

Nilofar Chaharmahali¹,
Abass Akhavan Sepahi^{1*},
Mohammad Reza Awwadi²

1. Department of Microbiology,
School of Biology Sciences,
North Tehran Branch, Islamic
Azad University, Tehran, Iran

2. Department of
Nanotechnology,
Pharmaceutical Sciences
Branch, Islamic Azad
University, Tehran, Iran

Comparison of the Native *Bacillus subtilis* and *Bacillus Megaterium* Strains Isolated from Soil in Production of Riboflavin

Received: 25 Jun. 2016 ; Accepted: 1 Jul. 2017

Abstract

Background and Objectives: Vitamin B2 (riboflavin) is a water-soluble vitamin and yellow. The aim of this study is to identify strains of *Bacillus* isolated from soil do with the ability to produce riboflavin by PCR.

Materials and Methods: Soil samples was mild randomly during 2 consecutive days the air. Sampling was performed of areas far from the sun and from 3 to 10 cm soil depth. The genus *Bacillus* were identified to species level using standard methods. Also isolates were approved identified using the PCR method. To study the riboflavin production of synthetic culture media were used and HPLC techniques.

Result: PCR using gene 16SrRNA test results showed that 32 strains obtained from a strain of *Bacillus subtilis* and 10 were 2 strain of *Bacillus megaterium*. The isolated strains of *Bacillus megaterium* PTCC 1250 with standard strains were positive of riboflavin production in synthetic medium and HPLC.

Conclusions: *Bacillus subtilis* bacteria living in the soil among the most important role in the production of riboflavin and riboflavin-producing strains to confirm the use of molecular methods is necessary.

Keywords: *Bacillus* species, Riboflavin, 16SrRNA

*Corresponding Author:
Department of Microbiology, School
of Biology Sciences, North Tehran
Branch, Islamic Azad University,
Tehran

Tel: 0912-1547166
E-mail: Akhavansepahy@gmail.com

مقایسه سویه‌های بومی باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس مگاتریوم جداشده از خاک در تولید ویتامین ریوفلاوین

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۴/۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: ویتامین B₂ (ریوفلاوین) یک ویتامین زردرنگ و محلول در آب می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه شناسایی سویه‌های باسیلوس جداشده از خاک با توانایی در تولید ریوفلاوین با روش PCR می‌باشد. **روش بررسی:** نمونه‌برداری از خاک به صورت تصادفی طی ۲ روز متمادی در هوایی معتدل صورت گرفت. نمونه‌برداری از مناطق دور از آفتاب و از عمق ۳ تا ۱۰ سانتی‌متری سطح خاک انجام شد. سپس جنس باسیلوس با استفاده از روش‌های استاندارد تا سطح گونه شناسایی شدند. همچنین ایزوله‌های شناسایی شده با استفاده از روش مولکولی PCR مورد تأیید قرار گرفتند. جهت بررسی تولید ریوفلاوین از محیط کشت سنتتیک و تکنیک HPLC استفاده گردید. **یافته‌ها:** نتایج آزمون PCR با استفاده از ژن 16SrRNA نشان داد که از مجموع ۳۲ سویه به‌دست‌آمده تعداد ۱۰ سویه باسیلوس سوبتیلیس و ۲ سویه باسیلوس مگاتریوم بودند. این سویه‌های جداسازی شده به همراه سویه استاندارد باسیلوس مگاتریوم PTCC 1250 از نظر تولید ریوفلاوین در محیط کشت سنتتیک و HPLC مثبت بودند. **نتیجه‌گیری:** در میان باکتری‌های ساکن خاک باسیلوس سوبتیلیس بیشترین نقش را در میزان تولید ریوفلاوین داشته و به‌منظور تأیید سویه‌های تولیدکننده ریوفلاوین استفاده از روش مولکولی ضروری به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: گونه‌های باسیلوس، ریوفلاوین، 16SrRNA

نیلوفر چهارمحالی^۱، عباس اخوان سپهری^۲، محمد رضا عوادی^۲

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
^۲دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
^۳استادیار، گروه نانو تکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۰۹۱۲-۱۵۴۷۱۶۶

E-mail: Akhavansepahy@gmail.com

مقدمه

می‌کنند، استفاده می‌شود.^{۱۰} جنس باسیلوس شامل باکتری‌هایی است میله‌ای، هوازی و گرم مثبت. بسیاری از اعضای این جنس به صورت ساپروفیت در خاک، آب، هوا و سبزی‌ها دیده می‌شوند و از میکروارگانیسم‌های تولیدکننده ویتامین B₂ (ریبوفلاوین) هستند. بهترین منابع ریبوفلاوین شامل مخمر آب جو، بادام، گوشت، غلات، سبوس گندم، قارچ، سویا، شیر و اسفناج می‌باشد. ریبوفلاوین در اثر نور و قلیا نظیر جوش شیرین از بین می‌رود. برای حفظ محتوای ریبوفلاوین غذاها بایستی آن‌ها را دور از نور قرار داد ریبوفلاوین عمدتاً به وسیله آسکومیسیت‌های رشته‌ای تولید می‌شوند و این قارچ‌ها تولیدکننده انبوه هستند.^{۱۱} هدف از انجام این مطالعه شناسایی سویه‌های باسیلوس جدا شده از خاک با تکیه بر توانایی آن‌ها در تولید ریبوفلاوین به کمک روش PCR می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی-مقطعی مقدار ۲۰۰ گرم خاک از عمق ۱۰ سانتی متری به طور تصادفی و در مجموع تعداد ۱۰۰ نمونه خاک از مناطق مختلف شهر تهران شامل پارک‌های جنگلی چیتگر، لاله، ملت و پردیسان و از مکان‌های دور از نور خورشید در شرایط استریل درون کیسه‌های پلاستیکی جمع‌آوری گردید. سپس بر اساس پروتوکول تأیید شده توسط WHO، ۵ گرم از خاک را در فویل آلومینیومی در ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ ساعت در آن خشک گرمخانه‌گذاری نمودیم. سپس به ۱ گرم از نمونه خاک ۱۰ میلی‌لیتر سرم نمکی (W/V85%) اضافه نموده و ورتکس شد. ۱ میلی‌لیتر از این محلول در ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ دقیقه گرمخانه‌گذاری و سپس ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده و رقت‌های ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۳} از آن تهیه و ۰/۱ از هر نمونه به روش پورپلیت و بر روی محیط لوریا آگار (شرکت مرک کشور آلمان) کشت داده و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، کلنی‌های مشکوک به باسیلوس جداسازی و ایزوله‌ها از نظر تست بیوشیمیایی و میکروبیولوژی نظیر از رنگ‌آمیزی گرم و اسپور (مالاشیت گرین)، کاتالاز، نشاسته، مانیتول، کازئین، اوره آز، سیرتات، MRVP و ژلاتیناز استفاده شد. باسیلوس مگاتریوم PTCC 1250 تهیه شده از سازمان علمی و پژوهشی صنعتی ایران، به‌عنوان

ویتامین‌ها گروهی از مواد شیمیایی هستند که فرایندهای فیزیولوژیک را کنترل کرده و بر روی آن‌ها تأثیرگذارند، ضمن اینکه برای متابولیسم و رشد حیوانات به‌ویژه پستانداران ضروری می‌باشند.^۱ اساساً ویتامین‌ها بر اساس حلالیت به دو گروه ویتامین‌های محلول در چربی (A, D, E K) و ویتامین‌های محلول در آب شامل B₁₂ (سیانوکوبالامین)، B₉ (اسید فولیک)، B₇ (بیوتین)، B₆ (پیریدوکسین)، B₅ (پانتوتیک اسید)، B₃ (نیاسین)، B₂ (ریبوفلاوین)، B₁ (تیامین) و C (اسید آسکوربیک) می‌باشند.^۲ ریبوفلاوین با فرمول شیمیایی C₁₇H₂₀N₄O₆ و نام ۸و۷ دی متیل ۱۰-دی-ریبوز-۳و۲و۴و۵ تتراهیدروکسی فنیل-ایزوالوکسازین، زردرنگ و با حلالیت پایین در آب شناخته می‌شود.^۳ این ویتامین به وسیله میکروارگانیسم‌ها سنتز می‌شود ولی مهره‌داران توانایی سنتز این ویتامین را ندارند.^۴ ریبوفلاوین جزء اصلی کوآنزیم‌های فلاوین مونونوکلوئید (FMN) و فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) می‌باشد. هر دو کوآنزیم واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء غیر آنزیمی از طریق ناقل دهیدروژنه‌کننده‌ی درگیر در سیستم تولید ATP را کاتالیز می‌کنند، بنابراین ریبوفلاوین برای متابولیسم سلولی و تنفس ضروری است.^۵ هایپرپیلی روبینمی نوزادی یا زردی، سردردهای میگرنی، مشکلات پوستی از قبیل آکنه مخصوصاً آکنه روزاسه، ورم پوست، آگزما، و زخم‌ها با مصرف مکمل‌های ریبوفلاوین بهبود می‌یابد.^۶ ریبوفلاوین با کمک روش‌های اسپکتروفتومتری با UV در طول موج ۴۴۵ نانومتر^۷، اسپکتروفتومتری فلورسانس با طول موج ۴۴۰ نانومتر^۸ و HPLC (۹) قابل اندازه‌گیری می‌باشد. گونه‌های مختلفی از باکتری‌ها توانایی تولید ریبوفلاوین را دارند از جمله کلستریدیوم/استوبوتیلیکوم، اما از این ارگانیسم به علت حساسیت زیاد به آهن نمی‌توان در صنعت استفاده کرد، همچنین کاندیدا/ریبوفلاوین که به میزان ۶۰۰ mg/l ریبوفلاوین تولید می‌کند اما این ارگانیسم نیز به علت حساسیت زیاد به آهن مناسب نیست. برای رسیدن به تولید ریبوفلاوین در *Bacillus subtilis* سنتز پورین نامنظم است و یک موتاسیون در فلاووکیناز FAD سنتتاز ضروری است. یک آنالوگ ساختمانی ریبوفلاوین، رزوفلاوین برای گزینش *Bacillus subtilis* جهش‌یافته که به مقدار فراوان ریبوفلاوین تولید

سویه استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور شناسایی مولکولی سویه‌های تولیدکننده ریپوفلاوین، ابتدا DNA ژنومی سویه‌ها با استفاده از کیت CinnPure-DNA (Cell culture, Tissues, Gram Positive Bacteria and CSF) (سیناکلون، ایران) استخراج گردید. از پرایمرهای یونیورسال مورگان جهت تکثیر ژن ۱۶S rRNA با توالی‌های معلوم و شامل

R= 5'- CCAGCAGCCGCGTAATACG-3'

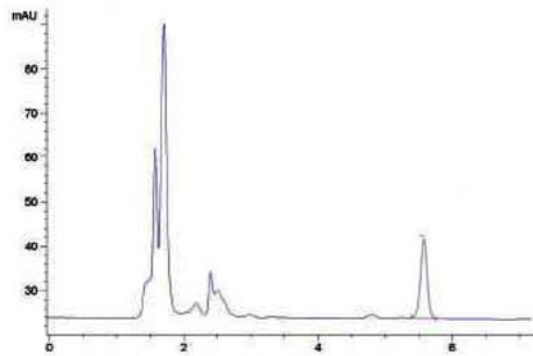
TACCAGGGTATCTAATCC-3' در سویه‌های باسیلوس استفاده شد که طول قطعه حاصل از تکثیر ۲۸۲ bp بود. جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه فتوایومتر (Bio-Rad, USA) استفاده گردید. در نهایت، واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۵/۵ میکرو لیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی (Taq DNA polymerase (0.05 U/μl، 3 MgCl₂ mM) و dNTPs (0.4mM، ۰/۸ میکرو لیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرو مولار، ۰/۷ میکرو لیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۴ میکرو لیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از گرایانت ترموسایکلر (پندورف، آلمان) برای ۳۵ سیکل به صورت زیر انجام گرفت: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله طولی سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه. برای اطمینان از انجام واکنش زنجیر پلیمرز الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ در شرایط ۱۰۰ ولت در بافر TBE 1X انجام و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، DNA در زیر نور (UV) در دستگاه Gel doc، مشاهده و عکس برداری شد.

محیط کشت اختصاصی جهت تولید ریپوفلاوین با این ترکیبات ساخته و مورد استفاده قرار گرفت، این محیط شامل ترکیبات: ۲۵ گرم گلوکز، ۰/۶ گرم KH₂PO₄، ۰/۲۶ گرم 7H₂O، ۰/۶ گرم MgSO₄، ۰/۶ گرم ZnSO₄ و ۱۰٪ بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر ۷ می باشد که در آزمایشگاه ساخته شد. این محیط به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، تحت شرایط تک آن‌های آرام با سرعت ۱۰۰ rpm در شرایط هوازی قرار داده شد. تولید ریپوفلاوین در محیط کشت برات بعد از ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت جلوگیری از اکسیداسیون ریپوفلاوین محیط‌های کشت در شرایط تاریکی نگهداری شدند. به منظور تشخیص ریپوفلاوین

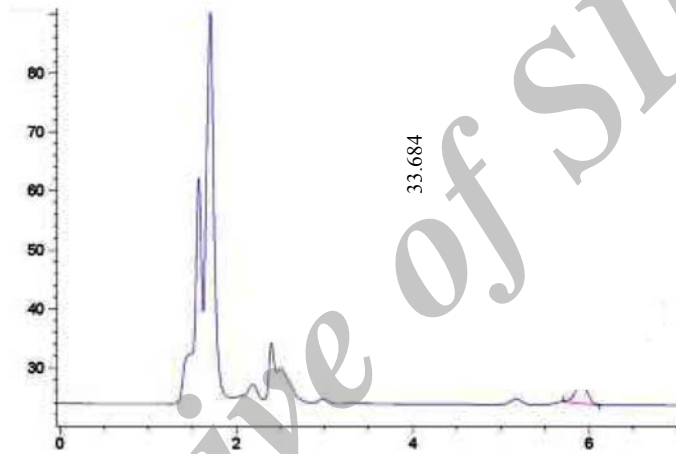
تولید شده از روش HPLC (مدل SERIES ۱۲۰۰ ALEGRIT) استفاده شد. فاز متحرک (Mobile phase) محلول آمونیوم استات و الکل با نسبت ۷۰:۳۰ و نسبت شاره (Flow rate) یک میلی لیتر در دقیقه بود. زمان بازداری (Retention time) ۵-۶ دقیقه محاسبه گردید. ^{۱۲} در نهایت داده‌ها با Anova Test بررسی و تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها

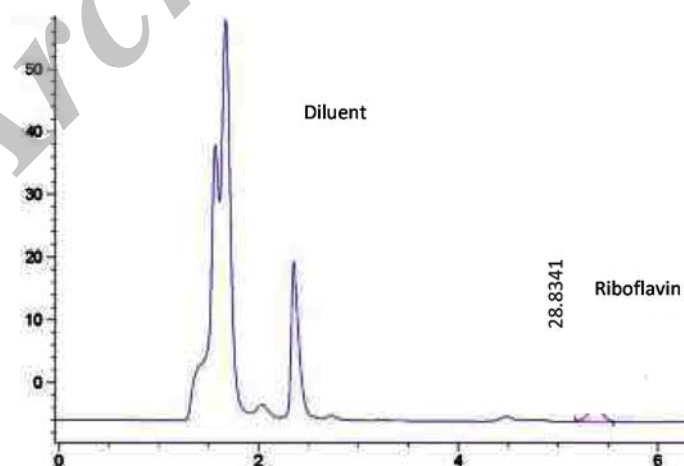
در مجموع ۳۲ سویه اسپوردار از ۱۲ مرحله نمونه برداری از ۳ منطقه مختلف شهر تهران جمع آوری گردید. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژی نشان داد که ۱۰ سویه متعلق به جنس باسیلوس سوبتیلیس و ۲ سویه نیز متعلق به جنس باسیلوس مگاتریوم بودند. نتیجه حاصل از شمارش کلنی، برای سویه‌های هوازی اسپوردار حدود ۱۰^۲ × ۳/۳۲ کلنی در هر گرم خاک و برای باسیلوس‌ها به صورت میانگین برای باسیلوس سوبتیلیس حدود ۱۰^۲ × ۵/۸ و باسیلوس مگاتریوم ۱۰^۳ × ۱/۸ کلنی در یک گرم خاک بود. نمودار حاصل از HPLC برای تشخیص ریپوفلاوین نشان داد که زمان بازداری (Retention Time) ریپوفلاوین استاندارد در محدوده ۵-۶ دقیقه و سطح زیر نمودار نمایانگر غلظت آن می باشد. مقایسه سطح زیر نمودارها نشان می دهد که غلظت ریپوفلاوین تولید شده توسط باسیلوس مگاتریوم نسبت به سویه باسیلوس سوبتیلیس کمتر می باشد (نمودارهای ۱ تا ۴). نتایج حاصل از PCR و الکتروفورز ژن هدف برای تأیید سویه باسیلوس سوبتیلیس در شکل ۱ نشان داده شده است. جهت تعیین توالی محصول PCR به شرکت آرمین شگرف فرستاده شد. نتیجه تعیین توالی را با استفاده از روش بلاست کردن و مقایسه با توالی‌های قطعه تکثیر یافته 16SrRNA موجود در بانک‌های اطلاعاتی متوجه شدیم سویه‌های به طور غالب *Bacillus subtilis* می باشد (شکل ۲). میزان تشابه سویه مورد آزمایش با نزدیک ترین گونه ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی Eztaxon درصد شباهت ۹۹٪ بوده و نتایج نشان داد که بر اساس نتایج سویه بررسی شده مربوط به شاخه باکتریایی Firmicutes، رده Bacilli، راسته Bacillales، و جنس *Bacillus* بوده است.



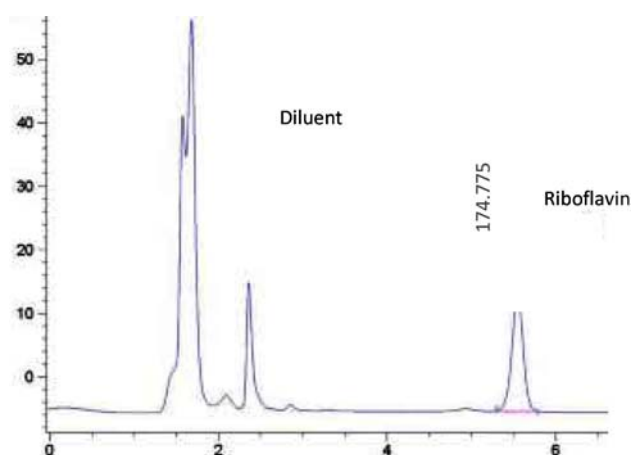
نمودار ۱: کروماتوگراف نمونه استاندارد ریبوفلاوین به روش HPLC (محور افقی میزان تولید ریبوفلاوین و محور عمودی رقت موردنظر تولید ریبوفلاوین)



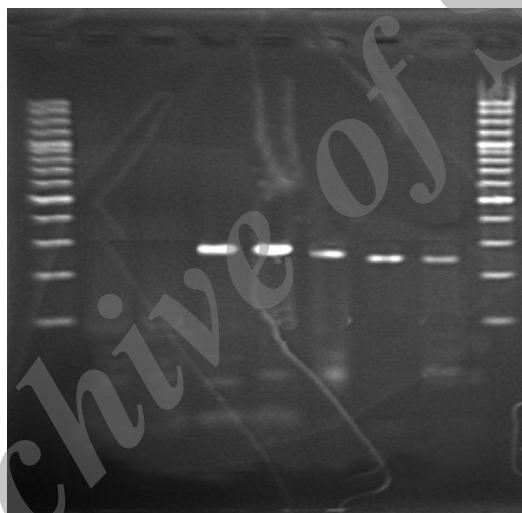
نمودار ۲: تولید ریبوفلاوین توسط سویه *Bacillus megaterium* PTCC 1250 (محور افقی میزان تولید ریبوفلاوین و محور عمودی رقت موردنظر تولید ریبوفلاوین)



نمودار ۳: تولید ریبوفلاوین توسط سویه *Bacillus megaterium* جداشده از خاک پارک جنگلی چیتگر (محور افقی میزان تولید ریبوفلاوین و محور عمودی رقت موردنظر تولید ریبوفلاوین)



نمودار ۴: تولید بیشترین میزان ریبوفلاوین توسط سویه *باسیلوس سوبتیلیس* جداشده از خاک پارک جنگلی چیتگر (محور افقی میزان تولید ریبوفلاوین و محور عمودی رقت موردنظر تولید ریبوفلاوین)



شکل ۱: تصویر باندها ۱۶S rRNA با طول ۲۸۲ bp جهت شناسایی سویه *Bacillus subtilis* بر روی ژل آگاروز بعد از الکتروفورز

```

GTGCCAGCAGCCGCGCTAATACGTAGGTGCCAAGCGTTTGCCGGATTATT
GGGCGTAAAGGCTNGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGG
CTCAACCGGGGGGGTCAATTGGAACTGGGGAAGTGTAGTGCAGAGAGGA
GAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGANATGCGTAGAGATGTGGAGGACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCGTGGAGGAGCGAAGC
GTGGGGAGCGAACAGGATTANATACCCCTGGTAGTCCACGCCCGTAAACGAN

```

شکل ۲: تعیین توالی نوکلئوتیدی 16S rRNA باکتری *Bacillus subtilis* جداشده از خاک پارک چیتگر

بحث

سنتتیک می‌تواند بر روی تولید ریوفلاوین تأثیرگذار باشد. دلیل دیگری که بر روی تولید ریوفلاوین می‌تواند مؤثر باشد منبع هیدروکربن مورد استفاده می‌باشد. همان‌طور که در مطالعه دانش آذری و همکارانش مطرح شده منبع هیدروکربن و محیط سنتتیک می‌تواند بر روی تولید ریوفلاوین توسط سویه‌ها بخصوص سویه‌های مورد مطالعه در اینجا تأثیرگذار باشد. اختلاف کوچکی در میزان تولید ریوفلاوین در بین *باسیلوس سوبتیلیس* های به‌دست‌آمده از خاک‌های نمونه‌برداری شده وجود دارد که این اختلاف ($P > 0.05$) معنی‌دار نیست و می‌تواند تحت تأثیر شرایط استخراج باشد. زارعان شهرکی و خسروی دارانی در سال ۱۳۹۲ در مقاله مروری نشان دادند که از میان ریزسازواره‌های مختلف و متغیرهای عملیاتی، بهترین باکتری مولد پروپیونی باکتریوم فرئودنریچیئی زیرگونه شرمانی بوده و مؤثرترین عوامل بر تولید ویتامین ب ۱۲ عبارت‌اند از نوع سوبسترا، عصاره مخمر، بتائین، یون کبالت، ۵ و ۶ دی متیل بنزیمیدازول، pH و دما. به نظر می‌رسد آینده تحقیقات به سمت استفاده از کشت ناپیوسته خوراک دهی شده با سوبسترای ارزان قیمت ملاس و نیز تولید هم‌زمان ویتامین ب ۱۲ و اسید پروپیونیک در نوشیدنی‌های تخمیری صورت پذیرد. با این استراتژی هزینه استخراج ویتامین حذف خواهد شد.^{۱۶} در ضمن *باسیلوس سوبتیلیس* به‌دست‌آمده ممکن است زیر تایپ‌هایی داشته باشد که در میزان تولید ریوفلاوین تأثیر داشته باشند. همچنین با مطالعه مقالات مختلف مشخص شده است که *Retention Time* برای ریوفلاوین بر اساس جنس فاز متحرک و ستون مورد استفاده متفاوت می‌باشد. در روش کار مطالعه حاضر از ستون C18 و فاز متحرک محلول امونیم استات و الکل با نسبت ۷۰:۳۰ استفاده شد و *Retention time* ۵ تا ۶ دقیقه به دست آمد.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های به‌دست‌آمده، *باسیلوس سوبتیلیس* سرعت رشد بیشتری داشته و میزان بیشتری ریوفلاوین تولید می‌نماید، و به‌عنوان سویه غالب تولیدکننده ریوفلاوین در خاک‌های نمونه‌برداری شده بود.

در این مطالعه جنس غالب در مناطق نمونه‌برداری *باسیلوس سوبتیلیس* بود. در صنعت برای تولید انبوه ریوفلاوین از ارگانسیم‌های زیادی از جمله؛ *Ashbya gossypii* کاندیدا/ فاماتا، مخمرها و *باسیلوس سوبتیلیس* استفاده می‌شود.^{۱۲} میزان ریوفلاوین تولیدشده توسط سویه‌های جدا شده از خاک و سویه استاندارد با روش HPLC سنجیده شد. برای اطمینان از صحت عملکرد روش طراحی‌شده، تکرارپذیری نتایج و CV کار با استفاده از استانداردهای تهیه‌شده و با دستگاه دیگر HPLC خوانده شده که برای کنترل کار خود استفاده کردیم. CV روش کار ۱۰/۶۴٪ محاسبه گردید که برای کار تحقیقاتی مناسب می‌باشد. همچنین با مطالعه مقالات مختلف مشخص شده است که *Retention Time* برای ریوفلاوین بر اساس جنس فاز متحرک و ستون مورد استفاده متفاوت می‌باشد. در روش کار مطالعه حاضر از ستون C18 و فاز متحرک محلول امونیم استات و الکل با نسبت ۷۰:۳۰ استفاده شد و *Retention time* ۵ تا ۶ دقیقه به دست آمد. نتایج نشان داد که میزان تولید ریوفلاوین در بین سویه‌های *باسیلوس مگاتریوم* (استاندارد و بومی) و *باسیلوس سوبتیلیس* اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) وجود دارد بدین معنی که با وجود مهیا بودن شرایط تولید، توانایی *باسیلوس سوبتیلیس* در تولید ریوفلاوین بیشتر از سویه *باسیلوس مگاتریوم* بود. با توجه به پراکندگی‌های نمونه‌برداری و سویه‌های به‌دست‌آمده می‌توان این‌طور عنوان کرد که سویه غالب جنس *باسیلوس* در مناطق نمونه‌برداری شده *Bacillus subtilis* می‌باشد. طبق فرضیه موجود و هم‌ارز نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه Bower و همکاران^{۱۳}، سرعت رشد و تعداد اوپرون می‌تواند دلیلی بر تولید بیشتر ریوفلاوین توسط *باسیلوس سوبتیلیس* باشد. در مطالعه Bower، محققین نوعی *باسیلوس سوبتیلیس* را طراحی نمودند که حاوی چندین کپی از اوپرون بیوسنتتیک ریوفلاوین (اوپرون rib) بود. لذا سرعت سنتز ریوفلاوین در این سویه سنتزی طراحی‌شده در مقایسه با سویه تیپ وحشی بیشتر بود.^{۱۴} از دیگر عوامل مهم و مؤثر در تولید ریوفلاوین منبع هیدروکربنی مورد استفاده می‌باشد. دانش آذری و همکارانشان^{۱۵} نشان دادند که منبع هیدروکربن و ترکیبات موجود در محیط‌های

تشکر و قدردانی

بدین وسیله تمامی مؤلفین از مدیریت و کارکنان گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال تقدیر و تشکر می‌نمایند.

ملاحظات اخلاقی

کلیه اقدامات جهت رعایت اخلاق در تهیه و استفاده از اطلاعات مقالات دیگر جهت به کارگیری در پژوهش فعلی توسط نویسندگان اتخاذ گردید. این مقاله کد اخلاقی ندارد.

References

- Clarke M, Ward M, Strain JJ, Hoey L, Dickey W, McNulty H. B-vitamins and bone in health and disease: The current evidence. *Proc Nutr Soc.* 2014; 73: 330–339.
- Van Meurs JBJ, Dhonukshe-Rutten RAM, Pluijm SMF, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2033-2041.
- De Groot CP. Vitamin B 12, folate, homocysteine, and bone health in adults and elderly people: a systematic review with meta-analyses. *J Nutr Metab.* 2013; 486:186.
- Matte JJ, Guay F, Girard CL. Bioavailability of vitamin B 12 in cows' milk. *British J Nutr.* 2012; 14;107(01):61-6.
- Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *ASH Education Program Book.* 2003(1):62-81.
- Kanis JA, Johnell O. Requirements for DXA for the management of osteoporosis in Europe. *Osteoporosis Int.* 2005 ;16(3):229-38.
- Zatalia SR, Sanusi H. The role of antioxidants in the pathophysiology, complications and management of diabetes mellitus. *Acta Med Indones.* 2013; 45(2); 141-147.
- Brun PJ, Yang KJ, Lee SA, Yuen JJ, Blaner WS. Retinoids: Potent regulators of metabolism. *Biofactors.* 2013; 39(2): 151-163.
- Raghow, R. Metabolic balancing acts of vitamin A in type-2 diabetes and obesity. *World J Diabetes.* 2012; 3(10): 174-177.
- Polidori MC, Mecocci P, Stahl W, Parente B, Cecchetti R, Cherubini A, et al. Plasma levels of lipophilic antioxidants in very old patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res Rev.*, 2000; 16(1): 15-19.
- Macdonald HM, McGuigan FE, Fraser WD, Ralston SA, Reid SH. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism interacts with riboflavin intake to influence bone mineral density. *Bone.* 2004; 35: 957–964.
- Fratoni V, Brandi ML. B Vitamins, Homocysteine and Bone Health. *Nutrients.* 2015; 7: 2176-2192.
- Bower S, Perkins J, Yocum RR, Serror P, Sorokin A, Rahaim P, et al. 1995. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* birA gene encoding a repressor of the biotin operon. *J Bacteriol.* 1995; 177:2572–75.
- Perkins JB, Pero J. Vitamin biosynthesis. In *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives.* American Society of Microbiology 2002 : 271-286.
- Daneshazari R, Roayaei M, Najafzadeh H. Isolation and identification of a riboflavin producer yeast from Nectarine. *Biol J Microorganism.* 2014 ;3(10):27-36.
- Shahraki Z, Khosravi Darani S, Khosravi Darani K. effective factor on microbial production of vitamin B12. 21st science & food industry international congress. Shiraz. Shiraz university. 2013 http://www.civilica.com/Paper-NCFOODI21-NCFOODI21_1145.html.