مجلة جامعة كركوك للعلوم الزراعية ... المجلد (9) العدد (2) 2018
Journal of kirkuk University for Agricultural Sciences ...Vol (9) No. (2) 2018

# تأثير بعض العوامل على قابلية النمو وانتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula glutinis*

احمد ابراهيم صالح[1] أمين سليمان بدوي[2] ايثار زكي ناجي[2]

- [1] جامعة كركوك – كلية الزراعة – الحويجة
- [2] جامعة تكريت – كلية الزراعة

- البحث مستل من أطروحة الدكتوراه للباحث الاول
- تاريخ تسلم البحث 2016/4/19 وقبوله 2016/10/26

**الخلاصة**

أجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير بعض العوامل على قابلية النمو وإنتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula glutinis*. بينت النتائج ان افضل درجة حرارة واس هيدروجيني ابتدائي كانت (30م° ، 7) على التوالي كما ان أفضل سرعة دوران للحاضنة كانت 250 دورة/دقيقة اما حجم اللقاح الأفضل فكان 8% حجم/حجم بالإضافة إلى أن أفضل فترة حضانة كانت 120 ساعة. كما تبين ان وسط التخمر الأمثل كان يحتوي على : 2.5% سكروز كمصدر كربوني ، 0.22% كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ كمصدر للنتروجين ، 0.20% فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين $K_2HPO_4$، 0.20% فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين $KH_2PO_4$ و 0.01% كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4 .7H_2O$. وتم الحصول على كاروتينويدات كلية بمقدار 2260.30 مايكروغرام/لتر ونسبة الكاروتينويدات الى السكر المستهلك 92.18 مايكروغرام/غم.

**كلمات مفتاحية : الكاروتينويدات ، خميرة *Rhodotorula glutinis* .**

# Effect Of Some Factors On Growth Ability And Carotenoids Production From The Yeast *Rhodotorula glutinis*

**Ahmed I. Saleh[1] Ethar Z. Naji[2] Ameen S. Badawi[2]**

- [1] **Kirkuk university – college of agriculture – Haweja**
- [2] **Tikrit university – college of agriculture**

- Date of research received 19/4/2016 and accepted 29/6/2016

**Abstract**

The study was conducted to find out the effect of some factors on growth ability and Carotenoids production from the yeast *Rhodotorula glutinis*. The results showed that the best temperature and primary pH was (30°C and 7) respectively and the best speed of shaker incubator was 250 RPM and the best inoculum size was 8% volume/volume. In addition to that, the best incubation period was 120 hour. The fermentation media included 2.5% sucrose, 0.22% ammonium sulfate (NH4) 2SO4, 0.20% K2HPO4, 0.20% KH2PO4 and 0.01% magnesium sulfate MgSO4. 7H2O. with a total amount of Carotenoids 2260.30 micrograms/liter and carotenoids ratio to the sugar consumer is 92.18 micrograms/ grams.

**Key words: Carotenoids, *Rhodotorula Glutinis* Yeast.**

## المقدمة

تعد الكاروتينويدات من بين الصبغات الأكثر انتشارا في الطبيعة. وتصنع تحديدا بواسطة النباتات والأحياء المهجرية (Vachali وآخرون، 2012). للكاروتينويدات أهمية كبيرة واستخدامات واسعة فهي مفيدة كمضافات غذائية، ومكونات فعالة من مضادات الأكسدة والفيتامينات التي تتمتع بفعالية مضادة للأورام وتحمي الإنسان من الأمراض القلبية وأمراض تقدم العمر. ويمكن أيضا أن تستخدم كعوامل ملونة في الأطعمة والعقاقير، وفي الزراعة من اجل تعزيز لون النبات كالأزهار، والثمار (Johnson و Schroeder، 1996). تنتج الكاروتينويدات الميكروبية عادة من جنس *Rhodotorula* ويتأثرالانتاج من هذة الخميرة بالأنواع ومكونات الوسط والظروف البيئية. وان كمية الكاروتينويدات المنتجة بواسطة هذا الجنس يمكن ترتيبها بالشكل التالي: منخفض (اقل من 100 مايكروغرام/غم)، متوسط (101 – 500 مايكروغرام/غم) ومرتفع (أكثر من 500 مايكروغرام/غم) كما مدون من قبل (Aksu و Tugba Eren ، 2007؛ El-Banna وآخرون، 2012). يعتبرالإنتاج الميكروبي للكاروتينويدات ذو أهمية بالغة بالمقارنة مع الاستخلاص من الخضراوات أو التصنيع الكيميائي والسبب الرئيسي لذلك هو المشاكل الفصلية والجغرافية المتنوعة عند إنتاج وتسويق الملونات العديدة ذات الأصل النباتي وبسبب ألأهمية ألاقتصادية للعمليات الميكروبية باستعمال مواد طبيعية منخفضة الكلفة كمصادر كاربوهيدراتية ( Frengova و Beshkova ، 2009). ونتيجة لذلك، فقد جذب إنتاج الكاروتينويدات من الأحياء المجهرية اهتماما كبيرا. تتكون الكاروتينويدات طبيعيا من

صبغات التربينويد، التي تتألف بدورها من تكثيف لوحدات الآيزوبرين وسلسلة البولين ذات الأواصر الثنائية المزدوجة. وتكون تلك الصبغات مسؤولة عن مختلف أنواع الألوان الحمراء - البرتقالية الموجودة في الطبيعة التي تمتص الضوء بطول موجي يتراوح بين 300-600 نانومتر. ويرتبط الامتصاص بشكل مباشر بعدد الأواصر الثنائية المزدوجة والمجاميع الوظيفية الموجودة في التركيب.

## المواد وطرائق البحث

**وسط التخمر الأساسي:**

استخدم الوسط المقترح من قبل Bhosale و Gadre، (2001c) كوسط أساسي للتخمر المتكون من: 25غم كلوكوز و 10غم خلاصة الخميرة و 2غم فوسفات البوتاسيوم الاحادية و 2غم فوسفات البوتاسيوم الثنائية و 0,1غم كبريتات المغنيسيوم المائية وجميع المكونات مذابة في 1لتر من الماء المقطر. وبظروف التنمية التالية: الأس الهيدروجيني ضبط على 6 ، حجم البيئة الى حجم الدورق (5:1)، حجم اللقاح 10٪ ، حرارة التحضين 30°م ، فترة التحضين 4 أيام و سرعة الحاضنة الهزازة 150 دورة/ دقيقة .

**تعيين الظروف المثلى لإنتاج الكاروتينويدات:**

درست الظروف المثلى للإنتاج والتي شملت تاثيرمصادر كربونية مختلفة، تركيز مستخلص الخميرة، نوع المصدر النتروجيني، حجم اللقاح الابتدائي، الأس الهيدروجيني، درجة الحرارة، سرعة الخلط (التهوية) ، فترة التحضين .

**تأثير مصدر الكربون:**

تمت في هذه التجربة دراسة تأثير مصادر كربونية مختلفة في انتاج الكاروتينويدات وكانت: (سكروز، مالتوز، كالاكتوز، لاكتوز، مولاس القصب ومولاس البنجر) وكل مصدر من هذه المصادر أضيف على حده بنسبة 25 غم/لتر إلى وسط الإنتاج الأساسي بإستثناء المولاس فقد أضيف بنسبة 50غم/لترلكلا النوعين وذلك لاحتواء نوعي المولاس على السكريات بنسبة 50% بحسب تعليمات معمل سكرالموصل. ضبط الأس الهيدروجيني عند 6 ، حجم الوسط إلى حجم الدورق (5:1)، حجم اللقاح 10٪ و التحضين على 30°م لمدة 4 أيام باستخدام الحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة، واعتمد المصدر الأمثل بالتجارب اللاحقة.

**تأثير تركيز مستخلص الخميرة:**

درس في هذه التجربة تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة وكانت كالأتي (2.5، 5، 7.5، 10 و 12.5) وتم متابعة التجربة وأعتمد التركيز الأمثل من خلال دراسة تأثير التراكيز اعلاه كل على حده على وسط التخمر الاساسي بعد معرفة المصدر الكربوني الملائم لتحديد النسبة المثلى من مستخلص الخميرة عند الاستبدال بالمصدر النتروجيني في التجارب اللاحقة.

**تأثير المصدر النتروجيني:**

من اجل معرفة المصدر النتروجيني الأمثل للحصول على أعلى إنتاجية من الكاروتينويدات أضيفت مصادر نتروجينية مختلفة وكل على حدة الى الوسط الغذائي واُستبدلت خلاصة الخميرة بالمصادر النتروجينية الآتية: كبريتات الامونيوم ، اليوريا ، كلوريد الامونيوم ، خلاصة المالت ، خلاصة اللحم ومتحلل الكازين، واعتمد المصدر الأمثل في التجارب اللاحقة.

**تأثير حجم اللقاح الابتدائي:**

لتقدير تأثير حجم اللقاح الابتدائي في إنتاج الكاروتينويدات استعملت حجوم لقاح مختلفة وبالنسب التالية (2، 4، 6، 8 و 10)٪ من وسط التخمر، اعتمد حجم اللقاح الأمثل في التجارب اللاحقة. حضر اللقاح بالطريقة التالية (حملت عروة الناقل الجرثومي عشرة مرات من مزرعة الخميرة المنماة على الوسط المائل Yeast Malt Agar والمحضنة بدرجة حرارة 30°م بعمر 48 ساعة ونقلت إلى دورق سعة 250 مل يحتوي على 50 مل من الوسط السائل Yeast Malt Broth. حضنت الدوارق الملقحة بحاضنة هزازة بسرعة 100دورة/دقيقة وبدرجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة وتم تحديد النمو بقياس الامتصاصية عند طول موجي 570 نانومتر).

**تأثير الأس الهيدروجيني:**

لتعيين الأس الهيدروجيني الأمثل للإنتاج فقد تم اختبار تأثير قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني (3، 4، 5، 6، 7 و 8) واعتمد الأس الهيدروجيني الأمثل في التجارب اللاحقة.

**تأثير درجة حرارة التحضين:**

لتعيين درجة حرارة الانتاج المثلى فقد اختبرت درجات الحرارة (15، 25، 30، 35 و 40)°م واعتمدت الدرجة الحرارة المثلى في التجارب اللاحقة.

**تأثير سرعة دوران الحاضنة الهزازة (التهوية):**

من أجل معرفة سرعة دوران الحاضنة الهزازة المثلى لإنتاج الكاروتينويدات فقد اختبرت السرع التالية (50، 100، 150، 200 و 250) دورة/دقيقة واعتمدت السرعة المثلى للإنتاج لاحقا.

**تأثير فترة التحضين:**

لغرض معرفة تأثير فترة التحضين في الإنتاج فقد اختبرت فترات تحضين مختلفة (24، 48، 72، 96، 120 و 144) ساعة واعتمدت ألفترة المثلى لإنتاج الكاروتينويدات من خميرة *Rhodotorula glutinis* المعزولة محليا بعد تثبيت الظروف الملائمة للانتاج من خلال التجارب أعلاه .

**انتخاب عزلة الخميرة:**

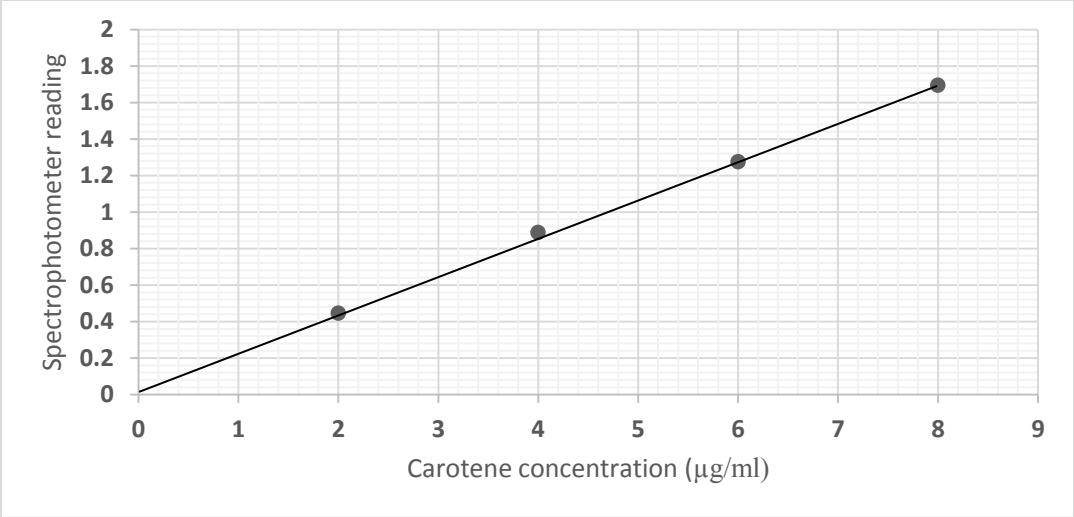
انتخبت العزلة المستخدمة في الدراسة بعد سلسلة من خطوات الغربلة الاولية والثانوية والنهائية للحصول على العزلة الاكفأ من ناحية النمو وقابلية الانتاج وشخصت العزلة المنتخبة وفقاً لطريقة Kreger-Van Rij، (1984) بالاعتماد على الخواص المظهرية كشكل الخلايا الخضرية وتكوين الغزول الفطرية والقابلية على تكوين الابواغ الكيسية اضافة للخواص المزرعية للعزلة كطبيعة النمو على الاوساط الصلبة والسائلة كما استخدمت الاختبارات الفسلجية والكيموحيوية في عملية التشخيص والتي اشتملت على قابلية العزلة على تخمير الكربوهيدرات وتمثيل مركبات الكربون والنتروجين كما اختبرت قابليتها على النمو بوسط خالي من الفيتامينات ومدى تحمل النمو باوساط ذات ضغوط ازموزية عاليه وتركيز 1% من حامض الخليك وقابلية العزلة لانتاج الحامض من الكلوكوزومدى مقاومتها للمضاد الحيوي السايكلوهكساميد كما اختبرت قابليتها لانتاج الامونيا من اليوريا وتبين من خلال تلك المفاتيح التصنيفية بأن العزلة المنتخبة هي خميرة *Rhodotorula glutinis* .

**تقدير الوزن الجاف للخلايا:**

تم تقدير الوزن الجاف للخلايا في 50 مل من مزرعة التخمر بعد الطرد المركزي على 3500 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة، غسل الراسب جيدا مرتين بالماء المقطر، طرح ماء الغسل في كل مرة، أجريت بها عملية الطرد المركزي، ثم التجفيف على 85°م لحين ثبات الوزن، يقدر الوزن الجاف للخلايا بصيغة غم/لتر من حجم المزرعة.

**استخلاص وتقدير الكاروتينويدات:**

وفقا لطريقة Park وآخرون (2005) المعدلة من قبل Ali ( 2013) لاستخلاص الكاروتينويدات، تم إجراء عملية الطرد المركزي لـ (50) مل من وسط التخمر الملقح على 3500 دورة في الدقيقة لمدة 15دقيقة، بعد فصل الراشح لتقديركمية الكربوهيدرات المتبقية غسل الراسب جيدا مرتين بالماء المقطر وأزيل ماء الغسل بعد الطرد المركزي في كل مرة. بعدها أضيف 10 مل من (0.5 عياري) حامض الهيدروكلوريك لراسب الخلايا، وسخن في حمام مائي بدرجة 100°م لمدة 10 دقائق ، ثم برد في الماء المثلج لمدة 10 دقائق، بعد ذلك ولاستخلاص الصبغات، قيست كميات من الأسيتون وبحسب الحاجه وأضيفت إلى عالق الخلايا مع التحريك بقوة، لضمان تحطيم الخلايا والاستخلاص الكامل للصبغات، وللتأكد من تمام الاستخلاص أضيفت كميات إضافية من الأسيتون حتى تحولت الخلايا الى عديمة اللون. أضيفت بعدها كميات من الهكسان مساوية للأسيتون المستخدم، ونقلت المكونات إلى قمع فصل. ثم أضيف محلول كلوريد الصوديوم البارد 15٪ لتنقية طبقة الهكسان، أخذت بعدها طبقة الهكسان وقدرت امتصاصية الصبغة على 450 نانومتر بجهازالمطياف الضوئي (.JENWAY 6305UV/vis). ثم رسم المنحنى القياسي باستخدام البيتا كاروتين القياسي وبالتاكيز التالية (10،8،6،4،2 مايكروغرام/مل) والمجهز من شركة (Sigma Aldrich) باعتبارها المادة القياسية. حسبت بعدها كمية الكاروتينويدات المنتجه باستخدام المنحنى القياسي كما في الشكل(1).

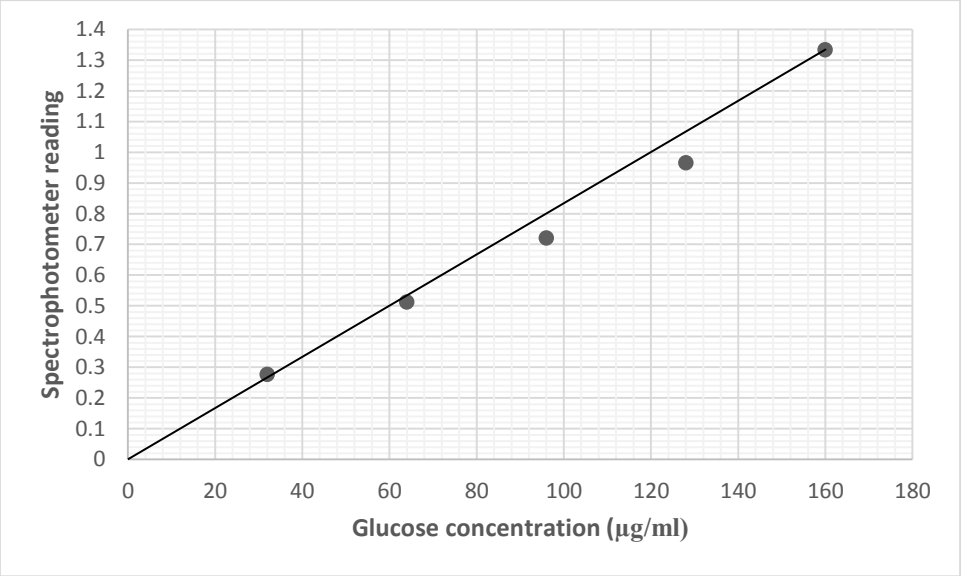



**شكل (1): المنحني القياسي لتقدير البيتا كاروتين**

**تقدير الكربوهيدرات المتبقية:**

تم تقدير الكربوهيدرات الكلية المتبقية بعد التخمير بطريقة (الفينول-حامض الكبريتيك) الموصوفة من قبل (Dubois وآخرون ، 1956) وذلك بأخذ 1 مل من المحلول الرائق الذي تم الحصول عليه من راشح مزرعة الخميرة الخالي من الخلايا وإجراء التخافيف المطلوبة باستخدام الماء المقطر. بعد ذلك اخذ 1 مل من المحلول الأخير وأضيف له 1 مل من محلول الفينول

(5٪) ومزجت جيدا ثم أضيف للمزيج 5مل من حامض الكبريتيك المركز. رجت الأنابيب بقوة ثم وضعت في حمام مائي بدرجة 25-30°م لمدة 30 دقيقة وقيست الكثافة الضوئية عند طول موجي 490 نانوميتر بجهاز المطياف الضوئي طراز JENWAY 6305 UV/vis. وتم حساب تراكيز السكر في العينات بالاعتماد على المنحنى القياسي باستخدام الكلوكوز النقي بوصفه سكرا قياسيا وتم تحضير المنحنى القياسي بعمل تراكيز مختلفة من محلول سكر الكلوكوزتراوحت من (32-192 مايكروغرام/مل) وتم تطبيق الطريقة المذكورة للحصول على قيم الكثافة الضوئية للتراكيز المختلفة من الكلوكوز كما في الشكل (2).




**شكل (2): المنحني القياسي لتقدير الكربوهيدرات الكلية**

**التحليل الإحصائي:**

حللت نتائج التجارب بإستخدام النموذج الخطي العام ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز (SAS ، 2001) لدراسة تأثير العوامل على وفق التصميم العشوائي الكامل CRD كما أجري إختبار دنكن (Duncan ، 1955) لتحديد معنوية الفروق مابين متوسطات العوامل المؤثرة على الصفات المدروسة عند مستوى احتمالية 0.05.

## النتائج والمناقشة

**تأثير المصدر الكربوني:**

يبين الجدول 1 بأن أفضل مصدر كربوني لإنتاج الكاروتينويدات كان السكروز ، إذ بلغت كمية الكاروتينويدات المنتجة 1281.81 مايكروغرام/لتر حيث أختلفت معنويا عن باقي المصادر الكربونية المستخدمة. اتفقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه El-Banna وآخرون (2012) فقد اشاروا بأن اعلى كاروتينويدات حجمية وخلوية كلية كانت في الوسط الحاوي على السكروز عند تنمية خميرة *R. glutinis var. glutinis* إذ بلغت (1.81 ملغم/لتر). وهذا ما اكده كذلك (Latha وآخرون ،2004 ؛ Aksu و Tugba Eren ، 2007). أشار Ahmed (2004) بأن تنمية خميرة *R. glutinis 32* في وسط حاوي على السكروز كمصدر وحيد للكربون قد اعطى كذلك اعلى كتلة حيوية و اكبر كمية كاروتينويدات بالمقارنة مع بقية مصادر الكربون المستخدمة إذ بلغت 8.75 غم/لتر و 1.517 ملغم/لتر على التوالي. كما يوضح الجدول أن اعلى كفاءة انتاجية كانت مع السكروز بالمقارنة مع باقي المصادر المستخدمة والمحسوبة على اساس نسبة الكاروتينويدات بالنسبة للسكر المستهلك إذ بلغت 52.35 مايكروغرام/غم بالمقارنة مع اقل كفاءة انتاجية التي وجدت مع اللاكتوز الذي سجل اقل المعطيات من ناحية الكتلة الحيوية والانتاجية وكفاءة الانتاج كما مر سابقا واعلى قيمة اس هيدروجيني وكانت القيم (2.65 ، 94.74 ، 10.06 و 7.86) على التوالي. ويعود السبب في ذلك الى عدم قابلية خميرة *R. glutinis* من تمثيل سكر اللاكتوز لعدم امتلاك الخميرة لأنزيم (β-galactosidase) الذي يعمل على تحليل سكر اللاكتوز الى السكريات الأحادية المكون منها. أتفقت النتيجة مع ما أشار اليه Latha وآخرون (2004) الذين اكدوا بأن اللاكتوز لم يدعم نمو الخميرة اذ أشاروا بأن الخمائر الهاضمة لسكراللاكتوز نادرة جدا تحت الظروف الطبيعية و *R. lactis* هو النوع الوحيد الذي يستطيع ان يهضم اللاكتوز. توصل Ahmed (2004) الى أن استخدام اللاكتوز في وسط تنمية *R. glutinis* 32 كان ذو تأثير سلبي على انتاج الكتلة الحيوية والكاروتينويدات على السواء.

**تأثير تركيز مستخلص الخميرة:**

توضح نتائج الجدول 2 بأن كمية الكاروتينويدات قد إزدادت مع زيادة تركيز خلاصة الخميرة من (2.5 – 5) غم/لتر ثم اخذت بالانخفاض التدريجي مع استمرارية الزيادة في تراكيز خلاصة الخميرة لتصل كمية الكاروتينويدات الكلية الى ادنى مستوى لها مع التركيز الأعلى لخلاصة الخميرة. فقد بينت نتائج التحليل الإحصائي بأن أقصى انتاجية للكاروتينويدات بالاضافة الى نسبتها الى السكر المستهلك قد وجدت عند استخدام الوسط الغذائي الحاوي على (5 غم/لتر) من مستخلص الخميرة إذ بلغت

(1584.06 مايكروغرام/لتر و 64.41 مايكروغرام/غم) على التوالي كما بينت النتائج ان كمية الكاروتينويدات قد سجلت انخفاضا ملحوضا عند ارتفاع او انخفاض تركيز مستخلص الخميرة عن هذه القيمة، واقل انتاجية كانت عند التركيز (12.5غم/لتر) من مستخلص الخميرة وكانت (1180.06 مايكروغرام/لتر). وجاءت هذه النتيجة متفقة مع ما توصل اليه Ali ( 2013) حيث وجد أن النسبة العالية من خلاصة الخميرة (6 غم/لتر) فأكثر والمنخفضة جدا (2 غم/لتر) او اقل قد أثرت سلباً على كمية الكاروتينويدات الكلية بالإضافة الى الانخفاض في كفاءة الانتاج. بين كل من (El-Hawary و Mehanna ،1991؛ Slemer-Olsen و Sorthaug ، 1998) أن النسبة المثلى لخلاصة الخميرة المستخدمة في الاوساط الغذائية تتراوح بين 0.1 – 5% وهذه النسبة بقيمتها العليا تتطابق مع ما توصلت اليه نتائج هذه الدراسة.

**الجدول 1: تأثير المصدر الكربوني في إنتاج الكاروتينويدات C=30 ، pH=6 ، rpm=150**

| المصدر الكربوني | الكتلة الحيوية غم/ لتر | الكاروتينويدات مايكروغرام /لتر | السكر المستهلك غم/لتر | الكاروتينويدات/السكر المستهلك (مايكروغرام/غم) | الأس الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|---|
| سكروز | 12.83<br>c | 1281.81<br>a | 24.48<br>a | 52.35<br>a | 5.96<br>b c |
| مالتوز | 9.54<br>d | 973.41<br>d | 22.61<br>c | 43.05<br>d | 6.05<br>b |
| كالاكتوز | 13.32<br>b | 1179.07<br>c | 24.50<br>a | 48.12<br>c | 5.98<br>b c |
| لاكتوز | 2.65<br>f | 94.74<br>f | 9.41<br>e | 10.06<br>f | 7.86<br>a |
| مولاس القصب | 13.70<br>a | 1204.54<br>b | 24.16<br>b | 49.85<br>b | 5.82<br>d |
| مولاس البنجر | 5.02<br>e | 276.44<br>e | 21.41<br>d | 12.90<br>e | 5.94<br>c |

**f-a: الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تشير الى عدم وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05.**

**الجدول 2: تأثير تركيز مستخلص الخميرة في إنتاج الكاروتينويدات باستخدام السكروز كمصدر كربوني C=30° , pH=6 , rpm=150**

| تركيز مستخلص الخميرة غم /لتر | ألكتلة الحيوية غم/ لتر | الكاروتينويدات مايكرو غرام /لتر | السكر المستهلك غم/لتر | الكاروتينويدات/السكر المستهلك مايكروغرام/غم | الأس الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|---|
| **2.5** | 10.17<br>e | 1269.91<br>d | 23.58<br>e | 53.84<br>c | 5.11<br>d |
| **5** | 12.15<br>d | 1584.06<br>a | 24.59<br>a | 64.41<br>a | 5.62<br>c |
| **7.5** | 12.50<br>c | 1419.08<br>b | 24.53<br>b | 57.84<br>b | 5.98<br>b |
| **10** | 12.83<br>b | 1281.81<br>c | 24.48<br>c | 52.35<br>d | 5.96<br>b |
| **12.5** | 12.99<br>a | 1180.06<br>e | 24.17<br>d | 48.81<br>e | 6.11<br>a |

**e-a: الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تشير الى عدم وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05.**

ونظرا لأن التركيز 5 غم/لتر من خلاصة الخميرة كان هو الافضل بإعطاء أعلى إنتاجية من صبغات الكاروتينويد لذلك استخدم لحساب كمية المصدر النتروجيني الذي سيستخدم في الدراسة اللاحقة وفقا لنسبة النتروجين لكل مصدر من تلك المصادر، اذ ان مستخلص الخميرة استخدم كمصدر للنتروجين في بيئة التخمر الاساسية وبحسب تعليمات الشركة المصنعة فقد كانت نسبة النتروجين في مستخلص الخميرة المستعمل 9.5%(هذه النسبة مسجلة على بيانات عبوة المنتج ، وقد تختلف حسب الشركة المنتجة)، وعند عمل تجربة افضل تركيز لمستخلص الخميرة في البيئة الاساسية، وجد أن تركيز 5 غم /لتر من بيئة التخمير هو افضل محفز للانتاج، وبناءً على ماسبق تم حساب نسبة النتروجين المثلى في بيئة التخمر الاساسية وكمايلي : 5×9.5 ÷ 100 = 0.47 وحدة نتروجين / لتر وعند استخدام مصادر نتروجين اخرى خلاف مستخلص الخميرة فانها تضاف بنفس النسبة السابقة، فعند استخدام مصادر نتروجين غير عضوية يتم حساب نسبة النتروجين تبعا للوزن الجزيئي اما المصادر العضوية فتكون نسبة النتروجين مسجلة في بيانات العبوة وتحسب مباشرة.

**تأثير المصدر النتروجيني:**

يتضح من الجدول 3 ان افضل مصدر نتروجيني هو كبريتات الامونيوم اذ بلغت كمية الكاروتينويدات ونسبتها الى السكر المستهلك (1474.19 مايكروغرام/لتر و 62.30 مايكروغرام/غم) على التوالي وتلتها اليوريا وكانت كمية الكاروتينويدات المنتجة (1337.76 مايكروغرام/لتر). اتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه El-Banna وآخرون (2012) اذ حصلوا على

الانتاجية الاعلى للكارويتنويدات بواسطة الخميرة *R. glutinis var. glutinis* عند تنميتها بوسط حاوي على كبريتات الامونيوم. اشار Ferrao و Garg (2011) بأن اعلى انتاجية للكاروتينويدات يمكن الحصول عليها بواسطة *R. glutinis* مع استخدام الاملاح غير العضوية كمصادر للنتروجين. وفي تجربة أجراها كل من Cattalina و Dima (2012) لدراسة تأثير مصادر النتروجين المختلفة على نمو الخميرة وقابلية تكوين الكاروتينويدات من خلال ثلاث سلالات لخميرة *Rhodotorula* ، أظهرت المعلومات التي حصلا عليها بأن النمو والانتاج الاوطأ كان مع اثنين من السلالات المختبرة بالوسط المحتوي على كلوريد الامونيوم والوسط مع نترات الامونيوم بوجود 0.1% ثيرونين. اما اعلى نسبة نمو وانتاجية فكانت مع السلالة المختبرة الثالثة عند تنميتها على وسط حاوي على كبريتات الامونيوم وهذا ما يدعم النتائج التي توصلت اليها الدراسة الحالية.

**جدول 3 : تأثير المصدر النتروجيني في إنتاج الكاروتينويدات باستخدام السكروز كمصدر كربوني C=30° , pH=6 , rpm=150**

| المصدر النتروجيني | الكتلة الحيوية غم/ لتر | الكاروتينويدات مايكروغرام /لتر | السكر المستهلك غم/لتر | الكاروتينويدات/السكر المستهلك مايكروغرام/غم | الأس الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|---|
| **كبريتات الامونيوم** | 7.41<br>d | 1474.19<br>a | 23.59<br>c | 62.30<br>a | 2.31<br>f |
| **اليوريا** | 9.01<br>d | 1337.76<br>b | 24.34<br>a | 54.94<br>b | 6.05<br>b |
| **كلوريد الامونيوم** | 6.21<br>e | 690.43<br>d | 23.63<br>c | 29.19<br>d | 3.71<br>e |
| **خلاصة المالت** | 2.14<br>f | 80.92<br>f | 19.83<br>d | 4.08<br>f | 6.39<br>a |
| **خلاصة اللحم** | 10.52<br>a | 879.20<br>c | 24.33<br>a | 36.13<br>c | 5.76<br>c |
| **متحلل الكازين** | 9.67<br>b | 449.08<br>e | 24.25<br>b | 18.51<br>e | 5.54<br>d |

**f-a: الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تشير الى عدم وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05.**

**تأثير حجم اللقاح**

تشير النتائج الموضحة في الجدول 4 إن استعمال اللقاح بنسبة (8% حجم/حجم) قد حقق أفضل إنتاج للكاروتينويدات والكتلة الحيوية إذ بلغت (1657.92 مايكروغرام/لتر و 7.70 غم/لتر) على التوالي ، وترافقت تلك الزيادة مع زيادة نسبة الكاروتينويدات الى السكر المستهلك لتسجل أعلى قيمة عند هذا الحجم من اللقاح إذ بلغت (69.85 مايكروغرام/غم) ، هذا وقد شهدت جميع القيم المذكورة أعلاه انخفاضا واضحا عند حجم لقاح (2% حجم/حجم) في وسط التخمر. وقد يعزى سبب هذا الانخفاض عند استعمال كمية قليلة من اللقاح لعدم التناسب بين حجم اللقاح الى حجم وسط التخمر والذي بدوره سيؤدي لحاجة اللقاح لفترة طويلة لتكوين الاعداد المطلوبة لانتاج الكتلة الحيوية للخلايا والتي من خلالها نحصل على انتاجية الكاروتينويدات ألاعلى وهذه الفترة الطويلة ستؤدي الى استهلاك معظم المواد اللازمة للنمو والتكاثر دون الوصول الى اعداد الخلايا المطلوبة للانتاج بصورة مقنعة. وتبين كذلك نتائج التحليل الاحصائي حصول انخفاض معنوي بكمية الكاروتينويدات والكتلة الحيوية إضافة إلى نسبة الكاروتينويدات الى السكر المستهلك عند زيادة نسبة اللقاح الى (10% حجم/حجم) ويمكن ان نفسر هذا الانخفاض بحالة التنافس الشديد للحصول على الاوكسجين والمغذيات وعوامل النمو في وسط التخمر وإستهلاك معظم المواد الموجودة في الوسط ، الامر الذي قد يغير من ظروف وسط التخمر بسرعة لتصبح غير ملائمة لعملية الانتاج اللاحقة.

**جدول 4: تأثير حجم اللقاح في إنتاج الكاروتينويدات باستخدام السكروز كمصدر كربوني وكبريتات الامونيوم كمصدر نتروجيني , ċ=30 pH=6 , rpm=150**

| حجم اللقاح % | ألكتلة الحيوية غم/ لتر | الكاروتينويدات مايكرو غرام /لتر | السكر المستهلك غم/لتر | الكاروتينويدات/السكر المستهلك مايكروغرام/غم | الأس الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|---|
| **2** | 5.11<br>e | 710.58<br>e | 20.40<br>e | 34.83<br>d | 2.86<br>a |
| **4** | 6.29<br>d | 1134.12<br>d | 22.80<br>d | 48.74<br>c | 2.51<br>b |
| **6** | 7.30<br>c | 1424.18<br>c | 23.07<br>c | 61.71<br>b | 2.38<br>c |
| **8** | 7.70<br>a | 1657.92<br>a | 23.73<br>a | 69.85<br>a | 2.24<br>d |
| **10** | 7.41<br>b | 1474.19<br>b | 23.59<br>b | 62.30<br>b | 2.31<br>c |

**e-a: الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تشير الى عدم وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05.**

اما الأس الهيدروجيني فقد شهد انخفاضا مع جميع التراكيز المستخدمة إذ بلغ 2.24 عند التركيز 8% بالمقارنة مع 2.86 مع استخدام التركيز 2%. يلاحظ من خلال التجارب التي اجراها Ali (2013) باستخدام خميرة *R. glutinis* NRRL Y-842 فقد وجد أن انتاج الكاروتينويدات قد ازداد مع زيادة حجم اللقاح من 2.5 – 10% بالرغم من أن الزيادة كانت محدودة ، واكد أن بزيادة حجم اللقاح ستزداد معها كلاً من كمية الكاروتينويدات ووزن الخلايا الجاف. كما اوضح Frengova وآخرون (1994) أن جميع اوساط التخمر التي قام بدراسة حجم اللقاح الامثل معها كانت ذات اعلى إنتاجية مع حجم لقاح مستخدم يبلغ (6% حجم/حجم).

**تأثير الاس الهيدروجيني (pH)**

يبين الجدول 5 الزيادة الحاصلة في كمية الكاروتينويدات مع ارتفاع قيمة الاس الهيدروجيني وصولا لدالة الحموضة بالقيمة (7) ثم حصل انخفاض معنوي بعد هذه القيمة بكمية الكاروتينويدات الكلية. يتضح من ذلك بأن الاس الهيدروجيني المتعادل أعطى أعلى إنتاجية من الكاروتينويدات إضافة إلى أعلى كمية كاروتينويدات بالنسبة للسكر المستهلك. وكانت هذه القيم (90 .1760 مايكروغرام/لتر و 73.39 مايكروغرام/لتر) على التوالي ، كما شهدت هذه القيم انخفاضا معنويا عند ارتفاع أو انخفاض درجة الاس الهيدروجيني عن هذه القيمة. توافقت هذه النتائج مع ما توصل اليه Bhosale (2001) إذ وجد بأن اعلى مستوى لانتاج الكاروتينويدات بفعل خميرة *Rhodotorula* قد تم الحصول عليه عند اس هيدروجيني (7) كما لاحظ ان الانخفاض في الانتاجية قد لوحظ عند كلا الجانبين من الاس الهيدروجيني المتعادل. و اتفقت نتائج هذه الدراسة كذلك مع النتائج التي حققها كل من (Choughari و Singhal ، 2008 : Maldonade وآخرون ، 2008) حيث اشاروا الى ان زيادة قيمة الاس الهيدروجيني ادت الى زيادة معدل النمو وانتاج الكاروتينويدات الى ان وصلت لاعلى مستوى عند الاس الهيدروجيني (6.8 – 7) وهذا ما يدعم النتائج التي توصلت اليها الدراسة الحالية.

**جدول 5: تأثير الأس الهيدروجيني الأولي في إنتاج الكاروتينويدات باستخدام السكروز كمصدر كربوني وكبريتات الامونيوم كمصدر نتروجيني ċ=30, rpm=150**

| الأس الهيدروجيني الأولي | ألكتلة الحيوية غم/ لتر | الكاروتينويدات مايكرو غرام /لتر | السكر المستهلك غم/لتر | الكاروتينويدات/السكر المستهلك مايكروغرام/غم | الأس الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|---|
| **3** | 5.78<br>e | 862.45<br>f | 22.82<br>f | 37.79<br>f | 2.11<br>f |
| **4** | 6.66<br>d | 953.46<br>e | 23.00<br>e | 41.45<br>e | 2.15<br>e |
| **5** | 7.13<br>c | 1179.59<br>d | 23.50<br>D | 50.18<br>d | 2.21<br>d |
| **6** | 7.70<br>b | 1657.92<br>b | 23.73<br>C | 69.86<br>b | 2.24<br>c |
| **7** | 8.11<br>a | 1760.90<br>a | 23.99<br>A | 73.39<br>a | 2.33<br>b |
| **8** | 8.13<br>a | 1635.25<br>c | 23.86<br>b | 68.53<br>c | 2.57<br>a |

**f-a: الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تشير الى عدم وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05.**

**تأثير درجة الحرارة**

تشير ألنتائج المبينة في الجدول 6 أن درجة الحرارة المثلى هي 30 ºم، إذ اعطى استخدام هذه الدرجة الحرارية اعلى كمية من الصبغة واكبر كتلة حيوية والنسبة الاكبر من كفاءة الانتاج وكانت (1760.90 غم/لتر ، 8.11 غم/لتر و 73.39 مايكروغرام/غم) على التوالي. اما الاس الهيدروجيني فقد وصل الى 2.33 عند هذه الدرجة الحرارية وهي اقل قيمة لدالة الحموضة بالمقارنة مع باقي الدرجات الحرارية المستخدمة. اتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه Ali (2013) عند تنمية خميرة *R. glutinis* NRR Y-842 فقد أظهرت البيانات التي توصل اليها ان افضل درجة حرارة للتنمية وانتاج الكاروتينويدات كانت 30 ºم بينما لاحظ حصول انخفاض واضح في النمو والكارويتنويد المنتج في الحرارة الاعلى من 30 ºم وقد عزى السبب الى احتمالية تغير في طبيعة النظام الانزيمي عند درجات الحرارة الاعلى من ذلك. كما ان نتائج الدراسة جاءت متوافقة مع ما اشار اليه El-Banna وآخرون (2012) من ان درجة الحرارة الملائمة للنمو وإنتاج الكاروتينويدات بواسطة خميرة *R. glutinis* بلغت 30 ºم . وجد كل من Aksu و Tugba Eren (2007) ان كلاً من انتاج الكاروتينويدات والنمو الخلوي للخميرة *R. glutinis* تأثر بدرجة حرارة الوسط وكانت افضل درجة حرارة 30 ºم لانتاج كل من الكتلة الحيوية والصبغة على حد سواء.

**جدول 6 : تأثير درجة حرارة التحضين الأولي في إنتاج الكاروتينويدات باستخدام السكروز كمصدر كربوني وكبريتات الامونيوم كمصدر نتروجيني rpm=150**

| درجة حرارة التحضين سيليزية | ألكتلة الحيوية غم/ لتر | الكاروتينويدات مايكرو غرام /لتر | السكر المستهلك غم/لتر | الكاروتينويدات/السكر المستهلك مايكروغرام/غم | الأس الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|---|
| **15** | 5.72<br>d | 741.94<br>d | 22.48<br>d | 33.00<br>d | 3.56<br>b |
| **25** | 7.80<br>b | 1687.92<br>b | 23.89<br>b | 70.63<br>b | 2.57<br>d |
| **30** | 8.11<br>a | 1760.90<br>a | 23.99<br>a | 73.39<br>a | 2.33<br>e |
| **35** | 6.10<br>c | 939.89<br>c | 23.44<br>c | 39.95<br>c | 3.05<br>c |
| **40** | 1.83<br>e | 139.20<br>e | 19.62<br>e | 7.08<br>e | 4.06<br>a |

**e-a: الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تشير الى عدم وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05.**

كما بينت نتائج التحليل الاحصائي انخفاض قيم كل من الكاروتينويدات المنتجة والكتلة الحيوية وكفاءة الانتاج مع درجة الحرارة 40 °م إذ وصلت الى القيم (139.20 مايكروغرام/غم ، 1.83 غم/لتر و 7.08 مايكروغرام/غم) على التوالي ، وربما يعزى السبب الى التأثير السلبي لدرجة الحرارة العالية على الانظمة الانزيمية الخاصة بالنمو والانتاج ومدى توفر الاوكسجين المذاب في وسط التخمر حيث أن ذائبية الاوكسجين تقل مع ارتفاع درجات الحرارة.

**تأثير معدل التهوية**

يبين الجدول 7 أن افضل انتاج للكاروتينويدات والكتلة الحيوية وكفاءة الانتاج كان مع استخدام 250 دورة/دقيقة إذ بلغت (2116.93 مايكروغرام/لتر ، 8.82 غم/لتر و 86.69 مايكروغرام/غم) على التوالي. في حين ادى استخدام 50 دورة/دقيقة الى انخفاض لجميع القيم اعلاة اذ وصلت الى (1027.80 مايكروغرام/لتر ، 5.80 غم/لتر و 45.65 مايكروغرام/غم) وقد يعود سبب ذلك الانخفاض الى شحة الاوكسجين الذائب في وسط التخمر ، حيث ان لسرعة الدوران اهمية بالغة في خلط مكونات الوسط وتوفير المغذيات والاوكسجين للخلايا النامية لتتمكن من اداء فعالياتها الايضية ونشاطها الحيوي على اكمل وجه. ويبدو من خلال هذه الدراسة انه بزيادة معدل التهوية تزداد كمية الكاروتينويدات المنتجة من الخميرة. اتفقت نتيجة هذه الدراسة مع ما توصل اليه Tinoi وآخرون (2004) عند تنمية خميرة *R. glutinis* على مخلفات طحين اللوبياء المتحلل كمصدر للنتروجين ومستخلص البطاطا الحلوة كمصدر للكربون حيث وجدوا ان سرعة الحاضنة الهزازة (250 دورة/دقيقة) كانت افضل سرعة لانتاج اكبر كمية من الكاروتينويدات والكتلة الحيوية.

**جدول 7 : تأثير سرع الخلط المختلفة (التهوية) في إنتاج الكاروتينويدات باستعمال السكروز كمصدر كربوني وكبريتات الامونيوم كمصدر نتروجيني**

| سرعة الخلط دورة / دقيقة | ألكتلة الحيوية غم/ لتر | الكاروتينويدات مايكرو غرام /لتر | السكر المستهلك غم/لتر | الكاروتينويدات/السكر المستهلك مايكروغرام/غم | الأس الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|---|
| **50** | 5.80<br>e | 1027.80<br>e | 22.51<br>d | 45.65<br>e | 2.43<br>a |
| **100** | 7.51<br>d | 1668.44<br>d | 23.33<br>c | 71.50<br>d | 2.39<br>b |
| **150** | 8.11<br>c | 1760.90<br>c | 23.99<br>b | 73.39<br>c | 2.34<br>c |
| **200** | 8.32<br>b | 1873.46<br>b | 24.21<br>ab | 77.38<br>b | 2.31<br>c |
| **250** | 8.82<br>a | 2116.93<br>a | 24.41<br>a | 86.69<br>a | 2.26<br>d |

**e-a: الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تشير الى عدم وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05.**

**تأثير فترة التحضين:**

يوضح الجدول 8 تأثير فترة التحضين في إنتاج الكاروتينويدات والكتلة الحيوية ، حيث نلاحظ الزيادة التدريجية للكاروتينويدات الكلية والكتلة الحيوية ونسبة الكاروتين الى السكر المستهلك مع ازدياد مدة التحضين لحين الوصول الى 120 ساعة اذ بلغت القيم اقصى ما يمكن وكانت (2260.30 مايكروغرام/لتر ، 9.93 غم/لتر و 92.18 مايكروغرام/غم) على

الترتيب. وتوافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه العديد من الباحثين ، فقد أشار (Frengova وآخرون ، 1997؛ Buzzini و Martini ، 2000) بأن انتاج الكاروتينويدات قد بدأبعد اليوم الاول من التحضين أي بعد نهاية الطور اللوغارتمي للخمائر ، من ثم ازداد على نحو سريع حتى نهاية اليوم الثالث أي خلال طور الثبات، وتستمر الزيادة لتصل اقصاها عند اليوم الخامس خلال مرحلة موت الخمائر ، ثم انخفضت بشكل سريع في اليوم السادس. اوضح El-Banna وآخرون (2012) بأن معدل الخلايا القابلة للحياة يصل حده الاعلى خلال اليوم الاول من التحضين وبعدها يحصل نوع من الاستقرارية لأعداد الخلايا حتى اليوم الثالث ، ثم تنخفض بعدها الاعداد لتصل حدها الادنى عند نهاية وقت التحضين. كما اشاروا الى حصول انخفاض في النتروجين خلال اليومين الاوليين ثم تحصل حالة الاستقرارية النسبية وهذا يمكن أن يكون ناتجا عن نمو الخميرة وخصوصاً اليوم الاول لإحتياجها لمركبات النتروجين البسيطة. وأكدت النتائج التي توصلوا اليها أن السكروز يختفي في الجزء العلوي من الوسط الزرعي بنهاية اليوم الاول وهذا ناتج عن تحول السكروز بواسطة انفرتيز الخميرة. كما أن معدل استخدام الكربوهيدرات من قبل خميرة *R. glutinis* كانت بحدها الاعلى خلال 24 ساعة الاولى وهذا يدعم النتائج التي توصلت اليها الدراسة الحالية.

**جدول 8: تأثير فترة التحضين في إنتاج الكاروتينويدات باستعمال السكروز كمصدر كربوني وكبريتات الامونيوم كمصدر نتروجيني**

| فترة التحضين / ساعة | ألكتلة الحيوية غم/ لتر | الكاروتينويدات مايكرو غرام /لتر | السكر المستهلك غم/لتر | الكاروتينويدات/السكر المستهلك مايكروغرام/غم | الأس الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|---|
| **24** | 3.47<br>f | 353.73<br>f | 21.40<br>f | 16.52<br>f | 3.30<br>a |
| **48** | 5.49<br>e | 865.41<br>e | 23.51<br>e | 36.80<br>e | 2.38<br>b |
| **72** | 6.74<br>d | 1469.37<br>d | 23.80<br>d | 61.72<br>d | 2.33<br>b |
| **96** | 8.82<br>b | 2116.93<br>b | 24.41<br>c | 86.69<br>b | 2.26<br>c |
| **120** | 9.93<br>a | 2260.30<br>a | 24.52<br>b | 92.18<br>a | 2.21<br>c |
| **144** | 7.90<br>c | 1952.71<br>c | 24.66<br>a | 79.18<br>c | 2.20<br>c |

**f-a: الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تشير الى عدم وجود إختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05.**

## المصادر


1. Ahmed, G. F. (2004). Production of carotenoid pigments by *Rhodotorula* yeast under different growth conditions. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Ain Shams University.
2. Aksu, Z. and Tugba Eren, A. T. (2007). Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis.* Biochemical engineering journal, 35(2): 107-113.
3. Ali, D. F. (2013). Studies on carotenoids production from some yeasts. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Mansoura University.
4. Bhosale, P. (2001). Studies on yeast *Rhodotorula*, its carotenoids and their applications, PhD. thesis, University of Pune, 66-80.
5. Bhosale, P. and Gadre, R. V. (2001c). Production of *β*-carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 55(4): 423- 427.
6. Buzzini, P. and Martini, A. (2000). Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin.Bioresour. Technol., 71(1):41–44.
7. Catalina, V. and Dima, R. (2012). The effect of nitrogen source on carotenoids production by *Rhodotorula sp.* Romanian Biotechnological Letters, 17(5):7570-7576.
8. Choudhari, S. and Singhal, R. (2008). Media optimization for the production of β-carotene by *Blakeslea trispora*: A statistical approach, Bioresource Technol., 99: 722–730.
9. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry, 28(3): 350-356.
10. Duncan, D. B. (1955). Multiple range and F. test, Biometric, 11: 42.
11. El-Banna, A. A.; Abd El-Razek, Amal M. and El-Mahdy, A. R. (2012). Isolation, Identification and Screening of Carotenoid-Producing Strains of *Rhodotorula glutinis* Food

and Nutrition Sciences, 3: 627-633
12. El- Hawary, F. T. and Mehanna, A. S. (1991). Production of single cell protein from yeast grown in whey. Acta Alimentaria, 20:205-213.
13. Ferrao, M. and Garg, S. (2011). Studies on effect of media components on growth and β-carotene production by *Rhodotorula graminis* RC04. J. of Cell and Tissue Res., 11(1): 2551-2556.
14. Frengova, G. I.; Simova, E. D.; and Beshkova, D. M. (1997). Caroteno-protein and exo poly saccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus Helveticus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 18(4): 272-277.
15. Frengova, G. I.; Emilina, S.; Kontantza, P.; Dora, B. and Drinka, G. (1994). Formation of carotenoids by *R. glutinis* in whey ultra-filtrate. Biotechnol. Bioeng., 44: 888-894.
16. Frengova, G. I. and Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. Journal of industrial microbiology and biotechnology, 36(2): 163-180.
17. Johnson, E. A. and Schroeder, W. A. (1996). Microbial carotenoids. Advances in biochemical engineering/biotechnology, 53: 119-178.
18. Kreger-Van Rij. (1984). The yeasts a taxonomic study. 3rd ed.; pp. 585. Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam.
19. Latha, B. V.; Jeevaratnam, K.; Murali, H. S. and Manja, K. S. (2004). Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. Ind. J. of Biotechnol., vol. 4: 353 – 357.
20. Maldonade, I. R.; Rodriguez-Amaya, D. B. and Scamparini, A. R. P. (2008). Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem, Food Chem., 107: 145–150.
21. Park, P. K.; Cho, D. H.; Kim, E. Y. and Chu, K. H. (2005). Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(4): 429-434.
22. Saenge, C.; Cheirsilp, B.; Suksaroge, T. T. and Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochemistry, 46(1): 210-218.
23. SAS (2001). SAS Users-Guide. SAS Institute Inc. Cary NC. USA
24. Selmer-Olsen, E. and Sorthaug, T. (1998). Comparative studies of the growth of lactobacillus plantarum in whey supplemented with autolysate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract. Milchwissen.; 53 (7): 367-370.
25. Tinoi, J.; Rakariyatham, N. and Deming, R. L. (2004). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. Process Biochemistry, 40(7): 2551-2557.
26. Vachali, P.; Bhosale, P. and Bernstein, P. S. (2012). Microbial carotenoids. In Microbial Carotenoids from Fungi (pp. 41-59). Humana Press.