تولید کاروتنویید از آب پنیر توسط مخمر قرمز رنگ ردوترولا آکنیوروم، جداسازی شده از شیرهٔ درختان توس طالقان

ایرج نحوی، محسن واعظ وگیتی امتیازی[1]

چکیده

کاروتنوییدها از مهم‌ترین و رایج‌ترین رنگیزه‌های طبیعی هستند، که وظایف بیولوژیک مهمی را در موجودات زنده برعهده دارند، و هم چنین، رنگ مشخص و جذابی را به بسیاری از حیوانات پرورشی می‌بخشند. در دو دههٔ اخیر استفاده از کاروتنوییدهای با منشأ میکروبی، به علت دارا بودن مزایایی چون طبیعی و مقرون به صرفه بودن آنها، مورد توجه پژوهشگران واقع شده است. در این بین، مخمرهای تولید کننده کاروتنویید با توانایی مصرف لاکتوز به ندرت جداسازی شده‌اند، و اطلاعات کمی در زمینه تولید کاروتنوییدهای مخمری با استفاده از سوبستراهای حاوی لاکتوز، از جمله آب پنیر گزارش شده است. در این تحقیق یک سویه از مخمر قرمز رنگ مولد کاروتنویید به نام رودوترولاآکنیوروم از شیرهٔ درختان توس منطقه ماسه چال طالقان جداسازی گردید و توسط آزمون‌های میکروسکوپی، ماکروسکوپی و بیوشیمیایی شناسایی شد.

نتایج نشان داد که مخمر جداسازی شده توانایی مصرف لاکتوز و تولید کاروتنویید را توأماً دارا می‌باشد. ارزیابی شرایط مطلوب کشت مقادیر ماکزیمم بیوماس و کاروتنویید را به ترتیب معادل ۹/۹g/lit و ۲۹۰μg/g برآورد نمود. ضمناً آنالیز شیمیایی عصاره کاروتنوییدی استخراج شده از این مخمر، مؤید حضور بتاکاروتن، ترولین و ترولورودین، به عنوان کاروتنوییدهای اصلی تولید شده بود. با توجه به این که آب پنیر یکی از فراورده‌های جانبی صنایع پنیر سازی کشور است، و متأسفانه در حال حاضر اکثراً به هدر می‌رود و باعث آلودگی محیط زیست می‌شود، استفاده از این ماده در تولید مواد با ارزشی چون کاروتنوییدها می‌تواند از اهمیت شایانی برخوردار باشد.

واژه‌های کلیدی: *کاروتنویید، ردوترولا آکنیوروم، آب پنیر*

مقدمه

تشکیل رنگیزه‌های کاروتنوییدی یکی از خصوصیات جنس ردوترولا[2] است (۳ و ۱۴). بتاکاروتن[3] همراه با دو کاروتنویید ترولین[4] و ترولورودین[5] اجزای اصلی این رنگیزه‌ها در این گروه از مخمرها می‌باشند (۷)، که به عنوان پیش مادهٔ ویتامین A و نیز یک رنگ خوراکی طبیعی در صنایع غذایی و دارویی اهمیت

۱. به ترتیب استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

2. *Rhodotorula* 3. Beta carotene 4. Torulene 5. Torularhodin

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1379.4.3.6.3]

دارند (۳، ۶ و ۱۳).

در دو دهه اخیر، استفاده از سوبستراهای ارزان قیمت به منظور رشد و تولید کاروتنویید توسط مخمرها مورد توجه پژوهشگران بوده است (۱۰، ۱۱، ۱۴، ۱۵ و ۱۷). با این وجود، سویه‌های مخمری کاروتنوییدی با توانایی مصرف سوبستراهای طبیعی حاوی قند لاکتوز (مثل آب پنیر)، به ندرت در طبیعت یافت شده‌اند، و گزارش‌های کمی در این زمینه منتشر گردیده است. در سال ۱۹۹۰، زالاشکو (۲۰)، از مخمر لاکتوز مثبت رودوترولا لاکتوزا[1]، و در سال ۱۹۹۴ و ۱۹۹۷، فرنگوا و همکاران (۷ و ۸) با استفاده از کشت مخلوط مخمر لاکتوز منفی ردوترولا گلوتینیس[2] و باکتری هموفرمانتیتوی لاکتوباسیلوس هلویتیکوس[3] تولید کاروتنویید در محیط آب پنیر نمودند.

آب پنیر یک فراوردهٔ جنبی مهم صنایع پنیر سازی است. از تولید ۰/۴۵ کیلوگرم پنیر مقدار ۲/۷ - ۴/۵ کیلوگرم آب پنیر حاصل می‌شود، که با BOD و COD بالا، آلوده کننده شدید محیط زیست محسوب می‌شود (۱). با استفاده از فرایندهای میکروبی می‌توان علاوه بر رفع این مشکل، فراورده‌های باارزشی تولید نمود (۳)، که این مهم نیز منوط به جداسازی سویه‌های برتر با تولید بالا می‌باشد. در فصل بهار درختان برگ‌ریز، از جمله درختان توس، در محل زخم‌های خود شیره‌ای ترشح می‌کنند که توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها، از جمله مخمرها آلوده می‌گردد (۳ و ۹). شیرهٔ درختان توس به سبب دارا بودن ترکیباتی خاص، در مجاورت نور تولید اکسیژن نوزاد می‌کنند. این ماده یک اکسیدکنندهٔ قوی مواد داخل سلولی مانند آنزیم‌ها است، و سبب از بین بردن عوامل مهاجم و پارازیت‌ها در محل زخم‌های درخت می‌گردد. با این وجود، مخمرهای تولید کنندهٔ کاروتنویید به سبب دارا بودن رنگیزه‌ها قادرند از سمیت اکسیژن نوزاد بکاهند، و به صورت فلور غالب مخمری در محل، رشد و تکثیر نمایند، که گاه به عنوان زیستگاه منحصر به فردی که مخمر خاصی از آن جدا شده است، ذکر گردیده‌اند (۳ و ۱۶).

مواد و روش‌ها

جداسازی مخمرها

شیرهٔ درختان توس منطقهٔ ماسه چال از روستای دهدر طالقان، واقع در شهرستان ساوجبلاغ، از نظر حضور سویه‌های برتر از مخمرهای کاروتنوییدی مورد مطالعه قرار گرفت. درختان در منطقه‌ای سردسیر، در خاکی سطحی با شیب تند، در کنار چشمه‌های دایمی به نام چهل چشمه، به شکل دو تودهٔ نزدیک به هم رویش نموده‌اند. شیرهٔ درختان توسط سرنگ‌ها و سواب‌های استریل نمونه برداری شد، و میکروفلور مخمری کاروتنوییدی آنها با استفاده از محیط‌های کشت مناسب جداسازی و خالص سازی گردید.

شناسایی مخمرها

مخمرهای جداسازی شده (باکلنی صورتی تا قرمز) بعد از تهیهٔ کشت خالص، با استفاده از کلید شناسایی شمارهٔ ۹ مورد شناسایی قرار گرفتند (۵). شناسایی بر پایهٔ آزمون‌های ماکروسکوپی، میکروسکپی و بیوشیمیایی صورت پذیرفت (۱۲).

آماده سازی محیط کشت تلقیحی و آب پنیر

مخمر ردوترولا آکنیوروم[4]، که به عنوان سویه برتر در این جداسازی شناخته شده بود، در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت پیتون-یست اکسترکت مالت-لاکتوز برات (P. Y. M. L.) (۳) درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری تلقیح و در ۲۰°C و با سرعت هوادهی ۲۵۰ دور در دقیقه، برای مدت ۲۴ ساعت کشت گردید.

محیط کشت آب پنیر با روش‌های مختلفی تهیه شد، و در نهایت محیط کشت ویلتز[5] و آگالد[6] انتخاب گردید. این محیط کشت حاوی یک لیتر آب پنیر تازه است که به آن دو گرم $(NH_4)_2SO_4$، دو گرم Na_2HPO_4، دو گرم $MgSO_4$، ۰/۱ گرم NaCl، ۰/۱ گرم $CaSO_4,2H_2O$، ۰/۰۲۵ گرم $FeSO_4$،

1. *Rhodotorula lactosa* 2. *Rhodotorula glutinis* 3. *Lactobacillus helviticus*
4. *Rhodotorula acheniorum* 5. Willetts 6. Ugald

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1379.4.3.6.3]

$7H_2O$، ۰/۰۰۷۵ گرم $ZnSO_4,7H_2O$، ۰/۰۰۱ گرم $MnSO_4$ و ۰/۰۰۵ گرم $4H_2O$ ،H_3BO_3 اضافه گردیده است. پس از آماده سازی، محیط فوق به میزان ۵۰ml در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری تقسیم و استریل گردید (۱۹).

شکست سلول‌های مخمری و استخراج کاروتنوییدها

از آن‌جا که کاروتنوییدهای تولید شده توسط مخمر ترکیبات داخل سلولی می‌باشند، برای استخراج آنها روش‌های مختلفی از شکست سلولی، شامل استفاده از هم‌زن برقی و ذرات شیشه به قطر mm ۰/۵ (۳ و ۴)، استفاده از دستگاه هموژنیزه کننده ساخت شرکت IKA (۳)، استفاده از دستگاه اولتراسونیک و استفاده از حلال دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به شکل داغ (۳ و ۱۸) مورد مطالعه قرار گرفت، که روش اخیر به سبب کارایی بالا، سرعت عمل و سادگی برای آزمون‌های بعدی آنالیز انتخاب شد. بعد از شکست سلول‌های مخمری، کاروتنوییدهای تولید شده توسط حلال پترولیوم اتر استخراج و مقدار آن محاسبه گردید (۳، ۴، ۷ و ۱۰).

آنالیز شیمیایی ترکیبات کاروتنوییدی تولیدی

کاروتنوییدهای استخراج شده توسط پترولیوم اتر، از نظر طیف جذبی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر پیشرفته[1] در دامنهٔ طول موج ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر مورد آنالیز قرار گرفت. به منظور شناسایی کامل‌تر اجزای تشکیل دهندهٔ عصارهٔ کاروتنوییدی استخراج شده، از تکنیک کروماتوگرافی نازک لایه[2] روی صفحاتی از جنس سیلیکاژل خنثی و منیزیم اکسید و حلال پترولیوم اتر و استن به نسبت (۱۰:۱) استفاده و با تفکیک باندهای به دست آمده از هر یک، نوع کاروتنوییدهای تولید شده شناسایی اولیه گردید.

بررسی اثر پارامترهای محیط کشت بر تولید کاروتنوییید

از آن‌جا که کاروتنوییدهای تولید شده توسط مخمرها ترکیبات داخل سلولی بودند، برای بهینه‌سازی میزان تولید، اقدام به بهینه نمودن بیوماس تولیدی توسط مخمر مورد استفاده گردید، و اثر عوامل مختلف، شامل غلظت قند لاکتوز و سولفات آمونیوم محیط کشت آب پنیر، دما، pH، سرعت هوادهی و زمان کشت در سه تکرار انجام پذیرفت.

نتایج

جداسازی و شناسایی میکروفلور مخمری تولید کنندهٔ کاروتنوییید شیرهٔ درختان توس

در این تحقیق دو گونه مخمر کاروتنوییدی شامل ردوترولا آکنیوروم و اسپوریدیوبولوس روییننی[3] با ظاهر کلنی کاملاً متفاوت جداسازی گردید (جدول ۱)، که با استفاده از کلید شناسایی موجود و چند تست تکمیلی، گونه‌های مذکور شناخته شد (جدول ۲). در نهایت، گونهٔ اول به لحاظ دارا بودن خصوصیت دیگر، یعنی توانایی مصرف قند لاکتوز، به عنوان سویه برتر انتخاب و در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیهٔ شیمیایی کاروتنوییدهای استخراجی

طیف جذبی عصارهٔ سلولی استخراج شده از مخمر ردوترولا آکنیوروم (شکل ۱) نشان‌دهندهٔ حضور رنگیزه‌های کاروتنوییدی در این گونهٔ جداسازی شده بود، و تجزیهٔ شیمیایی TLC، حضور سه ترکیب اصلی بتاکاروتن، ترولین و ترولورودین را با توجه به گزارش‌های قبلی در این جنس تأیید می‌نمود (جدول ۳).

بررسی اثر غلظت قند لاکتوز و سولفات آمونیوم

با بررسی چهار غلظت از قند لاکتوز در محیط کشت آب پنیر، میزان ۷۵ g/l آن، تولید بیوماس مخمری بالاتر و به تبع آن کاروتنوییید بیشتر، به ازای هر لیتر محیط کشت می‌نمود (شکل ۲).

هم‌چنین، غلظت دو گرم در لیتر از سولفات آمونیوم، به عنوان تأمین کنندهٔ منبع نیتروژن، مناسب‌تر دیده شد (شکل ۳).

1. Specord S
2. Thin Layer Chromatography
3. *Sporidiobolus ruinenii*

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1379.4.3.6.3]

جدول ۱. مورفولوژی مخمرهای جداسازی و شناسایی شده

نام مخمر	رنگ کلنی	اندازهٔ کلنی* (mm)	سطح کلنی	اطراف کلنی
ردوترولا آکنیوروم	قرمز رنگ	۳-۱	محدب	صاف
اسپوریدیوبولوس روییننی	قرمز کم‌رنگ	۴-۱	آتش‌فشانی	دندانه‌دار

*: بعد از ۵ روز در ۲۲°C روی محیط YM آگار

جدول ۲. نتایج تست‌های شناسایی مخمرهای جداسازی شده

نام مخمر / نام تست	ردوترولا آکنیوروم	اسپوریدیوبولوس روییننی
مصرف هوازی قند د-گزیلوز	+	+
مصرف هوازی قند مالتوز	+	+
مصرف هوازی قند لاکتوز	+	–
مصرف هوازی قند د-مانیتول	+	+
مصرف نیترات	+	+
مصرف اتیل آمین	–	–
رشد در غیاب ویتامین بیوتین	+	+
رشد در غیاب ویتامین PABA	+	+
رشد در دمای ۲۵°C	+	+
رشد در دمای ۳۰°C	–	–
رشد در دمای ۳۷°C	–	–
رشد در حضور ۰/۱% سیکلوهگزامید	–	W[1]
تشکیل نشاستهٔ خارج سلولی	+	–
تولید رشته یا فیلامنت	–	+
تولید هیف کاذب	–	+
تولید بالیستوسپور	–	+

۱. ضعیف

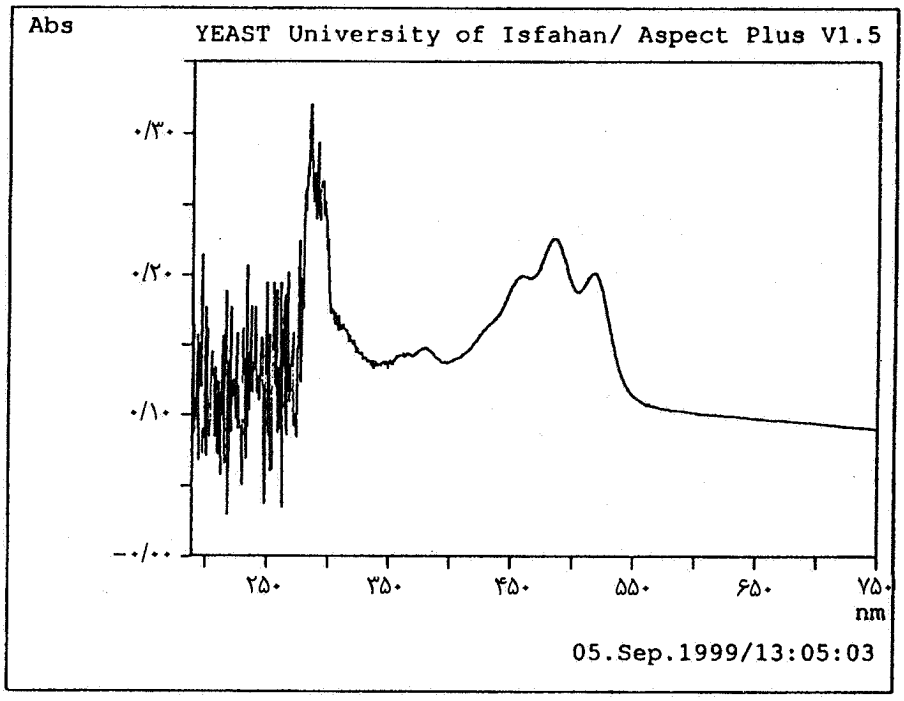
بررسی اثر pH، دما و سرعت هوادهی

بالاترین بیوماس تولیدی توسط مخمر در pH=۵/۵ حاصل گردید (شکل ۴). هر چند که مخمر در حد وسیعی از pH قادر به رشد بود، اما در pH کمتر از سه رشد محسوسی قابل مشاهده نبود.

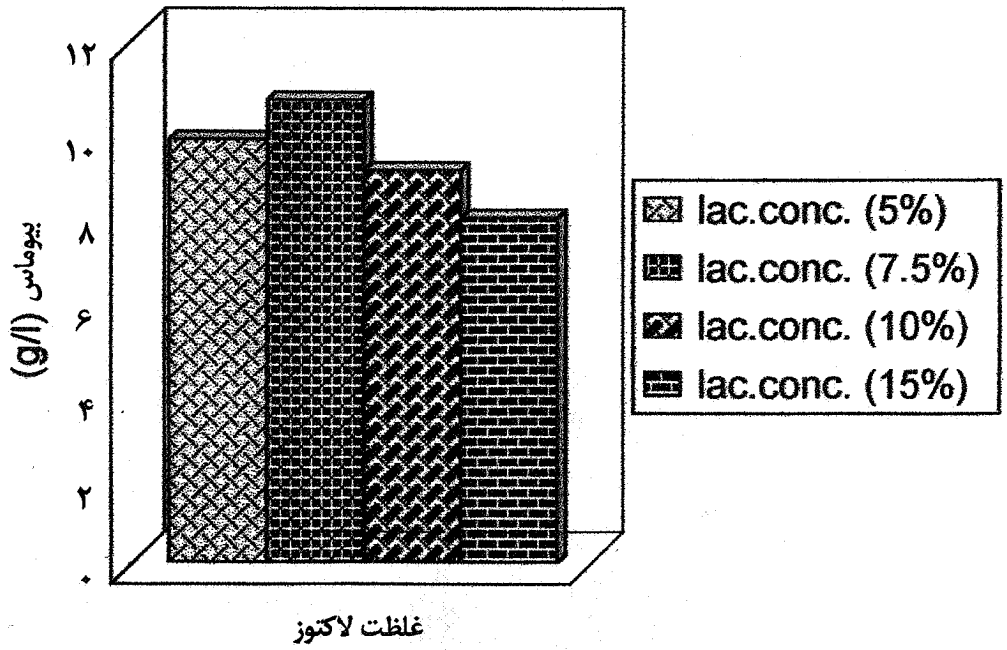
مناسب‌ترین دمای رشد مخمر جداسازی شده در ۲۲°C تعیین گردید (شکل ۵)، و مشخص شد که رشد مخمر فوق در دمای بالاتر از ۲۸°C به طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1379.4.3.6.3]



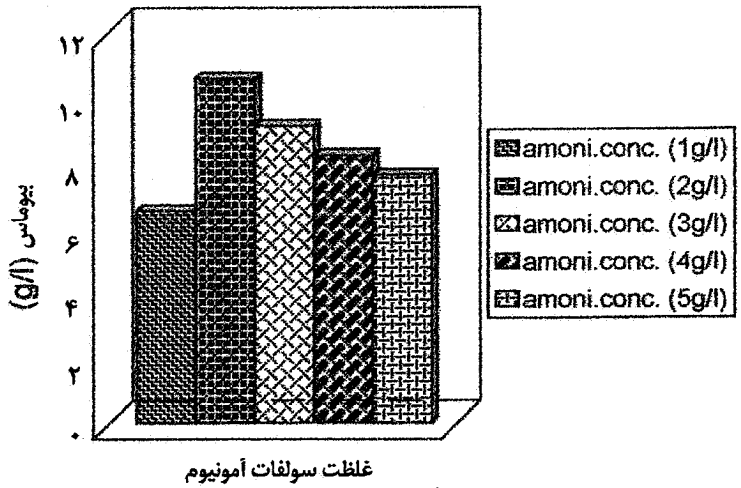
شکل ۱. طیف جذبی عصارهٔ کاروتنوییدی استخراج شده از ردوترولا آکنیوروم در حلال پترولیوم اتر



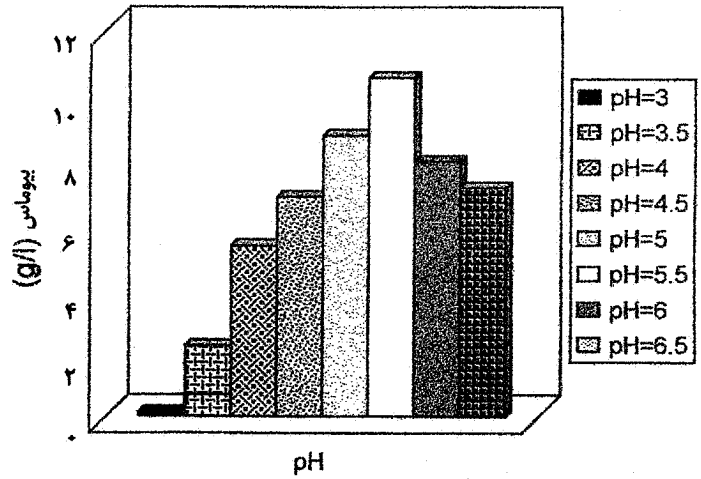
شکل ۲. اثر غلظت قند لاکتوز آب پنیر بر بیوماس تولید شده توسط مخمر

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-23]

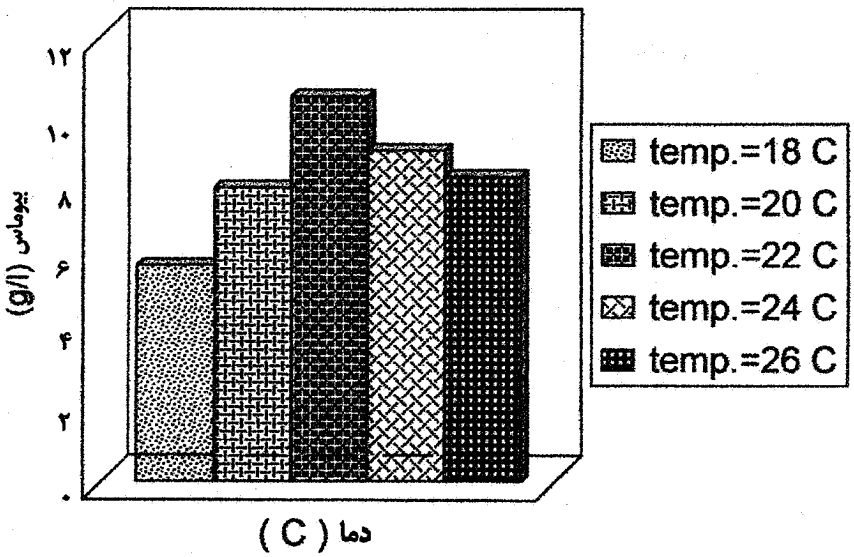
[DOR: 20.1001.1.24763594.1379.4.3.6.3]



شکل ۳. اثر غلظت سولفات آمونیوم بر بیوماس تولیدشده توسط مخمر



شکل ۴. اثر pH بر بیوماس تولید شده توسط مخمر



شکل ۵. اثر دما بر بیوماس تولید شده توسط مخمر

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1379.4.3.6.3]

جدول ۳. ترکیبات کاروتنوییدی شناسایی شده در عصاره استخراج شده از سلول‌های مخمری، توسط حلال پترولیوم اتر با استفاده از تکنیک TLC

نام کاروتنویید	λ_{max}
بتا -کاروتن	۴۵۲
ترولین	۴۸۵
ترولورودین	۵۱۵

جدول ۴. مقایسه میزان تولید کاروتنویید توسط مخمرهای لاکتوز مثبت با سویه برتر جداسازی شده

مطالعهٔ انجام شده	منبع ۷ و ۸	منبع ۲۰	تحقیق حاضر
کاروتنویید کل تولیدی	۲۶۸ $\mu g/g$	۸۶/۸ $\mu g/g$	۲۹۰ $\mu g/g$
مخمر مورد استفاده	*R. glutinis*	*R. lactosa*	*R. acheniorum*

از آن‌جا که مخمر ردوترولا آکنیوروم یک مخمر غیر تخمیری است، هوادهی اثر مهمی بر رشد و تولید کاروتنویید آن دارد. از طرفی، چون مقدار هوادهی محیط کشت با سرعت تکان خوردن آن بر حسب دور در دقیقه رابطهٔ مستقیم دارد، اقدام به تعیین میزان آن گردید، و برای ml ۵۰ محیط کشت در ظروف ۲۵۰ میلی لیتری مقدار ۲۵۰ دور در دقیقه مناسب به نظر رسید (شکل ۶). هم چنین، مشخص گردید که در سرعت‌های فراتر از این مقدار، به علت ایجاد نیروی تنش بر میکروارگانیسم، میزان رشد کاهش می‌یابد.

بررسی اثر مدت زمان کشت

آزمایش‌ها نشان داد که حداکثر بیوماس تولیدی توسط این مخمر در روز چهارم به دست می‌آید (شکل ۷)، و به دنبال آن کاهش جزئی در مقدار بیوماس (شکل ۸الف) و افزایش تدریجی در کاروتنویید سلول، باعث می‌شود که کاروتنویید تولید شده در محیط کشت در روز پنجم حداکثر مقدار خود را دارا باشد (شکل ۸ب و ۸ج).

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر مشخص شد که مخمر قرمز رنگ ردوترولا آکنیوروم، جدا شده از شیرهٔ درختان توس منطقه طالقان، علاوه بر توانایی تولید نسبتاً زیاد کاروتنویید، قادر است قند لاکتوز را نیز مصرف کند. این در حالی است که گزارش‌های کمی در زمینهٔ مخمرهای کاروتنوییدی لاکتوز مثبت و کاربرد صنعتی آنها وجود دارد.

سویهٔ جداسازی شده اخیر، در مقایسه با سویه‌های مخمری به کار گرفته شده توسط سایر پژوهشگران، از تولید کاروتنویید نسبتاً بیشتری برخوردار است (جدول ۴).

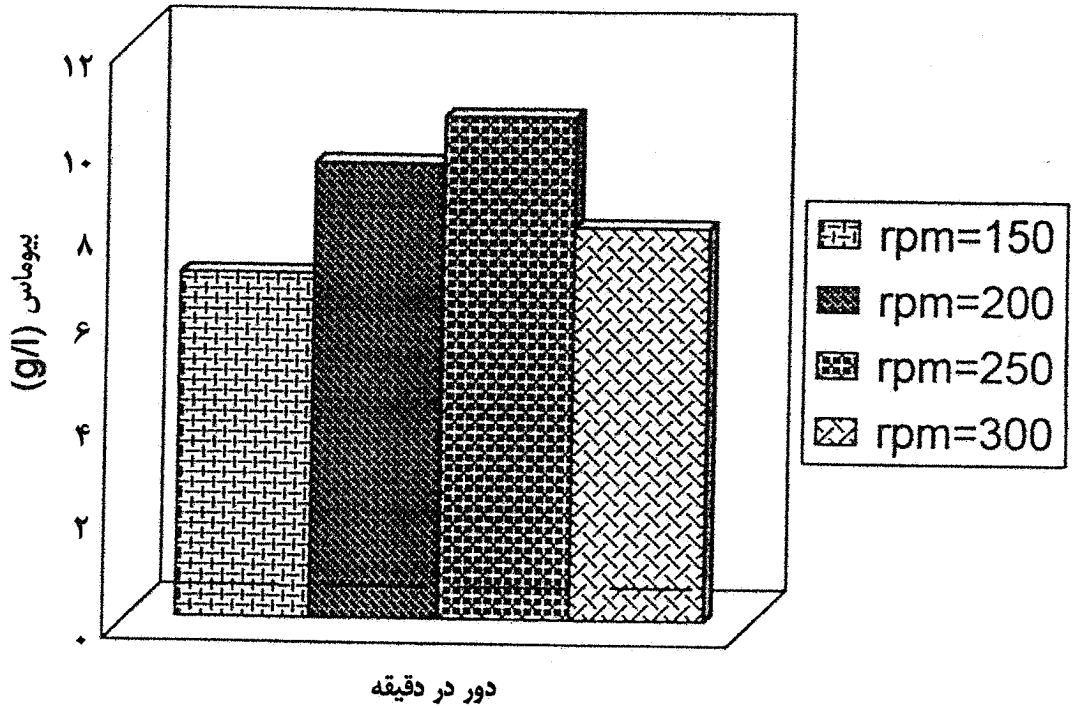
در نهایت، بعد از بهینه سازی شرایط محیط کشت آب پنیر (غلظت لاکتوز ۷۵ و سولفات آمونیوم دو گرم در لیتر، pH=۵/۵، دمای $22^{\circ}C$ و سرعت هوادهی ۲۵۰ دور در دقیقه)، میزان تولید کاروتنویید ۲۸۷۱ میکروگرم در لیتر (شکل ۸ج)، معادل ۲۹۰ میکروگرم در گرم (شکل ۸ب) و بیوماس ۹/۹ گرم در لیتر (شکل ۸الف) در مدت ۵ روز به دست آمد، و بازده تولید بیوماس بر مبنای مصرف قند لاکتوز به حداکثر ۶۳/۱۲% رسید.

سعی بر آن است که در پژوهش‌های آینده میکروفلور مخمری درختان توس سایر مناطق کشور از نظر حضور سویه‌های دیگری چون فافیا ردوزیما[1]، تولید کننده کاروتنویید

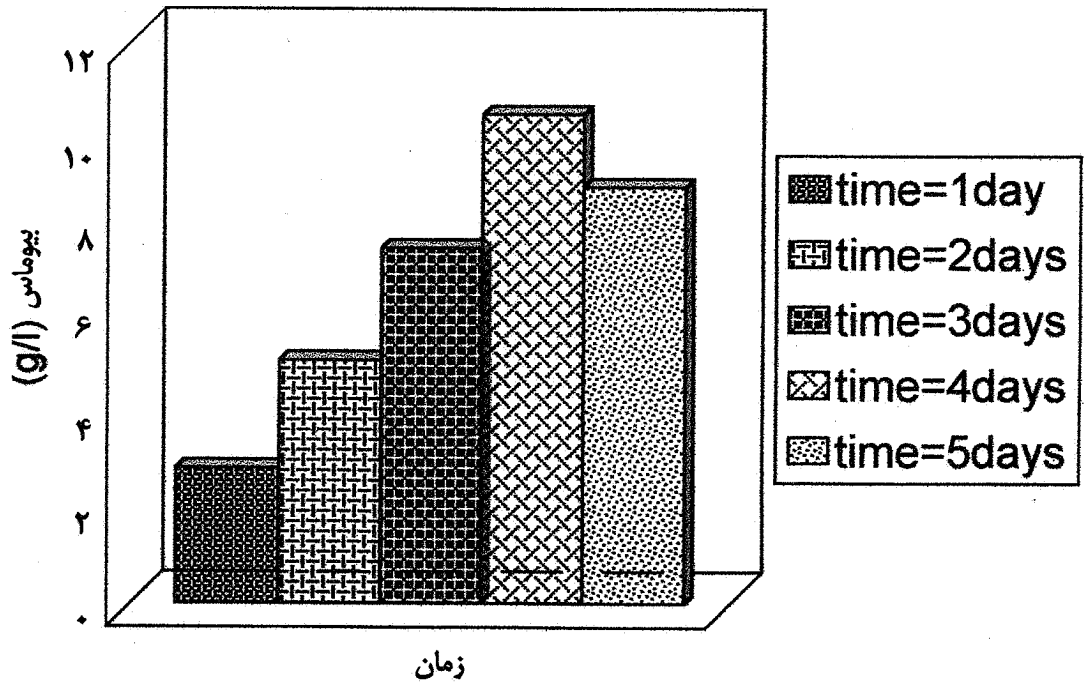
1. *Phaffia rhodozyma*

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1379.4.3.6.3]



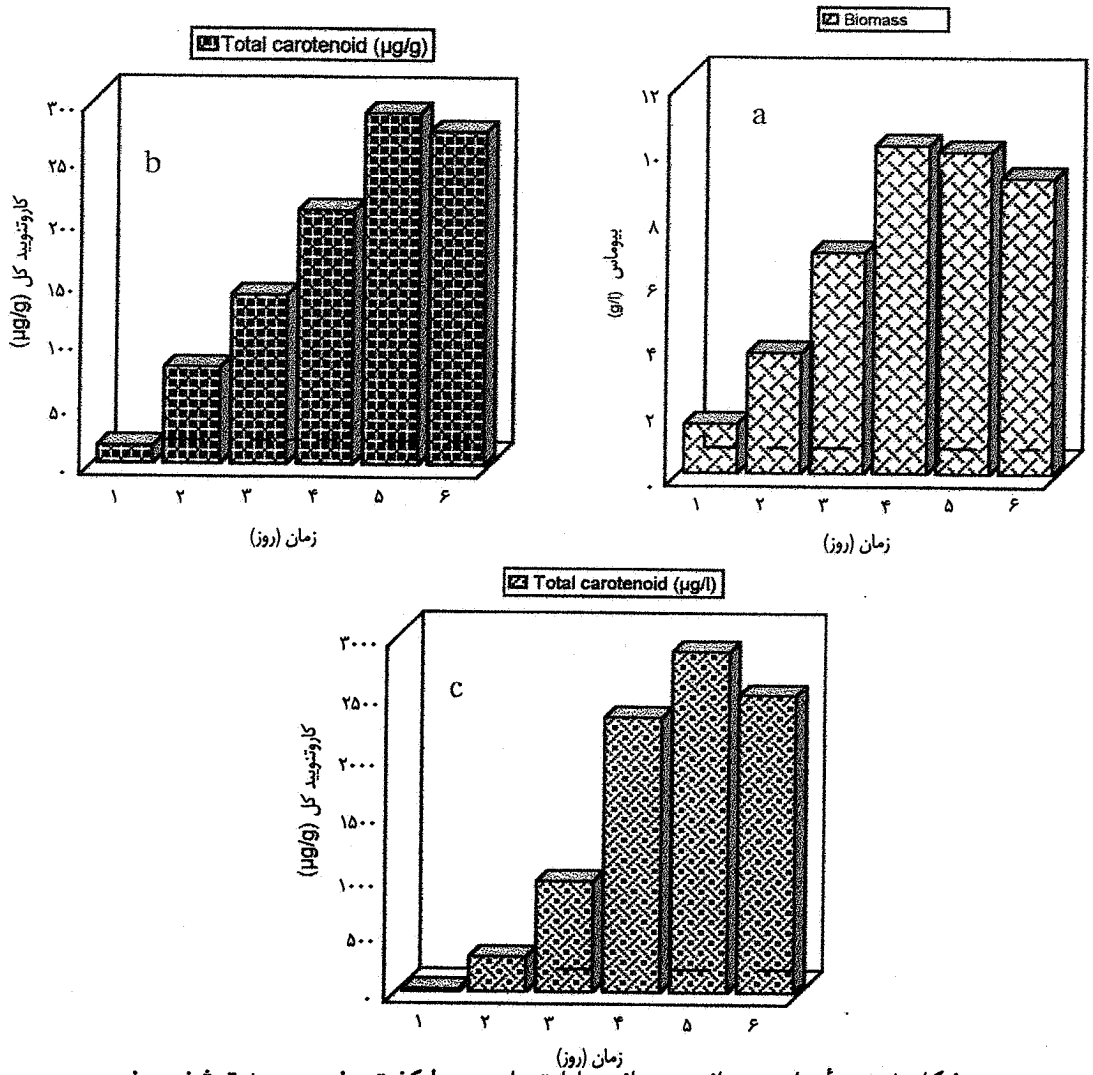
شکل ۶. اثر سرعت هوادهی بر بیوماس تولید شده توسط مخمر



شکل ۷. اثر مدت زمان کشت بر بیوماس تولید شده توسط مخمر

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1379.4.3.6.3]



شکل ۸. نتیجهٔ نهایی بعد از بهینه‌سازی پارامترهای محیط کشت مخمر در مدت شش روز

الف) نمودار بیوماس تولیدی (g/l) ب) نمودار کاروتنویید تولیدی (µg/g) ج) نمودار کاروتنویید تولیدی (µg/l)

آستاگزانتین، که از مناطق دیگری از دنیا گزارش شده است (۲ و ۹)، مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقایان مهندس سید علی خانی و مهندس آقای نادری ریاست محترم جهاد سازندگی طالقان به خاطر کمک در شناسایی منطقه تشکر و قدردانی می‌گردد.

گرشاسبی از ادارهٔ آبخیزی جهاد سازندگی شهرستان ساوجبلاغ و

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1379.4.3.6.3]

منابع مورد استفاده

۱. نحوی، ا. و ز. صهبائی. ۱۳۷۷. بررسی تولید پروتئین تک یاخته (SCP) از آب پنیر. مجلهٔ پژوهشی دانشگاه اصفهان ۱ و ۲: ۲۹-۴۴.

۲. نحوی. ا. و م. واعظ. ۱۳۷۸. تولید آستاگزانتین از منابع میکروبی و کاربرد آن در پرورش ماهی. مجلهٔ آبزی‌پروری ۲۶: ۵۷-۶۱.

۳. واعظ. م. ۱۳۷۸. جداسازی و شناسایی مخمرهای تولید کنندهٔ کاروتنویید و کاربرد آنها در صنعت. پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان.

4. An, G. H., D. B. Schuman and E. A. Johnson. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. Appl. and Environ. Microbiol. 55: 116-124.

5. Barnett, J. A., R. W. Payne and D. Yarrow. 1983. Yeasts: Characteristics and Identification. Frist edittion, Cambrige Univ. Press, Cambrige.

6. Ershova, Y. A., A. Dmitrovsky, O. Polulyakh, O. Podoprigova and V. Bykhovky. 1992. Enzymatic conversion of torulene and torularhodin to retinal. Prikladnaya Biokhimiya Mikrobiologia 28: 680-684.

7. Frengova, G., E. Simova, K. Paulova, D. Beshkova and D. Grigorova. 1994. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. Biotech. and Bioeng. 44: 888-894.

8. Frengova, G., E. Simova and D. Beshkova. 1997. Caroteno-protein and exopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and Lactobacillus helveticus. J. Indust. Microbiol. and Biotech. 18: 272-277.

9. Golubev, W. I. 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Yeast 11: 101-110.

10. Haard, N. F. 1988. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. Biotech. Letters . 10: 609-614.

11. Hayman, G. T., B. M. Mannarelli and T. D. Leathers. 1995. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed od corn wet-milling co-products. J. Indust. Microbiol. 14: 389-395.

12. Kurtzman, C. P. and J. W. Fell. 1998. The Yeasts: A Taxonomic Study. Fourth edition, Elsevier, Amsterdam.

13. Margalith, P. Z. 1992. The carotenoid pigments. *In*: Pigment Microbiology. First edition, pp. 32-76, Chapman and Hall, London.

14. Matelli, I., N. O. da Silva and D. Pomeroy. 1990. Production of β-carotene by a *Rhodotorula* strain grown on sugar-cane juice. Biotech. Letters 12: 207-208.

15. Meyer, P. S. and J. C. Du Preez. 1994. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. World J. Microbiol. and Biotech. 10: 178-183.

16. Miller, M. W., M. Yoneyama and M. Soneda. 1976. *Phaffia* a new yeast genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). Internat. J. Systematic Bacteriol. 26: 286-291.

17. Okagbue, R. N. and M. J. Lewis. 1984. Use of alfalfa residual juice as a substrate for propagation of the red yeast *Phaffia rhodozyma*. Appl. Microbiol. and Biotech. 20: 33-39.

18. Sedmak, J. J., D. K. Weerasinghe and S. O. Jolly. 1990. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. Biotech. Techniques 4: 107-112.

19. Willetts, A. and U. Ugald. 1987. The production of single cell protein from whey. Biotech. Letters 9: 795-800.

20. Zalashko, M. V. 1990. Biotechnology of Milk Whey Processing. Science Press, Moscow.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-23]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1379.4.3.6.3]