Archive of SID

بررسی رشد و تولید CO_2 در سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* مناسب برای تولید مخمر نانوایی

محسن گلابی[1*]، منوچهر توسلی[2]، ایرج نحوی[3]، محسن مبینی دهکردی[4]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، موسسه آموزش عالی غیر انتفاعی غیر دولتی راغب اصفهانی.
۲- استادیار و هیات علمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان.
۳- استاد و هیات علمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان.
٤- استادیار و هیات علمی گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد.
(تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۱۲ ،تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۱٦)

چکیده

در این تحقیق میزان تولید CO_2 توسط نمونه‌های مختلف پودرهای تجاری مخمر نانوایی بعنوان شاخصی از قدرت تخمیر آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و اختلاف در کیفیت و قدرت فرآوری محصولات مشاهده گردید در ادامه سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* از نمونه‌های تجاری جداسازی شد و با استفاده از محیط-های مایع مشابه خمیر و سامانه‌ی اندازه‌گیری تولید گاز در محیط مایع، قدرت تخمیر کنندگی این سویه‌ها مقایسه گردید. میزان تولید CO_2 توسط سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* در مقایسه با یک سویه‌ی استاندارد این گونه‌ی مخمری نشان‌دهنده‌ی این واقعیت بود که تولید سریع CO_2 مهمترین شاخصه‌ی یک سویه‌ی مطلوب *ساکارومایسس سرویزیه* برای تولید مخمر نانوایی است. بکارگیری محیط مایع مشابه خمیر و سامانه‌ی اندازه‌گیری تولید گاز در محیط مایع بعنوان روشی کارآمد و سریع در مقیاس آزمایشگاهی برای غربال‌گری و شناسایی سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* مناسب به منظور تولید مخمر نانوایی شناخته شد. سویه‌هایی که نسبت به فشار اسمزی مقاومتر باشند در محیط ساختگی مایع مشابه خمیرهای شیرین (High sucrose) دارای فعالیت تخمیری بالاتری هستند این سویه‌ها به منظور تولید مخمرهای نانوایی مناسب در فرآوری محصولات قنادی پیشنهاد می‌شوند. سویه‌ی K با تولید میزان مناسب توده‌ی زیستی و همچنین میزان بالای تولید CO_2 در محیط مایع مشابه خمیرهای معمولی (Moderate sugar) به عنوان یک سویه‌ی ایده‌آل برای تولید مخمرهای نانوایی شناسایی شد. این سویه به دلیل توانایی بالای تولید CO_2 در محیط High sucrose بعنوان یک مخمر نانوایی علاوه بر فرآوری خمیرهای معمولی دارای قابلیت کاربردی وسیعی در فرآوری محصولات قنادی می‌باشد.

کلید واژگان: مخمر نانوایی، CO_2 ، *ساکارومایسس سرویزیه*، محصولات قنادی

۱- مقدمه

استفاده‌ی انسان از مخمرها در تولید محصولات غذایی سابقه‌ای ۹۰۰۰ ساله دارد. مصریان باستان با به کارگیری توده‌ی زیستی حاصل از تولید آبجو (که از مخمرهای جنس *ساکارومایسس* تشکیل شده است)، نان‌های با کیفیت تولید می‌کردند. این کاربرد تا اواخر قرن نوزدهم به همین شکل ادامه داشت تا اینکه توانایی خالص سازی این سویه‌ها منجر به تولید محصولی با عنوان مخمر نانوایی شد [۳-۱]. تولید مخمر نانوایی بعنوان یک محصول تجاری سریعاً رشد و توسعه پیدا کرد به نحوی که در اواخر قرن بیستم میزان تولید سالانه آن به حدود ۲ میلیون تن و ارزشی بالغ بر ۲ میلیارد دلار رسید [٤]. سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* که به عنوان مخمر نانوایی مورد استفاده

* مسئول مکاتبات: Mohsen.Golabi@Gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

قرار می‌گیرند می‌بایست متابولیسم تنفسی را بخوبی انجام دهند و سرعت تکثیر بالایی داشته باشند. این خصوصیات در مرحله تولید توده‌ی زیستی در صنایع تولید کننده‌ی مخمر نانوایی اهمیت دارد. همچنین باید از قدرت تخمیری خوبی برخوردار باشند. در حقیقت اصلی‌ترین وظیفه مخمر در هنگام به‌کارگیری در تولید نان و محصولات مرتبط، تولید گاز دی اکسیدکربن به منظور افزایش حجم محصول است که این امر منجر به توسعه شبکه پروتئینی موجود در خمیر (گلوتن) شده و در نهایت منجر به پخت مناسب و اعطای حالت تردی به نان می‌شود. همچنین مخمرها با تولید متابولیت‌های جانبی، منجر به ایجاد طعم و عطر مطبوع در محصول می‌شود [۵ و۶]. خصوصیات و ویژگی‌های صنعتی سویه‌های مناسب در تولید مخمر نانوایی از گونه‌ی *ساکارومایسس سرویزیه* در مقایسه با سویه‌های صنعتی تولیدکننده‌ی بیواتانول و سویه‌های آزمایشگاهی این مخمر بسیار متفاوت می‌باشد [۷ و۸]. از این‌رو تعیین خصوصیات و ویژگیهای شاخص سویه‌های میکروبی مورد استفاده در هر صنعت به منظور شناسایی و جداسازی سویه‌های ایده‌آل برای آن صنعت از نظر اقتصادی بسیار با اهمیت می‌باشد [۹ و۱۰]. مخمرهای نانوایی علاوه بر استفاده در تولید نان، در فرآوری محصولات قنادی نیز به کار می‌روند اما وجود قند در خمیرهای شیرین سبب افزایش فشار اسمزی محیط خمیر شده که منجر به کاهش فعالیت مخمرها می‌شود در نتیجه به‌کارگیری مخمرها در تولید محصولات قنادی با محدودیت روبروست. اما سویه‌های مخمری که از مقاومت بالاتری به فشار اسمزی برخوردار باشند به منظور فرآوری این گروه از محصولات غذایی مطلوب‌تر هستند [۱۲و۱۱]. میزان تولید CO_2 در محیط‌های ساختگی مایع مشابه خمیر در شرایط آزمایشگاهی شاخصی از قدرت تخمیر یک سویه در شرایط حضور در خمیر است [۱۴و۱۳]. به‌کارگیری این محیطها دارای مزیت‌هایی نسبت به اندازه‌گیری قدرت تخمیر در محیط خمیر می‌باشد. از جمله می‌توان به کوچک بودن مقیاس آزمایش و در نتیجه تسهیل آن و توان افزایش تکرارها در آزمایش شده که منجر به افزایش دقت در نتایج حاصل می‌گردد [۱۶-۱۴]. همچنین به کارگیری محیط خمیر بدلیل حضور ریزسازواره‌های ناخواسته‌ی موجود در آرد می‌تواند منجر به ایجاد خطا در آزمایش شود [۱۷]. از طرفی با توجه به اینکه در هر منطقه ترکیبات و مواد مغذی موجود در آرد متفاوت است، بنابراین به کارگیری محیط مایع مشابه خمیر بدون داشتن این عوامل خطاساز در همه‌ی نقاط شرایط یکسانی را برای مقایسه سویه‌های مخمری فراهم می‌آورد. محیط مایع مشابه خمیرهای معمولی (Moderate sugar) حاوی قندهای قابل تخمیر (برای مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*) در حدی است که در خمیرهای معمولی وجود دارد. وجود سوربیتول در این محیط سبب ایجاد فشار اسمزی در حد خمیرهای معمولی می‌شود. محیط مایع مشابه خمیرهای شیرین (High sucrose) حاوی قندهای موجود در خمیر شیرین است و وجود سوربیتول سبب ایجاد فشار اسمزی در حد فشار اسمزی موجود در خمیرهای شیرین می‌شود همچنین مواد معدنی و ویتامین‌های موجود در این محیط ساختگی مشابه با محیط خمیر طراحی شده است [۱۶و۱۵و۱۳]. هدف از این تحقیق بررسی ویژگی‌های شاخص سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* به منظور شناخت ویژگی‌های کلیدی یک سویه‌ی صنعتی مناسب برای تولید مخمر نانوایی و ارائه‌ی روش‌های آزمایشگاهی سریع و کارآمد در بررسی نمونه‌های تجاری و آزمایشگاهی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌های مخمر تجاری و ریزسازواره‌های مورد استفاده

شش نمونه پودر مخمر نانوایی تجاری خشک فعال در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. چهار نمونه‌ی آن تولید شده توسط شرکت‌های تجاری ایرانی و دو نمونه‌ی آن خارجی بود. به منظور جداسازی سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه*، از هر نمونه‌ی تجاری، ۱ گرم در آب مقطر سترون حل‌شد و پس از تهیه‌ی سری رقت در محلول آب پپتونه‌ی سترون از رقت 10^{-5} در محیط جامد YPD (گلوکز۲٪ ,پپتون ۲٪ ,عصاره مخمر ۱٪) کشت انجام گرفت و در دمای $30^{\circ}C$ به مدت ۲-٤ روز گرمخانه گذاری گردید. پرگنه‌های بدست آمده خالص سازی شد و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی

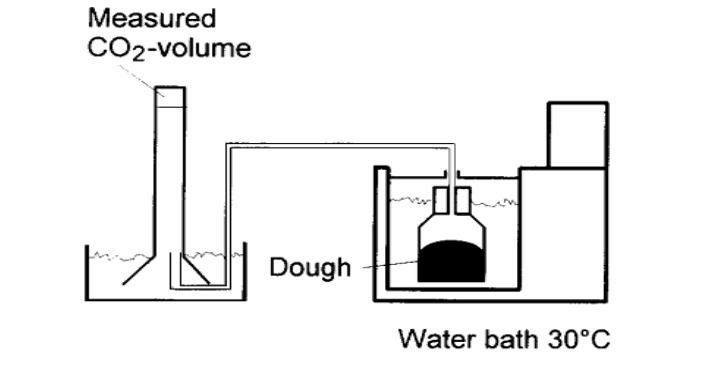
www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی جنس و گونه‌ی مخمرها انجام گرفت. توانایی مصرف اتانول، تولید رنگدانه، تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، گالاکتوز، لاکتوز و ساکاروز مهمترین آزمون‌های انجام شده در شناسایی گونه‌ی مخمرها بود. برای تعیین توانایی مخمرها در تخمیر قندهای مورد نظر از محیط کشت پایه که حاوی ۰/۳ ٪ عصاره‌ی مخمر، ۰/۵٪ پپتون، معرف برومو تیمول بلو و قند مورد نظر در غلظت ۲٪ می‌باشد، استفاده شد. یک پرگنه‌ی تازه از مخمر مورد نظر به لوله‌ی آزمایش حاوی ٤/٥ml محیط مربوطه تلقیح شد و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۸°C گرمخانه‌گذاری شد. پس از این مدت تولید گاز در لوله‌ی درهام، ایجاد کدورت و تغییر pH مورد ارزیابی قرار گرفت. رشد یا عدم رشد گونه‌ها در محیط جامد ALP (Aerobic low peptone) (آگار ۱/۵٪ ، سولفات آلومینیوم ۰/۱٪ ، کازئین آبکافت شده ۰/۵٪ ، عصاره‌ی مخمر ۰/۰۵٪ ، سولفات آلومینیوم ۰/۲٪ ، کلرید پتاسیم ۰/۰۲٪ ، فنل رد ۰/۰۲٪) که حاوی ۲٪ (حجم/حجم) اتانول بود، پس از گرمخانه‌گذاری در ۲۸°C به مدت ٤٨ ساعت بررسی شد [۱۹]. بررسی ویژگی‌های مورفولوژی مخمرهای رشد کرده در محیط جامد YPD و تولید رنگدانه و هیف مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۸]. در نهایت سویه‌های بدست آمده با حروف K، M، F، I، R و S نام‌گذاری شدند [۲۷]. همچنین سویه‌ی استاندارد *ساکارومایسس سرویزیه* از کلکسیون میکروبی ایران (PTCC) با کد ۵۰۸۰ (بعنوان یک سویه‌ی شاهد غیر صنعتی) با عنوان سویه‌ی P در این تحقیق مورد آزمایش قرار گرفت.

۲-۲- بررسی قدرت تخمیر نمونه‌های تجاری

خمیر با استفاده از ۲۰ گرم آرد سفید (آرد 000 شرکت افخم)، ۱۰ میلی لیتر آب مقطر، ۰/٤ گرم نمک و ۱ گرم پودر مخمر تهیه شد. برای تهیه خمیرشیرین به محیط فوق ساکاروز در غلظت ۱۰،۲۰و ۳۰ درصد (برحسب وزن آرد) اضافه شد . خمیر تهیه شده پس از یکنواخت شدن بوسیله قاشقک فلزی (به مدت ۲ دقیقه) به سامانه اندازه گیری تولید CO_2 انتقال یافت. تصویر شماتیک این سامانه در شکل ۱ نمایش داده شده است. خمیر در این سامانه در دمای ۳۰°C قرار گرفت و CO_2ی تولید شده در مدت زمان ۱۵۰ دقیقه اندازه-گیری شد. تجربیات آزمایشگاهی ما نشان‌داد که این سامانه‌ی طراحی شده به دلیل کم حجم بودن و دقت بالا در شرایط آزمایشگاهی بسیار کاراتر از دستگاه فرمانتومتر(دستگاه متداول اندازه‌گیری CO_2 تولید شده توسط خمیر در صنعت) می‌باشد.



شکل ۱ تصویر شماتیک از سامانه اندازه‌گیری CO_2ی تولید شده در خمیر

۲-۳- محیط‌های مایع مشابه خمیر

در این تحقیق از دو نوع محیط مایع مشابه خمیر Moderate sugar و High sucrose استفاده گردید که طبق روش می‌یرز و همکاران ساخته شد [۱۳]. این محیط‌ها حاوی ۳/. گرم کازوآمینواسید، ۲/۳ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۸ گرم $(NH_4)_2SO_4$ ، ۰/۷۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$ ، ۰/۱ گرم $CaCl_2$، ۱/٤٥ گرم اسیدسیتریک، ۱۲/۱۷ گرم تری سدیم سیترات، ۱۰ میلی‌گرم تیامین HCl، ۱۰ میلی-گرم پیریدوکسین HCl، ۵۱ میلی‌گرم نیکوتینیک اسید، ۲۰ میلی‌گرم کلسیم پانتوتنات و ۰/۲۵ میکروگرم بیوتین در لیتر به عنوان محیط پایه معدنی و ویتامین بود. علاوه بر این، محیط مایع مشابه خمیرهای معمولی (Moderate sugar) حاوی ۱۲ گرم کلرید سدیم، ٤٥ گرم سوربیتول، ۲٦ گرم گلوکز، ٦/ ۰ گرم فروکتوز، ۲ گرم ساکاروز و ۲۰ گرم مالتوز در لیتر بود و محیط مایع مشابه خمیرهای شیرین (High sucrose) حاوی ٦ گرم کلرید سدیم، ١٦٥ گرم سوربیتول، ۲٦ گرم گلوکز، ۰/٦ فروکتوز، ۳۰۰ گرم ساکاروز و ۲۰ گرم مالتوز در لیتر بود. این محیط‌ها توسط دستگاه میلی پور سترون شد [۱۹].

www.SID.ir

Archive of SID

۲-٤- سامانه طراحی شده برای اندازه گیری میـزان تولید گاز در محیط‌های مایع

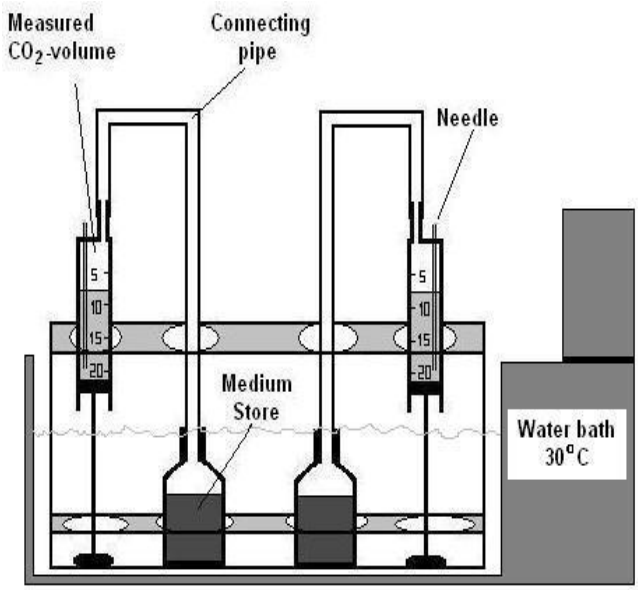
این سامانه از سه قسمت تشکیل شده است:

۱- مخزن حاوی محیط کشت و مخمر.

۲- لوله‌ی رابط که انتقال دهنده‌ی گاز تولید شـده در محـیط مـایع می‌باشد.

۳- سرنگ محتوی آب که محل جمع‌آوری گاز تولیدی است.

محیط کشت حاوی مخمرها به مخزن شیشه‌ای انتقال داده می‌شود. درپوش و لوله‌ی رابط، این مخزن را به سرنگ محتوی آب متصل می‌کند. گاز CO_2ی تولیدی توسط ریزسازواره‌ها بوسیله لوله‌ی رابط به درون سرنگ وارده شده و جایگزین آب داخل سرنگ می‌گـردد. آب جایگزین شده توسط CO_2 از طریق سوزن واقع در سرنگ به بیـرون هدایت می‌شود. چندین عدد از این سامانه در یک جـا لولـه‌ای ثابـت شده و در گرمخانه و یا حمام آب گرم با دمای ۳۰° C قرار می‌گیرد.



شکل ۲. سامانه‌ی طراحی شده برای اندازه‌گیری میزان تولید گاز در محیط‌های مایع

۲-٥- بررسی منحنی رشد سلولی

بررسی منحنی رشد سلولی در محیط YPD و محـیط YPD کـه حاوی غلظتهای ۱۰ ، ۲۰، ۳۰ و ۳۵ درصد گلوکز بود انجام شد. هر سویه‌ی مخمری ابتدا در محیط YPD بمـدت یـک روز کـشت شـد سپس این محیط کشت با محیط کشت YPD تازه و سـترون رقیـق شد تا جذب نوری در ٦۲۰ nm معادل با ۰/۷ شـود. از ایـن محـیط کشت مقدار ۱۰۰µl به ۲۵ ml محیط کشت YPD و محیط کشت‌هـای YPD حـاوی درصـدهای متفـاوت گلـوکز اضـافه گردیـد و گرمخانه‌گذاری در ۳۰°C و ۱۵۰rpm انجام شد. تمامی آزمـایش‌هـا حداقل در سه تکرار انجام شد و جذب نوری هـر ٦ سـاعت در nm ٦۲۰ ثبت گردید [۲۰]. در تمامی محیط کشت‌هایی که حاوی مقـادیر قندی بالاتر از ٪۲ بود، سترون کردن محیط کشت توسط فیلتراسیون با استفاده از دستگاه میلی پور انجام گرفت..

۲-٦- بررسی میزان فعالیت سویه‌های مخمـری در محیط مایع مشابه خمیر

سلول‌های مخمر در YPD به مدت ٤۸ ساعت کشت شدند. از این سوسپانسیون نمونه‌های ۵ میلی لیتـری تهیـه و سـانتریفوژ (۳۰۰۰ g، ۵min) گردید. مایع رویی دور ریخته شد و توده‌ی زیستی باقیمانده در ۵ میلی لیتر محیط مایع مشابه خمیر حل شـد و بـه سـامانه انـدازه گیری تولید CO_2 منتقل گردید. از محیط کشت اولیـه نمونـه‌هـای ۵ میلی لیتری به منظور محاسبه میزان وزن خشک موجود در این مقـدار سوسپانسیون سلولی تهیه شد و در نهایت پس از انـدازه‌گیـری میـزان گاز تولید شده توسط مخمرها طی ۱۲۰ دقیقه، این میزان برحسب گاز CO_2ی تولید شده توسط هر گرم وزن خشک سلولی برای هر سـویه محاسبه و گزارش گردید.

۲-۷- تجزیه وتحلیل داده‌های آماری

به منظور انجام تحلیل‌های آماری از روش‌هـای آزمـون t و تجزیـه واریانس استفاده گردید و میزان معنا داری توسط آزمون دانکن تعیین شد. در نهایت با استفاده از نرم افزار SPSS 13.0.0 عملیات آماری انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

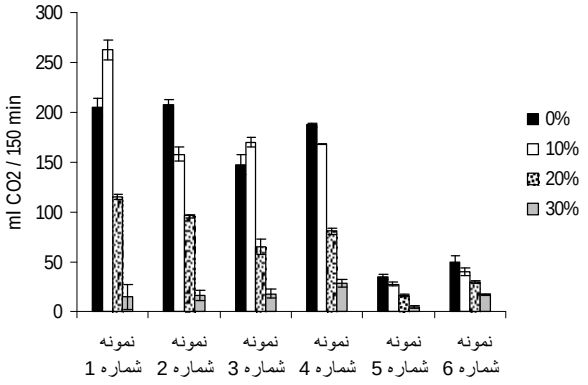
۳-۱- بررسی قدرت فرآوری خمیر توسط نمونـه‌های مخمر تجاری

نمونه‌های مختلف پودرهای تجاری مخمر نـانوایی، میـزان فعالیـت متفاوتی را در محیط فاقـد سـاکاروز نـشان دادنـد. بـالاتر بـودن ایـن شاخص توسط یک نمونه تجاری در روش انجام گرفته نشان‌گر بالاتر بودن کیفیت آن نمونه در فرآوری خمیرهای معمولی می‌باشد. قـدرت

www.SID.ir

Archive of SID

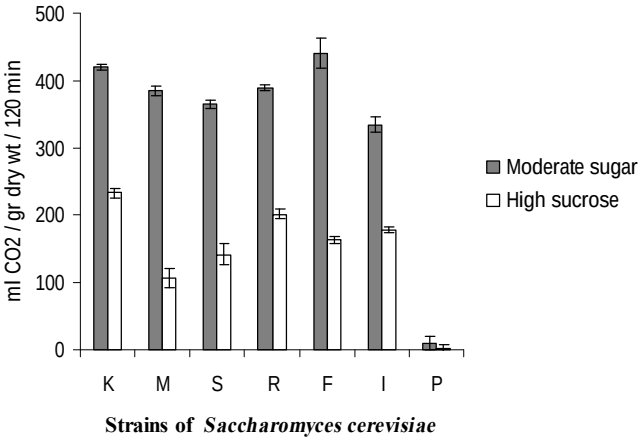
تخمیر مخمرهای نانوایی در خمیر توسط فشار اسمزی ناشی از آرد، نمک و بخصوص قندها کاهش می یابد. وجود قند در غلظت‌های بالا سبب ایجاد فشار اسمزی در محیط خمیر شده که منجر به خروج آب داخل سلولی مخمرها می‌شود در نتیجه فعالیت و قدرت تخمیر در این سلول‌ها کاهش می‌یابد [۲۱]. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود میزان تولید CO_2 در خمیر فاقد ساکاروز توسط نمونه‌های ۱،۲ و ٤ نسبت به دیگر نمونه‌ها بیشتر است که بیانگر کیفیت بالاتر این نمونه‌ها می‌باشد. با افزایش ده درصدی ساکاروز به محیط خمیر میزان تولید CO_2 توسط نمونه‌های ۱و ۳ در مقایسه با خمیر فاقد ساکاروز افزایش یافته در صورتی که در دیگر نمونه‌ها افزایش ساکاروز منجر به کاهش فعالیت تخمیری مخمرها شده است که بیانگر بالاتر بودن نسبی مقاومت به فشار اسمزی این دو نمونه نسبت به دیگر نمونه‌ها است. نمونه‌های مخمرهای تجاری که از میزان مقاومت بالاتری به فشار اسمزی برخوردارند برای کاربرد در صنایع قنادی مناسب هستند و نمونه‌هایی که از قدرت تخمیری بالاتری در محیط خمیرهای معمولی برخوردارند مطلوب برای کاربرد در صنایع تولید نان صنعتی می‌باشند [۲۲]. افزایش ساکاروز در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد به شدت منجر به کاهش فعالیت تخمیری نمونه‌ها شده است و بنظر می‌رسد نمونه‌های موجود به منظور فرآوری محصولاتی که حاوی مقادیر بالایی از قند باشند ناکارآمد هستند. روش انجام گرفته و سامانه‌ی معرفی شده در این تحقیق علی‌رغم سادگی توانایی بالایی در تفکیک قدرت تخمیر و کیفیت نمونه‌های تجاری دارد.



شکل۳ میزان تولید CO_2 بر حسب میلی لیتر در خمیر معمولی و خمیرهای حاوی غلظت‌های مختلف ساکاروز توسط پودرهای مخمر نانوایی تجاری در مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای ۳۰°C

۳-۲- بررسی قدرت تخمیر سویه‌های مخمری در مقیاس آزمایشگاهی

در شکل شماره٤ میزان فعالیت سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط‌های مایع مشابه خمیر نشان داده شده است. در محیط Moderate sugar اختلاف میزان فعالیت دو سویه‌ی F و K با دیگر سویه‌ها در سطح ۵٪ معنا دار است ($p<0.05$). همچنین میزان فعالیت سویه‌ی K در محیط High sucrose با دیگر سویه‌ها در سطح ۱٪ معنا دار است ($p<0.01$). به دلیل بالاتر بودن فشار اسمزی محیط High sucrose نسبت به محیط Moderate sugar ، قاعدتا کاهش فعالیت تخمیری و تولید CO_2 توسط نمونه‌های مخمری انتظار می‌رود اما این کاهش فعالیت در سویه‌های مختلف به یک نسبت نیست، سویه‌ی K کمترین میزان کاهش را در مقایسه با سویه‌های دیگر نشان می‌دهد که نشان‌دهنده‌ی مقاومت بیشتر به فشار اسمزی در این سویه نسبت به دیگر سویه‌های مورد آزمایش است.



شکل٤ میزان تولید CO_2 بر حسب میلی‌لیتر برگرم وزن خشک سلولی در مدت ۱۲۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای ۳۰°C در محیط‌های مایع مشابه خمیر توسط سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* از نژاد مخمر نانوایی و سویه‌ی استاندارد *ساکارومایسس سرویزیه* (سویه‌ی P).

دو سویه‌ی K و F بالاترین میزان تولید CO_2 را در میان سویه‌های صنعتی نشان دادند. تولید CO_2ی بسیار پایین توسط سویه‌ی P در این شرایط (بعنوان یک سویه‌ی شاهد) بخوبی نشان دهنده‌ی تفاوت ویژگی‌های خاص سویه‌های صنعتی مورد کاربرد بعنوان مخمر نانوایی

www.SID.ir

Archive of SID

در مقابل سویه‌های دیگر گونه‌ی *ساکارومایسس سرویزیه* می‌باشد. هر چند سویه‌های صنعتی مورد استفاده به عنوان مخمر نانوایی نیز با یکدیگر در میزان تولید CO_2 متفاوت می‌باشند اما این تفاوت در مقایسه با سویه‌ی P به شدت چشمگیر است که نشاندهنده‌ی شاخصه‌ی تولید سریع و زیاد CO_2 توسط سویه‌های مطلوب صنعتی مورد استفاده در تولید مخمر نانوایی می‌باشد. میزان فعالیت سویه‌ها در محیط High sucrose تفکیک کننده‌ی سویه‌ها در توانایی تخمیر در محیط‌هایی با فشار اسمزی بالا می‌باشد. به کارگیری محیط مایع حاوی مقادیر قند بالا و مقایسه‌ی قدرت تخمیر در این محیط به منظور شناسایی سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* مناسب به منظور به کارگیری در خمیرهای شیرین یک روش کاربردی می‌باشد [۱۲و۱٤]. در سویه‌های صنعتی مورد آزمایش، سویه‌ی K بالاترین قدرت تخمیر را نسبت به دیگر سویه‌ها در محیط High sucrose نشان داد. بنابراین در میان سویه‌های مورد آزمایش سویه‌ی K بعنوان قویترین سویه‌ی تخمیر کننده در شرایط خمیر شیرین شناخته شد.

۳-۳- بررسی منحنی رشد سلولی

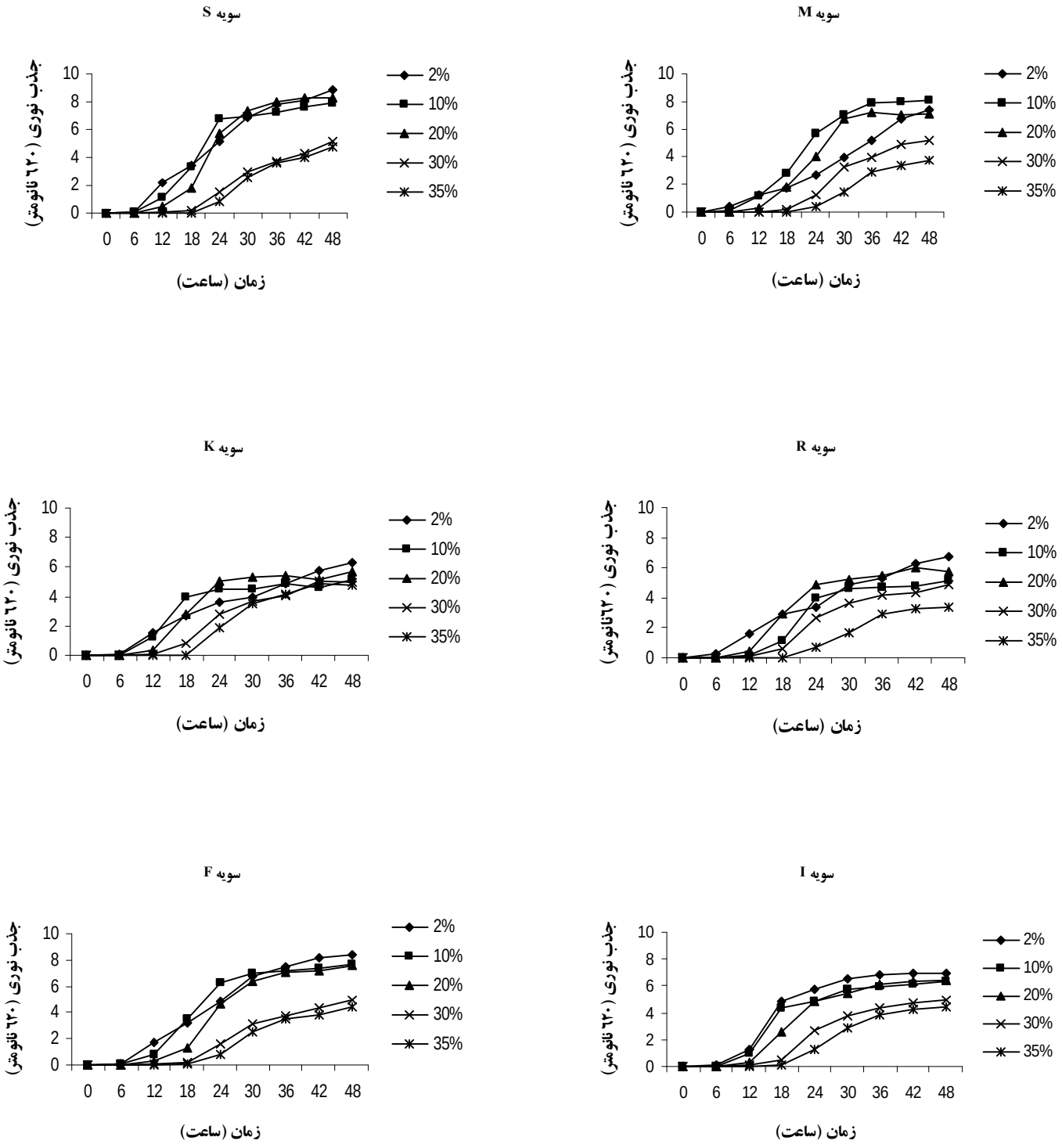
یکی از ویژگی‌های مهم صنعتی یک سویه‌ی مناسب *ساکارومایسس سرویزیه* به منظور تولید مخمر نانوایی، سرعت تکثیر و توانایی تولید توده‌ی زیستی می‌باشد. سوبستراهای مورد استفاده در تولید صنعتی این محصول حاوی غلظت‌های بالای قند می‌باشد. حضور غلظت‌های بالای گلوکز در محیط کشت علاوه بر ایجاد فشار اسمزی سبب سرکوب مسیرهای متابولیکی گلوکونئوژنز، تنفسی و جذب قندهای دیگر از طریق جلوگیری از بیان ژن در این مسیرها می‌شود. قطع مسیر تنفسی و چرخه‌ی TCA در این شرایط به اثر کرب‌تری (Crabtree effect) معروف است [۲٤و۲۳]. با توجه به منحنی رشد سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* که در شکل ۵ نشان داده شده است افزایش میزان قند در محیط‌های کشت، در تمامی سویه‌ها منجر به افزایش فاز تاخیر منحنی رشد گردیده و همچنین کاهش در میزان نهایی تولید توده‌ی زیستی پس از مدت ٤۸ ساعت مشهود است. تفاوت منحنی رشد در دو غلظت ۲۰ و ۳۰ درصد گلوکز در سویه‌های F, S, M و I معنی دار است اما در سویه‌ی K و R این اختلاف در میزان توده‌ی زیستی تولید شده پس از ٤۸ ساعت در این دو سویه در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد معنی دار نیست. همچنین اگرچه افزایش غلظت قند در محیط کشت بطور کلی سبب افزایش فاز تأخیر منحنی رشد در تمامی سویه‌ها می‌شود اما تاثیر این عامل در سویه‌های R و K متفاوت از دیگر سویه‌ها می‌باشد به صورتی که در غلظت ۳۰٪ فاز تاخیر در این دو سویه برابر با ۱۲ ساعت بوده اما در دیگر سویه‌ها نزدیک به ۱۸ ساعت می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی توانایی بالاتر این دو سویه در تطابق با شرایط فشار اسمزی بالا و مقاومت بالاتر به فشار اسمزی است.

مطالعات نشان‌داده سویه‌هایی از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* که سیلان گلیکولیتکی (Glycolytic flux) قویتری دارند، نسبت به سویه‌های دیگر از توانایی بالاتری برای فعالیت در خمیرهای شیرین و تطابق با محیط‌های حاوی فشار اسمزی بالا برخوردار هستند [۲۵]. این مطالعات با مشاهدات ما از رفتار دو سویه‌ی R و K در میزان فعالیت در محیط High sucrose و تطابق سریعتر در محیط حاوی ۳۰٪ گلوکز با یافته‌های ذکر شده تطابق دارد. بررسی منحنی رشد سویه‌های مخمر وحشی مقاوم به فشار اسمزی از گونه‌ی *ساکارومایسس سرویزیه* که از یک گیاه استوایی بنام Apple Cashew توسط اوشو در سال ۲۰۰۵ جداسازی شد نشان داد که مخمرهای مقاوم جداسازی شده در غلظت‌های ۱۵٪ و ۲۰٪ گلوکز بیشترین میزان تولیدتوده‌ی زیستی را نشان می‌دهند و با افزایش غلظت گلوگز میزان نهایی تولید توده‌ی زیستی کاهش می‌یابد [۲٦]. بررسی منحنی رشد سویه‌های مورد آزمایش نشان داد که در تمامی سویه‌ها به جز سویه‌های R و K افزایش غلظت گلوکز در محیط کشت از ۲۰٪ به ۳۰٪ تأثیر شدیدی بر میزان تولید توده‌ی زیستی نهایی دارد اما تغییرات غلظت در محدوده‌ی ۲٪ تا ۲۰٪ در میزان تولید توده‌ی زیستی نهایی چندان اثرگذار نیست. بنابراین در این سویه‌ها حد بحرانی غلظت گلوکز بین ۲۰٪ تا ۳۰٪ قرار دارد. اما در سویه‌ی R میزان بحرانی غلظت در محدوده‌ای بین ۳۰٪ تا ۳۵٪ است همچنین با توجه به معنی‌دار نبودن اختلاف میزان نهایی تولید توده‌ی زیستی در غلظت‌های ۳۵٪ از قند با دیگر غلظت‌ها در سویه‌ی K انتظار می‌رود حد بحرانی غلظت قند در این سویه بالاتر از ۳۵٪ باشد که نشان‌دهنده‌ی مقاومت بیشتر به استرس فشار اسمزی در این دو سویه نسبت به دیگر سویه‌های مورد بررسی می‌باشد که با نتایج قبلی تطابق دارد. با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد سویه‌هایی که

میزان مقاومت بالاتری به فشار اسمزی دارند از توانایی بالاتری در تولید CO_2 در خمیرهای شیرین برخوردار هستند این قابلیت باعث وسیع‌تر شدن موارد کاربرد این سویه‌ها در صنایع غذایی شده که از نظر اقتصادی اهمیت بالایی دارد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵ منحنی رشد سلولی سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط کشت YPD حاوی غلظت‌های متفاوت گلوکز در شرایط ۳۰°C و ۱۵۰rpm به مدت ٤٨ ساعت.

www.SID.ir

Archive of SID

٤- نتیجه گیری

در جداسازی و انتخاب سویه‌های مناسب *ساکارومایسس سرویزیه* به منظور تولید مخمر نانوایی به دلیل تفاوت چشمگیر تولید CO_2 در این سویه‌ها نسبت به دیگر سویه‌های گونه‌ی *ساکارومایسس سرویزیه* ، این ویژگی باید به عنوان اولین صفت مورد بررسی در نظر گرفته شود. روش‌های آزمایشگاهی ارائه شده در این تحقیق از قابلیت بالایی در غربالگری سریع سویه‌های مختلف برخوردار می‌باشد. سویه‌های مقاومتر در مرحله‌ی تولید توده‌ی زیستی در صنایع تولید کننده از نظر اقتصادی از بازده بیشتری برخوردار هستند همچنین این سویه‌ها به دلیل توانایی بالاتر در فرآوری محصولات قنادی، محدوده‌ی وسیع‌تری از موارد مصرف را تحت پوشش قرار می‌دهند.

٥- سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات و فناوری و مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان به دلیل حمایت مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

٦- منابع

[1] Kurtzman , C. P and Fell, J. W. 1998. The yeasts: A taxonomic study. USA, Elsevier science. 1074p.

[2] Querol, A and Fleet, G. Yeasts in food and beverages. Germany. Springer-verlage, 445p.

[3] Wirtz, R. L. 2003. Grain, Baking, and Sourdough. Bread: A Brief Historical Panorama. In: Handbook of Dough Fermentations (ed. Kulp. K. and Lorenz, K.). USA, Marcel Dekker, INC, New York, Basel. 1- 21.

[4] Attfield, P. V. 1997. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. Nature Biotechnology. 15, 1351-1357.

[5] Spencer, I. F. T and Spencer, D. M. 1996. Mutagenesis in yeast. In :yeast protocols (ed. Evans, I. H.). USA Human press , Totowa New Jersey.17-39.

[6] Donalies, U. E. B., Nauyen ., H. T. T, Stahl, U., Nevogt, E. 2008. Improvement of *Saccharomyces* yeast strains used in brewing, wine making and baking. In :Food Biotechnology (ed. Scheper, T.). Germany. Springer verlage, Berlin. 67-99.

[7] Van-Hoek, P., Van Dijken, J. P. and Pronk, J. T. 2000. Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microbial Technology. 26, 724-736.

[8] Randez-Gil, F., Sanz, P. and Prieto, J. A. 1999. Engineering baker's yeast: Room for improvement. Trends Biotechno1ogy. 17, 237-244.

[9] Ando, M., Nakamura, S. and Shinomiya, Y. 2003. Sugar super tolerant yeast for confectionary and bakery. United state patent. No: US 6,521,272 B1.

[10] Modige, T., Granath, K., Adler, L., Lieden, G. 2007. Anaerobic glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae* strains under hyperosmotic stress. Applied Microbiology Biotechnology. 75, 289-296.

[11] Imura, T, T., Kawasaki, H, M. 2007. Yeast. United States Patent No: 7,198,810 B2.

[12] Nishida, O., Kuwasaki, S., Suzuki, C. and Shima, J. 2004. Superior molasses assimilation, stress tolerance, and trehalose accumulation of bakers yeast isolated from dried sweet potatoes. Bioscience biotechnology and biochemistry. 68, 1442-1448.

[13] Myers, D. K., Lawler, D. T. M, and Attfield, P. V. 1997. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention of fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environment Microbiology. 63, 145-150.

[14] Bell, P. J . L., Higgins, V. J. and Attfield, P. V. 2001. Comparison of fermentative capacities of industrial baking and wild-type yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* in different sugar media. Letters in Applied Microbiology. 32, 224 -229.

[15] Attfield, P.V. and Kletsas. 2000. Hyperosmotic stress response by strains of bakers' yeasts in high sugar concentration medium. Letters in Applied Microbiology. 31, 323-327.

[16]. Panadero, J., Randez-Gill, F., Prieto, A. 2005. Validation of a flour-free model dough system for throughput studies of bakers yeast. Applied and environmental microbiology, 71, 1142-1147.

[17] Teunissen, A., Dumortier, F., Gorwa, M. F., Bauer, J., Tanghe, A., Loïez, A., Smet, P., Dijck, P. V. and Thevelein, J. M. 2002. Isolation and characterization of a freeze-tolerant diploid derivative of an industrial baker's yeast strain and its use in frozen doughs. Applied and Environmental Microbiology. 68, 4780- 4787.

www.SID.ir

Archive of SID

[18]. Boekhout, T. and Kurtzman, C. P. 1996. Principle and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. In: Nonconventional yeasts in biotechnology. Germany. Springer, Berlin. 1-67p.

[19]. Atlas, R. M. 2004. Handbook Of microbiological media. Washington D.C, USA. CRC Press, 1088p.

[20] Hernandez-lopez, M. J., Randez-Gill, F. AND Prieto, J. A. 2006. Hog1 mitogen-activated protein plays conserved and distinct role in osmotolerant yeast *Torulaspora delbrueckil*. Eukaryotic Cell. 5, 1410-1419.

[21] Benitez, T., Codon, A. C. 2004. Ethanol tolerance and production by yeast. In: Hand book of fungal Biotechnology. New York. Marcel Dekker, 1-17.

[22]. Hui, H.Y. 2006. Bakery Products Science and Technology. Iowa, USA. Blackwell Publishing Professional. 575p.

[24] Ganced, J. M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. Mirobial Molecular Biology. 62, 334-361.

[23] Carlson, M. 1999. Glucose repression in yeast. Current opinion microbiology. 2, 202-207.

[25]. Wang, Z, X., Zhuge, J., Fan, H., Prior, B,A. 2001. Research review paper: Glycerol production by microbial fermentation: a review. Biotechnology Advances. 19, 201–223.

[26]. Osho, A. 2005. Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. African Journal of Biotechnology. 4, 660-662.

[27]. Golabi, M., Nahvi, I., Tavasoli, M., Mobini Dehkordi, M. 2010. Assessment of stress resistance of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for designing selection media. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology. 4, 1-8.

www.SID.ir

Archive of SID

The study of CO_2 production and growth rate in suitable industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for production of bakers yeast

Golabi, M. [1 *], Tavassoli, M. [2], Nahvi, I. [3], Mobini Dehkordi, M. [4]

1- M.Sc. Microbiology, Ragheb Isfahani Higher Education Institute.
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Esfahan.
3- Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Esfahan
4- Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Science, University of Shahrekord.
(Received:88/7/12 Accepted: 89/1/16)

In the present study, some industrial active dry yeasts were compared regarding CO2 production which is a factor for determining the fermentation ability. The industrial baking strains of *Saccharomyces cerevisiae* were isolated from commercial active dry yeast, afterwards the amount of CO2 production was measured in a model liquid dough media using the gas measuring system. The comparison between the amounts of CO2 production by standard and industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* revealed that rapid CO2 production in moderate sugar medium is the most important phenotype in strains which are suitable for producing the baker's yeast. This method is considered as a fast screening way for strains of *Saccharomyces cerevisiae* in laboratory scale for the purpose of selecting the optimum strains for producing bakers yeast. The more osmoresistance strains are more active in high sucrose medium. Therefore, these strains are useful for producing baker's yeast in the confectionary industry. One strain named K, showed appropriate biomass production. This strain had been highly active in high sucrose medium which makes it a good candidate for the production of bakers yeast in bakery and confectionary industry.

Key words: Bakers yeast, CO_2, *Saccharomyces cerevisiae*, confectionary industry.

* Corresponding Author E_Mail address: Mohsen.Golabi@Gmail.com

www.SID.ir