوميتر بعد (صفر و5 و10 و15 و20 و25 و30) يوم من الحفظ وسجلت النتائج.

دراسة ثباتية الكاروتينويدات في درجات حرارية مختلفة

Studying the stability of carotenoids at different temperatures

درست ثباتية الكاروتينويدات بدرجات حرارية مختلفة شملت (4 و25 و40)م بعد اذابتها في البترووليوم ايثر كأفضل مذيب عضوي للثباتية وزيت السمسم كأفضل مذيب دهني للثباتية، وبدرجات حرارية مختلفة شملت (4 و25 و60)م، ولمدة 30 يوم مع قراءة الامتصاصية على طول موجي 474 نانومتر بعد (صفر و5 و10 و15 و20 و25 و30) يوم من الحفظ وسجلت النتائج.

دراسة ثباتية الكاروتينويدات في الضوء والظلام

Studying the stability of carotenoids in light and dark

درست ثباتية الكاروتينويدات في الضوء والظلام لمدة 30 يوم بدرجة حرارة 4م بعد إذابتها في البترواليوم إيثر كأفضل مذيب عضوي للثباتية وزيت السمسم كأفضل مذيب دهني للثباتية كلاً على انفراد، وقراءة الامتصاصية على طول موجي 474 نانومتر بعد (صفر و5 و10 و15 و20 و25 و30) يوم من الحفظ وسجلت النتائج.

النتائج والمناقشة Results and discussion:

تقدير الفعالية المضادة للاحياء المجهرية للكاروتينويدات المنتجة من خميرة *RhodotorualmucilaginosaM*

Determination of antimicrobial activity of carotenoids produced from yeast *Rhodotorula mucilaginosa* M

أعتمدت غالبية الابحاث على التقدير النوعي لقياس قطر المنطقة الشفافة Clear zone طريقة لتقدير الفعالية التثبيطية للكاروتينويدات؛ ونظراً لان التقدير الكمي يعطي نتائج أدق، لذا استعمل في هذه الدراسة لتقدير الفعالية التثبيطية للكاروتينويدات المنتجة من خميـــرة *Rhodotorula mucilaginosa* M، اذ يوضح (الجدول، 1) الفعالية التثبيطية للكاروتينويدات ضد العزلات المرضية ولمدد حضن مختلفة شملت (8 و12 و24) ساعة وبتركيز 0.5 مايكروغرام/ مل.

جدول (1): الفعالية التثبيطية للكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M ضد بعض انواع البكتريا المرضية.

مدة الحضن/ساعة بتركيز 0.5مايكروغرام/مل	الفعالية التثبيطيةللكاروتينويدات على العزلات المرضية /دورة لوغارتمية			
	Staph.aureus	*E.Coli*	*B. subtilis*	*Salm.typhi*
8	$10^6\times2$	$10^6\times5$	$10^6\times9$	$10^7\times2$
12	$10^5\times3$	$10^5\times6$	$10^5\times9$	$10^6\times8$
24	$10^4\times2$	$10^5\times5$	$10^5\times2$	$10^5\times9$
معاملة السيطرة	$10^7\times3$	$10^7\times3$	$10^7\times3$	$10^7\times3$

يلاحظ من الجدول أعلاه تباين تأثير الفعالية التثبيطية للكاروتينويدات تجاه أنواع مختلفة من البكتريا المرضية شملت *Staph. aureus* و*E. Coli* و*B. subtilis* و*Salm. Typhi* وأعلى تثبيط تم الحصول علية بعد 24 ساعة من الحضن إذ انخفض العدد للأنواع الاربعة من البكتريا من 2×10^7الى 2×10^4 و5×10^4 و2×10^5 و9×10^5بعد 24 ساعة من الحضن على التوالي، وإستناداً الى النتائج المستحصل عليها تكون الكاروتينويدات المنتجة من خميرة . *Rhodotorula mucilaginosa* M أكثر فعالية تثبيطية ضد بكتريا *Staph. aureus* الموجبة لصبغة گرام في حين أقل تثبيط تم الحصول عليه هو ضد بكتريا *Salmo. Typhi* السالبة لصبغة گرام وقد يعود السبب كما ذكره **Singh *et al.* (2007)** الى مكونات الجدار الخلوي ما بين البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام، وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية للفعالية المضادة للإحياء المجهرية ضد الانواع المختلفة من الاحياء المجهرية المرضية للكاروتينويدات المنتجة من الخميرة على مستوى معنوية 0.05، في حين أشار **Devine & Hancock (2002)** الى أن إنتقائية النشاط المضاد للأحياء المجهرية يعتمد على كثافة الشحنة للجدار الخلوي، وتركيب طبقة lipopolysaccharides، وتكون الدهون في الغشاء السايتوبلازمي للبكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام، كما أشار الى إن لكيمياء الصبغة تأثير في فعلها التثبيطي ضد الاحياء المجهرية، وتتفق النتائج المستحصل عليها في هـذه الدراسة مـــع ما توصل اليه **Manimala & Murugesan (2014)** في إمتلاك الكاروتينويدات المستخلصة من خميرة *Sporobolomyces* sp. فعالية تثبيطية عالية ضد بكتريا *Escherichia coli* و*Staphylococcus aures* في حين أظهرت النتائج التي توصل لها **Yolmeh *et al.* (2016)** إمتلاك مستخلص الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* نشاطا مثبطاً ضد جميع البكتريا المرضية التي أختبرها وكانت *Bacillus cereus* أقل الانواع حساسية من البكتريا الموجبة لصبغة گرام و *Salmonella enteritidis* الاكثر حساسية من بين المجموعة المختبرة من البكتريا السالبة لصبغة گرام، وأكد أن الفعاليات التثبيطية للصبغات المستخلصة من خميرة *R. glutinis* اكثر فعالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة گرام من السالبة لصبغة گرام، وخلاف ذلك ما توصل اليه **Türkkan (2007)** في أن بكتريا *Salmonella Enteritidis* B42 أكثر حساسية من بكتريا *Bacillus* لمستخلص الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula glutinis*، وأشار الى أن تأثير الكاروتينويدات على البكتريا الممرضة لا يعتمد على تركيزها بقدر الاعتماد على نوع سلالة الخميرة وعدد البكتريا الموجودة في المزرعة.

تقدير الفعالية المضادة للاكسدة للكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilagiosa M*

Determination of the antioxidant activity of carotenoids produced from yeast *Rhodotorula mucilaginosa* M

أختبرت الفعالية المضادة للأكسدة للكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M بإستخدام مادة DPPH والاعتماد على مقدار الانخفاض بالامتصاصية الذي يعبر عن كفاءة الفعالية المضادة للأكسدة **(Sulistyo *et al.*, 2015)**، تبين من خلال النتائج أن الكاروتينويدات تمتلك فعالية مضادة للأكسدة وبنسبة كسح لجذور DPPH بلغت 85.6%، تطابقت نتيجة هذه الدراسة مع ما توصل اليه **Gramza-Michałowska & Stachowiak (2010)**، إذ لاحظ إنخفاض في الامتصاصية بزيادة الفعالية المضادة للأكسدة للكاروتينويدات؛ وذلك لقدرتها على وهب الهيدروجين، ومنع تكوين الجذور الحرة، ووجد **Gramza-Michałowska & Stachowiak (2010)** إمتلاك الكاروتينويدات المنتجـــة من خميـرة *Phaffiarho dozyma* نسبـــة كسح عالية للجذور الحرة بلغت 94.58 %، وأشار **Manimala & Murugesan (2014)** الى زيادة الفعالية المضادة للاكسدة للكاروتينويدات بزيادة تركيزها، إذ وجد زيادة في كسح جذور DPPH بزيادة تركيز الكاروتينويدات واعلى نسبة كسح حصل عليها بلغ 75.04%، مما يؤكد أن المركبات الموجودة في مستخلص الخميرة لها القدرة على منح الالكترون والتفاعل مع الجذور الحرة وتحويلها الى منتجات أكثر إستقراراً لانهاء سلسلة تفاعل الجذور الحرة.

تمتلك جزيئة DPPH قابلية على كسب الالكترونات وتكوين جزيئة مستقرة، إذ يعطي محلول هذه المادة المذابة بالإيثانول ذات اللون البنفسجي أعلى إمتصاصية على طول موجي 517 نانومتر، وبالنظر لحصول التفاعل الذي يحصل بين الكاروتينويدات وDPPH تنخفض شدة اللون ويتحول الى اللون الاصفر وسرعة تحول اللون الاصفر يدل على كفاءة الصبغة في عملها كمضاد للأكسدة وبذلك تنخفض الامتصاصية على الطول الموجي 517 نانومتر **(Korumilli, 2014)**، وأشار **Smirnoff (2005)** الى إمتلاك الكاروتينويدات قابلية كسح متنوعة للجذور الحرة إذ أنها تعمل كمضادات للأكسدة من خلال تفاعلها مع singlet oxygen أو تفاعلها مع الجذور الحرة أو مع جذور الاوكسجين وغيرها من الجذور الحرة.

دراسة ثباتية الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M. **في ظروف مختلفة**

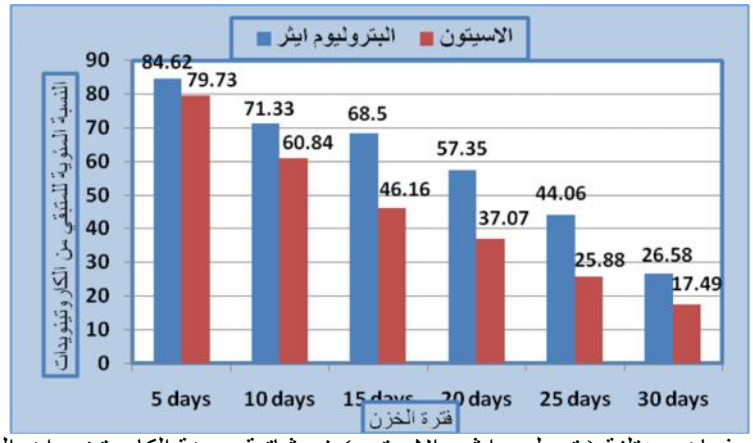
Study the stability of carotenoids produced from *Rhodotorula mucucilaginosa* M yeast in different conditions

ثباتية الكاروتينويدات بأستعمال مذيبات مختلفة

Studying the stability of carotenoids in different solvents

درست ثباتية الكاروتينويدات المنتجة من العزلة *Rhodotorula mucilaginosa* M في نوعين من المذيبات وهي اللاقطبي المتمثل بالبرتوليوم إيثر، والقطبي المتمثل بالأسيتون بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 يوم في الظلام اذ يلاحظ من (الشكل،1) أن الصبغة بصورة عامة كانت أكثر ثباتية في البترولیوم إيثر منه في الاسيتون، حيث إنخفضت النسبة المئوية للصبغة الى 84.62% و79.73% بعد 5أيام من الخزن في البترولیوم ايثر والأسيتون على التوالي، في حين بلغت 71.33% و60.84% على التوالي بعد 10 يوم من الخزن لتصل في نهاية مدة الخزن والبالغة 30 يوم 26.58% و17.49% على التوالي، كما وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية على مستوى معنوية (0.05) للثباتية الخزنية للكاروتينويدات المنتجة من الخميرة في مذيبات مختلفة.

تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه **Latha & Jeevaratnam (2010)**، إذ أوجد أن مقدار المتبقي من صبغة الكاروتينويدات الذائبة في البترولیوم إيثر بعد 90 يوم من الخزن في الظلام بدرجة حرارة 4م بلغ 35%، في حين كان مقدار المتبقي منها في الأسيتون تحت نفس الظروف تتراوح ما بين 8-10%، كما أوجد **Yadav & Prabha (2014)** أن الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY والمخزنة في البترولیوم إيثر بدرجة حرارة 4م كانت أكثر ثباتا من المخزنة بالأسيتون تحت الظروف نفسها إذ بلغت نسبة المتبقي 35% و10% على التوالي.



شكل (1): تأثيراستعمال مذيبات مختلفة (بترولیوم ایثر، الاسیتون) في ثباتية صبغة الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M عند الخزن بدرجة حرارة 25م ولمدة 30 يوم.

ثباتيةالكاروتينويدات باستعمال بعض الزيوت النباتية

Studying the stability of carotenoids in some vegetable oils

يوضح (الشكل، 2) ثباتية الكاروتينويدات عند الخزن ببعض الزيوت النباتية والمتمثلة بزيت السمسم وزيت زهرة الشمس وزيت جوز الهند، إذ يلاحظ أن أعلى ثباتية تم تسجيلها للصبغة عند إستعمال زيت السمسم يليه زيت زهرة الشمس وأخيراً زيت جوز الهند، إذ بلغت النسبة المئوية للمتبقي من الصبغة بعد 5 يوم من الخزن بدرجة حرارة الغرفة (25 م) 97.3% و91.61% و81.81%، وأنخفضت في نهاية مدة الخزن البالغة 30 يوم الى 84.68% و76.23% و41.26% على التوالي، وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية على مستوى معنوية (0.05) للثباتية الخزنية للكاروتينويدات المنتجة من الخميرة في بعض الزيوت النباتية.

تتوافق النتائج المستحصل عليها مع ما توصل اليه **Latha & Jeevaratnam (2010)** الى أن الكاروتينويدات أعطت أعلى ثباتية في زيت السمسم ثم زيت اللوز يليه زيت زهرة الشمس ثم زيت النخيل وأخيراً زيت جوز الهند، كما أشار المصدر نفسه الى إمتلاك الكاروتينويدات ثباتية جيدة عند خزنها في الزيوت النباتية مما يشجع من إستعمالها كملونات في الاغذية ذات المحتوى الدهني العالي، وأوضح **Lavecchia & Zuorro (2008)** الى أن الإختلاف في إستقرارية الكاروتينويدات في الزيوت النباتية يعود الى الاختلاف في خصائص هذه الزيوت والتي تعود الى الاختلاف في طبيعة الحوامض الدهنية المكونة لها، ومحتواها من الحوامض الدهنية متعددة عدم التشبع، ونوع وكمية المواد المضادة للأكسدة الموجودة فيها بصورة طبيعية.

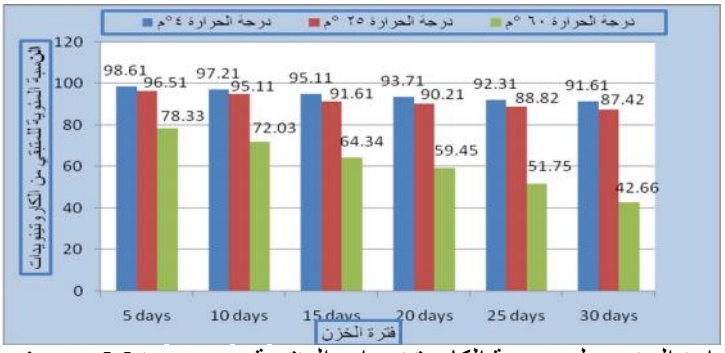
شكل (2): تأثير استخدام زيوت نباتية مختلفة (زيت السمسم، زيت زهرة الشمس، زيت جوز الهند) في ثباتية صبغة الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M عند الخزن بدرجة حرارة 25م ولمدة 30 يوم.

ثباتية الكاروتينويدات عند الخزن بدرجات حرارية مختلفة

Studying the stability of carotenoids at different temperatures

يمثل(الشكل 3 و4) تأثير خزن الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M بدرجات حرارية مختلفة شملت الاولى 4 و25 و60م عند خزن الصبغة في زيت السمسم كأفضل مذيب دهني، وبدرجات حرارية 4 و25 و40م عند خزن الصبغة في البترواليوم ايثر كأفضل مذيب عضوي، إذ يلاحظ من (الشكل، 3) أن الكاروتينويدات المخزنة بدرجتي حرارة 4 و25م في زيت السمسم كانت ذات ثباتية عالية جداً حتى نهاية مدة الخزن مقارنة مع ثباتيتها بدرجة حرارة 60م، إذ بلغت النسبة المئوية للمتبقي من الصبغة بعد 5 يوم من الخزن 98.61% و96.51% على التوالي لتصل في نهاية الخزن الى 91.61% و87.42% على التوالي، مع ملاحظة ثباتية جيدة نوعا ما للصبغة بدرجة حرارة 60م، كما وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية على مستوى معنوية (0.05) للثباتية الخزنية للكاروتينويدات المنتجة من الخميرة في درجة حرارة خزن 4م وبين درجات حرارة الخزن المستعملة في هذه الدراسة عند الخزن في زيت السمسم كأفضل مذيب دهني.

تتفق النتائج المستحصل عليها من هذه الدراسة مع ما توصل اليه **Latha & Jeevaratnam, (2010)** الى أن الصبغة المخزنة بالزيوت بدرجة حرارة 4م كانت أكثر ثباتية من الصبغة المخزنة بالزيوت نفسه بدرجة حرارة الغرفة، على الرغم من أن ثباتية الصبغة بدرجة حرارة الغرفة كانت جيدة بالمقارنة مع درجات الحرارة العالية.



شكل (3): تأثير درجة حرارة الخزن على صبغة الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M بدرجات حرارة (4 و25 و60)م المذابة في زيت السمسم مدة 30 يوم.

كما ويلاحظ من (الشكل،4) أن أعلى ثباتية تم الحصول عليها عند الخزن بدرجات حرارية شملت 4و25 و40م في البترواليوم إيثر كانت بدرجة حرارة 4م مقارنة بدرجتي حرارة 25 و40م، على الرغم من الثباتية الجيدة للصبغة بدرجة حرارة 25م، بلغت النسبة المئوية للمتبقي من الصبغة بعد 5 يوم من الخزن 97.21% عند درجة حرارة 4م في حين أنخفضت في نهاية مدة الخزن لتصل الى 55.25%، وبلغت بعد الخزن لمدة 5 يوم بدرجة حرارة 25م 86.02% لتصل في نهاية مدة الخزن الى 27.98%، وبينت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية على مستوى معنوية (0.05) للثباتية الخزنية للكاروتينويدات المنتجة من الخميرة في درجات حرارة خزن 4م وبين درجات حرارة الخزن المستخدمة في هذه الدراسة عند الخزن في البتيروليوم ايثر كأفضل مذيب عضوي.

أوضح **Yadav & Prabha (2014)** الى أنه بصورة عامة تكون ثباتية الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY أفضل بدرجة حرارة 4م ثم بدرجة حرارة الغرفة وتكون الثباتية أضعف بدرجة حرارة 60م، إذ لوحظ أن صبغة الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY بإستعمال أوساط MYEB وماء جوز الهند والرز كانت اكثر ثباتية بدرجة حرارة 4م، إذ بلغت النسبة المئوية للمتبقي من الصبغة 90% و70% و50% للأوساط الثلاثة على التوالي بعد 5أيام من الخزن، ثم إنخفضت بعد 10أيام لتصل الى 86% و61% و33%، في حين وصلت بعد اكثر من 15 يوم من الحضن الى 76% و35% و32% على التوالي، أما عند الخزن بدرجة حرارة 29م لأكثر من 5 يوم بلغت نسبة المتبقي 97% و68% و48% للأوساط الثلاثة على التوالي، لتنخفض في نهاية مدة الخزن والبالغة 15 يوم 48% و40% و21% على التوالي.

أوجد **Yip *et al.* (2014)** الى أنه لا توجد فروقات معنوية في ثباتية المستخلص الغني بصبغة Fucoxanthin بدرجة حرارة الثلاجة 4م ودرجة حرارة الغرفة 25م على مستوى معنوية (0.05)، وهذا يشير الى ثباتية الصبغة في هاتين الدرجتين الحراريتين، في حين كان هناك إنخفاض معنوي واضح جداً عند الخزن بدرجة حرارة 50م، مما يدل على إن

صبغة Fucoxanthin غير ثابتة بدرجات الحرارة العالية وبالتالي فهي غير ملائمة للخزن، وقد أشار **Boon *et al.* (2010)** الى أن درجة الحرارة العالية قد تؤدي الى تحطم الاصرة المزدوجة للكاروتينويدات ومن ثم الى تحطمها.

شكل (4)تأثير درجة حرارة الخزن في صبغة الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M بدرجات المذابة في البترواليوم ايثر مدة 30 يوم.

ثباتية الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* M في الضوء والظلام

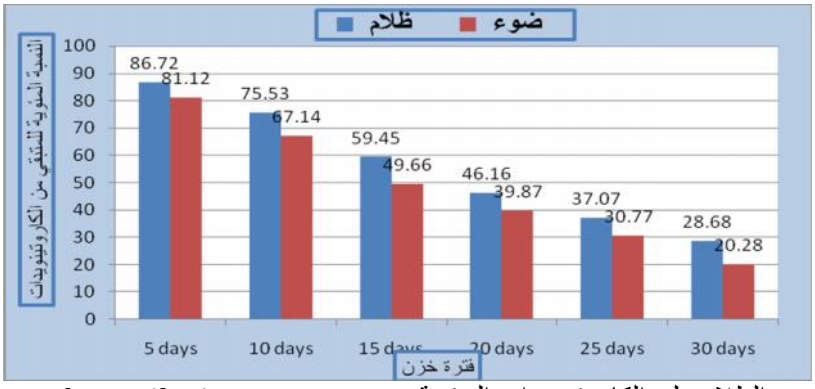
Studying the stability of carotenoids in light and dark

أشار **Hii, *et al.* (2010)** الى أن الضوء ذو تأثير كبير جداً في ثباتيـــة الكاروتينويـــدات، ويوضح (الشكل، 5) و(الشكل، 6) تأثير الضوء والظلام على الكاروتينويدات المذابة في زيت السمسم والبترواليوم إيثر بدرجة حرارة الثلاجة 4م لمدة 30 يوم من الخزن، إذ يلاحظ من (الشكل، 5) الثباتية العالية للكاروتينويدات المخزنة في الظلام والمذابة بزيت السمسم الى نهاية مدة الخزن، إذ بلغت النسبة المئوية للمتبقي 97.21% بعد 5 يوم من الخزن وإنخفضت في نهاية الخزن لتصل الى 84.62%.

أما فيما يتعلق بالكاروتينويدات المخزنة في الضوء والمذابة في زيت السمسم فقد كانت ذات ثباتية جيدة إذ بلغت النسبة المئوية للمتبقي بعد 5 يوم من الخزن 94.41% مع ملاحظة إنخفاض أسرع في الثباتية إذ وصلت النسبة المئوية للمتبقي 66.44% في نهاية مدة الخزن، أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية على مستوى معنوية (0.05) للثباتية الخزنية للكاروتينويدات المنتجة من الخميرة عند خزنها بدرجة حرارة 4م في زيت السمسم في الضوء والظلام.

شكل (5): تأثير الضوء والظلام على الكاروتينويدات المنتجة من خميرة *Rhodotorual mucilaginosa* M المذابة في زيت السمسم والمخزنة بدرجة حرارة 4 م مدة 30 يوم.

اما فيما يتعلق بالكاروتينويدات المذابة في البترواليوم ايثر فأعطت النتائج نفسها إذ يلاحظ من (الشكل، 6) أن الصبغة أكثر ثباتية في الظلام منها في الضوء، إذ بلغت النسبة المئوية للمتبقي من الصبغة حوالي 86.72% و81.12% في الظلام والضوء على التوالي بعد 5 يوم من الخزن بدرجة حرارة الثلاجة لتنخفض هذه النسبة الى 28.68% و20.28% على التوالي في نهاية مدة الحضن، كما وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية على مستوى معنوية (0.05) للثباتية الخزنية للكاروتينويدات المنتجة من الخميرة عند خزنها في زيت السمسم في الضوء والظلام.



شكل (6): تأثير الضوء والظلام على الكاروتينويدات المنتجة من خميرة M *Rhodotorula mucilaginosa* المذابة في البتروليوم ايثر والمخزنة بدرجة حرارة 4 م مدة 30 يوم.

أشار **Kadian *et al.* (2013)** الى تأثر صبغة الكاروتينويدات الموجودة في مستخلص عصير الطماطة ومستخلص عصير الجزر ومستخلص بعض أنواع الأزهار المخملية بالإضاءة التي مصدرها الاشعة فوق البنفسجية UV وضوء الشمس والضوء الصناعي ولكن بنسب مختلفة، إذ أوجد الباحث أن التعرض لإشعة UV يكون أكثر تأثيراً على صبغة الكاروتينويدات الموجودة في مستخلص عصير الطماطة وعصير الجزر ومستخلص الاوراق المخملية، تلاها ضوء أشعة الشمس وأخيراً الإضاءة الاصطناعية، مما يشير الى إن الثباتية والفعالية الحيوية للكاروتينويدات تتفاوت بشكل ملحوظ في النماذج التصنيعية المختلفة.

أوجد **Yip*et al.* (2014)** أن المستخلص الغني بصبغة Fucoxanthin المستخلصة من بعض الاعشاب البحرية، وهي إحدى أنواع الكاروتينويدات، والمعرض للضوء حدث فيها إختزال للإمتصاصية مقارنة مع النموذج المحفوظ بالظلام، وهذا دليل على أن صبغة Fucoxanthin حساسة للإضاءة ويحدث إنخفاضا في ثباتيتها عند تعرضها للضوء، وقد أشار **Mercadante (2008b)** و**Vásquez-Caicedo*etal* (2007)** الى أن الكاروتينويدات تعاني من تحطم وتكوين أشباه جزيئية عند تعرضها للضوء.

يمكن ان يكون الضوء ذا تأثير يؤدي الى تكوين singlet oxygen وهذا الاخير يتفاعل مع الكاروتينويدات مما ينتج عنه الحالة غير المستقرة لها، وقد يتبع هذه الحالة مسارات تحطم كيميائية مما يؤدي مباشرة الى مهاجمة الآصرة المزدوجة للكاروتينويدات بواسطة singlet oxygen مكونة جذور حرة ثنائية bi radicals والتي تؤدي في نهاية المطاف الى منتجات سلسلة الكاربونيل المنشقة Carbonyl Chin Cleavage **(Garavelli*et al.*, 1998)**، كما قد يؤدي الضوء الى تعزيز تكوين تفاعلات الاشباه الجزيئية Trans – Cis والتي تؤدي الى تحطم الكاروتينويدات.

الاستنتاجات Conclusions:

امتلاك خميرة *Rhodotorula mucilaginosa* المعزولة محليا والمطفرة كيميائيا فعالية تثبيطية ضد العديد من الاحياء المجهرية المرضية وفعالية مضادة للاكسدة، اضافة لامتلاكها ثباتية عالية في مذيب البتروليوم ايثر وزيت السمسم بدرجة حرارة الثلاجة 4م في الظلام لمدة 30يوم.

المصادر References:

I. Almainy, Z. A. (2017). *Production of Carotenoids from Local Yeast Isolate and Studing of its Properties*, MasterThesis, College of Agriculture, University of Baghdad.
II. Almainy, Z. A. & Al-Shamary, E. I. (2017). Carotenoids production from local isolate *Rhodotorula mucilaginosa*. *Euphrates Journal of Agriculture Science*, 9(4), 824-839.
III. Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: Areview. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71- 79.
IV. Chanchay, N., Sirisansaneeyakul, S., Chaiyasut, C. & Poosaran, N. (2012). Optimal conditions for carotenoid production and antioxidation characteristics by

Rhodotorula rubra. *Engineering and Technology International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 6(8), 621-625.

V. Berman, J., Zorrilla-López, U., Farré, G., Zhu, C., Sandmann, G., Twyman, R. M., Capell, T. & Christou, P. (2015). Nutritionally important carotenoids as consumer products. *Phytochemistry Reviews*, 14, 727-743.

VI. Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J. & Decker, E. A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 515-532.

VII. de la Fuente, J. L., Rodríguez-Sáiz, M., Schleissner, C., Díez, B., Peiro, E. & Barredo, J. L. (2010). High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllo mycesdendrorhous*. *Journal of Biotechnology*, 148, 144-146.

VIII. Della Penna, D. & Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol*., 57, 711-738.

IX. Devine, D. A. & Hancock, R. E. W. (2002). Cationic peptides: distribution and mechanisms of resistance. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 703-14.

X. Farré, G., Bai, C., Twyman, R. M., Capell, T., Christou, P. & Zhu, C. (2011). Nutritious crops producing multiple carotenoids-a metabolic balancing act. *Trends in Plant Science*, 16, 532-540.

XI. Gramza-Michałowska, A. & Stachowiak, B. (2010). The antioxidant potential of carotenoid extract from *Phaffiar hodozyma*. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9, 171-188.

XII. Henriquez, V., Escobar C., Galarza J. & Gimpel J. (2016). *Carotenoids In Microalgae. In Carotenoids In Nature*, Ed. S. Claudia, pp. 219-237, Switzerland: Springer International Publishing.

XIII. Hii, S. L., Choong, P. Y., Woo, K. K. & Wong, C. L. (2010). Stability studies of fucoxanthin from *Sargassum binderi*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4, 4580-4584.

XIV. Kadian, S. S., Sharma, A. & Sood, D. R. (2013). Effect of light and heat on stability of crude carotenoid extract from natural sources. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4, 2415-2418.

XV. Korumilli, T. & Susmita, M. (2014). Carotenoid production by *Rhodotorula* sp. on fruit waste extract as a sole carbon source and optimization of key parameters. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 33, 89-99.

XVI. Latha, B. V. & Jeevaratnam, K. (2010). Purification and characterization of the pigments from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY isolated from natural source. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 5, 166-174.

XVII. Lavecchia, R. & Zuorro, A. (2008). Shelf stability of lutein from marigold (*Tagete serecta* L.) flowers in vegetable oils. *Chemical Engineering Transactions*.14, 199-204.

XVIII. Manimala, M. R. A. & Murugesan, R. (2014). In vitro antioxidant and antimicrobial activity of carotenoid pigment extracted from *Sporobolomyces* sp. isolated from natural source. *Journal of Applied and Natural Science*. 6(2), 649-653.

XIX. Querol, A. & Fleet, G. (2006). *Yeasts In Food And Beverage*. Springer-9 Verlag Berlin Heideberg, Printed in Germany: 14-303.

XX. Smirnoff, N. (2005). *Ascorbate, Tocopherol and Carotenoids: Metabolism, Pathway Engineering and Functions*. In Book Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants: 53-86.

XXI. Singh, D. P., Kumar, R., Malik, V. & Tyagi, P. (2007). Synthesis and characterization of complexes of cyclohexadeca-6, 8, 14, 16-tetraene and their biological screening. *Transition Metal Chemistry*, 32, 1051-1055.

XXII. Soliev, A. B., Hosokawa, K. & Enomoto, K. (2011). Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 20(11), 1-17.

XXIII. Türkkan, E. (2007). *Antibacterial Effects Against Some Pathogen Food-Borne Bacteria of Carotenoids Extracted fromRhodotorulaglutinis*. MSc Thesis, Department of Food Engineering Institute of Natural and Applied Science University of Çukurova, Adana,Turkey.

XXIV. Venil, C. K., Zakaria, Z. A. & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48, 1065-1079.

XXV. Yadav, S., Manjunatha, K., Ramachandra, B., Suchitra, N. & Prabha, R. (2014). Characterization of pigment producing Rhodotorula from dairy environmental samples. *Asian Journal of Dairying & Foods Research*, 33, 1-4.

XXVI. Yip, W. H., Joe, L. S., Mustapha, W. A. W., Maskat, M. Y. & Said, M. (2014). Characterisation and stability of pigments extracted from *Sarga ssumbinderi* obtained from Semporna, Sabah. *Sains Malaysiana*, 43, 1345-1354.

XXVII. Yolmeh, M., Hamedi, H. & Khomeiri, M. (2016). Antimicrobial activity of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis* against some bacteria and fungi. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 18, 1-5.