Vitamin Riboflavin Production by Two Locally Isolated Yeast Isolates and the Effect of Temperature and pH on their Productivity

Dr. Mysa'a Yazajy *
Dr. Nesreen Nakshow **
Aleen Sarko ***

(Received 28 / 12 / 2022. Accepted 27 / 4 /2023)

□ ABSTRACT □

In this study, a group of yeasts were isolated from different natural sources, then they were purified and tested for their ability to produce the vitamin Riboflavin. The optimum temperature and pH to produce the largest amount of the vitamin were determined. 21 pure yeast isolates were obtained from different sources which they were able to produce riboflavin in a synthetic production medium.

The results showed that two isolates of these yeasts superior in producing the largest amount of vitamin. The strains were identified by using the Carbohydrate fermentation method in the API strips (test kit), it turned out that they were: *Candida famata* and *Candida guilliermondii*. The ability of these two isolates to produce riboflavin differed according to the different conditions of temperature and pH applied in the experiments.

It was found that conditions of 30 ° C and pH = 6 were optimal to give the largest amount of vitamin. The isolate *C. guilliermondii* was the best as it gave an amount of vitamin amounted to 172.24 g / 50 ml production medium under these conditions. Compared to the isolate *C.famata*, which produced an amount estimated at 57.84 g/50 ml production medium under the same conditions. whereas the amount of produced vitamin decreased to 53.84 µg and 0.24 µg for *C.gulliermondii* and *C.famata*, respectively, when the applied conditions were 30°C and pH=4.5. On the other hand, it was found that the conditions of temperature 35 ° C and pH = 7 were not suitable for producing vitamin by both isolates.

Keywords: vitamins, Riboflavin, yeasts, temperature, pH.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* **Professor, Department of Botany, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
** **Researcher, National commission for Biotechnology - NCBT., Ministry of Higher Education and Scientific Research, Damascus , Syria.**
*** **Teaching Assistant, Department of Botany, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria. sarkoaleen@gmail.com**

إنتاج فيتامين الريبوفلافين من عزلتي خمائر معزولة محلياً وتأثير درجة الحرارة والحموضة في الإنتاجية

د. ميساء يازجي*

د. نسرين نقشو**

اليـن سركو***

(تاريخ الإيداع 28 / 12 / 2022. قُبِل للنشر في 27 / 4 /2023)

□ ملخّص □

تم في هذا البحث عزل مجموعة من الخمائر من مصادر طبيعية مختلفة، وتنقيتها، واختبار قدرتها على إنتاج فيتامين الريبوفلافين، وتحديد درجة الحرارة والحموضة الأمثل لإنتاج أكبر كمية من الفيتامين. تم الحصول على 21 عزلة نقية من الخمائر من مصادر مختلفة قادرة على إنتاج الريبوفلافين ضمن وسط إنتاج تركيبي.

بينت النتائج تفوق عزلتين من هذه الخمائر في إنتاج أكبر كمية من الفيتامين، وبعد تحديد الأنواع بطريقة تخمير السكاكر في شرائح الـ API تبين أنهما: *Candida famata* و *Candida guilliermondii*.

اختلفت قدرة هاتين العزلتين بإنتاج الريبوفلافين باختلاف شروط الحرارة والحموضة المطبقة في التجارب، وتبين أن الدرجة 30 م° و pH=6 كانت الأفضل لإعطاء أكبر كمية من الفيتامين. وقد تفوقت العزلة *C. guilliermondii* بإعطاء كمية من الفيتامين بلغت 172.24 µg/50 مل وسط إنتاج في هذه الشروط، مقارنة بالعزلة *C. famata* التي أعطت كمية قدرت ب 57.84 µg/50 مل وسط إنتاج في الشروط ذاتها.

في حين انخفضت كمية الفيتامين الناتجة إلى 53.84 µg و 0.24 µg لكل من *C.gulliermondii* و *C.famata* على الترتيب وذلك عند تطبيق درجة الحرارة 30 م° وpH=4.5. بالمقابل تبين أن الدرجة 35 م° وpH=7 لم تكن مناسبة لإنتاج الفيتامين من كلتا العزلتين.

الكلمات المفتاحية: فيتامينات، الريبوفلافين، خمائر، درجة حرارة، درجة حموضة.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

* أستاذ – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

**باحثة- الهيئة العامة للتقانة الحيوية- وزارة التعليم العالي والبحث العلمي _دمشق _سورية.

***معيدة – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية sarkoaleen@gmail.com .

مقدمة:

تملك الأحياء الدقيقة مسارات استقلابية متعددة، تنتج من خلالها مركبات حيوية قيمة مثل البروتينات، الأحماض النووية، السكريات المتعددة و الفيتامينات وغيرها وذلك من خلال عمليات الاستقلاب الأولية والثانوية.

تعد الفيتامينات مركبات كيميائية هامة، فهي تتحكم وتؤثر في العمليات الفيزيولوجية التي تعد ضرورية لعمليات الاستقلاب والنمو عند الحيوانات، خاصة الثديات. لكن هذه المركبات لا يمكن تصنيعها حيوياً بواسطة خلايا الثدييات، التي فقدت القدرة على تصنيعها، بينما على العكس من ذلك فإن بعض الكائنات النباتية الراقية والأحياء الدقيقة ظلت محتفظة بهذه القدرة، حيث يتم تصنيع هذه المركبات والتي تعد متطلبات غذائية ذات قيمة عالية للإنسان والحيوان (Lim *et al*.,2001).

يتم إنتاج معظم الفيتامينات حالياً على مستوى صناعي من خلال العمليات الكيميائية، أو عن طريق عمليات التخمر، وتستخدم الفيتامينات بشكل واسع كمواد مضافة للأغذية، للمواد الصيدلانية، ولمستحضرات التجميل (Survase *et al*.,2006).

يعد الريبوفلافين، ويدعى أيضاً فيتامين B2، أحد الفيتامينات المنحلة في الماء، وهو يؤدي دوراً هاماً في صحة الإنسان، حيث يساعد الجسم في هضم الكربوهيدرات، البروتينات، والدهون من أجل إنتاج الطاقة اللازمة له، كما أنه يشكل طليعة للفلافين أحادي النكلوتيد FMN ، وفلافين أدنين ثنائي النكليوتيد FAD ، حيث تكون هذه النكليوتيدات مرافقات أنزيمية للعديد من الأنزيمات الهامة المسؤولة عن تفاعلات كيميائية ضرورية لعمليات الاستقلاب. (Xin *et al*.,2017; Chaudhuri *et al*.,2014).

يستخدم الريبوفلافين بشكل أساسي في الصناعات الصيدلانية، وله استخدامات في الصناعات الغذائية أيضاً كمواد مضافة وفي صناعة أعلاف الحيوانات (Lim *et al*.,2001)، وهو أساسي في تغذية الإنسان وللعلاج، ويسبب نقصه تساقط الشعر، التهابات الجلد، ضعف النظر، وعجز النمو، ولقد وجد أنه يساعد في علاج الصداع النصفي والملاريا (Krymchantowski *et al*.,2002).

يتم إنتاج الريبوفلافين تجارياً إما بالطرائق الكيميائية، أو عن طريق التصنيع الحيوي، ومع تطور التقانات الحيوية، تحول اهتمام أبحاث عديدة إلى الطرائق البيولوجية لتحسين القدرة الإنتاجية التي تعطي مستقلبات وسطية بوساطة الأحياء الدقيقة، حيث تستخدم حالياً العمليات التخمرية بشكل واسع لأنها تعطي الفيتامين في خطوة واحدة، ويسهم هذا في تقليل التكلفة الإنتاجية، على نقيض العمليات الكيميائية (Survase *et al*.,2006) ، وفي العقود الأخيرة كان هناك ازدياد بالتوجه للإنتاج الحيوي للريبوفلافين عن طريق الأحياء الدقيقة، ويتم استبدال هذه التقنيات بالطرائق الكيميائية إذا كانت الكميات قليلة (Lime *et al*.,2001; Stahmann *et al*., 2000; Vandamme, 1992) .

تعد الخمائر مجموعة من الفطريات وحيدة الخلية، ينتمي معظمها إلى صف الفطريات الزقية Ascomycetes، وبعضها إلى صف الفطريات الدعامية Basidiomycetes، وهي قادرة على التكاثر اللاجنسي عن طريق البرعمة أو الانقسام أو إعطاء أبواغ كلاميدية كبيرة (Kurtzman, 1998).

وتشمل الخمائر المنتجة لفيتامين الريبوفلافين B2 كما وصفها Demin (1972) الأنواع الآتية:

Candida robusta, Candida guilliermondii, Candida flareri(famata), Debaromyces subglobosus, Toroulopsis famata.

يتم إنتاج الريبوفلافين على المستوى التجاري كمتممٍ غذائي من عمليات التخمير التي تعتمد على الفطر الزقي *Ashbya gossypii*، وعلى خميرة *Candida Famata*، وقد أجريت العديد من الأبحاث التي اهتمت بإنتاج هذا الفيتامين في أوساط مناسبة من حيث التركيب والشروط البيئية المثلى نذكر منها (Jimenez *et al*., 2005; Lim ; ; Aguiar *et al*., Dmytruk *et al*., 2014; Wei *et al*.,2012; Mateos *et al*.,2006 *et al*., 2001 (Silva.,2019; Aguiar *et al*.,2017; Amaro *et al*.,2015 2015;

وتعد خميرة الـ *Candida Famata* من أكثر الأحياء الدقيقة التي تستخدم في المجال الصناعي لإنتاج الريبوفلافين، حيث أنها تنتج كمياتٍ كبيرةً منه تصل تقريبياً إلى 21 غ/ل، وتفرزه خارجاً في وسط الإنتاج (Stahmann *et al*., 2000 .(Abbas and Sibirny, 2011;

أشار Sabry *et al*. (1989) إلى إمكانية إنتاج الريبوفلافين من خميرة *Candida guilliermondii* وبلغت الإنتاجية 10.46 ملغ/100مل، ودرس تأثير عدة مصادر كربونية كان أفضلها زيت الذرة، واختبر درجات حرارة ودرجات حموضة مختلفة، كان أفضلها 30 م° و pH=6. وفي دراسة لBurkholder (1943) على إنتاجية هذا الفيتامين من الخميرة في عدة درجات حرارة (20، 27، 30، 37) م° وجد أن أفضل مردود للإنتاجية كان عند الدرجة 30 م°.

أهمية البحث وأهدافه:

يتم عادة إنتاج أغلب الفيتامينات بكميات كبيرة، بطرائق كيميائية صناعية والتي تسبب تلوث بيئي كبير، بالإضافة إلى التكلفة العالية، لذلك كان التوجه نحو إنتاجها بطرائق حيوية، حيث تعد الأحياء الدقيقة وخاصة الخمائر من الكائنات الحية بالغة الأهمية، والتي يمكن أن تنتج العديد من هذه المركبات الضرورية للإنسان، ونظراً لعدم وجود دراسات سابقة في سوريا على إنتاج الفيتامينات من مصادر طبيعية، تكمن أهمية هذا البحث بعزل وتحديد أنواع مختلفة من الخمائر من أوساط طبيعية، وتنميطها، ودراسة قدرتها الإنتاجية لفيتامين الريبوفلافين، وتحديد درجات الحرارة والحموضة المثلى للحصول على أكبر كمية من هذا الفيتامين .

طرائق البحث ومواده:

1-جمع العينات وعزل الخمائر

تم جمع عدة عينات من مصادر محلية متنوعة (ترب مختلفة، لبن، مصل لبن، مصل جبن، مخللات، مربيات، فواكه ..) خلال عامي 2020، 2021، وتم حفظها في الثلاجة في المختبر لعزل وتشخيص الخمائر منها.

تم تحضير عدة أوساط زرعية صنعية (PDA، YM، YGC، YPD، VPM)، جدول (1)، من أجل عزل الخمائر و الحصول على مستعمرات نقية بطريقة التخطيط على الآغار المائل، ومن أجل تنشيط الخمائر وتحضير اللقاح وإنتاج الفيتامين. حضرت الأوساط وعقمت في الأوتوكلاف في درجة حرارة 121 م° لمدة 15 دقيقة. كما تم تحضير وسط تركيبي من أجل عملية إنتاج فيتامين الريبوفلافين vpm وتم ضبط pH الوسط على 6 (Wang *et al*., 2008).

جدول (1) أوساط الاستنبات المستخدمة وتركيبها

اسم الوسط ورمزه	استخدام الوسط	تركيب الوسط
PDA	وسط صنعي عام استخدم لعزل الخمائر من العينات	خلاصة البطاطا ديكستروز آغار
YM	وسط صنعي نوعي استخدم لتنقية الخمائر وحفظها	خلاصة الخميرة مالت ببتون ديكستروز آغار
YM(Broth)	وسط صنعي استخدم لتنشيط خلايا الخمائر	خلاصة الخميرة مالت ببتون ديكستروز
YGC	وسط صنعي نوعي استخدم لعزل الخمائر من العينات وتنقيتها	خلاصة الخميرة غلوكوز كلورامفينيكول آغار
YPD	وسط صنعي استخدم لتنشيط خلايا الخميرة وتحضير لقاحة من العزلات لتلقيح وسط الإنتاج	خلاصة خميرة ببتون ديكستروز
VPM	وسط تركيبي استخدم لإنتاج الفيتامين	سكروز 20 غ/ل $(NH_4)_2So_4$ 5 غ/ل KH_2Po_4 1 غ/ل $MgSo_4.7H_2o$ 0.5 غ/ل $Cacl_2.2H_2o$ 0.1 غ/ل Nacl 0.1 غ/ل خلاصة خميرة 2 غ/ل غلايسين 1.5 غ/ل

2-إنتاج الفيتامين:

بعد العزل من عدة مصادر والحصول على مستعمرات نقية، تم إجراء عملية غربلة من أجل انتقاء العزلات المنتجة لأكبر كمية من فيتامين الريبوفلافين، وذلك عن طريق تحضير لقاح من كل عزلة حيث تم تحضينها في دوارق مخروطية تحوي 50 مل وسط YPD السائل لمدة 48 ساعة، على درجة حرارة 28 م°، ثم نقل 0.2 مل إلى دوارق مخروطية أخرى تحوي 50 مل من وسط الإنتاج التركيبي، حضنت الدوارق في حاضنة هزازة لمدة 6 أيام على درجة حرارة 30 م° و 170 هزة/د.

تم تغليف الدوارق بأوراق السولوفان بشكل كامل وذلك منعاً لأكسدة الفيتامين الناتج بالضوء (Wang *et al*.,2008).

سحب 3 مل من كل عينة في اليوم السادس ومزجت مع 3 مل HCL (0.1 N)، سخنت في حمام مائي بدرجة حرارة 70م° لمدة 15 دقيقة، ووضعت في جهاز الـ ULTRA SONIC. بعد ذلك تم تثفيل العينات بسرعة 5000 rpm (دورة في الدقيقة) بدرجة حرارة 4 م° لمدة 5 دقائق ثم فلترة الطافي بفلاتر 0.45µ (Tanner *et al*.,1949) والذي استخدم للكشف عن الفيتامين.

3-الكشف عن الفيتامين:

تم الكشف عن فيتامين الريبوفلافين في العينات باستخدام جهاز المطياف الضوئي على طول موجة 440 نانومتر ومقارنة النتائج مع ستاندر الفيتامين وحساب كميته وتركيزه من معادلة الخط المستقيم.

4-تحديد الأنواع المدروسة:

تم اختيار أفضل عزلتين منتجتين لفيتامين الريبوفلافين وأجريت عملية تصنيف لهذه العزلات عن طريق دراستها مجهرياً للتعرف على أشكال مستعمرات الخمائر النامية وتحديد صفاتها حسب (الحجم، الشكل، اللون، اللمعان، طبيعة الحافة، طبيعة المستعمرة إذا كانت سطحية أو عميقة)، كما وصفت الخلايا مجهرياً حسب الشكل (بيضوية، كروية، اسطوانية) طبيعة البرعمة، إمكانية تشكيل ميسيليوم حقيقية أم كاذب (Barnett 2000).

ثم أُجري تصنيف فيزيولوجي للعزلتين المنتجتين بشكل أكبر من غيرها بوساطة التفاعلات الكميوحيوية عن طريق شرائح ال API 20 C AUX التي تتكون من 19 اختبار تمثيلي لتحديد جنس و نوع الخميرة.

5-أمثلة الشروط البيئية لإنتاج الريبوفلافين:

تم في هذا البحث دراسة تأثير درجتي الحرارة 30 م° و35 م° وثلاث درجات pH (4.5، 6، 7) في إنتاج الريبوفلافين وذلك فقط على الأنواع التي أعطت أكبر كمية من الفيتامين بعد القيام بعملية الإنتاج والكشف عنه، حيث حضنت العزلات المدروسة بكل درجة حرارة على حدة مع تغيير درجات الحموضة الثلاث.

الدراسة الاحصائية:

تمت دراسة الفروق المعنوية في قيم الامتصاصية باستخدام تحليل التباين الأحادي في اتجاهين Two – way Anova لمعرفة مدى تأثير كل من الحرارة والحموضة في امتصاصية كميات الفيتامين المدروسة، والتي تم إنتاجها في شروط مختلفة، مع الأخذ بعين الاعتبار التأثير المتبادل بين الحرارة والحموضة، وتحديد مصدر التباين، وذلك عند مستوى معنوية 0.05، باستخدام البرنامج IBM SPSS Statistics 23، وتم الاكتفاء بدراسة هذه الفروق بالنسبة للامتصاصية بسبب ترابط العناصر الثلاث المدروسة (كمية الفيتامين، تركيزه، والامتصاصية).

النتائج والمناقشة:

1-عزل الخمائر:

بينت نتائج عزل الخمائر من العينات المدروسة وجود21 عزلة موزعة كالتالي: 7عزلات من عينات اللبن، حيث وجدت أعلى نسبة للعزلات فيها، أتى بعدها عينات الترب المحلية التي أعطت 4 عزلات، ثم مصل الجبن عزلتين، مصل اللبن عزلتين، فالمخللات عزلتين، والمكدوس 2 عزلة، وأخيراً الشوندر التي تم الحصول على عزلة واحدة منها، والجبن عزلة واحدة أيضاً، ويوضح الجدول(2) مصدر العزلات التي تم الحصول عليها، عددها، والرمز الذي أعطي لكل واحدة منها والشكل (1) تنقية الخمائر بطريقة التخطيط على الوسط الآغاري.

جدول (2) عزلات الخمائر التي تم الحصول عليها

مصدر العزلات	عدد العزلات	رمز العزلة
لبن	7	AG1 , AG2 , AG3 , AG4 , SR1 , SR2 , SR3
ترب مختلفة	4	N8 , N9 ,N9* ,N10
مصل جبن	2	N3 , N4
مصل لبن	2	N1 , N2
مخللات	2	P1 , P2
مكدوس	2	MA1 , MA2
شوندر	1	N5
جبن	1	CH

شكل (1) تنقية أنواع الخمائر بطريقة التخطيط على الآغار

2-التوصيف المورفولوجي للخمائر:

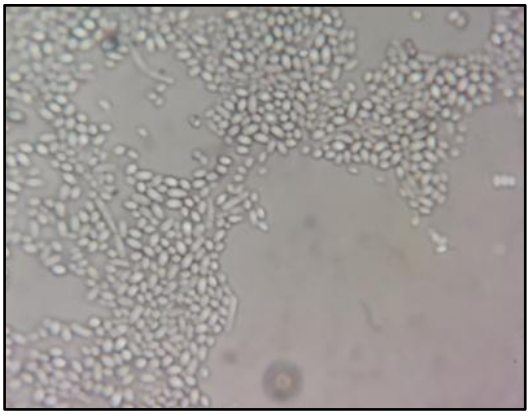
يمكن تصنيف الخمائر المعزولة ضمن 4 مجموعات حسب (Barnett, 2000) بعد دراسة صفاتها الشكلية.

I. المجموعة الأولى: تطابق صفات الخميرة من جنس *Candida*.
II. المجموعة الثانية: أقرب لصفات الخميرة من جنس *Candida*.
III. المجموعة الثالثة: تطابق صفات الخميرة من جنس *Saccharomyces*.
IV. المجموعة الرابعة: أقرب لصفات الخميرة من جنس *Rhodotorula*.

يوضح الجدول (3) التوصيف المورفولوجي للخمائر المعزولة في هذا البحث. كما يوضح الشكل (2)، الخلايا البيضوية للخمائر بعد مشاهدتها بالمجهر الضوئي.

جدول (3) الوصف المورفولوجي للخمائر المعزولة من المصادر الطبيعية

رقم المجموعة	عدد العزلات	شكل الخلية	طبيعة البرعمة	إمكانية تشكل الميسيليوم	نوع الأبواغ	الراسب	العكارة	الحلقة	الغشاء	التصنيف حسب Barnett
1	8	بيضوية	برعمة محيطية	لا يوجد	زقية	ضعيف	واضحة	لا يوجد	لا يوجد	*Candida*
2	6	بيضوية	برعمة محيطية	لا يوجد	زقية	سميك	خفيفة	لا يوجد	لا يوجد	*Candida*
3	5	بيضوية كبيرة الحجم	برعمة محيطية	لا يوجد	زقية	ضعيف	واضحة	لا يوجد	لا يوجد	*Saccharomyces*
4	2	بيضوية	برعمة محيطية	لا يوجد	زقية	ضعيف جدا	خفيفة	لا يوجد	لا يوجد	*Rhodotorula*



شكل (2) شكل خلايا الخمائر تحت المجهر (X400)

3-غربلة العزلات الفطرية المنتجة للريبوفلافين:

بينت نتائج غربلة العزلات الفطرية التي تمت في شروط ثابتة من تركيبة وسط الإنتاج VPM و حرارة 30 م° ودرجة حموضة pH = 6 أن جميع عزلات الخمائر الـ 21 التي تم الحصول عليها من مصادر طبيعية مختلفة قادرة على إنتاج فيتامين الريبوفلافين، لكن بكمياتٍ متفاوتة، والذي قد يعود إلى اختلاف العزلات بقدراتها الإنتاجية للمركبات الاستقلابية، و تبين تفوق عزلتان منها في إنتاج أكبر كمية من الفيتامين وهما:

- العزلة ذات الرمز N9 والتي تبين بعد التوصيف البيوكيميائي أنها : *Candida famata*، والتي أعطت فيتامين الريبوفلافين بكمية 57.84 µg، وهذا ما يتوافق مع دراسة قام بها Levine *et al.* (1949) على هذا الجنس من الخميرة، حيث كانت كمية الفيتامين الناتجة 0.6غ/ل.

- العزلة ذات الرمز AG3 والتي تبين بعد التوصيف البيوكيميائي أنها: *Candida guilliermondii* والتي أعطت فيتامين الريبوفلافين بكمية 172.24 µg، حيث بين Sabry *et al.* (1989) إنتاج كمية تبلغ 10.46ملغ/100مل وسط بوساطة هذا النوع من الـ Candida، كما بين Burkhloder (1943) إنتاج 10-60 ميكروغرام/مل من الفيتامين بوساطة النوع ذاته.

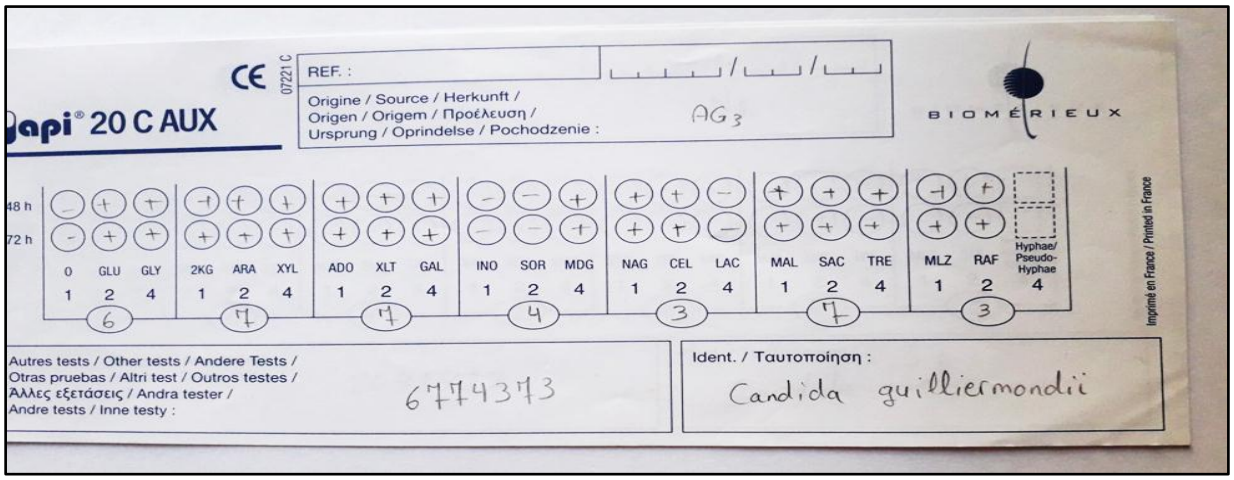
4-تحديد أنواع الخمائر بواسطة الـ API :

بين التوصيف البيوكيمائي الذي تم بوساطة API للعزلتين الأكثر إنتاجاً للريبوفلافين بأنهما تابعتان للنوعين التاليين:

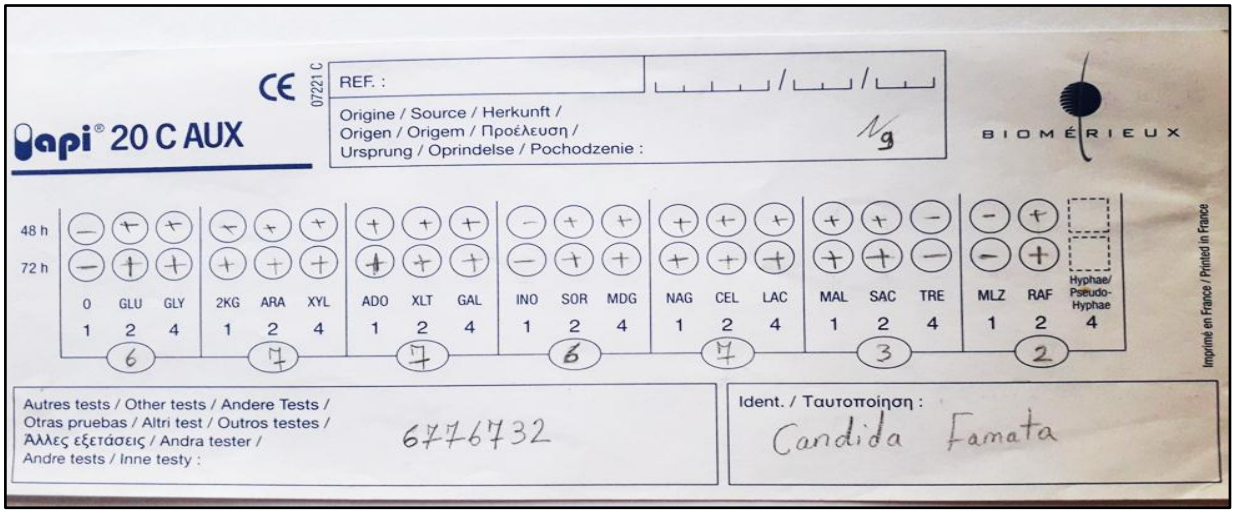
العزلة AG3 هي : *Candida guilliermondii*.

العزلة N9 هي : *Candida famata*.

يبين الشكلان (3 و 4) كيفية تحديد نوع الخمائر عن طريق الـ API المعتمدة على تخمير السكاكر لتحديد جنس ونوع الخميرة، تبعاً للمجموع الرقمي لكل من السكاكر المخمرة التي تأخذ الرمز (+) في كل خانة، مع إهمال المجموع الرقمي للسكاكر غير المخمرة ذات الرمز السالب (-) في كل خانة، ومع ترتيب الأرقام من اليسار إلى اليمين.



شكل (3): تحديد النوع *Cadida guilliermondii* بالاعتماد على المجموع الرقمي للسكاكر المخمرة



شكل (4): تحديد النوع *Candida famata* بالاعتماد على المجموع الرقمي للسكاكر المخمرة

تم اعتماد هاتين العزلتين لدراسة تأثير درجات مختلفة من الحرارة والحموضة في إنتاج فيتامين الريبوفلافين في هذا البحث.

5-أمثلة درجة الحرارة ودرجة الحموضة لإنتاج الريبوفلافين

تبين وجود اختلاف واضح في كمية فيتامين الريبوفلافين الناتج، وذلك باختلاف نوع العزلة، الشروط البيئية من درجة الحرارة ودرجة الحموضة pH المدروسة، حيث تؤثر هذه الشروط البيئية المختلفة بشكل مختلف في المسارات الاستقلابية لكل نوع من الأحياء الدقيقة، مؤدية بذلك إلى تغيير نوعي وكمي في المركبات الوسطية الناتجة عن العمليات الفيزيولوجية المختلفة للخلية.

العزلة *Candida famata* N9 :

نلاحظ من خلال الجدول (4) بأن الـ *C.famata* المعزولة في هذا البحث أعطت أعلى كمية من الفيتامين عند استخدام درجة حرارة 30 م° و pH=6 حيث قدرت الكمية ب 57.84 µg بتركيز 4.82 ppm في 50 مل وسط إنتاج، لكن عند درجة الحموضة pH=4.5 و درجة الحرارة ذاتها نلاحظ تناقص في كمية الفيتامين بشكل واضح، حيث بلغت 10.24 µg وتركيز 0.85 ppm في 50 مل وسط إنتاج، في حين لم تكن درجة الـ pH=7 ملائمة لإنتاج الفيتامين عندما كانت الحرارة 30 م°، حيث كانت الكمية الناتجة تحت الحد الأدنى لإمكانية الكشف بالجهاز DL> .

هذا وقد حصل Heefner *et al.* (1993) على الريبوفلافين بوساطة عزلة من هذا الجنس من الخميرة، بكمية تراوحت بين 560 ملغ/ل إلى 7.5 غ/ل الدرجة 30م° و بدرجة pH تعادل 7، وهذا يؤكد اختلاف قدرة العزلات المختلفة على إنتاج هذا الفيتامين في الشروط المختلفة.

أما عند درجة الحرارة 35م° نلاحظ تناقص في كمية الفيتامين الناتج وذلك عند درجتي الـ pH 6 و 4.5 وقدرت الكمية ب 24.24 µg و 1.44 µ g في الدرجتين السابقتين على الترتيب، كما لوحظ أيضاً بأن pH=7 لم تكن ملائمة لإنتاج هذا الفيتامين وذلك عندما كانت درجة الحرارة 35 م°، كما هو الحال بالنسبة للدرجة 30 م°، حيث كانت الكمية تحت الحد الأدنى لإمكانية الكشف عنها بالجهاز. وقد كان لتغيير درجات الحرارة والحموضة تأثيراً معنوياً في قيم امتصاصية

الكميات المنتجَة من الفيتامين تحت تأثير هذه العوامل، في حين أن التفاعل المتبادل بين الحرارة والحموضة معاً كان غير معنوي. جدول (6)

الجدول (4): كمية وتركيز الريبوفلافين ضمن الشروط المختلفة من حرارة وحموضة

تغيير درجة الحرارة والحموضة للعزلةN9					
درجة الحرارة	درجة الحموضة	متوسط قراءات الامتصاصيةABS	تركيز الفيتامين ppm	كمية الريبوفلافين 50/mgمل وسط إنتاج	كمية الريبوفلافين 50/µgمل وسط إنتاج
30	4.5	0.0025 ± 0.03133	0.85	0.01	10.24
30	6	0.0183 ± 0.071	4.82	0.05	57.84
30	7	0.0086 ± 0.021	<DL	<DL	<DL
35	4.5	0.005 ± 0.024	0.12	0.0014	1.44
35	6	0.0095 ± 0.043	2.02	0.02	24.24
35	7	0.0097 ± 0.0203	<DL	<DL	<DL

العزلة *Candida guilliermondii* AG3:

كانت درجة الحرارة 30م° والحموضة pH=6 هي الأفضل لإنتاج أكبر كمية ممكنة من الفيتامين بوساطة النوع *Candida guilliermondii*، والتي وصلت إلى 172.24 µg بتركيز 14.35 ppm في 50 مل وسط إنتاج، لكن عند قيمة pH=7 انخفضت كمية الفيتامين إلى 39.04 µg ، أما في الوسط الحامضي pH=4.5 فقد أعطت كمية قدرت ب 53.84 µg بالدرجة 30 م° بتركيز 4.48 ppm، في حين وصلت الكمية إلى 53.44 µg بتركيز 4.45 ppm بالدرجة 35م°، ونستنتج من ذلك بأن الوسط الحامضي كان مناسباً لا يمنع تشكل الفيتامين بكمية قليلة مع اختلاف درجة الحرارة سواء عند 30م°، و ال 35م°.

بالمقابل لم تكن درجة الحرارة المرتفعة 35م° المترافقة مع درجة الحموضة المائلة إلى الاعتدال pH=6 وpH=7 مناسبة لإنتاج الفيتامين، حيث نلاحظ من جدول النتائج (5) بأن معدل إنتاج الفيتامين عند هذه الشروط كان أقل من الحد الأدنى لإمكانية الكشف عنه DL>، و قد يعود هذا إلى أن هناك بعض العناصر أو المركبات الكيميائية عند هذه الدرجة من الحموضة قد لا تكون موجودة بصورة حرة، بالتالي لا تستطيع الخلية الاستفادة منها، لكن كمية الإنتاج الأفضل بهذه الدرجة من الحرارة كانت عند درجة pH=4.5 حيث بلغت كمية الفيتامين53.44 µg / 50مل وسط إنتاج.

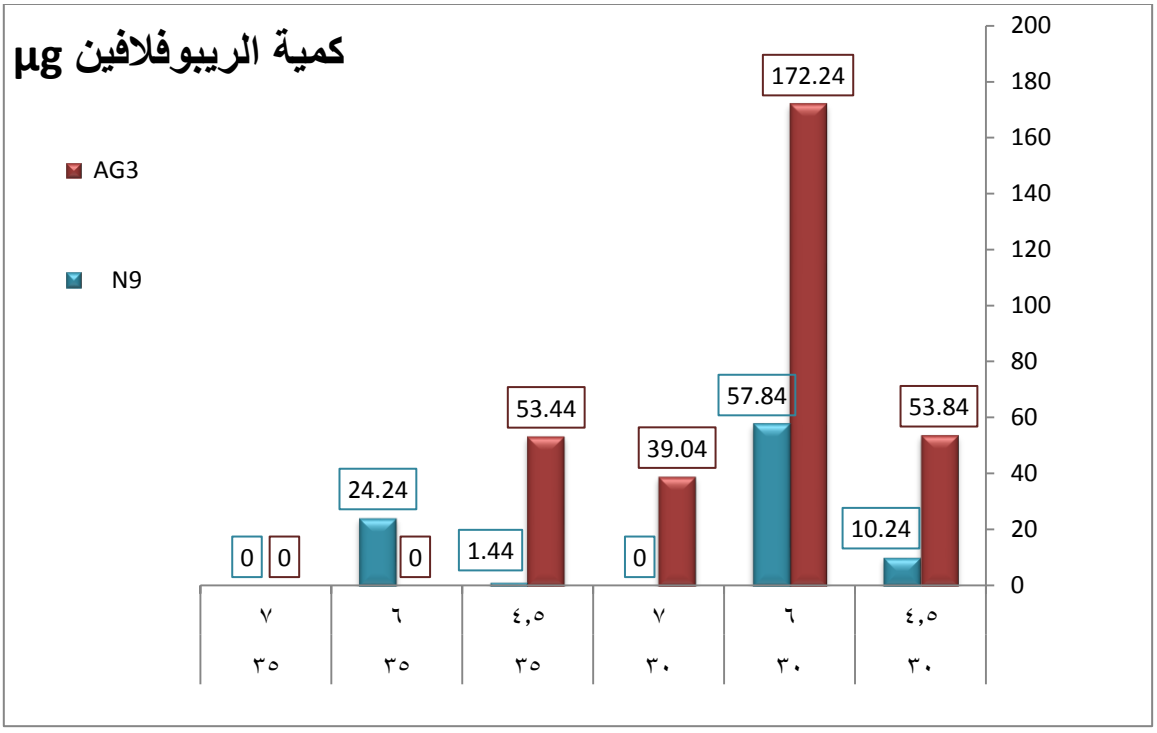
توافقت نتائجنا مع ما قام به Sabry *et al.* (1989) الذي درس تأثير درجات الحرارة والحموضة في إنتاجية هذا الفيتامين بوساطة هذا الجنس من الخمائر، وبين أن بالدرجة 30 م° و درجة الحموضة المنخفضة المعادلة لـ pH=4 تم تثبيط إنتاج الفيتامين، لكن عندما تراوحت الـ pH بين 4 و 6 كان إنتاج الفيتامين بشكل جيد، وأعلى كمية إنتاج تمت بالدرجة pH=6، كما بين Pessoa *et al.* (2003) في دراسته على أحد أنواع هذا الجنس من الخمائر أن الدرجة 30 م°مترافقة بدرجة الحموضة pH=5 هي الأمثل لإنتاج الريبوفلافين، وهذا يؤكد اختلاف إنتاج الفيتامين باختلاف الأنواع وليس فقط بالشروط البيئية المختلفة.

الجدول(5) كمية وتركيز الريبوفلافين ضمن الشروط المختلفة من حرارة ودرجة حموضة

تغيير درجة الحرارة والحموضة للعزلة AG3					
درجة الحرارة	درجة الحموضة	متوسط قراءات الامتصاصية ABS	تركيز الفيتامين ppm	كمية الريبوفلافين 50/mg مل وسط إنتاج	كمية الريبوفلافين 50/µg مل وسط إنتاج
30	4.5	0.0045 ± 0.0677	4.48	0.05	53.84
30	6	0.0214 ± 0.1663	14.35	0.17	172.24
30	7	0.0095 ± 0.0553	3.25	0.03	39.04
35	4.5	0.0045 ± 0.0673	4.45	0.05	53.44
35	6	0.0026 ± 0.017	<DL	<DL	<DL
35	7	0.0045 ± 0.0207	<DL	<DL	<DL

بينت الدراسة الإحصائية أن تأثير تغيير درجات الحرارة والحموضة كان معنوياً في قيم امتصاصية الكمية المنتجة من الفيتامين لكلا العزلتين حيث كانت قيم المعنوية .Sig كلها أقل من مستوى المعنوية 0.05، بينما كان تأثير التفاعل المتبادل بين الحرارة والحموضة معنوياً فقط في العزلة AG3.

يبين المخطط (1) مقارنة بين كميات الفيتامين المنتجة بوساطة العزلتين N9 الـ *C.famata* و AG3 الـ *C.guilliermondii* وذلك بتأثير درجات الحرارة والحموضة المستخدمة في هذا البحث، وقد لوحظ أن العزلة AG3 كانت الأفضل لإنتاج أعلى كمية من الفيتامين مقارنة بالعزلة N9، وذلك في جميع الشروط المطبقة، كما كانت درجة الحرارة 30م° والحموضة pH=6 هي الأفضل لإعطاء أعلى كمية من الفيتامين بلغت 172.24 µg بوساطة *C.guilliermondii*. في حين عند تطبيق الدرجة 35م° لوحظ انخفاض في كمية الفيتامين وذلك في جميع درجات الحموضة المستخدمة وللعزلتين معاً.



مخطط (1): تأثير تغير درجات الحرارة وpH في كميات الفيتامين (مقدرة بـµg) الناتجة بوساطة العزلتين AG3, N9

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

نستنتج من هذا البحث:

1. تفوق العزلة *Candida guilliermondii* في قدرتها الإنتاجية لفيتامين الريبوفلافين على باقي العزلات التي تم الحصول عليها في هذا البحث.
2. كانت درجة الحرارة 30 م° و pH=6 هي المثلى لإنتاج أكبر كمية من الفيتامين بالنسبة لعزلتي الخمائر *Candida guilliermondii* و *Candida famata* .
3. لم تكن الدرجة 35 م° والدرجة pH=7 مثالية لإنتاج الفيتامين من العزلتين معاً.
4. كانت العزلة *Candida guilliermondii* الأفضل في إنتاج الفيتامين في جميع الشروط المدروسة.

التوصيات :

1-متابعة دارسة تأثير شروط بيئية أخرى في إنتاجية فيتامين الريبوفلافين.

2- دارسة تأثير بعض مصادر الكربون والآزوت في إنتاج الفيتامين.

3-عزل وتحديد أنواع أخرى من الخمائر ودراسة قدرتها الإنتاجية للفيتامين.

References:

1. Abbas, C. A., & Sibirny, A. A. *Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 75(2), 2011, 321-360.
2. Aguiar, T. Q., Silva, R., & Domingues, L. *Ashbya gossypii beyond industrial riboflavin production: A historical perspective and emerging biotechnological applications*. Biotechnology Advances, 33(8), 2015, 1774-1786.
3. Aguiar, T. Q., Silva, R., & Domingues, L. *New biotechnological applications for Ashbya gossypii: Challenges and perspectives*. Bioengineered, 8(4), 2017, 309-315.
4. Barnett, J. A. How yeasts are classified. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 2000.
5. Burkholder, P. R. *Synthesis of riboflavin by a yeast*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 29(6), 1943, 166-172.
6. Chaudhuri, S., Batabyal, S., Polley, N., & Pal, S. K. *Vitamin B2 in nanoscopic environments under visible light: photosensitized antioxidant or phototoxic drug?*. The Journal of Physical Chemistry A, 118(22), 2014, 3934-3943.
7. Demain, A. L. *Riboflavin oversynthesis*. Annual Reviews in Microbiology, 26(1), 1972, 369-388.
8. Dmytruk, K., Lyzak, O., Yatsyshyn, V., Kluz, M., Sibirny, V., Puchalski, C., & Sibirny, A. (2014). *Construction and fed-batch cultivation of Candida famata with enhanced riboflavin production*. Journal of Biotechnology, 172, 2014, 11-17.
9. Heefner, D. L., Boyts, A., Burdzinski, L., & Yarus, M. U.S. Patent No. 5,231,007. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 1993.
10. Jiménez, A., Santos, M. A., Pompejus, M., & Revuelta, J. L. *Metabolic engineering of the purine pathway for riboflavin production in Ashbya gossypii*. Applied and Environmental Microbiology, 71(10), 2005, 5743-5751.
11. Krymchantowski, A. V., Bigal, M. E., & Moreira, P. F. *New and emerging prophylactic agents for migraine.* CNS drugs, 16(9), 2002, 611-634.

12. Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. *Definition, classification and nomenclature of the yeasts*. In The yeasts, Elsevier, 1998, (pp. 3-5).
13. Ledesma-Amaro, R., Serrano-Amatriain, C., Jiménez, A., & Revuelta, J. L. *Metabolic engineering of riboflavin production in Ashbya gossypii through pathway optimization*. Microbial cell factories, 14(1), 2015, 1-8.
14. Lim, S. H., Choi, J. S., & Park, E. Y. M*icrobial production of riboflavin using riboflavin overproducers, Ashbya gossypii, Bacillus subtilis, andCandida famate: An overview*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 6(2), 2001, 75-88.
15. Mateos, L., Jiménez, A., Revuelta, J. L., & Santos, M. A. *Purine biosynthesis, riboflavin production, and trophic-phase span are controlled by a Myb-related transcription factor in the fungus Ashbya gossypii*. Applied and environmental microbiology, 72(7), 2006, 5052-5060.
16. Pessoa, M. D. L. A., Andrade, S. A. C., Salgueiro, A. A., & Stamford, T. L. M. *Utilization industrial waste from vegetal oils riboflavine production by candida guilliermondii DM 644*. Food Science and Technology, 23, 2003, 453-458.
17. Sabry, S. A., Ghanem, K. M., & Ghozlan, H. A. *Riboflavin production by Aspergillus terreus from beet-molasses.* MICROBIOLOGIA-MADRID-, 9, 1993, 118-118.
18. Silva, R., Aguiar, T. Q., Oliveira, R., & Domingues, L. *Light exposure during growth increases riboflavin production, reactive oxygen species accumulation and DNA damage in Ashbya gossypii riboflavin-overproducing strains*. FEMS yeast research, 19(1), 2019, foy114.
19. Stahmann, K. P., Revuelta, J. L., & Seulberger, H. *Three biotechnical processes using Ashbya gossypii, Candida famata, or Bacillus subtilis compete with chemical riboflavin production.* Applied Microbiology and Biotechnology, 53(5), 2000, 509-516.
20. Survase, S. A., Bajaj, I. B., & Singhal, R. S. *Biotechnological Production of Vitamins*. Food Technology & Biotechnology, 44(3), 2006.
21. Tanner Jr, F. W., Vojnovich, C., & Van Lanen, J. M. *Factors affecting riboflavin production by Ashbya gossypii*. Journal of Bacteriology, 58(6), 1949, 737-745.
22. Vandamme, E. J. *Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 53(4), 1992, 313-327.
23. Wang, L., Chi, Z., Wang, X., Ju, L., Chi, Z., & Guo, N. *Isolation and characterization of Candida membranifaciens subsp. flavinogenie W14-3, a novel riboflavin-producing marine yeast.* Microbiological research, 163(3), 2008, 255-266.
24. Wei, S., Hurley, J., Jiang, Z., Wang, S., & Wang, Y. *Isolation and characterization of an Ashbya gossypii mutant for improved riboflavin production*. Brazilian Journal of Microbiology, 43, 2012, 441-448.
25. Xin, Z., Pu, L., Gao, W., Wang, Y., Wei, J., Shi, T., ... & Guo, C. *Riboflavin deficiency induces a significant change in proteomic profiles in HepG2 cells.* Scientific reports, 7(1), 2017, 1-10.