مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره چهارم (پیاپی ۲۱) زمستان ۱۳۹۳
صفحات ۳۳۸-۳۲۹

Original Article

بررسی تولید شیرین کننده زایلیتول توسط *کاندیدا گوئیلیرموندی*

فروغ عسگری کرچگانی*[۱]، غلامرضا قزلباش[۲]، ایرج نحوی[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، [۳] استاد، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

چکیده

سابقه و هدف: زایلیتول یک پلی الکل پنج کربنه با قدرت شیرین کنندگی بالاست. تولید بیوتکنولوژیکی زایلیتول با استفاده از میکروارگانیسم ها به ویژه مخمر ها از نظر زیست محیطی ایمن است و به عنوان جایگزینی برای روش شیمیایی مورد مطالعه قرار می گیرد. این مطالعه با هدف بررسی تولید این شیرین کننده طبیعی از زایلوز، توسط سویه مخمری *کاندیدا گوئیلیرموندی* جداسازی شده از گرده گل آهار انجام شد.

مواد و روش ها: به منظور جداسازی سویه مخمری تولیدکننده زایلیتول از محیط کشت یست پپتون زایلوز (YePX) استفاده گردید. زایلیتول تولید شده توسط مخمر جداسازی شده از گرده گل آهار، با روش های کروماتوگرافی لایه نازک و با استفاده از کیت اختصاصی شناسایی و تایید شد. همچنین به منظور شناسایی مولکولی سویه مخمر از روش PCR استفاده گردید. مقدار زایلیتول نیز با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) اندازه گیری شد.

یافته ها: سویه مخمری تولیدکننده زایلیتول با موفقیت از گرده گل آهار جداسازی شد. با روش مولکولی مشخص گردید که به گونه *کاندیدا گوئیلیرموندی* تعلق دارد. این مخمر توانست پس از گذشت ۷۲ ساعت مقدار ۲٤/٦۷ گرم بر لیتر زایلیتول را از ٤۰ گرم بر لیتر زایلوز تولید نماید.

نتیجه گیری: در این بررسی زایلیتول توسط سویه مخمری *کاندیدا گوئیلیرموندی* جداسازی شده از طبیعت تولید گردید. با توجه به خواص ارزشمند زایلیتول و با در نظر گرفتن معایب روش شیمیایی تولید زایلیتول، می توان از این شیرین کننده طبیعی به عنوان جایگزین قند در صنایع شیمیایی، غذایی و دارویی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: زایلیتول، زایلوز، *کاندیدا گوئیلیرموندی*.

دریافت مقاله: اسفند ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۳

مقدمه

الکل های قندی دسته ای از پلی الکل ها هستند که با احیای آلدوزها و کتوزها تشکیل می شوند و دارای مزیت هایی مانند مقدار کالری پایین، خاصیت آنتی اکسیدانی، کاهش قند خون و قدرت شیرین کنندگی می باشند (۱). زایلیتول (Xylitol) یکی از پلی الکل هایی است که در حال حاضر به طور وسیعی مورد استفاده قرار می گیرد.

D-زایلیتول یک پلی الکل پنج کربنه می باشد که به طور طبیعی خاصیت شیرین‌کنندگی بالایی دارد (۲). این پلی الکل شیرینی مشابه سوکروز، اما مقدار انرژی کمتری نسبت به سوکروز دارد و برخلاف آن اسید تولید نمی کند. با توجه به مقدار کالری کم، به عنوان جایگزین قند و یک عامل مؤثر برای جلوگیری از پوسیدگی دندان در آدامس، خمیر دندان، دهان شویه و صنایع غذایی استفاده می شود (۳ و ٤). از آنجایی که متابولیسم زایلیتول وابسته به انسولین نمی باشد، در شرایط

* آدرس برای مکاتبه: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۳۸۹۹٤۳۳۵ پست الکترونیک: fo.askary63@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

کمبود انسولین یک جایگزین قند مناسب برای افراد دیابتی است (۵). به دلیل خاصیت ضدمیکروبی بودن زایلیتول می توان از آن در پیشگیری و درمان بیماری های اوتیت (Otitis)، درماتیت حساسیتی(Atopic dermatitis)، فیبروز سیستیک (Cystic fibrosis)، دور دهانی (Periodontitis)، پوکی استخوان و کم خونی همولیتیک ناشی از کمبود گلوکز ٦-فسفات دهیدروژناز استفاده نمود (٦).

D-زایلیتول به طور صنعتی با احیای شیمیایی D-زایلوز تولید می گردد. اما تولید بیوتکنولوژیکی D-زایلیتول با استفاده از میکروارگانیسم ها به دلیل اینکه نیاز به کاتالیست سمی ندارد و از نظر زیست محیطی ایمن می باشد و با توجه به معایب روش شیمیایی، از اهمیت به سزایی برخوردار است (۷). در سال های اخیر تبدیل میکروبی زایلوز به زایلیتول بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در میان میکروارگانیسم ها، مخمرها بهترین تولیدکننده می باشند (۸). مخمرها از مدت ها پیش قابل قبول ترین منابع میکروبی در صنایع مختلف و صنایع غذایی بوده اند و به دلیل عدم بیماریزایی (GRAS) به عنوان یک منبع سالم مطرح بوده اند (۹). از جمله زیستگاه های مخمرها می توان به گیاهان اشاره نمود. گیاهان به دلیل داشتن توانایی فتوسنتز و ساخت بسیاری از ترکیبات کربنی متنوع، زیستگاه های مناسبی را برای مخمرهای مختلف مهیا می سازند (۱۰).

بیشتر مخمرهای تولید کننده زایلیتول از زایلوز به عنوان منبع کربن استفاده می کنند. مسیر کاتابولیکی زایلوز به این صورت است که ابتدا D-زایلوز توسط آنزیم زایلوز ردوکتاز به زایلیتول احیا می شود. سپس زایلیتول توسط زایلیتول دهیدروژناز به D-زایلولوز اکسید می شود. سرانجام D-زایلولوز توسط آنزیم زایلوز کیناز به D-زایلولوز ۵ فسفات فسفریله شده و سپس وارد مسیر پنتوز فسفات می شود (۱).

در سال های اخیر مطالعات زیادی در مورد تولید بیوتکنولوژیکی زایلیتول به وسیله سویه های مختلف *کاندیدا* (*Candida*) و سایر مخمرها صورت گرفته است. از این میان می توان به تولید زایلیتول توسط سویه های *کاندیدا گوئیلیرموندی* (*Candida guilliermondii*) (١٤-١١)، *کاندیدا تروپیکالیس* (*C. tropicalis*) (١٧-١٥)، *کاندیدا موجی* (*C. mogii*) (١٨)، *کاندیدا شهاتا* (*C. shehatae*) (١٩)، *کاندیدا آتنسنسیس* (*C. athensensis*) (٢٠)، *دباریومایسز هانسنی* (*Debaryomyces hansenii*) (٢٣-٢١) و *رودوتورولا موسیلاژینوزا* (*Rhodotorola mucilaginosa*) (٢٤) اشاره نمود.

هدف از این مطالعه که برای اولین بار در ایران انجام شده است، بررسی تولید زایلیتول توسط سویه مخمری *کاندیدا گوئیلیرموندی* جداسازی شده از گرده گل آهار بود.

مواد و روش ها

الف) جداسازی سویه مخمری مولد زایلیتول: برای این منظور ابتدا گرده گل آهار به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سیلیسیوس در آب خیسانده شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول یاد شده به ارلن های حاوی محیط جداسازی یست پپتون زایلوز (YePX) (عصاره مخمر ۱۰، پپتون ۲۰، زایلوز ۲۰ (گرم بر لیتر) با pH ۵) (مرک، آلمان) انتقال داده شد و در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری گردید (۲۵). پس از ٤٨ ساعت از محیط مایع بر روی محیط جداسازی جامد کشت داده شد. پس از دو روز کلنی ها در زیر میکروسکوپ مشاهده و بررسی شدند. این مخمر در محیط های اسلنت یست پپتون دکستروز آگار (YPD) (گلوکز ۲۰، پپتون ۲۰، عصاره مخمر ۱۰ و آگار ۲۰ (گرم بر لیتر)) (مرک، آلمان) و در دمای ٤ درجه سیلیسیوس برای آزمایشات بعدی نگهداری شد (٢٦).

ب) تولید زایلیتول توسط سویه مخمری جدا شده: مخمر فعال شده مورد نظر در یک ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط پیش تولید زایلیتول (زایلوز ٤٠، سولفات آمونیوم ۵، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۲، سولفات منیزیم ۰/۵، عصاره مخمر ۵ و پپتون ۱ (گرم بر لیتر) (مرک، آلمان) با pH ۵/۵) کشت داده شد. سپس ارلن در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس در انکوباتور با

Archive of SID

www.SID.ir

۱۸۰ دور در دقیقه گرماگذاری گردید. پس از ٤٨ ساعت از محیط یاد شده به نسبت ۵ درصد به ارلن های حاوی محیط تولید (مشابه محیط پیش تولید) انتقال داده شد. ارلن ها در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس با ۱۸۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. تولید زایلیتول، هر ٢٤ ساعت به مدت ۵ روز بررسی گردید (۷).

ج) شناسایی زایلیتول: در ابتدا زایلیتول تولید شده توسط سویه مخمری *کاندیدا گوئیلیرموندی* با روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) به عنوان یک روش آنالیزی ساده و سریع به صورت کیفی مورد شناسایی قرار گرفت. در این روش ترکیبات بر اساس قطبیت و وزن مولکولی جداسازی می شوند. به این ترتیب که مقدار ۱ میکرولیتر از محیط حاوی زایلیتول تولید شده توسط مخمر بر روی کاغذهای سیلیکاژل TLC (مرک، آلمان) قرار گرفت. کاغذ به مدت ۲ ساعت در حلال (مرک، آلمان) شامل پروپانل-بوتانل-آب با نسبت ۱:۲:۷ قرار داده شد. سپس به منظور ظاهر شدن لکه های ایجاد شده، کاغذ با رنگ (هیدروکسید سدیم-پرمنگنات پتاسیم) (مرک، آلمان) اسپری گردید. پس از خشک شدن، تولید زایلیتول مورد بررسی قرار گرفت (٤).

سپس زایلیتول تولید شده توسط مخمر مورد نظر که ابتدا با روش کروماتوگرافی لایه نازک جداسازی گردید، با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت مگازایم ایرلند شناسایی شد و مورد تایید قرار گرفت. به منظور تشخیص کیفی و کمی زایلیتول تولید شده توسط مخمر و هم چنین اندازه گیری مقدار زایلوز باقی مانده طی این فرآیند تخمیر، از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) استفاده گردید. در این روش از ستون آمینی Nucleosil 100-5 NH2 ساخت شرکت Knauer آلمان استفاده شد. فاز متحرک، استونیتریل: آب (۸۰:۲۰) بود که با سرعت ۱ میلی لیتر در دقیقه از ستون عبور داده شد. آشکارساز مورد استفاده RI بود و ۲۰ میکرولیتر از نمونه ها به دستگاه تزریق گردید.

د) اندازه گیری بیومس (توده) میکروبی: اندازه گیری توده زنده هم زمان با اندازه گیری بیشینه تولید زایلیتول صورت گرفت. به این ترتیب که محیط کشت تخمیری در ٦٠٠٠ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و با آب مقطر ۲ بار شستشو داده شد. سپس در دمای ۸۰ درجه سیلیسیوس تا ثابت شدن وزن، خشک گردید (٢٦).

ه) استخراج DNA: ابتدا مخمر مورد نظر در محیط عصاره مخمر-پپتون-گلوکز (YPD) مایع کشت داده شد. سلول ها جداسازی و با استفاده از آب مقطر شستشو داده شدند. سپس سلول ها با بافر لیزکننده (Lysing Buffer)، دانه های شیشه ای (٦٠٠-٤٢٥ میکرون)، محلول فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۵:۲٤:۱) مخلوط شدند و به مدت ۳ تا ۵ دقیقه ورتکس گردیدند. بافر لیزکننده حاوی تریتون X-100 (Triton X-100)، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، کلرید سدیم، تریس-اسید کلریدریک (Tris-HCl) و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) بود. سپس به محتویات فوق، بافر (Tris-EDTA) اضافه شد. به منظور انحلال DNA در بافر Tris-EDTA عمل مخلوط سازی به آرامی انجام گرفت. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (g) به مدت ۱۰ دقیقه، به روماند جدا شده به میزان دو برابر حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. حرکت سریع و یا ورتکس در این مرحله موجب قطعه قطعه شدن DNA می گردد. پس از سانتریفیوژ، محلول روماند دور ریخته شد. پس از تبخیر شدن ایزوپروپانول، در زیر هود به رسوب باقی مانده ۱۰۰ میکرولیتر بافر Tris-EDTA اضافه شد. DNA استخراج شده تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سیلیسیوس قرار گرفت (۲۷).

و) واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): به منظور تکثیر ناحیه 18S rRNA از پرایمرهای ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') به عنوان پرایمر رو به جلو و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') به عنوان پرایمر برگشتی استفاده شد (۲۸). به منظور شناسایی مولکولی مخمر مولد زایلیتول جداسازی شده، واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۷۵ میکرولیتر $Mgcl_2$ (۲۵ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر،

Archive of SID

www.SID.ir

۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز ((U5، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۰/۲ میلی مولار) ، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. درجه خلوص و اندازه نسبی محصول PCR به دست آمده بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد تعیین شد. سپس توسط شرکت فزا پژوه تعیین توالی گردید. توالی به دست آمده در سایت NCBI جستجو شد تا نام جنس و گونه مخمر مورد نظر مشخص شود.

ز) *آنالیز آماری:* برای آنالیزهای ژنومی از نرم افزار CLC (CLC GenomicsWorkbench (V4.5, CLC Bio.)) استفاده شد.

***Candida guilliermondii* strain AUMC 7771**

```
Query  1   AACACAATTTAATTATTTTTACAGTTAGTCAAATTTTGAATTAATCTTCAAAACTTTCAA  60
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  141 AACACAATTTAATTATTTTTACAGTTAGTCAAATTTTGAATTAATCTTCAAAACTTTCAA  200

Query  61  GAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATG  120
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201 CAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATG  260

Query  121 AATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCC  180
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  261 AATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCC  320

Query  181 AGAGGGCAAGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCCCCGGGTTTGGTATTGAGTG  240
           |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  321 AGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCCCCGGGTTTGGTATTGAGTG  380

Query  241 ATACTCTTAGTCGGACTAGGCGTTTGCTTGAAAAGTATTGGCATGGGTAGTACTGGATAG  300
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  381 ATACTCTTAGTCGGACTAGGCGTTTGCTTGAAAAGTATTGGCATGGGTAGTACTGGATAG  440

Query  301 TGCTGTCGACCTCTCAATGTATTAGGTTTATCCAACTCGTTGAA  344
           |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  441 TGCTGTCGACCTCTCAATGTATTAGGTTTATCCAACTCGTTGAA  484
```

شکل ۱: مقایسه توالی DNA سویه مخمری جداسازی شده و سویه دارای بیشترین تشابه از سایت NCBI .

Archive of SID
www.SID.ir

یافته ها

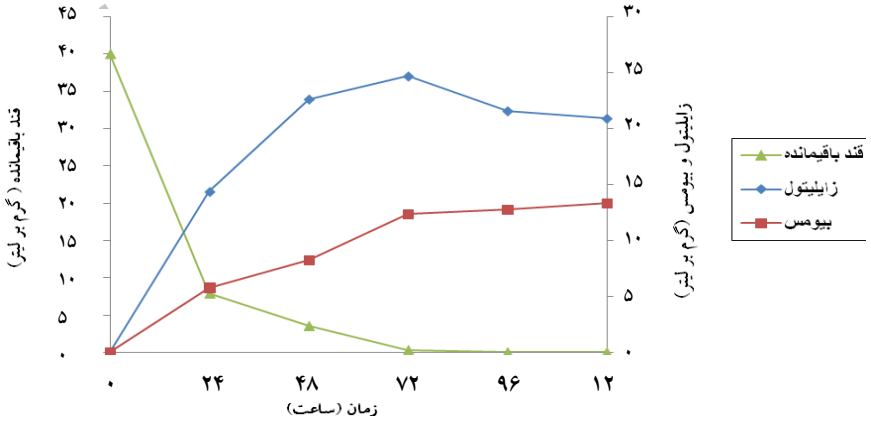
الف) جداسازی و شناسایی مخمرهای مولد زایلیتول: در این بررسی سویه مخمری مولد زایلیتول از گرده گل آهار جداسازی گردید و به عنوان بهترین تولیدکننده برای بررسی های بعدی انتخاب شد.

ب) شناسایی مخمرها توسط تعیین توالی RNA ریبوزومی: قطعات به دست آمده از هر مخمر پس از PCR بر روی ژل آگارز برده شد تا خالص بودن و اندازه نسبی آن ها مشخص گردد. طول قطعات به دست آمده با پرایمرهای ITS1 و ITS2 در مخمرهای مختلف متفاوت و شامل قسمتی از ITS2–5.8S rRNA–ITS1–18S rRNA و قسمتی از 28S rRNA می باشد. پس از تعیین توالی و تطابق در سایت NCBI مشخص گردید که جدایه مورد نظر با تشابه ۹۹ درصدی به گونه *پیکیا گوئیلیرموندی* یا *کاندیدا گوئیلیرموندی* تعلق دارد (شکل ۱). *کاندیدا گوئیلیرموندی* دارای کلنی های نرم، صاف، موکوئیدی و کرم رنگ بر روی محیط عصاره مخمر-پپتون-گلوکز (YPD) بود.

ج) شناسایی کیفی و کمی زایلیتول تولید شده توسط سویه کاندیدا گوئیلیرموندی: مخمر *کاندیدا گوئیلیرموندی* پس از ۲٤ ساعت قادر به تولید زایلیتول از قند زایلوز می باشد. زایلیتول تولید شده در روز دوم بر روی کاغذ TLC در شکل

شکل ۲: کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) حاصل از زایلیتول تولید شده توسط سویه *کاندیدا گوئیلیرموندی*. باند زایلیتول تولید شده توسط مخمر (S) در مقابل باند زایلیتول شاهد (X).

۲ نشان داده شده است (مقدار ۱۰ گرم بر لیتر زایلیتول به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت). سپس زایلیتول تولید شده توسط این مخمر با استفاده از کیت مگازایم شناسایی و تایید گردید. هم چنین مقدار تولید با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) اندازه گیری شد. همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می شود این مخمر در روز سوم پس از ۷۲ ساعت بیشترین تولید زایلیتول (۲٤/٦۷ گرم بر لیتر) را از ٤۰ گرم بر لیتر زایلوز دارا بود. همچنین مقدار قند زایلوز باقی مانده و مقدار توده میکروبی، در این فرآیند تخمیر اندازه گیری شد.



نمودار ۱: تولید زایلیتول و مصرف قند زایلوز توسط *کاندیدا گوئیلیرموندی* و اندازه گیری آن ها با استفاده از HPLC.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در این مطالعه زایلیتول به عنوان محصول اصلی متابولیسم زایلوز توسط مخمر *کاندیدا گوئیلیرموندی* (جداسازی شده از گرده گل آهار) تولید گردید. مقادیر زایلیتول تولید شده با روش بسیار دقیق کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) اندازه گیری شد. به طور معمول زایلیتول به وسیله میکروارگانیسم های مصرف کننده زایلوز تولید می شود. این میکروارگانیسم ها دارای آنزیم زایلوز ردوکتاز می باشند و زایلیتول محصول اصلی متابولیسم زایلوز است (۲۹). تولید میکروبی زایلیتول از منابع کربنی دیگر در موارد نادر انجام شده است. تولید زایلیتول از گلوکز تنها در یک مورد توسط اونیشی (Onishi) و سوزوکی (Suzuki) گزارش شد (۳۰). همچنین تولید زایلیتول از لاکتوز در یک مورد، طی یک فرآیند سه مرحله ای با استفاده از میکروارگانیسم ها انجام گرفت (۳۱). در مطالعات اخیر مخمر *کاندیدا* بهترین مخمر مولد زایلیتول در نظر گرفته شده است. از ویژگی های این مخمر می توان به مصرف کننده طبیعی D-زایلوز و حفظ تعادل اکسیداسیون و احیا در طول تجمع D-زایلیتول اشاره نمود (۳۲). ایکوچی (Ikeuchi) و همکاران در سال ۱۹۹۹ مخمرهای مولد زایلیتول را از خاک مزارع و پارک ها به ویژه خاک هایی که در تماس با برگ های افتاده از درختان بودند جداسازی نمودند. در میان مخمرهای جداسازی شده، سویه ۹-۵۵۹ *کاندیدا* بیشترین مقدار زایلیتول (۱۷۳ گرم بر لیتر) را از ۲۰۰ گرم بر لیتر زایلوز تولید کرد (۳۳). در مطالعه ای دیگر سویه 2581 *کاندیدا گوئیلیرموندی* که قادر به تولید زایلیتول بود مورد بررسی قرار گرفت. این سویه از ۱۵۰ گرم بر لیتر زایلوز پس از ۳ روز، ۹۰ گرم بر لیتر زایلیتول تولید کرد (٤). یک سویه مخمری *کاندیدا گوئیلیرموندی* توسط کاروالو (Carvalho) و همکاران گزارش شد که از ۳۰ گرم بر لیتر زایلوز، ۲۳/۸ گرم بر لیتر زایلیتول تولید نمود (۳٤).

رائو (Rao) و همکاران تعداد ۳۵ سویه مخمری را از روده سوسک جداسازی کردند. از این میان ۲۰ سویه مصرف کننده زایلوز به عنوان تنها منبع کربن بودند. از میان آن ها ۱۳ تا از زایلوز، زایلیتول تولید کردند. از این مخمرهای مولد زایلیتول، سویه YS-54 *کاندیدا* بیشترین تولید زایلیتول (۲۵ گرم بر لیتر) را از ٤۰ گرم بر لیتر زایلوز داشت (۸). در پژوهش حاضر سویه مخمری *کاندیدا گوئیلیرموندی* جداسازی شده از گرده گل آهار ۲٤/٦۷ گرم بر لیتر زایلیتول از ٤۰ گرم بر لیتر زایلوز تولید کرد. مقدار زایلیتول تولید شده توسط این سویه نزدیک به مطالعات انجام شده مشابه می باشد.

از آنجایی که زایلوز، فراوان ترین مونومر قندی موجود در ترکیبات همی سلولزی هیدرولیز شده است، از لحاظ اقتصادی تولید زایلیتول از این منبع ارزان قیمت می تواند بسیار مقرون به صرفه باشد. فرآیند تخمیر که در مخمرها منجر به تولید زایلیتول می شود از طریق فاکتورهایی مانند غلظت زایلوز، منبع نیتروژن، هوادهی، دما و pH کنترل می گردد. به منظور افزایش بازدهی فرآیند بیوتکنولوژیکی زایلیتول می توان این پارامترها را بهینه سازی نمود. جداسازی سویه های مخمری مولد زایلیتول و شناسایی اولیه این سویه ها گامی نخست برای دست یابی به سویه های برتر تولید کننده زایلیتول می باشد.

نتیجه گیری

در این بررسی زایلیتول توسط سویه مخمری *کاندیدا گوئیلیرموندی* جداسازی شده از طبیعت تولید گردید. با توجه به خواص ارزشمند زایلیتول و با در نظر گرفتن معایب روش شیمیایی تولید زایلیتول، می توان از این شیرین کننده طبیعی به عنوان جایگزین قند در صنایع شیمیایی، غذایی و دارویی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از سرکار خانم احمدی کارشناس بخش HPLC آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Granstrom TB, Izumori K, Leisola M. A rare sugar xylitol PartI: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. Appl Microbiol Biotechnol. 2007; 2: 277-281.

2. Altamirano A, Vazquez F, De Figueroa LIC. Isolation and identification of xylitol- producing yeasts from agricultural residues. Folia Microbiol. 2000; 45(3): 255-258.

3. LifHolgerson P, Stecksen Blicks C, Sjostrom I, Oberg M, Twetman S. Xylitol concentration in saliva and dental plaque after use of various xylitol-containing products .Caries Res. 2006; 40: 393-397.

4. Zagustina NA, Rodionova NA, Mestechkina NM, Shcherbukhin VD, Bezborodov AM. Xylitol production by a culture of *Candida guilliermondii* 2581. Appl Microbiol Biotechnol. 2001; 37(5): 489-492.

5. Natah SS, Hussien KR, Tuominen JA, Koivisto VA. Metabolic response to lactitol and xylitol in healthy men. J Clin Nutr. 1997; 65: 947-950.

6. Abou Zeid AA, El-Fouly MZ, El-Zawahry YA, El-Mongy TM, El-Aziz ABA. Bioconversion of rice straw xylose to xylitol by a local strain of *Candida tropicalis*. J Appl Sci Res. 2008; 4(8): 975-986.

7. Cheng kk, Ling HZ, Zhang JA, Ping WX, Huang W, Ge JP, Xu JM. Strain isolation and study on process parameters for xylose- to- Xylitol bioconversion. Food Biotechnol. 2010; 24(1): 1606-1611.

8. Rao RS, Bhadra B, Shivaji S. Isolation and characterization of xylitol- producing yeasts from the gut of colleopteran insects. Curr Microbiol. 2007; 5: 441-446.

9. Vakhlu J, Kour A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electr J Biotechnol. 2006; 9: 69-85.

10. Phaff HJ, Starmer WT. Yeast associated with plants, insect and soil. Pp. 123-180. In: Rose AH, Harrison JS (eds). The yeasts: Biology of yeasts, second edition, Academic Press, Orlando, Florida. 1987.

11. Cortez DV, Roberto IC. Optimization of D-xylose to xylitol biotransformation by *Candida guilliermondii* cells permeabilized with Triton x-100. Biocatal Biotrasform. 2014; 32(1): 34-38.

12. Ramesh S, Muthuvelayudham R, Rajesh Kannan R, Viruthagiri T. Application of factorial design to the study of xylitol production from corncob hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. J Biochem Technol. 2012; 4(1): 518-523.

13. Pereira RS, Mussatto SI, Roberto IC. Inhibitory action of toxic compounds present in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. J Indian Microbiol Biotechnol. 2011; 38(1): 71-78.

14. Cortez DV, Roberto IC. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. Bioresour Technol. 2010; 101(6): 1858-1865.

15. Ping y, Ling HZ, Song G, Ge JP. Xylitol production from non-detoxified corncob

Archive of SID

www.SID.ir

hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. Biochem Eng J. 2013; 75: 89-91.

16. Ahmad I, Shim WY, Ieon WY, Yoon BH, Kim JH. Enhancement of xylitol production in *Candida tropicalis* by co-expression of two genes involved in pentose phosphate pathway. Bioprocess Biosyst Eng. 2012; 35(1-2): 199-204.

17. Misra S, Raghuwanshi S, Saxena RK. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted stain of *Candida tropicalis*. Carbohydr Polym. 2013; 92(2): 1596-1601.

18. Sirisansaneeyakul S, Kop B, Tochampa W, Wannawilai S, Chaveesuk R, Lee WC. Sodium benzoate stimulates xylitol production by *Candida mogii*. J Inst Chem Eng. 2014; 45(3): 734-743.

19. Li Y, Park JY, Shiroma R, Ike M, Tokuyasu K. Improved ethanol and reduced xylitol production from glucose and xylose mixtures by the mutant strain of *Candida shehatae* ATCC22984. Appl Biochem Biotechnol. 2012; 166: 1781-1790.

20. Zhang J, Geng A, Yoo C, Lu Y, Li Q. xylitol production from D-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. Bioresour Technol. 2012; 105: 134-141.

21. Perez-Bibbins B, Oliveira RRS, Torrado A, Aguilar-Uscanga MG, Dominguez JM. Study of the potential of the air lift bioreactor for xylitol production in fed-boten cultures by *Debaryomyces hansenii* immobilized in alginate beads. Biotechnol Process Eng. 2014; 98: 151-161.

22. Perez-Bibbins B, Salgado JM, Torrado A, Aguilar-Uscanga MG, Dominguez JM. Culture parameters affecting xylitol production by *Debaryomyces hansenii* immobilized in alginate beads. Process Biochem. 2013; 48(3): 387-397.

23. Prakasha G, Varma AJ, Prabhune A, Shouche Y, Rao M. Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Bioresour Technol. 2011; 102(3): 3304-3308.

24. Bura R, Vajzovic A, Doty SL. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3I: production of xylitol and ethanol. J Indian Microbiol Biotechnol. 2012; 39(7): 1003-1011.

25. Rao RS, Prahasham RS, Prasad KK, Rajesham S, Sarma PN, Rao LV. Xylitol production by *Candida* sp. : Parameter optimization using Taguchi approach. Process Biochem. 2004; 39: 951- 956.

26. Altamirano A, Vazquez F, De Figueroa LIC. Isolation and identification of xylitol - producing yeasts from agricultural residues. Folia Microbiol. 2000; 45(3): 255-258.

27. Hoffman CS. Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, New York. 1997.

28. Deak T, Chen J, Beuchat LR. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. Appl Environ Microbiol. 2000; 66: 4340-4344.

29. Saha BC, Bothast RJ. Production of xylitol by *Candida peltata*. J Indian Microbiol Biotechnol. 1999; 22: 633- 636.

Archive of SID

www.SID.ir

30. Onishi H, Suzuki T. Microbial production of xylitol from glucose. Appl Microbiol. 1969; 18: 1031-1035.

31. Toyoda T, Ohtaguchi K. Xylitol production from lactose by biotransformation. J Biochem Technol. 2009; 2: 126-132.

32. Ko BS, Kim J, Kim JH. Production of xylitol from D – xylose by a xylitol dehydrogenase gene disrupted mutant of *Candida tropicalis*. Appl Environ Microbiol. 2006; 72: 4207- 4213.

33. Ikeuchi T, Azuma M, kato J, Ooshima H. Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentrations of xylose. Biomass Bioenergy. 1999; 2: 333-339.

34. Carvalho W, Silva SS, Vitolo M, Felipe MGA, Mancilha IM. Improvement in xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate achieved by the use of a repeated- batch immobilized cell system. J Biosci. 2002; 3: 109-112.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 4, January 2015

Original Article

Evaluation of xylitol sweetener production by *Candida guilliermondii*

Forough Asgary Karchegany[1], **Gholamreza Ghezelbash**[2], **Iraj Nahvi**[3]

[1]MS.c., Department of Microbiology, Falavarjan branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran, Ahvaz, Iran.
[3]Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Xylitol is a naturally five–carbon polyol with a high sweetening ability. The biotechnological production of xylitol by microorganisms specially yeasts is very environmentally safe and has been studied as an alternative to the chemical method. The purpose of this study was xylitol production by *Candida guilliermondii* that isolated from spores of Zinnia.

Materials & Methods: The xylitol producing yeast strain was isolated on Yeast extract Pepton Xylose (YePX) medium. The identity of strains was confirmed using PCR reaction. The xylitol produced by the strains was analyzed using tine layer chromatography (TLC) and specific kits. The concentration of Xylitol produced in this experiment was quantified using HPLC method.

Results: The xylitol producing yeast strain was isolated from pollen of *Zinnia elegans* flower and was identified by 16S rRNA sequence analysis as *Candida guilliermondii*. This strain produced 24.67 g l^{-1} xylitol after 72 hours in medium contained 40 g l^{-1} xylose.

Conclusion: In this study xylitol was produced by *Candida guilliermondii* isolated from the nature. According to the properties of xylitol and the difficulties through chemical production of this compound, the sweetener produced by biotechnological methods can be used as an attractive sugar in the nutritional supplement and pharmaceutical industries.

Keywords: Xylitol, Xylose, *Candida guilliermondii*.

Correspondence to: Forough Asgary Karchegany

Tel: +989138994335

E-mail: fo.askary63@yahoo.com

Journal of Microbial World 2015, 7(4): 329-338.

Archive of SID

www.SID.ir