Archive of SID

جداسازی و بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی مخمرها و گزینش سویه‌های برتر جهت تولید اتانول بعنوان سوخت

الناز سیدصیام‌دوست*
گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
فریدون ملک‌زاده
گروه میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
فتح اله فلاحیان
گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
نور امیرمظفری
گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
محمدرضا رضوی
گروه انگل‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۱۰ **تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۲۶**

چکیده

مقدمه: با توجه به رشد جمعیت جهان، مصرف زیاد انرژی،محدودیت منابع نفتی تأمین‌کنندهٔ انرژی و افزایش قیمت سوخت در آینده،جایگزین کردن یک منبع انرژی دیگر امری ضروری محسوب می‌شود. اتانول یک سوخت قابل تجدید و بی‌خطر است و جایگزین بسیار مناسبی برای نفت می‌باشد که تولید جهانی آن عمدتاً بر پایهٔ

* عهده‌دار مکاتبات: elnaz_siamdoust@yahoo.com، تلفن: ۶۶۴۹۹۵۱۵-۰۲۱ ، ۶۶۴۱۸۷۳۳-۰۲۱

www.SID.ir

Archive of SID

تخمیر قندها توسط مخمرها است. بعلت نقش مهم مخمرها در فرآیند تخمیر و تولید اتانول، مطالعهٔ ویژگی‌های فیزیولوژیکی آنها جهت افزایش تولید اتانول در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است.

هدف: جداسازی مخمرها از زیستگاه طبیعی آنها همچون میوه‌ها و منابع غذایی تخمیری مختلف، بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی آنها به منظور یافتن سویه‌هایی با توان فیزیولوژیکی بالا برای بکارگیری در صنعت تولید اتانول، هدف این پژوهش بوده است.

روش بررسی: از انواع آب پنیر، خیار شور،ماست، کشمش، خرما، سیب و انگور سفید و قرمز، آلو، هلو نمونه‌گیری شد. برای جداسازی روش رقت سریال بکار گرفته شد و پس از برررسی مورفولوژیکی، خالص‌سازی صورت گرفت. برای مطالعهٔ ویژگی‌های فیزیولوژیکی، آزمایش‌های مقاومت به غلظت‌های مختلف اتانول بین (v/v) ٪ (1-13) در محیط کشت GPY و محیطهای با فشار اسمزی بالا، رشد در دماهای متفاوت،تخمیر قندهای مختلف، تجزیه و مصرف منابع کربن و نیتروژن متنوع، سازگاری با محیط‌های فاقد ویتامینها بکار گرفته شد و بر این اساس سویه‌های برتر گزینش و برای شناسایی جنس و گونه و معرفی آنها از 28S rDNA Ribotyping استفاده شد.

نتایج: ۴۰ کلنی مخمر جداسازی و خالص سازی شدند. براساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی، ۴ سویهٔ MS3,MS2, MS1 MS5, انتخاب شدند و به ترتیب در آنها مقاومت به اتانول (v/v) ٪ 12، ٪11، ٪8 و ٪6 و حداکثر دمای قابل رشد (°C) 42، 37، 40 ، 37 بود.در محیط‌های کشت با فشار اسمزی بالا همگی رشد کردند و در محیط‌های فاقد ویتامین‌ها به استثنای سویهٔ MS5 سازگاری نشان دادند. هر ۴ سویه توانایی تجزیه و مصرف منابع کربن و نیتروژن متفاوت و تخمیر قندهای گلوکز، فروکتوز و مانوز را داشتند و قندهای گالاکتوز، ساکارز و رافینوز توسط سویه‌های MS2 و MS3، مالتوز، تره هالوز و سلوبیوز به ترتیب توسط سویه‌های MS2 ، MS3 و MS5 تخمیر شدند. در توالی‌یابی ژن 28S rDNA، سویه‌های MS1 ،MS2 ، MS3 و MS5 به ترتیب ٪81 ، ٪100 ، ٪99 و ٪88 تشابه با سویه‌های شناخته شده نشان دادند.

نتیجه‌گیری: در بررسی مقاومت به اتانول و فشار اسمزی بالا، ۴ سویهٔ منتخب مقاومت قابل توجهی نشان دادند و بعلت اینکه تحمل بالا به قند و اتانول در مخمرها با افزایش تولید اتانول نسبت مستقیم دارد، این سویه‌ها می‌توانند برای تولید کارآمد اتانول مفید باشند؛ علاوه بر این، توانایی رشد سویهٔ MS1 در 42°C و MS3 در 40°C، تخمیر قندهای مختلف توسط سویه‌های MS2 و MS3 ، تخمیر سلوبیوز توسط سویهٔ MS5 در بهینه‌سازی تولید اتانول می‌تواند مؤثر باشد. با شناسایی ۴ سویه، جنس و گونه سویه‌های MS2 و MS3 تعیین شد اما مشخص شد که دو سویهٔ MS1 و MS5 مخمرهایی متعلق به گونه، جنس یا حتی سطوح تاکسونومی بالاتر جدید می‌باشند و برای تعیین این موارد نیاز به بررسی‌های بیشتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مخمر، اتانول، فشار اسمزی بالا، حرارت بالا، تخمیر

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در قرن اخیر مصرف انرژی به علت رشد زیاد جمعیت جهان و صنعتی شدن بیشتر کشورها بطور پیوسته افزایش یافته است.[۱] با توجه به محدود بودن سوخت‌های فسیلی یکی از بزرگترین چالش‌های جوامع قرن بیست‌ویکم مواجهه با نیاز روزافزون به انرژی در سیستم‌های حمل‌ونقل، فرآیندهای صنعتی و حرارتی می‌باشد؛ علاوه بر این، سوخت‌های فسیلی با تولید و انتشار گازهای گلخانه‌ای بویژه CO_2 اثرات مخربی بر روی محیط زیست دارند.[۲]

در حال حاضر نفت خام اصلی‌ترین منبع تأمین‌کنندهٔ انرژی مورد نیاز در سرتاسر جهان است. Campbell and Laherrere (1998) چند روش مختلف برای بررسی منابع نفت خام شناخته شده و منابعی که هنوز کشف نشده‌اند را بکار گرفتند و نتیجه‌گیری آنها کاهش تولید نفت قبل از شروع سال ۲۰۱۰ بوده است. آنها همچنین پیش‌بینی کرده‌اند که تولید کلی سالانهٔ نفت خام جهان از ۲۵ بیلیون بشکه به ۵ بیلیون بشکه در سال ۲۰۵۰ خواهد رسید و به همین علت قیمت نفت خام در آینده افزایش خواهد یافت.[۳] از آنجا که اقتصاد بسیاری از کشورها وابسته به نفت می‌باشد، کمبود نفت در آینده یک مسألهٔ جدی قلمداد می‌شود. بنابر دلایل عنوان شده جایگزین کردن منابع انرژی دیگر به غیر از نفت امری ضروری محسوب می‌شود.[۱]

اتانول یک مادهٔ آلی با فرمول شیمیایی C_2H_5OH با دارا بودن ۳۵ درصد اکسیژن در ساختار خود بهنگام اشتعال و سوختن آن، تولید ذرات آلوده‌کنندهٔ محیط زیست به حداقل می‌رسد[۴]، علاوه بر این، برخلاف سوخت‌های فسیلی، اتانول یک سوخت قابل تجدید می‌باشد، در نتیجه فراهم‌آوری آن همیشگی است. این ویژگی‌های منحصر بفرد اتانول موجب شده است تا بعنوان یک سوخت سالم،ایمن و جایگزین نفت مورد توجه بسیاری قرار گیرد[۲ و ۵] تا آنجا که در بعضی از کشورها همچون برزیل، در حال حاضر تعداد زیادی از خودروها سوختشان توسط اتانول یا مخلوطی از اتانول و بنزین به نام Gasohol تأمین می‌شود.[۶،۷]

تولید جهانی اتانول عمدتاً بر پایهٔ تخمیر قندها توسط مخمرها است. تحت نام مخمر (yeast)، به گروهی از میکروارگانیسم‌ها اتلاق می‌شود که وقتی در یک محیط قندی تحت شرایط بیهوازی قرار گیرند،اتانول و دی‌اکسید کربن تولید می‌کنند که این عمل،تخمیر نامیده می‌شود[۸]. مخمرها علاوه بر این ویژگی فیزیولوژیکی، بعلت رشد سریع در pH پائین و نیاز غذایی ساده، برای تولید اتانول مناسب و ارجح می‌باشند. از معروفترین مخمرهای بکار گرفته شده در فرآیند تولید اتانول، سویه‌های *Saccharomyces* بویژه *S.cerevisiae* می‌باشد.[۹]

با توجه به اینکه تنها ۱٪ از کل سویه‌های مخمری تا به حال توصیف شده‌اند و هنوز مخمرهای زیادی برای شناسایی وجود دارند،[۱۰] که احتمال دارد کاربرد صنعتی داشته باشند و همچنین اهمیت استفاده از اتانول در سال‌های اخیر و نقش مهم مخمرها در تولید آن، نیاز به پژوهش در زمینه‌های مختلف جهت افزایش تولید آن همچون جداسازی یا ایجاد سویه‌هایی توسط علم مهندسی ژنتیک با توانائیهای فیزیولوژیکی بالا و متنوع از جمله مقاومت به غلظت‌های بالای قند بعنوان سوبسترای مصرفی و اتانول بعنوان محصول نهایی در محیط کشت تخمیر، توانایی تخمیر محدودهٔ وسیعی از قندها، رشد در دماهای بالا و موارد دیگر، می‌باشد.[۱۰]

www.SID.ir

Archive of SID

هدف از این پژوهش، جداسازی مخمرها از زیستگاه طبیعی آنها همچون میوه‌ها و منابع غذایی تخمیری مختلف، بررسی و تعیین ویژگی‌های فیزیولوژیکی آنها، گزینش سویه‌های برتر برای بکارگیری آنها در صنعت تولید اتانول بوده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی، بررسی مورفولوژیکی، خالص‌سازی و نگهداری

از مواد غذایی تخمیری همچون انواع آب پنیر، خیارشور، ماست، کشمش و میوه‌های سالم مثل سیب و انگور سفید و قرمز، خرما، آلو، هلو نمونه جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. برای افزایش تعداد مخمرها و جداسازی بهتر، از محیط کشت Malt extract Broth بهمراه کلرآمفنیکل (0.1 g/l، برای جلوگیری از رشد باکتریها) با pH:6.0 استفاده شد. محیط کشت در فانل‌ها توزیع و استریل شد، سپس به مقدار 10% از نمونه‌های مواد غذایی تخمیری به فانل‌ها اضافه شد و در گرمخانهٔ 30^oC، بر روی شیکربادور 150rpm/min قرار داده شدند. پس از مشاهدهٔ کدورت و رشد، با استفاده از روش رقت سریال، رقت‌های متوالی از 10^{-1} تا 10^{-8} فراهم شد، هر یک از رقت‌ها بر روی محیط کشت جامد GMPYA با pH:5.6-5.8 (Glucose 20g/l Malt extract 5g/l, Peptone 10g/l, yeast extract 5g/l, Agar 20g/l) کشت متراکم داده و در 30^oC گرماگذاری شدند. در موارد جداسازی از میوه‌های تازه، ابتدا بدون اینکه شسته شوند آنها را له کرده و به ظرف‌های استریل در پوش‌دار منتقل (بطوریکه $\frac{۴}{۵}$ حجم ظرف‌ها پر شد) و در دمای اتاق بمدت ۲۰ تا ۳۰ روز نگهداری شدند، سپس مشابه روش فوق عمل شد.

از تک کلنی‌های رشد کرده، نمونه لام تهیه و با کریستال ویوله رنگ‌آمیزی ساده شدند و در زیر میکروسکوپ نوری، اشکال میکروسکوپی و نحوهٔ جوانه زدن در آنها مشاهده شد، سپس این کلنی‌ها با تجدید کشت بر روی محیط GMPYA، خالص‌سازی شدند.

برای بررسی خواص ماکروسکوپی از محیط کشت Sabourad's Dextrose Agar (SDA) با pH:5.6 و برای بررسی تولید میسلیوم کاذب یا حقیقی از تکنیک Dalman Plate[11] استفاده شد،دراین روش از مخمرها بر روی محیط کشت جامد Corn Meal Agar (CMA) بصورت خط و نقطه کشت داده و بر روی نقطه ها و قسمتی از خط لامل استریل گذاشته، در گرمخانه $30^\circ C$ به مدت ۱۰ روز قرار داده، روزانه بررسی و با مشاهده پرزهایی در اطراف لامل‌ها، آنها را بر روی لامی که قبلا یک قطره رنگ قرار داده شده بود منتقل ودر زیر میکروسکوپ نوری وجود میسلیوم بررسی شد.

برای نگهداری کشت خالص مخمرها، از محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) استفاده شد. پس از رشد کلنی‌ها،در دمای 4^oC آنها را قرار داده و با هر ماه تجدید کشت نگهداری شدند. برای نگهداری طولانی مدت از محیط کشت مایع GMPY بهمراه گلیسرول 15%(v/v) و دمای -20^oC استفاده شد.

در آزمایش مقاومت به غلظت‌های مختلف اتانول از محیط کشت مایع GPY (Glucose 20g/l, Peptone 7g/l, yeast extract 4.5g/l) به همراه غلظت‌های مختلف از اتانول بین (v/v)٪ (1-13) به طور جداگانه استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

پس از استریل کردن محیط کشت‌ها، اتانول تحت شرایط استریل و در دمای اتاق به هر یک اضافه شد. در بررسی رشد در دماهای مختلف نیز محیط کشت مایع GPY بهمراه گرماگذاری در دماهای (°C)37,40,42,45 بکار برده شد. در سنجش مقاومت به فشار اسمزی بالا سه محیط کشت متفاوت که میزان (w/v) ٪ 1 yeast extract و (w/v) ٪ 2 Agar در همه آنها ثابت بود، بکار گرفته شدند. در محیط شماره ۱ از [(w/v) (٪ +NaCl 10٪ Glucose)]، در محیط شمارهٔ ۲ از [(w/v)٪Glucose 60] و در محیط شمارهٔ ۳ از [(w/v) (٪ +NaCl 10٪ Glucose 12٪+Malt extract 2٪)] استفاده شد. در آزمایش تجزیه و مصرف منابع کربن مختلف، از محیط کشت Yeast Nitrogen Basal (YNB) استفاده شد[۱۱] و قندهای مورد آزمایش بعنوان تنها منبع کربن به میزان 50mmol ، بطور جداگانه به محیط کشت اضافه شدند [اسامی قندها در جدول (۴) در بخش نتایج فهرست شده است]. در بررسی تجزیه و مصرف منابع نیترون متفاوت از محیط کشت Yeast Carbon Basal (YCB)[۱۱] با اضافه کردن KNO_3، $NaNO_3$، L-Lysin بعنوان تنها منبع نیتروژن به میزان mmol(5-2) به‌طور جداگانه استفاده شد. در آزمایش توانایی سازگاری در محیط کشت فاقد ویتامین‌ها، محیط کشت YNB بهمراه (w/v)٪ 2 Glucose با حذف تیامین، پیریدوکسین، بیوتین و تمامی ویتامین‌های موجود در آن بطور جداگانه بکار گرفته شد. در آزمایش هیدرولیز اوره از محیط کشت Urea Broth و در سنجش توانایی تخمیر قندهای مختلف از محیط کشت Yeast Broth با افزودن قندهای مورد نظر به میزان 50mmol بطور جداگانه استفاده شد. [اسامی قندها در (جدول ۶) فهرست شده است]. در این مورد به هر یک از لوله‌های آزمایش برای مشاهدهٔ وجود گاز CO_2 ـ که نشان‌دهنده تخمیر و تولید اتانول است ـ لوله‌های دُرهام اضافه شده بود.

شناسایی ژنتیکی

برای استخراج ژنوم مخمرها روش اصلاح شدهٔ Hoffman and Winston (1987) بکار گرفته شد.[۱۲و ۱۳] پس از استخراج ژنوم، برای تکثیر ناحیهٔ D1/D2 از ژن 28S rDNA (ژن کُدکننده rRNAهای زیر واحد بزرگ ریبوزوم) با اندازه‌ای حدود 600bp، از پرایمرهای ((forward)NL-1 و (reverse)NL-4[۱۴] استفاده شد.

حجم نهایی هر مخلوط واکنش PCR، 25µl و حاوی 1µl از DNA ژنومی با غلظت تقریبی 8ng/µl، 1.7µl از $MgCl_2$ 25mM، 1.8 µl از PCR buffer[Tris HCl (PH:8.4)10mM، KCl 500mM]، 0.57 µl از 4dNTP mix 10mM ، 1µl از هر پرایمر با غلظت 10pmol/ µl ، 0.3µl از Taq DNA Polymerase (5u/µl) و 17.63 µl آب مقطر استریل بود. برنامهٔ اجرا شده برای PCR ، مطابق با برنامهٔ بکار گرفته شده توسط Voigt et al (1999) بود[۱۵]. محصولات PCR بدست آمده توسط آزمایشگاه شرکت SEQLAB آلمان (www.seqlab.de) آنالیز و توالی‌یابی شدند. سپس برای بررسی تشابه این توالی‌های بازی با توالی‌های بازی شناخته شده و ثبت شده در بانک ژن از برنامهٔ BLAST استفاده شد.

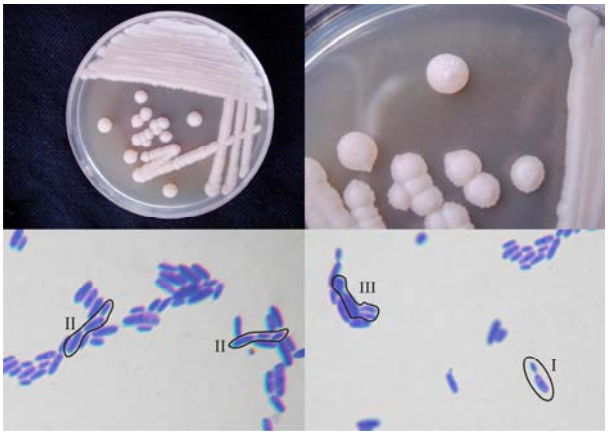
نتایج و بحث

حدود ۴۰ کلنی مخمر جداسازی، بررسی مورفولوژیکی و خالص‌سازی شدند. خواص فیزیولوژیکی آنها آزمایش و براساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی تعیین شده، ۴ سویه MS1، MS2، MS3، MS5 از میان آنها انتخاب شدند. در

www.SID.ir

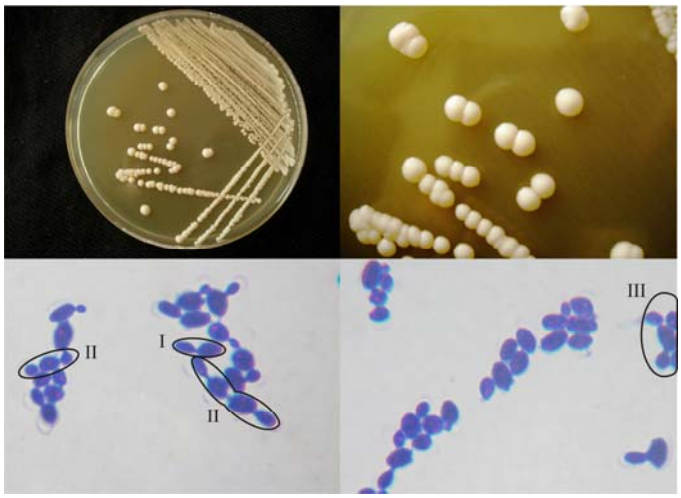
Archive of SID

تصویر (۱) تا (۴) اشکال ماکروسکوپی و میکروسکوپی آنها نشان داده و در جداول (۱) تا (۶) خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و فیزیولوژیکی آنها تعیین شده است. در جدول (۷) نتایج توالی‌یابی ژن 28S rDNA و درصد تشابه آنها با سویه‌های مخمری شناخته شده مشخص شده است.



شکل۱- اشکال ماکروسکوپی و میکروسکوپی سویهٔ MS1

(a) تصویر کامل از کشت تازهٔ مخمر؛ (b) تصویر نزدیک از تک‌کلنی (به شکل گرد و مات، با سطح برآمده و ناصاف، با کناره‌های مشخص و مضرس)؛ (c) اشکال میکروسکوپی باسیلی و بیضوی (زیرمیکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی 100×10)، جوانه زدن دوقطبی II؛ (d) جوانه زدن تک‌قطبی I و چندقطبی III.

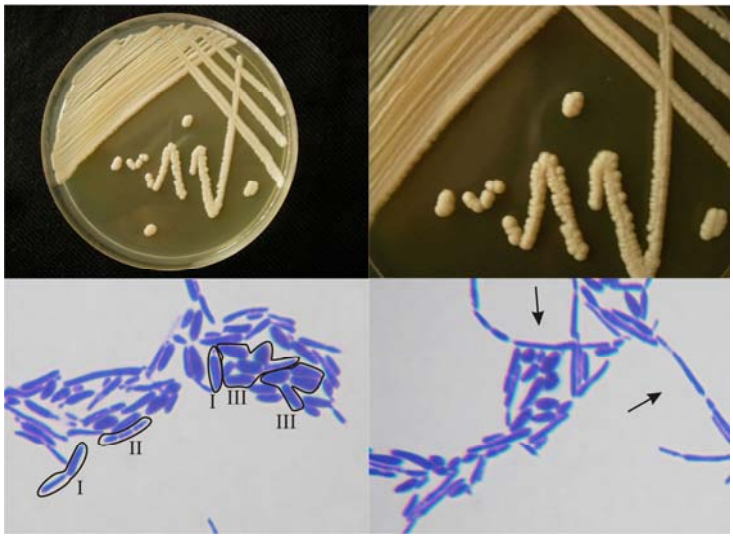


شکل۲- اشکال ماکروسکوپی و میکروسکوپی سویهٔ MS2

(e) تصویر کامل از کشت تازهٔ مخمر؛ (f) تصویر نزدیک از تک کلنی (به شکل گرد و براق، با سطح برآمده و صاف، با کناره‌های مشخص)؛ (g) اشکال میکروسکوپی کروی و بیضی (زیرمیکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی 100×10)، جوانه زدن تک‌قطبی I و دوقطبی II؛ (h) جوانه زدن چندقطبی III

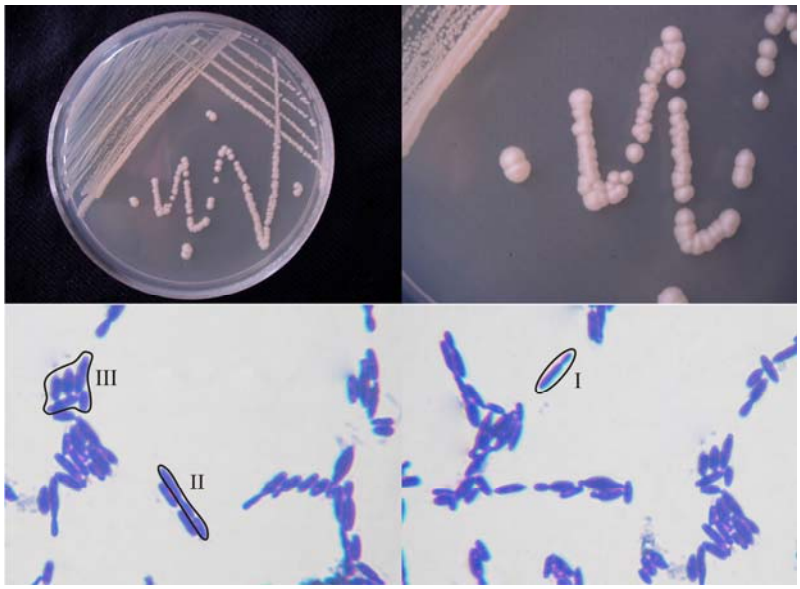
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- اشکال ماکروسکوپی و میکروسکوپی سویهٔ MS3

(k) تصویر کامل از کشت تازهٔ مخمر؛ (l) تصویر نزدیک از تک کلنی (به شکل تقریباً گرد و براق، با سطح چین‌خورده، با کناره‌های مشخص و مضرس)؛ (m) اشکال میکروسکوپی باسیلی و بیضوی (زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی 100×10)، جوانه‌زدن تک‌قطبی I، دوقطبی II و چندقطبی III (n) اشکال باسیلی بلند



شکل۴- اشکال ماکروسکوپی و میکروسکوپی سویهٔ MS5

(o) تصویر کامل از کشت تازهٔ مخمر؛ (p) تصویر نزدیک از تک کلنی (به شکل گرد و براق، با سطح صاف و برآمده، با کناره‌های مشخص)؛ (q) اشکال میکروسکوپی باسیلی و لیمویی (زیرمیکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی 100×10)، جوانه زدن دوقطبی II و چندقطبی III؛ (r) جوانه زدن تک‌قطبی I

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات میکروسکوپی و منبع جداسازی چهار سویهٔ مخمر منتخب

سویه‌ها	زیستگاه	تولید میسلیوم حقیقی / کاذب	شکل میکروسکوپی	نوع جوانه زدن
MS1	آب خیارشور	+ / +	بیشتر باسیلی و بیضوی	تک‌قطبی، دوقطبی و چندقطبی
MS2	آب پنیر	-/ متغیر	بیضوی و کروی	تک قطبی، دوقطبی و چندقطبی
MS3	انگور سفید	+/+	بیشتر باسیل‌های بلند و باسیل‌های معمولی	تک قطبی، دوقطبی و چندقطبی
MS5	انگور قرمز	متغیر/ +	بیشتر لیمویی‌شکل، بیضوی و باسیلی	تک قطبی، دوقطبی و چندقطبی

جدول۲- مشخصات ماکروسکوپی چهار سویهٔ مخمر منتخب بر روی محیط کشت SDA

سویه‌ها	رنگ کلنی‌ها		حالت و شکل ظاهری کلنی‌ها	
	تازه	کهنه	تازه	کهنه
MS1	کرم‌رنگ، نقطه‌های سفیدرنگ بر روی سطح	تیره‌تر	سطح برآمده و ناصاف، پهن، کناره‌ها مشخص و مضرس، مات و نرم	بزرگ‌تر و پخش‌تر، کناره‌ها نامشخص‌تر
MS2	سفید مایل به کرم	مرکز تیره‌تر	سطح برآمده و صاف، کناره‌ها مشخص، براق و نرم	بزرگ‌تر
MS3	سفید مایل به زرد یا خاکستری	ثابت	سطح چین‌خورده، کناره‌ها مشخص و مضرس، بسیار براق و نرم	بزرگ‌تر، کناره‌ها نامشخص‌تر
MS5	سفید مایل به صورتی	تیره‌تر	سطح برآمده و صاف، کناره‌ها مشخص، براق و نرم	بزرگ‌تر

جدول۳- مقاومت به استرسهای شیمیایی و فیزیکی چهار سویهٔ مخمر منتخب

سویه‌ها	حداکثر مقاومت به Ethanol%(v/v)	حداکثر مقاومت به دما (^{o}C)	60% Glucose	12%Glucose + 10% NaCl + 2% Malt extract	5%Glucose + 10%NaCl
MS1	12	42	+	+	+
MS2	11	37	+/ با تأخیر	+	+
MS3	8	40	+	+	+
MS5	6	37	+	+	+

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- تجزیه و مصرف منابع کربن مختلف چهارسویهٔ مخمر منتخب

سویه‌ها	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7	C_8	C_9	C_{10}	C_{11}	C_{12}	C_{13}	C_{14}	C_{15}	C_{16}	C_{17}	C_{18}	C_{19}	C_{20}	C_{21}	C_{22}	C_{23}	C_{24}	C_{25}	C_{26}	C_{27}
MS1	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	ضعیف	+	-	متغیر	متغیر	متغیر	+	-	-	-	ضعیف با تأخیر	+	+
MS2	ضعیف	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	متغیر	متغیر	-	-	-	-	-	-	-	متغیر با تأخیر
MS3	+	با تأخیر	+	+	+	+	+	+	-	+	ضعیف	+	+	+	+	+	-	متغیر	-	ضعیف با تأخیر	+	-	+	+	ضعیف	-	+
MS5	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	ضعیف	-	+	-	+	-	متغیر	-	-	-	-	-	--	-	-	+

C_1: L-Arabinose, C_2: D-Ribose, C_3: D-Xylose, C_4: L-Sorbose, C_5: D-Fructose, C_6: D-Galactose, D_7: D-Glucose
C_8: D-Mannose, C_9: L-hamnose, C_{10}: Cellobiose, C_{11}: Lactose, C_{12}: Maltose, C_{13}: Melibiose, C_{14}: Sucrose
C_{15}: Trehalose, C_{16}: Raffinose, C_{17}: Cellulose, C_{18}: Inulin, C_{19}: Starch, C_{20}: Ethanol, C_{21}: Glycerol
C_{22}: Inositol, C_{23}: Manitol, C_{24}: Sorbitol, C_{25}: Citrate, C_{26}: Lactate, C_{27}: Gluconate

جدول۵- تجزیه و مصرف منابع نیتروژن مختلف، رشد در محیط‌های بدون ویتامین و هیدرولیز اوره چهار سویه مخمر منتخب

سویه‌ها	KNO_3	$NaNO_3$	L-Lysine	Biotin بدون	Pyridoxin بدون	Tiamin بدون	Vitamin بدون	Urea هیدرولیز
MS1	+	ضعیف	+	+	+	+	+	-
MS2	متغیر	-	+	+	+	+	+	-
MS3	+	-	+	+	+	+	+	-
MS5	ضعیف	-	+	+	+	+	-	-

جدول ۶- تخمیر قندهای مختلف چهار سویه مخمر منتخب

سویه‌ها	L-Arabinose	D-Ribose	D-Xylose	D-Fructase	D-Galactose	D-Glucose	D-Mannose	L-Rhamnose	Cellobiose	Lactose	Maltose	Melibiose	Sucrose	Trehalose	Raffinose	Cellulose	Inulin	Starch
MS1	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS2	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
MS3	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	با تأخیر+	+	+	+	-	-	-
MS5	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

جدول۷- شناسایی براساس توالی‌یابی ژن 28S rDNA چهار سویه مخمر منتخب

سویه‌ها	سویه‌های شناخته شده	Accession Number (سویه‌های شناخته شده)	درصد تشابه
MS1	*Candida albicans WO-1*	AAFO 01000018-1	81%
MS2	*Saccharomyces cerevisiae AWRI1631*	ABSV01001619-1	100%
MS3	*Pichia guilliermondii ATCC6260*	AAFM01000051-1	99%
MS5	*Vanderwaltozyma polyspora DSM70294*	AAZN01000281-1	88%

www.SID.ir

Archive of SID

اتانول محصول عمده و نهایی راه گلیکولیز تحت شرایط بیهوازی در اکثر مخمرها می‌باشد، با این حال هنگامیکه غلظت آن در محیط کشت تخمیربه 4٪(v/v) برسد، رشد مخمرها متوقف می‌شود. Ingram and Buttke (1984), van Uden (1989), Walker (1998) گزارش کردند که اتانول بطور غیررقابتی انتقال قندها،اسیدهای آمینه و دیگر فرآیندهای مرتبط با لیپیدهای غشا را مهار،نفوذپذیری غشا را افزایش و بدین ترتیب استحکام غشا را کاهش می‌دهد و در نهایت عملکرد سلول‌ها مختل می‌شود؛ از این رو اصلی‌ترین عامل محدودکنندهٔ بازده تولید اتانول، اثر بازدارندگی خود اتانول می‌باشد که از نظر اقتصادی از اهمیت زیادی برخوردار است.[۷و۱۶و۱۷]

فاکتور مهم دیگر در فرآیند تولید اتانول، غلظت قندبکار گرفته شده بعنوان سوبسترا در محیط کشت تخمیر می‌باشد. Rehm and Reed (1995) براساس مطالعاتی که در این زمینه داشتند، عنوان کردند که تولید غلظت‌های بالای اتانول مکرراً بدلیل مهار شدن میکروارگانیسم‌ها با غلظت‌های بالای قند محدود می‌شود و علت آن را ایجاد فشار اسمزی بالا و متعاقب آن خروج آب از درون سلول‌های مخمر بیان کردند.[۱۱] Van Uden (1989) با بررسی اثر مهاری سوبسترا بر توانایی تخمیر مخمرها نشان داد که این پدیده عمدتاً بین غلظت‌های (15-25)٪(v/v) از قند رخ می‌دهد؛ از این رو می‌توان اظهار کرد که بین افزایش مقاومت به قند و اتانول در سویه‌های مخمر بکار گرفته شده در فرآیند تخمیر و افزایش تولید اتانول ارتباط مستقیم وجود دارد.[۱۶]

در یک بررسی توسط Osho(2005) ، با روش مشابهی ۱۷ مخمر از شراب Cashew apple جداسازی و در سنجش مقاومت آنها، ۴ سویهٔ مخمر با حداکثر مقاومت به 9٪(v/v) اتانول و 25٪(w/v) قند انتخاب و شناسایی شدند که ۳ سویه به گونه *S.cerevisiae* و ۱ سویه به *S.uvarum* تعلق داشتند.[۱۹]

Nwachukwa et al (2006) نیز در یک روش مشابه از شراب خرما، ۱۳ سویهٔ مخمر مقاوم به اتانول با محدودهٔ مقاومتی بین (10-20)٪(v/v) گزارش کردند که ۹ سویه به گونهٔ *S.cerevisiae* ، ۲ سویه به *S.globosus* و ۱ سویه به *Hanseniaspora uvarum* تعلق داشتند.[۲۰]

در هر دو بررسی مذکور، سویه‌های منتخب بعنوان سویه‌های مقاومت به قند و اتانول و مناسب جهت کاربرد صنعتی معرفی شده‌اند. در تطابق با این دو مطالعه، Odunfa and Ekunsanmi (1990) اظهار داشته‌اند که در انتخاب یک مخمر برای بکارگیری در صنعت، به‌ویژه در تولید اتانول، مقاومت آنها به قند و اتانول یک برتری فیزیولوژیکی محسوب می‌شود.[۲۱]

از میان ۴۰ مخمر جداسازی شده در این پژوهش مطابق با جدول (۳)، ۴ سویهٔ MS1 ,MS2 ، MS3، MS5 که هم مقاوم به غلظت‌های بالای 4٪(v/v) اتانول و هم محیط‌های با فشار اسمزی بالا بودند، انتخاب شدند. با استفاده از 28S rDNA Ribotyping، مطابق با جدول (۷) معلوم شد که سویهٔ MS2 به گونهٔ *Saccharomyces cerevisiae*، MS3 به *Pichia guilliermondii* و دو سویهٔ MS1 و MS5 به گونه، جنس یا حتی سطوح تاکسونومی بالاتر جدید تعلق دارند.

اخیراً یکی از زمینه‌های پژوهش در جهت افزایش تولید اتانول بعنوان سوخت، استفاده از مواد سلولزی و هیدرولیز آنها به قندها و تولید اتانول از آنها بطور همزمان می‌باشد. در این فرآیند آنزیم و

www.SID.ir

Archive of SID

میکروارگانیسم همزمان به محیط کشت اضافه می‌شوند، بدلیل اینکه عملکرد بهینهٔ آنزیم‌های هیدرولیز کننده در دمای 45^oC و به بالا می‌باشد، میکروارگانیسم‌هایی که توانایی رشد در چنین حرارت‌هایی یا نزدیک به آن را داشته باشند، (دماهای بالای 40^oC) دیگر نیازی به کاهش دادن زیاد دما جهت رشد آنها نبوده و موجب خواهند شد تا آنزیم در شرایط نزدیک به دمای بهینه قرار داشته و قندهای بیشتری در واحد زمان تولید کند که با تخمیر آنها محصول نهایی یعنی اتانول نیز افزایش می‌یابد.[۲۲ - ۲۴] Szezodrak and Targonski (1998) برای جداسازی میکروارگانیسم‌های مقاوم به حرارت بالای 40^oC ، ۵۸ سویه را مورد آزمایش قرار دادند و از میان آنها توانستند *Fabospora fragilis* را که هم تولیدکنندهٔ اتانول و هم قادر به رشد در 43^oC بود را شناسایی کنند.[۲۵]

از میان مخمرهای جداسازی شده، سویهٔ MS1 با توانایی رشد در 42^oC و MS3 در 40^oC می‌توانند مورد مناسبی برای این منظور باشند.

طبق اظهارات Walker (1998) و Ingledew (1993) ، بدلیل اینکه از هیدرولیز مواد سلولزی قندهای مختلفی نیز بهمراه گلوکز از جمله زایلوز، سلوبیوز، آرابینوز، گالاکتوز و غیره حاصل می‌شوند، سویه‌های مخمری که قادر به تخمیر قندهای متنوع علاوه بر گلوکز باشند، موجب کارآیی بالای فرآیند تولید اتانول خواهند شد[۶و۷]. از میان سویه‌های منتخب، سویهٔ MS5 با توانایی تخمیر سلوبیوز و سویه‌های MS2 و MS3 با تخمیر قندهای متنوع، مطابق با جدول (۶) سویه‌های مفیدی برای این مورد می‌باشند.

مطابق با جداول (۴) و (۵)، به استثنای سویهٔ MS5 ، سویه‌های منتخب با محیط‌های کشت فاقد تمامی ویتامین‌ها سازگاری نشان دادند و هر ۴ سویه توانایی تجزیه و مصرف تعدادی از منابع کربن مختلف و منبع‌های نیتروژنی بجای سولفات آمونیوم ـ منبع نیتروژنی معمول برای مصرف مخمرها ـ را داشتند که مؤید توانمندی فیزیولوژیکی آنها است که در محیط‌های سادهٔ غذایی و منابع کربن و نیتروژن جایگزین شده، قادر به رشد و تخمیر می‌باشند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این بررسی نشان داد که سویه‌های MS1، MS2، MS3 و MS5 با رشد در حضور غلظت‌های بالای 4% از اتانول، محیط‌های با فشار اسمزی بالا و دماهای بالای 40^oC (سویه‌های MS1 و MS3)، تخمیر قند گلوکز، قندهای متنوع (توسط سویه‌های MS2 و MS3) و سلوبیوز (توسط سویهٔ MS5) جهت تولید اتانول از پتانسیل قابل توجهی برخوردارند؛ با شناسایی آنها مشخص شد که سویهٔ MS2 به گونهٔ *Saccharomyces cerevisiae* و سویهٔ MS3 به گونه *Pichia guilliermondii* تعلق دارند و برای معرفی جنس و گونهٔ سویه‌های MS1 و MS5 نیاز به بررسی‌های بیشتر می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به اینکه چهار سویهٔ مخمر منتخب بطور طبیعی و بدون هیچ‌گونه اصلاحاتی مثل دستکاریهای ژنتیکی دارای قابلیت‌های فیزیولوژیکی مؤثر برای تولید اتانول می‌باشند و بعلت اهمیت اخیر استفاده از اتانول بعنوان سوخت بویژه د ر بخش حمل و نقل، امید است که در پژوهش‌های فراتر در زمینه بهبود و پیشرفت فرآیندهای تولید اتانول نقش مفید و کاربردی داشته باشند.

References:

1. Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., and Zacchi, G., *Trends Biotechnol.*, **24**, 549 (2006).
2. Campbell, C.J., and Laherrere, J.H., *Sci. Am.*, **3**, 78 (1998).
3. Sun, Y., and Cheng, J., *Bioresour. Technol.*, **83**, 1 (2002).
4. Badger, P.C., *Trends in New Crops and New Uses*, Janick, J., Whipkey, A., eds., A.S.H.S. Press, Alexandria (2002).
5. Solomon, B.D., Barens, J.R., and Halvorsen, K.E., *Biomass Bioenerg.*, **31**, 416, (2007).
6. Ingledew, W.M., *The Yeasts*, Rose, A.H., and Harison, J.S., eds., Academic Press, London, (1993).
7. Walker, G.M., *Yeast*, *Physiology and Biotechnology*, John Wiley and Sons, ltd., England (1998).
8. Bekatorou, A., Psarianos, C., and Koutinas, A.A., *Food Technol. Biotechnol.*, **44**, 407, (2006).
9. Benitez, T., and Codon, A.C., *Handbook of Fungal Biotechnology*, Arora, D.K., eds., Spain, (2004).
10. Kurtzman, C.P., and Piskur, J., *Using Fungi as Models*, Sunner Hagen, P., Piskur, J., eds., Springer, Berlin (2006).
11. Soudi, M.R., *Applied Microbiology: Fermentation Process, Theory and Experiment*, Alzahra University Press, Tehran (1999).
12. Hoffman, C.S., Winston, F., *Gene.*, **57**, 267 (1987).
13. Vasdinyei, R., and Deak, K.T., *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 123 (2003).
14. Inácio, J., Rodrigues, M.G., and Sobral, P., Fonseca, A., *FEMS. Yeast Res.*, **4**, 541 (2003).
15. Voigt, K., and Cigelink, E., O'Donnell, K.J., *Clin. Microbiol.*, **37**, 3957 (1999).
16. Van Uden, N., *Alcohol Toxicity in yeast and Bacteria*, Boca Raton, F.L., eds., C.R.C. Press, Inc. (1989).
17. Ingram, L.O., and Buttke, T.M., *Adv. Microb. Physiol.*, **25**, 253 (1984).
18. Rehm, H.J., Reed, G., and Weinheim, V.C.H., *Biotechnol*., Verlagsgesell Schaft GmbH., Germany (1995).
19. Osho, A., *Afr. J. Biotechnol.*, **4**, 660, (2005).
20. Nwachukwu, I.N., Ibekwe, V.I., Nwabueze, R.N., and Anganwu, B.N., *Afr. J. Biotechnol.*, **5**, 1725 (2006).
21. Odunfa, S.A., and Ekunsanmi, T.J., *J. Appl. Bact.*, **69**, 672 (1990).
22. Hari-Krishna, S.H., Janardhan Reddy, T., and Ghowdary, G.V., *Bioresour. Technol.*, **77**, 193 (2003).
23. Godfrey, T., and Reichelt, J., *Industrial Enzymology*, Macmillaness Press, London (1996).
24. Spindler, D.D., Wyman, C.E., and Grohmann, K., *Biotechnol. Bioeng*, **34**, 189, (1989).
25. Szezodrak, J., and Targonski, Z., *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 300 (1998).

www.SID.ir