فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۰، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۲۷- ۳۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۰۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۹

# جداسازی و شناسایی یک سویه تولیدکننده ریبوفلاوین از نکتارین

**رویا دانش‌آذری:** دانشجوی کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران، roya.danesh@yahoo.com
**محمد رعایایی اردکانی*:** استاد میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران، roayaei_m@yahoo.com
**حسین نجف‌زاده:** دانشیار فارماکولوژی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران، najafzadeh@scu.ac.ir

## چکیده

**مقدمه:** بسیاری میکروارگانیسم‌ها همچون قارچ‌ها، باکتری‌ها و مخمرها به طور ذاتی توانایی تولید ویتامین‌ها از جمله ویتامین B2 یا ریبوفلاوین را دارند. در این راستا پژوهش حاضر با هدف جداسازی و غربال‌گری مخمرهای تولیدکننده ریبوفلاوین از منابع مختلف خاک، برگ و میوه‌ها انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌هایی از برگ، خاک درختان و نیز انواع میوه‌ها به منظور بررسی حضور مخمرها و توانایی تولید ریبوفلاوین توسط آن‌ها تهیه شد. پس از خالص و غنی‌سازی نمونه‌ها، به منظور سنجش احتمالی تولید ریبوفلاوین از روش‌های اسپکتروفتومتر، کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا استفاده شد. در انتها، شناسایی جدایه برتر انتخابی با استفاده از تکنیک‌های رایج ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی انجام شد.

**نتایج:** در این تحقیق، ۲۶جدایه مخمری از نمونه‌های محیطی جداسازی شد که ۶ جدایه توانایی تولید ریبوفلاوین را نشان دادند. نتایج شناسایی جدایه برتر انتخابی به‌وسیله ویژگی‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی مشخص کرد که این جدایه وابسته به مخمر *کلاویسپورا لوسیتانیا* است و با توجه به جداسازی آن از میوه شلیل، این جدایه، *کلاویسپورا لوسیتانیا جدایه N3* (شماره ثبت ژن: JQ586258) نام‌گذاری شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** تنها یک جدایه از ۶ جدایه تولیدکننده، بررسی و شناسایی نهایی شد ولی بر رسی روی سایر جدایه هانشان داد که۲۳ در صدآن‌ها توان تولید را دارند. این نتیجه موید این مطلب است که کشور ایران پتانسیل لازم برای جدا سازی مخمرهای تولید کننده ریبو فلاوین را دارد.

**واژه‌های کلیدی:** جداسازی و شناسایی، تولید ریبوفلاوین، مخمر، *کلاویسپورا لوسیتانیا*

* نویسنده مسؤول مکاتبات

**مقدمه**

ویتامین‌ها، ترکیبات شیمیایی آلی شامل دو گروه محلول در چربی و محلول در آب هستند. این ترکیبات در کنترل فرآیندهای فیزیولوژی، رشد و سوخت و ساز موجودات نقش دارند. بنابراین، تامین مقادیر اندک آن‌ها در رژیم غذایی برای پیشگیری از بروز اختلال‌های شدید متابولیکی در بدن ضروری است(۱ و ۲).

ویتامین $B_2$ یا ریبوفلاوین یکی از ویتامین‌های خانواده B و وابسته به گروه فلاووآنزیم‌هاست که دارای دو شکل کوعاملی فلاوین مونو نوکلئوتید (FMN) و فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) است این دو ماده بخش پرروستاتیک بسیاری از آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند. از این‌رو ریبوفلاوین در رشد سلولی عملکرد آنزیمی و تولید انرژی نقش دارد. بنابراین، تامین روزانه ۱/۲ تا ۱/۶ میلی‌گرم از این ویتامین در رژیم غذایی به منظور پیشگیری از ایجاد عوارض کمبود، همچون ریزش مو، التهاب پوست، کاهش بینایی و اختلال در رشد ضروری است(۳ و ۴). اما با توجه به مشاهده گزارش‌هایی مبنی بر کمبود این ویتامین در افراد به علت رژیم غذایی نامناسب، تولید آن در صنعت به روش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی انجام شده و به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود (۵).

در ابتدا تولید تجاری ریبوفلاوین به شکل شیمیایی بوده‌است. تولید عوامل سمی طی انجام این فرآیند- که نیازمند تیمارهای ویژه پیش از ورود به محیط زیست برای پیشگیری از ایجاد آلودگی زیستی است- یکی از معایب بزرگ این روش به شمار می‌رود و موجب شده محققان توجه خود را به متابولیت‌های بیولوژیک معطوف کرده تا محصولات زیستی را از میکروارگانیسم‌ها تهیه کنند. در این میان ریبوفلاوین نیز به عنوان یکی از ترکیبات ضروری برای انسان و سایر موجودات از اهداف پژوهش‌های امروزی است(۲).

ریبوفلاوین، ویتامین منحصربه فردی است که توسط انواعی از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود. این میکروارگانیسم‌ها بر اساس میزان تولید به سه گروه قارچ‌ها (تولیدکنندگان قوی)، مخمرها (تولیدکنندگان متوسط) و باکتری‌ها (تولیدکنندگان ضعیف) تقسیم می‌کنند.

نخستین فرآیند تولید بیولوژیک با باکتری *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم* آغاز شد. این باکتری با استفاده از دانه مالت یا آب پنیر به عنوان سوبسترا، قادر به تولیدی در حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. اما طی مطالعات گیلرماند[۱] و همکاران و نیز ویکرهام[۲] و همکاران مشخص شد که به ترتیب قارچ‌های *ارموتسیوم آشبی* و *آشبیا گوسپی* توانایی تولید مقادیر بیشتری از این ویتامین را دارند. بنابراین، این دو قارچ، جایگزین باکتری یاد شده شدند(۳ و ۶). علاوه بر باکتری یاد شده، تاکنون تولید ریبوفلاوین در هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مطالعه شده است. بیشتر باکتری‌ها مانند *لاکتوباسیلوس پلنتاروم*[۳]، *لاکتوباسیلوس لاکتیس*[۴]، *میکروکوکوس لوتئوس*[۵]، *اشریشیا کولی*[۶]، *پروپیونی‌باکتریوم فردونریچی*[۷] و *مایکوباکتریوم فلی*[۸] این ویتامین را به میزان اندک تولید می‌کنند. اگرچه بیشترین میزان تولید طبیعی در میان باکتری‌ها به برخی سویه‌های *کلستریدیا* متعلق است، اما *باسیلوس سوبتیلیس* و *کورینه‌باکتریوم آمونیوژنز*[۹] از باکتری‌های تولیدکننده در میزان کم در شرایط طبیعی بوده که سویه‌های نوترکیب آن‌ها قادر به تولید در بازده بالا هستند(۱، ۷ و ۸). مخمرها به‌ویژه جنس *کاندیدا* از دیگر تولیدکنندگان این ویتامین هستند. این تولیدکنندگان متوسط، بر طبق فهرست ارائه

شده توسط دمین[10] در سال ۱۹۷۲ شامل: *کاندیدا فماتا*، *کاندیدا گیلرماندی*، *کاندیدا روبوستا*[11]، *دباروما یسس ساب گلوبوسوس*[12] و *کاندیدا قوشی*[13] هستند. امروزه با انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه، گونه‌هایی از جنس‌های دیگر همچون *پیشیا*[14]، *ساکاروما یسس*[15]، *ترولوپسیس*[16] و *هانسنولا*[17] به این فهرست افزوده شده‌است. تمامی مخمرها و باکتری‌ها باید بر اثر مهاری آهن در هنگام بیوسنتز غلبه نمایند اما این مهار در قارچ‌ها وجود ندارد (۲ و ۹). قارچ‌ها تولیدکنندگان قوی‌تری نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها به‌شمار می‌آیند و اثر مهار آهن در آن‌ها مشاهده نمی‌شود اما کوشش برای دستیابی به مخمرها و باکتری‌های تولیدکننده به علت سرعت رشد بیشتر، هزینه‌های کمتر و نیاز به محیط‌های رشد با پیچیدگی کمتر افزایش یافته‌است(۱). امروزه علاوه بر *آشبیا گوسپی*، مخمر *کاندیدا فماتا* و باکتری *باسیلوس سوبتیلیس*، میکروارگانیسم‌های دیگری هستند که برای تولید در مقیاس صنعتی استفاده می‌شوند(۳، ۵ و ۶).

بنابراین، اگرچه تولید شیمیایی چند دهه با موفقیت انجام می‌گرفت، اما در سال‌های اخیر فرآیندهای بیوتکنولوژی بسیاری برای جایگزینی تولید شیمیایی با تولید زیستی بررسی شدند. علت این امر، مزایای روش زیستی همچون استفاده از منابع تجدیدپذیر، کاهش پسماندها و همچنین، کاهش انرژی مصرفی و هزینه‌ها است(۱ و ۳).

بنابراین، با توجه به اهمیت ذکر شده برای ویتامین ریبوفلاوین و مطالعه محدود میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آن، هدف اصلی در این تحقیق جداسازی و غربال‌گری برخی مخمرهای تولیدکننده این ویتامین از منابع محیطی در نظر گرفته شد تا پتانسیل کشور در زمینه مخمرهای تولیدکننده بررسی شود.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه

نمونه‌هایی از برگ، خاک درختان و نیز انواع میوه‌ها به منظور بررسی حضور مخمرها و توانایی تولید ریبوفلاوین توسط آن‌ها تهیه شد. تمامی نمونه‌ها بلافاصله پس از نمونه‌برداری بر روی یخ نگهداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه نیز تا زمان جداسازی مخمرها، نمونه‌ها در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### محیط و شرایط کشت مخمرها

ابتدا غنی‌سازی نمونه‌ها در محیط YM broth با ترکیب عصاره مخمر، عصاره مالت، پپتون و دکستروز به ترتیب با مقادیر۳، ۳، ۵ و ۱۰ گرم در لیتر انجام شد. ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شدت هم‌زنی ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس، از محیط YGC agar[18] به منظور جداسازی اولیه مخمرها استفاده شد. پس از گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها به مدت ۷۲ تا ۹۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تایید کلونی‌های مخمری رشد یافته بر روی محیط با لام گرفتن و مشاهده در زیر میکروسکوپ، این کلونی‌ها در مورد توانایی تولید ریبوفلاوین بررسی شدند(۱۰ و ۱۱).

### بررسی تولید ریبوفلاوین

به منظور بررسی تولید ریبوفلاوین توسط مخمرهای جداسازی شده، ابتدا از محیط کشت پیش تولید YPD با ترکیب عصاره مخمر، پپتون و دکستروز با مقادیر ۱۰، ۲۰ و ۲۰ گرم در لیتر استفاده شد(۵). یک لوپ از مخمرهای تازه رشد یافته بر روی محیط YGC agar به محیط پیش تولید YPD تلقیح کرده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط فوق را به محیط تولید یاد شده در جدول ۱ تلقیح نموده و نمونه‌ها به مدت ۵ روز با شدت هم‌زنی ۱۷۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند.

جدول۱- ترکیبات محیط کشت تولید ریبوفلاوین

| نام ترکیب | گرم در لیتر |
|---|---|
| $(NH4)_2SO_4$ | ۵ |
| $KH_2PO_4$ | ۱ |
| $MgSO_4. 7H_2O$ | ۰/۵ |
| $CaCl_2. 2H_2O$ | ۰/۱ |
| عصاره مخمر | ۲ |
| سوکروز | ۲۰ |
| کلرید سدیم | ۰/۱ |

**سنجش تولید ریبوفلاوین در محیط**

به منظور سنجش ریبوفلاوین تولیدی، از محیط کشت تولید تحت شرایط استریل نمونه‌گیری کرده و سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس، سوپرناتانت برای بررسی تولید کیفی و کمی ویتامین استفاده شد. در ابتدا جذب سوپرناتانت در طول موج ۴۴۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر آنالیتیکژنا[۱۹] خوانده شد؛ اما به علت آن که طول موج انتخابی، برای ریبوفلاوین اختصاصی محسوب نمی‌شود از روش‌های کروماتوگرافی برای تایید حضور این ویتامین در محیط تولید استفاده شد(۱۴). کروماتوگرافی لایه نازک با نمونه‌گذاری بر روی پلیت‌های کروماتوگرافی ساخت شرکت مرک[۲۰] و با استفاده از تانک حاوی n-بوتانول، استیک‌اسید و آب مقطر با نسبت ۱:۴:۴ حجمی/ حجمی به عنوان فازهای حلال انجام شد. زمانی که حلال نزدیک به انتهای پلیت رسید، پلیت از تانک خارج و خشک شد. سپس، بررسی نقاط با استفاده از نور ماورای بنفش در طول موج ۲۵۴ نانومتر و با استفاده از دستگاه آشکارساز UV شرکت دزاجا[۲۱] انجام شد. پس از آن، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (شرکت شیمادزو[۲۲]) استفاده شد که در این مرحله ۱ میلی‌لیتر محلول از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی عبور داده و سپس ۲۰ میکرولیتر از این محلول فیلتر شده با سرنگ میکرولیتری هامیلتون به دستگاه تزریق شد. اساس آزمایش سنجش ریبوفلاوین استفاده از جذب در ۲۵۴ نانومتر، استفاده از فاز معکوس با سیستم متانول و آب (به نسبت حجمی ۳۰ به ۷۰) با جریان حلال ۱ میلی‌لیتر در دقیقه در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد است. با مقایسه زمان ماندگاری نمونه‌های مجهول نسبت به نمونه‌های استاندارد، ریبوفلاوین را شناسایی کرده و با توجه به سطح زیر منحنی پیک‌ها بر اساس منحنی‌های استاندارد مربوطه، غلظت تعیین شد(۱۲ و ۱۳).

**شناسایی مخمر**

شناسایی مخمرها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، رشد و ویژگی‌های بیوشیمیایی آن‌ها از جمله توانایی تخمیر و جذب هیدرات‌های کربن و نیز شناسایی مولکولی انجام می‌گیرد. آزمون‌های بیوشیمیایی بر اساس مطالعات کارتزمن[۲۳] و استخراج ژنوم به روش هافمن[۲۴] انجام شد. با توجه به منابع معتبر موجود، جفت پرایمری که توالی آن‌ها در زیر آورده شده است، انتخاب و در واکنش زنجیره ای پلیمراز به کار گرفته شدند(۱۵ و ۱۶).

پرایمر رفت (۱۹ باز)

3′ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 5′

پرایمر برگشت (۲۰ باز)

3′ TCCTCCGCTTATTGATATGC 5′

پس از استخراج ژنوم به روش هافمن و با استفاده از دو پرایمر عمومی ذکر شده، واکنش زنجیره پلیمراز به روش زیر در دستگاه ترمال‌سایکلر بایورد[۲۵] انجام شد: دمای دناتوره شدن اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان آن ۵ دقیقه بود. ۳۶ سیکل شامل: ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵/۶ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد

انجام شد. پس از این مراحل، ۱۰ دقیقه دما در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور تکمیل سنتز DNA نهایی نگه داشته شد. پس از انجام واکنش زنجیره پلیمراز، به منظور تایید تکثیر ژنوم و تعیین اندازه قطعه تکثیر یافته، الکتروفورز روی ژل آگاروز و در نهایت تعیین توالی انجام شد و سپس نتیجه حاصل در سایت NCBI، BLAST شد(۱۵).

## نتایج

### جداسازی مخمرها

به طور کل ۲۶ جدایه مخمری از نمونه‌ها به دست آمد که به تفکیک تعداد مخمرهای جداسازی شده و نیز تعداد تولیدکنندگان در میان این جدایه‌ها در جدول ۲ مشاهده می‌شوند. بیش‌ترین تعداد مخمر جداسازی شده و نیز بیش‌ترین تعداد جدایه تولیدکننده از خاک است. اما همانگونه که در ادامه بیان می‌شود بهترین تولیدکننده از میوه جداسازی می‌شود.

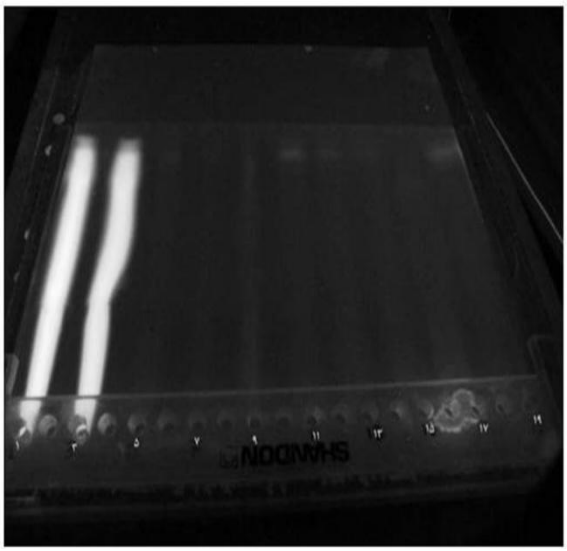
جدول۲- تعداد مخمرهای جداسازی‌شده و تولیدکننده ریبوفلاوین از منابع مختلف

| نوع نمونه | تعداد مخمرهای جداسازی شده | تعداد مخمرهای تولیدکننده |
|---|---|---|
| خاک اطراف درختان میوه | ۱۲ | ۴ |
| برگ انواع درختان میوه | ۱۱ | ۱ |
| انواع میوه | ۳ | ۱ |

### غربال‌گری مخمرهای تولیدکننده ریبوفلاوین

در ابتدا بر اساس اسپکتروفتومتر تنها ۶ جدایه توانایی تولید ریبوفلاوین را نشان دادند که به علت عدم اختصاصیت طول موج انتخابی، در ادامه با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تولید توسط این جدایه‌ها تایید شد.

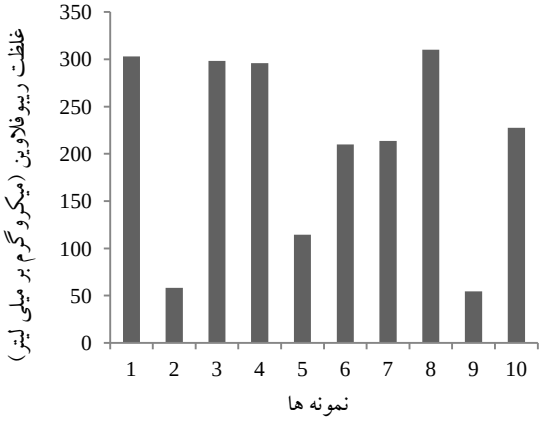
نتایج حاصل از کروماتوگرافی لایه نازک در شکل ۱ مشاهده می‌شود. نمونه‌های شاهد، رقت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ریبوفلاوین خالص تهیه شده از شرکت سیگما[۲۶] هستند و با مقایسه نمونه‌های مجهول با شاهد، تولید یا عدم تولید بررسی می‌شود. همچنین، با مقایسه تراکم و نحوه توزیع باندهای حاصل، می‌توان به طور کیفی میزان تولید را مقایسه کرد.



شکل۱- آشکارسازی باندهای حاصل از TLC با مشاهده در زیر نور ماورای بنفش باطول موج ۲۵۴ نانومتر
۳، ۱: شاهد؛ ۱۹، ۱۳، ۱۱: نمونه‌های مثبت ؛ ۱۷، ۱۵، ۹، ۵: نمونه‌های منفی

به منظور دستیابی به نتایج دقیق‌تر می‌توان تحلیل کمی توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی انجام داد. در این تکنیک ابتدا با تزریق غلظت‌های استاندارد و دستیابی به مساحت سطح زیر پیک، منحنی استاندارد رسم کرده و معادله خطی به دست آورده که در نهایت با قرار دادن مساحت سطح زیر پیک نمونه‌های مجهول در این معادله می‌توان به مقادیر کمی تولید، دست یافت. غلظت ریبوفلاوین تولیدی حاصل از برخی جدایه‌ها در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

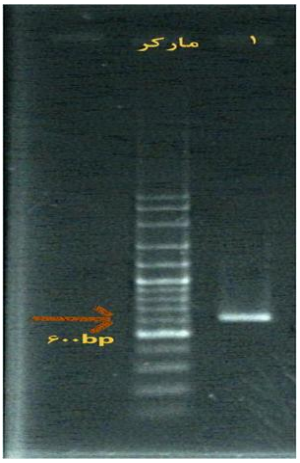
اگرچه در این شکل به نظر می‌رسد که ۴ جدایه ۱، ۳، ۴ و ۸ تولید مشابهی دارند اما تحلیل نهایی نتایج حاصل از تکنیک‌های ذکر شده، جدایه جداسازی شده از میوه شلیل را بهترین تولیدکننده مشخص نمود. بنابراین، در گام بعدی شناسایی این جدایه انجام شد.




شکل ۲- غلظت ریبوفلاوین در نمونه‌های موردآزمون

**شناسایی جدایه برتر تولیدکننده ریبوفلاوین**

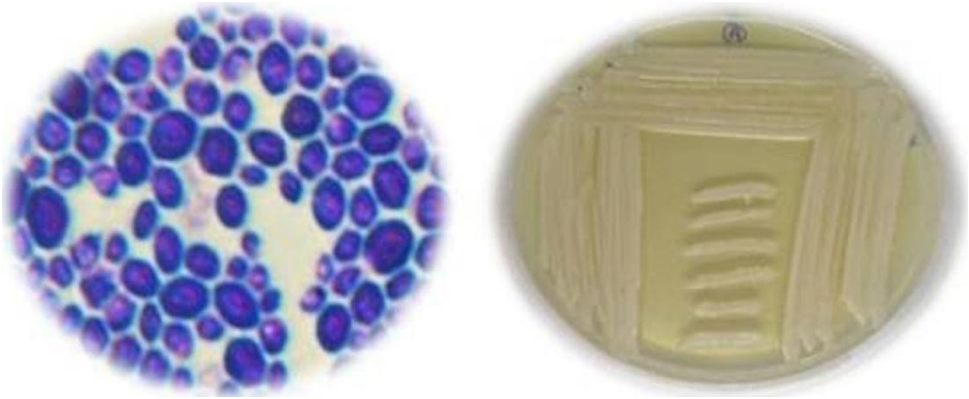
شناسایی اولیه این مخمر بر اساس ویژگی‌های کلونی بر روی پلیت و آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شد. سلول‌های تخم مرغی شکل، کرم رنگ، کدر با حاشیه چروک (شکل۳) از ویژگی‌های ریخت‌شناسی این مخمر بوده که همراه با بررسی آزمون‌های بیوشیمیایی ذکر شده در جدول۳ و نیز تعیین توالی ژنوم تکثیریافته (شکل ۴) مشخص شد که این جدایه بیشترین شباهت را به *کلاویسپورا لوسیتانیا*[۲۷] داراست.




شکل۴- الکتروفورز محصول زنجیره‌ای پلیمرازجدایهN3

جدول۳ - نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه N3

| آزمون | ترکیب | N3 |
|---|---|---|
| تخمیری | مالتوز | + |
| | گالاکتوز | + |
| | لاکتوز | _ |
| | گلوکز | + |
| | سوکروز | + |
| جذب | مانیتول | + |
| | رافینوز | _ |
| | سالیسین | + |
| | اینوزیتول | _ |
| | اینولین | _ |
| | تره‌هالوز | + |
| | آرابینوز | _ |
| ژلاتین | | _ |



شکل۳- شکل میکروسکوپی (X۴۰) و پلیت جدایه N3

## بحث و نتیجه‌گیری

هر چند اکثر مطالعات در زمینه افزایش میزان تولید و بررسی موتاسیون‌های مولکولی در یک‌سری میکروارگانیسم‌های خاص همچون قارچ فیلامنتی آشبیا گوسپی، مخمر کاندیدا فماتا و باکتری باسیلوس سوبتیلس است، اما در این میان تحقیقاتی نیز در زمینه دستیابی به دیگر سویه‌های مناسب تولیدکننده انجام می‌شود. چنان که در گزارش انجام شده توسط وانگ[۲۸] و همکاران، جدایه مخمری معرفی شد که برای نخستین بار از دریا جدا شده و قادر است بر اثر مهاری آهن غلبه کند(۵). بدیهی است گزارش‌هایی از این گروه می‌تواند به افزایش تولید بیولوژیک این ویتامین کمک کند. بنابراین، بررسی تولید ریبوفلاوین از منابع مختلف محیطی در این پژوهش در نظر گرفته شد.

به منظور جداسازی مناسب مخمرها باید درنظر داشت که ویژگی‌های فیزیکی- شیمیایی محیط، یک عامل مهم اکولوژیک برای تعیین زیستگاه آن‌هاست. این ویژگی به همراه ویژگی‌های تغذیه‌ای در تنوع زیستگاه مخمرها نقش دارد. جداسازی انواعی از جنس‌های مخمری از میوه و سبزیجات (مارتینی[۲۹] و همکاران و چانچای‌چاویوات[۳۰] و همکاران)، خاک (سوزوکی[۳۱] و همکاران، لیترز[۳۲] و همکار و مارگارت[۳۳])، محصولات لبنی (ساووا[۳۴] و همکار)، آب (وانگ و همکاران) گزارش شده‌است(۵، ۱۵، ۱۷ و ۱۸). این گزارش‌ها و مواردی مشابه آن‌ها، بیانگر تنوع گستردگی مخمرها در طبیعت بوده است. بر این اساس، منابع محیطی در این مطالعه، به شکل تصادفی انتخاب شده که با توجه به تنوع ذکر شده، جداسازی مخمرها از منابع محیطی انتخابی دور از انتظار نیست و با نتایج حاصل از مطالعات سایر پژوهشگران هم‌خوانی دارد.

جدایه شناسایی شده در این تحقیق ابتدا در سال ۱۹۷۹ توسط هولزچو[۳۵] و همکاران به عنوان میکروارگانیسم بیماری‌زای فرصت‌طلب شناسایی شد و تاکنون در موارد متعددی جداسازی آن از نمونه‌های بیماری‌زا گزارش شده‌است (۹، ۱۹ و ۲۰). البته باید توجه داشت این مخمر، سویه صرفا بیماری‌زا نیست و جداسازی آن از نمونه‌های غیرکلینیکی مانند پوست مرکبات همچون لیمو، میوه درختان گلابی و آگاو و ریشه کاکتوس و محصولات لبنی محلی مصر توسط سائوتا[۳۶] و همکاران، والدز[۳۷] و همکاران، ال شارود[۳۸] و همکاران گزارش شده است (۲۱- ۲۳). همچنین، نقش مفید آن مانند تولید آسکوربیک‌اسید و یا استفاده در فرآوری برخی مواد خوراکی همچون پنیرهای قالبی و فشرده بررسی شد(۲۴). در این مطالعه، با توجه به نتایج بیوشیمیایی و مولکولی مشخص شد که میوه شلیل می‌تواند یکی دیگر از منابع جداسازی این گونه از *کلاویسپورا* با قابلیت تولید ریبوفلاوین باشد که این توانایی بیانگر اثر مفید دیگر این جدایه است.

ذکر این نکته در خور توجه است که بر اساس بررسی‌های انجام شده در منابع قابل دسترس، گزارشی از تولید ویتامین توسط این جدایه مشاهده نشد. در توجیه این مشاهده می‌توان به گزارش بارنز[۳۹] و همکاران استناد کرد که بر اساس مطالعات آن‌ها، *کاندیدا گیلرماندی* از لحاظ تشابه ژنی، نزدیکترین سویه به *کلاویسپورا لوسیتانیا* است. علاوه بر آن با توجه به این که گونه‌های جنس *کاندیدا* از مهم‌ترین مخمرهای تولیدکننده ریبوفلاوین هستند(۹)، می‌توان به این نتیجه رسید که توانایی تولید ریبوفلاوین در این گونه، که این مطالعه به آن دست یافته است، یکی از ویژگی‌هایی است که دور از نظر نست اما تایید نهایی و اثبات این مطلب نیازمند پژوهش‌های بیشتر است.

## References


(1) Burgess CM, Smid E, Sinderen D. Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. *International Journal of Food Microbiology* 2009; 133(1): 1-7.

(2) HanLim S, Choi JS, Park EY. Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: An Overview. *Biotechnology Bioprocess Engineering*. 2001; 6(2):75-88.

(3) Alosta HA. Riboflavin production by encapsulated *Candida flarei* [Dissertation]. Oklahama: Oklahoma State University; 2007.

(4) Vergani L, Barile M, Angelini C, Burlina A, Nijtmans L, Pia Freda M, et al. Riboflavin therapy biochemical heterogeneity in two adult lipid storage myopathies. *Brain Journal* 1999; 122(12): 2401-11.

(5) Wang L, Chi Z, Wang Z, Ju L, Ning G. Isolation and characterization of Candida membranifaciens subsp. flavinogenie W14-3 a novel riboflavin-producing marine yeast. *Microbiological Research* 2008; 163(3): 255-66.

(6) Stahmann K, Revuelta JL, Seulberger H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied microbial biotechnology* 2000; 53(5): 509-16.

(7) Kuizomi S, Yonetani Y, Maruyama A, Teshiba S. Production of riboflavin by metabolically *Corynebacterium ammoniagenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2000; 53(6): 674-79.

(8) Perkins JB, Sloma A, Hermann T, Zachgo E, Pero J. Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1999; 22(1): 8-18.

(9) Kurtzman CP, Fell JW. *The yeast:a taxonomic study*. 4th ed. Netherlands: Elsevier press; 1998.

(10) KeeSun S, Yong S, Jung HY, Yong P. *Candida thermophila* sp. nov. , a novel thermophilic yeast isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001; 51(6): 2167–70.

(11) Soon H, Kang HL, Jangyul K, Kyung B. Diversity of yeasts associated with *Panax ginseng*. *Journal of Microbiology* 2006; 44 (6): 674-79.

(12) Kealy D, Haies J. *Analytical chemistry*. 1st ed. Oxford: Scientific Publisher; 2001.

(13) Osman H, Jee Chee M. Sensitivity of UV detection in simultaneous separation and detection of B-vitamins using HPLC. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* 2000; 7(1): 251-55.

(14) Rucker RB, Suttie J, McCormick DB, Machlin L. *Handbook of vitamins*. 3rd ed. NewYork: Marcel Dekker Inc; 2001.

(15) Chanchaichaovivat A, Ruenwongsa P, Panijpan B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control* 2007; 42(3): 326-35.

(16) Covadonga R, Jacqueline K, Friedrich ML, Goodrich M, Parish ME. Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68(4): 1955-61.

(17) Martini A, Kurtzman CP, Meyer S, Oneill B. Two new species in *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp, nov. , the ascorporic state of *Candida fermentati* and *Candida carpophilba* comb, nov. yeast. *Research* 2004; 5(4): 463-9.

(18) Savova I, Nikolova M. Isolation and taxonomic study of yeast strains from bulgarian dairy products. *Journal of Culture Collections* 2002; 3(1): 59-65.

(19) Merz WG, Khazan U, Jabra M, ChiWu L, Osterhout G, Lehmann PF. Strain delineation and epidemiology of *Candida (Clavispora) lusitaniae*. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30(2): 449-54.

(20) Noel T, Favel A, Goumar A, Fallague K, Chastin Ch, Leclerc F. Differentiation between atypical isolates of *Candida Lusitaniae* and *Candida pulcherrima* by determination of mating type. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(3):1430-32.

(21) El-Sharoud WM, Belloch C, Peris D, Querol A. Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. *Journal of Food Science* 2009; 21(2): 380-86.

(22) Sahota PP, Kaur D, Pandove G. Studies on the preparation of low alcoholic naturally carbonated blended beverage from guava and lemon. *International Journal of Safety*. 2010; 12: 165-80.

(23) Valdez AV, Garcia LS, Kirchmayr M, Cria R, Mathis AG. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Springer Science* 2011; 10(4): 258-64.

(24) Graham H. F. *Yeasts in food and beverages*. 1st ed. Germany: Springer; 2006.

---

[1]. Guilliermond
[2]. Wickerham
[3]. *Lactobacillus plantarum*
[4]. *Lactobacillus lactis*
[5]. *Micrococcus luteus*
[6]. *Escherichia coli*
[7]. *Propionibacterium freudenreichii*
[8]. *Mycobacterium pheli*
[9]. *Corynebacterium ammoniagenes*
[10]. Demain
[11]. *Candida robusta*
[12]. *Debaromyces subglobosus*
[13]. *Candida ghoshii*
[14]. *Pichia*
[15]. *Saccharomyces*
[16]. *Torulopsis*
[17]. *Hansenula*
[18]. Yeast extract Glucose Chloramphenicol agar
[19]. Analyticjena
[20]. Merck
[21]. Desaga
[22]. Shimadzu
[23]. Kurtzman
[24]. Huffmann
[25]. Biorad
[26]. Sigma
[27]. *Clavispora lusitaniae*
[28]. Wang
[29]. Martini
[30]. Chanchaichaovivat
[31]. Suzuki
[32]. Leathers
[33]. Margaret
[34]. Savova
[35]. Hulzcho
[36]. Sahota
[37]. Valdez
[38]. El-Sharoud
[39]. Barns

# Isolation and identification of a riboflavin producer yeast from Nectarine

**Roya Daneshazari**
M.Sc. of Microbiology, Shahid Chamran university, Ahvaz, Iran, roya.danesh@yahoo.com
**Mohammad Roayaei** *
Associate Professor of Microbiology, Shahid Chamran university, Ahvaz, Iran, roayaei_m@yahoo.com
**Hossein Najafzadeh**
Associate Professor of Pharmacology, Shahid Chamran university, Ahvaz, Iran, najafzadeh@scu.ac.ir

## Abstract

**Introduction**: Many microorganisms like fungi, bacteria and yeasts, have a natural ability to produce vitamins included vitamin B2 or riboflavin. In this regard, the present study was performed to isolation and screening for riboflavin producing yeasts from various sources of soil, leaf and fruits.

**Materials and method**s: samples of leaf, soil and fruits were prepared for the presence of yeasts and by its ability to produce riboflavin. After purification and enrichment of samples, in order to assay riboflavin production, spectrometry, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography were used. Finally, the best selected isolate was identified using conventional morphological, biochemical and molecular techniques.

**Results**: In this study, 26 yeast strains were isolated from environmental samples, that 6 isolates showed the ability to produce riboflavin. Identification results of the best selected isolate by biochemical and phenotypic characteristics revealed that this isolate is related to *Clavispora lusitaniae* and considering isolation of it from nectarine, has named it *Clavispora lusitaniae strain N3* (Gene accession no: JQ586258 ).

**Discussion and conclusion:** Although only one of the six producing strains was studied and identified, observation of ability to produce among 23% of strains showed necessity for further investigation. And according to the result of absence of viewing report about production by investigated strain, it can be said that Iran has potentiality for isolation of yeasts and is capable of producing riboflavin.

**Key words:** Isolation and identification, Riboflavin production, Yeast, *Clavispora lusitaniae*

* Corresponding author
**Received:** July 28, 2013 / **Accepted:** December 10, 2013