جداسازی و شناسائی مخمرهای تولید کننده اتانول از قند دی‌ـ زایلوز

روح‌الله حمیدی‌مطلق[1]، ایرج نحوی[2]،گیتی امتیازی[2] و *غلامرضا قزلباش[3]

[1] تهران، خیابان کارگر جنوبی، میدان پاستور، مؤسسه پاستور ایران

[2] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی

[3] اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: 85/12/22 تاریخ پذیرش: 87/3/6

چکیده

تولید اتانول از قند دی‌ـ زایلوز بعنوان دومین قند فراوان در طبیعت و یکی از ترکیبات اصلی تشکیل دهنده‌ی پیکره گیاهان، از اهمیت انکار ناپذیزی برخوردار است. در این بررسی، محیطهای طبیعی از قبیل خاکهای کشاورزی، کمپوست‌ها، برگ و توده گیاهان در حال فساد برای ارزیابی حضور مخمرهای تولید کننده‌ی اتانول از قند دی‌ـ زایلوز، مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا از نمونه‌های جمع‌آوری شده بمقدار یک گرم بمدت 24 ساعت در محیط کشت مایع حاوی دی‌ـ زایلوز- عصاره مخمر کشت داده شد. سپس 0/1 میلی‌لیتر از این محیط به محیط کشت جامد دی‌ـ زایلوز- عصاره مخمر- آگار تلقیح و مخمرهای مصرف کننده قند دی‌ـ زایلوز به عنوان تنها منبع کربن و انرژی جداسازی شد. در پایان نیز مخمرها جهت بررسی توانایی تولید اتانول در شرایط هوادهی آرام مورد سنجش قرار گرفت. از 61 سویه جدا شده در محیط دی‌ـ زایلوز (20 g/l)، پنج سویه کمتر از1g/l و هفت سویه بیش از 1 g/l اتانول تولید می‌کردند. گونه‌های تولید کننده‌ی بیش از 1 g/l اتانول، *Candida boidinii*، *C. paludigena* 3 ایزوله *Kluyveromyces marxianus* و 2 ایزوله *Aureobasidum pullulans* بودند. *C. boidinii* با تولید 5/08 g/l اتانول بیشترین تولید اتانول را دارا بود. مطالعه بر روی این سویه‌ها نشان داد که هوادهی در شرایط 100 rpm، عصاره مخمر بمقدار 5 g/l، انکوباسیون بمدت 84-60 ساعت و pH=4/5 بیشترین میزان اتانول را تولید می‌کند.

واژه های کلیدی: اتانول، زایلوز، تخمیر، *C.boidinii*

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: 0611-3331045، پست الکترونیک:rghezelbash@scu.ac.ir

مقدمه

بحران جهانی انرژی و این واقعیت که روزی سوختهای فسیلی به اتمام خواهند رسید، تولید اتانول از منابع ارزان قیمت را بعنوان مکمل و یا حتی جایگزینی برای سوختهای فسیلی، ضرورتی استراتژیک و انکار ناپذیر ساخته است (6). توده‌ها و پس‌مانده‌های لیگنوسلولزی و گیاهی، مهمترین، ارزانترین و در دسترس‌ترین منابع برای تولید اتانول با استفاده از تخمیر میکروبی می‌باشند. توده لیگنوسلولزی گیاهان حاوی سلولز، همی‌سلولز و لیگنین می‌باشد. بخش همی‌سلولزی که 35 درصد از وزن خشک گیاهان چوبی و نهاندانگان را شامل می‌شود، غالباً از پلیمر زایلان تشکیل شده که حاوی مونومرهای دی‌ـ زایلوز است. به عبارت دیگر دی‌ـ زایلوز در فرم پلیمر زایلان حدود 25 درصد از وزن خشک گیاهان را تشکیل می‌دهد (7). بنابراین استفاده از میکروارگانیسم‌های تخمیر کننده دی‌ـ زایلوز ضرورت اصلی اقتصادی کردن و بهینه سازی تولید اتانول از توده‌ها و پس مانده‌های گیاهی می‌باشد. برای مثال باگاس دارای 21/8 درصد وزنی و سبوس گندم دارای 29 درصد وزنی پلیمر زایلان دارد.

تعدادی از بـاکتریها، قارچها و مخمرها قادر به تخمیر قند دی‌ـ زایلوز هستند، که از این میان می‌توان مخمرهای *Candida stipitis*، *C. shehatea* و *Pachysolen tannophilus* که از اهمیت بیشتری برخوردارند را نام برد. مخمر *Saccharomyces cerevisiae* به دلیل فقدان سیستمهای فیزیولوژیک لازم قادر به مصرف این قند نیست (17). اما تا کنون مطالعات کمی در باره سایر سویه‌های تخمیرکننده دی‌ـ زایلوز صورت گرفته و هیچ گزارشی از سویه‌های بومی ایران در دسترس نیست. هدف از این مطالعه جداسازی، شناسایی و بررسی خصوصیات کمیّ مخمرهای بومی تخمیر کننده دی‌ـ زایلوز می‌باشد.

مواد و روشها

جداسازی مخمرها: در این بررسی از منابع محیطی مختلفی استفاده شد. خاکهای کشاورزی، خاکهای آمیخته با توده‌های فاسد شده گیاهی و یا در حال فساد، باگاس نیشکر، برگ، ساقه‌ی درختان از شهرهای اصفهان، تهران و اهواز از نمونه‌هایی بودند که در این مطالعه استفاده گردید. لازم به ذکر است که تمام مواد مورد استفاده در این بررسی از شرکت مرک آلمان تهیه شد. یک گرم از هر یک از این نمونه‌های فوق مستقیماً وارد محیط کشت حاوی قند دی‌ـ زایلوز(20 g/l) و عصاره مخمر (5 g/l) در pH=4 شد. برای ممانعت از رشد باکتریها از کلرآمفنیکل (0/005 g/l) استفاده گردید. ارلن‌ها در دمای 25 درجه سانتی گراد و هوادهی 180 rpm قرار گرفت و بعد از 48 ساعت 0/1ml از این محیط رشد، روی محیط کشت جامد حاوی قند دی‌ـ زایلوز (20 g/l) و عصاره مخمر (5 g/l) حاوی آگار (20g/l)، با روش کشت خطی کشت داده شد. پس از 48 ساعت کلنیهای مخمری جداسازی شده و با تهیه کشت اسلنت خالص از آنها در یخچال (4 درجه سانتی گراد) نگهداری شدند (13).

بررسی توانایی تولید اتانول از قند دی‌ـ زایلوز : برای بررسی تولید و یا عدم تولید اتانول، مخمرها در شرایط مناسب تخمیر در محیط حاوی قند دی‌ـ زایلوز (20 g/l) و عصاره مخمر (5 g/l) (pH=4) و در شرایط هوادهی آرام100 rpm کشت داده شدند. سپس در ساعتهای 72 و 96 نمونه برداری صورت گرفت و در صورت تولید اتانول، اتانول تولید شده اندازه‌گیری شد (12 و 13).

اندازه‌گیری توده سلولی : روش کدورت سنجی با طول موج 600 nm روشی بود که برای اندازه‌گیری تراکم رشد و تعیین جرم سلولی استفاده شد (8).

اندازه‌گیری اتانول: اتانول با روش رنگ‌سنجی دی‌کرومات‌پتاسیم بصورت کمیّ مورد سنجش واقع شد (5). بدین ترتیب که ابتدا اتانول در یک بالن 100 ml دارای لوله جانبی طی حرارت تبخیر شد و سپس بخار حاصله از طریق لوله جانبی وارد یک مخزن کاپیلاری حاوی 10 ml محلول دی‌کرومات‌پتاسیم و 2 ml اسید سولفوریک گردید. واکنش انجام شده بین اتانول و معرفهای نامبرده فوق موجب تغییر رنگ اولیه معرفها می‌گردد. بعد از این واکنش، نمونه کاپیلاری به حجم رسانده شد و جذب نوری آن در 588 nm خوانده شد. در پایان بر اساس خط کالیبراسیون میزان اتانول موجود بر حسب g/l گزارش شد.

اندازه‌گیری قند باقیمانده: قند باقیمانده با روش دی‌نیترو سالیسیلیک اسید اندازه‌گیری شد (9).

شناسائی مخمرها : مخمرها با توانائی تولید بیش از 1 g/l اتانول با روشهای استاندارد شناسائی شد (10). در شناسایی مخمرها جدا از خصوصیات مورفولوژیکی از خصوصیات متابولیسمی نیز استفاده شد. در بررسی تخمیر و جذب قندهای مختلف از تستهای بیوشیمیایی استفاده شد. معرف تخمیر تولید CO_2 در لوله دورهام و معرف جذب ایجاد کدورت 1+ تا 4+ در محیط کشتهای اختصاصی بود.

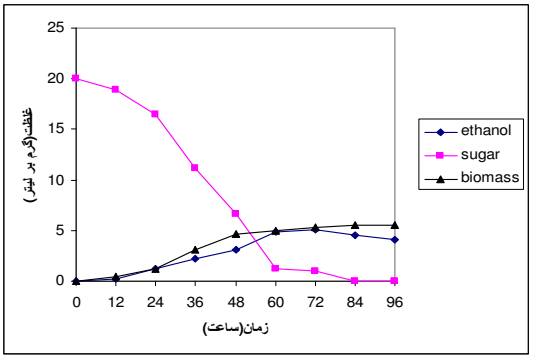
جدول 1- شناسائی مخمرها با استفاده از آزمایشات تخمیر (Fermentation) و جذب (Assimilation)

	نوع قند	*C. boidinii*	*C. paludigena*	*K. marxianous* K1	*K. marxianous* K2	*K. marxianous* K3	*A. pullulans* A1	*A. pullulans* A2
تخمیر	گلوکز	+	+	+	+	+	−	−
	گالاکتوز	−	−	+	+	+	−	−
	سوکروز	−	−	+	+	+	−	−
	مالتوز	−	−	−	−	−	−	−
	لاکتوز	−	−	−	+	−	−	−
	رافینوز	−	−	+	+	+	−	−
	ترهالوز	−	−	−	−	−	−	−
جذب	گلوکز	+	+	+	+	+	+	+
	گالاکتوز	−	+	+	+	+	+	+
	سوکروز	+	+	+	+	+	+	+
	مالتوز	−	+	−	−	−	+	+
	سلوبیوز	−	+	−	−	+	+	+
	ترهاتوز	−	+	−	+	−	+	+
	لاکتوز	−	+	+	+	+	+	+
	ملی‌بیوز	−	−	−	−	−	+	+
	رافینوز	−	+	+	+	+	+	+
	ملی‌زیتوز	−	+	−	−	−	+	+
	دی- زایلوز	+	+	+	+	+	+	+
	ال- آرابینوز	−	+	+	+	+	+	+
	دی- ریبوز	+	−	+	−	+	+	+
	ال- رامنوز	−	−	−	−	−	+	+
	دی- مانیتول	+	+	+	−	+	+	+
	سالیسین	−	+	+	+	−	+	+
	اینوزیتول	−	+	−	−	−	+	+
	کراتی‌نین	−	−	−	−	−	+	+
	سیترات	−	+	−	−	−	+	+

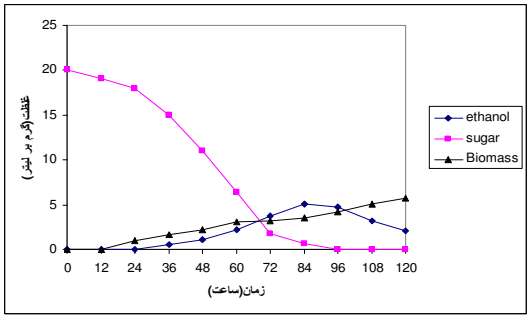
نتایج

جداسازی و تولید الکل: از 61 سویه جدا شده در این مطالعه که توانایی مصرف قند دی- زایلوز را داشتند، تولید اتانول در پنج سویه کمتر از 1 g/l و در هفت سویه بیشتر از 1 g/l بود. در این بررسی تنها سویه‌های تولید کننده‌ی بیش از 1 g/l مورد شناسائی قرار گرفت (جدول 1). بررسیها نشان داد که پس از 72 ساعت *C. boidinii* با

حداکثر تولید 5/08 g/l ، *Aureobasidium pullulans* A2 با تولید 4 g/l ، سویه *Kluyveromyces marxianous* K3 با 3/8 g/l پس از 84 ساعت، بیشترین تولید اتانول را دارند (جدول2). شکل 2،1 و3 روند تولید اتانول، مصرف قند و تولید توده سلولی این سویه‌ها را نشان می‌دهد.

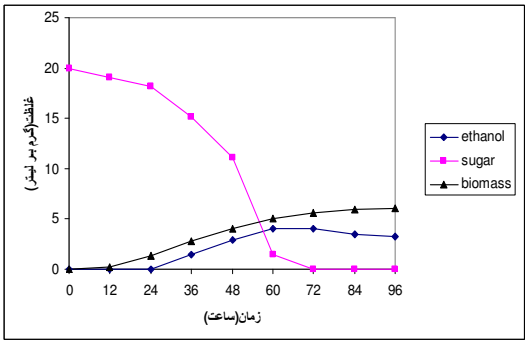


شکل1- روند مصرف قند دی- زایلوز و تولید اتانول را در سویه *C.boidinii* : با شروع رشد و متابولیسم و کاهش قند، توده سلولی افزایش می‌یابد و متعاقب این افزایش تخمیر شروع و تولید اتانول افزایش می‌یابد. ماکزیمم تولید این سویه در 60 ساعت بعد از تخمیر صورت می‌گیرد (غلظت اولیه قند دی_زایلوز 20 گرم بر لیتر، هوادهی 100 rpm ، pH اولیه محیط 4/5 و دما 26 درجه سانتی گراد).

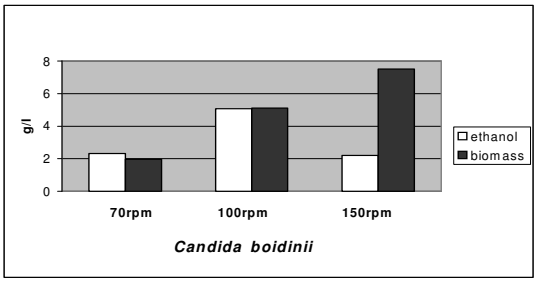


شکل2- روند مصرف قند دی- زایلوز و تولید اتانول در *K.marxianus* : با شروع رشد و متابولیسم و کاهش قند، توده سلولی افزایش می‌یابد و متعاقب این افزایش تخمیر شروع و تولید اتانول آغاز می‌شود. *K.marxianus* بعد از 84 ساعت به ماکزیمم تولید خود می‌رسد (غلظت اولیه قند دی_زایلوز 20 گرم بر لیتر، هوادهی100 rpm، pH اولیه محیط 4/5 و دما 26 درجه سانتی گراد).

اثرهوادهی: میزان هوادهی یکی از مهمترین عوامل تنظیم و کنترل تولید اتانول در مخمرهای مصرف کننده‌ی دی_ زایلوز محسوب می‌شود (3). هوادهی در 100 rpm بیشترین تولید را موجب می‌شود، بطوریکه کاهش میزان هوادهی به 70 rpm و یا افزایش آن به 150 rpm باعث کاهش میزان تولید اتانول می‌گردد. در هوادهی 70 rpm توده سلولی نیز کاهش می یابد که حاکی از کاهش توانایی رشد و کاهش مقدار توده سلولی است، بهمین دلیل اتانول کمتری تولید می‌شود. بعلاوه هوادهی بالا با دور 150 rpm نیز گرچه توده سلولی را افزایش می دهد اما سلولها در حضور اکسیژن بالا بسمت مسیر اکسیداتیو تمایل داشته و در نتیجه توانایی تخمیر کاهش می‌یابد (شکل4).



شکل 3 – روند مصرف قند دی- زایلوز و تولید اتانول در سویه *A. pullulanse*: با شروع رشد و متابولیسم و کاهش قند، توده سلولی افزایش می‌یابد و متعاقب این افزایش تخمیر شروع و تولید اتانول آغاز می‌شود. *A. pullulanse* بعد از 60 ساعت به ماکزیمم تولید اتانول خود می‌رسد (غلظت اولیه قند دی_زایلوز 20 گرم بر لیتر، هوادهی 100 rpm ، pH اولیه محیط 4/5 و دما 26 درجه سانتی گراد).



شکل 4- اثر هوادهی در تولید اتانول و توده سلولی در مخمر *C. boidinii* : با افزایش هوادهی از 70 rpm به 100 rpm توده سلولی و همینطور تولید اتانول افزایش می‌یابد. اما افزایش بیش از حد هوادهی متابولیسم این مخمر را بسمت متابولیسم تنفسی می‌برد و متعاقباً به دلیل این افزایش تنفس تولید اتانول طی فرآیند تخمیر

کاهش و تولید بیومس افزایش می‌یابد (غلظت اولیه قند دی‌ـزایلوز 20 گرم بر لیتر،pH اولیه محیط 4/5 و دما 26 درجه سانتی گراد).

جدول2- ماکسیمم تولید و بازده تولید سویه‌های جدا شده

	max Ethanol(g/l)	$Y_{P/S}$*	Theoritical Yield**	Time of Fermentation(h)
C. boidinii	5/08	0/25	٪50	60
C. paludigena	1/44	0/07	٪14	72
K.marxianous K1	2/4	0/12	٪23	96
K.marxianous K2	4/28	0/21	٪41	84
K.marxianous K3	5/02	0/251	٪49	84
A. pullulans A1	2/95	0/15	٪29	72
A. pullulans A2	4/00	0/20	٪40	72

$Y_{P/S}$=غلظت محصول/(g/l)غلظت قند(g/l):*: از نظر تئوری زمانی که 51 درصد از قند دـ زایلوز مصرفی تبدیل به اتانول شود، بازده تخمیر 100 درصد است (3):.**

بحث

توانایی تولید اتانول از قند دی‌ـ زایلوز در سال 1981 کشف شد. ابتدا تصور بر آن بود که فقط مخمرهای محدودی نظیر *P. stipitis* ، *C. shehatae* و *P. tannophilus* توانائی تخمیر دی‌ـزایلوز را دارند (4 و12). اما مطالعات تایولا در سال 1984 مخمرهای دیگری نظیر *Brettanomyces* را بجمع کلکسیون مخمری اضافه کرد، که حاوی 174 سویه با توانائی مصرف دی‌ـ زایلوز و تخمیر گلوکز بود. اما مطالعاتی که نیگام و همکاران در سال 1985 انجام دادند شامل یک غربالگری(Screaning) وسیع از محیطهای طبیعی بود که گونه‌هایی از جنسهای *Candida*، *Citeromyces*، *Kloeckera* و*Klyveromyces* را به عنوان سویه‌های تخمیرکننده دی‌ـ زایلوز معرفی کرد (2، 9 و 16). اطلاعات کمی درباره توانایی تولید اتانول بوسیله *Candida boidinii* در دست است زیرا این مخمر بیشتر در تولید زایلیتول، یکی از محصولات دیگر متابولیسم دی‌ـ زایلوز مطرح است (14 و15). توانائی تولید اتانول از دی‌ـ زایلوز بوسیله *K. marxianous* تا به امروز بحث‌انگیز بوده است (1، 8 و 11). به طوریکه در مجامع علمی به این توانایی با دیده شک نگریسته می شود. اهمیت مطالعه حاضر در این است که توانایی این گونه را در تخمیر دی‌ـ زایلوز به اثبات می‌رساند. با توجه به توانائی تخمیری این مخمر در دماهای بالا مطالعه تکمیلی در مورد فیزیولوژی تخمیری این گونه ضروری به نظر می‌رسد. *A .pullulans* که یک شبه مخمر محسوب می‌شود نیز توانائی تخمیر دی‌ـ زایلوز را دارد. البته مطالعات دیگر نشان می‌دهد که بعضی از سویه‌های این گونه دارای توانایی تخمیر دی‌ـ زایلوز نیستند. این شبه مخمر دارای توانائی زیادی در رشد و تجزیه ترکیبات فنلی دارد و با توجه تخمیر دی‌ـ زایلوز در حضور ترکیبات مزاحمی نظیر فورفورال در فرآیندهای صنعتی، مطالعات تکمیلی جهت تشخیص تواناییهای تخمیری این شبه مخمر در حضور ترکیبات سمی جذاب به نظر می‌رسد.

منابع

1- Anderson P. J., Mcneil K., and Watson K. 1986. High efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* Isolated from sugar mills. Applied and Environmental microbiology. 51:1314-1320.

2 - Barron N., Molholland H., Boyle M., and Mchale A. P. 1997. Ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on straw-supplemented whiskey distillery spent wash at 45C. Bioprocess Engineering. 17:383-386.

3- Du Preez J. C. 1994. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. Enzyme and Microbial Technology. 16: 944-956.

4 - Grootjen D. R. J., Meijlink L. H. H. M.,Vleesenbeek R., Van der lans R. G. J. M., and Luyben K. Ch. A. M. 1991. Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* in combination with *sacharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology. 13:530-536.

5 - Grootjen D. R. J., Meijlink L. H. H. M., Van der lans R. G. J. M., and Luyben K. Ch. A. M. 1990. Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *sacharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology. 12:860-864.

6 - Jeffries T. W. 2000. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. Advanced in Applied Microbiology. 47:221-267.

7 - Jeffries T. W., and Kurtsman C. P. 1994. Strain selection ,taxonomy and genetic of xylose fermenting yeasts. Enzyme and Microbial Technology. 6:922-932.

8 - Jeffries T. W., and Sreenath H. K. 1988. Fermentation of hemicellulose sugars and sugar mixtures by *Candida shehatea*. Biotechnology and Bioengineering. 31:502-506.

9 - Kotter P., and Ciriacy M. 1993. Xylose fermentation by *sacharomyces cerevisiae* Applied Microbiology and Biotechnology. 38:776-783.

10 - Kurtzman C. P., Fell. J. W., 1999. The Yeasts. A Taxonomic Study. Elsevier publication. Amesterdam.

11 - Laplace J. M., Delgenes J. P., Molleta R., Navarro J. M. 1991. Combined alchoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: process considerations in relation to ethanol tolerance. Biotechnology Letters. 13:445-450.

12- Margaritis A . and Bajpai P. 1982. Direct fermentation of D-Xylose to ethanol by *Kluyveromyces marxianus*. Applied and Environmental Microbiology. 44:1039-1041.

13 - Nigam J.N., Ireland R. S., Margaritis A., and Lachance.1985. Isolation and Screening of yeasts That Ferment D-Xylose Directly to Ethanol. Applied and Environmental Microbiology . 50(6):1486-1489.

14 - Stanbuk B. U., Franden M. A., Singh A., and Zhang M. 2003. D-Xylose transport by *Candida Succiphila* and *Kluyveromyces marxianus.* Applied Biochemistry and Biotechnology. 106:255-263.

15- Taherzadeh M. J., Eklund R. and Gustafsson L. 1997. Chracterizatiom and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. Industrial Engineering Chemistry. 36:4659-4665.

16 - Torget R., and Hsu T. A. 1994. Two Temprature dilute acid prehydrolysis of hardwood xylan using a percolation process. Applied Biochemistry and Biotechnology. 45/46, 5-22

17- Torbjon L., and Barbel H. 1989. Fermentation of lignocellulose Hydrolysates with yeast and xylose isomerase. Enzyme and Microbial Technology. 11:583-589.

Isolation and Identification of Ethanol Producer Yeasts from D-Xylose

Hamidimotlagh R., Nahvi I., Emtiazi G. and Ghezelbash Gh.
Biology Dept., Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R. of IRAN

Abstract

D-xylose, is the second most abundant sugar in nature and it is one of the main constituents of plants. Hence, ethanol production from D-xylose has an ignorable importance in the world future energy trends. In this research, natural environments and materials such as compost and decaying body of plants and agricultural wastes, were investigated for finding xylose fermentating yeasts, which can produce ethanol using D-xylose. First, one gram of different samples were cultured in broth culture media comprising xylose as the only energy source and yeast extract and after 24 hours 0.1 ml of brothes were transferred on solid medium containing the same elements. D-xylose utilizing yeasts were examined for their ability to ferment D-xylose using their culture in mild agitation. From 61 isolates, 5 isolates could utilize D-xylose and produce less than 1 g/l ethanol from 20 g/l D-xylose and 7 isolates could produce more than 1 g/l ethanol from 20 g/l D-xylose. These later isolates were *Candida boidinii*, *Candida paludigena*, three isolates of *Kluyveromyces marxianus* and two isolates of *Auerobasidium polullans*. Among these isolates, *Candida boidinii* with 5.8 g/l ethanol from 20 g/l D-xylose was the best ethanol producer. As a result of this study, 100 rpm agitation, 5 g/l yeast extract, 60-84 hours incubation time and pH=4.5 were the best environmental condition for the maximum production.

Keywords: Ethanol, Xylose, Fermentation, *C. boidinii*