



إنتاج وتوصيف الاركوستيرول من خميرة
Saccharomyces cerevisiae واستعماله في
تدعيم الحليب الفرز

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية الزراعة - جامعة البصرة

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في العلوم الزراعية

(علوم الأغذية)

من قبل الطالبة

إسراء صباح عذافة الكنعاني

بكالوريوس علوم زراعية - علوم الاغذية

2016

بإشراف

أ. د. علاء جبار عبد المنهل

آب / 2022 م

محرم / 1444 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَأَنْ لَيْسَ لِلإِنْسَانِ إِلَّا مَا سَعَى

﴿٣٩﴾ وَأَنْ سَعِيهِ سَوْفَ يُرَى ﴿٤٠﴾ ثُمَّ يُجْزَاهُ

الْجِزَاءَ الْاَوْفَى ﴿٤١﴾

سورة النبا النبوي العظيم

سورة النجم

والآية (٣٩-٤١)

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المشرف

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة (إنتاج وتوصيف الازكوسيتيرول من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* واستعماله في تدعيم الحليب الفرز) المقدمة من قبل الطالبة (إسراء صباح عذافة الكنعاني) تم بإشرافي في جامعة البصرة - كلية الزراعة/ قسم علوم الأغذية وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الأغذية.

التوقيع:

الاسم: أ.د. علاء جبار عبد المنهل

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان: كلية الزراعة - جامعة البصرة

التاريخ: ٢٠٢٢ / ٨ / ٢٢

توصية رئيس القسم

إشارة الى التوصية المقدمة من الأستاذ المشرف أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها

وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: أ.م.د. حسن هادي مهدي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية الزراعة - جامعة البصرة

التاريخ: ٢٠٢٢ / ٨ / ٢٢

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعون أدناه نشهد بأننا اطلعنا على الرسالة الموسومة (إنتاج وتوصيف الاركوستيروول من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* واستعماله في تدعيم الحليب الفرز) التي تقدمت بها الطالبة (إسراء صباح عذافة) وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة فيها ووجدنا أنها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في علوم الأغذية .

التوقيع:
الاسم: د. حيدر إبراهيم علي / عضواً
المرتبة العلمية : أستاذ
العنوان: كلية الزراعة - جامعة البصرة
التاريخ : / / 2022

التوقيع:
الاسم: د. علاء جبار عبد / عضواً ومشرفاً
المرتبة العلمية : أستاذ
العنوان: كلية الزراعة - جامعة البصرة
التاريخ : / / 2022

التوقيع:
الاسم: د. الهام إسماعيل طامي / رئيساً
المرتبة العلمية : أستاذ
العنوان: كلية علوم الهندسة الزراعية - جامعة بغداد
التاريخ : / / 2022

التوقيع:
الاسم: د. خالد حسك عبد الحسن / عضواً
المرتبة العلمية : مدرس
العنوان: كلية الزراعة - جامعة البصرة
التاريخ : / / 2022

مصادقة عميد كلية الزراعة

بناء على الصلاحيات المخولة لنا نصادق على ما جاء في إقرار اللجنة .

التوقيع:
الاسم: د. ساجد سعد حسن
المرتبة العلمية : أستاذ
العنوان: كلية الزراعة - جامعة البصرة
التاريخ : / / 2022

الأهداء

إلى من أشرقت الأرض بنور وجهه وأرسله الله رحمة للعالمين خاتم الأنبياء والمرسلين

وسيد البشرية ومعلمها الأول .. (محمد صلى الله عليه وآله وسلم)

إلى نفسي .. إلى أنا .. لأنني أستحق .. بعد كل هذا العناء .. أن أقتطف لنفسي ..

ثمرة جهدي على مدار السنين .

إلى من ساندتني في صلاتها و دعائها .. إلى حبيبة قلبي ونور عيني وملاذي الآمن ..

إلى أروع امرأة في الوجود : أمي الغالية .

إلى الذي لم يبخل علي بأي شيء .. إلى من سعى لأجل راحتي وسعادتي ..

إلى أعظم و أعز رجل في الكون حبيب قلبي : أبي العزيز .

إلى القلوب الطاهرة .. إلى رياحين قلبي .. إلى سندي وملجأئي الدائم ..

إلى رفقاء دربي أخوتي الأعزاء : (الاء وزهراء ومصطفى وحسين)

إلى الذين لم يؤمنوا بي مطلقاً .. أو بأنني سأصل إلى هذا الحد ..

إسراء

شُكْرٌ وَتَقْدِيرٌ

" وَقَالَ رَبِّ أَوْزِعْنِي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ الَّتِي أَنْعَمْتَ عَلَيَّ وَعَلَىٰ وَالِدَيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَالِحًا تَرْضَاهُ وَأَدْخِلْنِي بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ " ، الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين محمد صلى الله عليه وعلى آله وسلم . أسجد لله حمداً وشكراً وتعظيماً الذي هداني ويسر لي أمري ومنحني العزم والصبر وأعاني على انجاز هذا العمل وما توفيقى إلا بالله الذي علم بالقلم علم الإنسان ما لم يعلم . يسرني وقد انتهيت من اعداد رسالتي أن اسجل في أولى صفحاتها جزيل شكري وعظيم تقديري الى من كان خير سند وعون والى من زودني بالمعلومات القيمة والارشادات ولما قدمه لي من جهد ومتابعة طيلة فترة البحث مشرفي الفاضل الاستاذ الدكتور علاء جبار عبد المنهل كما اتقدم بجزيل الشكر والامتنان الى لجنة المناقشة المتمثلة بالاستاذة الدكتورة الهام اسماعيل طامي لتحملها عناء السفر وقبولها مناقشة رسالتي والاستاذ الدكتور حيدر ابراهيم علي والدكتور خالد حسك عبد الحسن لقبولهم مناقشة الرسالة و ابداء آرائهم السديدة كما ويسعدني أن اتقدم بالشكر الجزيل الى رئاسة جامعة البصرة و عمادة كلية الزراعة ورئاسة قسم علوم الاغذية لأتاحت الفرصة لي لاكمال دراستي . شكري وامتناني وتقديري الى الست نوال خالد والست انفال علوان والاستاذ حسن كاظم (رحمه الله) والاستاذ الدكتور صباح مالك والأستاذ المساعد الدكتور وائل علي على ملاحظاتهم القيمة وتقديم يد العون لإغناء الاطروحة طيلة مده الدراسة والبحث كما اتقدم بالشكر الجزيل الى الدكتور كاظم هذيلي التدريسي في قسم المحاصيل الحقلية لمساعدته في تحليل النتائج احصائياً . كل التقدير والحب إلى من جمعني بهم الحياة إلى احبائي ورفقاء دربي أشهد بأنهم نعم الرفقاء في جميع الامور وأخص بالشكر والامتنان الست حمدية سالم والست علا ظاهر والست تبارك حسن والست عبير ساجد والست جنان محمد والست زينب صبيح والست رغد موسى والست اثمار عبد الرضا .

محبتي واعتزازي إلى عائلتي على رعايتهم لي ومساندتهم طوال فترة الدراسة وتحملهم الايام الصعبة معي وتوفيرهم لكل سبل الراحة فجزاهم الله خير الجزاء .

إِسْرَاءُ الْكِنَعَانِي

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى استعمال خميرة *Saccharomyces cerevisiae* في إنتاج الاركوستيروول وتحسينه من خلال دراسة بعض المعايير المؤثرة في انتاجه واستعماله في تدعيم الحليب الفرز ، أجريت عملية غربلة لسبع أنواع من الخمائر المتوفرة في الأسواق المحلية لمدينة البصرة لإختيار الأكفأ في إنتاج الاركوستيروول ، إذ أظهرت النتائج تفوق الخميرة ذات الرمز Y.6 (المنشأ اللبناني) على باقي الأنواع وبنسبة وصلت الى 0.47% ، بعدها أجريت عليها مجموعة من الفحوصات التشخيصية التأكيدية فضلاً عن التشخيص باستعمال جهاز الفايترك Vitek2 والتي أظهرت عائديتها الى خميرة *S.cerevisiae* وبنسبة تطابق 97% .

درست الظروف المثلى للإنتاج وباستعمال نظام التخمرات السائلة ، بينت النتائج أن أفضل وسط لإنتاج أكبر كمية من الكتلة الحيوية لإنتاج الاركوستيروول كان Yeast Extract Peptone Dextrose والتي بلغت 7.29 غم / لتر و 0.47% ، أجريت عملية استبدال للمصدر الكربوني في الوسط القياسي باستعمال عصير التمر والمولاس وبنسب استبدال مختلفة لوحظ فيها أن أفضل مصدر كربوني هو (عصير التمر) وبنسبة استبدال 75% ، بينما كان الرقم الهيدروجيني الأمثل 5 ودرجة الحرارة المثلى للإنتاج 30 م° ، وأفضل مدة حضن تم الحصول عليها عند 72 ساعة ، وكان حجم اللقاح الأمثل هو 4 مل ، وسرعة الاهتزاز الأمثل للإنتاج كانت عند 150 دورة / دقيقة أذ بلغت نسبة الأركوستيروول عندها (0.47 , 0.55 , 0.66 , 0.68 , 0.74 , 0.78 , 0.83) % على التوالي مع وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

شخص الاركوسـتيرول المنتج من خميرة *S. cerevisiae* باستعمال تقنية الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) Fourier Transform Infrared Spectroscopy واعتماداً على المجاميع الفعالة مقارنة مع العينة القياسية، ولوحظ طيف الاشعة تحت الحمراء للاركوسـتيرول القياسي والمنتج من خلال المرسمات أذ يتركز في الحزمة (1054.87 سم⁻¹ و 1464.67 سم⁻¹ و 1671.02 سم⁻¹) ، أظهرت دراسة تشخيص الاركوسـتيرول باستعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة High - performance liquid chromatograph (HPLC) أن وقت الاحتجاز (Retention time) للاركوسـتيرول القياسي كان 4.92 دقيقة بينما كان وقت الاحتجاز (RT) للاركوسـتيرول المنتج 4.61 دقيقة .

أجريت عملية تحويل للاركوسـتيرول المنتج من خميرة *S. cerevisiae* الى فيتامين D₂ باستعمال الأشعة فوق البنفسجية ، إذ بلغت كمية فيتامين D₂ الناتجة من التحويل 65.41 مايكروغرام / غرام ، بعد ذلك استعمل فيتامين D₂ المنتج في تدعيم حليب الفرز وبتركيز 600 وحدة دولية والخزن على فترات (0 ، 7) يوم ، قدر الفيتامين المستخلص تقديراً نوعياً وكمياً باستعمال تقنية جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) ، أظهرت النتائج أن وقت الاحتجاز لكل من فيتامين D₂ القياسي والمنتج عند يوم 0 و 7 يوم من الخزن هو (4.65، 4.61) دقيقة على التوالي ، بلغ تركيز فيتامين D₂ عند 0 يوم من الخزن 0.0136 مايكروغرام / مل في حين كان تركيزه بعد 7 يوم من الخزن 0.0125 مايكروغرام / مل ، بينما بلغت ثباتية الفيتامين بعد أسبوع من الخزن (91.911%) ، كما أظهرت نتائج التقييم الحسي لحليب الفرز المدعم بفيتامين D₂ المنتج والقياسي عدم وجود فروقات معنوية في كل من صفة اللون والطعم والرائحة والقوام وأيضاً القبول العام بين الحليب المدعم والغير مدعم .

قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان	التسلسل
1	المقدمة	1
3	مراجعة المصادر	2
3	الخمائر	1-2
4	أهمية الخمائر	2-2
6	خميرة الخبز <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3-2
8	الشكل والتركيب الخلوي لخميرة <i>S.cerevisiae</i>	1-3-2
9	المتطلبات الغذائية	2-3-2
10	تطبيقات خميرة الخبز <i>S. cerevisiae</i>	3-3-2
11	الاركوستيرون	4-2
13	الوظيفة الفسيولوجية للاركوستيرون	1-4-2
14	التخليق الحيوي للاركوستيرون لخميرة <i>S. cerevisiae</i>	2-4-2
18	طرائق استخلاص وتقدير الاركوستيرون	3-4-2
20	الظروف المثلى لإنتاج الاركوستيرون	4-4-2
20	أفضل وسط لإنتاج الاركوستيرون	5-4-2
21	أفضل مصدر كاربوني لإنتاج الاركوستيرون	6-4-2
21	الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الاركوستيرون	5-2
22	درجة الحرارة المثلى لإنتاج الاركوستيرون	1-5-2
23	مدة الحضان المثلى لإنتاج الاركوستيرون	2-5-2
23	حجم اللقاح الأمثل لإنتاج الاركوستيرون	3-5-2
24	سرعة الاهتزاز الأمثل لإنتاج الاركوستيرون	4-5-2
25	فيتامين D	1-4-5-2
25	تركيب فيتامين D	2-4-5-2
27	تخليق فيتامين D	3-4-5-2
28	أهمية فيتامين D	4-4-5-2
30	الكميات الغذائية الموصى تناولها من فيتامين D	5-4-5-2
31	سمية فيتامين D	6-4-5-2

31	مصادر فيتامين D	7-4-5-2
33	تحويل الاركوستيرون الى فيتامينD ₂ بواسطة الاشعة فوق البنفسجية (UV)	6-5-2
35	تطبيقات فيتامين D في تدعيم الأغذية	7-5-2
35	تدعيم الحليب ومنتجاته بفيتامين D	1-7-5-2
36	تدعيم الخبز بفيتامين D	2-7-5-2
36	تدعيم العصائر بفيتامين D	3-7-5-2
37	المواد وطرق العمل	3
37	المواد	1-3
37	المواد الكيميائية	1-1-3
38	الاجهزة المستعملة	2-1-3
39	الايوساط الزراعية	3-1-3
39	الصبغات والكواشف	4-1-3
42	المواد الأولية المستعملة في الدراسة	5-1-3
42	خميرة الخبز	1-5-1-3
42	حليب الفرز	2-5-1-3
43	تحضير المحاليل والصبغات والكواشف	1-2-3
43	محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 عياري)	1-1-2-3
43	محلول حامض الهيدروكلوريك المخفف (1 عياري)	2-1-2-3
43	محلول ماء الببتون	3-1-2-3
43	صبغة المثلين الزرقاء (0.3%)	4-1-2-3
44	صبغة البروموثايمول الزرقاء	5-1-2-3
44	صبغة الملاكايت الخضراء (5%)	6-1-2-3
44	صبغة السفراين	7-1-2-3
44	دليل الفينولفتالين	8-1-2-3
45	طرائق التعقيم	2-2-3
45	التعقيم بالمؤصدة	1-2-2-3
45	التعقيم بالمرشحات الدقيقة	2-2-2-3
45	الايوساط الزراعية	3-2-3
45	وسط مستخلص المالت الصلب (5%)	1-3-2-3

45	وسط مستخلص المالت السائل (5%)	2-3-2-3
46	وسط البطاطا الدكستروز الصلب	3-3-2-3
46	وسط الكلوكوز - كاربونات الكالسيوم الصلب	4-3-2-3
46	وسط تحلل اليوريا	5-3-2-3
46	وسط السابرويد دكستروز الصلب	6-3-2-3
47	وسط مستخلص الخميرة والببتون والدكستروز السائل	7-3-2-3
47	وسط خلاص البوتاسيوم - مستخلص الخميرة والكلوكوز	8-3-2-3
47	وسط تخمر المصادر الكربونية	9-3-2-3
48	أوساط الإنتاج	4-2-3
48	الوسط الأول	1-4-2-3
48	الوسط الثاني	2-4-2-3
48	الوسط الثالث	3-4-2-3
48	البدائل المستعملة في وسط الإنتاج الاكفأ	4-4-2-3
49	تحضير عصير التمر	1-4-4-2-3
49	مولاس القصب	2-4-4-2-3
49	طرائق العمل	3-3
49	تنشيط الخميرة	1-3-3
49	حفظ الخميرة	2-3-3
50	الغربلة	3-3-3
50	تحضير لقاخ الخميرة	1-3-3-3
50	حساب عدد الخلايا الحية في اللقاخ	2-3-3-3
50	غربلة العزلات لاختيار الاكفأ في انتاج الاركوستيروول	3-3-3-3
52	تقدير الكتلة الحيوية للخميرة	4-3-3-3
52	الاختبارات التشخيصية التأكيدية لخميرة الخبز <i>S.cerevisiae</i>	4-3-3
52	الفحص المظهري	1-4-3-3
53	الفحص المجهري	2-4-3-3
53	الفحوصات الكيموحيوية	5-3-3
53	فحص انتاج الحامض	1-5-3-3
53	فحص تحلل اليوريا	2-5-3-3

54	فحص تخمر المصادر الكربونية	3-5-3-3
54	النمو على وسط يحتوي على مادة السايكلوهيكسامايد	4-5-3-3
54	فحص النمو في درجات حرارة مختلفة	5-5-3-3
55	فحص تكوين السبورات	6-5-3-3
55	تشخيص الخميرة المنتخبة بتقنية الفايك 2 Vitek	7-5-3-3
56	دراسة الظروف المثلى لإنتاج الاركوستيرون	6-3-3
56	الوسط الزراعي الأمثل	1-6-3-3
56	البدايل المحلية لوسط الإنتاج	2-6-3-3
56	تقدير السكريات الكلية	1-2-6-3-3
59	الرقم الهيدروجيني الأمثل	3-6-3-3
59	درجة الحرارة المثلى	4-6-3-3
60	مدة الحضانة المثلى	5-6-3-3
60	حجم اللقاح الأمثل	6-6-3-3
60	سرعة الاهتزاز المثلى	7-6-3-3
61	تشخيص الاركوستيرون	7-3-3
61	التشخيص باستعمال جهاز مطياف الأشعة تحت الحمراء	1-7-3-3
61	التشخيص باستعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة	2-7-3-3
62	التطبيق	8-3-3
62	تحويل الاركوستيرون الى فيتامين D ₂ باستعمال جهاز الأشعة فوق البنفسجية (UV)	1-8-3-3
62	تحويل الاركوستيرون الى فيتامين D ₂	1-1-8-3-3
62	تقدير محتوى فيتامين D ₂	2-1-8-3-3
63	تدعيم حليب الفرز بفيتامين D ₂	2-8-3-3
64	الفحوصات الحسية للحليب	3-8-3-3
65	التحليل الاحصائي	4-3
66	النتائج والمناقشة	4
66	غربة العزلات لاختيار أفضلها في إنتاج الاركوستيرون	1-4
68	الفحوصات التأكيدية التشخيصية لخميرة الخبز ذات الرمز Y.6	2-4
69	الاختبارات المظهرية والمجهريّة	1-2-4
70	الاختبارات الكيموحيوية	2-2-4

72	التشخيص التأكيدي باستعمال جهاز الفايتهك لخميرة الخبز Y.6	3-2-4
74	دراسة الظروف المثلى لإنتاج الأركوستيروول	3-4
74	الوسط الأمثل لإنتاج الأركوستيروول	1-3-4
75	استعمال البدائل المحلية في وسط انتاج الأركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	2-3-4
78	تأثير الرقم الهيدروجيني pH	3-3-4
80	درجة الحرارة المثلى	4-3-4
82	مدة الحضانة المثلى	5-3-4
83	حجم اللقاح الأمثل	6-3-4
85	سرعة اهتزاز الحاضنة	7-3-4
87	تشخيص الأركوستيروول بواسطة تقنية الأشعة تحت الحمراء	4-4
89	تشخيص الأركوستيروول باستعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل عالية الكفاءة	5-4
91	تحويل الأركوستيروول الى فيتامين D ₂	6-4
92	تأثير الخزن على حليب الفرز المدعم بفيتامين D ₂	7-4
95	التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D ₂ القياسي والمنتج من الخميرة	8-4
97	الاستنتاجات والتوصيات	5
97	الاستنتاجات	1-5
98	التوصيات	2-5
99	المصادر	6
99	المصادر العربية	1-6
100	المصادر الأجنبية	2-6
121	الملاحق	7

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	التسلسل
7	التصنيف الهرمي لخميرة <i>S. cerevisiae</i>	1-2
30	الكميات الغذائية الموصى بها من فيتامين D	2-2
32	محتوى فيتامين D في الأغذية	3-2
37	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة ومنشأها والشركة المصنعة	1-3
38	الاجهزة والمعدات المستعملة في الدراسة ومنشأها والشركة المصنعة	2-3
39	الايوساط الزرعوية المستعملة في الدراسة ومنشأها والشركة المصنعة	3-3
39	الصبغات والكواشف المستعملة في الدراسة ومنشأها والشركة المصنعة	4-3
42	خميرة الخبز الجافة وعلاماتها التجارية (الشركة المصنعة) مع المنشأ المستعملة لإستخلاص الاركوستيروول	5-3
59	نسب استبدال المصدر الكربوني الكلوكوز بكل من عصير التمر والمولاس	6-3
63	التركيب الكيميائي للحليب الكامل والفرز المستعمل في تجربة التدعيم	7-3
65	استمارة التقييم الحسي لنماذج الحليب	8-3
72	الفحوصات الكيموحيوية لخلايا خميرة <i>S.cerevisiae</i>	1-4
73	التشخيص التأكيدي لخميرة الخبز (Y.6) باستعمال جهاز الفايتك Vitek2	2-4
96	معدلات درجات التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D ₂ القياسي والمنتج من الخميرة	3-4

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	التسلسل
12	التركيب الكيميائي للاركوستيروول	1-2
17	التخليق الحيوي للاركوستيروول في خميرة <i>S. cerevisiae</i>	2-2
26	التركيب الكيميائي لفيتامين D ₂ وD ₃	3-2
28	تخليق فيتامين D في جسم الانسان	4-2
40	مخطط طرائق العمل	1-3
66	امتصاصية الاشعة فوق البنفسجية (UV) لأطياف الاركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	1-4
68	غربة الخمائر لأختيار الخميرة الاكفاً في إنتاج الاركوستيروول	2-4
69	الفحص المظهري لخلايا خميرة الخبز <i>S.cerevisiae</i>	3-4
70	الفحص المجهرى لخلايا خميرة الخبز <i>S.cerevisiae</i>	4-4
71	الاختبارات الكيموحيوية التأكيديية لخميرة الخبز Y.6	5-4
74	كمية الاركوستيروول المنتجة من خميرة <i>S.cerevisiae</i> باستعمال أوساط زرعية مختلفة	6-4
76	تأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الاركوستيروول بعصير التمر وبنسب مختلفة	7-4
77	تأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الاركوستيروول بالمولاس وبنسب مختلفة	8-4
79	تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي على إنتاج الاركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	9-4
81	تأثير الحضان بدرجات حرارة مختلفة على إنتاجية الاركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	10-4
83	تأثير مدة الحضان على إنتاج الاركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	11-4
84	تأثير استعمال حجوم لقاح مختلفة على إنتاجية الاركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	12-4
86	تأثير سرع الاهتزاز على إنتاجية الاركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	13-4
88	مرتسم طيف الاشعة تحت الحمراء للاركوستيروول القياسي	14-4
89	مرتسم طيف الاشعة تحت الحمراء للاركوستيروول المستخلص من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	15-4
90	مرتسم كروماتوغرافيا السائل عالية الكفاءة (HPLC) للاركوستيروول القياسي	16-4
90	مرتسم كروماتوغرافيا السائل عالية الكفاءة (HPLC) للاركوستيروول المنتج من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	17-4
93	كروماتوكرام فيتامين D ₂ القياسي لمدة الخزن 0 يوم بتركيز 600 وحدة دولية	18-4
94	كروماتوكرام فيتامين D ₂ المنتج لمدة الخزن 0 يوم بتركيز 600 وحدة دولية	19-4
94	كروماتوكرام فيتامين D ₂ القياسي لمدة الخزن 7 أيام بتركيز 600 وحدة دولية	20-4
95	كروماتوكرام فيتامين D ₂ المنتج لمدة الخزن 7 أيام بتركيز 600 وحدة دولية	23-4

قائمة الملاحق

الصفحة	العنوان	التسلسل
122	ملحق التحليل الاحصائي لغريلة الخمائر لإختبار الخميرة الأكفأ في إنتاج اكبر كمية من الكتلة الحيوية	1-7
122	ملحق التحليل الاحصائي لغريلة الخمائر لإختبار الخميرة الأكفأ في إنتاج الاركوستيروول	2-7
123	ملحق التحليل الاحصائي لكمية الكتلة الحيوية المنتجة من خميرة <i>S.cerevisiae</i> باستعمال اوساط زرعية مختلفة	3-7
123	ملحق التحليل الاحصائي لكمية الاركوستيروول المنتجة من خميرة <i>S.cerevisiae</i> باستعمال اوساط زرعية مختلفة	4-7
124	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الكتلة الحيوية بعصير التمر وبنسب مختلفة	5-7
124	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الاركوستيروول بعصير التمر وبنسب مختلفة	6-7
125	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الكتلة الحيوية بالمولاس وبنسب مختلفة	7-7
125	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الاركوستيروول بالمولاس وبنسب مختلفة	8-7
126	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي على إنتاج الكتلة الحيوية من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	9-7
126	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي على إنتاج الاركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	10-7
127	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير الحضان بدرجات حرارة مختلفة على إنتاجية الكتلة الحيوية من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	11-7
127	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير الحضان بدرجات حرارة مختلفة على إنتاجية الاركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	12-7
128	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير مدة الحضان على إنتاجية الكتلة الحيوية من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	13-7
128	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير مدة الحضان على إنتاج الاركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	14-7
129	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استعمال حجوم لقاح مختلفة على إنتاجية الكتلة الحيوية من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	15-7
129	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استعمال حجوم لقاح مختلفة على إنتاجية الاركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	16-7
130	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير سرعة الاهتزاز على إنتاجية الكتلة الحيوية من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	17-7
130	ملحق التحليل الاحصائي لتأثير سرعة الاهتزاز على إنتاجية الاركوستيروول من خميرة <i>S.cerevisiae</i>	18-7
131	ملحق التحليل الاحصائي التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D ₂ القياسي والمنتج من الخميرة لصفة اللون	19-7
131	ملحق التحليل الاحصائي التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D ₂ القياسي والمنتج من الخميرة لصفة الطعم	20-7
131	ملحق التحليل الاحصائي التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D ₂ القياسي والمنتج من الخميرة لصفة الرائحة	21-7
132	ملحق التحليل الاحصائي التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D ₂ القياسي والمنتج من الخميرة لصفة القوام	22-7
132	ملحق التحليل الاحصائي التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D ₂ القياسي والمنتج من الخميرة لصفة القبول العام	23-7

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
UV	Ultraviolet
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
SCP	Single cell protein
GRAS	Generally recognized as safe
FDA	Food and drug administration
COVID-19	Coronavirus disease 2019
RDA	Recommended dietary intakes of vitamin D
VDT	Vitamin D toxicity
ER	Endoplasmic reticulum
EFSA	European food safety authority
TLC	Thin-layer chromatography
R _f	Retention factors
RT	Retention time
HPLC	High performance liquid chromatography
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
GC-MS	Gas chromatography– mass spectrometry
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
40X	High power objective lens
CRD	Complete randomized design
L.S.D.	Least significant difference
ppm	Parts per million
p<0.05	Probability level more
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

يعد فيتامين D₂ (الاركوكالسيفيرول) أحد الفيتامينات الذائبة في الدهن ، يتم تخليقه داخل الجسم عند تعرض الجلد لأشعة الشمس ومن خلال عدة خطوات (Balachandar *et al.*, 2021)، أن لهذا الفيتامين أهمية كبيرة في الحد من هشاشة العظام وامراض القلب وتصلب الشرايين من خلال تنظيم عملية امتصاص ونقل بعض الاملاح المعدنية كالكالسيوم والفسفور وتحسين مناعة الجسم وايضاً خفض إصابة كبار السن خصوصاً بمرض الزهايمر فضلاً عن علاج وقائي من بعض أنواع السرطان (Yazawa *et al.*, 2000;Hirsch, 2011;Ledesma-Amaro *et al.*, 2013).

على الرغم من أهميته فإن مصادر فيتامين D والمتمثلة بأشعة الشمس وبعض أنواع الغذاء المتمثلة بزيت كبد الحوت أو السلمون أو التونة تكون غير كافية لسد حاجة الجسم اليومية والتي تتطلب تناول حوالي 400 – 2000 وحدة دولية اعتماداً على عدة عوامل كالعمر ووزن الجسم ونوع المرض وغيرها (Pludowski *et al.*, 2018) ، إذ إن هناك اعداداً كبيرة ممن يعانون من نقص فيتامين D نتيجة قلة تعرضهم لأشعة الشمس أو اصحاب الحميات الغذائية أو النباتيين أو استعمال واقيات الشمس حتى وصلت الى ما يقارب المليار شخص على مستوى العالم بينهم اكثر من 50% في اسيا والشرق الاوسط (Bokhari and Albaik., 2019) ، لذا أكدت الدراسات الحديثة على ضرورة وأهمية إيجاد مصادر غنية بالفيتامين كالتوجه نحو الاحياء المجهرية وبالأخص الفطريات كمصادر مهمة لهذا الفيتامين كذلك تدعيم المنتجات الغذائية كالحليب اللبن الرائب والاجبان والعصير والخبز وغيرها بهذا الفيتامين لغرض تحقيق هذه الفوائد (Moulas and Vaiou, 2018; Zahedirad *et al.*,2019; Maurya *et al.*,2020).

نظراً لندرة الدراسات المحلية بصدد انتاجه من مصادر غير شائعة مثل الخميرة، ارتأينا القيام بهذه الدراسة لتوفيره من مصادر ميكروبية واستعماله في اغناء أو تدعيم بعض منتجات الالبان بهدف التحسين من قيمتها الغذائية لغرض ايصالها للمستهلك وتعويضه لنقص هذا الفيتامين مع تقدم العمر ، إذ إن 40% من الفيتامينات يحصل عليها الانسان عن طريق المكملات الغذائية أو من خلال تدعيم الأغذية بالفيتامينات، والذي يتحقق من خلال الخطوات التالية:

1. جمع سلالات من خميرة الخبز ذات مناشئ مختلفة من الاسواق المحلية .
2. اجراء عملية غربلة للخمائر لاختيار الاكفأ في انتاج الاركوستيروول وتشخيصها باستعمال الفحوصات التشخيصية التأكيدية .
3. تشخيص الخميرة الاكفأ باستعمال تقنية الفايتك Vitek2.
4. تحديد الظروف المزرعية المثلى لإنتاج أكبر كمية من الكتلة الحيوية لإنتاج الاركوستيروول من خلال دراسة العديد من المعايير المؤثرة في الإنتاج كأفضل وسط للإنتاج وأفضل مصدر كربوني وأفضل درجة حرارة ورقم هيدروجيني ومدة حضان وحجم اللقاح .
5. توصيف الاركوستيروول باستعمال جهازي HPLC و FT-IR .
6. دراسة تدعيم الحليب الفرز بفيتامين D₂ المنتج مع متابعة ثباتيته بعد الخزن .

Yeasts

1-2 الخمائر

تعد الخمائر كائنات حية وحيدة الخلية حقيقية النواة Eumycetes تقع ضمن مملكة الفطريات (Kreger-van Rij, 1984) ، هناك أجناس وأنواع عديدة من الخمائر بعضها يعود الى الفطريات البازيدية Basidiomycetous ومنها ما يصنف ضمن الفطريات الكيسية Ascomycetes ، تكون اما بيضوية أو كروية أو أسطوانية الشكل (Lodder, 1970) ، تمثل إحدى أكثر الكائنات الحية الدقيقة الصناعية استعمالاً في مجالات مختلفة ولا يمكن الاستغناء عنها في صناعة العديد من الأغذية والأدوية ، إن كلمة الخميرة كلمة إنكليزية قديمة تدعى (Gyot) تتشابه بالمعنى بين العديد من اللغات والتي تعني الفقاعات (Bubbles) (Walker, 2009 ; Kurtzman *et al.*, 2011) .

يختلف حجم خلايا الخمائر تبعاً لكل نوع منها إذ يتراوح بين (4-40) مايكرومتر وهي اجمالاً اكبر حجماً من البكتيريا وأن معظمها اكبر بمقدار 4-24 مرة من البكتيريا، كما تتميز الخمائر عن الاعفان بأنها لا تكون خيوطاً (مايسليوم) الا في حالات خاصة، تمتلك بعض الخمائر جسم خيطي حقيقي(هايفة حقيقية) أو يكون غير حقيقي (هايفة كاذبة) (Pitt and Hocking, 2009 ; Mokhtari *et al.*, 2017) .

ذكر (Kreger-van Rij, 1984) أن الخمائر كائنات حية غير متحركة ، تعتمد في تغذيتها على المواد العضوية الحية والميتة كمصادر للطاقة ، إذ تحتاج الى مصادر كربونية ونيروجينية بسيطة التركيب ولا تحتوي على بلاستيدات خضراء .

تحصل الخمائر على غذائها عن طريق إنتاج وتحرير العديد من الإنزيمات المحللة للبروتينات أو السكريات أو الدهون ، أو عن طريق امتصاص الأحماض الأمينية والسكريات الأحادية (Barnett *et al.*, 1983) .

تتكاثر الخمائر عن طريق التبرعم Budding أو بالانقسام الثنائي Binary fission ، يمكن أن تنمو الخمائر هوائياً (بوجود الأوكسجين) أو لاهوائياً (في حالة غياب الأوكسجين) ، كما أنها تفضل النمو في درجات حرارية معتدلة تتراوح بين (25-30) م° وبعضها تنمو في درجة الصفر أو في درجة 37 م° ، ايضاً لها القدرة على النمو في الوسط الحامضي عند رقم هيدروجيني أمثل (4.5-5) (Kreger-van Rij, 1984 ; Kurtzman *et al.*, 2011) ، وضح (Karimy *et al.*, 2020) أن خلايا الخميرة تتكاثر عن طريق عملية التبرعم (Budding)، يعد التبرعم شكل من أشكال انقسام الخلايا اللاجنسي غير المتماثل، إذ ينشأ نتوء صغير من احد جوانب جدار الخلية ما يلبث أن يكبر حتى يفصل عن الخلية الأم أو يبقى مرتبطاً معها مكوناً سلاسل من الخلايا قد تطول أو تقصر ، وفي احيان أخرى قد تتكاثر بالانشطار مكونة خليتين جديدتين .

وضح (Pitt and Hocking, 2009) بأن الخمائر تتكاثر بشكل أبطأ من البكتريا كما أنها ذات حيوية عالية في البيئات التي تكون حامضية وبالتالي لا تتنافس في البيئات التي تفضلها البكتريا أي عند رقم هيدروجيني متعادل أو في درجات حرارة عالية ، إذ تشترك العديد من الخمائر مع الاعفان في تحمل الظروف الحامضية .

2-2 أهمية الخمائر

Importance of Yeasts

يعد استعمال الخمائر في صناعة الخبز والمشروبات الكحولية وفي إنتاج بعض الأغذية المتخمرة من التطبيقات التقليدية التي مازالت تستعمل حتى الان، تختلف أنواع الخمائر في شكلها الخلوي ونوع التمثيل الغذائي وعمليات التكاثر، إذ أستعمل عدد قليل فقط من هذه الأنواع تجارياً (El- Ghwas *et al.*, 2021) ، تشمل التطبيقات التجارية للخميرة إنتاج المشروبات الكحولية (مثل البيرة والنببذ) والمشروبات غير الكحولية (مثل الكومبوتشا والكفير) فضلاً عن الخبز والمعجنات ، ايضاً استعملت في إنتاج الأنزيمات مثل الاميليز والانيليز والسليوليز والكلوكانيز والانفرتيز كذلك في المعالجة الحيوية وإعادة التدوير للمخلفات الصناعية وفي تحسين طعم ونكهة العديد من الأغذية أو كمكملات غذائية أو مع المضافات الغذائية المختلفة أو بادئات أو كخمائر علاجية فضلاً عن إدخالها في الأغذية المعدلة وراثياً (Reed, 2012 ; Arevalo-Villena *et al.*, 2017) ، كما تتكون جدران خلايا الخميرة من البيتاكلوكان والمانوبروتين والكايتين وأن تركيبها هذا يعطيها أهمية كإضافات علفية في علائق المجترات بسبب تأثيراتها المفيدة على إنتاجية الحيوان فضلاً عن كونها معززات حيوية تعمل كمغذيات صحية (Elghandour *et al.*, 2019) .

بين (Ribeiro *et al.*, 2020) امكانية استعمال الخمائر ومنها خميرة *Saccharomyces cerevisiae* في إنتاج المستحلبات التي تدخل في الكثير من الأغذية فضلاً عن قدرتها العالية في استحلاب مختلف الهيدروكربونات والزيوت النباتية وايضاً دورها واهميتها كمضادات للأكسدة ، استعملت بعضها ايضاً كباقي الكائنات الحية المجهرية المختلفة في إنتاج بروتين احادي الخلية (SCP) ومن هذه الخمائر التي تعود الى جنس (*Saccharomyces* ، *Candida* ، *Pichia* ، (*Torulopsis* ، *Kluyveromyces*) (Bajpai, 2017) ، من الخمائر المهمة تجارياً ايضاً خميرة

Kluyveromyces marxianus أذ تستعمل الكلوكونز وايضاً اللاكتوز في الحليب كمصادر كربونية (Reed, 2012) .

يمكن أن تعد الخميرة كمصدر لإنتاج الدهون، إذ إن بعض الأنواع التي تسمى Oleaginous yeasts قادرة على إنتاج وتراكم أكثر من 20% من كتلتها الحيوية في شكل دهون أثناء طور الاستقرار Stationary phase تحت مستوى محدود من النتروجين لذلك تسمى "زيتية" أو زيت الخلية الواحدة (SCO) Single cell oils ومن هذه الخمائر (*Cryptococcus*، *Trichosporon*، *Rhodotorula*، *Rhodospiridium*، *Lipomyces*) (*Yarrowia*) (Liang and Jiang, 2013) .

اشارت الدراسات العلمية الى أهمية استعمال الزيوت الميكروبية كبديل جزئي عن الزيوت أو الدهون النباتية والحيوانية فضلاً عن إمكانية استعمالها في بعض الصناعات الكيميائية مثل صناعة الوقود والصابون والبلاستيك والمواد المضافة لصناعة الأغذية ومستحضرات التجميل، إذ أثبتت الدراسات بأن زيوت الخمائر مشابهة للزيوت النباتية (Probst *et al.*, 2016) ، يمكن إن يكون للخميرة آثاراً إيجابية أو سلبية على المنتجات المتخمرة التي يستهلكها الإنسان أو الحيوان على حد سواء ، إذ استعملت بعض الخمائر في عملية الانضاج السطحي لأنواع من الاجبان مثل خميرة *Candida pseudotropicalis* كما أن لها دوراً رئيسياً في صناعة الخل ، في حين تعرضت بعض الأغذية بالأخص الأغذية التي ترتفع فيها نسبة السكريات مثل المربيات والدبس والعسل فضلاً عن أغذية أخرى مثل اللبن الرائب والسلطات والمايونيز وعصير الفاكهة الى التلف بسبب أنواع من الخمائر (El-Ghwas *et al.*, 2021 ; Perricone *et al.*, 2017) .

Saccharomyces cerevisiae

3-2 خميرة الخبز

إن الاسم العلمي لخميرة الخبز (*Saccharomyces cerevisiae*) يتكون من مقطعين: المقطع الأول "Saccharo" والمشتق من كلمة لاتينية ويعني فطر السكر والمقطع الثاني "cerevisiae" وتعني (البيرة) ألا أن بعض المصادر أشارت إلى أنها جاءت من كلمة رومانية معناها آلة الحصاد (Salari and Salari, 2017) ، تعود خميرة الخبز إلى صنف Ascomycota ضمن مملكة الفطريات Fungi رتبة Saccharomycetales عائلة Saccharomycetaceae Fai and Grant, 2009 ; Kurtzman *et al.*, 2011 ; Montes Saccharomycetaceae (de Oca *et al.*, 2016) وكما مبين في الجدول (1-2) .

جدول (1-2) التصنيف الهرمي لخميرة *S. cerevisiae* (Montes de Oca *et al.*, 2016)

Domain	Eukarya
Kingdom	Fungi
Division	Ascomycota
Subdivision	Saccharomycotina
Class	Saccharomycetes
Order	Saccharomycetales
Family	Saccharomycetaceae
Subfamily	Saccharomyetoideae
Genus	<i>Saccharomyces</i>
Species	<i>Cerevisiae</i>

أشار Walker and White, (2017) إلى أن خميرة *S. cerevisiae* لها القدرة على النمو بوجود أو عدم وجود الاوكسجين (لاهوائية اختيارية)، درجة الحرارة المثلى لنمو خميرة الخبز 30 م ، ويزداد نمو الخميرة عند درجة حرارة تتراوح بين (28-35) م في حين يقل أو ينعدم

النمو عند مدى حراري يتراوح بين (37-41) م (Cheung *et al.*, 2014) ، كما تعد خميرة الخبز من الكائنات الحية التي تنمو بشكل أفضل تحت الظروف الحامضية وبأرقام هيدروجينية تتراوح بين (4-6) اعتماداً على ظروف الوسط (Kamal *et al.*, 2020) .

1-3-2 الشكل والتركيب الخلوي لخميرة *S.cerevisiae*

Cellular morphology and structure of *S.cerevisiae*

تشتمل المكونات الكيميائية في خلايا الخميرة على الأحماض الأمينية والبيبتيدات والكربوهيدرات والأحماض النووية (DNA و RNA) والأنزيمات والأملاح والكلوتامات أحادية الصوديوم (Hassan, 2011) ، أن خميرة *S.cerevisiae* ذات خلايا حقيقية النواة ، إذ تحتوي على جميع العضيات الرئيسية الشائعة كما في الخلايا الحيوانية مثل النواة والشبكة الإندوبلازمية والميتوكوندريا وجهاز كولجي والفجوات والهيكل الخلوي ، يعد الكلوكان Glucan مكوناً رئيسياً لجدران خلايا خميرة الخبز فضلاً عن المانوبروتين ، تنمو مستعمرات خميرة *S.cerevisiae* بسرعة ويكتمل نموها في غضون ثلاثة أيام تقريباً، تتميز خلايا الخميرة بأنها ناعمة، رطبة، لماعة أو باهتة وذات لون كريمي فضلاً عن قدرتها على تخمير الكربوهيدرات (Barnett *et al.*, 1983 ; Montes de Oca *et al.*, 2016).

Nutritional Requirements

2-3-2 المتطلبات الغذائية

تعد خميرة *S. cerevisiae* من الكائنات الحية التي لا تمتلك صبغة الكلوروفيل وبالتالي لا يمكنها تصنيع غذائها بنفسها أي انها لا تتغذى تغذية ذاتية وتكون ذات معيشة رمية Saprotrophic تحتاج الخمائر خلال نموها وتكاثرها الى نسبة رطوبة أعلى مما تحتاجه الاعفان

واقل مما تحتاجه البكتريا ، إذ تتطلب نشاطاً مائياً يتراوح بين (0.88 – 0.94) % ، تغذيتها تكون من نوع عضوية كيميائية Chemoorganotrophic أي أنها تستعمل المركبات العضوية كمصدر للطاقة ، أي تعتمد على السكريات كمصادر كربونية فضلاً عن المصادر النيتروجينية اللازمة لبناء الخلية (Lodder, 1970 ; Barnett *et al.*, 1983) .

تمتلك خميرة *S. cerevisiae* القدرة على استعمال الببتيدات ومعظم الحوامض الأمينية (مثل الهستيدين، الكلايسين، السيستئين والليسين) فضلاً عن استعمالها للأمونيا كمصدر وحيد للنيتروجين، كما تعمل على تخمير سكر الكلوكوز بحيث تستعمل 98% منه عند التمثيل الغذائي بينما 2% فقط تتحول الى مواد خلوية ، في حين تنتج طاقة من عملية التمثيل الغذائي اللاهوائي (بغياب الاوكسجين) ويتحول الى مادة خلوية بنسبة تصل الى 10% من الكلوكوز وتعرف هذه العملية بتأثير باستور (Pasteur's effect) (Kreger-van Rij, 1984 ; *et al.*, 2016) .Montes de Oca

تستطيع سلالات خميرة *S. cerevisiae* أن تنمو هوائياً بوجود سكر الرافينوز والمالتوز والكلوكوز ولا يمكنها استهلاك السليبيوز واللاكتوز، بعض السلالات لا تخمر السليبيوز والتريهالوز وذلك لاختلاف قدرة الخميرة على استعمال السكريات فضلاً عن اختلاف ظروف التهوية (Kurtzman and Fell, 1998) ، كما أن للخميرة القدرة على إنتاج الفيتامينات منها فيتامين (B₁ , B₂ , B₅ , D) ، وتؤثر العناصر المعدنية في النشاط الأنزيمي لخلايا خميرة الخبز أو تدخل في تركيب الخلايا، ومن أهم العناصر النادرة والعناصر المعدنية والتي لها دور مهم في عملية

النمو (الكالسيوم، الفلور، البوتاسيوم، اليود، الليثيوم، المنغنيز، الفوسفور، الصوديوم، الحديد، النحاس، المغنيسيوم، الكوبلت، الكبريت، الألمنيوم والزنك) (Jach et al., 2015).

3-3-2 تطبيقات خميرة الخبز *S. cerevisiae*

عرفت خميرة الخبز منذ قديم الزمان بارتباطها المباشر بالإنسان ، إذ استعمل الإنسان خميرة *S. cerevisiae* والخمائر القريبة منها في صناعة الخبز والمشروبات الكحولية ومنتجات غذائية متخمرة مختلفة فضلاً عن إدخالها كمضافات علفية ، لذا فإن هذه الخميرة هي من أكثر الخمائر ذات قيمة صناعية وطبية (Tuite and Oliver, 1991 ; Riesute et al., 2021) ، أن خميرة *S. cerevisiae* هي المسؤولة عن التخمير الكحولي ، إذ تستعمل هذه الخميرة مجموعة متنوعة من السكريات السداسية مثل الكلوكوز والفركتوز والكاللاكتوز والمانوز فضلاً عن السكريات الثنائية مثل المالتوز والسكروروز لإنتاج CO₂ والايثانول ومجموعة مختلفة من نواتج الايض مثل الإسترات والالديهيدرات والأحماض الأمينية التي تساهم في تطوير نكهة الأغذية المتخمرة (Kurtzman et al., 2011).

تلعب خميرة *S. cerevisiae* دوراً مهماً في عملية التخمير الصناعي، إذ تستعمل لإنتاج الخل والايثانول وايضاً بروتين احادي الخلية (SCP) (Andrietta et al., 2017) ، فضلاً عن دورها في إنتاج المستحلبات الحيوية المختلفة (Ribeiro et al., 2020).

تعد خميرة الخبز مصدر غذائي غني لحامض الفوليك، ويصل محتوى حامض الفوليك في الخميرة الى (4 ملغم / 100 غم) (Patring et al., 2005) ، كما أن لها دوراً في إعادة التوازن المعوي أذ تعمل على إنتاج وتعزيز العديد من الأنزيمات التي تساعد في تكسير

العناصر الغذائية وامتصاصها وظيفياً مثل أنزيم (Sucrase-isomaltase , Invertase) (Moslehi-Jenabian *et al.*, 2010) ، كذلك فإن خميرة *S. cerevisiae* القدرة على التخلص من السموم الفطرية من خلال ارتباطها بالـ ochratoxin A و zearalenone وتنشيط نشاطهما (Yiannikouris *et al.*, 2004 ; Shetty and Jespersen, 2006) ، ايضاً لخميرة *S. cerevisiae* دور مهم في معالجة الاسهال الشديد وبالأخص عند الأطفال (Szajewska *et al.*, 2007).

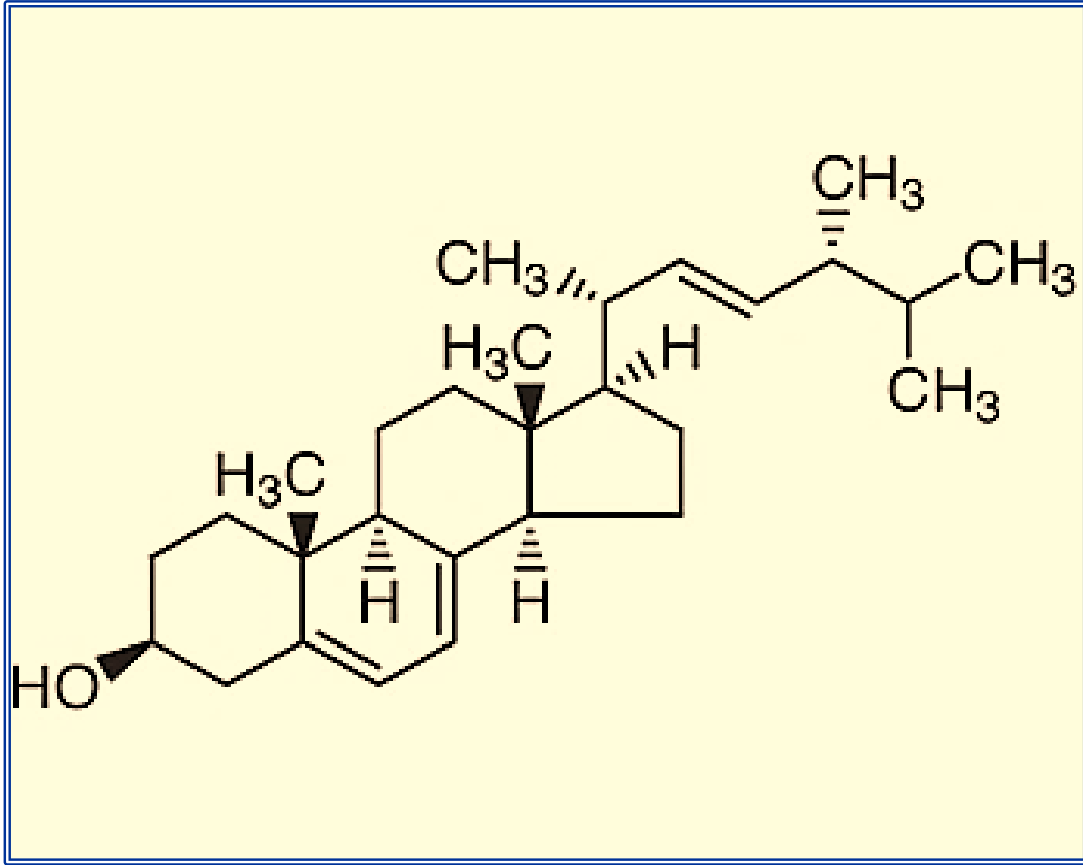
تستعمل خميرة الخبز على نطاق واسع في إنتاج المكونات الخلوية الجزيئية مثل الدهون والبروتينات والأنزيمات والفيتامينات ، إذ صنفت خميرة *S. cerevisiae* ضمن الكائنات الحية المشخصة على أنها آمنة (GRAS) من قبل إدارة الغذاء والدواء الامريكية (FDA) (Montes de Oca *et al.*, 2016) ، كذلك اشارت الدراسات العلمية الى أن خميرة *S. cerevisiae* تعد من المصادر الميكروبية المهمة لإنتاج الاركوستيرول (بروفايتمين D₂) ، إذ يعد الاركوستيرول أحد المكونات الرئيسية لخلايا خميرة الخبز (Jordá and Puig, 2020) .

Ergosterol (provitamin D₂)

4-2 الاركوستيرول

الاركوستيرول (5,7-diene oxysterol) يعرف أيضاً باسم بروفيتامين D₂ يعد من اكثر الستيروولات الميكروبية شيوعاً، وهو مادة عضوية بلورية بيضاء اللون و صيغتها الكيميائية C₂₈H₄₄OH، وهو ينتمي إلى عائلة الستيرويدات (Hirsch, 2011; Damini *et al.*, 2013) وكما في الشكل (2-3) ، الاركوستيرول هو ستيروول يوجد في أغشية خلايا الفطريات والمسؤول عن تنظيم

نفاذية ومرونة الغشاء (Rodrigues, 2018) ، يوجد الأركوستيروول بصورة طبيعية في فطر المشروم، خميرة الخبز وزيت كبد الحوت (Kadakal and Tepe, 2019).



شكل (1-2) التركيب الكيميائي للاركوستيروول (Provitamin D₂) (Damini *et al.*, 2013)

يوجد الاركوستيروول في اغلب الاحياء المجهرية ولكن توزيعه غير منتظم ، إذ لا تحتوي البكتريا على ستيروول أو تحتوي على كميات قليلة جداً (0.001- 0.01) % ، واحتوت الاعفان مثل الأنواع التابعة لأجناس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* و *Trichoderma* و *Cladosporium* على الاركوستيروول بنسب تراوحت بين (0.1-0.8%) (Zhao *et al.*, 2018)، في حين وجد الاركوستيروول في كل من خميرة *Saccharomyces* وخميرة *Candida* بإنتاجية أعلى من البكتريا والاعفان والتي تراوحت بين (0.04- 4.6) % من الوزن الجاف للخلية ، ويأتي

في مقدمتها النوع *Saccharomyces cerevisiae* والتي اصبحت مصدراً تجارياً لإنتاجه (Tan *et al.*, 2003 ; Shang *et al.*, 2006 ; Náhlík *et al.*, 2017; Blaga *et al.*, 2018).

يعرف الاركوستيرون بأنه (هرمون فطري) يساعد على تحفيز النمو والتكاثر وهو مادة دهنية نشطة مناعياً (Rodrigues, 2018) ، له وزن جزيئي 396.65 ودرجة انصهار تتراوح بين 156-158 م° اما درجة الغليان فكانت 250 م° (Damini *et al.*, 2013) ، يعد الاركوستيرون المولد (المهدد) لفيتامين D₂ فضلاً عن استعماله في إنتاج الكورتيزون (Tan *et al.*, 2003) ، يلعب الاركوستيرون دوراً في تنظيم النفاذية الانتقائية فضلاً عن موقعه في الغشاء وهو مركب مهم لخلايا الفطريات السليمة ، كما أُعتبر الاركوستيرون كمؤشر لتحديد نمو الفطريات في الأغذية (Kadagal and Tepe, 2019) .

1-4-2 الوظيفة الفسيولوجية للاركوستيرون

The Physiological Function of Ergosterol

يعد الاركوستيرون مكوناً مهماً من مكونات غشاء الخلية الفطرية، إذ يقوم بتثبيت بنية الغشاء من خلال الارتباط بالفوسفوليبيدات وتنظيمه لنفاذية الغشاء وتنشيط فعالية الأنزيمات المرتبطة به فضلاً عن دوره في نقل المواد داخل وخارج غشاء الخلية (Hu *et al.*, 2017; Kadagal and Tepe, 2019) ، كما أن للاركوستيرون تأثيراً محتملاً على امتصاص وتمثيل العناصر الغذائية عن طريق تنظيم أنشطة أنزيمات ATPase المرتبطة بالغشاء فضلاً عن تنظيم كفاءة نقل أنزيمات الفوسفولايبيز Phospholipases من خلال التأثير على حركة غشاء الخلية (Zhang *et al.*, 2010) ، أن الاركوستيرون يخزن في السايتوبلازم تحديداً في القطرات الدهنية على شكل ستيرون أستر، والذي يمكن أن يكون بمثابة خزين للستيرون للحفاظ على

توازنه داخل الخلايا (Choudhary and Schneiter, 2012) ، علاوة على ذلك فإن الاركوسستيرول يعمل على تحفيز نمو الفطريات وتكاثرها (أذ يعد هرموناً فطرياً) كما يلعب ايضاً دوراً مهماً في التكيف مع الإجهاد أثناء التخمير ، إذ وجد أن قدرة الخميرة على تحمل الإجهاد ترتبط ارتباطاً وثيقاً بمستويات الاركوسستيرول (Montañés *et al.*, 2011) ، كما أظهرت الدراسات بأن الخميرة التي تقاوم ظروف التجميد فضلاً عن ظروف انخفاض السكر يكون محتواها من الاركوسستيرول اعلى من الخميرة تحت الظروف الاعتيادية (Aguilera *et al.*, 2006 ; Kodedová and Sychrová, 2015) .

الاركوسستيرول هو الستيروول الرئيسي لغشاء الخلية في معظم الفطريات الكيسية ويتم تخليق الاركوسستيرول في الشبكة الإندوبلازمية (ER) ، يختلف الاركوسستيرول عن الكوليسترول في وجود أصرة مزدوجة في حلقة الستيروول الثانية عند الموقع (7،8) وفي السلسلة الجانبية للستيروول عند الموقع (22،23) وميثيل إضافي عند ذرة الكربون (C24) من الستيروول (Weete *et al.*, 2010 ; Blosser, 2013) .

2-4-2 التخليق الحيوي للاركوسستيرول من خميرة *S. cerevisiae*

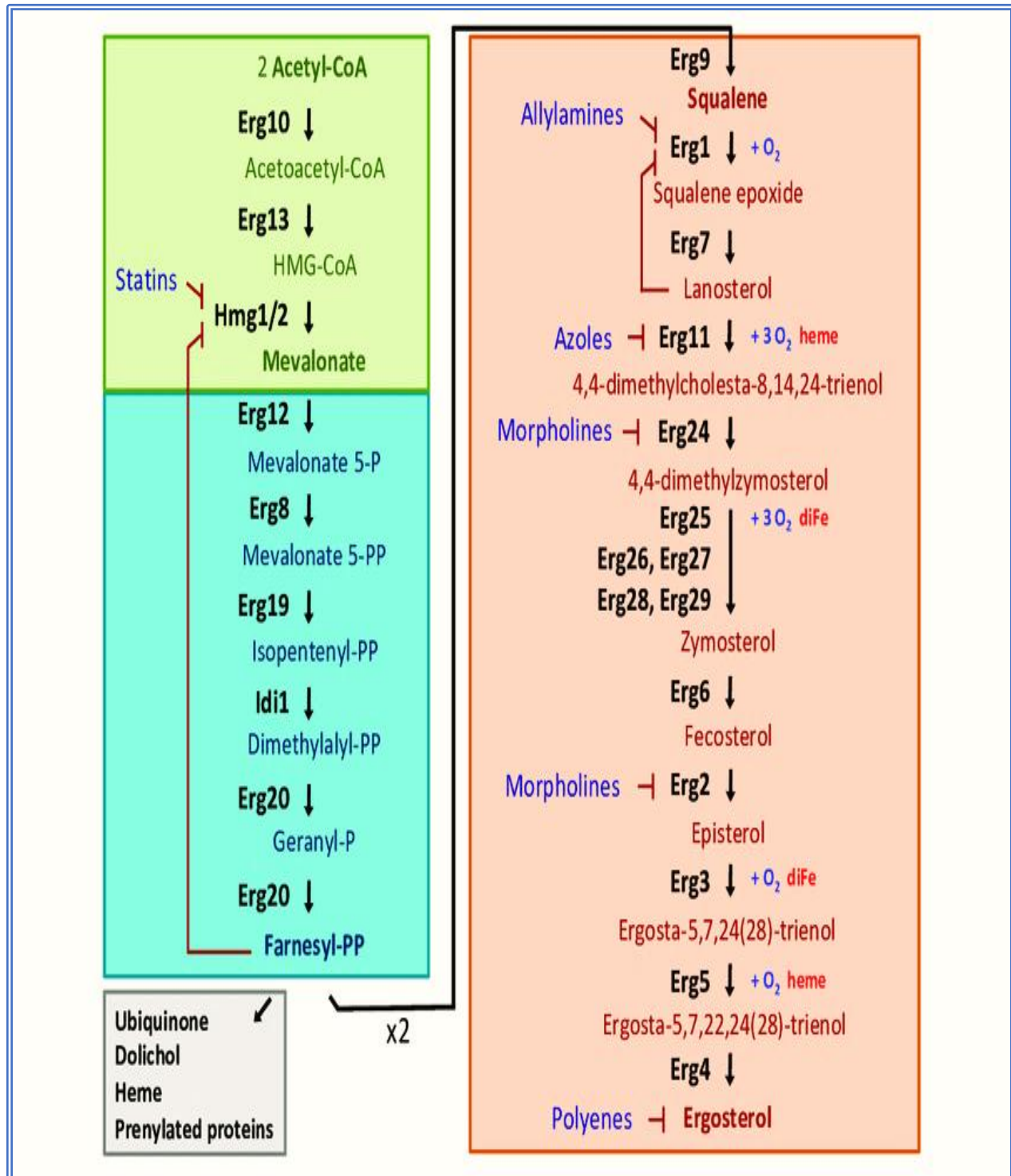
Ergosterol Biosynthesis in Yeast *S. cerevisiae*

أن خميرة *S. cerevisiae* لا يمكنها الحصول على الستيروول من مصادر خارجية لذلك فأنها تلبي احتياجاتها منه عن طريق تصنيع الاركوسستيرول الخاص بها من خلال مسار معقد للغاية تشترك فيه العديد من الأنزيمات ، إذ يتطلب التخليق الحيوي لجزيء واحد من الاركوسستيرول في خميرة *S. cerevisiae* استهلاك ما لا يقل عن 24 جزيئة من ATP و 16 جزيئة من NADPH ، كما أن مسار التخليق الحيوي يقسم حسب المنتجات الوسيطة الى ثلاثة أجزاء والتي تشمل التخليق

الحيوي للميفالونات (Mevalonate) ، والتخليق الحيوي لـ farnesyl-PP (مركب وسطي يتكون عند التخليق الحيوي للتربينات والترينويدات مثل الستيرويدات) والتخليق الحيوي للاركوستيروول (Hu *et al.*, 2017 ; Jordá and Puig, 2020) وكما موضح في الشكل (2-4) ، يتكون مسار الميفالونات (Mevalonate) والمعروف ايضاً بمسار HMG-CoA من ثلاث خطوات ، إذ يبدأ تخليق الاركوستيروول الحيوي بتكثيف جزيئتين من المرافق الأنزيمي (acetyl-CoA) لإنتاج acetoacetyl-CoA وتتخفز هذه الخطوة بواسطة أنزيم acetoacetyl-CoA thiolase (ERG10) وتتم هذه العملية في الفجوة ، يتكثف بعدها الجزيء الثالث من المرافق الأنزيمي acetyl-CoA إلى acetoacetyl-CoA بواسطة أنزيم hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (ERG13) والذي يختزل إلى mevalonate بفعل أنزيم HMG-CoA reductase ويحدث هذان التفاعلان في الميتوكوندريا (Miziorko, 2011 ; Klug and Daum, 2014) .

اما الجزء الثاني من المسار فإنه يتم في الفجوة ويتضمن ستة تفاعلات يتم من خلالها تكوين فارنيسيل بيروفوسفات (farnesyl-PP) وهو مركب وسطي مهم في التخليق الحيوي للستيروولات والبنزوكوينون والهيموغلوبين، وهذه التفاعلات تتم بفعل أنزيمات mevalonate kinase (ERG12) و phosphomevalonate kinase (ERG8) و (ERG19) Isopentenyl diphosphate (IDI) و mevalonate pyrophosphate decarboxylase Isomerase و farnesyl pyrophosphate synthetase (ERG20) على التوالي (Miziorko, 2011; Hayakawa *et al.*, 2017) .

في حين أن الجزء الثالث أو ما يعرف بالمسار المتأخر والذي يتم من خلاله إنتاج الاركوستيرون من المركب (farnesyl-PP) والذي يتضمن 15 خطوة متتالية وتحدث هذه التفاعلات بشكل أساسي في غشاء الشبكة الإندوبلازمية (ER) ، إذ يتم أولاً في هذا المسار استعمال جزيئين من المركب الوسيطى فارنيسيل بيروفوسفات (farnesyl-PP) بواسطة أنزيم Erg9 synthase squalene لتشكيل السكوالين (Squalene) وهو الممهد لجميع الستيرويدات ، اما في الخطوة الثانية يتم تحويل السكوالين الى اللانوستيرون (Lanosterol) على التوالي بواسطة أنزيمات (squalene epoxidase Erg1) وأنزيمات (lanosterol synthase Erg7) ، يتم تحويل اللانوستيرون إلى زايموستيرون (Zymosterol) من خلال عملية معقدة تتضمن سلسلة من التفاعلات المختلفة لإزالة الميثيل والاختزال التي يتم تحفيزها بواسطة اللانوستيرون lanosterol 14- α -demethylase Erg11 (المعروف أيضاً باسم Cyp51) واختزال C-14 Erg24 ومجموعة إزالة الميثيل المعقدة C-4 Erg25-Erg26-Erg27 ، إذ يدخل كل من Erg28 و Erg29 في تفاعل مركب إزالة الميثيل C-4 المعقد (Ward *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 2019) ، يوجد الزايموستيرون (Zymosterol) المركب الوسيطى الأول في مسار التخليق الحيوي في الأغشية الخلوية *al.*, (Zinser 1993) ، يحول Erg6 الزايموستيرون الى فيكوستيرون (Fecosterol) بعد ذلك يتكون الابينستيرون (Episterol) بواسطة Erg2 ويكون هذا التحول غير مشبع ويجرى اختزاله وتحويله بواسطة Erg3 و Erg5 و Erg4 الى الاركوستيرون.



شكل (2-2) التخليق الحيوي للاركوستيروول في خميرة *S. cerevisiae* (Hu et al., 2017)

3-4-2 طرق استخلاص وتقدير الاركوستيرون

Extraction and determination ergosterol methods

يعد الاستخلاص احد طرق الفصل الكيميائي لفصل مادة أو عدة مواد عن بعضها البعض، إذ يمكن استخلاص الستيرويدات من الفطريات اما بالطرق التقليدية (مثل الاستخلاص بالسكسوليت) أو بالطرق غير تقليدية (مثل الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية أو بالميكرويف أو المذيبات أو الاستخلاص بالموائع فوق الحرجة أو الاستخلاص تحت الضغط) الا أن عملية الصبونة تعد الطريقة القياسية لأستخلاص الستيرويدات باستعمال المذيبات المختلفة من خلايا الخمائر والفطريات (Papoutsis *et al.*, 2020).

بين He *et al.*, (2000) إمكانية استخلاص خلايا الخميرة من وسط التخمير السائل باستعمال النبد المركزي ثم تقدير الاركوستيرون اعتماداً على طريقة الامتصاص الضوئي، إذ أجريت عملية صبونة باستعمال محلول هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي (50% KOH و C₂H₅OH بنسبة 2:3) والمضاف اليه n-heptane ثم الايثانول وأجريت قراءة للامتصاصية على الطول الموجي 281.5 و 230 نانومتر باستعمال جهاز المطياف الضوئي (UV-visible spectrophotometer) وقدر محتوى الاركوستيرون حسب المعادلة التالية :

$$\text{Ergosterol content (Mg/g dry cells)} = \left(\frac{\text{OD } 281.5 \text{ nm}}{290} \right) - \left(\frac{\text{OD } 230 \text{ nm}}{518} \right) \times F$$

وضح Holloway, (2011) في طريقته لاستخلاص وتقدير الاركوستيرون، بعد تنمية الخميرة على وسط YPED وأجريت عملية نبد مركزي بعدها الصبونة باستعمال محلول 15% KOH الكحولي، استخلص الستيرون بإضافة n-heptane ، وخفف الستيرون بالايثانول

(100%) وأجريت قراءة للامتصاصية باستعمال جهاز (UV-visible spectrophotometer)

وقدر محتوى الاركوستيرون حسب المعادلة التالية :

$$\% \text{ Ergosterol} + \% \text{ 24(28) DHE} = \left[\left(\frac{A_{281.5 \text{ nm}}}{290} \right) \times F \right] / \text{ وزن العينة}$$

$$\% \text{ 24(28) DHE} = \left[\left(\frac{A_{230 \text{ nm}}}{518} \right) \times F \right] / \text{ وزن العينة}$$

$$\% \text{ Ergosterol} = (\% \text{ Ergosterol} + \% \text{ 24(28) DHE}) - \% \text{ 24(28) DHE}$$

كذلك استخلص Wu *et al.*, (2012) الاركوستيرون من خميرة *S. cerevisiae*

بعد عملية التخمر واجراء الصوبنة وتقديره اعتماداً على تركيز الاركوستيرون (C) في العينة

(ملغم / مل) وحجم المذيب المستعمل في الاستخلاص (V) ووزن الخميرة (W) على أساس الوزن

الجاف وكما في المعادلة :

$$\text{Ergosterol (\%)} = \frac{CV}{1000 W} \times 100$$

تمكن Barreira *et al.*, (2014) من استخلاص الاركوستيرون من خلايا فطر المشروم ،

استعمل الفطر المجفف المضاف له methanol/dichloromethane وأجري له نبذ مركزي ، قدر

له الاركوستيرون باستعمال جهاز (HPLC) وبالطور المتحرك acetonitrile: methanol على

الطول الموجي 280 نانومتر وقدرت كميته من خلال مقارنة مساحة المنحنى القياسي له مع منحنى

الكولكالسفيرول القياسي .

درس Nowak *et al.*, (2016) إمكانية استخلاص خلايا الكائن المجهرى من وسط التخمر

وتشخيص الاركوستيرون بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) لفطر *Hygrophoropsis*

aurantiaca ، إذ أجريت عملية صوبنة بإضافة KOH و n-hexane ، شخص الاركوستيرول بتقنية (TLC) والتي تعتمد على انفصال n-hexane بالسليكا جل لصفحة (TLC) وباستعمال المذيب toluene/ethyl acetate.

عمل (Pastinen *et al.*, 2017) على استخلاص الاركوستيرول بالمذيبات من الكتلة الحيوية لخميرة الخبز وتقدير كميته من خلال اجراء عملية الصوبنة وذلك بإضافة NaOH و 1-butanol الى خلايا الخميرة الجافة مع المزج ثم النبد المركزي ، قدر الاركوستيرول المستخلص باستعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) .

4-4-2 الظروف المثلى لإنتاج الاركوستيرول

The optimum conditions on production of ergosterol

1-4-4-2 أفضل وسط لإنتاج الاركوستيرول

The optimum media for the production of ergosterol

تتأثر إنتاجية الكتلة الحيوية المتكونة وكمية المنتج المرغوب بصورة مباشرة بنسبة ونوع كل من المصدر النيتروجيني والمصدر الكربوني المضافة في وسط الإنتاج (Tuite and Oliver, 1991)، إذ استعمل (He *et al.*, 2000) وسط YEPD لتنمية خميرة *S. cerevisiae* بهدف إنتاج الاركوستيرول ، بينما درس (Arthington-Skaggs *et al.*, 2000) إمكانية الحصول على افضل انتاجية للاركوستيرول من خميرة *Candida albicans* باستعمال وسط Sabouraud dextrose agar ، في حين وجد (Damini *et al.*, 2013) أن إنتاجية الاركوستيرول كانت افضل عند استعمال وسط مكون من الكلوكوز ، يوريا ، Soybean meal ، KH_2PO_4 ، NaNO_3 و MgSO_4 ، اما (Abd-Elsalam *et al.*, 2017) فقد عمل على تحويل

الوسط الذي استعمله (2013) Damini *et al.*, من خلال إضافة سائل Corn steep liquor بدلاً من Soybean meal كمصدر نيتروجيني في وسط الإنتاج .

2-4-4-2 أفضل مصدر كربوني لإنتاج الاركوستيرول

The optimum carbon source for ergosterol production

يعد المصدر الكربوني من العناصر الغذائية المهمة لمختلف أنواع الخمائر كما تؤدي المصادر الكربونية وبالأخص العضوية منها دوراً مزدوجاً في الخلية ، والذي يتمثل في عمليات بناء مختلف المنتجات الايضية وايضاً إنتاج الطاقة ، إذ تمتاز الخمائر بأن لها القابلية على النمو في مدى واسع من المصادر الكربونية مثل الكربوهيدرات والكحولات والاحماض العضوية والدهنية (Tuite and Oliver, 1991; Kurtzman *et al.*, 2011) ، إذ درس تأثير مصادر كربونية مختلفة على إنتاجية الاركوستيرول وتوصل الى أن افضل مصدر كربوني هو الكلوكوز مقارنة مع سكر القصب (المولاس) والسكروز ، في حين وجد (Ghanem *et al.*, 1990) إمكانية إنتاج الاركوستيرول من عفن *Penicillium crustosum* باستعمال مولاس البنجر كمصدر كربوني وشراب الذرة كمصدر نيتروجيني .

3-4-4-2 الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج الاركوستيرول

The optimum pH for the production of ergosterol

تعود أهمية الرقم الهيدروجيني لنمو الخمائر يعود الى تأثيره في صفات الوسط مثل ذائبية مكونات الوسط الغذائي والتحكم بنسب التوافر الحيوي لهذه المكونات فضلاً عن تأثيره في تأين وثبات المركبات الحيوية الناتجة اثناء عملية التخمر، كما يعتمد الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط الزراعي على نمو الخميرة ونوع المنتج المرغوب المراد إنتاجه

(Tuite and Oliver, 1991; Kurtzman *et al.*, 2011) ، توصل (He *et al.*, 2000) عند دراسته لمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين 4-8 أن افضل رقم هيدروجيني لإنتاج الاركوسستيرول من خميرة *S. cerevisiae* عند 6 في حين كانت أفضل إنتاجية للكتلة الحيوية عند 6.5، اما (Zhao *et al.*, 2018) فإنه وجد اقصى إنتاجية للاركوسستيرول من العفن *Cladosporium cladosporioides* عند رقم هيدروجيني 7.5 .

4-4-4-2 درجة الحرارة المثلى لإنتاج الاركوسستيرول

The optimum temperature for the production of ergosterol

تؤثر درجة الحرارة في تحديد نشاط الاحياء المجهرية المختلفة كالنمو والفعاليات الحيوية الاخرى وبذلك تعد احدى العوامل المهمة للسيطرة على عمليات الهدم والبناء الحيوي ولاسيما في الصناعات التخمرية ، غالباً ما ترتبط درجة الحرارة المثلى بنوع الاحياء المجهرية المستعملة في الإنتاج ، كما أن درجة الحرارة المثلى لنمو الكائن المجهرى لا تكون دائماً هي المثلى لإنتاج المنتج المرغوب (الخفاجي، 1990 ; Tuite and Oliver, 1991) ، استعمل (Endo *et al.*, 2009) درجة حرارة 30 م° للحصول على أعلى كمية من الاركوسستيرول ، كما لاحظ (Li *et al.*, 2009) بأن الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج الاركوسستيرول من عفن *Penicillium roqueforti* كانت 25 م° ، في حين أنتج (Veen *et al.*, 2003) الاركوسستيرول من خميرة *S. cerevisiae* عند درجة حرارة 28 م° ، كذلك وجد (Shang *et al.*, 2006) أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الاركوسستيرول من خميرة *S. cerevisiae* كانت عند 30 م° .

2-4-4-5 مدة الحضانة المثلى لإنتاج الأركوستيروول

The optimum incubation period for ergosterol production

تعد مدة الحضانة عاملاً آخر من العوامل المهمة التي تحدد في ضوءها الإنتاج الأمثل للمركبات أو المنتجات الأيضية المختلفة بواسطة الأحياء المجهرية (الخفاجي، 1990)، إذ وجد (He et al., 2000) أن أفضل مدة حضانة لإنتاج الأركوستيروول من خميرة *S. cerevisiae* كانت 30 ساعة بينما بلغت أعلى إنتاجية للكتلة الحيوية عند 55 ساعة، في حين لاحظ (Ghanem et al., 1990) أن مدة الحضانة المثلى لإنتاج الأركوستيروول من عفن *Penicillium crustosum* هي 8 أيام، درس (Veen et al., 2003) إمكانية إنتاج الأركوستيروول من خميرة *S. cerevisiae* عند الحضانة لمدة 3 أيام، درس (Lavová et al., 2013) تأثير مدد حضانة مختلفة تراوحت بين 0-76 ساعة على إنتاج الأركوستيروول من ثلاث عزلات تعود إلى خميرة *Saccharomyces cerevisiae* إذ لاحظ أن أفضل مدة حضانة كانت 52 ساعة، في حين وجد (Gomez-Lopez et al., 2011) أن أعلى كمية من الأركوستيروول في خميرة *S. cerevisiae* عند 48 ساعة من الحضانة.

2-4-4-6 حجم اللقاح الأمثل لإنتاج الأركوستيروول

The optimum inoculum volume for the production of ergosterol

تختلف مستويات حجوم اللقاح المستعملة اعتماداً على نوع الكائن المجهرية ونوع المادة الأيضية المراد إنتاجها، أن قلة حجم اللقاح قد لا تؤدي إلى حدوث عملية التخمير بشكل كامل بالتالي تكون كمية المنتج المرغوب منخفضة في حين أن الزيادة في حجم اللقاح ينتج عنها تنافس الأحياء المجهرية على مكونات الوسط والمغذيات وبالتالي نفاذها في وقت مبكر وكذلك استهلاك

الايوكسجين نتيجة النمو وتكتل الخلايا وبالتالي انخفاض إنتاجية المنتج المرغوب (الخفاجي ، 1990 ; احمد والنواوي، 1999) ، حصل (He *et al.*, 2000) على أفضل حجم لقاح لإنتاج أكبر كمية من الكتلة الحيوية لإنتاج الأركوستيرول كانت عند 10 مل، أيضاً لاحظ (Damini *et al.*, 2013) أن كمية الأركوستيرول تزداد عند حجم لقاح 10 مل عند إنتاجه من خميرة *S.cerevisiae* ، في حين استعمل (Shang *et al.*, 2006) حجم لقاح وصل الى 10% (حجم / حجم) من خميرة *S.cerevisiae* لإنتاج أعلى كمية من الأركوستيرول ، بينما استعمل (Abd-Elsalam *et al.*, 2017) حجم لقاح مقداره 60 مل / لتر من الوسط لإنتاج الأركوستيرول من خميرة *Saccharomyces boulardii* .

7-4-4-2 سرعة الاهتزاز الأمثل لإنتاج الأركوستيرول

The optimum shaking speed for the production of ergosterol

تمنع سرعة الاهتزاز تكتل الخلايا وتساعد في زيادة ذوبانية الأوكسجين في وسط الإنتاج فضلاً عن مزج مكوناته، كما أن الأوكسجين يمتلك تأثيرات مختلفة على تكوين المنتجات الأيضية خلال التخمرات الهوائية وذلك من خلال تأثيره في المسارات الأيضية لمختلف الأحياء المجهرية (الخفاجي ، 1990 ; احمد والنواوي، 1999) ، إذ اشارت الدراسات الى أن استرات الستيروول Sterol esters تتكون بكميات كبيرة خلال النمو الهوائي في حين تنخفض عندما تكون الخلايا تحت الظروف اللاهوائية (Rychtera *et al.*, 2010) ، استعمل (Endo *et al.*, 2009) سرعة الاهتزاز 150 دورة / دقيقة لإنتاج أكبر كمية من الأركوستيرول من خميرة *S.cerevisiae* ، أشار (He *et al.*, 2000) الى أن سرعة الاهتزاز المثلى لإنتاج الأركوستيرول من خميرة *S.cerevisiae* هي 200 دورة / دقيقة ، لاحظ (Damini *et al.*, 2013) أن أفضل

سرعة اهتزاز لإنتاج أكبر كمية من الاركوسـتيرول كانت عند 200 دورة / دقيقة ، في حين بين Lavová *et al.*, (2013) أن أفضل إنتاجية للاركوسـتيرول كانت عند سرعة اهتزاز 180 دورة / دقيقة ، اما Zhao *et al.*, (2018) فإنه لاحظ أن كمية الاركوسـتيرول المنتجة تزداد عند سرعة اهتزاز 120 دورة / دقيقة ، كما وجد Shang *et al.*, (2006) بأن أعلى إنتاجية للاركوسـتيرول المنتج من خميرة *S.cerevisiae* كانت عند سرعة اهتزاز وصلت الى 600 دورة / دقيقة .

Vitamin D

5-2 فيتامين D

Vitamin D Structure

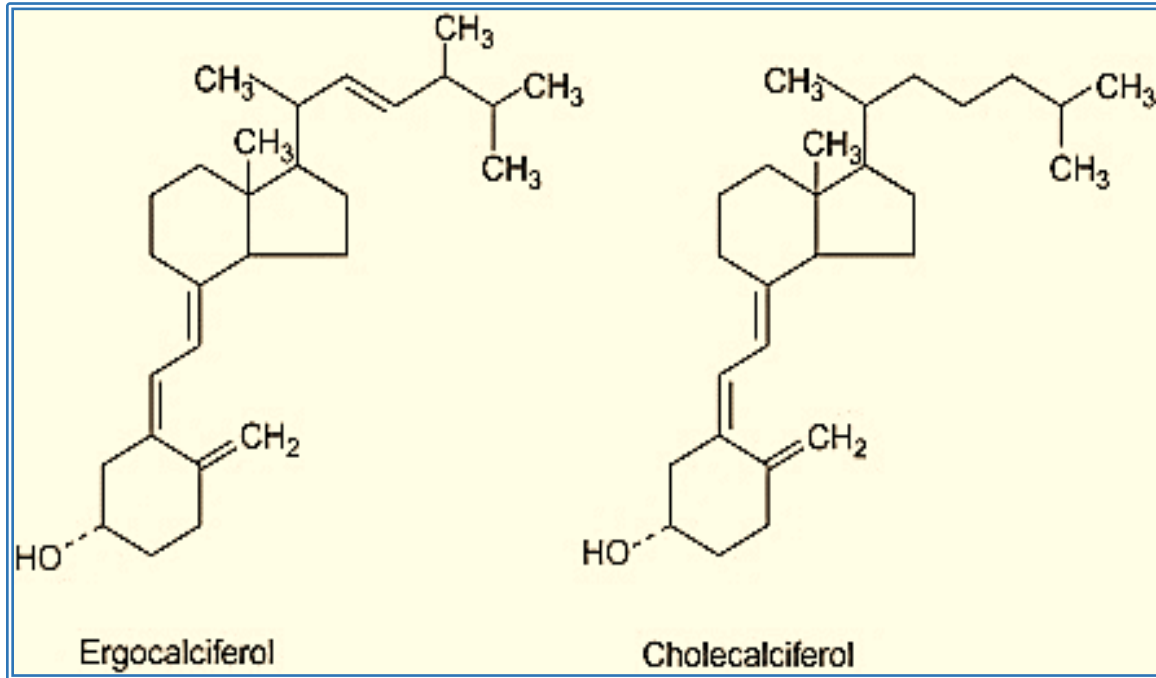
1-5-2 تركيب فيتامين D

يعد أحد الفيتامينات القابلة للذوبان في الدهون وهو هرمون سـتيرويد ينتج تحت الجلد عند تعرضه للأشعة فوق البنفسجية (الشمس) ويمكن الحصول عليه من بعض المصادر الغذائية أو المكملات الغذائية ، يعرف فيتامين D ايضاً " بفيتامين الشمس" واكتشف لأول مرة في عام 1650 من قبل العالم Francis Glisson عند إصابة عدد من الأطفال بمرض الكساح ، بينما لاحظ Sinadecki عام 1822 أن هناك علاقة بين مرض الكساح ونقص التعرض لأشعة الشمس (Dini and Bianchi, 2012 ; Bokhari and Albaik, 2019) ، يصنف فيتامين D على أنه عنصر غذائي أساسي للجسم (Cowbrough , 2015) .

يمثل فيتامين D مجموعة من الستيرويدات التي يبلغ عددها 11 مركبا والتي أهمها فيتامين D₂ أو " الكالسفيرول Calciferol" والذي يتكون من الاركوسـتيرول Ergosterol ، وفيتامين D₃ أو " الكولكالسفيرول Cholecalciferol " ، ينتج فيتامين D₂ من الاركوسـتيرول وهو عبارة عن سـتيرول متواجد بكثرة في الفطريات (ينتج بطريقة شبه حيويه)

ويتكون بتعرضه للأشعة فوق البنفسجية (Taofiq *et al.*, 2017) ، اما فيتامين D₃ يتكون من تعرض الستيروول الحيواني المشتق من الكوليسترول للأشعة فوق البنفسجية ، يوجد فيتامين D₃ في بعض المصادر والمنتجات الحيوانية مثل زيت كبد الحوت والاسماك مثل السلمون والسردين والتونة وايضاً الزيت والمارجرين والجبن ، وهو مشتق من الكوليسترول (Wu and Ahn, 2014 ; Zhang *et al.*, 2015 ; Cardwell *et al.*, 2018) .

يختلف فيتامين D₂ عن فيتامين D₃ في مجموعة الميثيل عند ذرة الكربون C₂₄ فضلاً عن وجود الأصرة المزدوجة بين نرتي الكربون C₂₃-C₂₂ وكما موضح في الشكل (1-2) ، الكولكالسيفيرول يصنعه الجسم تحديداً تحت الجلد عندما يكون التعرض لأشعة الشمس كافياً لذلك سُمي " بفيتامين أشعة الشمس " ، إذ تعتمد كمية فيتامين D₃ على مدة التعرض لأشعة الشمس وسطح الجلد والطول الموجي للإشعاع (Alexiou, 2016 ; Saponaro *et al.*, 2020) .



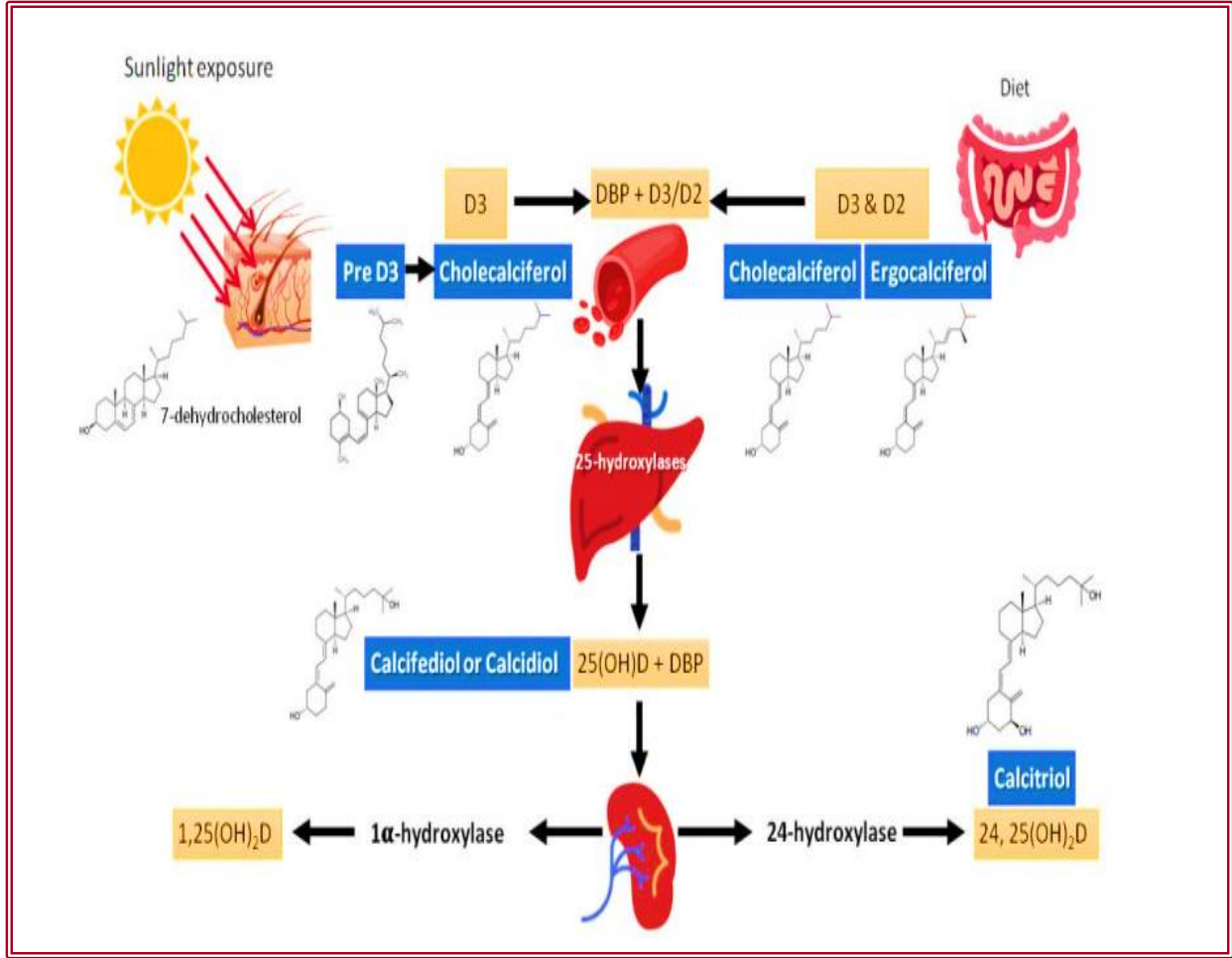
شكل (2-3) التركيب الكيميائي لفيتامين D₂ و D₃ (Cardwell *et al.*, 2018)

Vitamin D synthesis

2-5-2 تخليق فيتامين D

يختلف فيتامين D عن غيره من الفيتامينات بإمكانية تصنيعه في الجسم عن طريق التعرض لأشعة الشمس (Cowbrough , 2015) ، إذ اشار (Dini and Bianchi, 2012) الى إمكانية الحصول على فيتامين D₂ من تعريض الاركوستيروول للأشعة فوق البنفسجية ، إذ يوجد فيتامين D في جسم الأنسان بعدة أشكال: أهمها هو 1,25-hydroxyvitamin D و 1,25- dihydroxyvitamin D النشط ، يتم إنتاج فيتامين D تحت الجلد عن طريق التعرض للأشعة فوق البنفسجية (UV) (من خلال تحويل 7-dehydrocholesterol الموجود في فيتامين D₃ أو الكالكالسيفيرول) وكما موضح في الشكل (2-2) أو قد يتم امتصاصه من خلال عدد قليل من الأغذية ، أو يمكن تناول فيتامين D على شكل فيتامين D₃ أو فيتامين D₂ (مكملات غذائية).

يتم تحويل فيتامين D في الكبد والكلى الى الشكل الفعال 1,25dihydroxyvitamin D وهذا الشكل له دور مهم في الحفاظ على مستويات الدم من الفسفور والكالسيوم فضلاً عن تحسين امتصاصية الكالسيوم ، أن انزيمات الساييتوكروم لها دور رئيسي في العمليات الأيضية لفيتامين D ، تحدث الخطوة الأولى لتنشيط فيتامين D في الكبد ، إذ يعمل انزيم 25-hydroxylase على تحويل فيتامين D الى 25-hydroxyvitamin وهو الشكل المنتشر في الدم ، اما الخطوة الثانية فأنها تتم في الكلى بفعل أنزيم (CYP27B1) 25-hydroxyvitaminD-1-a- hydroxylase والمرافق الأنزيمي ferredoxin و ferredoxinreductase الذي يحول 25[OH]D الى 1,25[OH]₂D (Kalaras, 2012) .



شكل (4-2) تخليق فيتامين D في جسم الإنسان (Dominguez *et al.*, 2021)

Importance of Vitamin D

3-5-2 أهمية فيتامين D

لفيتامين D أهمية في تحفيز النمو والمحافظة على صحة الجسم ، إذ يعزز فيتامين D من امتصاص الكالسيوم في الأمعاء ويحافظ على تركيزه في الدم وله دور مباشر في تكوين العظام وتقويتها ويقي من الإصابة بالكساح لدى الأطفال (Rickets) وايضاً من الإصابة بهشاشة العظام (Osteomalacia) فضلاً عن دوره الكبير في الحد من الأمراض كأمراض القلب وتصلب الشرايين

(Nair and Maseeh, 2012 ; Bokhari and Albaik, 2019) ، كذلك السيطرة على امتصاص ونقل بعض الاملاح المعدنية كالكالسيوم والفسفور وتنظيم حركتهما داخل وخارج الهيكل العظمي للحفاظ على قوة العظام ، ايضاً له دور في عملية خفض إصابة كبار السن ببعض الامراض مثل مرض الزهايمر وأنواع من السرطانات (Yazawa *et al.*, 2000 ; Hirsch *et al.*, 2011 ; Ledesma-Amaro *et al.*, 2013) ، كما ظهر حديثاً أن لفيتامين D دور في تقليل الإصابة بفيروس COVID-19 ، إذ يقلل من حدوث التهابات الجهاز التنفسي ويعزز مناعة الجسم (Bassatne *et al.*, 2021) .

أن نقص فيتامين D يحدث نتيجة نقص المغذيات التي يحتاجها الجسم أي عندما يكون الاستهلاك أقل من المستويات الموصى بها ، تحدث هذه الظاهرة عند اتباع الحميات الغذائية المرتبطة بأمراض السمنة أو تناول الحليب الفريز أو الأغذية الخالية من الدهون وهذا يؤثر على امتصاص الكالسيوم في الامعاء الدقيقة ، إذ أن فيتامين D والكالسيوم أحدهما مرتبط بالأخر، فيتامين D مهم جداً ونقصه يؤدي الى الإصابة بهشاشة العظام وتقوس الساقين وقصر القامة ، ويحدث هذا ايضاً بسبب عدم كفاية تناول الكالسيوم (Cowbrough , 2015 ; Alexiou, 2016) .

أن أشعة الشمس تكون محدودة في بعض البلدان، وبسبب عدم التعرض الكافي للأشعة فوق البنفسجية (UV) لا يستطيع جسم الإنسان من تحويل 7-dehydrocholesterol الموجود تحت الجلد إلى فيتامين D، هنالك أسباب أخرى لنقص الفيتامين منها استعمال واقي الشمس، تركيز صبغة الميلانين

(الأشخاص ذوي البشرة الداكنة تكون لديهم كمية فيتامين D المنتجة تحت الجلد أقل عند تعرضهم لأشعة الشمس) ، أمراض السمنة أو الشيخوخة، كما أن النساء اللاتي تعرضن لأشعة الشمس بشكل منخفض للغاية معرضات لخطر الإصابة بتلين العظام بعد فترة الحمل بسبب احتياج الجسم إلى كمية أكبر من الكالسيوم (Mawer and Davies, 2001 ; Schagen *et al.*, 2012 ; Wu and Ahn, 2014) .

2-5-4 الكميات الغذائية الموصى تناولها من فيتامين D

Recommended dietary intakes of vitamin D

تختلف الكميات الغذائية الموصى بها (RDA) من فيتامين D والتي تتطلب تناول حوالي 400 – 2000 وحدة دولية اعتماداً على عدة عوامل منها العمر ولون البشرة ووزن الجسم والأشخاص الذين يعانون من السمنة (Schagen *et al.*, 2012 ; Taofiq *et al.*, 2017 ; Pludowski *et al.*, 2018) وكما موضح في الجدول (2-2) .

جدول (2-2) الكميات الغذائية الموصى بها من فيتامين D (Schagen *et al.*, 2012)

العمر	الرجال	النساء	الحمل	الرضع
0 - 12 سنة	400 وحدة دولية	400 وحدة دولية		
1 - 13 سنة	600 وحدة دولية	600 وحدة دولية		
14 - 18 سنة	600 وحدة دولية	600 وحدة دولية	600 وحدة دولية	600 وحدة دولية
19 - 50 سنة	600 وحدة دولية	600 وحدة دولية	600 وحدة دولية	600 وحدة دولية
51 - 70 سنة	600 وحدة دولية	600 وحدة دولية		
< 70 سنة	800 وحدة دولية	800 وحدة دولية		

Vitamin D toxicity (VDT)

5-5-2 سمية فيتامين D

من النادر جداً حدوث تسمم بسبب فيتامين D أو ما يعرف بسمية فيتامين D (Vitamin D toxicity) وقد ينتج التسمم عن تناول كميات كبيرة من المكملات الغذائية الحاوية على هذا الفيتامين ولفترات طويلة أو تناول كميات فائضة عن الحاجة من الكالسيوم بشكل موازٍ وبالتالي حدوث حالة مرضية تسمى فرط كالسيوم الدم hypercalcemia نتيجة ارتفاع نسبة الكالسيوم في الدم عن مستواها الطبيعي والتي قد تسبب اعراض مختلفة منها الإمساك ، العطش ، كثرة التبول والقلق النفسي (Marcinowska-Suchowierska *et al.*, 2018 ; Fraser, 2021).

Sources of vitamin D

6-5-2 مصادر فيتامين D

هنالك ثلاث مصادر رئيسية لفيتامين D الأول هو الجلد البشري (أذ يحتوي على 7-DHC بمدى يتراوح بين 0.5-1.3 مايكروغرام / سم²) عند تعرضه الى اشعة الشمس على طول موجي يتراوح بين 290-320 نانومتر ينتج عنه فيتامين D₃ بعد مروره بعدة خطوات ، اما المصدر الثاني فهو الفطريات التي تنتج الاركوستيرول والذي يتم تحويله الى فيتامين D₂ ، في حين ان المصدر الثالث لفيتامين D زيت كبد الحوت والذي يحتوي على كمية مرتفعة منه ، أن مصادر الحصول على فيتامين D والمتمثلة بأشعة الشمس وايضاً بعض أنواع الغذاء تكون غير كافية لسد نقص هذا الفيتامين لأسباب مختلفة (Dominguez *et al.*, 2021; Fraser, 2021) ، ، ايضاً بعض الاغذية التي تحتوي على كميات منخفضة من فيتامين D منها صفار البيض واللحوم الحمراء فضلاً عن المارجرين (Cowbrough, 2015) وكما مبين في الجدول (2-3) ، تعد خميرة الخبز *S.cerevisiae* من المصادر الميكروبية المهمة لفيتامين D لكونها آمنة فضلاً عن

خصائصها الحيوية، إذ يمكن أن تكون بديلاً لسد النقص في فيتامين D كونها تحتوي على الاركوستيرول الذي يتحول عند تعريضه للأشعة فوق البنفسجية الى فيتامين D₂ ، إذ يمكن أن تصل كمية الكولي كالسيفيرول (فيتامين D₃) في خميرة *S.cerevisiae* الى 4428.11 وحدة دولية / غم (Shang *et al.*, 2006 ; Amiri *et al.*, 2019).

جدول (2-3) محتوى فيتامين D في الأغذية (O'Mahony *et al.*, 2011)

فيتامين D (مايكروغرام / 100 غرام)	مصادر الأغذية الطبيعية
0.1	حليب كامل الدسم
0.6 – 0.3	جبين الشيدر
0.1	اللبن الرائب
1.5	الزبد
5.4 – 4.9	صفار البيض
14.2 – 5.3	فطر المشروم chanterelle
29.8 – 13.6	فطر المشروم (<i>Cantharellus tubaeformis</i>)
0.2	فطر المشروم (<i>Agaricus bisporus</i>)
11.9	فطر المشروم (<i>Agaricus bisporus</i>) المعرض للأشعة فوق البنفسجية
250 – 210	زيت كبد الحوت
24.7 – 13.1	سمك السلمون
15.4 – 5.7	سمك الرنجة
4.6	سمك السردين
16.1 – 8.8	سمك الماكريل
6.7	سمك التونة
1.2	اللحم
0.1	الدجاج

2-5-7 تحويل الاركوستيرون الى فيتامين D₂ بواسطة الاشعة فوق البنفسجية (UV)

Conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation

يعد الاركوستيرون المادة الممهدة (Precursor) لفيتامين D₂ والذي يتحول اليه من خلال تعريضه للأشعة فوق البنفسجية ، أشار (Janakakumara, 2005) الى إمكانية تحويل الاركوستيرون في فطر المشروم الى فيتامين D₂ باستعمال عدة أنواع من الاطوال الموجية تضمنت (UV-A (320-400) , UV-B (290-320) , UV-C (190-290)) نانومتر .

أن كمية فيتامين D₂ المنتجة عند تعريض كل من الفطر *Agaricus bisporus* و *Agaricus bitorquis* للأشعة فوق البنفسجية عند درجة حرارة 12 م° ولمدة ساعتين زادت من 2.20 مايكروغرام / غرام على أساس الوزن الجاف إلى 7.30 مايكروغرام / غرام على التوالي (Mau et al., 1998) .

وجد كل من (Jasinghe and Perera, 2006) و (Jasinghe et al., 2007) أن درجة حرارة التشعيع تؤثر على معدل تحويل الاركوستيرون الى فيتامين D₂، أن درجة الحرارة المثلى للأشعة فوق البنفسجية لفطريات *lentinus edodes* هي حوالي 35 م°، إذ كانت كمية فيتامين D₂ عالية، قد يحدث انخفاض في كمية الفيتامين المنتجة عند استعمال درجة حرارة اعلى من 35 م° وهذا نتيجة عدة عوامل منها: التحلل الضوئي تحت الأشعة فوق البنفسجية ، موت الخلايا ، الأكسدة وتكوين صبغات بنية اللون .

لاحظ كل من (Wu and Ahn, 2014) أن إنتاجية فيتامين D₂ تتحسن مع زيادة درجة الحرارة حتى 35 م° ، كما وجد (Simon et al., 2011) أن الأشعة فوق البنفسجية عند اطوال

موجية تتراوح بين (290-320) UV-B تعتبر من الطرق الفعالة في تحفيز إنتاج فيتامين D₂ في فطر المشروم، إذ لم يلاحظ تغيرات كبيرة في محتويات فيتامين C والأحماض الأمينية والأحماض الدهنية والعناصر الغذائية الأخرى .

بين (2011) Ruslan *et al.*, عند تعريضه فطر *Pleurotus ostreatus* للأشعة فوق البنفسجية عند الاطوال الموجية 254 و366 نانومتر ولفترات زمنية مختلفة شملت 15 ، 30 ، 60 ، 90 و 120 دقيقة ، أن محتوى فيتامين D قد بلغ 3.46 ± 24.12 ، 1.43 ± 28.15 ، 38.22 ± 2.11 ، 3.68 ± 48.19 و 3.41 ± 14.81 مايكروغرام / غرام على التوالي عند طول موجي 254 نانومتر ، بينما كان المحتوى 5.35 ± 9.59 ، 5.58 ± 20.6 ، 4.5 ± 27.67 ، 2.81 ± 10.62 ، 0.32 ± 8.76 مايكروغرام / غرام على التوالي في نفس المدة عند طول موجي 366 نانومتر، إذ لاحظ أن أعلى كمية من فيتامين D في الفطر المعرض للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي 254 نانومتر ولمدة 90 دقيقة .

توصل (2016) Sławińska *et al.*, في دراسته لثباتية فيتامين D₂ في فطر المشروم المجفف (*Agaricus bisporus* , *Pleurotus ostreatus* , *Lentinula edodes*) والنتائج من تعريض الفطر الى الأشعة فوق البنفسجية بأن الفطر المجفف قد احتفظ ب 48.32 % من الفيتامين بعد الخزن لمدة سنة ونصف .

8-5-2 تطبيقات فيتامين D في تدعيم الأغذية

Vitamin D applications in food fortification

أكدت الدراسات الحديثة على ضرورة وأهميه تدعيم المنتجات الغذائية كاللبن الرائب والاجبان والعصائر والخبز ومنتجاته بهذا الفيتامين لغرض زيادة القيمة الغذائية وتحقيق هذه الفوائد (Moulas and Vaiou, 2018 ; Zahedirad *et al.*, 2019 ; Maurya *et al.*, 2020).

1-8-5-2 تدعيم الحليب ومنتجاته بفيتامين D

درس (Kazmi *et al.*, 2007) إمكانية تدعيم منتجات الحليب مثل الجبن واللبن الرائب والمثلجات القشطية بفيتامين D من خلال استعمال المستحلبات ومتابعة تأثير الخزن على ثباتية وبقاء الفيتامين ، كما لاحظ (Kaushik *et al.*, 2014) ثباتية الحليب المدعم بفيتامين D₂ عند الخزن لمدة 7 أيام في عبوات مختلفة سواء كانت زجاجية أو بلاستيكية الا أن الفقد كان معنوياً عند استعمال أكياس البولي اثيلين إذ انخفض تركيز الفيتامين من 596.66 الى 548.04 وحدة دولية ، وجد (Rajarajan *et al.*, 2020) عند استعماله لثلاث مستويات من فيتامين D لتدعيم الايس كريم شملت 1000 و 1500 و 2000 وحدة دولية لكل لتر من مزيج الايس كريم ، أن أفضل مستوى كان عند 1500 وحدة دولية لتعويض النقص الحاصل في هذا الفيتامين لدى عامة الناس ، في حين أشار كل من (Kaushik and Arora, 2017) الى إمكانية تدعيم اللبن الرائب بفيتامين D₂ بمستوى 600 وحدة دولية / لتر وملاحظة التغييرات التي تحصل له اثناء فترات خزنه مختلفة ، إذ لوحظ أن فترة التخزين لم تؤثر على كل من الحموضة والرقم الهيدروجيني فضلاً عن قدرته على الاحتفاظ بالماء وانخفاض في محتوى الأستالديهيد والنمو الميكروبي .

2-8-5-2 تدعيم الخبز بفيتامين D

تمكن Tolosa, (2015) من تدعيم الخبز ومنتجاته مثل المعجنات والكعك بفيتامين D مع متابعة ثابتة الفيتامين عند تعرضه للحرارة وتأثيره على جودة الخبز خلال فترات الخزن ، اما في تجربة أجريت عند تدعيم الخبز بفيتامين D بمستوى 5000 وحدة دولية لمجموعة من كبار السن يعانون من نقص فيتامين D والتي تراوحت أعمارهم بين (58-89) سنة أن نسبة الفيتامين زادت عند تناولهم لهذا الخبز المدعم وبشكل يومي (Costan *et al.*, 2008) .

3-8-5-2 تدعيم العصائر بفيتامين D

أشارت بعض الدراسات الى إمكانية تدعيم أغذية من غير الحليب أو منتجاته بهدف تنويع الأغذية المدعمة ومساعدة الأشخاص الذين يعانون من الحساسية تجاه الحليب ومنتجاته أو حدوث ظاهرة عدم تحمل اللاكتوز ومن هذه الأغذية هو عصير البرتقال من خلال تدعيمه ب 1000 وحدة دولية من فيتامين D ومتابعة ثباته لمدة 12 أسبوع (Tangpricha *et al.*, 2003) ، في حين أجرى Economos *et al.*, (2014) دراسة لتحديد إمكانية زيادة تركيز 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] للأطفال الذين يتناولون عصير البرتقال المدعم بفيتامين D بمستوى 200 وحدة دولية والتي تتراوح أعمارهم بين (1-8) سنة ، إذ وجد أن تركيز [25(OH)D] يزداد عند تناول العصير المدعم خلال 12 اسبوعاً ، بينما درس Biancuzzo *et al.*, (2010) القدرة على امتصاص كل من فيتامين D₂ و D₃ عند تناول العصير المدعم بمستوى 1000 وحدة دولية للأعمار التي تراوحت بين (18-84) سنة ، إذ تبين أن قدرة الجسم على الامتصاص والهضم لفيتامين D₂ و D₃ متساوية .

Materials and Methods

3- المواد وطرائق العمل

Materials

1-3 المواد

1-1-3 المواد الكيميائية

جدول (1-3) المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة ومنشأها والشركة المصنعة

المنشأ والشركة المصنعة	المواد	ت
U.K. (LAB)	Yeast Extract مستخلص الخميرة	1
China (Himedia)	Malt Extract مستخلص المالت	2
India (Himedia)	Agar الاكار	3
China (Himedia)	Peptone الببتون	4
England (B.D.H)	C ₇ H ₁₆ هبتان	5
U.S.A. (Romil)	C ₆ H ₁₂ O ₆ كلوكوز	6
U.S.A. (Romil)	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆ رافينوز	7
U.S.A. (Romil)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ سكروز	8
U.S.A. (Romil)	C ₆ H ₁₂ O ₆ لاكتوز	9
U.S.A. (Romil)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ .2H ₂ O تريهالوز	10
England (B.D.H)	CaCO ₃ كاربونات الكالسيوم	11
England (B.D.H)	H ₂ SO ₄ حامض الكبريتيك	12
England (B.D.H)	HCl حامض الهيدروكلوريك	13
Australi (Chem-Supply)	C ₅ H ₈ O ₆ حامض الاسكوريك	14
England (B.D.H)	KOH هيدروكسيد البوتاسيوم	15
India (Himedia)	Cycloheximide مادة سايكلوهكسامايد	16
England (B.D.H)	KH ₂ PO ₄ فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين	17
England (B.D.H)	K ₂ HPO ₄ فوسفات البوتاسيوم احادي الهيدروجين	18
Spain (Scharlau)	Ethanol الكحول الأثيلي	19
Germany (Sigma-Aldrich)	Standard Ergosterol الاركوستيرول القياسي	20
Germany (Sigma-Aldrich)	Standard Vitamin D ₂ فيتامين D ₂ القياسي	21

2-1-3 الأجهزة المستعملة

جدول (2-3) الأجهزة والأدوات والمعدات المستعملة في الدراسة ومنشأها والشركة المصنعة

المنشأ والشركة المصنعة	الجهاز	ت
Germany (Sartorius)	Sensitive balance	ميزان حساس
Germany (Service Binder)	Incubator	الحاضنة
Germany (Sartorius)	Shaking incubator	الحاضنة الهزازة
U.S.A. (Fisher Scientific)	Vortex	مازج الانابيب الدوار
Korea (Fine Tech)	Magnetic stirrer	جهاز المازج المغناطيسي
Germany (Gesellschaftfur)	Water bath	جهاز الحمام المائي
Germany (Tafesa)	Centrifuge	جهاز الطرد المركزي
France (elle)	pH-meter	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني
Japan (Optima)	Spectrophotometer	جهاز المطياف الضوئي
Japan (Jasco)	Fourier-Transform Infrared spectroscopy (FT-IR)	جهاز الاشعة تحت الحمراء
Denmark (Hetosicc)	Freeze-drying	جهاز التجفيد
U.S.A. (VK2C8300)	Vitek 2	جهاز الفايك
China (Binocular)	Light microscope	المجهر الضوئي
Korea (Daihan labtech)	Ultrasonic cleaner	جهاز الموجات فوق الصوتية
U.S.A (Dionex)	High - performance liquid chromatography (HPLC)	جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة
Japan (Optima)	Ultraviolet system	جهاز الاشعة فوق البنفسجية
Turkey (Tulsan)	Milk cream separation	جهاز الفراز
U.S.A. (Magnehelic)	Laminar air flow hood	كابينة الزرع
Egypt (Electrostar)	Refrigerator	ثلاجة
U.S.A. (Ceiso)	Loop	الناقل الجرثومي
Korea (JEO tech)	Rotary evaporator	المبخر الدوار
India (Mtco)	Lactoplus Milk Analyzer	جهاز فحص مكونات الحليب
Jorden (Afco)	Filter paper	أوراق ترشيح
Germany (Novel)	Pipettes	ماصات مختلفة الاحجام

Germany (Novel)	Beaker volume	بيكرات بأحجام مختلفة	25
Germany (Novel)	Volumetric and conical flasks	دوارق حجمية ومخروطية	26
Germany (Novel)	Petri dishes	اطباق بلاستيك	27
Germany (Novel)	Test tubes	انابيب اختبار	28
Germany (Novel)	Slides	سلايدات	29

3-1-3 الأوساط الزرعية

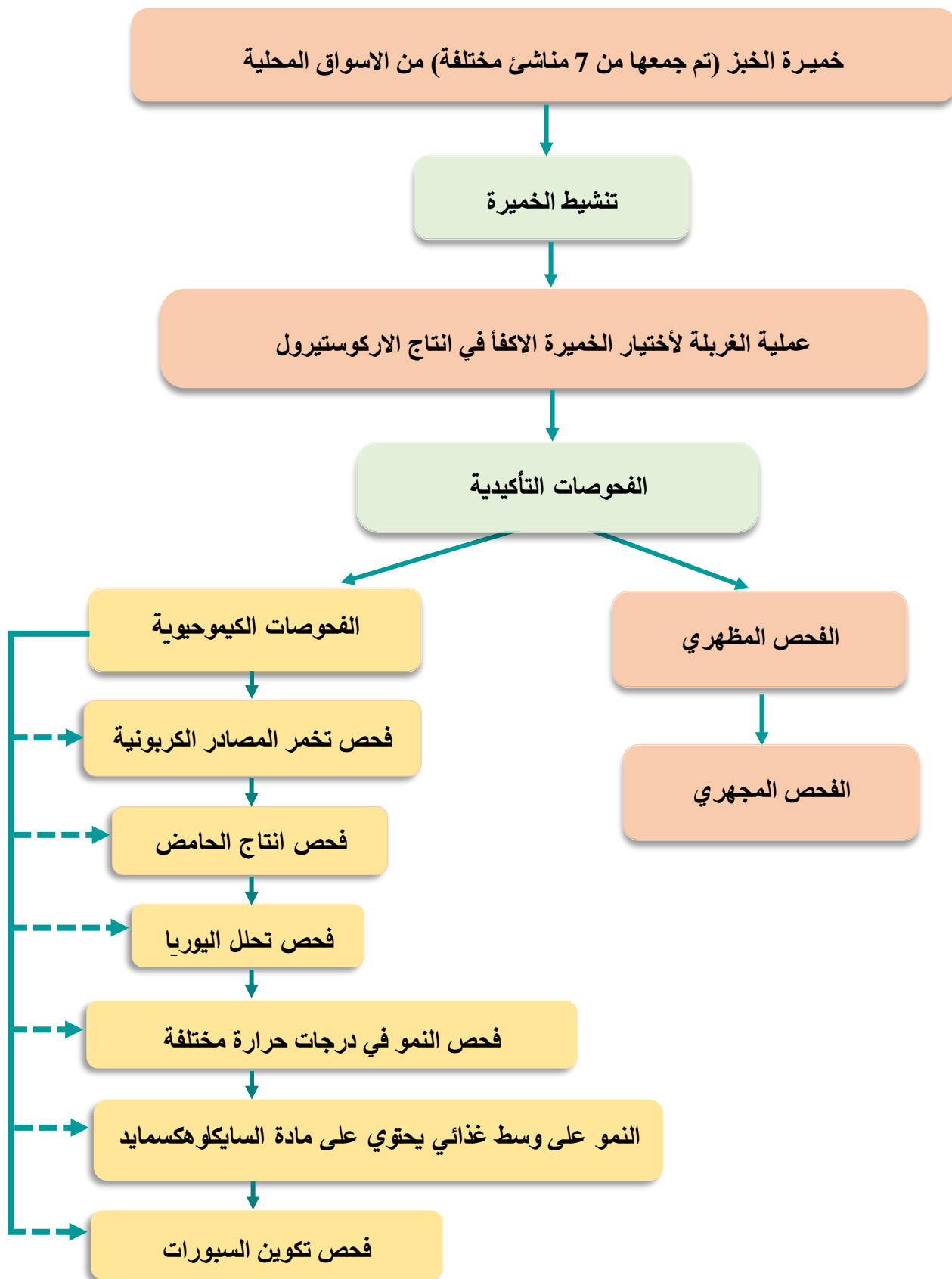
جدول (3-3) الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة ومنشأها والشركة المصنعة

المنشأ والشركة المصنعة	الأوساط الزراعية	ت	
U.K. (LAB)	Malt Extract Agar	وسط مستخلص المالت الصلب	1
U.K. (LAB)	Malt Extract Broth	وسط مستخلص المالت السائل	2
U.S.A. (TM media)	Potato Dextrose Agar (PDA)	وسط بطاطا - الدكستروز الصلب	3
India (Himedia)	Sabouraud Dextrose Agar	وسط السابرويد الصلب	4
India (Himedia)	Sabouraud Dextrose Broth	وسط السابرويد السائل	5
India (Himedia)	Yeast Extract Peptone Dextrose Broth (YEPD)	وسط مستخلص الخميرة والبيتون والدكستروز السائل	6
India (Himedia)	Urea Broth	وسط اليوريا السائل	7

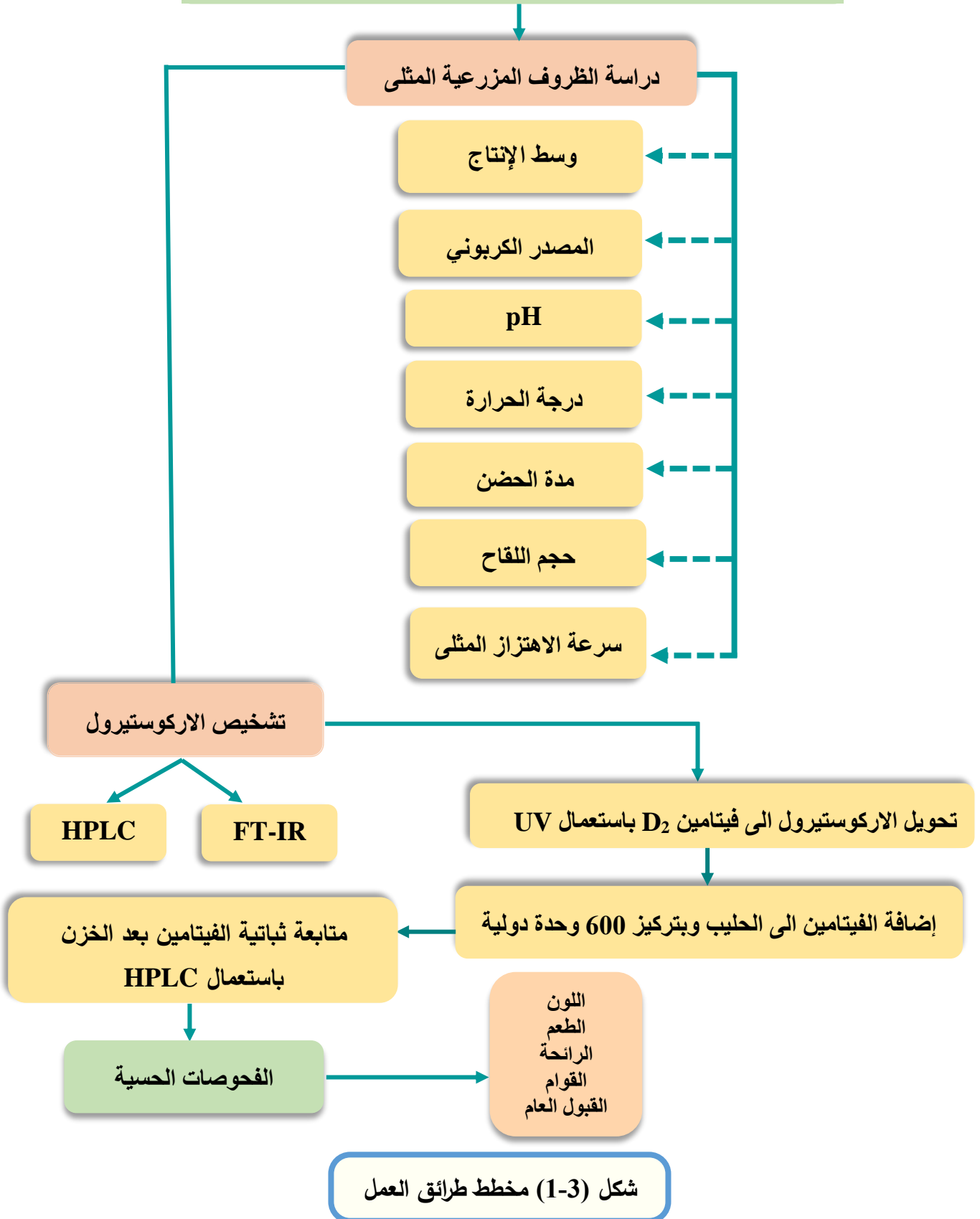
4-1-3 الصبغات والكواشف

جدول (4-3) الصبغات والكواشف المستعملة في الدراسة ومنشأها والشركة المصنعة

المنشأ والشركة المصنعة	الصبغات والكواشف	ت	
England (B.D.H)	Phenolphthalein	الفينولفتالين	1
England (B.D.H)	Safranin	صبغة السفرانين	2
Switzerland (Fluka)	Bromothymol blue	صبغة البروموثايمول الزرقاء	3
England (B.D.H)	Methylene blue	صبغة المثلين الزرقاء	4
India (Himedia)	Malachite green	صبغة الملاكايت الخضراء	5



تشخيص الخميرة الاكفاً بتقنية الفايتك 2 Vitek



3-1-5 المواد الأولية المستعملة في الدراسة

3-1-5-1 خميرة الخبز :-

استعملت خميرة الخبز الجافة *Saccharomyces cerevisiae* المستوردة من منشآت مختلفة والمتوفرة في الأسواق المحلية لمدينة البصرة، ذات علامات تجارية مختلفة كما في الجدول (3-5).

جدول (3-5) خميرة الخبز الجافة المستعملة لإنتاج الأركوستيرول وعلاماتها التجارية (الشركة المصنعة) مع المنشأ

المنشأ	اسم الشركة	خميرة الخبز
المصرية	Angel	
التركية	Beşler	
اللبنانية	Domo	
الأوروبية	European	
الصينية	Natu	
الأمريكية	Saf – instant	
الهندية	Yuva	

3-1-5-2 الحليب :-

تم الحصول على حليب البقر الطازج من محطة الأبحاث الزراعية في كلية الزراعة - جامعة البصرة.

1-2-3 تحضير المحاليل والصبغات والكواشف

1-1-2-3 محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 عياري)

استعمل هذا المحلول في تعديل الرقم الهيدروجيني للأوساط ، حضر من اذابة 4 غم

NaOH في كمية من الماء المقطر واكمل الحجم الى 100 مل .

2-1-2-3 محلول حامض الهيدروكلوريك المخفف (1 عياري)

حضر هذا المحلول من إضافة 8.29 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز (تركيزه 37%)

الى كمية من الماء المقطر واكمل الحجم الى 100 مل ، استعمل لتعديل الرقم الهيدروجيني للأوساط.

Peptone water solution

3-1-2-3 محلول ماء الببتون

حُضِر محلول ماء الببتون المعقم من إذابة 1 غم من الببتون في 1000 مل من الماء

المقطر، تم استعماله في تحضير التخافيف العشرية بعد تعقيمه في المؤسدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة .

Methylene blue stain

4-1-2-3 صبغة الميثيلين الزرقاء (0.3 %)

استعملت في تصبغ الخميرة لغرض الفحوصات المجهرية ، والتي حُضرت من

إذابة 0.3 غم منها في 100 مل من الماء المقطر (Harley and Prescott, 2002).

Bromothymol blue stain 5-1-2-3 صبغة البروموثايمول الزرقاء

استعملت هذه الصبغة في فحص تخمر السكريات، إذ حُضرت بإذابة 50 ملغم منها في 75 مل من الماء المقطر (Kurtzman and Fell, 1998).

Malachite green stain (5%) 6-1-2-3 صبغة الملاكايت الخضراء (5%)

استعملت للكشف عن وجود السبورات في الخميرة، إذ حُضرت هذه الصبغة بإذابة 5 غم في 100 مل ماء مقطر وسُخّنت بدرجة حرارة 85 م لمدة 2-3 دقيقة، بعدها رشحت الصبغة بواسطة ورق ترشيح Whatman No.1 (Harley and Prescott, 2002).

Safranin stain 7-1-2-3 صبغة السفرانين

استعملت هذه الصبغة في اختبار قدرة خلايا الخميرة على تكوين السبورات ، إذ حضرت من وزن 2.5 غم من الصبغة في 100 مل من الكحول الايثيلي (تركيزه 95%) ، أخذ 10 مل من محلول الصبغة المحضرة وأكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر (Harley and Prescott, 2002).

Phenolphthalein indicator 8-1-2-3 دليل الفينولفثالين

استعمل هذا الدليل في طريقة تقدير مجموع السكريات الكلية ، إذ حُضر الدليل بإذابة 1 غم منه في 50 مل من كحول الايثانول (تركيزه 95%) ثم اكمل الحجم بإضافة 100 مل من الماء المقطر (Chinchón-Payá et al., 2016).

Sterilization Methods

2-2-3 طرائق التعقيم

Autoclave Sterilization

1-2-2-3 التعقيم بالمؤصدة

عُقت جميع الأوساط الزرعية بجهاز المؤصدة Autoclave على درجة حرارة

121 م° وتحت ضغط 1 جو ولمدة 15 دقيقة .

Millipore filter Sterilization

2-2-2-3 التعقيم بالمرشحات الدقيقة

استُعملت المرشحات الدقيقة ذات القطر 0.45 مايكرومتر لتعقيم المواد والأوساط التي لا

تتحمل درجات الحرارة العالية مثل وسط تحلل اليوريا .

3-2-3 الأوساط الزرعية

1-3-2-3 وسط مستخلص المالت الصلب (5%) (MEA) Malt Extract Agar

استعمل هذا الوسط لغرض الفحوصات التشخيصية المظهرية للخميرة ، إذ حُضر

بإذابة 50 غم من وسط مستخلص المالت و20 غم من الأكار في لتر من الماء المقطر

وتم ضبط الرقم الهيدروجيني عند 5 (Kurtzman and Fell, 1998) .

2-3-2-3 وسط مستخلص المالت السائل (5%) Malt Extract Broth

استعمل هذا الوسط من أجل الفحص التشخيصي المجهري للخميرة ، إذ حُضر

من وزن 5 غم من مستخلص المالت ثم اكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر

وضبط الرقم الهيدروجيني عند 5 (Kurtzman and Fell, 1998) .

Potato Dextrose Agar (PDA) وسط البطاطا الدكستروز الصلب 3-3-2-3

استعمل هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط الخميرة من أجل تشخيصها باستعمال جهاز الفايستيك ، إذ حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة من إذابة 39 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر وتم ضبط الرقم الهيدروجيني عند 5.6.

4-3-2-3 وسط الكلوكوز - كاربونات الكالسيوم الصلب

Glucose-Calcium Carbonate Agar

استعمل هذا الوسط لغرض اختبار قدرة الخميرة على إنتاج الحامض، إذ حضر من إذابة 5 غم كلوكوز و 0.5 غم كاربونات الكالسيوم و 0.5 غم من مستخلص الخميرة و 2 غم من الآكار في 100 مل من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني عند 5 (Kreger-van Rij, 1984).

Urea Broth

5-3-2-3 وسط تحلل اليوريا

استعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة الخميرة على إنتاج إنزيم اليوريز، إذ حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 38.7 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.5 .

6-3-2-3 وسط السابرويد دكستروز الصلب

Sabourauds Dextrose Agar (SDA)

استعمل وسط السابرويد الصلب من أجل فحص قدرة الخميرة على النمو في وسط يحتوي على مادة السايكلوهكسامايد، إذ حضر الوسط وحسب تعليمات الشركة المجهزة له من إذابة 65 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر وتم ضبط الرقم الهيدروجيني عند 5.6.

7-3-2-3 وسط مستخلص الخميرة والبيتون والدكستروز السائل

Yeast Extract Peptone Dextrose Broth (YEPD)

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 50 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.5 ، استعمل هذا الوسط في تنشيط خلايا الخميرة وإنتاج الاركوستيرون .

8-3-2-3 وسط خلات البوتاسيوم - مستخلص الخميرة والكلوكوز

Potassium acetate-yeast extract glucose medium

حُضر هذا الوسط من إذابة 10 غم من خلات البوتاسيوم و2.5 غم من مستخلص الخميرة و1 غم من الكلوكوز في لتر من الماء المقطر وتم ضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.4 ، وضع بعدها في أنابيب اختبار بحجم 5 مل لكل أنبوبة واستعمل هذا الوسط في اختبار قدرة الخميرة على تكوين السبورات (Harley and Prescott, 2002).

9-3-2-3 وسط تخمر المصادر الكربونية Carbon Source Fermentation medium

حُضر الوسط بإذابة 0.45 غم من مستخلص الخميرة و 0.75 غم بيتون في 100 مل من الماء المقطر ثم اضيف اليه 4 مل من صبغة البروموثايمول الزرقاء Bromothymol blue ثم وزع الوسط في أنابيب اختبار سعة 10 مل بحجم 5 مل لكل أنبوبة ووضعت أنبوبة جمع الغاز (درهام) بشكل مقلوب بداخل كل أنبوبة بعد تفرغ الهواء منها وتم تعقيمها بالمؤصدة وتركت لتبرد، بعد ذلك اضيفت المحاليل السكرية المحضرة بمقدار 1 مل والتي عقت بالترشيح الغشائي Millipore filter بقطر 0.45 مايكرومتر والتي حضرت بتركيز 2% لكل من سكر

السكرور، الكلوكوز، الكالاكتوز، المالتوز اللاكتوز، الرافينوز، التريهالوز والمليبايوز
(Lodder, 1970 ; Kurtzman and Fell, 1998) .

4-2-3 اوساط الإنتاج

1-4-2-3 الوسط الأول :

استعمل وسط Sabourauds dextrose broth المحضر حسب تعليمات الشركة المجهزة

(Himedia) لإنتاج الاركوسيتروول (Shobayashi *et al.*, 2005) .

2-4-2-3 الوسط الثاني :

استعمل وسط Yeast extract peptone dextrose broth المحضر حسب الفقرة

7-3-2-3 في إنتاج الاركوسيتروول (He *et al.*, 2003) .

3-4-2-3 الوسط الثالث :

استعمل الوسط المكون من 8 غم من Soybean meal ، 8 غم كلوكوز ، 0.6 غم

KH_2PO_4 ، 0.1 غم يوريا ، 0.2 غم $NaNO_3$ و 0.1 غم $MgSO_4$ في 100 مل ماء مقطر في

إنتاج الاركوسيتروول (Damini *et al.*, 2013) .

4-4-2-3 البدائل المستعملة في وسط الإنتاج الاكفأ

استبدل المصدر الكربوني لوسط الإنتاج ببدائل محلية متمثلة بالمولاس وعصير التمر

والمحضرة كما في ادناه :

1-4-4-2-3 تحضير عصير التمر

تم شراء التمر صنف الزهدي من السوق المحلي لمدينة البصرة ونزعت منه النوى واضيف له الماء المقطر بنسبة (1:1) بعدها سخن بالحمام المائي على درجة حرارة 80 م° لمدة 3 ساعات، ثم رشح بقطعة قماش مملم وعقم الراشح بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 1 جو لمدة 10 دقائق (Gabsi *et al.*, 2013).

2-4-4-2-3 مولاس القصب

استعمل مولاس قصب السكر الذي تم الحصول عليه من معمل سكر ميسان .

3-3 طرائق العمل

1-3-3 تنشيط الخميرة :

نشطت الخميرة المجفدة التجارية على وسط YEPD المحضر في الفقرة (7-3-2-3) وحضنت بدرجة حرارة 30 م° لمدة 48 ساعة (Kara Ali *et al.*, 2017).

2-3-3 حفظ الخميرة :

حفظت الخمائر بعد تنميتها في انابيب اختبار بطريقة التخطيط على وسط YEPD الصلب بصورة مائلة (Slant) ثم الحضن بدرجة حرارة 30 م° لمدة 48 ساعة بعدها حفظت في درجة حرارة الثلاجة لحين الاستعمال .

Screening

3-3-3 الغربية

تم اجراء عملية غربلة لسلاطات الخميرة المنشطة لاختيار الاكفأ في إنتاج أكبر

كمية من الاركوستيروول وكما يلي :-

1-3-3-3 تحضير لقاح الخميرة

نقل ملئ اللوب من الخميرة المنشطة الى دورق حجمي سعة 250 مل يحتوي 30

مل من وسط YEPD السائل والحضن في حاضنة هزازة لمدة 48 ساعة بدرجة 30 م°

وبسرعة 200 دورة / دقيقة (He et al., 2007).

2-3-3-3 حساب عدد الخلايا الحية في اللقاح

قدرت اعداد الخلايا الحية في حجم اللقاح المستعمل في الدراسة وذلك بأخذ 1 مل

من الخميرة المنشطة ونقله الى 9 مل من محلول ماء البيتون المعقم والمحضر حسب

الفقرة (3-1-2-3) وحضرت سلسلة من التخفيف ثم نقل 1 مل من آخر تخفيف (1×10^6)

(CFU / مل) ووضع في الطبق بعدها اضيف اليه وسط YEPD المذكور في الفقرة (3-

8-3-2) وحضنت الاطباق عند درجة حرارة 30 م° لمدة 48 ساعة وحسبت أعداد

المستعمرات النامية .

3-3-3-3 غربلة العزلات لاختيار الاكفأ في إنتاج الاركوستيروول

استعملت دوارق حجمية سعة 250 مل تحتوي كل منها على 50 مل من وسط

YEPD السائل المحضر في الفقرة (7-3-2-3) لقح كل دورق مع 5 مل من كل خميرة

(1×10^6 CFU / مل) وحضنت بالحاضنة الهزازة عند رقم هيدروجيني 5 ودرجة حرارة 28 م° لمدة

30 ساعة وبسرعة 200 دورة / دقيقة (He et al., 2000; He et al., 2003) بعد ذلك أجريت

عملية نبد مركزي بسرعة 2700 دورة / دقيقة لمدة 5 دقيقة وغسلت الخلايا مع 10 مل من الماء المقطر المعقم ونبذت مركزياً مرة أخرى عند نفس الظروف وسجل الوزن الرطب للخلايا ، اضيف لها 3 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي 15 % (حضر من إذابة 15 غم KOH في 35 مل ماء مقطر واكمل الحجم باستعمال كحول الايثانول) ومزجت لمدة 1 دقيقة ثم وضعت في حمام مائي عند درجة حرارة 85 م° لمدة 1 ساعة بعدها تركت لتبرد عند درجة حرارة الغرفة (تقريباً لمدة 30 دقيقة) ، استخلص بعد ذلك الستيروول (Sterol) بإضافة 1 مل من الماء المقطر و 3 مل من n-heptane والمزج على جهاز Vortex لمدة 3 دقائق وتترك بعدها لمدة 30 دقيقة بدون تحريك ثم نقلت طبقة n-heptane (العليا) الى أنبوبة زجاجية اخرى وأخذ 0.5 مل من Sterol وخفف مع 4.5 مل من الايثانول (95 %) (Holloway, 2011) ، جرت عملية كشف أولي عن الاركوستيروول من خلال اجراء مسح (Scanned) على مدى واسع من الاطوال الموجية تراوح بين 230 – 330 نانومتر باستعمال جهاز الامتصاص الضوئي (UV-visible spectrophotometer) ، اما البلائك فقد تم تحضيره بإضافة 3 مل 15% KOH الى 3 مل n-heptane ووضع على جهاز Vortex لمدة 3 دقائق ويترك بدون تحريك لمدة 30 دقيقة ثم يأخذ 0.5 مل منه ويخفف مع 4.5 مل الايثانول ، إذ إن ظهور 4 قمم (Peaks) في المنحنى دلالة على وجود الاركوستيروول اما اذا كان المنحنى بشكل خط مستقيم (Flat) فإنه يدل على عدم وجود الاركوستيروول في العينة (Holloway, 2011) ، بعدها قدر محتوى الاركوستيروول في كل خميرة حسب طريقة Arthington-Skaggs *et al.*, (1999) والمبينة من قبل He *et al.*, (2000) وذلك بإخذ قراءة الامتصاصية على طول موجي 281.5 و 230 نانومتر ، تم احتساب محتوى الاركوستيروول على أساس نسبة مئوية لوزن الخلية الرطب وكما في المعادلات ادناه:

$$\% \text{ Ergosterol} + \% \text{ 24(28) DHE} = \left[\left(\frac{A_{281.5 \text{ nm}}}{290} \right) \times F \right] / \text{وزن العينة}$$

$$\% \text{ 24(28) DHE} = \left[\left(\frac{A_{230 \text{ nm}}}{518} \right) \times F \right] / \text{وزن العينة}$$

$$\% \text{ Ergosterol} = (\% \text{ Ergosterol} + \% \text{ 24(28) DHE}) - \% \text{ 24(28) DHE}$$

حيث أن :-

A : الامتصاصية

F : هو عامل التخفيف في الايثانول

DHE : Dehydroergosterol

290 و 518 : قيم E (نسبة مئوية لكل سنتيمتر) والمقدرة لتبلور الاركوستيرول و 24(28)DHE

4-3-3-3 تقدير الكتلة الحيوية للخميرة

اتبعت الطريقة التي وصفها He *et al.*, (2000) في تقدير الكتلة الحيوية ، إذ

جمعت خلايا الخميرة بعد انتهاء مدة التخمير بواسطة جهاز النبذ المركزي المبرد عند سرعة

5000 دورة / دقيقة وغسلت بالماء المقطر ثم جففت بواسطة فرن هوائي عند درجة 80 م° لمدة 6-8

ساعة (حتى ثبات الوزن) بعدها قدرت الكتلة الحيوية للخميرة بواسطة ميزان حساس اعتماداً على

الفرق بالوزن .

4-3-3 الاختبارات التشخيصية التأكيدية لخميرة الخبز *S.cerevisiae*

Morphological test

1-4-3-3 الفحص المظهري

نُميت الخميرة بطريقة التخطيط على وسط مستخلص المالت الصلب والمحضر في الفقرة

(1-3-2-3) بدرجة حرارة 20 م° لمدة 30 يوماً، لغرض دراسة الصفات المظهرية للخميرة من حيث

حجم وشكل ولون وارتفاع وترتيب خلايا المستعمرات (Kurtzman and Fell, 1998) .

Microscopic test

2-4-3-3 الفحص المجهرى

درست الخصائص المجهرية للخميرة المنمأة على وسط مستخلص المالت السائل والمحضر حسب الفقرة (2-3-2-3) لمدة 72 ساعة بدرجة حرارة 25 م لغرض اجراء الفحص المجهرى للخميرة، إذ اخذت مسحة من خلايا الخميرة وتم وضعها على شريحة زجاجية وتركت لتجف بعد ذلك صُبغت بصبغة المثيلين الزرقاء المحضرة في الفقرة (4-1-2-3) وفحصت تحت المجهر بقوة تكبير (40 X) (Kurtzman and Fell, 1998).

Biochemical Tests

5-3-3 الفحوصات الكيموحيوية

Acid Production Test

1-5-3-3 فحص إنتاج الحامض

أجري فحص إنتاج الحامض باستعمال وسط Glucose-calcium carbonate agar والمحضر في الفقرة (4-3-2-3) ، وبطريقة التخطيط نقل مقدار 1 مل من الخميرة المنشطة الى الوسط وحضنت على درجة حرارة 28 م ولمدة 48 ساعة ، إن ظهور الهالات حول مستعمرات خلايا الخميرة النامية يدل على إيجابية الفحص وإنتاج الحامض (Barnett *et al.*, 1983).

Urea Hydrolysis Test

2-5-3-3 فحص تحلل اليوريا

تم تلقيح الأنابيب الحاوية على 10 مل من وسط اليوريا السائل المحضر في الفقرة (5-3-2-3) بمقدار 0.1 مل من الخميرة المنشطة ، بعدها حضنت الأنابيب لمدة 5 أيام عند درجة حرارة 28 م مع متابعة نمو الخميرة يومياً ، يدل اللون الوردي الغامق على أن نتيجة الفحص إيجابية (Barnett *et al.*, 1983).

3-5-3-3 فحص تخمر المصادر الكربونية Carbon Source Fermentation

لقت الأنابيب الحاوية على وسط تخمر المصادر الكربونية المحضر في الفقرة (10-3-2-3) بإضافة 0.1 مل من الخميرة المنشطة ، بعدها حضنت الأنابيب لمدة 5 أيام مع مراعاة الفحص اليومي عند درجة حرارة 28 م° ، إن تغير اللون وتجمع الغاز في أنبوبة درهام دلالة على أن نتيجة الفحص إيجابية (Lodder, 1970 ; Kurtzman and Fell, 1998).

3-5-3-3 النمو على وسط يحتوي على مادة السايكلوهيكسامايد Cycloheximide

نقل مقدار 0.1 مل من الخميرة المنشطة الى اطباق تحتوي على وسط SDA المعقم والمحضر حسب الفقرة (6-3-2-3) والمضاف له مادة السايكلوهيكسامايد بتركيز 100 ملغم و 1000 ملغم لكل لتر من الماء المقطر والمعقمة بالمرشحات الدقيقة ، وحضنت لمدة 5 أيام وبدرجة حرارة 25 م° مع متابعة النمو يومياً ، يستعمل هذا الفحص من اجل معرفة قدرة الخميرة على النمو في وسط يحوي مادة السايكلوهيكسامايد (Kurtzman and Fell , 1998) .

3-5-3-3 فحص النمو في درجات حرارة مختلفة

تم نقل 0.1 مل من خميرة الخبز المنشطة باستعمال طريقة التخطيط الى اطباق تحتوي على وسط (YEPD) المحضر في الفقرة (7-3-2-3)، بعدها حضنت الاطباق لمدة 48 ساعة على درجتين حراريتين (30 و 37) م° مع متابعة نمو المستعمرات خلال فترة التحضين (Kurtzman and Fell , 1998) .

6-5-3-3 فحص تكوين السبورات

لقت الانابيب الحاوية على وسط تكوين السبورات والمحضر في الفقرة (9-3-2-3) بمقدار 0.1 مل من الخميرة المنشطة وحضنت لمدة 7-10 أيام بدرجة حرارة 25 م° ، وأخذ جزء من مستعمرة الخميرة ووضعت على شريحة زجاجية وثبتت اللطخة (Smear) عن طريق تمريرها على اللهب وأجري التصبغ بصبغة الملاكات الخضراء والمحضرة في الفقرة (6-1-2-3) ووضعت قطرة منها على الشريحة الزجاجية وتركت لمدة 5 دقائق بعد ذلك تم غسل الشريحة بالماء المقطر وصبغت بصبغة السفراين المحضرة في الفقرة (7-1-2-3) وتركت لمدة 1-2 دقيقة لتثبيت الصبغة بعدها غُسلت وتركت لتجف واجري لها الفحص تحت المجهر (Kurtzman and Fell, 1998 ; Harley and Prescott, 2002).

7-5-3-3 تشخيص الخميرة المنتخبة بتقنية الفايترك Vitek 2

شخصت خميرة الخبز والتي اعطت أعلى إنتاجية من الاركوستيروول باستعمال جهاز Vitek 2 وحسب تعليمات شركة Biomerieux (2010) Anonymous, في مختبر البيان الاهلي التخصصي في محافظة البصرة.

طريقة العمل :

استعمل وسط (PDA) المحضر المبين في الفقرة (3-3-2-3) لتنشيط خلايا خميرة الخبز التي اعطت أعلى إنتاجية من الاركوستيروول وتم الحضان بدرجة حرارة 30 م° لمدة 48 ساعة ، نقلت مستعمرة من الخميرة المنشطة بواسطة الناقل الجرثومي (Loop) الى أنابيب اختبار معقمة وشفافة لغرض تحضير عالق الخميرة، إذ تحوي هذه الأنابيب على المحلول الملحي

الفسولوجي Normal Saline بمقدار 3 مل، ولجعل عكورة العالق متساوية (McF 2.2-1.8) استعمل جهاز قياس العكورة DenisChekTM المصاحب لجهاز Vitek 2 لتثبيت الأنابيب المحتوية على عكارة عالق الخميرة فيه ، بعد ذلك نقلت الأنابيب التي تحتوي على عالق الخميرة الى حامل الأنابيب Cassete المرافق لجهاز Vitek 2 ، وضعت على حامل الأنابيب بطاقة التشخيص ANC Card التابعة لكل أنبوبة حتى يكون أنبوب النقل الشعري المتصل بطاقة Card / unit transfer tube مغمور في الأنبوبة التي تحوي على عالق الخميرة ، لغرض تعرف الكمبيوتر على الخميرة وبواسطة جهاز Barcode Reader تم اجراء قراءة للرموز الشريطية Barcode ولجميع بطاقات التشخيص ANC Card التي حُملت على حامل الأنابيب Cassete ونقل بعدها حامل الأنابيب في جهاز Vitek 2 الى وحدة Filler ، إذ سحب من الأنابيب عالق الخميرة الى داخل بطاقات Loader المتواجد في جهاز Vitek 2 هذه العملية استمرت لمدة بما يقارب 70 ثانية ، إذ قطعت حرارياً الأنابيب التي تنقل عالق الخميرة ، وفي غضون 8 ساعات بدأ عمل الجهاز وإعطاء قراءات للنتيجة ، قام الجهاز بصورة ذاتية بعملية تحليل للأنماط الكيموحيوية Biochemical patterns ، وعن طريق جهاز الكمبيوتر التابع لجهاز Vitek 2 قرأت البطاقة بعد أن اكتمل التحليل وجهزت النتيجة .

6-3-3 دراسة الظروف المثلى لإنتاج الأركوستيرول

Studying of optimum condition for ergosterol production

أجريت دراسة للظروف المزرعية المثلى لإنتاج أكبر كمية من الأركوستيرول من

خلال دراسة العديد من المعايير المؤثرة في الإنتاج وكما في ادناه:

Optimum culture medium

1-6-3-3 الوسط الزراعي الأمثل

دُرس تأثير ثلاثة أوساط زرعية في تنمية الخميرة لاختيار افضلها في إنتاج أكبر كمية من الاركوستيروول والتي شملت وسط السابرويد السائل Sabouraud dextrose broth (Shobayashi *et al.*, 2005) ، ووسط خلاصة الخميرة والببتون والكلوكوز YEPD (He *et al.*, 2003) ، ايضاً استعمل وسط مكون من 8 غم كلوكوز ، 8 غم Soybean meal ، 0.1 غم يوريا ، 0.6 غم KH_2PO_4 ، 0.2 غم $NaNO_3$ و 0.1 غم من $MgSO_4$ (Damini *et al.*, 2013) ، ضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.5 ولقحت بخلايا الخميرة بمقدار 10% من الوسط وحضنت عند درجة حرارة 28 م لمدة 30 ساعة وبسرعة 200 دورة / دقيقة.

2-6-3-3 البدائل المحلية لوسط الإنتاج

استعملت نوعين من البدائل المحلية كمصدر كربوني بديل في وسط الإنتاج القياسي وهما عصير تمر الزهدي ومولاس قصب السكر بعد تقدير السكريات الكلية لكل مصدر وكما يلي:

1-2-6-3-3 تقدير السكريات الكلية

قدرت السكريات الكلية في وسط عصير التمر ومولاس القصب حسب الطريقة التسحيحية (لين - أينون Lane - eynon) وحسب ما هو مبين في دلالي والحكيم، (1987) ، أذ وزن 50 غم من عينة العصير أو المولاس ووضع في بيكر واضيف اليه 400 مل من الماء المقطر مع إضافة هيدروكسيد الصوديوم (0.1 عياري) لتعديل الدالة الحامضية الى 7.5 ثم الغلي لمدة ساعة بعدها نقل الى دورق حجمي سعة 500 مل واكمل الحجم الى العلامة بالماء المقطر والترشيح

(Whatman No.1) ثم سحب 100 مل من الراشح واضيف اليه 2 مل من محلول خلات الرصاص و200 مل ماء مقطر في دورق حجمي سعة 500 مل وترك لمدة 10 دقائق ، اضيف 3 مل من محلول اوكزالات البوتاسيوم ثم الماء المقطر للوصول الى العلامة ثم الترشيح ، نقل 25 مل من الراشح ووضع في دورق حجمي سعة 250 مل واضيف له 5 غم من حامض الستريك وجلي المحلول لمدة 10 دقائق ، أجريت عملية تعادل للحامض بنقل الراشح الى دورق حجمي سعة 250 مل وتمت إضافة دليل الفينولفثالين له مع 10% من محلول هيدروكسيد الصوديوم حتى ظهور اللون الوردي ، ملأت السحاحة بعدها بالمحلول السكري ونقل الراشح الى دورق حجمي يحتوي على محلول فهلنك مع التسخين للغليان لمدة 2 دقيقة ويضاف بعدها 3 قطرات من المثيل الأزرق ، ثم التسخين بنزول 2-3 قطرات من المحلول السكري حتى اختفاء لون الكاشف (المثيل الأزرق) وظهور لون البرتقالي المحمر وتم تقدير نسبة السكريات الكلية كما في المعادلة أدناه :

$$\text{التخفيف} \times \text{المكافئ الجدولي للسكر المحول} = \frac{100 \times \text{السكريات الكلية (\%)}}{\text{وزن النموذج} \times \text{الحجم المسح} \times 1000} \text{ (سكر محول)}$$

إذ كانت نسبة السكريات الكلية لعصير التمر هي 45% بينما كانت نسبة السكريات الكلية لمولاس القصب 65% مع الابقاء على باقي مكونات الوسط الأخرى، أجريت عملية استبدال للمصدر الكربوني الكلوكوز في وسط الإنتاج (YEPA) والمحضر في الفقرة (7-3-2-3) بمصادر محلية هي (عصير التمر والمولاس) وينسب استبدال مختلفة (25 ، 50 ، 75 ، 100) % في 100 مل ماء مقطر وعند نفس الظروف السابقة

للحصول على افضل بديل محلي عن المصدر الكربوني المستعمل لإنتاج اكبر كمية من الاركوستيرول وكما موضح في الجدول (6-3).

جدول (6-3) نسب استبدال المصدر الكربوني الكلوكوز بكل من عصير التمر والمولاس

المولاس	عصير التمر	الكلوكوز	نسب الاستبدال
14 مل	1.125 مل	0.5 غم	%25
7 مل	2.25 مل	1 غم	%50
5 مل	3.375 مل	1.5 غم	%75
3.5 مل	4.5 مل	0	%100

3-6-3-3 الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل Optimal initial pH

درس أفضل رقم هيدروجيني للوسط البديل المحضر في الفقرة (7-3-2-3) لإنتاج أكبر كمية من الاركوستيرول ، إذ استعملت ارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (3-7) وباستعمال الحاضنة الهزارة وحسبت كمية الاركوستيرول الناتجة حسب المعادلة المبينة في الفقرة (3-3-3-3) .

3-6-3-3 درجة الحرارة المثلى Optimum temperature

عند الرقم الهيدروجيني الأمثل وباستعمال وسط الإنتاج البديل المحضر في الفقرة (7-3-2-3) حُضِن الوسط عند درجات حرارية مختلفة شملت (20 ، 25 ، 28 ، 30 و 35) م وبالحاضنة الهزارة لتحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج أكبر كمية من الاركوستيرول وتم حساب الكمية الناتجة حسب المعادلة في الفقرة (3-3-3-3) .

Optimum period of incubation 5-6-3-3 مدة الحضانة المثلى

للحصول على افضل مدة حضانة لإنتاج اكبر كمية من الاركوستيرول وعند الدرجة الحرارية المثلى والرقم الهيدروجيني الأمثل حضانة وسط الإنتاج البديل المحضر في الفقرة (7-3-2-3) عند مدد زمنية مختلفة والتي تضمنت (24 ، 30 ، 48 ، 72 ، 96 و120) ساعة وباستعمال الحاضنة الهزازة وحسبت كمية الاركوستيرول الناتجة حسب المعادلة في الفقرة (3-3-3-3) .

Optimum inoculum volume 6-6-3-3 حجم اللقاح الأمثل

استعملت الحاضنة الهزازة عند رقم هيدروجيني ودرجة حرارة ومدة حضانة المثلى لوسط الإنتاج البديل لمحضر في الفقرة (7-3-2-3) لفتح هذا الوسط بحجوم مختلفة من مزرعة الخميرة المنشطة للعزلة المنتخبة وهي (1 ، 2 ، 3 ، 4 و5) مل على التوالي لأختيار حجم اللقاح الأمثل لإنتاج اكبر كمية من الاركوستيرول وأجري حساب الكمية الناتجة حسب المعادلة المبينة في الفقرة (3-3-3-3).

Optimum shaking speed 7-6-3-3 سرعة الاهتزاز المثلى

ثبتت الظروف المثلى السابقة وباستعمال وسط الإنتاج البديل المحضر في الفقرة (7-3-2-3) حضانة الوسط الملقح في الحاضنة الهزازة عند سرع مختلفة شملت (0 ، 50 ، 100 ، 150 و200) دورة / دقيقة لأختيار أفضل سرعة اهتزاز لإنتاج أكبر كمية من الاركوستيرول وحسبت الكمية المنتجة كما في الفقرة (3-3-3-3).

7-3-3 تشخيص الاركوستيرول

1-7-3-3 التشخيص باستعمال جهاز مطياف الاشعة تحت الحمراء

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

استعمل جهاز مطياف الاشعة تحت الحمراء FT-IR التابع لمركز ابحاث البوليمر في جامعة البصرة لتشخيص المجاميع الفعالة لعينة الاركوستيرول المستخلصة من الخميرة ومقارنتها مع عينة الاركوستيرول القياسي ، إذ مزجت كل عينة مع مادة بروميد البوتاسيوم (KBr) اللامائي و لوحظ طيف المجاميع الفعالة للاركوستيرول على تردد (4000 – 400 سم⁻¹) (Wu et al., 2012) .

2-7-3-3 التشخيص باستعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة

High - pressure liquid chromatography (HPLC)

شخصت عينة الاركوستيرول المستخلصة من الخميرة بواسطة جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) التابع لكلية الصيدلة - قسم العلوم السريرية والمختبرية في جامعة البصرة، وذلك من خلال الاعتماد على وقت ظهور (وقت الاحتجاز) قمة المادة القياسية، استعمل عمود الفصل من نوع C18 (4.6 × 250 ملم) ، أجريت عملية الفصل باستعمال الطور المتحرك المتكون من خليط من (95 % ميثانول / أسيتونترايل) والذالة الحامضية له 6.5 وبنسبة (1 : 1) مع 5% ماء مقطر وبطول موجي 282 نانومتر عند درجة حرارة تراوحت بين 20 - 25 م° ومعدل جريان (1 مل / دقيقة) اما حجم النموذج المحقون فكان 10 مايكرو لتر (Ng et al., 2008) .

8-3-3 التطبيق The application

1-8-3-3 تحويل الاركوسستيرول الى فيتامين D₂ باستعمال جهاز الأشعة فوق البنفسجية (UV)

1-1-8-3-3 تحويل الاركوسستيرول الى فيتامين D₂

تم أخذ 8 غم من الكتلة الحيوية للخميرة التي تم تحسين الظروف المثلى لها لإنتاج أكبر كمية من الكتلة الحيوية لإنتاج الاركوسستيرول ، إذ اجريت لها عملية تجفيد باستعمال جهاز التجفيد (Freeze-drying) حتى الوصول الى نسبة الرطوبة (6 %) بعدها وضعت في طبق بارتفاع (1 سم) ، اما المسافة بين الطبق ومصدر التشعيع كانت 10 سم استعمل جهاز الاشعة فوق البنفسجية (UV) لغرض تحويل الاركوسستيرول الى فيتامين D₂ على طول موجي مقداره 254 نانومتر ولمدة 90 دقيقة عند درجة حرارة 25±2 م° (Ruslan *et al.*, 2011) .

2-1-8-3-3 تقدير محتوى فيتامين D₂

قدر فيتامين D₂ باستعمال جهاز HPLC بعد استخلاصه بإذابة 1 غم من الخميرة المجففة في 4 مل من سكوربات الصوديوم (حضر من إذابة 17.5 غم سكوربات الصوديوم في 100 مل من 1 عياري NaOH) واضيف اليه 10 مل من (50%) هيدروكسيد البوتاسيوم و 50 مل من الايثانول (95%) ، اجريت عليه الصوبنه في حمام مائي بدرجة حرارة 80 م° لمدة 1 ساعة ثم تبريدها الى درجة حرارة الغرفة قبل نقله الى قمع الفصل Separating Funnel ، فصل المزيج بإضافة 15 مل ماء مقطر تبعها اضافة 15 مل ايثانول ثم البينتان (50 مل) ، نقلت الطبقة العضوية الى المبخر الدوار وتم التخلص من المذيب على درجة حرارة 40 م° ثم ذوب المتبقي

في 10 مل من الايثانول بعدها مرر على المرشح الغشائي بقطر 0.45 مايكرون وتم التقدير على طول موجي 264 نانومتر استعمل عمود الفصل من نوع C18 (4.6 × 250 ملم) ، أجريت عملية الفصل باستعمال الطور المتحرك المتكون من خليط من (95% ميثانول / أسيتونتريل) . (Lee and Aan, 2016) .

2-8-3-3 تدعيم حليب الفرز بفيتامين D₂

أجريت عملية فرز للحليب البقري الطازج باستعمال جهاز الفراز (Milk cream separation) وقدر التركيب الكيميائي للحليب الكامل والفرز باستعمال جهاز فحص مكونات الحليب Lactoplus Milk analyzer ، كانت نتائج تحليل المكونات كما مبينه في جدول (7-3) .

جدول (7-3) التركيب الكيميائي للحليب الكامل والفرز المستعمل في تجربة التدعيم

حليب كامل الدسم	حليب الفرز	التركيب الكيميائي
3.3	3.2	بروتين
3.8	0.4	دهن
4.5	4.7	لاكتوز
1.0	0.6	معادن
8.8	8.5	المواد الصلبة اللادهنية (SNF)
12.6	8.9	المواد الصلبة الكلية (TSS)
87.4	91.9	الرطوبة (الماء)%

تم تدعيم حليب الفرز بإذابة 1غم من الفيتامين القياسي والمنتج من الخميرة كُلاً على حده في كمية من البولي سوربات 80 الدافىء (35-40) م (Bauernfeind and Allen, 1963) ، ثم أضيف الى 10 مل من حليب الفرز مع المزج بشكل جيد ، بعدها أجريت عملية التجنيس باستعمال الموجات فوق الصوتية ولمدة 5 دقائق ، ثم أضيف اليه 200 مل من حليب الفرز مع المزج للحصول على 600 وحدة دولية / لتر ، وضعت العينات في حمام مائي لغرض البسترة عند درجة حرارة 63 م ولمدة 30 دقيقة ثم بردت بسرعة الى درجة حرارة 4 م ووضعت في عبوات معتمة وتركت لمدة 2 ساعة عند هذه الدرجة، درست ثباتية فيتامين D₂ عند الخزن ولمدة 0 و7 ايام من الخزن عند درجة حرارة التلاجة 4 م وكما مبين في (Kaushik et al., 2014) واعتماداً على المعادلة أدناه:

$$\text{ثباتية الفيتامين \%} = \frac{\text{محتوى فيتامين D}_2 \text{ بعد الخزن}}{\text{محتوى فيتامين D}_2 \text{ قبل الخزن}} \times 100$$

أجريت عملية استخلاص وتقدير لمحتوى فيتامين D₂ في الحليب المدعم باستعمال جهاز HPLC وكما مبين في الفقرة (2-1-8-3-3) .

3-8-3-3 الفحوصات الحسية للحليب

أجريت عملية تقييم حسي لنماذج الحليب من قبل 10 مقيمين من اساتذة وطلبة الدراسات العليا لقسم علوم الأغذية وباستعمال استمارة التقييم المعتمدة من قبل (Clark et al., 2009) ، إذ منحت 10 درجات لكل صفة من الصفات المتمثلة باللون والطعم والرائحة والقوام والقبول العام وحسب الجدول (7-3) .

جدول (8-3) استمارة التقييم الحسي لنماذج الحليب

الصفة					المعاملة
القبول العام	القوام	الرائحة	الطعم	اللون	
					حليب غير مدعم
					حليب مدعم بفيتامين D ₂ القياسي
					حليب مدعم بفيتامين D ₂ المنتج

4-3 التحليل الاحصائي Statistical Analysis and Design

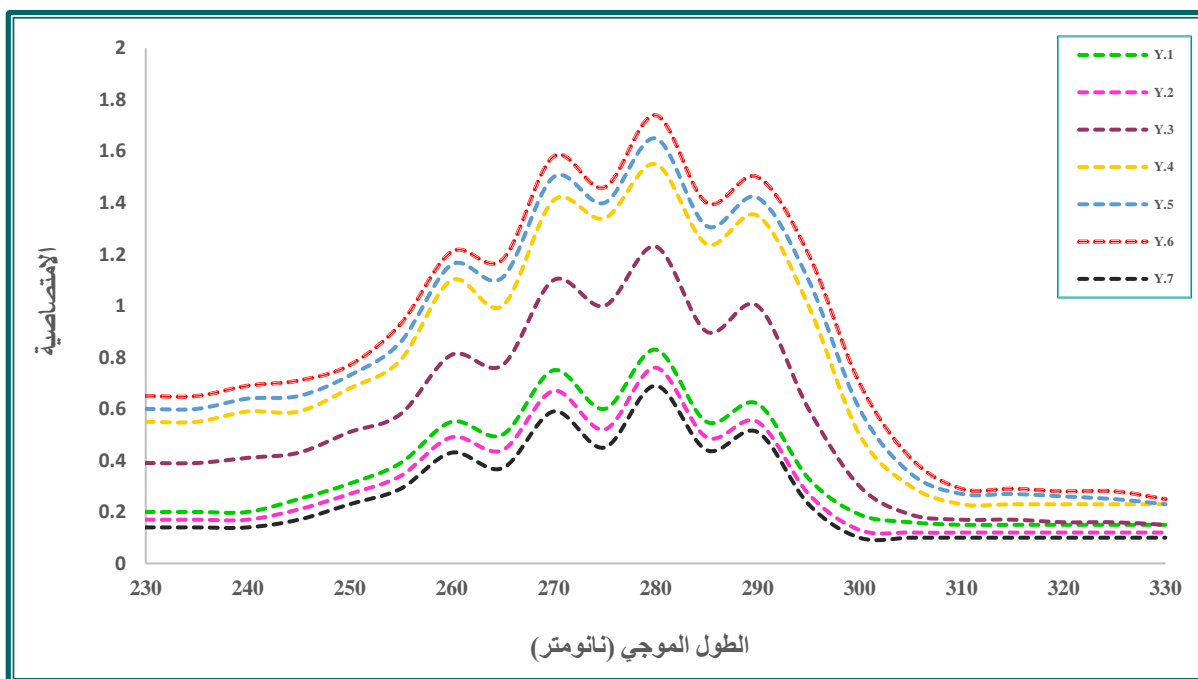
أجري التحليل الاحصائي للنتائج المستحصل عليها باستعمال التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (CRD) وبواقع 3 مكررات لكل معاملة ، إذ حلت البيانات باستعمال جدول تحليل التباين (ANOVA) حسب برنامج التحليل الاحصائي SPSS ver. 23 ، تم مقارنة الفروق المعنوية بين متوسطات المعاملات باستعمال أقل فرق معنوي (L.S.D) عند مستوى احتمالية (0.05) (الراوي وخلف الله، 2000).

4- النتائج والمناقشة

Results and Discussion

1-4 غربلة العزلات لاختيار أفضلها في إنتاج الاركوستيرون

أجريت عملية غربلة لخمائر الخبز الجافة ذات المناشئ المختلفة والمتداولة في الأسواق المحلية لمدينة البصرة لغرض الكشف الأولي عن وجود الاركوستيرون وذلك من خلال اجراء مسح (Scanned) على مدى واسع من الاطوال الموجية تراوح بين 230 – 330 نانومتر باستعمال جهاز الامتصاص الضوئي UV- visible spectrophotometer ، لوحظ من خلال الشكل (1-4) ظهور 4 قمم عند الاطوال الموجية 280 ، 270 ، 290 و 260 نانومتر في كل منحنى من منحنيات المستخلصات وبارتفاعات مختلفة كانت فيها خميرة Y.6 (Domo) الأعلى مقارنة مع بقية الخمائر .



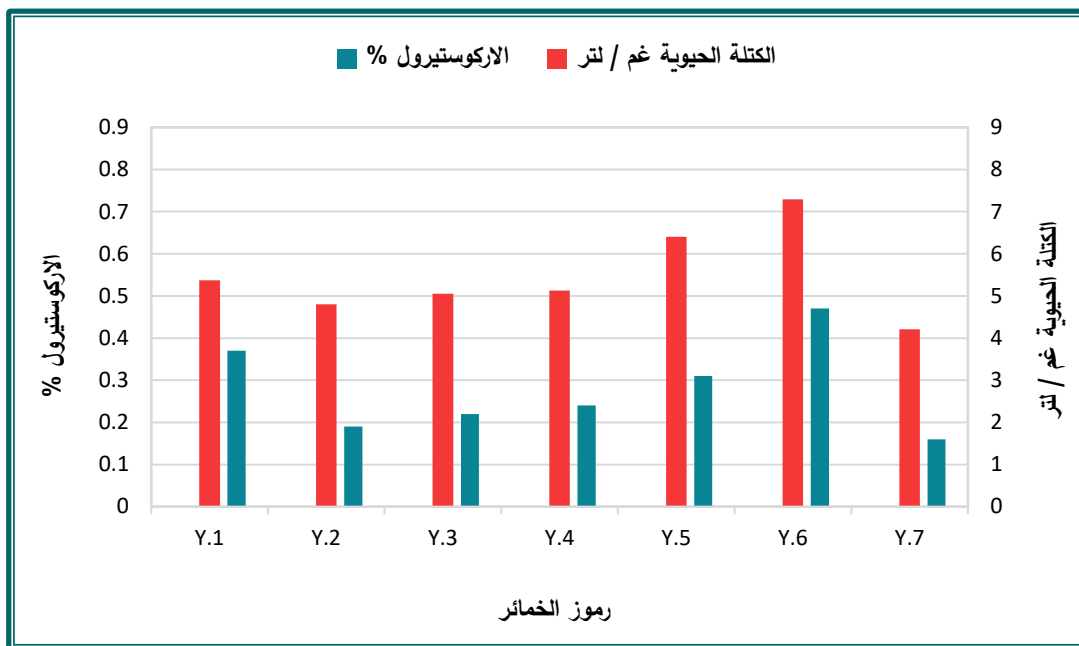
Y.6: Domo ، Y.5: Beşler ، Y.4: Yuva ، Y.3: Natu ، Y.2: European ، Y.1: Saf-Instant
Y.7: Angel ،

شكل (1-4) امتصاصية الأشعة فوق البنفسجية (UV) لأطياف الأركوستيروول من خميرة
S.cerevisiae

يعزى سبب ظهور هذه القمم الى وجود الأركوستيروول والذي يعد المركب الرئيسي للستيروولات المنتشرة في غشاء خلية الخميرة وهذا يتطابق مع نتائج العديد من الدراسات العلمية (Yuan *et al.*, 2006 ; Villares *et al.*, 2012 ; Somai *et al.*, 2021) ، اما انخفاض قمم المنحنيات أو ظهورها بشكل خط مستقيم (Flat) فإنه يدل على عدم وجود الأركوستيروول في الخميرة (Arthington-Skaggs *et al.*, 1999 ; Holloway, 2011) .

قدرت كمية الأركوستيروول الناتجة من الكتلة الحيوية حسب طريقة (Arthington-Skaggs *et al.*, 1999) ، اظهرت النتائج أن أعلى كمية منتجة من الكتلة الحيوية والأركوستيروول كانت من خميرة الخبز ذات المنشأ اللبناني (Domo) والتي بلغت 7.29 غم/ لتر و 0.47 % على التوالي ، في حين كانت اقل كمية منتجة للأركوستيروول من قبل الخميرة ذات المنشأ المصري (Angel) بكتلة حيوية وإنتاجية للأركوستيروول بلغت 4.21 غم / لتر و 0.16 % على التوالي وكما مبين في الشكل (2-4) .

جاءت النتائج متقاربة لما وجدته Lamacka and Sajbidor, (1997) بإِنَّ محتوى الأركوستيروول تراوح بين 0.48 - 1.56 % ، في حين كانت أعلى مما توصل اليه (Bhosle *et al.*, 2011) إذ بلغت إنتاجية الأركوستيروول 0.06 % بالمقابل كانت أقل مما ذكره (Gutarowska *et al.*, 2015) إذ تراوحت كمية الأركوستيروول المنتجة بين (1.4 – 6.4) % .



Y.6: Domo، Y.5: Beşler ، Y.4: Yuva ، Y.3: Natu ، Y.2: European ، Y.1: Saf-Instant

Y.7: Angel ،

شكل (2-4) غربلة الخمائر لأختيار الخميرة الاكفأ في إنتاج الأركوستيرونول

الكتلة الحيوية = 0.915 L.S.D (p<0.05) الاركوستيرونول = 0.088 L.S.D (p<0.05)

يعود الاختلاف في الإنتاجية بين أنواع الخمائر التجارية في محتواها للاركوستيرونول الى تركيب غشاء خلية الخميرة ومحتواه من السيترونول وايضاً الى مرونة ونفاذية الغشاء والذي يؤثر على الفعاليات الأيضية وقابلية مرور واستهلاك المواد الغذائية الموجودة في الوسط الغذائي فضلاً عن التباين الوراثي بين الخمائر المستعملة في الإنتاج (Dulaney *et al.*, 1954 ; Damini *et al.*, 2013) ، وقد أكملت الدراسة الحالية باستعمال الخميرة ذات المنشأ اللبناني Y.6 (Domo) واعتماداً على النتائج التي ذكرت لكل من الكتلة الحيوية وكمية الاركوستيرونول المنتجة .

2-4 الفحوصات التأكيذية التشخيصية لخميرة الخبز ذات الرمز Y.6 :

درست الصفات المزرعية لخميرة الخبز ذات الرمز Y.6 بأجراء الفحص المظهري والمجهري

فضلاً عن الاختبارات الكيموحيوية وحسب التالي :

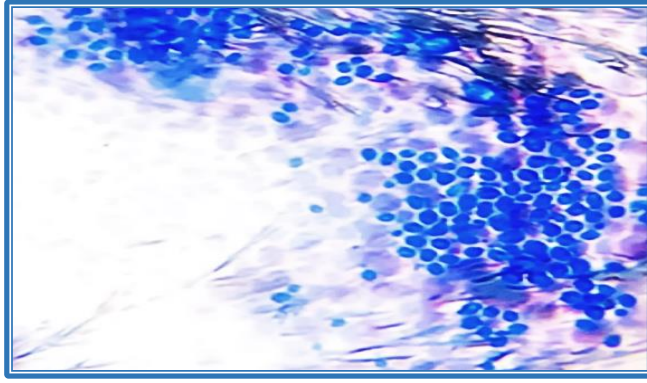
1-2-4 الاختبارات المظهرية والمجهرية :

تميزت خلايا الخميرة عند زراعتها على وسط يحتوي على 5% من مستخلص المالت الصلب عند درجة حرارة 20 م° لمدة 30 يوماً بترتيب الخلايا بشكل سلاسل منتظمة ذات حافة مرتفعة وملساء فضلاً عن تلون المستعمرات بلون ابيض مائل الى الكريمي وبشكل دائري منتظم كما مبين في الشكل (3-4) ، تطابقت النتائج المظهرية المذكورة مع المفاتيح التشخيصية لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* (Kurtzman and Fell, 1998).



شكل (3-4) الفحص المظهري لخلايا خميرة الخبز Y.6

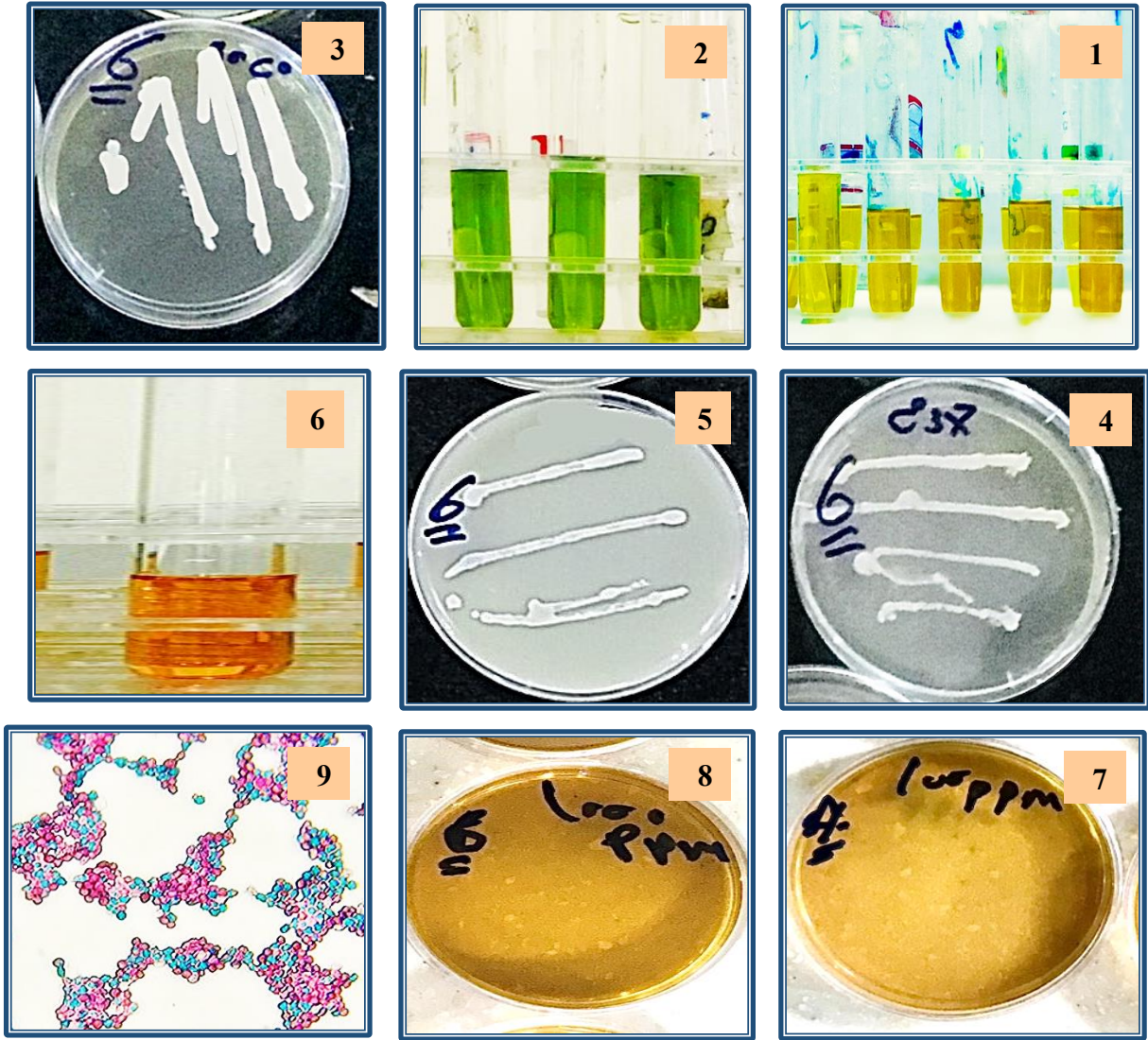
اما عند اجراء الفحص المجهرى لخلايا الخميرة المنماة على وسط 5% مستخلص المالت السائل ولمدة 72 ساعة ، أنها تلونت باللون الأزرق عند تصبيغها بصبغة المثيلين الزرقاء كما ظهرت خلاياها متجمعة على هيئة سلاسل أو ازواج فضلاً عن أنها ذات اشكال كروية أو بيضوية وكما موضح في الشكل (4-4) ، إذ توافقت نتائج الفحص المجهرى مع المفاتيح التشخيصية لخميرة *S. cerevisiae* والمبينة في (Lodder, 1970; Kreger-van Rij, 1984).



شكل (4-4) الفحص المجهرى لخلايا خميرة الخبز Y.6 المصبغة بصبغة الميثيلين الزرقاء

4-2-2 الاختبارات الكيموحيوية:

يوضح الجدول (1-4) نتائج الاختبارات الكيموحيوية التي أجريت على خميرة الخبز ذات المنشأ اللبناني (Y.6) ، إذ تميزت بتكوينها لهالات شفافة حول المستعمرات عند تنميتها على وسط Glucose-Calcium Carbonate Agar ، وهذا يعود الى إنتاجها لحمض الخليك من تخمر الكلوكوز كذلك لوحظ عدم قدرة هذه الخميرة على استعمال اليوريا كمصدر نيتروجيني وتحليلها وهذا يعزى الى عدم احتوائها على أنزيم اليوريز ، ايضاً بينت النتائج قدرة خميرة الخبز على تخمير بعض المصادر الكربوهيدراتية (السكريات) المتمثلة بالكلوكوز ، الكالاكتوز ، الرافينوز ، السكروز والمالتوز في حين لم تتمكن من تخمير كل من سكر اللاكتوز ، الميليبايوز والتريهالوز ، فضلاً عن أنها لم تستطع النمو في الوسط الحاوي على المضاد الحيوي السايكلوهكسامايد بتركيز 100 و 1000 جزء من المليون (ppm) بالمقابل تمكنت خميرة الخبز من النمو في درجة حرارة 30 م° بينما كان النمو متغائراً أو ضعيفاً عند درجة حرارة 37 م° ، ولوحظ قدرتها على تكوين السبورات التي تلونت بلون صبغة الملاكايت الخضراء وعند استعمال صبغة السفرانين تلون الجدار الخارجي للخلايا بلون أحمر وكما مبين في الشكل (4-5) ، توافقت النتائج مع المفاتيح التشخيصية المبينة في المصادر العلمية لكل من (Lodder, 1970 ; Kreger-van Rij, 1984 ; Kurtzman and Fell, 1998) التي أكدت على أن الخميرة Y.6 تعود الى خميرة *S. cerevisiae* .



شكل (4-5) الاختبارات الكيموحيوية التأكيدية لخميرة الخبز Y.6

- 1: تخمر كل من سكر (الكلوكوز، الكالاكتوز، الرافينوز، السكروز والمالتوز)
- 2: عدم تخمر كل من سكر (اللاكتوز، الميليبايوز والتريهالوز)
- 3: نمو خميرة الخبز في درجة حرارة 30 م°
- 4: النمو متغاير أو ضعيف لخميرة الخبز في درجة حرارة 37 م°
- 5: فحص انتاج الحامض
- 6: فحص تحلل اليوريا
- 7: فحص النمو على وسط غذائي يحتوي على مادة السايكلوهكسامايد بتركيز 100 ppm
- 8: فحص النمو على وسط غذائي يحتوي على مادة السايكلوهكسامايد بتركيز 1000 ppm
- 9: فحص تكوين السبورات لخلايا خميرة الخبز Y.6 المصبغة بصبغة الملاكايت الخضراء

جدول (1-4) الفحوصات الكيموحيوية لخلايا خميرة Y.6

فحص تكوين السبورات	فحص النمو في درجات حرارة مختلفة		فحص النمو على وسط غذائي يحتوي على مادة السايكلوهكسامايد		فحص تخمر المصادر الكربونية		فحص تحلل اليوريا	فحص إنتاج الحامض
	37 م	30 م	1000 ppm	100 ppm	+	الكلوكوز		
+	+	+	-	-	+	الكلوكوز	-	+
					+	الكالكتوز		
					+	الرافينوز		
					+	السكروز		
					+	المالتوز		
					-	اللاكٹوز		
					-	الميليبايوز		
					-	التريهالوز		

❖ + موجبة للفحص

❖ - سالبة للفحص

❖ ± متغاير النمو

3-2-4- التشخيص التأكيدي باستعمال جهاز الفايترك لخميرة الخبز Y.6

compact system Vitek 2

استعمل جهاز الفايترك لغرض اجراء التشخيص التأكيدي لخميرة الخبز (Y.6) ، إذ بينت نتائج

التشخيص بعد مقارنتها بالنتائج المخزونة بالجهاز بأن الخميرة المفحوصة تعود الى *S. cerevisiae*

بنسبة احتمالية 97% (علماً أن نسبة احتمالية تتراوح بين 96 – 99% تعد نسبة ممتازة للتشخيص)

كما هي الاختبارات المبينة في الجدول (2-4) .

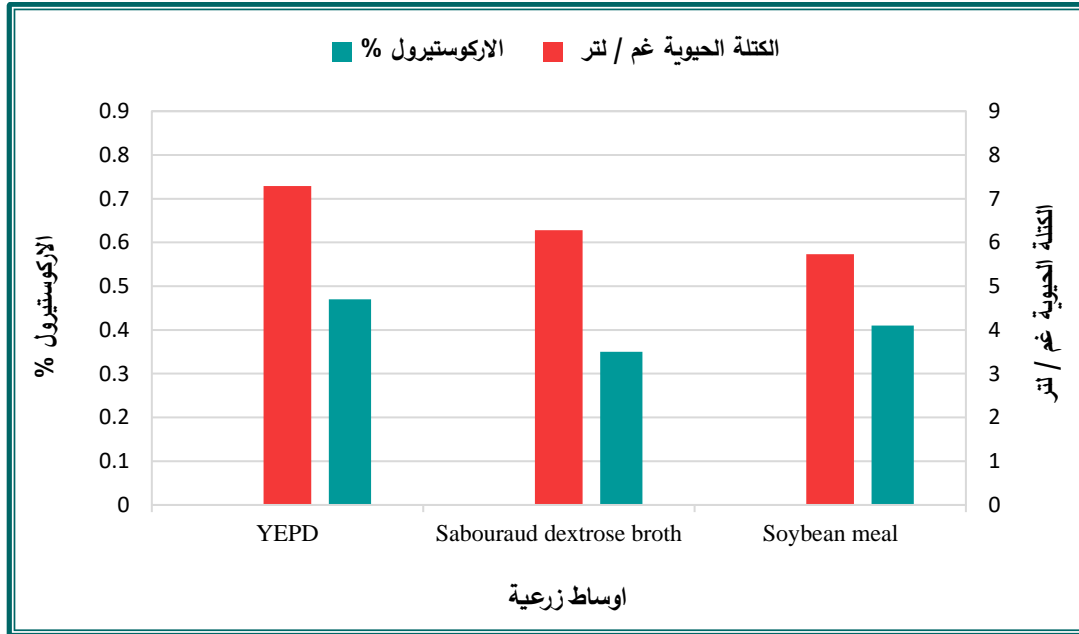
جدول (2-4) التشخيص التأكيدي لخميرة الخبز (Y.6) باستعمال جهاز الفايترك Vitek2

النتائج	الاختبار	رقم الاختبار
<i>S.cerevisiae</i> 97%		
-	L-Lysine-Arylamidase (LYSA)	3
-	L-Malate assimilation (IMLT)	4
+	Leucine-Arylamidase (LeuA)	5
-	N-Acetyl-glucosamine assimilation (ARG)	7
-	D-Gluconate assimilation (ERY)	10
-	Glycerol assimilation (GLYL)	12
-	Tyrosine Arylamidase (TYFA)	13
-	Beta-N-Acetyl-Glucosaminidase (BNAG)	14
-	Arbutin assimilation (ARB)	15
-	Arginine GP (AMY)	18
+	D-galactose assimilation (dGAL)	19
-	Gentiobiose assimilation (GEN)	20
+	D-Glucose assimilation (GLU)	21
-	Lactose assimilation (LAC)	23
+	Methyl-A-D-glucopyranoside assimilation (MADG)	24
-	Amygdalin assimilation (dCEL)	26
-	Gamma- glutamyl- Transferase (GGT)	27
+	D- Maltose assimilation (dMAL)	28
+	D- Raffinose assimilation (DRAF)	29
-	Pnp-N-acetyl-Bd-galactosaminidase 1 (NAGAI)	30
+	D-Mannose assimilation (Dmne)	32
-	D-Cellobiose assimilation (dMEL)	33
+	D-Melezitose assimilation (Dmlz)	34
-	L-Sorbose assimilation (LSBE)	38
-	L-Rhamnose assimilation (LRHA)	39
-	Xylitol assimilation (XLT)	40
-	D-Sorbitol assimilation (Dsor)	42
+	D- Melibiose assimilation (SAC)	44
-	Urease (URE)	45
+	Alpha- Glucosidase (AGLU)	46
+	D-Turanose assimilation (TUR)	47
+	D-Trehalose assimilation (DIRE)	48
-	Nitrate assimilation (NO3)	49
-	Saccharose/Sucrose assimilation (LARA)	51
-	D-Galacturonate assimilation (dGAT)	52
-	Esculin hydrolysis (ESC)	53
-	L-Glutamate assimilation (IGLT)	54
-	D-Xylose assimilation (dXYL)	55
+	DI-Lactate assimilation (LAT)	56
+	L-Arabinose assimilation (ACE)	58
-	Citrate (Sodium) assimilation (CIT)	59
-	Glucuronate assimilation (GRTS)	60
-	L-Proline assimilation (IPRO)	61
-	Keto-D-gluconate assimilation-2 (KG2)	62
-	Tyrosine Arylamidase (NAG)	63
-	Acetate assimilation (dGNT)	64

3-4 دراسة الظروف المثلى لإنتاج الأركوستيرول

1-3-4 الوسط الأمثل لإنتاج الأركوستيرول

استعملت ثلاثة أوساط زرعية لتحديد الوسط الأمثل لإنتاج الأركوستيرول من خميرة *S.cerevisiae* ، إذ أظهرت النتائج أن أفضل وسط انتاج هو YEPD وهو نفس الوسط الذي أجريت عليه عملية غربلة الخمائر ذات المناشئ المختلفة ، إذ أعطى أعلى كمية منتجة من الأركوستيرول والتي بلغت 0.47 % اما الكتلة الحيوية فكانت 7.29 غم/ لتر وكما مبين في شكل (6-4) في حين بلغ إنتاج كل من وسط Sabourauds dextrose broth ووسط Soybean meal للأركوستيرول (0.35 ، 0.41) % على التوالي ، والتي أعطت فروقات معنوية فيما بينها واعتماداً على النتائج المستحصلة فقد تم اختيار الوسط YEPD كوسط قياسي لإنتاج الأركوستيرول .



شكل (6-4) كمية الأركوستيرول المنتجة من خميرة *S.cerevisiae* باستعمال اوساط زرعية مختلفة

الكتلة الحيوية L.S.D (p<0.05) = 1.592 الأركوستيرول L.S.D (p<0.05) = 0.107

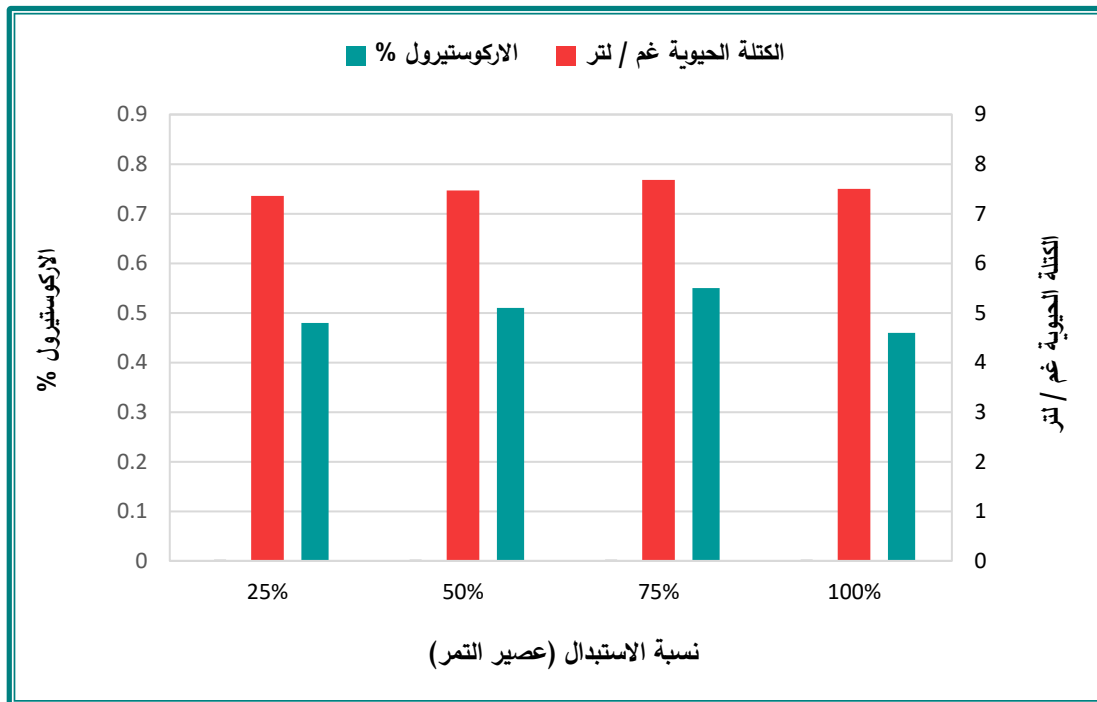
يتميز وسط YEPD بأنه يوفر أفضل نمو لخميرة *S.cerevisiae* لما يحتويه من سكر الكلوكوز فضلاً عن خلاصة الخميرة إذ تسمح هذه المواد بنمو أسرع للخلايا خلال الطور اللوغاريتمي وانشطار الخلايا كل 90 دقيقة ، إذ إن خلاصة الخميرة تمد الوسط بالنيتروجين وكذلك فيتامينات B-Complex بينما الكلوكوز يعتبر كمصدر طاقة لدعم نمو الخميرة اما التباين في الإنتاج فإنه يعزى الى اختلاف نسبة ونوع المصادر الكربونية والنيتروجينية في الاوساط الزراعية والتي تؤثر بصورة مباشرة على كمية الاركوستيرون المنتجة ومقدار الكتلة الحيوية المتكونة، فضلاً عن كمية الكلوكوز الموجود في الاوساط إذ إن زيادة نسبة الكلوكوز بمقدار 16% يؤدي الى زيادة كمية الاركوستيرون المنتجة، كما بينت الدراسات التي اجريت على الكتلة الحيوية ومحتوى الاركوستيرون أن 10% من الكلوكوز يعطي أعلى إنتاجية من الاركوستيرون (He et al., 2000).

جاءت النتائج متفقة مع العديد من الدراسات التي استعملت وسط Yeast extract (YEPE) Peptone Dextrose في إنتاج الاركوستيرون (He et al., 2000 ; et al., 2013) في حين بين (2013) Damini et al. أن افضل وسط هو Soybean meal لإنتاج أعلى كمية من الاركوستيرون ، بينما وجد (2012) Wu et al. أن أعلى إنتاجية للاركوستيرون كانت عند تنمية خميرة *S.cerevisiae* على وسط نقيع الذرة ووسط مستخلص الشعير.

4-3-2 استعمال البدائل المحلية في وسط إنتاج الاركوستيرون من خميرة *S.cerevisiae*

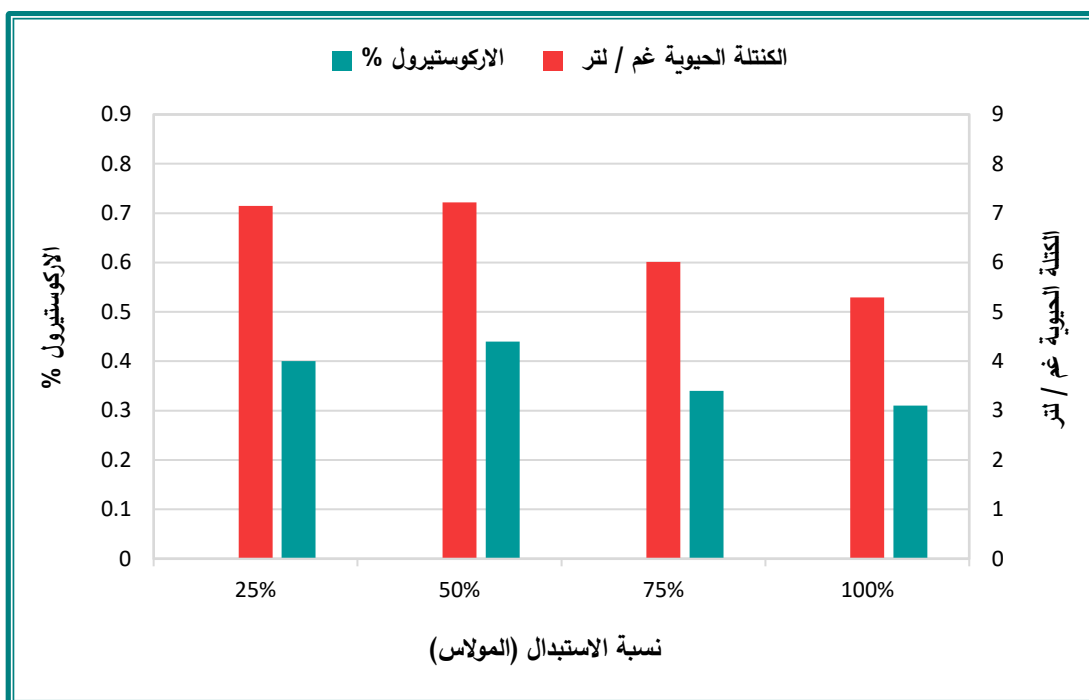
درس تأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط الإنتاج الأمثل (YEPE) والمتمثل بالكلوكوز ببدائل محلية متمثلة بعصير التمر والمولاس وبنسب مختلفة (25-100)% ،

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($p < 0.05$) بين المصادر الكربونية المستعملة في إنتاج الاركوستيروول ، ازادات إنتاجية الاركوستيروول مع زيادة نسبة الاستبدال حتى بلغت أقصاها 0.55% عند نسبة استبدال 75% من الكلوكوز بعصير التمر ، في حين كانت الإنتاجية والكتلة الحيوية منخفضة عند الاستبدال بالمولاس ولجميع نسب الاستبدال مقارنة مع الكلوكوز في الوسط القياسي وعصير التمر وكما مبين في الشكل (7-4) و (8-4).



شكل (7-4) تأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الاركوستيروول بعصير التمر وبنسب مختلفة

الكتلة الحيوية L.S.D ($p < 0.05$) = 0.850 الاركوستيروول L.S.D ($p < 0.05$) = 0.140



شكل (4-8) تأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الاركوستيرون بالمولاس وبنسب مختلفة

الكتلة الحيوية $L.S.D (p<0.05) = 1.339$ الاركوستيرون $L.S.D (p<0.05) = 0.098$

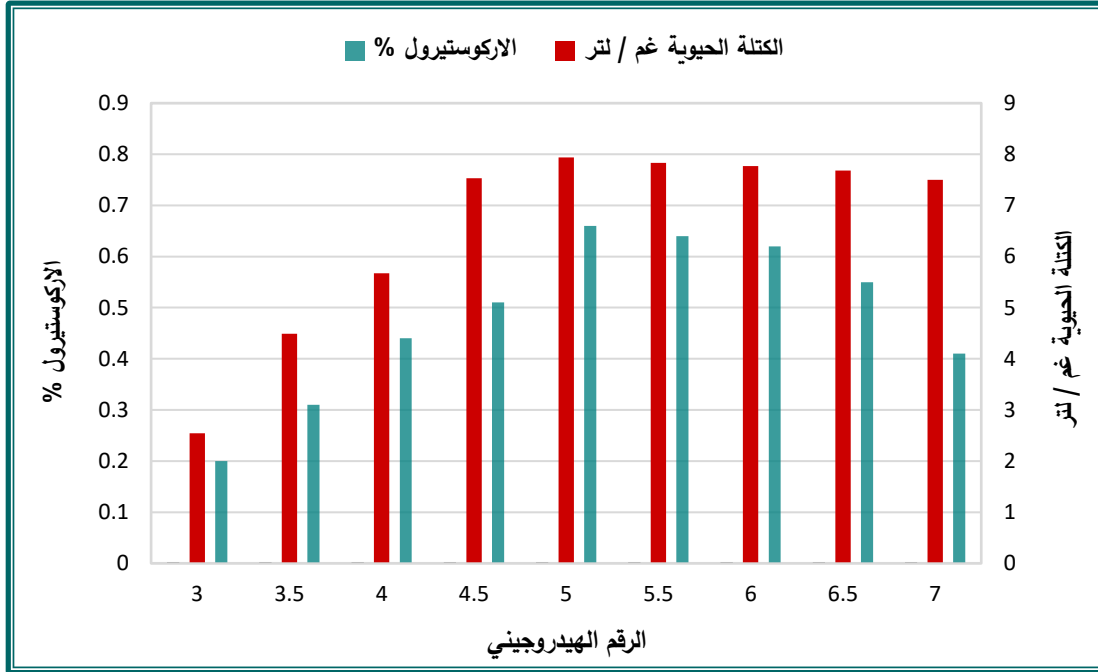
إن زيادة إنتاج الاركوستيرون في وسط الإنتاج المستبدل فيه الكلوكوز مع عصير التمر وبنسبة 75% قد يعزى الى احتواء عصير التمر على سكريات أحادية بسيطة (كلوكوز وفركتوز) سهلة الاستهلاك من قبل خميرة *S.cerevisiae* فضلاً عن العديد من المصادر النيتروجينية والفيتامينات والأملاح المعدنية مثل الفسفور والمغنيسيوم والتي تساعد في نمو الخميرة والقيام بالعمليات الأيضية لإنتاج الاركوستيرون ، في حين حصل بعض الانخفاض في كمية الاركوستيرون عند الاستبدال بنسبة 100% وهذا ربما يعزى الى احتواء العصير على بعض المركبات مثل حامض الخليك والفورميك والبروبيونيك والتي قد تؤثر على نمو الخميرة وبالتالي في إنتاج منتجاتها الأيضية أو تركيب جدارها (Al-Jasass et al., 2010 ; Gabsi et al., 2013; Alfadul and Hassan, 2016) ، اما

بالنسبة للانخفاض الحاصل في كمية الاركوسيتيرول عند الاستبدال بالمولاس فإنه قد يعود الى احتواء المولاس على نسبة عالية من السكريات الكلية الثنائية والمتعددة أو بسبب وجود بعض المكونات الغير مرغوب بها مثل المعادن الثقيلة والشوائب والمواد السليولوزية والتي قد تؤثر على نمو الخميرة وبالتالي على إنتاجية الاركوسيتيرول أو يحصل الانخفاض بسبب التثبيط بالمادة الاساس (substrate inhibition) وهي الظاهرة التي تحصل في تخمرات الوجبات التقليدية (Dumbrepatil *et al.*, 2008) ، إذ توافقت النتائج مع ما بينه العبيدي وآخرون، (1986) بأفضلية عصير التمر لنمو خميرة *S.cerevisiae* واستهلاك السكر مقارنة مع المولاس ، كما جاءت النتائج متفقة مع العديد من الدراسات التي أكدت على استعمال عصير التمر كمصدر كربوني ومنها ما ذكره Alshammari *et al.*, (2018) بأن الكتلة الحيوية لخميرة *S.cerevisiae* تزداد عند استعمال عصير التمر كمصدر كربوني إذ بلغت 8.5 مايكروغرام / مل بينما لاحظ (He *et al.* (2007) أن أعلى إنتاجية كانت عند كتلة حيوية 6.5 مايكروغرام / غرام عند استعمال المولاس في إنتاج الاركوسيتيرول من الخميرة ، إذ حظيت المصادر أو المخلفات الصناعية والزراعية باهتمام كبير في دراسات إنتاج المنتجات الحيوية من الاحياء المجهرية لما تمتاز به من خفض كلفة الإنتاج مقارنة مع الأوساط القياسية المستعملة ، لذلك اختير عصير التمر كبديل محلي عن المصدر الكربوني الكلوكوز في الوسط القياسي لأكمال الدراسة الحالية .

3-3-4 تأثير الرقم الهيدروجيني pH

دُرُس تأثير الرقم الهيدروجيني على إنتاجية الاركوسيتيرول من خميرة *S.cerevisiae* من خلال استعمال مديات مختلفة من pH تراوحت بين (3-7) إذ لوحظ وكما مبين في الشكل (4-9) إن إنتاجية الأركوسيتيرول ازدادت مع زيادة الدالة الحامضية الابتدائية للوسط حتى بلغت اقصاها

عند 5 بإنتاجية 0.66 % ، لتعود بعدها للانخفاض مرة أخرى في الأرقام الهيدروجينية المتعادلة لتصل الإنتاجية إلى 0.41% عند الرقم الهيدروجيني 7 .



شكل (4-9) تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي على إنتاج الأركوستيرول من خميرة *S.cerevisiae*

الكتلة الحيوية L.S.D (p<0.05) = 0.993 الأركوستيرول L.S.D (p<0.05) = 0.101

بينت النتائج الاحصائية وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية (p<0.05) عند

استعمال ارقام هيدروجينية مختلفة لاختيار الأفضل في إنتاج أكبر كمية من الأركوستيرول

، يعد الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط مهماً لنمو الخميرة ولتوجيهه أيضاً فضلاً عن

تأثيره في صفات الوسط مثل ذاتبية مكونات الوسط الغذائي والتحكم بنسب التوافر

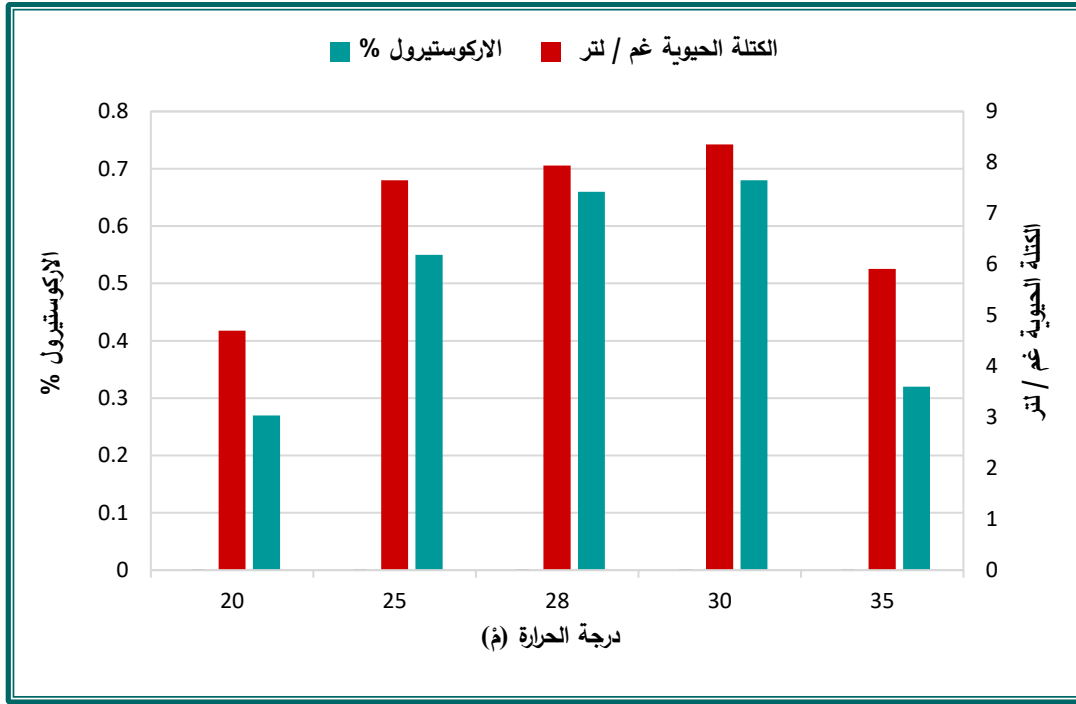
الحيوي لهذه المكونات كذلك تأثيره في تأين وثبات المركبات الحيوية الناتجة أثناء عملية

التخمير (Kurtzman *et al.*, 2011 ; احمد والنواوي، 1999) .

جاءت النتائج مقارنة مع ما توصل اليه (Shang *et al.*, 2006) عند دراسته للظروف المثلى لإنتاج الاركوستيروول من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* والذي وجد أن أعلى قيمة للاركوستيروول كانت عند رقم هيدروجيني 5.5 ، ايضاً متوافقة مع (Galaction *et al.*, 2021) الذي استعمل رقم هيدروجيني 5.4 لإنتاج الاركوستيروول من خميرة *S. cerevisiae* ، كذلك اتفقت مع ما وجدته (Vidra *et al.*, 2021) بأن أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج الاركوستيروول من خميرة *Kluyveromyces marxianus* كان عند 5.5 ، كما نكر (Wu *et al.*, 2012) أن أفضل إنتاجية للاركوستيروول كانت عند 5.5 عند تنمية خميرة *Saccharomyces cerevisiae* على وسط نقيع الذرة ، يحصل أثناء عملية التخمر انخفاض في الرقم الهيدروجيني يرافقه زيادة في محتوى الاركوستيروول وهذا ربما يعزى الى توفر الظروف الحامضية الملائمة لنمو الخميرة وإنتاج الاركوستيروول فضلاً عن ارتباطه بألية التمثيل الايضى لخلايا خميرة *S. cerevisiae* (Rychtera *et al.*, 2010) ، يمكن تفسير اختلاف نتائج دراستنا الحالية مع بعض نتائج الدراسات السابقة الى الاختلاف في نسب ومكونات المصدر الكربوني والنيروجيني، إذ أوضح (He *et al.*, 2000) الى أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الاركوستيروول يعتمد على نوع المصدر الكربوني مثل الكلوكوز أو السكروز وكذلك المصدر النيتروجيني مثل البيبتون أو مستخلص الخميرة .

4-3-4 درجة الحرارة المثلى

استعملت درجات حرارية مختلفة لاختيار أفضلها في إنتاج الاركوستيروول شملت (20 ، 25 ، 28 ، 30 ، 35) م°، إذ لوحظ وكما في الشكل (4-10) أن درجة الحرارة 30 م° أعطت أعلى إنتاجية والتي بلغت (0.68%) وبوزن كتلة حيوية يصل الى 8.35 غم / لتر .



شكل (4-10) تأثير الحضان بدرجات حرارة مختلفة على إنتاجية الاركوستيرونول من خميرة *S.cerevisiae*

L.S.D (p<0.05) = 0.086 الاركوستيرونول L.S.D (p<0.05) = 1.440 الكتلة الحيوية

اظهر التحليل الاحصائي للناتج وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية (p<0.05)

عند استعمال درجات حرارة مختلفة لاختيار الأمثل في إنتاج اكبر كمية من الاركوستيرونول ،
أذ قد تكون لدرجة الحرارة 30 م تأثير أفضل من الدرجات الحرارية الاخرى في ذاتية
الاوكسجين والطاقة الحركية للجزيئات وزيادة النواتج الايضية وبالتالي زيادة إنتاج الاركوستيرونول،
أذ تؤثر درجة الحرارة في تحديد نشاط الخمائر كالنمو والفعاليات الحيوية الاخرى وبذلك تعد
أحدى العوامل المهمة للسيطرة على فعاليات الهدم والبناء الحيوي ولاسيما في الصناعات التخمرية

(Tuite and Oliver, 1991; Kurtzman *et al.*, 2011)

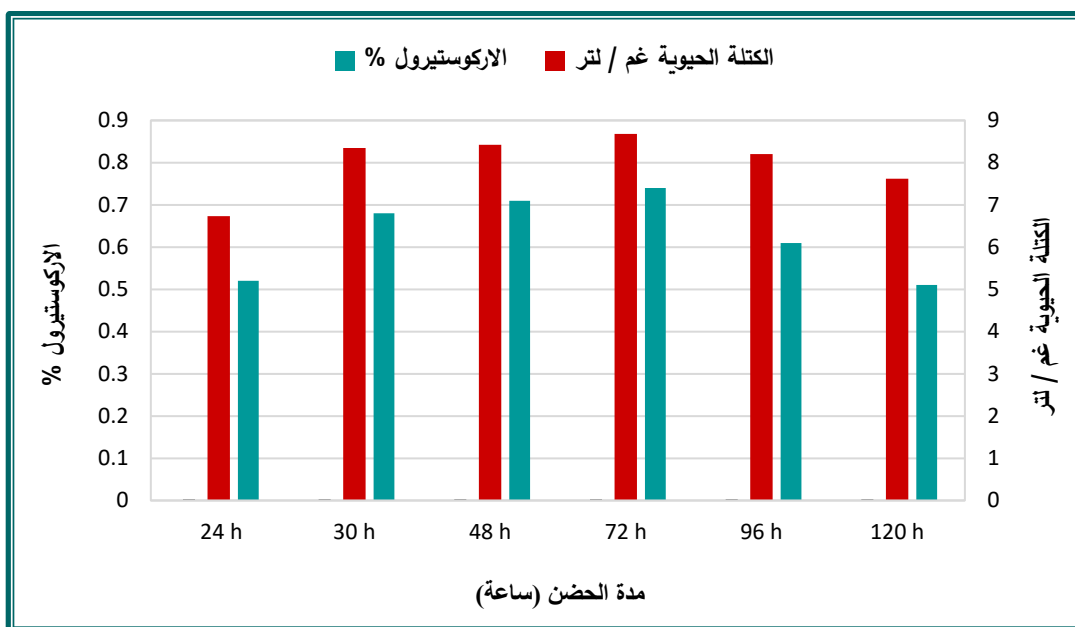
اشارت العديد من الدراسات الى تأثير درجة حرارة الحضان في تكوين الكتلة الحيوية وإنتاج

الاركوستيرونول، إذ تطابقت النتائج مع ما وجدته Endo *et al.*, (2009) بأن أفضل درجة حرارة

لإنتاج الأركوستيرول كانت عند 30 م°، في حين نكر (Li et al., 2009) عند دراسته لمدى واسع من الدرجات الحرارية تراوحت بين (10 - 30) م° بأن أفضل درجة حرارة لإنتاج الأركوستيرول هي 25 م°، كما جاءت النتائج متفقة مع ما توصل إليه (Shang et al., 2006) عند دراسته للظروف المثلى لإنتاج الأركوستيرول من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* والذي لاحظ أن أعلى قيمة للأركوستيرول كانت عند 30 م°، أيضاً اتفقت النتائج مع كل من (Galaction et al., 2021) و (Lavová et al., 2013) و (Shobayashi et al., 2005) عند استعمالهم درجة حرارة 30 م° لإنتاج الأركوستيرول من خميرة *S. cerevisiae*، في حين كانت متقاربة مع ما ذكره (Wu et al., 2012) بأن درجة حرارة 28 م° أعطت أعلى كمية من الأركوستيرول عند تنمية خميرة *Saccharomyces cerevisiae* على وسط نقيع الذرة .

4-3-5 مدة الحضان المثلى

استعملت مدد حضان مختلفة لاختيار أفضلها لإنتاج الأركوستيرول شملت (24 , 30 , 48 , 72 , 96 , 120) ساعة، ويلاحظ من الشكل (4-11) أن أعلى إنتاجية كانت عند مدة حضان 72 ساعة والتي بلغت (0.74%) وبوزن كتلة حيوية يصل إلى 8.51 غم / لتر إلا أن زيادة مدة الحضان بعد اليوم الثالث انعكست سلباً على كمية الأركوستيرول وهذا قد يعود إلى بداية نفاذ المغذيات من الوسط فضلاً عن زيادة النواتج الثانوية للخلايا والتي تؤدي إلى تثبيط نموها أو موتها ومن ثم انخفاض الإنتاج (الخفاجي، 1990 ; Tuite and Oliver, 1991) .



شكل (11-4) تأثير مدة الحضانة على إنتاج الأركوستيروول من خميرة *S.cerevisiae*

الكتلة الحيوية $L.S.D (p<0.05) = 1.308$ الأركوستيروول $L.S.D (p<0.05) = 0.113$

بينت النتائج الاحصائية وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($p<0.05$) عند

استعمال فترات حضان مختلفة لاختيار افضل فترة في إنتاج أكبر كمية من الأركوستيروول ،

إذ إن النتائج المتحصل عليها كانت متوافقة لما توصل اليه (Veen *et al.*, (2003) بأن

أفضل مدة حضان هي 3 أيام عند درجة حرارة 28 م ، وتوافقت النتيجة ايضاً

مع (Abd-Elsalam *et al.*, (2017) الذي أشار الى زيادة إنتاج الأركوستيروول تدريجياً حتى

وصلت أقصاها عند 72 ساعة ، كذلك كانت مقارنة مع ما ذكره (Lavová *et al.*, (2013) بأن

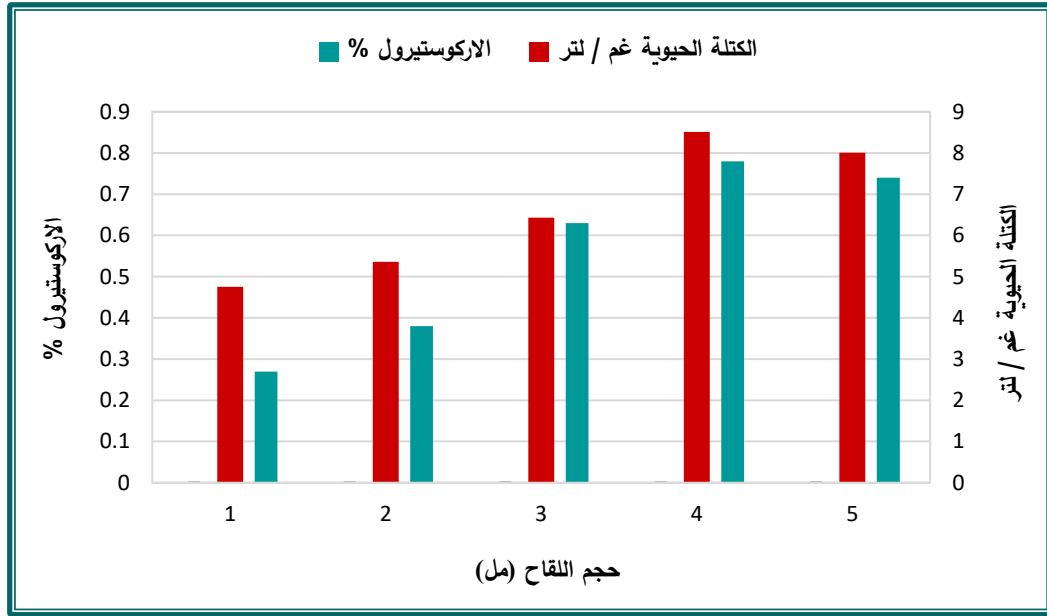
أفضل مدة حضان لإنتاج الأركوستيروول هي 52 ساعة.

4-3-6 حجم اللقاح الأمثل

أجري تلقيح وسط الإنتاج باستعمال حجوم مختلفة من اللقاح لغرض معرفة تأثير

حجم اللقاح في إنتاج الأركوستيروول، اظهرت النتائج وكما في شكل (4-12) زيادة تدريجية في كمية

الاركوستيرون المنتج من الخميرة مع زيادة حجم اللقاح المضاف حتى بلغت اقصاها 0.78% وبكتلة حيوية 8.68 غم / لتر عند استعمال حجم لقاح مقداره 4 مل (8%)، وظهرت النتائج الاحصائية وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($p < 0.05$) عند استعمال حجوم مختلفة من اللقاح لاختيار الحجم الأمثل في إنتاج أكبر كمية من الاركوستيرون.



شكل (4-12) تأثير استعمال حجوم لقاح مختلفة على إنتاجية الاركوستيرون من خميرة *S.cerevisiae*

L.S.D ($p < 0.05$) = 0.122 الاركوستيرون L.S.D ($p < 0.05$) = 1.562 الكتلة الحيوية

إن انخفاض كمية الاركوستيرون المنتج من الخميرة عند استعمال حجم لقاح مقداره 1 مل أو 2 مل قد يعود الى عدم كفاية خلايا الخميرة لحصول عملية التخمر بشكل كامل نتيجة قلة مساحة نموها بالتالي يؤثر ذلك على كفاءة استعمال الوسط مما ينعكس سلباً على الإنتاجية (الخفاجي ، 1990 ، احمد والنواوي، 1999) ، بينما زيادة كمية اللقاح (5 مل) ينتج عنه تنافس الاحياء المجهرية على مكونات الوسط والمغذيات وبالتالي نفاذها في وقت مبكر فضلاً عن سرعة استهلاك الاوكسجين وتكتل الخلايا وبالتالي انخفاض كمية المنتجات

الأيضية للخميرة (الخفاجي، 1990 ; He et al., 2000) ، بمعنى آخر أن نفاذ المغذيات في وسط النمو يؤدي الى تحفيز الخميرة للانتقال من طور النمو السريع (الطور اللوغاريتمي) الى المرحلة التي يتباطىء فيها نمو وانقسام الخلايا في الخميرة (طور الاستقرار) وبالتالي فإن هذا ينعكس سلباً على إنتاجية الكتلة الحيوية والاركوستيرون على حدٍ سواء (Leveille et al., 2022) ، جاءت النتائج مقارنة لما توصل اليه (Wu et al., 2012) بأن أفضل حجم لقاح في إنتاج الاركوستيرون من الخميرة كان 10% ، واستعمل (Damini et al., 2013) حجم لقاح 10% لإنتاج الاركوستيرون من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* ، بينما لاحظ (Abd-Elsalam et al., 2017) إن أفضل إنتاج للاركوستيرون من خميرة *Saccharomyces boulardii* عند استعماله حجم لقاح بمقدار 3 مل ، اما (Vidra et al., 2021) فقد استعمل حجم لقاح 5% لإنتاج الاركوستيرون من خميرة *Kluyveromyces marxianus* ، في حين وجد (Wu et al., 2012) أن حجم لقاح 30 مل بحجم وسط 3.9% اعطى أعلى إنتاجية للاركوستيرون عند تنمية خميرة *Saccharomyces cerevisiae* على وسط مستخلص الشعير .

4-3-7 سرعة اهتزاز الحاضنة

يبين الشكل (4-13) تأثير سرعة اهتزاز الحاضنة في إنتاج الاركوستيرون من خميرة *S.cerevisiae* ، ومن خلال النتائج لوحظ إن أعلى إنتاج للاركوستيرون كان عند سرعة اهتزاز (150 دورة / دقيقة) إذ بلغت الإنتاجية (0.83%) ووزن كتلة حيوية 9.45 غم / لتر ، في حين كانت منخفضة عند استعمال الحضان الساكن ، بينت النتائج الاحصائية وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($p < 0.05$) عند استعمال سرع اهتزاز مختلفة لاختيار السرعة الأمثل في إنتاج أكبر كمية من الاركوستيرون، إذ إن سرعة الاهتزاز تمنع تكثر الخلايا وتساعد في زيادة ذوبانية

الايوكسجين في وسط الإنتاج فضلاً عن مزج مكوناته، كما أن الاوكسجين يمتلك تأثيرات مختلفة على تكوين المنتجات الأيضية خلال التخمرات الهوائية وذلك عن طريق تأثيره في المسارات الأيضية للأحياء المجهرية المنتجة له (الخفاجي، 1990 ; He et al., 2000).



شكل (4-13) تأثير سرعة الاهتزاز على إنتاجية الاوكسيتيرول من خميرة *S.cerevisiae*

L.S.D (p<0.05) = 0.099 الاوكسيتيرول L.S.D (p<0.05) = 1.443 الكتلة الحيوية

جاءت النتائج متفقة مع العديد من الدراسات التي اكدت على ضرورة استعمال التحريك اثناء

التخمير لزيادة إنتاج الاوكسيتيرول (Shang ;Damini et al., 2013; Lavová et al., 2013)

2006, et al., واستعمل (Endo et al., 2009) في دراسته لإنتاج الاوكسيتيرول من

خميرة *S.cerevisiae* سرعة اهتزاز 150 دورة / دقيقة ، في حين اختلفت هذه النتيجة

مع (He et al ., 2000) إذ كانت الإنتاجية للاوكسيتيرول عند سرعة اهتزاز 200

دورة / دقيقة ، كذلك وجد (Wu et al., 2012) إن أعلى إنتاجية للاوكسيتيرول كانت عند 600

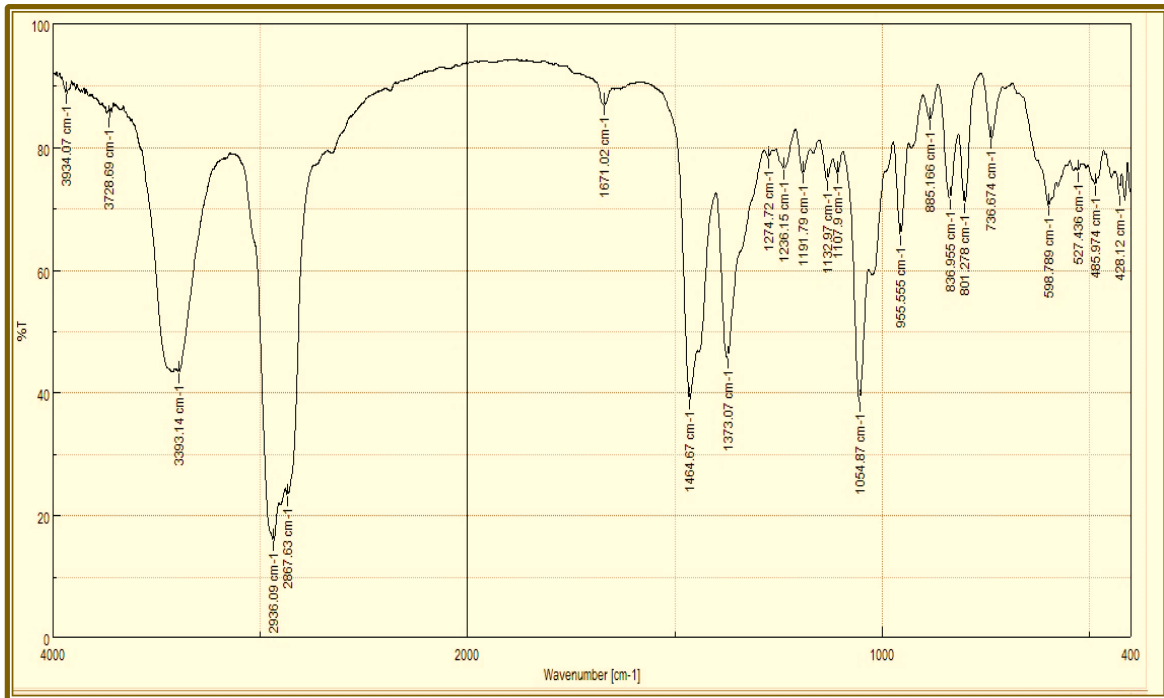
دورة / دقيقة ، يعود الاختلاف في الإنتاجية إلى تأثير سرعة الاهتزاز في نمو الخميرة

وفعاليتها في إنتاج الأركوستيرول ، كما أنها تحسن من تغلغل الأوكسجين في الوسط وتوزيعه المغذيات بشكل متساوي ، في حين إن التهوية المنخفضة (الحاضنة الساكنة) تمنع نمو وتحفيز تخليق الأركوستيرول (He *et al.*, 2000).

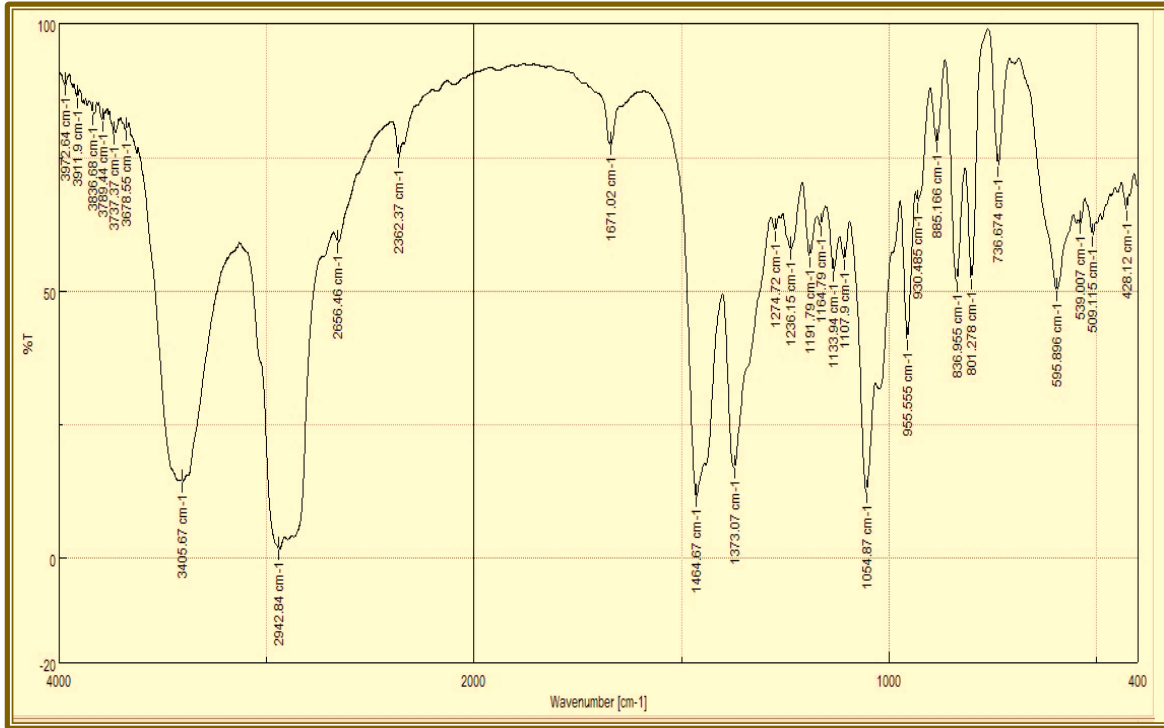
4-4 تشخيص الأركوستيرول بواسطة تقنية الأشعة تحت الحمراء

اجري في هذه الدراسة استعمال جهاز الأشعة تحت الحمراء (FT- IR) لغرض الكشف النوعي عن المجاميع الفعالة ايضاً معرفة مدى نقاوة المادة المستخلصة من الشوائب اذ تمتاز المواد بأن لكل منها مجاميع وظيفية عند طول موجي معين فضلاً عن التغيرات الهيكلية للبوليمرات الحيوية التي يمكن استعمالها في تحديد تراكيب المواد الدهنية مثل الأركوستيرول ، إن الشكليين (4-14) و (4-15) يوضحان النتائج المبينة للمرتسمات لكل من الأركوستيرول القياسي والمستخلص من الخميرة، إذ إن هذه المواد يمكن التعرف عليها من خلال القمم الظاهرة عند الأطوال الموجية والتي لا تتغير مواقعها عند أطوال الموجات ، لوحظ وجود حزمة عند الطول الموجي (2936.09 و 2942.84 سم⁻¹) للأركوستيرول القياسي والمستخلص من الخميرة على التوالي ، أن هذه الحزمة تعود الى التذبذب الاتساعي لمجموعة CH و CH₂ الألفاتية ، كما أن هذه القمة تدل على وجود كمية متوسطة من الدهون عند هذا الامتصاص (Wu *et al.*, 2012) ، فضلاً عن ظهور حزمة اخرى عند الطول الموجي (3393.14 و 3405.67 سم⁻¹) على التوالي ، والتي تعود لتذبذب مجاميع الهيدروكسيل OH وحزم المجاميع الامينية NH المتداخلة مع مجاميع الهيدروكسيل التي تظهر ضمن المنطقة نفسها، وتختلف شدة هذه الحزمة حسب نوع المواد المتفاعلة وشدة التفاعل، أن ما يشير الى وجود مركب الأركوستيرول فهو ظهور الامتصاص

الطيفي عند مجاميع الهيدروكسيل أو وجود الاواصر الهيدروجينية في هذه المنطقة (Manea *et al.*, 2007) اما عند الحزم ذات الطول الموجي (1464.67 سم⁻¹ و 1671.02 سم⁻¹) على التوالي، والذي يعود الى الاهتزاز الأحنائي في الالكانات الناتج عن وجود الرابطة (C=C) (Manea *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012) ، وفي الالكينات عند طول موجي 1373.07 سم⁻¹ و 836.95 سم⁻¹ (Damini *et al.*, 2013) كما ظهرت حزم عند 1236.15 سم⁻¹ و 1054.87 سم⁻¹ تعود للتذبذب الاتساعي لمجموعة الكربونيل والتي تعود لمجاميع الاستيل C=O (Manea *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012) ، بصورة عامة يمكن ملاحظة مدى تطابق المرتسمين لطيف الاشعة تحت الحمراء للاركوستيرون القياسي مع المنتج من خميرة *S.cerevisiae* من حيث القمم والمجاميع الفعالة والمبينة في شكل (14-4) و (15-4) .



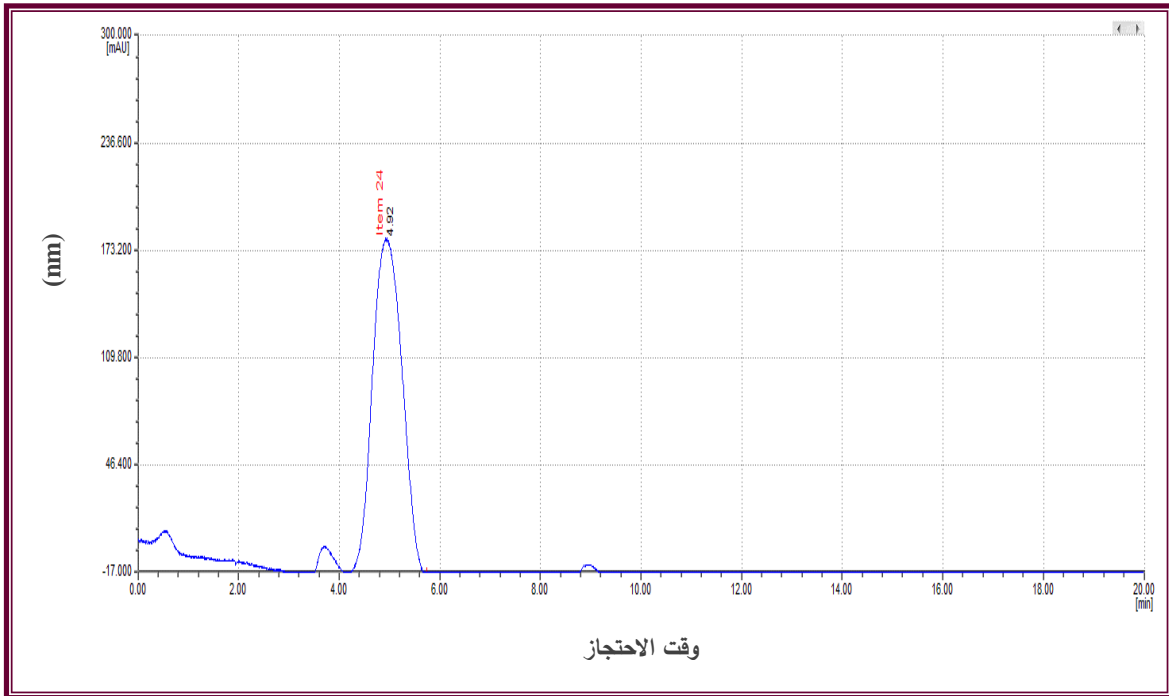
شكل (14-4) مرتسم طيف الاشعة تحت الحمراء للاركوستيرون القياسي



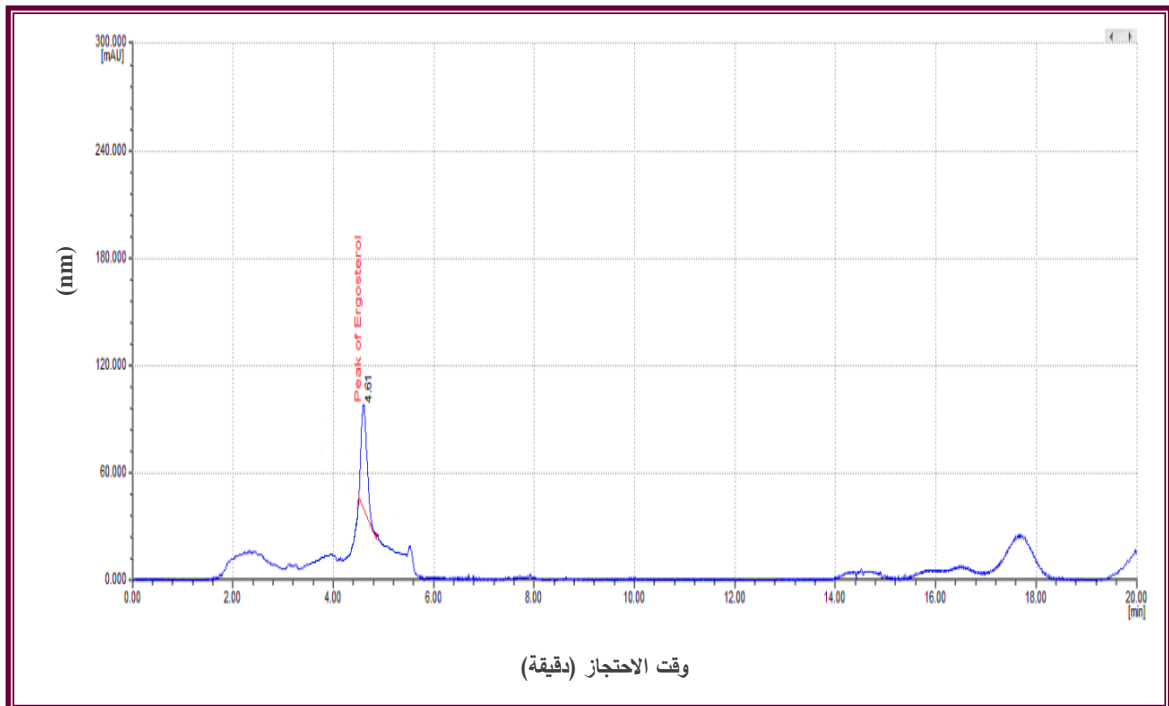
شكل (4-15) مرتسم طيف الأشعة تحت الحمراء للاركوستيرون المستخلص من خميرة *S.cerevisiae*

4-5 تشخيص الاركوستيرون باستعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل عالية الكفاءة

أجريت عملية تشخيص للاركوستيرون المنتج من خميرة *S.cerevisiae* بواسطة جهاز (HPLC)، إذ تم الكشف النوعي اعتماداً على وقت الاحتجاز للاركوستيرون المنتج من الخميرة ومقارنته مع وقت الاحتجاز للاركوستيرون القياسي مع نقصان أوزيادة اقل من دقيقة وكما في الشكل (4-16) و (4-17)، إذ لوحظ أن وقت الاحتجاز (RT) للاركوستيرون المنتج من الخميرة كان 4.61 دقيقة وهو مقارب للاركوستيرون القياسي الذي كان 4.92 دقيقة، وهذه النتائج جاءت متفقة مع ما ذكره (Verma *et al.*, 2002) أن وقت احتجاز الاركوستيرون كان 4.50 دقيقة.



شكل (16-4) مرتسم كروماتوغرافيا السائل عالية الكفاءة (HPLC) للاركوستيرون القياسي



شكل (17-4) مرتسم كروماتوغرافيا السائل عالية الكفاءة (HPLC) للاركوستيرون المنتج من

خميرة *S.cerevisiae*

6-4 تحويل الاركوستيروول الى فيتامين D₂

بعد تثبيت الظروف المثلى لإنتاج اكبر من كمية الاركوستيروول من خميرة *S. cerevisiae* ، أجريت عملية تحويل الاركوستيروول الى فيتامين D₂ من خلال تعريض الخميرة المنتجة تحت الظروف المثلى الى الأشعة فوق البنفسجية على طول موجي 254 نانومتر ولمدة 90 دقيقة ، إذ يتكون فيتامين D₂ نتيجة سلسلة من التفاعلات الضوئية الكيميائية (الأشعة فوق البنفسجية) والحرارية التي يتعرض لها الاركوستيروول (Jiang et al., 2020) ، بلغت كمية فيتامين D₂ المقدره باستعمال جهاز HPLC والنااتجة من تحويل الاركوستيروول 65.41 مايكروغرام / غم ، تقاربت النتائج المتحصل عليها مع ما وجدته Zhang et al., (2015) عند تحويل الاركوستيروول المنتج من فطر *Lentinula edodes* باستعمال الأشعة فوق البنفسجية فيتامين D₂ إذ بلغت كمية الفيتامين 68.61 مايكروغرام / غرام ، كذلك مع كل من Gallotti and Lavelli, (2020) في دراستهم لتأثير الأشعة فوق البنفسجية على محتوى فيتامين D₂ المحول من الاركوستيروول الناتج من الفطر بكمية بلغت 57.01 مايكروغرام / غرام .

يعود السبب في اختيار هذه الظروف يعود الى الدراسات العلمية التي اشارت الى إن أفضل محتوى من فيتامين D₂ هو عند تعريض الفطريات الحاوية على الاركوستيروول الى طول موجي 254 نانومتر ، وهذا ما وجدته Morales et al., (2017) عند تعريض فطر المشروم *Lentinula edodes* للأشعة فوق البنفسجية على طوليين موجيين 365 نانومتر و 254 نانومتر بأن أفضل محتوى لفيتامين D₂ كان عند طول موجي 254 نانومتر ، أيضاً توافقت النتائج مع ما ذكره Ruslan et al., (2011) عند تعريضه فطر *Pleurotus ostreatus* للأشعة فوق البنفسجية

على طول موجي 254 نانومتر و 366 نانومتر وبأوقات مختلفة تراوحت بين 15 – 120 دقيقة ، بأن أفضل محتوى من فيتامين D₂ كان عند طول موجي 254 نانومتر ولمدة 90 دقيقة ، فضلاً عن ذلك فإن الهيئة الاوروبية لسلامة الأغذية European Food Safety Authority اعتبرت أن تعريض خميرة *S.cerevisiae* للأشعة فوق البنفسجية على طول موجي 254 نانومتر بهدف تحويل الاركوستيرون الى فيتامين D₂ يعد آمناً (EFSA, 2014) .

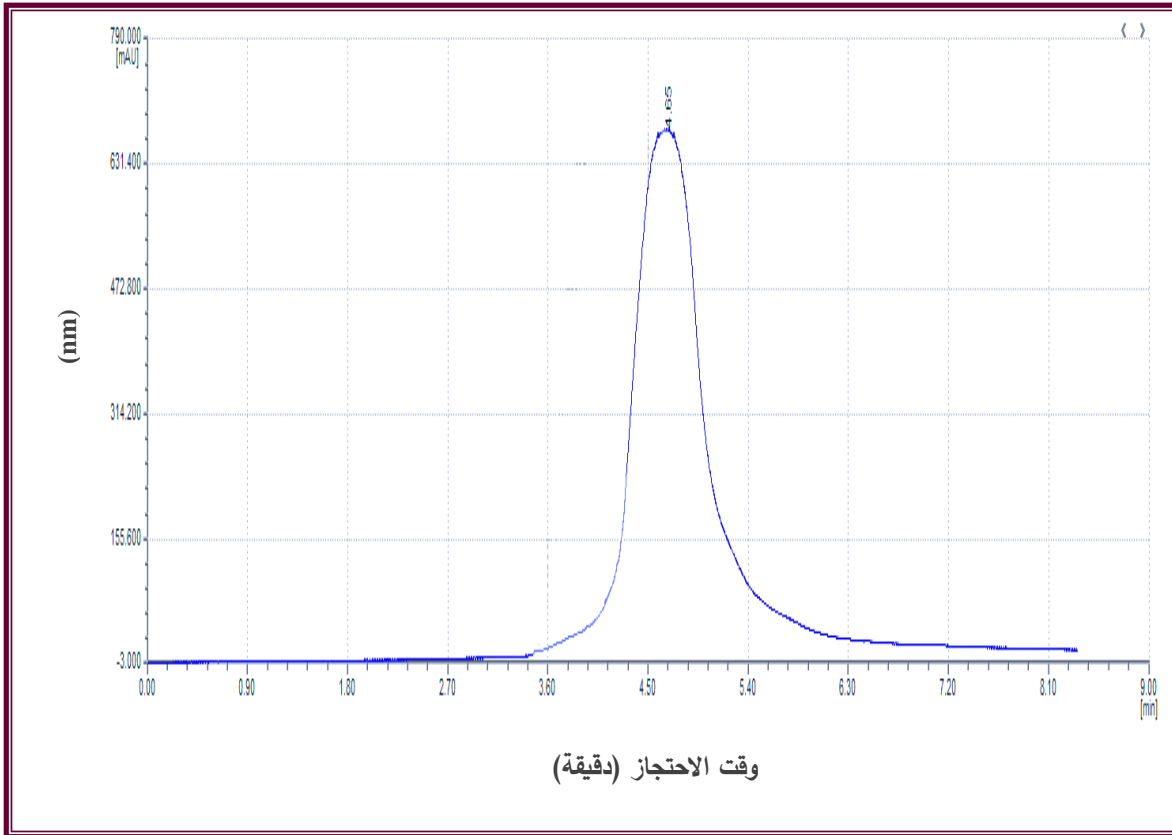
7-4 تأثير الخزن على حليب الفرز المدعم بفيتامين D₂

تناولت الدراسة الحالية تدعيم حليب الفرز بفيتامين D₂ (600 وحدة دولية) الناتج من تعريض الاركوستيرون المنتج من خميرة *S.cerevisiae* للأشعة فوق البنفسجية والخزن على فترات (0، 7) يوم وبدرجة حرارة 4 م° ، قدر الفيتامين المنتج تقديراً نوعياً وكمياً واعتماداً على وقت ظهور قمته مع وقت ظهور قمة فيتامين D₂ القياسي مع نقصان أو زيادة اقل من دقيقة باستعمال تقنية جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) ، وأظهرت النتائج أن وقت الاحتجاز لكل من فيتامين D₂ القياسي والمنتج عند 0 و 7 يوم من الخزن هو (4.61، 4.65) دقيقة على التوالي وكما مبين في الشكل (4-20) ، (4-21) ، (4-22) و (4-23) .

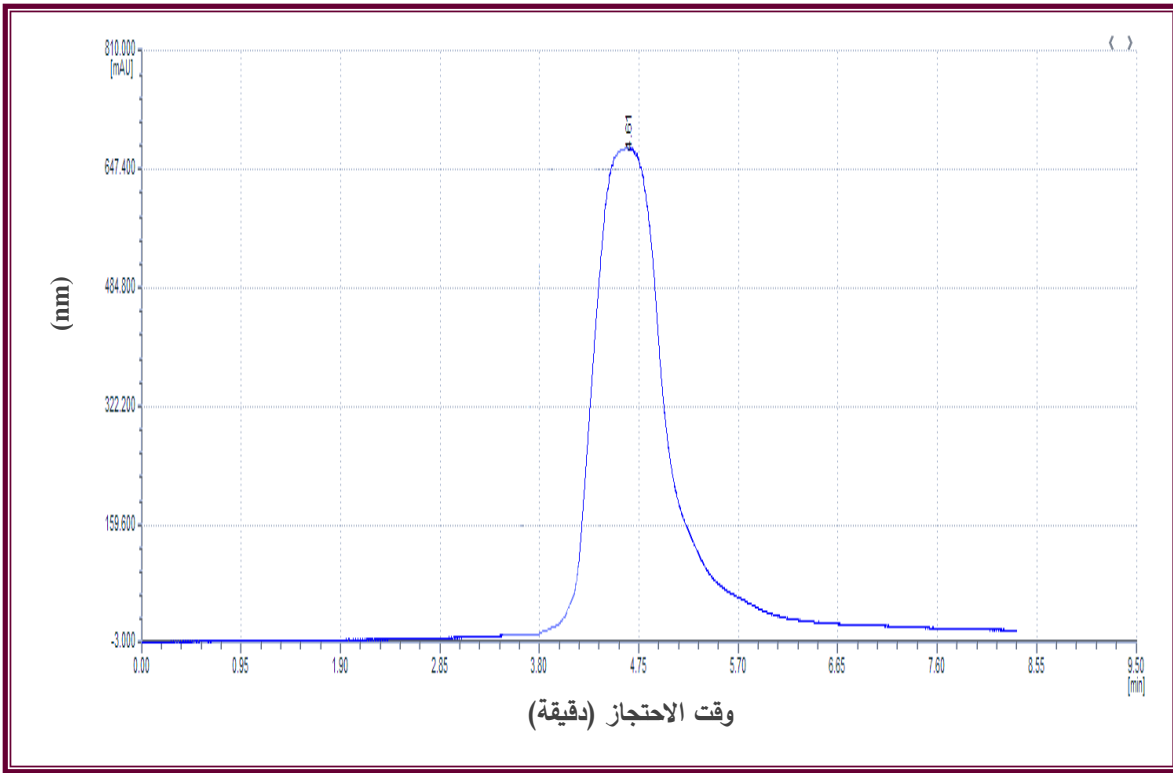
تقاربت النتائج المتحصل عليها مع ما وجدته (Oberson *et al.*, 2020) في دراسته للتقدير النوعي لفيتامين D₂ في الحليب أن وقت الاحتجاز له كان 3.67 دقيقة ، كذلك تم تقدير تركيز D₂ المنتج عند الخزن المبرد ولمدة 0 يوم ، إذ بلغ 0.0136 مايكروغرام / مل في حين انخفض تركيزه الى 0.0125 مايكروغرام / مل عند الخزن لمدة 7 أيام ، ومن خلال حساب ثباتية الفيتامين المنتج لوحظ أن الفيتامين قد احتفظ بنسبة 91.911% من فعاليته بعد الخزن ، قد يعزى حصول

الانخفاض الطفيف في ثباتية الفيتامين الى عدة أسباب منها التعرض للضوء أو الاوكسجين خلال مدة الخزن (Li and Min, 1998) .

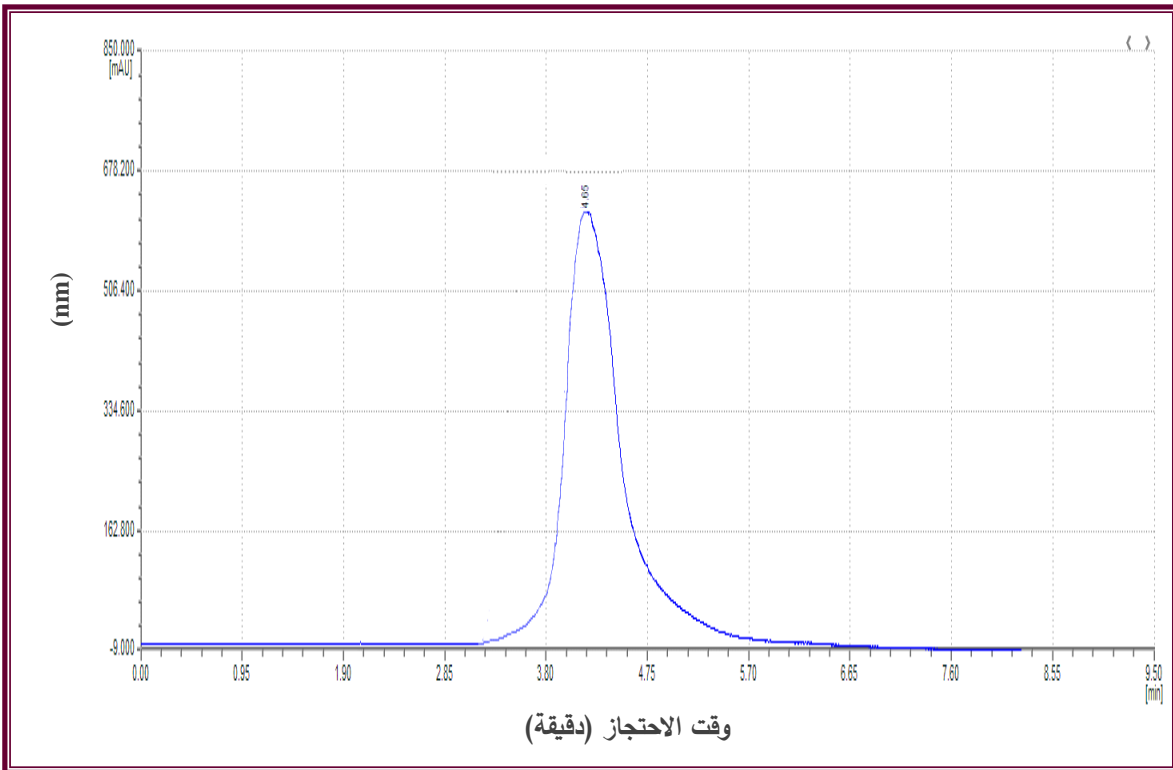
توافقت النتائج المستحصل عليها مع ما وجدته Kaushik *et al.*, (2014) عند تدعيم الحليب بفيتامين D والخزن عند (0، 3، 5، 7) يوم ، إذ لاحظ أن كمية فيتامين D عند 0 يوم من الخزن 599.80 وحدة دولية / لتر بينما بلغت 594.94 وحدة دولية / لتر بعد 7 أيام من الخزن .



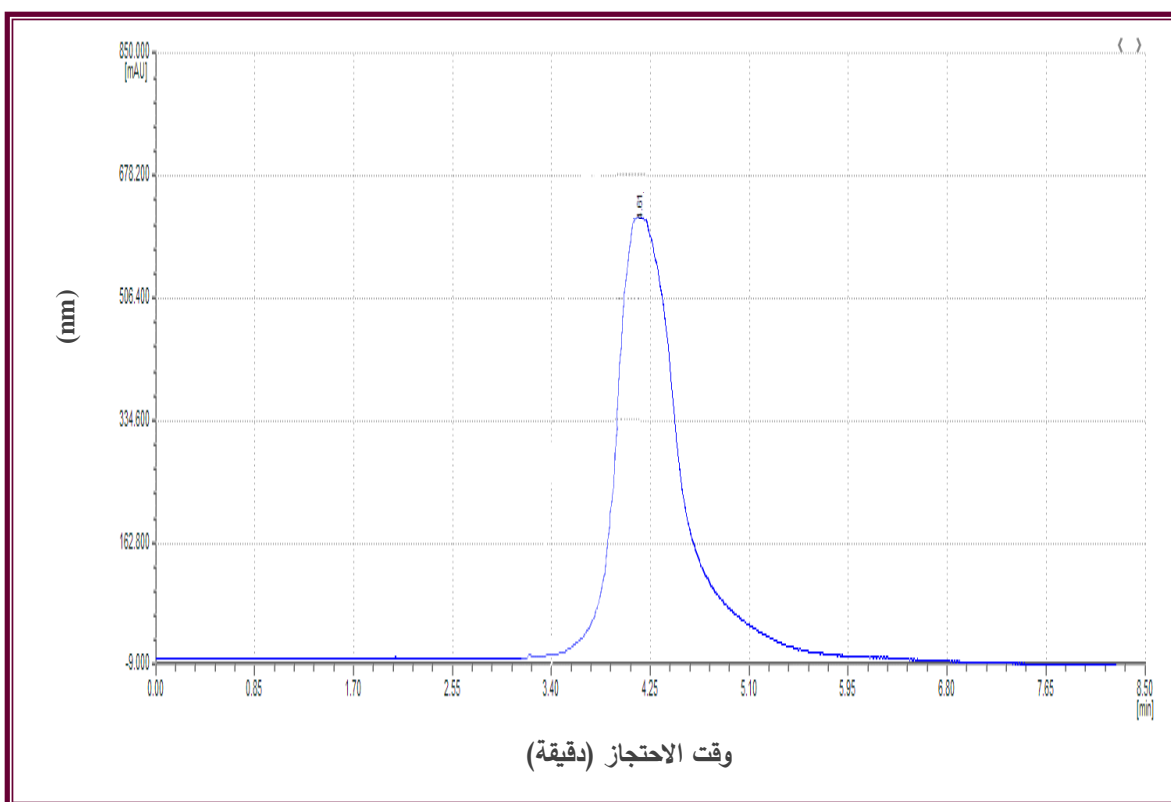
شكل (4-20) كروماتوگرام فيتامين D_2 القياسي لمدة الخزن 0 يوم بتركيز 600 وحدة دولية



شكل (21-4) كروماتوگرام فيتامين D_2 المنتج لمدة الخزن 0 يوم بتركيز 600 وحدة دولية



شكل (22-4) كروماتوگرام فيتامين D_2 القياسي لمدة الخزن 7 أيام بتركيز 600 وحدة دولية



شكل (23-4) كروماتوگرام فيتامين D₂ المنتج لمدة الخزن 7 أيام بتركيز 600 وحدة دولية

8-4 التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D₂ القياسي والمنتج من الخميرة

يلاحظ من جدول (3-4) معدلات درجات التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D₂ القياسي والمنتج من الخميرة ومقارنته مع حليب الفرز غير المدعم ، إذ أظهرت نتائج التقييم الحسي عدم وجود فروقات معنوية بين المعاملات الثلاث عند مستوى احتمالية 0.05 ، وجاءت هذه النتائج متطابقة مع ما بينه Gilkinson *et al.*, (2014) عند دراسته للصفات الحسية المتمثلة بالمظهر والطعم والرائحة والتقبل العام للحليب الفرز المدعم بفيتامين D₂ ، كذلك مع Kiani *et al.*, (2017) عند إضافته لفيتامين D بشكل مباشر الى الحليب أو على شكل كبسول إذ لم يلاحظ وجود فروقات معنوية مقارنة مع الحليب غير المدعم ، فضلاً عن عدم وجود فروق معنوية في الصفات الحسية للحليب المدعم وغير المدعم بالفيتامين .

جدول (3-4) معدلات درجات التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D₂
القياسي والمنتج من الخميرة

الصفة					المعاملة
القبول العام	القوام	الرائحة	الطعم	اللون	
8.47	8.8	8.0	8.5	8.6	حليب غير مدعم
8.50	8.6	8.2	8.3	8.90	حليب مدعم بفيتامين D ₂ القياسي
8.45	8.45	8.25	8.4	8.7	حليب مدعم بفيتامين D ₂ المنتج

L.S.D (p<0.05) = 4.741 الرائحة

L.S.D (p<0.05) = 4.401 اللون

L.S.D (p<0.05) = 4.324 القوام

L.S.D (p<0.05) = 4.862 الطعم

L.S.D (p<0.05) = 4.685 التقبل العام

5- الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendation

Conclusions

1-5 الاستنتاجات

1- إمكانية استعمال خمائر الخبز المتوفرة في الاسواق المحلية لمدينة البصرة في إنتاج

الاركوستيرون واتضح من خلال اجراء الفحوصات التشخيصية التأكيدية بأن خميرة الخبز

التجارية تعود الى خميرة *S.cerevisiae* .

2- استعمال نظام تخمرات الحالة السائلة في إنتاج الاركوستيرون من خميرة *S. cerevisiae* والنمناة

على الوسط Yeast Extract Peptone Dextrose كوسط قياسي مقارنة مع الاوساط الأخرى .

3- إنتاج الاركوستيرون باستعمال اوساط محلية رخيصة ومتوفرة كمصادر كربونية

بديلة عن الكلوكوز في الوسط القياسي والتي كان أفضلها عصير التمر بنسبة استبدال 75%.

4- تطابق الاركوستيرون المنتج من الخميرة مع الاركوستيرون القياسي من خلال استعمال تقنية

FT-IR و HPLC .

5- إمكانية استعمال الاركوستيرون بعد تحويله لفيتامين D_2 عن طريق تعريضه الى الأشعة فوق

البنفسجية في تدعيم حليب الفرز مع الاحتفاظ بثباتيته عند الخزن ولمدة 7 أيام ، كما أظهرت نتائج

التقييم الحسي عدم وجود فروق معنوية بين الحليب المدعم وغير المدعم .

Recommendation

2-5 التوصيات

- 1- استعمال أنواع أخرى من الاحياء المجهرية لها القدرة على إنتاج الاركوستيروول بكميات أكبر .
- 2- دراسة إمكانية استعمال مخلفات صناعية وزراعية أخرى في إنتاج الاركوستيروول مثل عصائر الفواكه التالفة أو ثقل التمر أو غيرها من أجل خفض كلفة الإنتاج .
- 3- إمكانية استعمال فيتامين D_2 المنتج في تدعيم منتجات الأغذية المختلفة مثل اليوكرت والجبن والخبز من أجل تعويض النقص وتحسين قيمتها الغذائية .
- 4- تأثير دراسة العوامل الأخرى على ثباتية فيتامين D_2 مثل الحرارة والرقم الهيدروجيني ووجود العناصر المعدنية وغيرهات من العوامل الأخرى .

Reference

6- المصادر

1-6 المصادر العربية

- احمد، محمد علي ; النواوي، محمد عبد الرزاق (1999). الفطريات الصناعية. الطبعة الأولى. الدار العربية للنشر والتوزيع. 624 صفحة.
- الخفاجي، زهرة محمود (1990). التقنية الحيوية. مطبعة جامعة بغداد . العراق ، 886 صفحة.
- العبيدي، زهير سلمان ; نوزاد عبد الله محمد ; نجاة علي حسون .(1986). إنتاج خميرة الخبز على نطاق شبه صناعي باستعمال عصير التمر ومقارنته بالمولاس. مجلة البحوث الزراعية والموارد المائية. (175) : 147-162 .
- الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبد العزيز محمد .(2000) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية، الطبعة الثانية ، دار الكتب للطباعة والنشر، كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل ، 488 ص .
- دلالي، باسل كامل والحكيم، صادق حسن (1987). تحليل أغذية. الطبعة 87. العراق. جامعة الموصل ، 563 ص.

- **Abd-Elsalam, I. S.; Adham, N. Z.; Shetiaia, Y. M. and Hassan, H. (2017).** Fermentative production of Ergosterol using *Saccharomyces boulardii* ATCC 236. *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)*, 13(2): 361-366.
- **Aguilera, F.; Peinado, R. A.; Millan, C.; Ortega, J. M. and Mauricio, J. C. (2006).** Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, 110(1): 34-42.
- **Alexiou, K. (2016).** The dietary importance of vitamin D in lifespan of adulthood. *MOJ Food Process Technol.*, 2(1): 8-11.
- **Alfadul, S. M., and Hassan, B. H. (2016).** Chemical composition of natural juices combining lemon and dates. *International Journal of Food Engineering*, 2(1): 9-15.
- **Al-Jasass, F. M.; Al-Eid, S. M., and Ali, S. H. (2010).** A comparative study on date syrup (dips) as substrate for the production of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *In IV International Date Palm Conference*, 882: 699-704.
- **Alshammari, E.; Khan, S., and Adnan, M. (2018).** Fermentation Conditions Optimization for Maximum *Saccharomyces* Biomass Generation from a Date Syrup Based Medium. *journal of Advances in BioResearch*, 9(4): 12-18.

- **Amiri, M. M.; Fazeli, M. R.; Babaei, T.; Amini, M.; Roodbari, N. H.; Mousavi, S. B., and Samadi, N. (2019).** Production of vitamin D₃ enriched biomass of *Saccharomyces cerevisiae* as a potential food supplement: evaluation and optimization of culture conditions using Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Iranian journal of Pharmaceutical Research*, 18(2): 974-987.
- **Andrietta, M. G.; Steckelberg, C.; Kitaka, P. R.; Goldebeck, R. and Andrietta, S. R. (2017).** Yeast from ethanol production–source of SCP (single cell protein). *World Journal of Research and Review*, 4: 87-89.
- **Anonymous. (2010)** Vitek2 Systems product Information. Durham, North Carolina 27704-0969 / U.S.A., 2-22.
- **Arevalo-Villena, M.; Briones-Perez, A.; Corbo, M. R.; Sinigaglia, M., and Bevilacqua, A. (2017).** Biotechnological application of yeasts in food science: starter cultures, probiotics and enzyme production. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6): 1360-1372.
- **Arthington-Skaggs, B. A.; Jradi, H.; Desai, T., and Morrison, C. J. (1999).** Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10): 3332-3337.
- **Arthington-Skaggs, B. A.; Warnock, D. W., and Morrison, C. J. (2000).** Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(8): 2081-2085.

- **Ashish, C.; Manish, K. G., and Priyanka, C. (2014).** GC-MS technique and its analytical applications in science and technology. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, 5: 6-10.
- **Bajpai, P. (2017).** Microorganisms used for single-cell protein production. *In Single cell protein production from lignocellulosic biomass* (pp. 21-30). Springer, Singapore.
- **Balachandar, R.; Pullakhandam, R.; Kulkarni, B., and Sachdev, H. S. (2021).** Relative Efficacy of Vitamin D₂ and Vitamin D₃ in Improving Vitamin D Status: Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 13(10): 2-26.
- **Barnett, J. A.; Payne, R. W. and Yarrow, D. (1983).** Yeasts: characteristics and identification, 2nd (ed.) Cambridge University. *Press*: 811 p.
- **Barreira, J. C.; Oliveira, M. B. P., and Ferreira, I. C. (2014).** Development of a novel methodology for the analysis of ergosterol in mushrooms. *Food Analytical Methods*, 7(1): 217-223.
- **Bassatne, A.; Basbous, M.; Chakhtoura, M.; El Zein, O.; Rahme, M. and Fuleihan, G. E. H. (2021).** The link between COVID-19 and Vitamin D (VIVID): a systematic review and meta-analysis. *Metabolism*, 119(15): 47-53.
- **Bauernfeind, J. C., and Allen, L. E. (1963).** Vitamin A and D enrichment of nonfat dry milk. *Journal of Dairy Science*, 46: 245-254.
- **Bhosle, S. R.; Sandhya, G.; Sonawane, H. B., and Vaidya, J. G. (2011).** Ergosterol content of several wood decaying fungi using a modified

method. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, 2(7): 916-918 .

- **Biancuzzo, R. M.; Young, A.; Bibuld, D.; Cai, M. H.; Winter, M. R.; Klein, E. K.; Ameri, A.; Reitz, R.; Salameh, W.; Chen, T.C. and Holick, M. F. (2010).** Fortification of orange juice with vitamin D₂ or vitamin D₃ is as effective as an oral supplement in maintaining vitamin D status in adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(6): 1621-1626.
- **Bлага, A. C.; Ciobanu, C.; Cașcaval, D. and Galaction, A. I. (2018).** Enhancement of ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch fermentation processes using n-dodecane as oxygen-vector. *Biochemical Engineering Journal*, 131: 70-76.
- **Blosser, S. J. (2013).** SrbA-regulation of ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Gateway to azole resistance and hypoxia adaptation. (Doctor of Philosophy, Montana State University).
- **Bokhari, F. F., and Albaik, M. (2019).** Vitamin D and its deficiency in Saudi Arabia. In Vitamin D Deficiency. *IntechOpen*, 8(8): 7-45 .
- **Cai, L. (2014).** Thin layer chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 8(1): 3-6.
- **Cardwell, G.; Bornman, J. F.; James, A. P. and Black, L. J. (2018).** A review of mushrooms as a potential source of dietary vitamin D. *Nutrients*, 10(10): 14-98.
- **Cheung, T.; Ko, J.; Lee, J. and Manpreet, T. (2014).** The effect of temperature on the growth rate of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Expedition*, 4: 1-10 .

- **Chinchón-Payá, S., Andrade, C., and Chinchón, S. (2016).** Indicator of carbonation front in concrete as substitute to phenolphthalein. *Cement and Concrete Research*, 82: 87-91.
- **Choudhary, V., and Schneider, R. (2012).** Pathogen-Related Yeast (PRY) proteins and members of the CAP superfamily are secreted sterol-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42): 16882-16887.
- **Clark, S.; Costello, M.; Drake, M. and F. Bodyfelt. (2009).** The sensory evaluation of dairy products, second edition. Springer.
- **Costan, R.; Zbranca, E.; Gotca, I.; Călătoru, D.; Costan, V., and Mocanu, V. (2008).** Compliance with bread fortified with vitamin D and calcium in elderly. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*, 112(4): 951-954.
- **Cowbrough, K. (2015).** The importance of vitamin D. *British Journal of Midwifery*, 23(Sup7): 3-4.
- **Damini, D.; Jayasmita, D.; Sukriti, P.; Selvarajan, E.; Suganthi, V. and Mohanasrinivasan, V. (2013).** Fermentative production of ergosterol using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(2): 1214-1221.
- **Dini, C., and Bianchi, A. (2012).** The potential role of vitamin D for prevention and treatment of tuberculosis and infectious diseases. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 48: 319-327.
- **Dominguez, L. J.; Farruggia, M.; Veronese, N., and Barbagallo, M. (2021).** Vitamin D sources, metabolism, and deficiency: Available Compounds and Guidelines for its Treatment. *Metabolites*, 11(4): 2-33.

- **Dulaney, E. L.; Stapley, E. O., and Simpf, K. (1954).** Studies on ergosterol production by yeasts. *Applied Microbiology*, 2(6): 371-379.
- **Dumbrepatil, A.; Adsul, M.; Chaudhari, S.; Khire, J., and Gokhale, D. (2008).** Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1): 333-335.
- **Economos, C. D.; Moore, C. E.; Hyatt, R. R.; Kuder, J.; Chen, T.; Meydani, S. N.; Meydani, M.; Klein, E.; Biancuzzo, R.M and Holick, M. F. (2014).** Multinutrient-fortified juices improve vitamin D and vitamin E status in children: a randomized controlled trial. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114(5): 709-717.
- **EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2014).** Scientific Opinion on the safety of vitamin D-enriched UV-treated baker's yeast. *EFSA Journal*, 12(1): 3520.
- **Elghandour, M. M. Y., Tan, Z. L., Abu Hafsa, S. H., Adegbeye, M. J., Greiner, R., Ugbogu, E. A., Monroy, J.C. and Salem, A. Z. M. (2019).** *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 128(3):+ 658-674.
- **El-Ghwas, D.E; Elkhateeb, WA; Akram, M. and Daba, G.M. (2021).** Yeast as Biotechnological Tool in Food Industry. *Journal of Pharmaceutical Research*. 5(2): 1-7.
- **Endo, A.; Nakamura, T. and Shima, J. (2009).** Involvement of ergosterol in tolerance to vanillin, a potential inhibitor of bioethanol

fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology letters*, 299(1): 95-99.

- **Fai, P. B., and Grant, A. (2009).** A comparative study of *Saccharomyces cerevisiae* sensitivity against eight yeast species sensitivities to a range of toxicants. *Chemosphere*, 75(3): 289-296.
- **Fraser, D. R. (2021).** Vitamin D toxicity related to its physiological and unphysiological supply. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 32(11): 929-940.
- **Gabsi, K.; Trigui, M.; Barrington, S.; Helal, A.N. and Taherian, A.R. (2013).** Evaluation of rheological properties of date syrup. *Journal of Food Engineering* 117: 165–172.
- **Galaction, A. I.; Blaga, A. C.; Tucaliuc, A.; Kloetzer, L., and Cașcaval, D. (2021).** Modelling of ergosterol production by *S. cerevisiae* in presence of n-dodecane as oxygen-vector. *Romanian Biotechnological Letters*, 26(2): 2464-2470.
- **Gallotti, F., and Lavelli, V. (2020).** The Effect of UV Irradiation on Vitamin D₂ Content and Antioxidant and Antiglycation Activities of Mushrooms. *Foods*, 9(8):10-87.
- **Ghanem, K. M.; Ghanem, N. B., and El-Refai, A. H. (1990).** Ergosterol production under optimized conditions by *Penicillium crustosum* Thom. *Journal of Islamic Academia Sci*, 3(1): 30-34.
- **Gilkinson, A.; Mulhern, M. S.; Burns, A. A.; Weir, R. R.; and Pourshahidi, L. K. (2014).** Investigation of the sensory characteristics and acceptability of vitamin D₃ fortified semi-skimmed milk. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73(OCE2), E96 .

- **Gomez-Lopez, A.; Buitrago, M. J.; Rodriguez-Tudela, J. L., and Cuenca-Estrella, M. (2011).** *In vitro* antifungal susceptibility pattern and ergosterol content in clinical yeast strains. *Revista iberoamericana de micologia*, 28(2): 100-103.
- **Gutarowska, B.; Skóra, J., and Pielech-Przybylska, K. (2015).** Evaluation of ergosterol content in the air of various environments. *Aerobiologia*, 31(1), 33-44.
- **Harley, J. P. and Prescott, L. M. (2002).** Laboratory exercises in microbiology, 5th (ed.) the McGraw-Hill Companies, U.S.A. 449 p.
- **Hassan, H. M. (2011).** Antioxidant and immunostimulating activities of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) autolysates. *World Appl. Sci. J.* 15(8): 1110-1119.
- **Hayakawa, H.; Sobue, F.; Motoyama, K.; Yoshimura, T., and Hemmi, H. (2017).** Identification of enzymes involved in the mevalonate pathway of *Flavobacterium johnsoniae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 487(3): 702-708.
- **He, X.; Guo, X.; Liu, N. and Zhang, B. (2007).** Ergosterol production from molasses by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(1): 55-60.
- **He, X.; Huai, W.; Tie, C.; Liu, Y. and Zhang, B. (2000).** Breeding of high ergosterol-producing yeast strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(1): 39-44.
- **He, X.P.; Zhang B.R. and Tan H.R. (2003).** Overexpression of a sterol C-24(28) reductase increases ergosterol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.*, 25:773–778.

- **Hirsch, A. L. (2011).** Industrial aspects of vitamin D. In Vitamin D (pp. 73-93). *Academic Press*.
- **Holloway, M. J. (2011).** Biochemical and Pharmacological Characterization of Cytochrome B5 Reductase as a Potential Novel Therapeutic Target in *Candida albicans*. (Graduate Theses and Dissertations, University of South Florida) .
- **Hu, Z.; He, B.; Ma, L.; Sun, Y.; Niu, Y. and Zeng, B. (2017).** Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Microbiology*, 57(3): 270-277.
- **Jach, M. E.; Serefko, A.; Sajnaga, E.; Kozak, E.; Poleszak, E. and Malm, A. (2015).** Dietary Supplements Based on The Yeast Biomass. *Current topics in Nutraceutical Research*, 13(2): 83-88.
- **Janakakumara, J. V. (2005).** Conversion of ergosterol in edible mushrooms to vitamin D₂ by UV irradiation (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis, National University, Singapore).
- **Jasinghe, V. J. and Perera, C. O. (2006).** Ultraviolet irradiation: the generator of vitamin D₂ in edible mushrooms. *Food chemistry*, 95(4): 638-643.
- **Jasinghe, V. J.; Perera, C. O. and Sablani, S. S. (2007).** Kinetics of the conversion of ergosterol in edible mushrooms. *Journal of Food Engineering*, 79(3): 864-869.
- **Jiang, Q.; Zhang, M., and Mujumdar, A. S. (2020).** UV induced conversion during drying of ergosterol to vitamin D in various mushrooms:

Effect of different drying conditions. *Trends in Food Science and Technology*, 105: 200-210.

- **Jordá, T., and Puig, S. (2020).** Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 11(7): 2-18.
- **Kadakal, Ç. and Tepe, T. K. (2019).** Is ergosterol a new microbiological quality parameter in foods or not? *Food Reviews International*, 35(2): 155-165.
- **Kalaras, M. D. (2012).** Production of Ergocalciferol (vitamin D₂) and Related Sterols in Mushrooms with Exposure to Pulsed Ultraviolet Light (Doctor of Philosophy, The Pennsylvania State University).
- **Kamal, M. I.; Zaied, K. A., and Hadi, A. E. (2020).** Correlation between Ph with Saccharification and Ethanol Fermentation of Sugarcane Juice Industrial Wastes by Genotypic Hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* as pH Determining Factor. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 11(7): 209-218.
- **Kara Ali, M.; Outili, N.; Ait Kaki, A.; Cherfia, R.; Benhassine, S., Benaissa, A., and Kacem Chaouche, N. (2017).** Optimization of baker's yeast production on date extract using Response Surface Methodology (RSM). *Foods*, 6(8): 2-17.
- **Karimy, M. F.; Damayanti, E.; Suryani, A. E.; Prasetyo, E.; Nurhayati, R.; Anwar, M., and Anggraeni, A. S. (2020).** A simple method for analysis of *Saccharomyces cerevisiae* morphology by applying a high vacuum mode of the scanning electron microscopy and without chemical fixatives. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 462: 12-48.

- **Kaushik, R., and Arora, S. (2017).** Effect of calcium and vitamin D₂ fortification on physical, microbial, rheological and sensory characteristics of yoghurt. *International Food Research Journal*, 24(4) : 1744-1752.
- **Kaushik, R.; Sachdeva, B., and Arora, S. (2014).** Vitamin D₂ stability in milk during processing, packaging and storage. *LWT-Food science and technology*, 56(2): 421-426.
- **Kazmi, S. A.; Vieth, R., and Rousseau, D. (2007).** Vitamin D₃ fortification and quantification in processed dairy products. *International Dairy Journal*, 17(7): 753-759.
- **Kiani, A.; Fathi, M., and Ghasemi, S. M. (2017).** Production of novel vitamin D₃ loaded lipid nanocapsules for milk fortification. *International Journal of Food Properties*, 20(11): 2466-2476.
- **Klug, L., and Daum, G. (2014).** Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS yeast research*, 14(3): 369-388.
- **Kodedová, M., and Sychrová, H. (2015).** Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 10(9): 39-306.
- **Kreger-van Rij. N. J. W. (1984).** The yeast: a taxonomic study. 3rd (ed.), Elsevier Sci., Publishers B. V. -Amsterdam. 1088 p.
- **Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (1998).** The Yeasts, a Taxonomic Study,” 4th (ed.) Elsevier, Amsterdam, 77-102.

- **Kurtzman, C. P.; Fell, J. W. and Boekhout, T. (2011).** Definition, classification and nomenclature of the yeasts. The yeasts -a taxonomic study. 5th (ed.) Elsevier Sci. Plub. B.V., Amsterdm, The Netherlands.
- **Lamacka, M., and Sajbidor, J. (1997).** Ergosterol determination in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison of different methods. *Biotechnology techniques*, 11(10): 723-725.
- **Lavová, B.; Hároniková, A.; Márová, I. and Urminská, D. (2013).** Production of ergosterol by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Microbiology, *Biotechnology and Food Sciences*, 2021: 1934-1940.
- **Ledesma-Amaro,R.; Jimenez, M.A. and Revuelta, J.L.(2013).** 21 - Microbial production of vitamins.In: Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals. McNeil,B.; Archer,D.; Giavasis, L. and Harvey,L.Woodhead Publishing Series in Food Science, *Technology and Nutrition*,571-594.
- **Lee, N. K., and Aan, B. Y. (2016).** Optimization of ergosterol to vitamin D₂ synthesis in *Agaricus bisporus* powder using ultraviolet-B radiation. *Food science and biotechnology*, 25(6): 1627-1631.
- **Leveille, C. L.; Cornell, C. E.; Merz, A. J., and Keller, S. L. (2022).** Yeast cells actively tune their membranes to phase separate at temperatures that scale with growth temperatures that scale with growth temperatures. *PNAS*, 199(4):1-7.
- **Li, T. L., and Min, D. B. (1998).** Stability and photochemistry of vitamin D₂ in model system. *Journal of Food Science*, 63(3): 413-417.
- **Li, Y.; Wadsö, L. and Larsson, L. (2009).** Impact of temperature on growth and metabolic efficiency of *Penicillium roqueforti* – correlations

between produced heat, ergosterol content and biomass. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5): 1494-1501.

- **Liang, M. H., and Jiang, J. G. (2013).** Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in lipid research*, 52(4): 395-408.
- **Liu, J. F.; Xia, J. J.; Nie, K. L.; Wang, F., and Deng, L. (2019).** Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(7): 1-8.
- **Lodder, J. (1970).** The Yeast, A taxonomic study, 2nd (ed.) North-Holland publishing. Co., Amsterdam-London: 1385 p.
- **Maal, K. B., and Shafiee, R. (2009).** Isolation and identification of an *Acetobacter* strain from Iranian white-red cherry with high acetic acid productivity as a potential strain for cherry vinegar production in food and agriculture biotechnology. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 54: 201-204.
- **Manea, M.; Gheevarghese, R. and Chiosa, V. (2007).** Molecular Interaction of A Cholinesterase Activator With Ergosterol Studied By High Resolution FT-IR Spectrometry, *Ars Docendi Publishing House*, 33-37.
- **Marcinowska-Suchowierska, E.; Kupisz-Urbańska, M.; Łukaszewicz, J.; Płudowski, P. and Jones, G. (2018).** Vitamin D toxicity—a clinical perspective. *Frontiers in endocrinology*, 550(9): 2-7.
- **Mau, J. L.; Chen, P. R., and Yang, J. H. (1998).** Ultraviolet irradiation increased vitamin D₂ content in edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12): 5269-5272.

- **Maurya, V. K.; Bashir, K., and Aggarwal, M. (2020).** Vitamin D microencapsulation and fortification: Trends and technologies. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 196:105-489.
- **Mawer, E. B., and Davies, M. (2001).** Vitamin D nutrition and bone disease in adults. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2(2): 153-164.
- **Miziorko, H. M. (2011).** Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 505(2): 131-143.
- **Mokhtari, S.; Khomeiri, M.; Jafari, S. M.; Maghsoudlou, Y. and Ghorbani, M. (2017).** Descriptive analysis of bacterial profile, physicochemical and sensory characteristics of grape juice containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall-coated probiotic microcapsules during storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(4): 1042-1048.
- **Montañés, F. M.; Pascual Ahuir, A. and Proft, M. (2011).** Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Molecular microbiology*, 79(4): 1008-1023.
- **Montes de Oca, R.; Salem, A. Z. M.; Kholif, A. E.; Monroy, H.; Pérez, L. S.; Zamora, J. L. and Puniya, A. K. (2016).** Yeast: description and structure. *Yeast Additives and Animal Production*, 4-13.
- **Morales, D.; Gil-Ramirez, A.; Smiderle, F. R.; Piris, A. J.; Ruiz-Rodriguez, A., and Soler-Rivas, C. (2017).** Vitamin D-enriched extracts obtained from shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) by supercritical

fluid extraction and UV-irradiation. *Innovative food science and emerging technologies*, 41: 330-336.

- **Moslehi-Jenabian, S.; Lindegaard, L. and Jespersen, L. (2010).** Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2(4): 449-473.
- **Moulas,A. and Vaiou,M.(2018).**Vitamin D fortification of foods and prospective health outcomes. *Journal of Biotechnology*, 285: 91-101.
- **Náhlík, J.; Hrnčířík, P.; Mareš, J.; Rychtera, M., and Kent, C. A. (2017).** Towards the design of an optimal strategy for the production of ergosterol from *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *Biotechnology Progress*, 33(3): 838-848.
- **Nair, R., and Maseeh, A. (2012).** Vitamin D: The “sunshine” vitamin. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 3(2): 118.
- **Ng, H. E.; Raj, S. S. A.; Wong, S. H.; Tey, D. and Tan, H. M. (2008).** Estimation of fungal growth using the ergosterol assay: a rapid tool in assessing the microbiological status of grains and feeds. *Letters in Applied Microbiology*, 46(1): 113-118.
- **Nowak, R.; Drozd, M.; Mendyk, E.; Lemieszek, M.; Krakowiak, O.; Kisiel, W.; Rzeski, W., and Szewczyk, K. (2016).** A new method for the isolation of ergosterol and peroxyergosterol as active compounds of *hygrophoropsis aurantiaca* and *in vitro* antiproliferative activity of isolated ergosterol peroxide. *Molecules*, 21(7): 2-10.
- **O’Mahony, L.; Stepien, M.; Gibney, M. J.; Nugent, A. P., and Brennan, L. (2011).** The potential role of vitamin D enhanced foods in improving vitamin D status. *Nutrients*, 3(12): 1023-1041.

- **Oberson, J. M.; Bénet, S.; Redeuil, K., and Campos-Giménez, E. (2020).** Quantitative analysis of vitamin D and its main metabolites in human milk by supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(2): 365-375.
- **Papoutsis, K.; Grasso, S.; Menon, A.; Brunton, N. P.; Lyng, J. G.; Jacquier, J. C., and Bhuyan, D. J. (2020).** Recovery of ergosterol and vitamin D₂ from mushroom waste-Potential valorization by food and pharmaceutical industries. *Trends in Food Science and Technology*, 99: 351-366.
- **Pastinen, O.; Nyssölä, A.; Pihlajaniemi, V., and Sipponen, M. H. (2017).** Fractionation process for the protective isolation of ergosterol and trehalose from microbial biomass. *Process Biochemistry*, 58: 217-223.
- **Patring, J. D.; Jastrebova, J. A.; Hjortmo, S. B. And lid, T. A., and Jägerstad, I. M. (2005).** Development of a simplified method for the determination of folates in baker's yeast by HPLC with ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7): 2406-2411.
- **Perricone, M.; Gallo, M.; Corbo, M. R.; Sinigaglia, M., and Bevilacqua, A. (2017).** Yeasts. In the Microbiological Quality of Food (pp. 121-131). *Woodhead Publishing*.
- **Pitt, J. I., and Hocking, A. D. (2009).** The ecology of fungal food spoilage. Springer, Boston, MA.
- **Pludowski, P.; Holick, M. F.; Grant, W. B.; Konstantynowicz, J.; Mascarenhas, M. R.; Haq, A.; Povoroznyuk, V.; Balatska, N.; Barbosa, A.P.; Karonova, T. and Wimalawansa, S. J. (2018).** Vitamin

D supplementation guidelines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 175: 125-135.

- **Probst, K. V.; Schulte, L. R.; Durrett, T. P.; Rezac, M. E. and Vadlani, P. V. (2016).** Oleaginous yeast: a value-added platform for renewable oils. *Critical reviews in biotechnology*, 36(5): 942-955.
- **Rajarajan, G.; Villi, R. A.; Mohan, B., and Irshad, A. (2020).** Optimization of enrichment levels of vitamin D in Ice cream. *Journal of Food and Animal Sciences*, 1(1): 28-32.
- **Reed, G. (Ed.). (2012).** Yeast technology. Springer Science and Business Media.
- **Ribeiro, B. G.; Guerra, J. M. C., and Sarubbo, L. A. (2020).** Potential food application of a biosurfactant produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8: 434.
- **Riesute, R.; Salomskiene, J.; Moreno, D. S., and Gustiene, S. (2021).** Effect of yeasts on food quality and safety and possibilities of their inhibition. *Trends in Food Science and Technology*, 108: 1-10.
- **Rodrigues, M. L. (2018).** The multifunctional fungal ergosterol. *Molecular and Cell Biology of Lipids*, 9(5): 18-1755.
- **Ruslan, K.; Reza, R. A. and Damayanti, S. (2011).** Effect of ultraviolet radiation on the formation of ergocalciferol (vitamin D₂) in *Pleurotus ostreatus*. *Bionatura*, 13(3): 255-261 .
- **Rychtera, M.; Cermak, J.; Votruba, J.; Nahlik, J.; Melzoch, K.; Kent, C. A., and Escalante, W. D. E. (2010).** Optimization of feeding strategy

for the ergosterol production by yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1): 65-76.

- **Salari, R., and Salari, R. (2017).** Investigation of the best *Saccharomyces cerevisiae* growth condition. *Electronic physician*, 9(1): 3592.
- **Saponaro, F.; Saba, A. and Zucchi, R. (2020).** An update on vitamin D metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18): 65-73.
- **Schagen, S. K.; Zampeli, V. A.; Makrantonaki, E., and Zouboulis, C. C. (2012).** Discovering the link between nutrition and skin aging. *Dermato-endocrinology*, 4(3): 298-307.
- **Shang, F.; Wen, S.; Wang, X. and Tan, T. (2006).** Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 122(3): 285-292.
- **Shetty, P. H., and Jespersen, L. (2006).** *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science and Technology*, 17(2): 48-55.
- **Shobayashi, M.; Mitsueda, S.I.; Ago, M. and Fujii, T. (2005).** Effects of culture condition on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69(12): 2381-2388.
- **Simon, R. R.; Phillips, K. M.; Horst, R. L. and Munro, I. C. (2011).** Vitamin D mushrooms: comparison of the composition of button mushrooms (*Agaricus bisporus*) treated postharvest with UVB light or sunlight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16): 8724-8732.
- **Sławińska, A.; Fornal, E.; Radzki, W.; Skrzypczak, K.; Zalewska-Korona, M.; Michalak-Majewska, M.; Parfieniuk, E. and Stachniuk,**

- A. (2016).** Study on vitamin D₂ stability in dried mushrooms during drying and storage. *Food chemistry*, 199: 203-209.
- **Somai, B. M.; Belewa, V., and Frost, C. (2021).** *Tulbaghia violacea* (Harv) Exerts its Antifungal Activity by Reducing Ergosterol Production in *Aspergillus flavus*. *Current microbiology*, 78(8): 2989-2997.
 - **Szajewska, H.; Skorka, A., and Dylag, M. (2007).** Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhea in children. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 25(3): 257-264.
 - **Tan, T.; Zhang, M. and Gao, H. (2003).** Ergosterol production by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4): 366-370.
 - **Tangpricha, V.; Koutkia, P.; Rieke, S. M.; Chen, T. C.; Perez, A. A., and Holick, M. F. (2003).** Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. *The American journal of Clinical Nutrition*, 77(6): 1478-1483.
 - **Taofiq, O.; Fernandes, Â.; Barros, L.; Barreiro, M. F. and Ferreira, I. C. (2017).** UV-irradiated mushrooms as a source of vitamin D₂: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 70: 82-94.
 - **Tolosa, B. (2015).** Use of bio-enriched yeast and stability of its vitamin D₂ in wheat dough baking, (Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki) .
 - **Tuite, M. F. and Oliver, S. G. (1991).** *Saccharomyces*. In: Biotechnology Handbooks.4. Atkinson, T. and Sherwood, R. F. (Editor) . Springer *Science and Business Media*, New York.

- **Veen, M.; Stahl, U., and Lang, C. (2003).** Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 4(1): 87-95.
- **Verma, B.; Robarts, R. D.; Headley, J. V.; Peru, K. M. and Christofi, N. (2002).** Extraction efficiencies and determination of ergosterol in a variety of environmental matrices. *Communications in soil science and plant analysis*, 33(15-18): 3261-3275.
- **Vidra, A.; Kaleta, Z., and Németh, Á. (2021).** Systematic Investigation of Ergosterol Fermentation by *Kluyveromyces marxianus* Y. 00243 via Statistical Design. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 65(4): 517-524.
- **Villares, A.; García-Lafuente, A.; Guillamón, E., and Ramos, Á. (2012).** Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in Tuber spp. truffles. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2): 177-182.
- **Walker, G. M. (2009).** Yeasts. In Desk encyclopedia of microbiology (pp. 1174-1187). Academic Press/Elsevier.
- **Walker, G. M., and White, N. A. (2017).** Introduction to fungal physiology. *Fungi: biology and applications*, (Ed. 3):1-35 .
- **Ward, D. M.; Chen, O. S.; Li, L.; Kaplan, J.; Bhuiyan, S. A.; Natarajan, S. K. and Cox, J. E. (2018).** Altered sterol metabolism in budding yeast affects mitochondrial iron–sulfur (Fe-S) cluster synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27): 10782-10795.
- **Weete, J. D.; Abril, M. and Blackwell, M. (2010).** Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PloS one*, 5(5): 10-899.

- **Wu, H. F.; Li, Y. L.; Song, G. M. and Xue, D. H. (2012).** Producing ergosterol from corn straw hydrolysates using *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Biotechnology*, 11(50): 11160-11167.
- **Wu, W. J., and Ahn, B. Y. (2014).** Statistical optimization of ultraviolet irradiate conditions for vitamin D₂ synthesis in oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) using response surface methodology. *PLoS One*, 9(4): 53-59.
- **Yazawa, Y.; Yokota, M., and Sugiyama, K. (2000).** Antitumor promoting effect of an active component of Polyporus, ergosterol and related compounds on rat urinary bladder carcinogenesis in a short-term test with concanavalin A. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23(11): 1298-1302.
- **Yiannikouris, A.; Francois, J. E. A. N.; Poughon, L.; Dussap, C. G.; Bertin, G.; Jeminet, G., and Jouany, J. P. (2004).** Adsorption of zearalenone by β -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Food Protection*, 67(6): 1195-1200.
- **Yuan, J. P.; Wang, J. H.; Liu, X.; Kuang, H. C., and Huang, X. N. (2006).** Determination of ergosterol in *Ganoderma* spore lipid from the germinating spores of *Ganoderma lucidum* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17): 6172-6176.
- **Zahedirad, M.; Asadzadeh, S.; Nikooyeh, B.; Neyestani, T. R.; Khorshidian, N.; Yousefi, M. and Mortazavian, A. M. (2019).** Fortification aspects of vitamin D in dairy products: A review study. *International Dairy Journal*, 94: 53-64.

- **Zhang, Y. Q.; Gamarra, S.; Garcia-Effron, G.; Park, S.; Perlin, D. S. and Rao, R. (2010).** Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. *PLoS pathogens*, 6(6): 939-1000 .
- **Zhang, Y.; Wu, W. J.; Song, G. S. and Ahn, B. Y. (2015).** Optimization of Ultraviolet Irradiate Conditions for Vitamin D₂ Synthesis in Shitake Mushrooms (*Lentinula edodes*) by Using Response Surface Methodology. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 58(1): 25-29.
- **Zhao, H.; Lin, Y.; Wang, M. and Zhou, S. (2018).** Optimization of culture conditions for ergosterol production by a marine fungus *Cladosporium cladosporioides* M-40. *Journal of Biotech Research*, 9.
- **Zinser, E. R. W. I.; Paltauf, F. R. I. T. and Daum, G. U. N. T. H. E. R. (1993).** Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *Journal of Bacteriology*, 175(10): 2853-2858.

7-1 ملحق التحليل الاحصائي لغرلبة الخمائر لإختيار الخميرة الأكفأ في انتاج اكبر كمية من الكتلة الحيوية

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	24.708 ^a	6	4.118	19.504	.000
Intercept	714.583	1	714.583	3384.512	.000
biomass.t1	24.708	6	4.118	19.504	.000
Error	2.956	14	.211		
Total	742.247	21			
Corrected Total	27.663	20			

7-2 ملحق التحليل الاحصائي لغرلبة الخمائر لإختيار الخميرة الأكفأ في انتاج الاركوستيرول

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.215 ^a	6	.036	15.533	.000
Intercept	1.658	1	1.658	717.732	.000
treat1	.215	6	.036	15.533	.000
Error	.032	14	.002		
Total	1.905	21			
Corrected Total	.248	20			

3-7 ملحق التحليل الاحصائي لكمية الكتلة الحيوية المنتجة من خميرة *S.cerevisiae* باستعمال اوساط زرعية مختلفة

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.756 ^a	2	1.878	9.105	.015
Intercept	372.490	1	372.490	1805.866	.000
biomass.t2	3.756	2	1.878	9.105	.015
Error	1.238	6	.206		
Total	377.484	9			
Corrected Total	4.994	8			

4-7 ملحق التحليل الاحصائي لكمية الاركوستيروول المنتجة من خميرة *S.cerevisiae* باستعمال اوساط زرعية مختلفة

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.023 ^a	2	.011	7.722	.022
Intercept	1.521	1	1.521	1029.323	.000
treat2	.023	2	.011	7.722	.022
Error	.009	6	.001		
Total	1.553	9			
Corrected Total	.032	8			

5-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الكتلة الحيوية
بعصير التمر وبنسب مختلفة

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.159 ^a	3	.053	.487	.701
Intercept	675.450	1	675.450	6215.322	.000
biomass.t3	.159	3	.053	.487	.701
Error	.869	8	.109		
Total	676.478	12			
Corrected Total	1.028	11			

6-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الاركوستيرول بعصير
التمر وبنسب مختلفة

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.023 ^a	3	.008	2.782	.110
Intercept	2.585	1	2.585	937.308	.000
treat3	.023	3	.008	2.782	.110
Error	.022	8	.003		
Total	2.630	12			
Corrected Total	.045	11			

7-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الكتلة الحيوية
بالمولاس وبنسب مختلفة

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7.854 ^a	3	2.618	9.752	.005
Intercept	494.212	1	494.212	1840.982	.000
biomass.t4	7.854	3	2.618	9.752	.005
Error	2.148	8	.268		
Total	504.213	12			
Corrected Total	10.001	11			

8-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استبدال المصدر الكربوني لوسط إنتاج الاركوستيول
بالمولاس وبنسب مختلفة

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.031 ^a	3	.010	3.953	.053
Intercept	2.852	1	2.852	1076.179	.000
treat4	.031	3	.010	3.953	.053
Error	.021	8	.002		
Total	2.905	12			
Corrected Total	.053	11			

9-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي على إنتاج الكتلة الحيوية من

خميرة *S.cerevisiae*

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	87.892 ^a	8	10.987	39.207	.000
Intercept	1158.630	1	1158.630	4134.736	.000
biomass.t5	87.892	8	10.987	39.207	.000
Error	5.044	18	.280		
Total	1251.566	27			
Corrected Total	92.936	26			

10-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي على إنتاج الاركوستيول من

خميرة *S.cerevisiae*

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.560 ^a	8	.070	29.627	.000
Intercept	6.502	1	6.502	2751.763	.000
treat5	.560	8	.070	29.627	.000
Error	.043	18	.003		
Total	7.105	27			
Corrected Total	.603	26			

11-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير الحضان بدرجات حرارة مختلفة على إنتاجية الكتلة الحيوية
من خميرة *S.cerevisiae*

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	28.699 ^a	4	7.175	17.728	.000
Intercept	716.221	1	716.221	1769.759	.000
biomass.t6	28.699	4	7.175	17.728	.000
Error	4.047	10	.405		
Total	748.967	15			
Corrected Total	32.746	14			

12-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير الحضان بدرجات حرارة مختلفة على إنتاجية الاركوستيروول
من خميرة *S.cerevisiae*

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.440 ^a	4	.110	54.875	.000
Intercept	3.700	1	3.700	1843.937	.000
treat6	.440	4	.110	54.875	.000
Error	.020	10	.002		
Total	4.161	15			
Corrected Total	.461	14			

13-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير مدة الحضان على إنتاجية الكتلة الحيوية من خميرة *S.cerevisiae*

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7.054 ^a	5	1.411	3.609	.032
Intercept	1143.854	1	1143.854	2926.083	.000
biomass.t7	7.054	5	1.411	3.609	.032
Error	4.691	12	.391		
Total	1155.600	18			
Corrected Total	11.745	17			

14-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير مدة الحضان على إنتاج الاركوسـتيرول من خميرة *S.cerevisiae*

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.146 ^a	5	.029	9.297	.001
Intercept	7.119	1	7.119	2268.007	.000
treat7	.146	5	.029	9.297	.001
Error	.038	12	.003		
Total	7.303	18			
Corrected Total	.184	17			

15-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استعمال حجوم لقاح مختلفة على إنتاجية الكتلة الحيوية

من خميرة *S.cerevisiae*

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	33.879a	4	8.470	17.740	.000
Intercept	662.540	1	662.540	1387.692	.000
biomass.t8	33.879	4	8.470	17.740	.000
Error	4.774	10	.477		
Total	701.193	15			
Corrected Total	38.653	14			

16-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير استعمال حجوم لقاح مختلفة على إنتاجية الاركوستيول

من خميرة *S.cerevisiae*

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.606 ^a	4	.151	51.870	.000
Intercept	4.738	1	4.738	1622.486	.000
treat8	.606	4	.151	51.870	.000
Error	.029	10	.003		
Total	5.373	15			
Corrected Total	.635	14			

17-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير سرعة الاهتزاز على إنتاجية الكتلة الحيوية من خميرة *S.cerevisiae*

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	52.460 ^a	4	13.115	32.247	.000
Intercept	713.874	1	713.874	1755.255	.000
biomass.t9	52.460	4	13.115	32.247	.000
Error	4.067	10	.407		
Total	770.401	15			
Corrected Total	56.527	14			

18-7 ملحق التحليل الاحصائي لتأثير سرعة الاهتزاز على إنتاجية الاركوستيروول من خميرة *S.cerevisiae*

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.604 ^a	4	.151	85.515	.000
Intercept	5.424	1	5.424	3070.204	.000
treat9	.604	4	.151	85.515	.000
Error	.018	10	.002		
Total	6.046	15			
Corrected Total	.622	14			

19-7 ملحق التحليل الاحصائي التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D₂ القياسي والمنتج من الخميرة لصفة اللون

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.276 ^a	2	.138	.088	.917
Intercept	641.778	1	641.778	408.487	.000
tt99	.276	2	.138	.088	.917
Error	9.427	6	1.571		
Total	651.480	9			
Corrected Total	9.702	8			

20-7 ملحق التحليل الاحصائي التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D₂ القياسي والمنتج من الخميرة لصفة الطعم

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.027 ^a	2	.013	.007	.993
Intercept	600.250	1	600.250	313.356	.000
tt1010	.027	2	.013	.007	.993
Error	11.493	6	1.916		
Total	611.770	9			
Corrected Total	11.520	8			

21-7 ملحق التحليل الاحصائي التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D₂ القياسي والمنتج من الخميرة لصفة الرائحة

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.167 ^a	2	.084	.110	.898
Intercept	586.447	1	586.447	770.233	.000
tt1111	.167	2	.084	.110	.898
Error	4.568	6	1.825		
Total	591.183	9			
Corrected Total	4.736	8			

22-7 ملحق التحليل الاحصائي التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D₂ القياسي والمنتج من
الخميرة لصفة القوام

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.264 ^a	2	.132	.118	.891
Intercept	620.840	1	620.840	555.286	.000
tt1212	.264	2	.132	.118	.891
Error	6.708	6	1.518		
Total	627.813	9			
Corrected Total	6.972	8			

23-7 ملحق التحليل الاحصائي التقييم الحسي للحليب المدعم بفيتامين D₂ القياسي والمنتج من
الخميرة لصفة القبول العام

ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.087 ^a	2	.043	.056	.946
Intercept	602.212	1	602.212	772.903	.000
tt1313	.087	2	.043	.056	.946
Error	4.675	6	1.779		
Total	606.973	9			
Corrected Total	4.762	8			

Summary

The current study aimed to use the *Saccharomyces cerevisiae* in the production of ergosterol, as well as improve it by studying some parameters affecting its production and usage in skim milk fortification. A screening process was conducted for seven types of bread yeasts available in the local markets of Basrah City to choose the most efficient in the production of ergosterol .

Results showed the superiority of yeast bread with the symbol Y.6 (Lebanese origin) compared with other types at a rate of 0.47%, then a group was conducted on it. Some of the confirmatory diagnostic tests, as well as the diagnosis, were performed utilizing the Vitek2 device, and it was discovered to be connected to *S. cerevisiae* with 97% accuracy.

The optimum conditions for production were studied by the liquid fermentation method. The results showed that the best media that produced great quantity of biomass for production ergosterol was Yeast Extract Peptone Dextrose, which was reached 7.29 g/L and 0.47%. The process of replacing the carbon source was carried out in the standard medium using date juice and molasses with different replacement ratios. It was found that the best carbon source was date juice with a replacement ratio of 75%, while the optimum pH was 5 and the optimum temperature for production was 30 °C, and the best incubation time was 72 hours, and the optimal inoculum volume was 4 ml, and the optimal speed of vibration of production was occurred at 150 rpm, where the percentage of ergosterol was (0.47, 0.55, 0.66, 0.68, 0.74, 0.78, 0.83)% respectively with significant variations at the probability threshold of 0.05.

Ergosterol which produce from has been diagnosis by UV-spectrophotometer using an infrared technique (Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and relying on the active aggregates compared with the standard sample. The infrared spectrum of standard and produced ergosterol is observed by graphs as it is concentrated in the beam (1671.02, 1464.67 and 1054.87) cm^{-1} . This study was found that diagnostic of Ergosterol using high-performance liquid chromatography (HPLC) that the retention time of standard ergosterol was 4.92 minutes, while the resulting ergosterol retention time was 4.61 minutes.

Ergosterol produced by *S.cerevisiae* yeast was converted to vitamin D₂ by using UV radiation. The amount of vitamin D₂ that produced from the conversion was 65.41 Mg/ml, then it was used to fortify the skim milk at a concentration of 600 IU and storage at (0, 7) days.

Extracted vitamin was estimated qualitatively and quantitatively by using the technique of High-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the retention time for both standard and produced vitamin D₂ at 0 and 7 days of storage (4.65, 4.61) minutes, respectively, while the concentration of vitamin D₂ at day 0 of storage was 0.0136 Mg/mL, while its concentration after 7 days of storage was 0.0125 Mg/mL, while the vitamin's stability after a week of storage was 91.911%, The sensory evaluation of the skim milk fortified by produced and standard vitamin D₂ showed, there were no significant differences between milk Fortified and non-fortified in qualities of color, taste, odour, and texture, as well as public acceptance.

**Ergosterol production and characterization
from *Saccharomyces cerevisiae* and Its use in
fortification of skim milk**

A Thesis

submitted to the Council College of Agriculture at the University
of Basra in Partial Fulfillment of the Requirements for Degree of
Master of Sciences in Agriculture

(Food Science)

By

Esraa Sabah Ethafa Al-Canaany

B.Sc. Agriculture Sciences - Food Science

2016

Supervised by

Prof. Dr. Alaa Jabbar Abd Al-Manhel

August / 2022 A. D.

Muharram / 1444 A. H.