تولید بتاکاروتن از گونه های مخمر Rhodotorula

امیررضا فریدمعیر
کارشناس

مهین آذر
دانشیار

انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

رنگدانه های کاروتنوئیدی از جمله مهمترین و فراوانترین رنگدانه های موجود در طبیعت می باشند. اما در طبیعت تنها گیاهان و میکروارگانیسم ها توانایی تولید این ترکیبات را دارند . این ترکیبات به دلیل خواص رنگدهی مناسب و پایداری نسبی آنها و همچنین به علت برخورداری از خواص آنتی اکسیدانی کاربردهای متعددی در صنایع مختلف از جمله صنعت غذا پیدا نموده اند. این ترکیبات به عنوان مهمترین پیش سازهای ویتامین A در بدن محسوب می شوند که حضور آنها را در مواد غذایی مورد مصرف ، ضروری به نظر می رساند. یکی از مهمترین میکروارگانیزم هایی که تولید کننده ترکیبات کاروتنوئیدی بخصوص بتاکاروتن می باشد، مخمر Rhodotorula است. اکثر گونه های این مخمر توانایی تولید ترکیبات کاروتنوئیدی را در حد قابل ملاحظه ای دارند. این مخمر پراکندگی فراوانی در طبیعت داشته و عامل فساد مواد غذایی می باشد. به منظور جداسازی مخمر Rhodotorula مواد غذایی و محیط های مختلفی مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت این مخمر از لیموترش فاسد شده جدا گردید که بعد از انجام آزمایشات شناسایی به عنوان Rhodotorula muciliginosa (rubra) شناسایی شد. در ادامه توانایی تولید کاروتنوئیدها و بخصوص بتاکاروتن در این گونه بومی با سایر گونه های بدست آمده از مراکز کلکسیون کشورهای امریکا و چین مقایسه گردید و مشخص گردید گونه Rh.glutinis (C 499) با توانایی تولید ۴۴۷ میکروگرم بر گرم وزن خشك توده سلولی بتاکاروتن در جایگاه اول و گونه بومی Rh. muciliginosa با ۲۸۵ میکروگرم بر وزن خشك توده سلولی در مقام بعدی از لحاظ تولید بتاکاروتن قرار دارند.

Beta-carotene production from the Rhodotorula

A. R FaridMoayr
B. SC

M. Azar
Associatd Professor

Medial School Shahid Behesti University

Abstract

Carotenoids are the most important and the largest pigments in nature, but only the plants and microorganisms are able to produce them in the nature. These components, due to having suitable coloring property, relative stability and also antioxidant activity, have different uses in Food Industries. These components are the most important precursors of vitamin A in the body, which their presence in the consuming foods are necessary. One of the most important microorganisms which can produce carotenoids especially beta-carotene is the yeast named Rhodotorula. Most species of this yeast have the ability of producing carotenoids pigments in the considerable amounts. For isolaion of Rhodotorula, a number of foods and media were studied. At the end, it was isolated from decayed lime, then after microbial evaluations, it was identified as Rhodotorula muciligenous (rubra). In continuing, the amount of carotenoids especially beta-carotene which were obtained from the indigenous species were compared with other species purchased from collection centers in U.S. and China. The results indicated that produced beta-carotene on dry weight biomass in the yeasts, Rh. glutinis (C499) and Rh. muciliginous (indigenous spp.) were 447 and 285 micg/g respectively.

مقدمه

برآورد شده است که میزان تولید سالیانه کاروتنوئیدها در طبیعت بیش از ۱۰۰ میلیون تن می باشد. برخی از اعضاء خانواده کاروتنوئیدها از قدیمی ترین انواع رنگدانه های غذایی شناخته شده می باشند. مهمترین عضو این گروه از رنگدانه ها، β - Carotene می باشد. تاکنون بیش از ۵۶۳ نوع از انواع کاروتنوئیدها شناخته شده است. تنها منابع طبیعی کاروتنوئیدها گیاهان و میکروارگانیسم ها می باشند. ولی این ترکیبات به صورت کامل یا تغییر یافته در بافت های انواع جانوران نیز یافت می شوند. کاروتنوئیدها ترکیبات «پلی انی» هستند که از به هم پیوستن هشت واحد «ایزوپرن» تشکیل می شوند. این ترکیبات به دلیل ویژگی های ساختمان هایشان جزو چربی ها محسوب می شوند. بتاکاروتن در شرایط معمولی (درجه حرارت اتاق) به صورت جامد بوده و به صور مختلفی کریستاله می شود. این ترکیب در حلال مناسب رنگ نارنجی تولید می نماید. فرم غالب ایزومر بتاکاروتن در طبیعت به صورت تمام ترانس می باشد، ولی ایزومرهای سیس و Polycis نیز از منابع طبیعی جدا شده اند (۴ و ۱۰).

امروزه اهمیت بتاکاروتن محدود به خاصیت رنگ زائی آن در محصولات غذایی نمی باشد. هم اکنون این ترکیبات در تهیه داروها، لوازم آرایشی و خوراکی کاربردهای فراوانی پیدا نموده اند. باتوجه به تحقیقات بعمل آمده در سال ۱۳۶۴ مشخص شده که در صنایع ایران (بخصوص صنایع غذایی) مصرف انواع رنگدانه های کاروتنوئیدی بالغ بر ۱۸۰۰-۲۰۰۰ کیلوگرم در سال می باشد که باتوجه به توسعه چشمگیر صنایع غذایی در طی ۱۵ سال اخیر بدون شک، مصرف این ترکیبات و همچنین تقاضا برای آنها افزایش یافته است (۱ و ۱۲).

یکی از مهمترین ویژگی های بتاکاروتن تولید ویتامین A در بدن انسان و برخی دیگر از جانوران می باشد. هر مولکول از این ترکیب توانایی تولید دو مولکول ویتامین A را در بدن انسان دارد و به همین لحاظ این ترکیب مهمترین پیش ساز ویتامین A شناخته شده است. از دیگر خصوصیات حائز اهمیت بتاکاروتن که در رابطه با ویژگی آنتی اکسیدانی این ترکیب مطرح است پیش گیری از وقوع بسیاری از بیماری ها نظیر آب مروارید، تصلب شرایین و از همه مهمتر برخی از انواع سرطان ها می باشد (۶).

از بین منابع طبیعی همانگونه که ذکر شد میکروارگانیسم ها نیز توانایی تولید انواع کاروتنوئیدها را دارا می باشند، از جمله میکروارگانیسم هایی که قابلیت تولید این ترکیبات را دارند می توان به انواع مخمرها و کپک ها اشاره کرد. از بین مخمرها، مخمر Rhodotorula که عامل فساد بسیاری از مواد غذایی می باشند قابلیت تولید انواع کاروتنوئیدها را دارند پراکندگی این مخمر بسیار گسترده بوده و می توان این مخمر را از آب، خاک و انواع محصولات غذایی فاسد شده و نشده و همچنین انواع محصولات کشاورزی جدا نمود. این مخمر جزو مخمرهای بی شکل بوده و در خانواده Cryptococaceae قرار می گیرد (۵، ۱۱ و ۱۹).

تولید انواع کاروتنوئیدها از گونه های مخمر Rhodotorula به طریق تکنیک های غوطه وری صورت می گیرد. این ترکیبات به صورت داخل سلولی سنتز شده و به همین منظوربرای جداسازی و استخراج این ترکیب لازم می باشد که دیواره سلولی شکسته ودر نهایت بعد از عملیات خالص سازی مقدماتی با استفاده از تکنیک های کروماتوگرافی انواع ترکیبات کاروتنوئیدی خالص شوند (۱۳ و ۱۷).

هدف از این تحقیق جداسازی گونه بومی مخمر Rhodotorula و بررسی میزان تولید بتاکاروتن در گونه بومی این مخمر و مقایسه میزان تولید این ماده یا تولید آن در سایر گونه های این مخمر (گونه های بدست آمده از مرکز کلکسیون چین و امریکا) می باشد.

مواد و روش ها

روش جداسازی مخمر Rhodotorula

باتوجه به پراکندگی گسترده این مخمر محیط های مختلفی به منظور جداسازی این مخمر مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله از محیط کشت انتخابی استفاده شد که با افزودن آنتی بیوتیک جنتامایسین با غلظت ppm۸۰ به محیط کشت Sabaru Dextrose Agar (SDA) تهیه گردید. در ادامه ازسطوح مختلف جامد و یا بخشی از مایع (۱ میلی لیتر) نمونه برداری شده و به محیط کشت انتخابی منتقل شد. کشت ها بعد از تلقیح به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در انکوباتوری با دمای ۲۴ درجه سانتیگراد قرار گرفته و بعد از پایان این مدت کشت ها از لحاظ رشد مخمرها مورد بررسی قرار گرفتند. اولین شاخص برای

جداسازی کلنی Rhodotorula رنگ صورتی متمایل به نارنجی کلنی ها می باشد که بعد از مشاهده این کلنی ها را در شرایط فوق مجدداً کشت داده تا از عدم آلودگی کلنی ها با سایر مخمرها اطمینان حاصل شود (۱۸).

شناسایی مخمر

شناسایی مخمرها براساس خصوصیت مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی آنها صورت پذیرفت. بدین ترتیب که ابتداً مخمر از لحاظ توانایی تشکیل رنگدانه ها در کلنی و سپس مشاهدات میکروسکوپی شناسایی شده و به دنبال آن تست های فیزیولوژیکی که شامل توانایی مصرف نیترات انواع قندها نظیر مالتوز، رافینوز، گالاکتوز (بررسی تخمیر این قند) و مصرف نیترات، تغییر گلوکزو واکنش اوره می باشد، بررسی گردید. این روش مطابق با روش پیشنهادی Beauchat و Deak طراحی گردیده بود (۳، ۵ و ۸).

آماده سازی محیط کشت

در این آزمایش از محیط کشت پیشنهادی Martelli و همکارانش استفاده شد. این محیط کشت محیط کشت اختصاصی تولید کاروتنوئیدها در مخمر Rhodotorula می باشد و از ترکیبات زیر تشکیل شده است:
ساکارز ۲٪ (W/V) 5/5, (NH4)2SO4، ۳/۵ KH2PO4، ۸/۳ Na2HPO4، ۰/۵ $7H_2O$ Mg SO4، ۰/۱ MnSO4 و عصاره مخمر ۱ گرم بر لیتر. بعد از آماده سازی محیط کشت فوق pH آن قبل از استریل کردن برابر ۵/۸ تنظیم گردیده و سپس مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰ درجه سانتیگراد عمل استریلیزاسیون صورت پذیرفت. عمل تلقیح محیط کشت های آماده شده با استفاده از سوسپانسیون مکیروبی که در حقیقت مخمرهای رشد یافته در محیط کشت SDB بودند (کشت های جوان) و به نسبت ۵٪ حجمی - حجمی صورت گرفت. بعد از عمل تلقیح فلاسک های تلقیح شده به مدت ۶۶ ساعت در شیکرانکوباتورداری که سرعت چرخش آن در حد ۱۹۰rpm تنظیم گردیده بود و دمای آن نیز معادل ۲۴ درجه سانتیگراد بود قرار گرفته و بعد از اتمام زمان فوق الذکر کشت ها به منظور جداسازی توده سلولی مورد استفاده قرار گرفتند (۷، ۱۴ و ۱۶).

جداسازی توده سلولی (Biomass)

به منظور جداسازی مخمرها از محیط کشت، ابتدا کشت های مورد نظر به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با استفاده از سا نتریفوژ یخچال دار سانتریفوژ شده و در ادامه بعد از جداسازی سوپرنا تان سلول ها با آب مقطر شستشو داده شده و با آب مقطر کاملاً مخلوط شده و دوباره مطابق شرایط فوق الذکر سانتریفوژ گردیدند. به منظور تعیین وزن خشک توده سلولی، بیوماس سانتریفوژ شده را در دستگاه خشک کن انجمادی (Freeze dryer) کاملاً خشک نموده و وزن خشک توده سلولی ثبت گردید.

استخراج کاروتنوئیدها

در اولین مرحله باید با استفاده از روشی خاص حداکثر دیواره توده سلول ها شکسته شود، از این رو در اینجا ازدستگاه Ball Mill استفاده گردید. بدین منظور ابتدا سوسپانسیون سلولی از اختلاط ۱۰ میلی لیتر استن سرد خالص با ۵ گرم توده سلولی مرطوب یا ۱ گرم توده سلولی خشک تهیه گردیده و به دنبال آن این سوسپانسیون وارد محفظه دستگاه شده و با سرعت چرخش ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه عملیات شکسته شدن دیواره سلولی تکمیل گردید. سپس سوسپانسیون را از کاغذ واتمن شماره ۴۲ عبور داده که در حقیقت در این مرحله مخلوط استخراج شده از سلول های شکسته کاملاً تفکیک گردیدند. معمولاً عمل شستن توده سلولی شکسته شده ۲ تا ۳ بار دیگر بر روی همان کاغذ صافی به منظور تکمیل عمل استخراج تکرار می گردد تا رنگ توده سلولی موجود بر روی سطح کاغذ صافی کاملاً سفید گردد. به منظور عملیات طیف سنجی مواد استخراج شده، باید آنها را از فاز استن به فاز هگزان یا پترولیوم اترمنتقل نمود. بدین منظور بعد از کامل شدن عمل استخراج اولیه با استن، حجم های بدست آمده با مقادیر کاملاً مشخص از هگزان یا پترولیوم اتر (Chromatography Grade) در یک قیف جداکننده کاملاً مخلوط گردیدند، به منظور جداسازی هر چه بهتر این دو فاز کمی آب مقطر به این مخلوط اضافه گردیده و بعد از ۲ ساعت در اتاق سردی با دمایی در حد ۸ درجه سانتیگراد عملیات تفکیک فازها کاملاً صورت پذیرفته و فاز هگزان جدا گردید. باتوجه به تحقیقات به عمل آمده توسط Simpson و همکارانش مشخص گردیده که غیر از ترکیبات کاروتنوئیدی و بخصوص بتاکاروتن ترکیبات دیگری که عمدتاً شامل انواع چربیها و

زانتوفیل ها می باشند، نیز در این مخمر سنتز شده که برای جداسازی آنها باید روش های مختلفی را از جمله صابونی کردن استفاده نمود. در این قسمت به منظور عملیات صابونی کردن واکنش ترکیبات قابل صابون شدن (Saponifiable) با پتاس محلول در متانول (Methanolic Potash) با نسبت ۵٪ وزنی ـ حجمی استفاده شد. در این قسمت باید توجه داشت که به دلیل حساسیت کاروتنوئیدها به واکنش های اکسیداسیون نوری (Photoxidation) کلیه مراحل باید تحت شرایط نور تقلیل یافته محیطی انجام شود و در ضمن در این مرحله در صورت وجود مقداری استن در محلول محصولات تراکم آلالی در حین عملیات صابونی کردن ایجاد می شود. بعد از پایان یافتن عملیات صابونی کردن مخلوط چندین بار با آب مقطر شسته می شود تا ترکیبات صابونی شده کاملاً خارج گردند. برای تعیین پایان مرحله شستشو می توان از معرف فنل فتالین استفاده نمود. جداسازی استرول ها و سایر ناخالصی های قابل ترکیب، با اعمال دمای پایین (زیر صفر در جه سانتیگراد) صورت می پذیرد (۱۴ ، ۱۵ و ۱۷).

تعیین میزان کاروتنوئیدها

برای تعیین میزان کاروتنوئیدهای تولید شده، محلول کاروتنوئیدهای موجود در فاز غیر قطبی (هگزان) راقبل از مرحله صابونی کردن دقیقاً از نظر حجمی اندازه گیری نموده و مقدار کاروتنوئید کل رابراساس میزان جذب محلول در ۴۵۰ نانومتر و ضریب خاموشی (Extinction coefficent) بتاکاروتن که ۲۵۰۰ نانومتر می باشد با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{۱۰۶× ضریب رقیق سازی × حجم کل × جذب}}{\text{گرم نمونه × ۱۰۰ × (Ec)}} = \frac{\text{میکروگرم کاروتنوئید}}{\text{گرم نمونه}}$$

خالص سازی بتاکاروتن با روش کروماتوگرافی (Liquid-Solid Column Chromatography) ستونی مایع ـ جامد می باشد که این روش مطابق با روش استاندارد AOAC است. فاز جامد مورد استفاده اکسید منیزیم یا Sea Sorb 43 که به نسبت یک به یک با خاک دیاتومه مخلوط گردید و در ستونی شیشه ای با قطر ۲ سانتیمتر تا ارتفاع ۱۵ سانتیمتر کاملاً فشرده گردید. حلال های مورد استفاده در این قسمت که فاز متحرک را تشکیل می دهند، شامل دو گروه می باشند که کلیه حلال های آلی مورد استفاده با درجه خلوص کروماتوگرافی می باشند (CG). گروه اول شامل ۹۱ سی سی هگزان و ۹ سی سی استن می باشد که این سیستم حلال در حقیقت برای عبور اولیه مخلوط کاروتنوئیدها بر روی روی ستون استفاده می شود و گروه دوم حلال شامل ۹۰ میلی لیتر هگزان و ۱۰ میلی لیتر استن است که برای جداسازی بتاکاروتن از روی ستون کروماتوگرافی استفاده می شود. در طول عملیات کروماتوگرافی سطح فاز متحرک از سطح ستون به طور ثابت ۲ سانتیمتر بالاتر نگه داشته می شود. بعد از عبور اولیه مخلوط کاروتنوئیدها از ستون فراکشن های مختلفی بر روی ستون تشکیل می شوند. فراکشن بتاکاروتن با عبور دادن گروه دوم حلال ها از روی ستون جدا می شوند. برای اجتناب از اختلاط فراکشن های مختلفی که از ستون جدا می شوند، باید بعد از وارد شدن هر فراکنش به ارلن خلاء آن را جدا نموده و ارلن دیگری جایگزین نمود. یکی از فاکتورهای اندازه گیری شده عدد R یا نسبت نگهداری یک فراکشن یا مهاجرت آن از فاز ثابت می باشد که در ارتباط با فاز متحرک می باشد. عددR براساس رابطه زیر محاسبه می شود.

$$R = \frac{\text{سرعت حرکت ناحیه (فراشکن) جدا شده بر روی ستون}}{\text{سرعت فاز متحرک}}$$

در اینجا باید توجه داشت که R ثابت کروماتوگرافی نبوده و با شرایط آزمایشی بکار رفته در حین انجام عملیات تغییر می کند. بنابر این در این تحقیق عدد R بدست آمده از ترکیب مورد نظر با عدد R همان ترکیب به صورت کاملاً خالص (استاندارد) که در همان شرایط آزمایشی محاسبه گردیده است، مقایسه شد (۲ و ۱۷).

تعیین ویژگی های جذب نوری در فراکنش های جدا شده

باتوجه به اینکه فراکشن های جدا شده در حلال های با قطبیت های متغیر وجود دارند. باید این حلال ها از هم تفکیک شوند ،مانند قسمت های قبل برای جداسازی حلال های با قطبیت بیشتر از حلال های با قطبیت پایین –تر بهتر است با افزایش اختلاف قطبیت حلال ها در یک دکانتور آنها را کاملاً از یک دیگر تفکیک نموده و بعداز جداسازی حلال ها حجم دقیق هگزان یا پترولیوم اتر که حاوی کاروتنوئیدها است تعیین شده و طیف جذبی هر فراکشن در اسپکتروفتومتر رسم گردد (۱۰).

مقایسه میزان تولید بتاکاروتن و بیوماس در بین گونه های مختلف

در ادامه تحقیق میزان تولید بتاکاروتن و کاروتنوئید تشکیل شده در بین گونه های مختلف مخمر Rhodotorula از کلکسیون کشورهای امریکا (American Type Culture Collection ATCC) و چین مقایسه گردید. محیط کشت مورد استفاده مطابق با محیط کشت اختصاصی ذکر شده در بخش های قبلی بوده و شرایط کشت در شیکر نیز دقیقاً مطابق با شرایط اعمال شده برای گونه بومی مخمر بود. مشخصات گونه های مورد بررسی در جدول ۱ درج گردیده است.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

برای بررسی آماری داده های بدست آمده از مقایسه گونه های مختلف و از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید. برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطوح اطمینان مختلف آماری از آزمون توکی ـ کرامر استفاده شد. کلیه تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار Instat انجام پذیرفت.

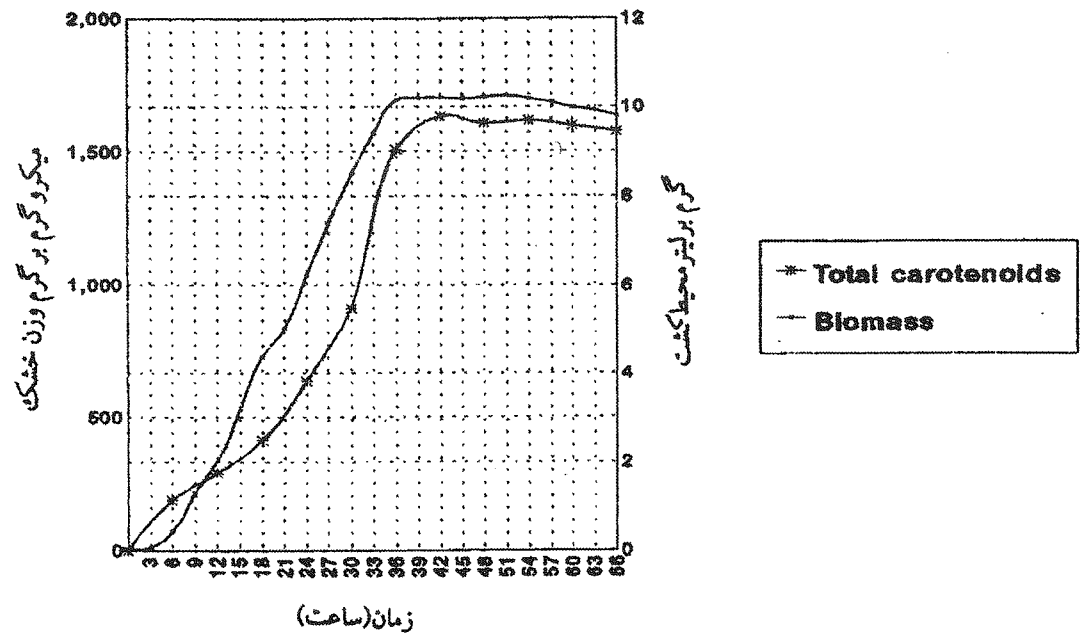
نتایج

جداسازی و شناسایی مخمر

از بین مواد و محیط های مختلف مورد بررسی برای جداسازی مخمر Rhodotorula، موفق به جداسازی این مخمر از لیمو ترشی که در دمای یخچال فاسد شده بود گردیدیم. به منظور شناسایی گونه، بعد از بررسی های دقیق تر خصوصیات مرفولوژیکی مطابق با قسمت قبل

جدول (۱) مشخصات گونه های مختلف Rhodotorula

گونه	کشورمنشاء	کد	تاریخ لیوفیلیزه کردن مخمر
minuta	آمریکا	ATCC.10658	1993
glutinis	آمریکا	ATCC.42224	1978
rubra	آمریکا	ATCC.2303	1989
glutinis	چین	C.499	1977
rubra	چین	C.103	1977



شکل (۱) منحنی تولید کاروتنوئید کل وبیوماس در طی ۶۶ ساعت در شیکر.

این مخمر تحت عنوان Rhodotorula muciliginosa شناسایی گردید که البته نام دیگر این گونه rubra نیز می باشد.

تولید کاروتنوئیدها و بیوماس در شیکر

شکل ۱ نشان دهنده میزان تولید سلولی و کاروتنوئید کل تشکیل دهنده در طی ۶۶ ساعت در شیکر می باشد.

طیف جذبی کاروتنوئیدهای استخراج شده

طیف جذبی کاروتنوئیدهای استخراج شده از گونه های بومی با استفاده از اسپکتروفتومتر در ناحیه طول موج ۳۴۰ نانومتر تا ۵۴۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت و باتوجه به نتایج به دست آمده، منحنی مطابق با شکل ۲ ایجاد گردیده است.

کروماتوگرافی

در طی عملیات صابونی کردن علاوه بر چربی های قابل صابونی شدن ترکیبی از خانواده زانتوفیل ها به نام Torularhodine که در حقیقت یک زانتوفیل اسیدی است، نیز در طی این عملیات جدا می گردد. در عملیات کروماتوگرافی انجام شده دو فراکشن مختلف جدا گردید فراکشن ۱ و فراکشن ۲ که عدد R×100] این دو فراکشن به ترتیب ۱۰۰ و ۸۴ بود. فراکشن ۱ به رنگ زرد بوده و در حقیقت بعد از مقایسه عدد R و خصوصیات جذب نوری آن با بتاکاروتن استاندارد به عنوان بتاکاروتن شناسایی گردید و فراکشن دوم قرمز متمایل به بنفش بود که با توجه به طول موج ماکزیمم جذب و عدد R آن و مقایسه با نتایج Simpson و همکارانش به عنوان Torulene شناسایی گردید.

تعیین ویژگی های جذب نوری فراکنش های ۱ و ۲

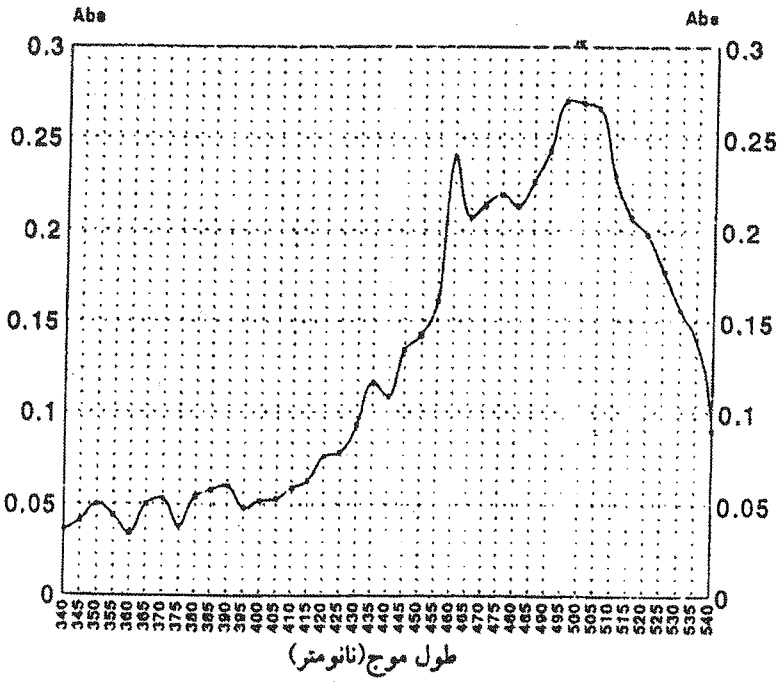
خصوصیات جذب نوری فراکنش های ۱ و ۲ که با استفاده از اسپکتروفتومتر صورت پذیرفته است ،در شکل ۳ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از مقایسه گونه های مختلف Rhodotorula

نتایج به دست آمده از کشت گونه های مختلف مخمر در شیکر و همچنین نتایج حاصل از استخراج کاروتنوئیدها از آن در جدول ۲ درج شده است.

نتایج بررسی آماری بین گونه های مختلف

به منظور بررسی آماری نتایج تولید بتاکاروتن در بین گونه های مختلف آزمون بارتلت انجام شده که به



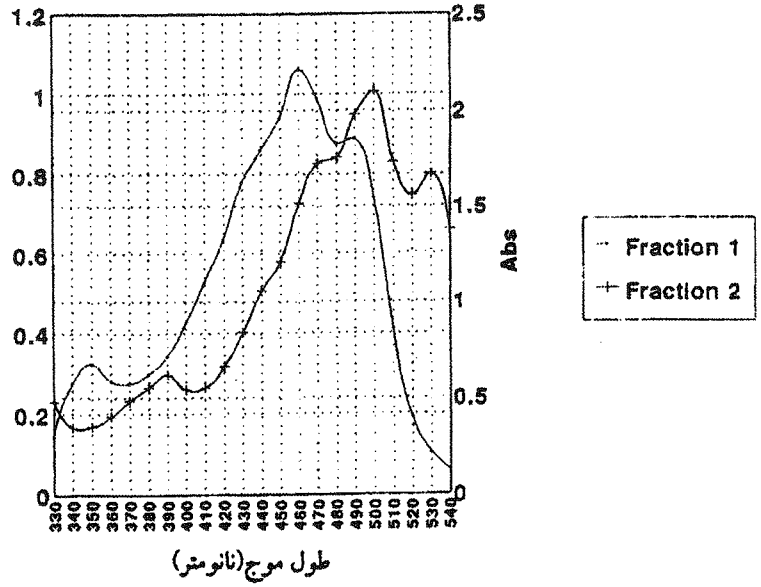
شکل (۲) طیف جذبی کاروتنوئیدهای استخراج شده از گونه بومی مخمر در حلال پترولیوم اتر.

منظور بررسی یکنواختی واریانس ها می باشد، نشان داد که مقدار P این آزمون برابر با ۰/۰۰۰۶ است که با توجه به اینکه کمتر از ۰/۰۰۵ می باشد، بنابر این به دلیل وجود تفاوت معنی دار بین انحراف استانداردها نمی توان از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده نمود و بایداز آزمون های غیرپارامتری استفاده نمود که در اینجا از آزمون آنالیز واریانس غیر پارامتری Kruska-wallis استفاده گردید، که با این آزمون Kw= ۵۰/۵۶۲ محاسبه گردید که با توجه به $P < 0.01$ کاملاً معنی دار می باشد و به همین دلیل به جای مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون توکی ـ کرامر، میانگین بتاکاروتن تولید شده در بین گونه های مختلف با استفاده از آزمون Dunn انجام شد و مشخص گردید که میانگین بتاکاروتن تولید شده در مخمر Rh. glutinis (C.499) از تمامی گونه ها بیشتر بوده و در ضمن تفاوت معنی داری بین میانگین بتاکاروتن تولید شده در این گونه با سایر گونه ها به جز گونه بومی Rh. muciliginosa (rubra) مشاهده شده است. میزان تولید بتاکاروتن در مخمر Rh.glutinis (C.499) برابر با (mg/g cell dry weight) ۴۴۷/۱۷ و در گونه بومی مخمر Rh. muciliginiosa (rubra) برابر با (mg/g cell dry weight) ۲۸۵ می باشد (جدول ۲).

با انجام آنالیز واریانس، F محاسبه شده در ارتباط با بیوماس تشکیل شده برابر ۴۰۶/۷ است که باتوجه به $P < 0.001$ کاملاً معنی دار بوده و نشان دهنده وجود اختلاف در بین بیوماس تشکیل شده در گونه های مختلف می باشد. با انجام آزمون توکی کرامر بین میانگین های وزنی توده سلولی تشکیل شده مشخص گردید، در بین تمامی گونه ها به جز Rh.minuta (ATCC) و Rh. glutinis (ATCC) تفاوت معنی داری مشاهده می گردد. علاوه بر این بیوماس تشکیل شده در گونه بومی مخمر Rh. muciliginosa (rubra) (۱۰/۰۹۴ dry weight/1culture) از سایر گونه ها بیشتر بوده و در ضمن مقایسه میانگین وزنی توده سلولی تشکیل شده در این گونه با سایر گونه ها تفاوت آماری کاملاً معنی داری ($P < 0.001$) را از خود نشان داده است.

بحث

باتوجه به نتایج مختلف بدست آمده از این تحقیق مشخص می گردد سوش های ATCC هم از نظر تولید کاروتنوئیدها و هم از نظر بیوماس تشکیل شده در سطحی پایین تر از سوش بومی ایران و چین قرار می گیرند. ولی به طور کلی در بین سوش های مختلف سوش Rh.glutinis (C.499) از نظر میزان تولید بتاکاروتن به مقدار (mg/g cell dry weight) ۴۴۷ قابل توجه می باشد و این مقدار تولید از مقادیر گزارش شده به وسیله Simpson و همکارانش که میزان تولید را برای Rh. glutinis برابر با (mg/g cell dry weight) ۲۵۷ و همچنین Fregnova و همکارانش که میزان تولید را برای



شکل (۳) منحنی جذب نوری فراکنش های ۱ و ۲ (در پترولیوم اتر).

(جدول (۲) بیوماس، بتاکاروتن و کاروتنوئید کل تشکیل شده در گونه های مختلف Rhodotorula (در ۱۲ تکرار)

تکرار	Rhodotrula های گونه															
	minut(ATCC)			glutinis(ATCC)			rubra(ATCC)			glutinis(China)			rubra(China)			mucilaginosa(1)
	وزن خشک (۱)	بتاکاروتن (۲)	کاروتنوئید کل (۳)	وزن خشک (۱)	بتاکاروتن (۲)	کاروتنوئید کل (۳)	وزن خشک (۱)	بتاکاروتن (۲)	کاروتنوئید کل (۳)	وزن خشک (۱)	بتاکاروتن (۲)	کاروتنوئید کل (۳)	وزن خشک (۱)	بتاکاروتن (۲)	کاروتنوئید کل (۳)	وزن خشک (۱)	بتاکاروتن (۲)	کاروتنوئید کل (۳)
۱	۵/۳۹۸	——	۳۸۰	۵/۸۸۱	۲۳۰	۱۰۱۰	۶/۵۴۲	۹۸	۷۵۰	۶/۸۴۸	۴۶۰	۱۷۰۸	۸/۴۱	۱۹۵	۱۵۰۵	۱۰/۱۴۹	۳۶۰	۱۶۹۶
۲	۵/۵۱	——	۴۵۱	۵/۳۶۹	۲۰۵	۱۱۵۱	۶/۳۶۷	۱۲۴	۸۶۰	۷/۹۳	۴۱۲	۱۶۵۰	۸/۰۲۴	۱۷۸	۱۴۵۰	۹/۸۸۶	۲۹۰	۱۶۸۵
۳	۴/۸۹۸	——	۳۹۵	۵/۳۹۲	۱۹۸	۹۸۵	۶/۵۰۳	۶۷	۶۹۵	۷/۸۴۱	۵۲۱	۱۷۱۰	۸/۲۲۶	۱۹۲	۱۴۹۸	۱۰/۳۵۳	۳۶۵	۱۶۰۵
۴	۴/۸۰۱	——	۲۸۴	۵/۵۷۱	۲۳۱	۱۲۰۱	۵/۶۹۹	۱۰۲	۸۰۴	۷/۰۸۹	۳۹۸	۱۵۹۰	۷/۶	۲۰۶	۱۵۸۴	۱۰/۲۹۲	۲۶۵	۱۵۸۵
۵	۵/۱۲۲	——	۴۱۲	۵/۸۶۳	۲۰۱	۹۹۶	۶/۵۳۲	۱۱۷	۸۲۵	۶/۸۵۱	۴۳۳	۱۶۹۸	۸/۲۱۴	۲۷۴	۱۵۳۳	۱۰/۰۷۳	۴۸۰	۱۵۹۹
۶	۵/۳۸۲	——	۳۶۸	۵/۸۱۶	۱۸۷	۸۵۰	۵/۹۹۳	۸۸	۷۱۳	۷/۲۲۹	۵۶۴	۱۸۱۰	۸/۰۰۵	۱۹۹	۱۵۷۵	۹/۷۳۴	۳۰۲	۱۶۰۱
۷	۵/۵۶۱	——	۴۰۱	۴/۹۹	۲۸۵	۱۲۸۱	۶/۵۸۲	۷۵	۷۳۸	۷/۷۱۱	۴۷۱	۱۶۳۲	۸/۱۶۴	۱۸۲	۱۴۹۸	۱۰/۳۳۸	۳۳۱	۱۶۷۰
۸	۵/۱۱۹	——	۳۷۵	۵/۰۲۵	۲۷۶	۱۱۱۲	۶/۲۹۱	۶۹	۶۵۰	۷/۱۸	۴۲۵	۱۵۹۸	۸/۳۷۴	۱۹۱	۱۴۷۷	۱۰/۰۶۸	۱۹۸	۱۴۹۰
۹	۵/۰۹۸	——	۳۱۸	۵/۱۵۸	۲۵۲	۱۰۲۸	۵/۱۸۸	۹۱	۷۰۱	۷/۰۸۶	۴۸۱	۱۶۷۸	۷/۸۹۹	۱۹۷	۱۴۳۶	۱۰/۲۱۲	۳۱۰	۱۶۶۵
۱۰	۴/۹۸۹	——	۲۹۰	۴/۷۸۷	۲۷۱	۱۰۹۵	۵/۹۱۹	۱۰۹	۷۸۹	۷/۲۹۷	۴۳۳	۱۵۵۶	۷/۹۱۴	۱۷۱	۱۳۹۹	۹/۷۷۲	۲۸۵	۱۶۵۲
۱۱	۴/۸۷۶	——	۳۴۶	۵/۵۸۵	۱۶۵	۷۸۵	۵/۵۲۳	۸۴	۶۶۴	۶/۱۶۶	۴۲۷	۱۶۸۴	۸/۲۹۷	۱۹۰	۱۳۸۰	۱۰/۱۹۷	۲۱۰	۱۶۹۲
۱۲	۵/۰۵۹	——	۲۸۸	۵/۰۵۴	۲۱۳	۹۷۸	۶/۸۸۷	۶۹	۶۲۲	۶/۹۷۲	۳۱۱	۱۵۰۰	۸/۲۶۳	۱۵۶	۱۳۴۴	۹/۸۹۱	۲۹۵	۱۶۷۳
میانگین	۵/۱۲۹	——	۳۷۵/۶۷	۵/۲۷۴	۲۵۲	۱۰۳۹/۳۳	۶/۲۴۸	۹۱/۰۸	۷۳۵/۰۸	۷/۲۶۷	۴۲۷/۱۷	۱۶۴۸/۱۸	۸/۱۳۱	۱۹۲/۲۵	۱۴۸۹/۱	۱۰/۰۹۲	۲۸۵	۱۶۱۷/۹۲

R.h. glutinis برابر با (mg/g cell dry weight) ۲۶۸ گزارش کرده‌اند بسیار بالاتربوده و نسبت به نتایج Martelli و همکارانش (mg/g cell dry weight) ۱۷۰۰ پایین‌تر می‌باشد (در اینجا ذکر این نکته ضروری است که محقق اخیر میزان تولید کاروتنوئید کل را برابر با میزان بتاکاروتن در نظر گرفته و نتایج را بر این اساس گزارش کرده اند) (۹، ۱۵ و ۱۷).

باتوجه به نتایج پیشنهاد می‌گردد باتوجه به توانایی مناسب این گونه مخمرها در تولید انواع کاروتنوئیدها و بخصوص بتاکاروتن و خصوصاً بیوماس غنی از پروتئین این مخمر ها به طور انبوه و با استفاده از صنایعات کشاورزی و صنایع غذایی تولید و به عنوان منبعی مناسب از لحاظ کاروتنوئیدها و همچنین پروتئین‌ها به عنوان مکمل غذایی به خوراک دام و بخصوص طیور اضافه گردیده و یا بعد از عملیات استخراج بر روی آن و خالص سازی به عنوان رنگدانه مورد مصرف قرار گیرد.

در انتها لازم می‌دانیم از تمامی همکاران پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی وصنعتی بخصوص سرکار خانم دکتر نسرین معظمی مدیریت محترم آن بخش به خاطر بذل مساعدت های علمی و فنی در این تحقیق تشکر نمائیم.

مراجع

[۱] آذر، م و همکاران. ۱۳۶۴ . گزارش نهایی طرح جایگزینی رنگ های خوراکی طبیعی به جای رنگ های مصنوعی وارداتی.، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، تهران. صفحات ۱۰-۵۳.

[2] AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 20th Editions, Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., pp. 1048-1049.

[3] Barnett, J. A. et al . 1990 Yeast: Characteristics and Identification, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 37-592.

[4] Bauefeind, J. C. 1975. Carotenoids as Food Colors. Food Technol. 29: 48-49.

[5] Beuchat, L. R. and Nail, B. V. 1985. Evaluation of media for enumerating Yeast and Moulds in Fresh and Forzen Fruit Purees. J . Food Protection. 48: 312-315.

[6] Block, G. and Longseth, L. 1994. Antioxidants Vitamins and Disease Prevention Food Technol. 48: 80-84.

[7] Cruger, W and Cruger, A. 1989. Biotechnology: A textbook of Industrial Microbiology, Sinaver, Associate Co., Munchen. pp. 64-228.

[8] Deak, T and Beuchat, L. R. 1986. Identification of Food Born Yeast. J. Food Protection. 50: 243-264.

[9] Fregnova, G. et al. 1994. Formation of Carotenoids by Rhodotorula glutinis in Whey Ultrafiltrate Biotechnology and Bioengieering. 44: 888-894.

[10] Gross, J. 1991. Pigments in Vegetable: Chlorophylls and Carotenoids, Van Nostrand Reinhold Co., NewYork, pp. 76-254.

[11] Jay, M.J and Margiytic, S. 1981. Incidence of Yeast in fresh ground beef and their ratios of Bacteria. J. Food Sci. 46: 648-649.

[12] La Roche, H. F. 1974. Egg Yolk Pigmentation with Carophyll, 2nd Editions, F. Hoffman-La Roche Co., Basle, pp. 3-31.

[13] Margalith, P. Z. 1992. Pigment Microbiology, Chapman and Hall Co., London, pp. 32-76.

[14] Martelli, H. L. and Dasilva, I. M. 1993. Methods in Enzymology Volume 214, Academic Press, London, pp. 286-390.

[15] Martelli, H. L. et. al. 1990. Production of B-carotene by Rhodotorula Strain grown on sugar cane juice. Biotechnology Letters. 12: 207-208.

[16] Martin, A. M. et al. 1993. Growth Parameters for the Yeast Rhodotorula rubra growth in Peat extracts. J. Feremen. and Biotech. 76: 321-325.

[17] Simpson, K. L. et al. 1964. Biosynthesis of Yeast Cartenoids. J. Bacteriol. 88: 1688-1694.

[18] Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. 1990. Yeast Technology, Springer Verlag Co., NewYork, pp. 201-243.

[19] Yamasato, K. et al. 1974. Yeast from the Pacific Ocean. J. Gen. Appl. Microbiol. 20: 289-307.