استخلاص وتقدير صبغة البيتا- كاروتين من بعض انواع جنس الـ *Rhodotorula* المعزولة ودراسة امكانية زيادة انتاجها بالتطفير

بادية عبدالرزاق جمال ملاعبيدة
قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة الموصل
رافعة قادر جرجيس الزبيدي
رعد حساني سلطان الحاج علاوي
قسم علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة الموصل

استلم في :3حزيران 2015 قبل في :15تشرين الثاني 2015

الخلاصة

تم استخلاص صبغة البيتا- كاروتين من6 عزلات جمعت من مصادر نباتية مختلفة تضمنت ثمار الفاكهة وأوراقها وتربتها تعود الى بعض انواع جنس *Rhodotorula* sp.، إذ بلغت اقصى انتاجية من العزلة BA61 *R. mucilaginosa* وبمقدار 10.25 غم/لتر، فيما كانت العزلة BA78 *R. minuta* اقل انتاجا وبمقدار 5.39 غم/لتر. ودراسة التأثيرات التطفيرية لكل من المطفر الكيميائي (MNNG) N-methyl-Ń-nitro-N-nitrosoguanidine والمطفر الفيزيائي (UVC) Short Wave Ultraviolet على حيوية العزلات وبينت النتائج ان المطفر الكيميائي (MNNG) بتركيز 0.2 ملغم/مل تأثير واضح في حيوية العزلات اذ وصلت نسبة شدة القتل اقصاها 65.91% في العزلة BA78 *R. minuta*. في حين اظهر التطفير بالـ UVC زيادة نسبة شدة القتل لجميع العزلات مع زيادة التعرض للـ UVC. وكانت العزلة BA78 *R. minuta* اكثر تأثراً، إذ بلغت نسبة شدة القتل 100% عند مدة تشعيع 20 دقيقة. تم دراسة تأثير الدمج بين المطفر الكيميائي بتركيز 0.2 ملغم/مل والفيزيائي. اظهرت النتائج زيادة شدة قتل العزلات المدروسة قيد الدراسة حيث بلغت 100% عند مدة تشعيع 15 و 20 دقيقة للعزلة BA78 *R. minuta*. التأثير الاكبر في انتاجية البيتا- كاروتين عند الدمج بين المطفر الكيميائي والفيزيائي كان على العزلة BA61 *R. mucilaginosa*، إذ بلغت الانتاجية اقصاها وبمقدار11.45 غم/لتر.

الكلمات المفتاحية : *Rhodotorula* ، Mutagenesis ، β-Carotene ، Extraction

المقدمة

ترجع ألوان الكاروتينويدات الصفراء، الحمراء والوردية وسهولة قابليتها للأكسدة إلى وجود العديد من الأواصر المزدوجة التي تدخل في تركيبها [1]. يعد البيتا-كاروتين من أهم وأكثر أنواع الكاروتينات الطبيعية التي تصنعها النباتات والطحالب والأحياء الدقيقة مثل الخمائر إذ تصل نسبته إلى حوالي 70% من الكاروتين الكلي [2]. وفي السنوات الأخيرة زاد الاهتمام به إلى حد كبير ويرجع ذلك لكثرة الأدلة التي تشير إلى فوائده وأهميته لصحة الإنسان فهو مصدر لفيتامين A في الجسم، إذ يتم تحويله في امعاء الانسان إلى فيتامين A الضروري للمحافظة على الرؤية كما أنه مادة مضادة للأكسدة تحمي الجسم من الجذور الحرة، وتعمل على تعزيز الجهاز المناعي في الجسم وتسهم في تحفيز نمو الخلايا وتمايزها [3]. لوحظ مؤخراً أن انتاج الكاروتين من النباتات أصبح محدوداً وذلك لارتفاع تكاليف الانتاج مقارنة بنسبة العائدات مما أدى إلى توجه اغلب الأبحاث والدراسات للحصول على الكاروتين من الأحياء المجهرية التي أصبحت مصادرً بديلة عن النباتات بالنظر لانخفاض كلفة الانتاج وتجنب تلوث البيئة بالمخلفات الناتجة عن النفايات الزراعية والصناعية [4]. فضلاً عن أن الكاروتين الناتج من هذه الكائنات الدقيقة يجنبنا المشاكل الناتجة عن التغييرات الموسمية والجغرافية التي تجابه إنتاجه من النباتات [5]. وتعد الخمائر أكثر ملاءمة في انتاج الكاروتين من الأحياء المجهرية الأخرى بالنظر لطبيعتها كونها كائنات وحيدة الخلية فضلاً عن معدل نموها السريع [6]. وتتميز خمائر جنس *Rhodotorula* التابعة لقسم الفطريات البازيدية Basidiomycotina والتي ينظوي تحته اكثر من 35 نوعاً بقدرتها على تخليق الكاروتينويدات [7] ورغم ان معظم الانواع التابعة لهذا الجنس غير مرضية الا ان بعض انواعه ممكن ان تسبب اصابات للإنسان مثل *R. mucilaginosa* [8] و *R. glutinis* و *R. minuta* كونها عاملاً مهماً في الاصابة وشدة الالتهاب، إذ تتواجد بصورة طبيعية على الجلد وفي الرئتين، الادرار والغائط. كما ويصيب افراد هذا الجنس بشكل رئيس المرضى الذين يعانون من قلة المناعة [9].

لتحليل مزيج مركبات الكاروتين استعملت العديد من الطرائق، ومنها تقنية الكروماتوكرافي التي تتميز بأنها على درجة عالية من الحساسية والخصوصية في تثبيت النتائج وتشمل كروماتوكرافيا الورقي [10] والطبقة الرقيقة [11] وكروماتوكرافيا الغاز– السائل [12] وكروماتوكرافيا السائل العالية الأداء HPLC [13] وكروماتوكرافيا الغاز- القياسي الطيفي سالكتلي [14]. وقد ساعد التطور في مجال التكنولوجيا على تطوير التقنيات الانتاجية، ويعد تعريض الكائنات الحية استعمالاً للمطفرات واحدة من أكثر التقنيات لزيادة الانتاجية، سواء أكانت هذه المطفرات فيزيائية أم كيميائية [15]. يهدف البحث الى استخلاص وتنقية صبغة البيتا-كاروتين من الخمائر الملونة واجراء التحسينات الوراثية على العزلات المنتجة للصبغة بالتطفير باستعمال المطفرات.

المواد وطرائق العمل

العزلات قيد الدراسة:

تـم اسـتعمال 6 عـزلات وهـي: *Rhodotorula mucilaginosa* BA58، *R. mucilaginosa* BA61، BA75 *R. graminis* BA1، *R. minuta* BA78، *R. glutinis* BA83، مشخصة مسبقا في دراسة سابقة اجريت في مختبرات قسم علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة الموصل [16].

تاثير المطفرات في العزلات الخميرية Effect of Mutagenes on Yeast Isolation

التاثير التطفيري للأشعة الفوق البنفسجية القصيرة الموجة

اجريت عملية التشعيع بحسب طريقة Gao وآخرون [17] أخذ 5 مل من معلق خلايا الخمائر وضع في طبق بتري نظيف ومعقم ووضع الطبق على سطح محرك مغناطيسي عمل على تحريك العالق حركة دائرية اثناء التشعيع لضمان تعريض جميع الخلايا للأشعة. تم تعرض العالق بعد رفع الغطاء للأشعة فوق البنفسجية بصورة عمودية من مصباح الأشعة فوق البنفسجية الذي يعطي اشعة ذات طول موجي 254 نانوميتراً ويكون البعد بين المصباح وسطح الطبق 20 سم. جرت عملية التشعيع لخمس مدد زمنية (2، 5،10، 15 و20) دقيقة، فضلاً عن المعاملة صفر (بدون تشعيع) كمقارنة. بعد انتهاء المدة الزمنية للتشعيع سحب الطبق وغلف بورق رقائق الالمنيوم وترك في الظلام لمدة ساعة لتحاشي حدوث عملية الاصلاح الضوئي Photoreactivation. مزج العالق جيدا وتم تلقيح خمسة اطباق للوسط الغذائي SGA وبواقع 0.2 مل من العالق الخميري لكل طبق ولكل مدة زمنية من مدد التشعيع المدروسة. حضنت الاطباق بدرجة 28°م لمدة 7 أيام ثم حسب عدد المستعمرات النامية في الاطباق الخمسة ليكون مجموع عدد المستعمرات النامية في 1 مل من العالق الخميري المشعع وللمدة الزمنية المدروسة. من العالق الخميري غير المشعع اي المعاملة صفر تم تحضير سلسلة من التخافيف ولغاية 10^{-4}. ومن هذا التخفيف لقحت عشرة اطباق SGA وبواقع 0.1 مل لكل طبق. وحضنت بدرجة 28°م ولمدة 7 ايام تم حساب عدد المستعمرات النامية والنسبة المئوية للأفراد الناجية والنسبة المئوية لشدة القتل بحسب المعادلات الآتية:

النسبة المئوية للأفراد الناجية = (العدد الناتج من معاملة التشعيع/ العدد الناتج من الأطباق غير المشععة) × 100

النسبة المئوية لشدة القتل = 100 – النسبة المئوية للافراد

التأثير التطفيري للمطفر الكيميائي N-methyl-Ń-nitro-Ń-nitrosoguanidine

استعملت طريقة Frengova وآخرون [5] إذ تم اذابة 0.02 غم من المادة المطفرة MNNG في 100 مل ماء مقطر معقم وبذلك يكون تركيز المطفر 0.2 ملغم/مل، نقل منها 5 مل إلى أنبوبة اختبار تحتوي على 1 مل من عالق الخلايا الخميرية. حضنت الأنابيب في حمام مائي هزاز في درجة حرارة 37°م ولمدة 30 دقيقة. رسبت الخلايا عن طريق النبذ المركزي باستعمال جهاز النبذ المركزي Centrifuge لمدة 15 دقيقة عند سرعة 9,000 دورة/دقيقة. غسل الراسب Pellet بإضافة 10 مل ماء مقطر معقم واجري نبذ مركزي لمدة 15 دقيقة بسرعة 9,000 دورة/دقيقة. كررت عملية الغسل ثلاث مرات ثم علق الراسب بإضافة 10 مل ماء مقطر معقم، رجت الأنابيب جيدا ثم نشر 0.2 مل من العالق بوساطة قضيب زجاجي معقم على سطح أطباق بتري تحتوي على الوسط الغذائي الصلب SGA بمعدل 5 أطباق/معاملة مع وجود أطباق للمقارنة (غير معاملة بالمطفر). حضنت الأطباق عند درجة حرارة 28°م مدة 7 أيام، تم حساب عدد المستعمرات الناجية في الاطباق الخمسة ليكون المجموع عدد المستعمرات الناجية في 1 مل من العالق الخميري غير المطفر والنسبة المئوية لشدة القتل.

تأثير التطفير باستعمال المطفر الكيميائي MNNG والمطفر الفيزيائي UVC

اتبعت طريقة Li وآخرون [18] في الدمج بين التطفير الكيميائي والفيزيائي، أضيف 5 مل من محلول المطفر الكيميائي MNNG بتركيز 0.2 ملغم/مل إلى أنبوبة اختبار تحتوي على 1 مل من عالق الخلايا الخميرية لكل نوع من أنواع الخمائر المدروسة. حضنت الأنابيب في حمام مائي هزاز عند درجة حرارة 37°م لمدة 30 دقيقة. رسبت الخلايا بالنبذ المركزي لمدة 15 دقيقة عند سرعة 9,000 دورة/دقيقة، كررت عملية الغسل ثلاث مرات وعلق الراسب بإضافة 10 مل ماء مقطر معقم، رجت الأنابيب جيدا. جرت عملية التشعيع داخل حجرة مظلمة، ثم أخذ 5 مل من المعلق وضع في طبق بتري نظيف ومعقم وتم تعريضه للاشعة فوق البنفسجية للفترات زمنية (2، 5، 10، 15 و20) دقيقة. ثم حسب عدد المستعمرات النامية والنسبة المئوية للأفراد الناجية والنسبة المئوية لشدة القتل. استخلصت صبغة البيتا-كاروتين وقدرت كميتها لغرض المقارنة بين انتاجية العزلة قبل وبعد التطفير.

استخلاص صبغة البيتا- كاروتين Extraction of β-carotene Pigment

تم استخلاص صبغة البيتا- كاروتين من عزلات الخمائر غيرالمطفرة والمطفرة بالدمج بين كل من المطفر الكيميائي والطفر الفيزيائي بحسب طريقة Harbone [19]. وزن 3 غم من الخميرة المنماة لمدة 48 ساعة على الوسط الغذائي الصلب سابرود كلوكوز (SGA) بميزان الكتروني حساس وضعت في دورق زجاجي صغير يحتوي على 20 مل من الأسيتون و 150 ملغم Glass beads غطيت بالكامل برقائق الألمنيوم لمنع تعرضها للضوء والأكسدة الضوئية. وضع الدورق على المحرك المغناطيسي لمدة 48 ساعة لتحطيم جدران خلايا الخميرة. تم استبعاد جدران الخلايا المحطمة بالترشيح من خلال أوراق الترشيح. وضع الراشح في قمع فصل زجاجي سعة 250 مل وأضيف اليه خليط من مذيب الأيثر والميثانول بنسبة 2:15 على التوالي مع كمية قليلة من ملح كلوريد الصوديوم، رج القمع جيدا وبقوة وترك لمدة دقيقتين لحين تكون طبقتين (قطبية وغير قطبية). تمثل الطبقة العليا المذيب الأيثر الحاوي على صبغة الكاروتين وتمثل الطبقة السفلى المكونات الأخرى. أهملت الطبقة السفلى وأخذ المذيب المستعمل الحاوي على صبغة البيتا-الكاروتين، تم تبخير المذيب بعد ذلك باستعمال جهاز المبخر الدوار عند درجة 40-60°م وحفظ في قنانٍ معتمة وفي ظروف الظلام عند -18°م لتجنب تأكسد الصبغة وتلفها.

تقدير صبغة البيتا – كاروتين Estimation of β-carotene Pigment

تم تقدير صبغة البيتا-كاروتين المستخلصة من عزلات الخمائر قيد الدراسة في مركز الأبحاث التابع لشركة الكندي العامة في محافظة نينوى/العراق. بعد تنقيتها باستعمال مرشحات غشائية بقطر 0.22 مايكرومتر. حسب طريقة Čarnecká [13]، وتم تقديرها بجهاز الكروماتوكرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC نوع Shimadzu Le-20 SPD-20 A بأستعمال عمود فصل C18 من شركة Dos-3-Scienes بأبعاد 4.6× 250 ملم. الطور المتحرك يتكون من Methanol وAcetonitril بنسبة (95 :5) حجم العينة 20 مايكروليتراً بمعدل جريان Flawrate (1.0) مل/دقيقة، حضرت صبغة البيتا- كاروتين القياسية β-carotene Standard (Sigma-Aldirch, U.S.A.) بتركيز1 .0 غم/لتر. اجري التقدير عند درجة حرارة 45°م وطول موجي 285 نانوميتر، نتج عن عملية الفصل رسم منحني Peak لكل عينة مقرون بزمن الاحتجاز الخاص بها، وحساب تركيز صبغة البيتا-كاروتين عن طريق مقارنة نتائج التقدير الكمي لصبغة البيتا- كاروتين في نماذج عينات الخمائر المدروسة لكل من زمن الاحتباس Retention Time ومساحة الحزم المجهولة للنماذج مع زمن الاحتباس ومساحة المنحني لصبغة البيتا-كاروتين القياسية المعروفة وفق المعادلة التالية [13] :

(تركيز المركب في العينة = مساحة حزمة المركب / مساحة حزمة النموذج القياسي) × تركيز النموذج القياسي

النتائج

دراسة القابلية التطفيرية للاشعة فوق البنفسجية القصيرة الموجة على حيوية عزلات الخمائر

عند تعريض عالق الخمائر الى اشعة UV لوحظ زيادة نسب شدة القتل في الخميرة *R. mucilaginosa* BA58 (3.84، 16.15، 40.77، 66.15 و 76.92%) على التوالي مع زيادة مدة التعرض. اما في الخميرة *R. mucilaginosa* AB75 فقد كانت نسب شدة القتل (8.33، 24.16، 35.83، 56.66 و 77.5%) على التوالي.

وبلغت (8.73، 20.63، 32.54، 52.38 و 80.15%) على التوالي في الخميرة BA61 *R. mucilaginosa*. اما الخميرة BA83 *R. glutinis* بلغت نسب شدة القتل (13.02، 23.95، 41.14، 52.68 و 63.02%) على التوالي. بينما كانت في الخميرة BA78 *R. minuta* (40، 95.71، 78.57، 85.71 و 100%) على التوالي في حين لم يكن هناك مستعمرات حية عند مدة تشعيع 20 دقيقة. وبالنسبة لـ BA1 *R. graminis* وصلت نسب شدة القتل (6.89، 20.69، 33.10، 62.06 و 75.86%) على التوالي (الجدول 1). من النتائج الواردة اعلاه يتضح ان اكثر انواع الخمائر تأثراً بالاشعة فوق البنفسجية كانت الخميرة BA78 *R. minuta* إذ ارتفعت نسب شدة القتل بشكل كبير مع زيادة مدة التعرض للأشعة وبلغت 100% عند مدة تعريض 20 دقيقة.

دراسة القابلية التطفيرية للمطفر الكيميائي على حيوية عزلات الخمائر

اظهرت نتائج تطفير بالمطفر الكيميائي MNNG تأثيرا واضحا في حيوية جميع انواع الخمائر المعرضة له، إذ بلغت نسب شدة القتل (57.26، 48.38، 46.32، 61.72، 65.91 و36.13%) على التوالي (الجدول 2).

دراسة القابلية التطفيرية للمطفر الكيميائي والفيزيائي على حيوية عزلات الخمائر

ادى التداخل باستعمال المطفرين المذكورين (الكيميائي والفيزيائي) الى ازدياد نسب القتل بين العزلات المطفرة، إذ سجلت اعلى نسب شدة قتل (79.26، 86.58، 93.90، 100و 100%) على التوالي ضمن معلق خميرة BA78 *R. minuta*، في حين كانت اقل النسب (23.66، 33.58، 44.77، 70.15و 85.82%)على التوالي للمطفرين سوية اتجاه معلق خميرة BA1 *R. graminis* . وتباينت نسب القتل بين عزلات الخمائر الاخرى قيد الدراسة وفقا لنوع الخميرة المطفرة (الجدول 3). يتبين مما ذكر اعلاه بان الخميرة BA78 *R. minuta* كانت شديدة الحساسية للمطفرين بدلالة عدم ظهور نمو مع زيادة مدة التعرض للأشعة الى 15 و 20 دقيقة. لذا اعتمدت المستعمرات الناجية من التطفير بالمطفر الكيميائي والأشعة فوق البنفسجية لمدة 10 دقائق في تجارب استخلاص وتنقية وتقدير صبغة البيتا-كاروتين اللاحقة لغرض مقارنة الانتاجية مع العزلات غير المطفرة بوصفها افضل مدة تطفير ظهر فيها نمو محدود لجميع الخمائر قياسا بظروف النمو الطبيعية.

التقدير الكمي لصبغة البيتا- كاروتين المستخلصة من الخمائر بتقنية الكروماتوكرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC

بعد استخلاص صبغة البيتا- كاروتين من عزلات الخمائر الملونة المطفرة بطريقة الدمج بين المطفر الكيميائي والمطفر الفيزيائي لمدة 10 دقائق، تم تقديرها كميا ونوعيا باستعمال تقنية HPLC. نتج عن عملية الفصل رسم المنحني الخاص بالمركب القياسي الذي ظهر عند زمن الاحتباس 3.045 دقيقة (الشكل 1). تبين ان زمن الاحتباس الذي ظهر على Chromatogram الخاص بكل عينة (الاشكال 2، 3، 4، 5، 6، 7) (الجدول 4) مطابق لزمن الاحتباس 3.045 دقيقة الخاص بالمحلول القياسي مما يدل على تواجد الصبغة في هذه المستخلصات. تجدر الاشارة الى ان الاختلاف في قيمة زمن الاحتباس بين صبغة البيتا- كاروتين القياسية وصبغات البيتا- كاروتين المناظرة لها ضمن مستخلصات الخمائر قد لوحظت في دراسات اخرى.

المناقشة

ان الاشعة فوق البنفسجية (190–280) نانومتراً ذات تأثير تطفيري ومسرطن عالٍ جداً، واكثرهم ضرراً هي 254 نانومتراً [20]. يؤدي دمج المطفرين الكيميائي والفيزيائي مع بعضهما الى زيادة شدة التأثير. فقد اشار ساجدي وعلي [21] لتركيز المادة المطفرة وطول مدة التعريض، اذ ان اطالة التعريض لمدة طويلة أو استعمال تركيز عال من المادة المطفرة يؤدي الى قتل الخلايا المعرضة. جاءت نتيجة استخلاص البيتا- كاروتين متوافقة مع دراسة الباحث Mohsen وآخرون [22]، إذ اشاروا الى افضلية استعمال كل من مذيب الايثر والميثانول في استخلاص الكاروتينويدات ومنها البيتا- كاروتين. اوضحت دراسات اخرى الى ان الفصل الكفوء لأغلب الصبغات الشائعة بضمنها الكاروتينويدات يكون عند استعمال انظمة الإذابة Solvent Systems (الايثر البترولي، الاسيتون والكحولات الثلاثية) من المركبات المفضلة لاستعمالها كمكون قطبي في هذه الانظمة [23] لذا اعتمد المبدأ الذي ذكره الباحث Harborne [19].

تعد الـ HPLC من التقنيات الاساسية المستعملة في الفصل الكمي والنوعي [24]. وجد ان زمن الاحتباس لصبغة البيتا- كاروتين المستخلصة من الخمائر يتراوح ما بين 3-4 دقيقة [25] وهذا يتفق مع ما تم الحصول عليه من نتائج في الدراسة الحالية، اذ كان زمن الاحتباس ضمن المدة المذكورة للعزلات البرية والطافرة. فقد تم الاشارة الى ان صبغة البيتا- كاروتين التي تم فصلها من الخميرة *R. glutinis* المطفرة باستعمال الاشعة الفوق البنفسجية وغير المطفرة ظهرت عند زمن احتباس 3.64 و 3.49 دقيقة، على التوالي [26-27]. بينت نتائج التقدير الكمي للصبغة زيادة كميتها في الخمائر المطفرة مقارنة بالخمائر غير المطفرة، وكانت الخميرة BA61 *R. mucilaginosa* اكثر الانواع انتاجا اذ بلغ تركيز الصبغة 10.25غم/لتر في العزلة غير المطفرة وعند تعريضها للمطفر ازدادت قابليتها على الانتاج ووصلت الى (11.45)غم/لتر. اما الخميرة BA78 *R. minuta* فكانت اقل الخمائر انتاجا للصبغة 5.39غم/لتر في العزلة غير المطفرة وارتفع انتاجها الى 6.56غم/لتر بعد تعريضها للمطفرات. اما عزلات الخمائر BA58 *R. mucilaginosa*، BA75 *R. mucilaginosa*، BA83 *R. glutinis* و BA1 *R. graminis* فقد كان تركيز الصبغة (8.91، 8.47،

7.65 و 7.36) غم/لتر على التوالي للعزلات غير المطفرة. ازداد التركيز الى (9.33، 9.20، 8.45 و8.28) غم/لتر على التوالي في العزلات المعرضة للتطفير.

جاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لما حصل عليه Nasrabadi و Razavi [28]، إذ لاحظ زيادة قابلية الخميرة *R. acheniorum* على انتاج صبغة البيتا- كاروتين بعد تعريضها لسلسلة متعاقبة من مطفرات UV، EMS، MNNG. وجد Li وآخرون [18] ان تعريض الخميرة *Rhodotorula* sp. للمطفرات UV، EMS، MNNG بصورة متعاقبة ادى الى زيادة انتاجها للصبغة ذاتها، إذ بلغ انتاجها603.93 مايكروغرام/غم بعد ان كان انتاجها قبل التطفير 213.18 مايكروغرام/غم. لاحظ Hwan وآخرون [29] زيادة قدرة الخميرة *Phaffia rhodozyma* على انتاج الكاروتينويدات بعد تطفيرها بكل من المطفرين UV و MNNG معا. اشار الباحث Winston [30] إلى ان تعريض الكائنات المجهرية للمطفرات يؤدي الى حدوث خلل وتغييرات في العمليات الايضية التي تحدث داخل الكائن الحي. في دراسة اخرى من قبل Gao وآخرون [17] تبين ان تطفير الخميرة *R. rubra* بالمطفر الكيميائي MNNG ادى الى التأثير في العمليات الحيوية المتعلقة بانتاج الكاروتينويدات وبضمنها البيتا- كاروتين وهذا يفسر ما تم التوصل اليه في دراستنا الحالية. وفي دراسة Abd El-Razek [31] وجد ان انتاجية الكاروتينويدات في الخميرة *R. glutinis* var. glutinis ازداد بعد تطفيرها. اما في دراسة Bhosale و Gadre [27] فقد وجد ان الخميرة *R. glutinis* MCIM 3353 انتجت 2.2 ملغم/لتر كاروتينويدات 14% منها بيتا- كاروتين وعند تعريض العزلة للأشعة فوق البنفسجية ارتفعت نسبة البيتا- كاروتين الى 82%. بينما وجد Yehia وآخرون [26] أن تعريض الخميرة *R. glutinis* للأشعة فوق البنفسجية ولمدد زمنية مختلفة (2 ، 2.5، 3، 3.5، 4، 4.5، 5، 5.5، 6، 6.5، 7، 7.5 و 8) دقيقة بطول موجي 254 نانومتراً ادى إلى زيادة انتاجية الخميرة من صبغة البيتا- كاروتين من 165 مايكروغرام/لتر في العزلة غير المطفرة الى 369، 325 و 138 مايكروغرام/لترعند التشعيع لمدة 2، 3 و3.5 دقيقة على التوالي، وان ما تم الحصول عليه من نتائج في الدراسة الحالية تتفق مع ما ذكر من نتائج دراسات الباحثين اعلاه.

المصادر

1- Rodriguez-Amaya, D.B. (2001), A guide to carotenoids analysis in foods, Washington DC: ILSI Press, U.S.A.

2- Eldahshan, O.A. and Singab, A.N. B. (2013), Journal of pharmacognsy and phytochemistry carotenoids, Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2(1): 225-234.

3- Johnson, E.A. and Schroeder, W.A., (1995), "Microbial carotenoids," In : A. Fiecher, Ed., Advances Biochemical Engineering, Heidelberg, 53: 119-178.

4- Mata-Gómez, L. C. ; Montañez, J.C. ; Méndez-Zavala, A. and Aguilar, C.N., (2014), Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview, Microbial Cell Factaries, 13(12): 1475-2859.

5- Frengova, G.I. ; Simova, E.D. and Bashkova, D.M., (2004), Improvement of carotenoid-synthesizing yeast *Rhodotorula rubra* by chemical mutagenesis, Z. Naturforsch., 59: 99-103.

6- Ausich, R.L., (1997), Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology, Pure. Appl. Chem., 69: 2169-2173.

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

8- Mokhtari, M.; Etebarian, H.; Mirhendi, S.H. and Razavi, M., (2011), Identification and phylogeny of some species of the genera *Sporidiobolus* and *Rhodotorula* using analysis of the 5.8S RDNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers, Arch. Biol. Sci., Belgrade, 63(1): 79-88.

9- Seifi, Z.; Abadi, A.Z.M. and Hydrinia, S., (2013), Isolation, Identification and susceptibility profile of *Rhodotorula* species isolated from two educational hospitals in Ahvaz, Jundishapur Journal of Microbiology, 6(6): 1-7.

10- Deb, P. and Madhugiri, M.J., (2012), Optimization of apple- pomace based medium for pigment production by *Micrococcus flavu*, An International Quarterly Journal of Life Sciences, 7(1): 57-60.

11- خالد، هالة يحيى ; العقلة، بسام أحمد و محمد ،عقبة، (2013)، المركبات الفعالة بيولوجيا والنشاط المضاد للأكسدة في أصناف البرتقال الرئيسية في سورية، مجلة دمشق للعلوم الزراعية، 29 (1):153 -164.

12- Buzzini, P. ; Innocenti, M. ; Van Broock, M. and Mulinacc, N., (2007), Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula* , *Rhodosporidium* , *Sporobolomyces* , and *Sporidiobolus*, *Canadian*, Journal of Microbiology, 53(8): 1024-1031.

13- Čarnecká, M., (2009), Molecular study of intercellular changes as response of microorganisms to environment, Ph.D. Thesis, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, Czech.

14- Sacchetti, G. ; Maietti, S. ; Muzzoli, M. ; Scaglianti, M. ; Manfredini, S. ; Radice, M. and Bruni, R., (2005), Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, Food Chemistry, 91:621-632.

15- Demain, A.L., (2010), History of industrial biotechnology, Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success (Soetaert ,W. and Vandamme , E. J., eds), PP. 17–77, Wiley-VCH Verlag Gmb H and Co. K Ga A, Weinheim, Germany.

16- ملاعبيدة، بادية عبدالرزاق جمال، (2015)، عزل وتشخيص بعض الخمائر ودراسة قدرة بعض انواع جنس الـ *Rhodotorula* على انتاج البيتا- كاروتين ودراسة بعض انواعها من الناحية الوراثية والجزيئية، اطروحة دكتوراه، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، العراق.

17- Gao , H. ; Liu , M. ; Zhuo , Y. ; Zhou , X. ; Liu , J. ; Chen , D. ; Zhang , W. ; Gou , Z. ; Shang , P. and Zhang , L., (2010), Assessing the potential of an induced – mutation strategy for avermectin overproducers, Appl. Environ. Microbiol., 76(13): 4583-4586.

18- Li, C. ; Zhenming, C. ; Jing, L. and Xianghong, W., (2007), Enhanced carotenoid production by a mutant of the marine yeast *Rhodotorula* sp. hidai, Journal of Ocean University of China, 6(1): 66-71.

19- Harborne, J.B., (1984), "Phytochemical Methods" A guide to modern techniques of Plant analysis, 2 nd edition London, Chapman and Hall.

20- Sage, E., (1993), Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context, Photochem. Photobiol., 57(1): 163-174.

21- ساجدي، عادل جورج وعلي، علاء يحيى محمد، (1987)، المايكروبايولوجي الصناعي – الجزء الاول – اساسيات التخمرات الصناعية، مطبعة جامعة البصرة، البصرة، العراق.

22- Mohsen, S. ; Bazaraa, W.A. ; Shams El-Din, M.H.A. and Shedeed, N.A., (2010), Carotenoids: extraction, fractionation, identification from some food processing wastes and utilization as natural colorant in spaghetti, J. Saudi. Soc. For Food and Nutrition., 5(2); 13-26.

23- المنديل، فتحي عبدالله منديل صالح، (2010)، استخدام النواتج الطبيعية والصفات البايولوجية في تصنيف بعض انواع الجنس *Potamogeton* النامية في نهر دجلة ضمن مدينة الموصل، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

24- Sherma, J. and Fried, B., (1996), "Handbook of Thin-layer Chromatography Chromatographic", Second Edition, by Marcel Dekker, Inc.

25- Hadi, R. S. ; Fabrice, B. and Ivan, M., (2006), UV-HPLC/APCI-MS method for separation and identification of the carotenoids produced by *Sporobolomyces ruberrimus* H 110, Iran. J. Chem. Eng., 25(2): 1-10.

26- Yehia, H.M. ; Al-Olayan, E.M. ; Elkhadragy, M.F. ; Khalaf-Allah, A. E.M. and El-Shimi, N.M., (2013), Improvement of carotenoid pigments produced by *Rhodotorula glutinis*, Life Science Journal, 10(4): 386-400.

27- Bhosale, P. B. and Gadre, R. V., (2001), Production of β-carotene by mutant of *Rhodotorula glutinis*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 55: 423-427.

28- Nasrabadi, M.R.N. and Razavi, S. H., (2011), Optimization of β-caroten production by a mutant of the lacto positive yeast *Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate, Food Sci. Biotechnol., 20(2): 445-454.

29- Hwan an, G. ; Schuman, D. B. and Johnson, A., (1989), Isolation of *Phaffa rhodozyma* mutants with increased Astaxanthin content, Applied and Environmental Microbiology, 55(1): 116-124.

30- Winston, F., (2008), EMS and UV mutagnesis in yeast, Current Protocols in Molecular Biology, 28:13.3B. 1-B.3B.5. © 2008 by John Wiley and Sons, Inc.
31- Abd El-Razek, A. M., (2004), Isolation, classification and mutagenesis of yeast carotenoids and optimizing factors affecting its production, Ph. D. Thesis, Faculty of Agriculture, Alexandria University, Egypt.

جدول (1) : تأثير العامل الفيزيائي (الاشعة فوق البنفسجية) على حيوية عزلات الخمائر قيد الدراسة

العزلات	فترة التعرض لأشعة الـ UV (دقيقة)	عدد المستعمرات / طبق						المعدل	الافراد الناجية %	نسبة القتل %
***R. mucilaginosa* BA58**	**المقارنة**	27	24	27	26	26	26	26		
	2	27	23	26	24	25	25	25	96.15	3.84
	5	23	21	20	22	23	23	21.8	83.84	16.15
	10	14	17	16	15	15	15	15.4	59.23	40.77
	15	8	10	9	9	8	9	8.8	33.84	66.15
	20	4	7	8	5	6	6	6	23.07	76.92
***R. mucilaginosa* BA75**	**المقارنة**	26	23	22	25	24	24	24		
	2	21	20	24	23	22	24	22	91.66	8.33
	5	18	19	19	18	17	18	18.2	75.83	24.16
	10	15	16	17	14	15	15	15.4	64.16	35.83
	15	9	12	10	10	11	10	10.4	43.33	56.66
	20	6	4	5	5	7	5	5.4	22.5	77.5
***R. mucilaginosa* BA61**	**المقارنة**	24	25	24	27	26		25.2		
	2	25	22	24	21	23	23	23	91.26	8.73
	5	19	22	19	20	20	20	20	79.36	20.63
	10	15	19	16	18	17	17	17	67.61	32.54
	15	11	14	10	13	12	12	12	47.61	52.38
	20	7	3	6	4	5	5	5	19.84	80.15
***R. glutinis* BA83**	**المقارنة**	38	37	38	39	40		38.4		
	2	32	33	33	34	35	30	33.4	86.97	13.02
	5	29	30	28	29	30	30	29.2	76.04	23.95
	10	21	23	23	22	24	24	22.6	58.85	41.14
	15	17	18	20	17	19	19	18.2	47.39	52.68
	20	14	15	13	14	15	15	14.2	36.97	63.02
***R. minuta* BA78**	**المقارنة**	12	13	16	15	14	14	14		
	2	9	8	7	8	10	10	8.4	60	40
	5	5	7	6	6	7	6	6.2	44.28	95.71
	10	0	4	5	0	3	3	3	21.42	78.57
	15	3	4	0	1	2	2	2	14.28	85.71
	20	0	0	0	0	0	0	0	0	100
***R. graminis* BA1**	**المقارنة**	30	27	31	28	29	29	29		
	2	28	29	26	25	27	27	27	93.10	6.89
	5	25	23	22	24	21	23	23	79.31	20.69
	10	18	19	20	19	21	21	19.4	66.89	33.10
	15	8	12	12	13	10	10	11	37.93	62.06
	20	6	8	5	9	7	7	7	24.13	75.86

جدول (2) : تـأثير العامـل المطفـر الكيميـائي N-methyl-Ń-nitro-Ń-nitrosoguanidine (M NNG) بتركيز 0.2 ملغم/مل على حيوية الخمائر قيد الدراسة

العزلات		عدد المستعمرات / طبق					المعدل	الافراد الناجية%	نسبة القتل %
R. mucilaginosa BA58	المقارنة	22	25	24	23	23	23.4	42.73	57.26
	المعاملة	10	12	9	9	10	10		
R. mucilaginosa BA75	المقارنة	24	26	26	25	23	24.8	51.61	48.38
	المعاملة	14	12	13	11	14	12.8		
R. mucilaginosa BA61	المقارنة	26	27	28	27	28	27.2	53.67	46.32
	المعاملة	15	14	13	15	16	14.6		
R. glutinis BA83	المقارنة	32	33	31	34	32	32.4	38.27	61.72
	المعاملة	12	11	13	12	14	12.4		
R. minuta BA78	المقارنة	18	16	19	17	18	17.6	34.09	65.91
	المعاملة	7	5	8	4	6	6		
R. graminis BA1	المقارنة	32	30	32	31	30	31	63.87	36.13
	المعاملة	19	20	21	18	21	19.8		

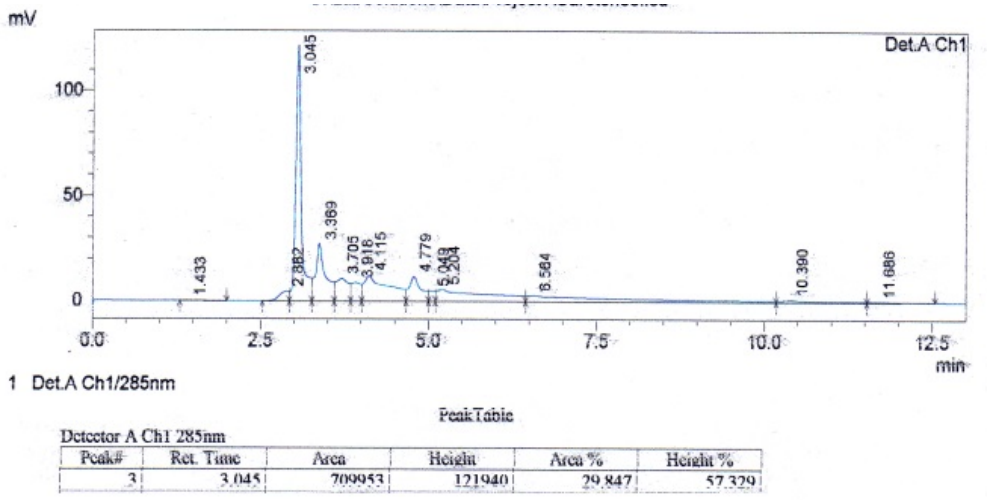
جدول (3) : تأثير العامل المطفر الكيميائي N-methyl-Ń-nitro-Ń-nitrosoguanidine (MNNG) بتركيز 0.2 ملغم/مل والعامل المطفر الفيزيائي (الاشعة فوق البنفسجية) على حيوية الخمائر قيد الدراسة.

العزلات	فترة التعرض لأشعة الـ UV (دقيقة)	عدد المستعمرات / طبق					المعدل	الافراد الناجية%	نسبة القتل %
R. mucilaginosa BA58	المقارنة	25	24	23	26	25	24.6		
	2	20	21	19	22	21	20.6	75.73	24.26
	5	18	15	17	14	16	16	59.70	40.29
	10	12	11	11	12	10	11.2	42.74	57.25
	15	8	4	5	7	6	6	24.39	75.61
	20	1	2	5	4	3	3	12.19	87.80
R. mucilaginosa BA75	المقارنة	26	28	29	27	26	27.2		
	2	16	14	15	17	15	15.4	62.60	37.39
	5	13	14	10	11	12	12	48.78	51.22
	10	11	8	9	12	10	10	36.76	63.23
	15	6	6	5	7	7	6.2	22.79	77.20
	20	0	3	2	3	2	2	7.63	92.36
R. mucilaginosa BA61	المقارنة	26	25	28	25	27	26.2		
	2	18	20	19	21	17	19	70.89	29.10
	5	12	13	13	15	14	13.4	49.26	50.73
	10	11	9	12	9	10	10.2	41.46	58.53
	15	5	8	5	6	6	6	22.90	77.1
	20	1	0	3	4	3	2.2	8.08	91.91
R. glutinis BA83	المقارنة	36	35	33	37	35	35.2		
	2	18	15	16	15	17	16.2	46.02	53.97
	5	13	14	13	15	14	13.8	39.20	60.79
	10	4	3	4	5	6	4.4	12.5	87.5
	15	0	0	0	0	1	0.2	0.56	99.43
	20	0	0	0	0	0	0	0	100
R. minuta BA78	المقارنة	15	16	17	18	16	16.4		

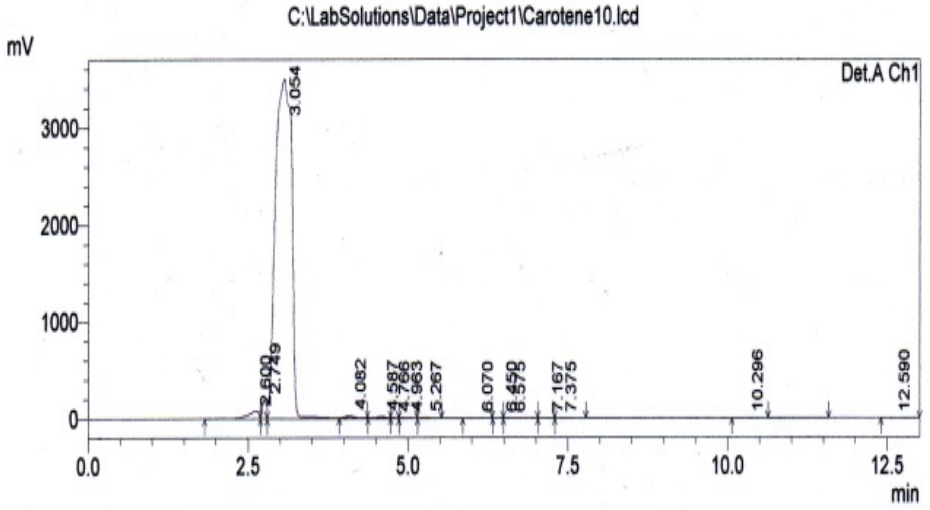
العزلات	فترة التعرض لأشعة الـ UV (دقيقة)	عدد المستعمرات / طبق					المعدل	الافراد الناجية%	نسبة القتل %
	2	3	4	3	2	5	3.4	20.73	79.26
	5	1	2	3	2	3	2.2	13.41	86.58
	10	0	2	1	1	0	1	6.09	93.90
	15	0	0	0	0	0	0	0	100
	20	0	0	0	0	0	0	0	100
	المقارنة	28	27	28	25	26	26.8		
***R. graminis* BA1**	**2**	18	22	19	21	20	20	76.33	23.66
	5	18	19	17	16	17	17.4	66.41	33.58
	10	15	13	14	15	17	14.8	55.22	44.77
	15	9	7	10	6	8	8	29.85	70.15
	20	5	4	4	3	3	3.8	14.17	85.82

جدول (4) : كمية البيتا- كاروتين المنتجة من عزلات الخمائر المطفرة والغير المطفرة.

العزلات	العزلات البرية		العزلات المطفرة	
	زمن الأحتباس (دقيقة)	التركيز غم/ لتر	زمن الأحتباس (دقيقة)	التركيزغم/ لتر
***R. mucilaginosa* BA58**	3.054	8.91	3.233	9.33
***R. mucilaginosa* BA75**	3.217	8.47	3.050	9.20
***R. mucilaginosa* BA61**	3.158	10.25	3.244	11.45
***R. glutinis* BA83**	3.161	7.65	3.125	8.45
***R. minuta* BA78**	3.028	5.39	3.045	6.56
***R. graminis* BA1**	3.186	7.36	3.192	8.28
المادة القياسية	3.045			



شكل (1): صبغة البيتا-كاروتين القياسية

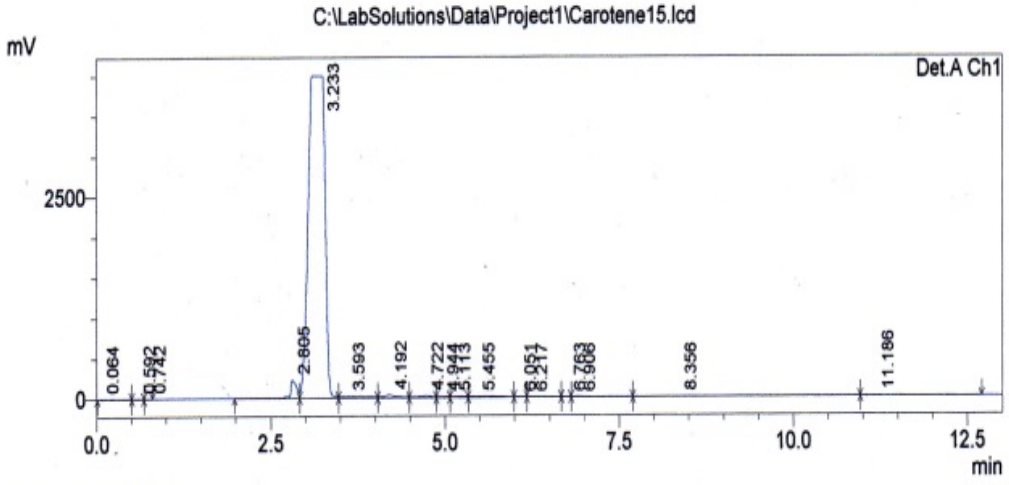


PeakTable

Detector A Ch1 285nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
3	3.054	63293404	3504993	96.298	91.602

شكل (2): 1. قبل التطفير العزلة BA58 *R. mucilaginosa*

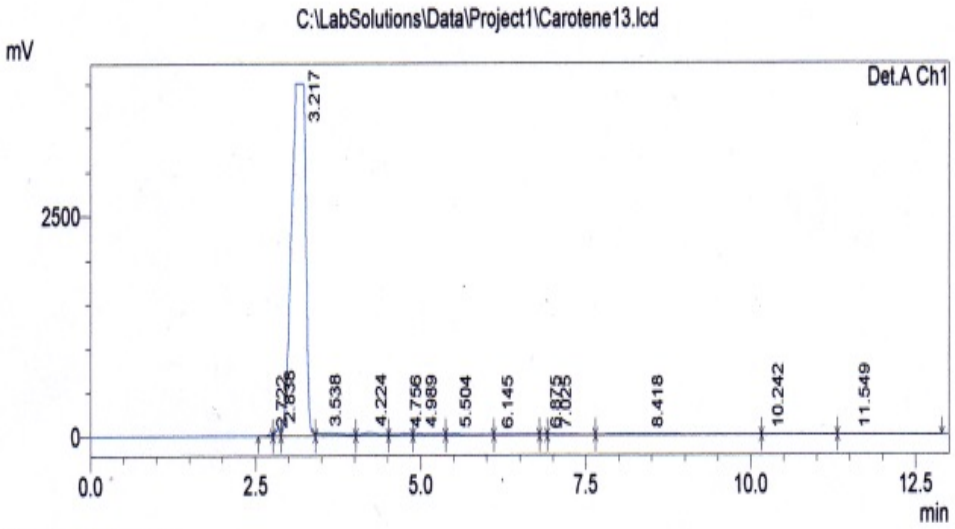


PeakTable

Detector A Ch1 285nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
5	3.233	66287731	4000061	94.368	91.941

2. بعد التطفير العزلة BA58 *R. mucilaginosa*

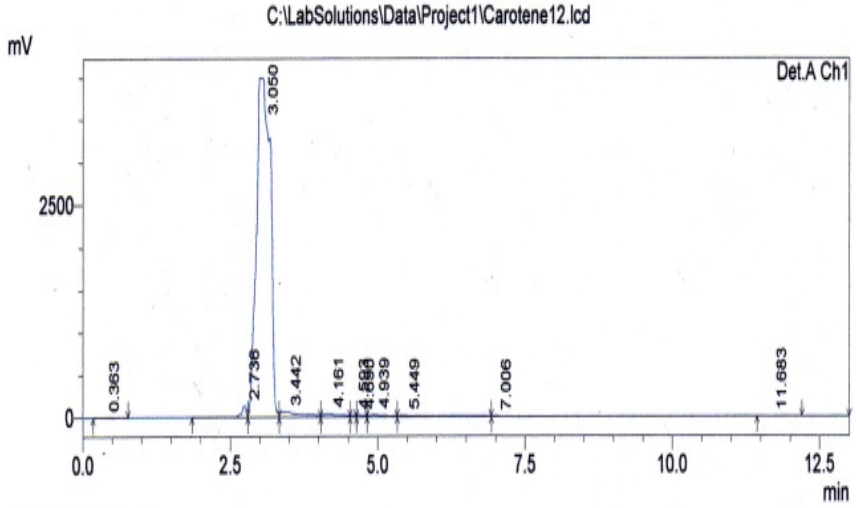


PeakTable

Detector A Ch1 285nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
3	3.217	60169728	3999637	92.736	93.785

شكل (3): 1. قبل التطفير العزلة *R. mucilaginosa* BA75

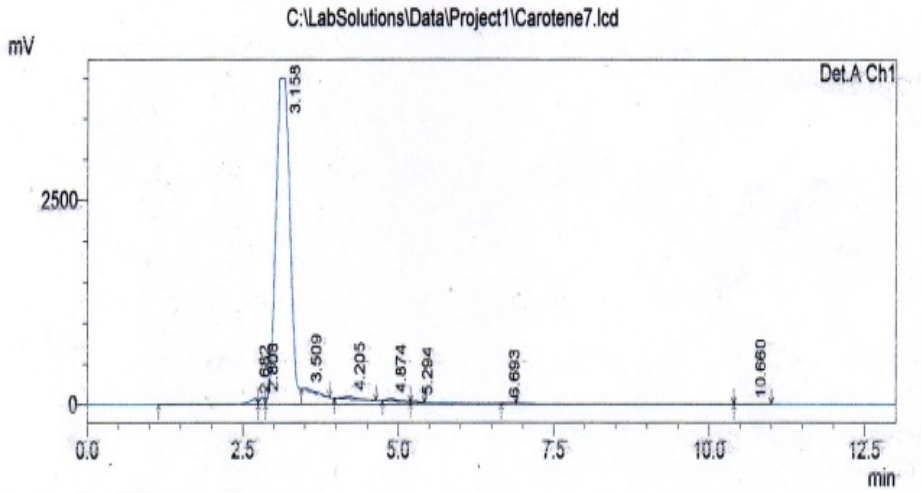


PeakTable

Detector A Ch1 285nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
3	3.050	65368129	4000362	92.399	92.456

2. بعد التطفير العزلة *R. mucilaginosa* BA75

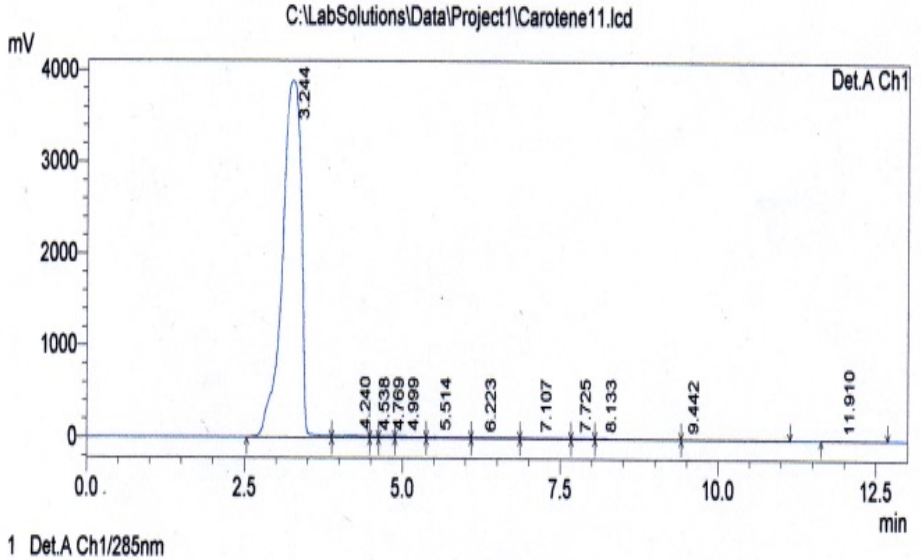


PeakTable

Detector A Ch1 285nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
3	3.158	72814443	4000350	96.912	94.306

شكل (4): 1. قبل التطفير العزلة *R. mucilaginosa* BA61

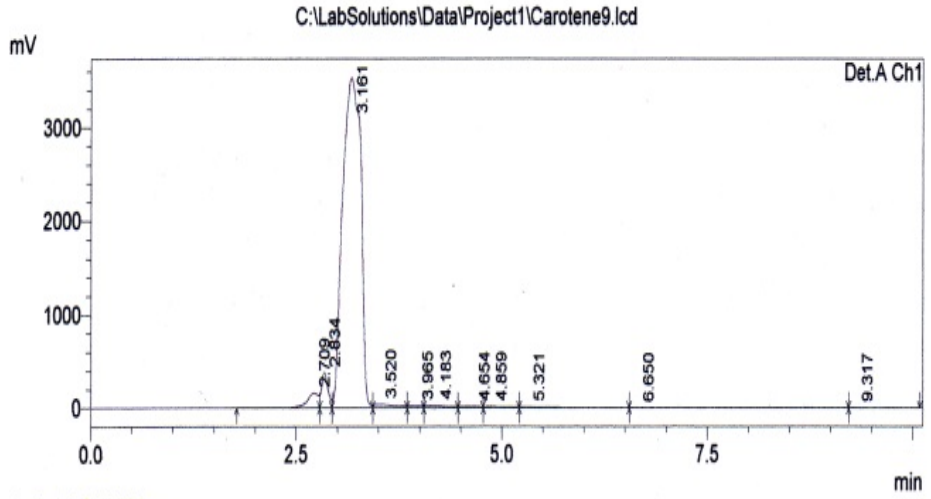


PeakTable

Detector A Ch1 285nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.244	81323049	3888994	97.821	98.137

2. بعد التطفير العزلة*R. mucilaginosa* BA61

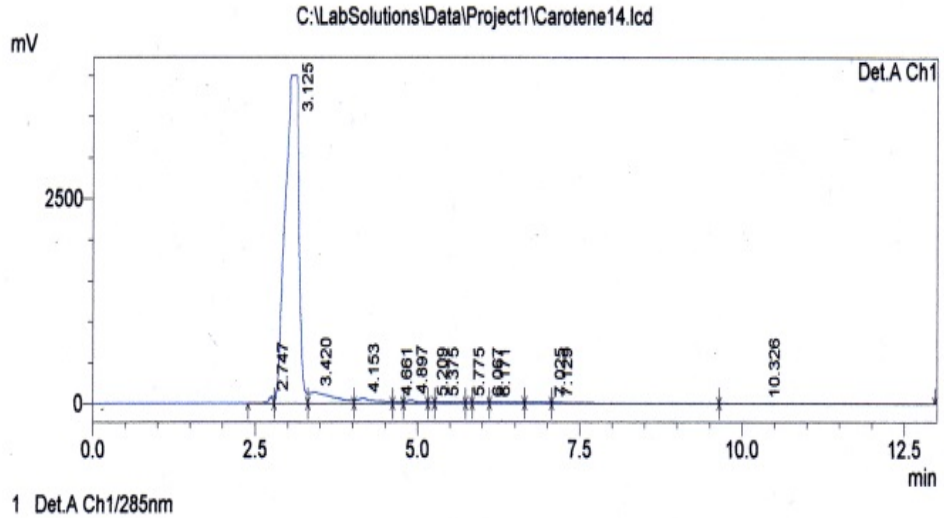


PeakTable

Detector A Ch1 285nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
3	3.161	54379507	3539389	90.076	84.208

شكل (5): 1. قبل التطفير العزلة BA83 *R.glutinis*

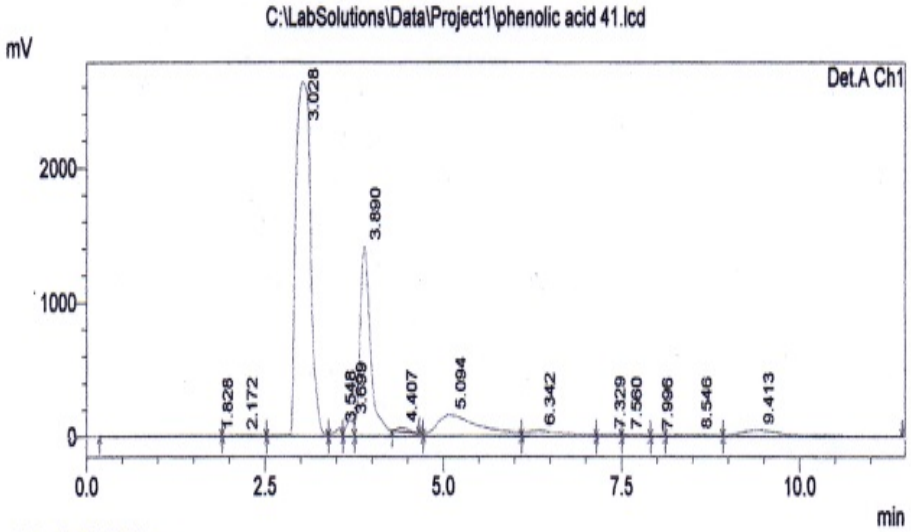


PeakTable

Detector A Ch1 285nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
2	3.125	60016675	4000310	87.409	89.800

2. بعد التطفير العزلةBA83 *R.glutinis*

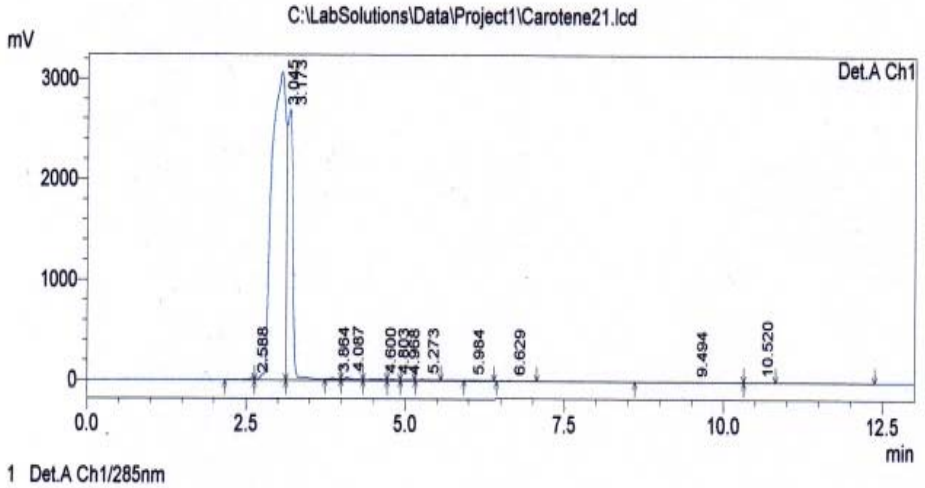


PeakTable

Detector A Ch1 210nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
3	3.028	38285796	2635238	57.584	57.976

شكل (6): 1. قبل التطفير العزلة BA78 *R. minuta*

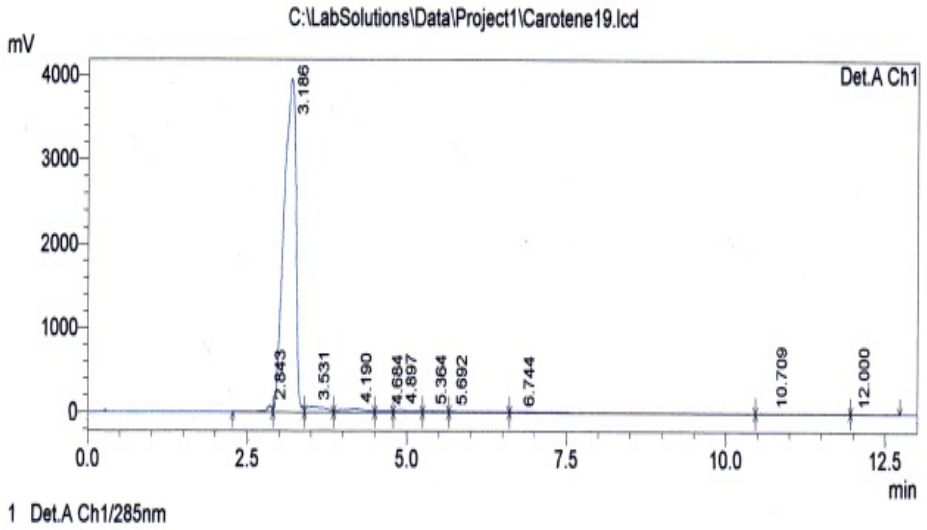


PeakTable

Detector A Ch1 285nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
2	3.045	46598705	3072706	71.658	52.627

2. بعد التطفير العزلة BA78 *R. minuta*

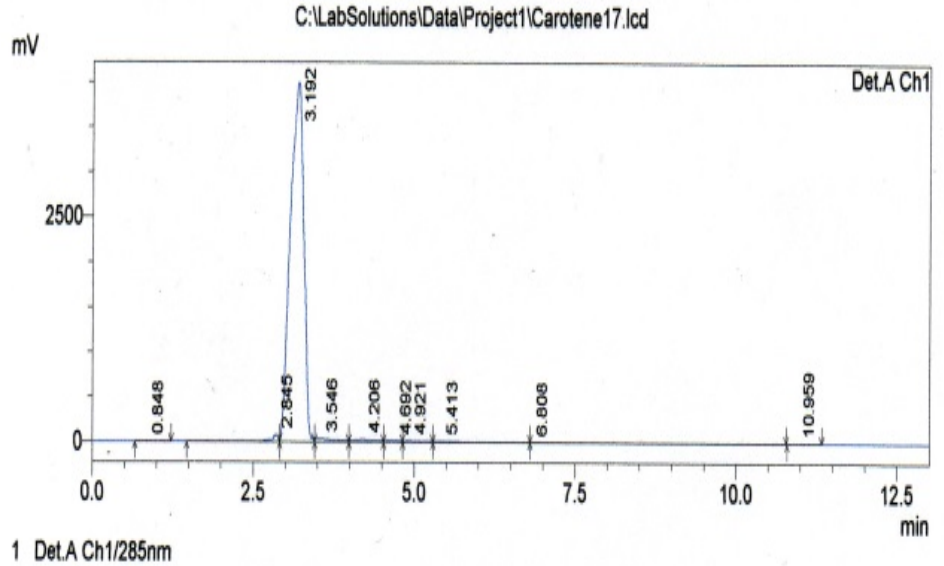


PeakTable

Detector A Ch1 285nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
2	3.186	52317669	3968328	89.963	93.297

شكل (7): 1. قبل التطفير العزلة *R. graminis* BA1



PeakTable

Detector A Ch1 285nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
3	3.192	58792834	4000071	94.882	95.695

2. بعد التطفير العزلة *R. graminis* BA1

Extraction and Estimation of β-carotene Pigment from Some Species of The Genus *Rhodotorula* and Study The Ability to Increas Their Production By Mutagenesis

Badia A. J. Mula Oboida
Rafiah Q. J. Al-Zubaidi
Raad H. S.Al-Haj Alawi
Dept. of Biology / College of Education for Pure Science / University of Mosul

Received in :3June2015 Accepted in 15November 2015

Abstract

Beta-carotene pigment was extracted from 6 strains collected from different sources related to some species of the genus *Rhodotorula* sp. The maximum productivity was in the strain *Rhodotorula mucilaginosa* BA61 with amount 10.25 gm/l. The minimum productivity was from the strain *R. minuta* BA78 with amount 5.39 gm/l. The effects of the chemical mutagen (MNNG) and the physical mutagen (UVC) on the viability of the strains was studied. The results revealed that the chemical mutagen (MNNG) with the concentration 0.2 mg/ml has the clear effect on the viability of the strains , which killing percentage reached to 65.91% in the strain *R. minuta* BA78. Results of the study of mutagenesis with UVC showed that increase in killing percentage for all the studied strains with the increase of radiation period. The maximum effect was with the strain *R. minuta* BA78, the killing percentage reach to 100% with the radiation period 20 minute. The companying effects of chemical with the concentration 0.2 mg/ml and physical mutagen was studied. The result showed increase in killing percentage for the studied strains which reach to 100% with the radiation period 15 and 20 minute for the strain *R. minuta* BA78. The maximum effect on Beta- carotene production was on the strain *R. mucilaginosa* BA61, the productivity reach to maximum with amount 11. 45gm/l.

Keywords: Extraction ، β-Carotene ، Mutagenesis ، *Rhodotorula*