Archive of SID

جداسازی، شناسایی و تعیین خصوصیات یک گونه مخمر مولد آمیلاز و کاربرد آن در تولید کاروتنوییدها با استفاده از کشت توأم

ایرج نحوی[1] رسول شفیعی[2] بهزاد شارقی[3]

(دریافت ۸۳/۱۰/۱۹ پذیرش ۸٤/٥/٥)

چکیده

نشاسته پلی ساکاریدی گیاهی است که طی سالهای اخیر به دلیل افزایش تولید و فرآوری آن در ایران، پساب حاصل از آن از آلاینده‌های زیست محیطی محسوب می‌گردد. در این تحقیق، پس از جداسازی یک گونهٔ مخمری مصرف کنندهٔ نشاسته (مولد آمیلاز) و شناسایی آن به عنوان *کریپتوکوکوس آیروس*، برخی خصوصیات آن از لحاظ الگوی ترشح آمیلازها ، نحوه تجزیهٔ نشاسته، ویژگی آمیلازهای ترشحه و قابلیت آن در تولید کاروتنوییدها با استفاده از کشت توأم مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* قادر به تجزیه و مصرف نشاستهٔ محلول و نشاستهٔ خام ذرت است؛ مصرف نشاستهٔ خام در میان مخمرها جزء صفات نادر بوده و از لحاظ صنعتی اهمیت ویژه‌ای دارد. همچنین مخمر مولد آمیلاز قادر به تجزیه کامل نشاستهٔ محلول در طی مدت ۱۰ ساعت اولیه کشت و تبدیل کامل آن به مجموعه‌ای از قندهای احیا کننده است و لذا با توجه به دسته‌بندی مخمرها از لحاظ الگوی ترشح آمیلازها، این مخمر جزء مخمرهای تند رشد بر روی نشاسته محسوب می‌شود. عدم بیماری‌زایی، رشد مناسب این گونه بر روی نشاستهٔ خام و محلول، مقاومت دمایی مناسب (کمتر از ۵۵°C) مجموعهٔ آمیلازهای مترشحه و نیز pH مطلوب حدود ۶-۵/۵ برای فعالیت مجموعهٔ آمیلازهای مترشحه توسط مخمر *کریپتوکوکوس آیروس*، بهره‌گیری از این مخمر را در فرآیندهای صنعتی برای تولید محصولات میکروبی میسر می‌سازد. در کشت توأم مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* به همراه یک گونه از مخمر *رودوتورولا* به عنوان مخمر مولد کاروتنوییدها که به عنوان مرحله آزمایشگاهی تولید کاروتنوییدها انجام گرفت، طیف جذبی کاروتنوییدهای تولید شده در ۳٪W/V نشاستهٔ محلول بررسی گردید و مشخص شد که کیفیت کاروتنوییدهای تولید شده نسبت به کشت خالص مخمر *رودوتورولا*، تغییری نیافته است.

واژه‌های کلیدی: نشاسته ،آمیلاز،مخمر،*کریپتوکوکوس آیروس*، اروتنویید، کشت توأم .

۱- استاد بیوتکنولوژی گروه زیستشناسی دانشگاه اصفهان
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان
۳- دانشیار بیوشیمی گروه زیستشناسی دانشگاه شهرکرد

Isolation and Characterization of an Amylase Producing Yeast and its Application in Carotenoid Production Using Dual Culture

Iraj Nahvi[1], Rasool Shafiee[2], Behzad Shareghi[3]

Abstract

Starch is a plant polysaccharide with unique applications in Iran. Its increasing production and processing recently have led to large volumes of industrial effluent as an environmental pollutant. In this study, an amylase producing yeast is isolated and identified as "*Cryptococcus aerius*" to investigate some of its characteristics such as its amylase secretion and starch digesting patterns, kinetics of amylase complex, and its capability for carotenoid production in dual culture. The results indicate that *C.aerius* is capable of soluble and raw maize starch digestion and assimilation. Raw starch digestion is scarce among yeast species; hence, it is industrially important. *C.aerius* digests soluble starch in the first 10 hours of cultivation and on the basis of amylase secreting patterns, it is therefore categorized with fast growing species on starch as carbon source. Non-pathogenicity, digestion of raw starch, heat stability of the secreted amylases complex (>55°C), and the optimum pH level of 5.5- 6 for amylases complex are the set of properties that make this species capable of use in microbial production on an industrial scale. Absorption of carotenoid extract obtained from dual fermentation of *C.aerius* and *Rhodotorula sp.* indicates that the quality of carotenoids produced in dual fermentation is the same as that produced from pure *Rhodotorula sp* culture.

Key words: *Starch, Amylase, Yeast, Cryptococcus Aerius, Carotenoids, Dual Fermentation.*

1. Professor of Biotechnology, Isfahan University, Isfahan, Iran
2. Grad. Student of Microbiology, Isfahan University, Isfahan, Iran
3. Associate Professor of Biochemistry, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

نشاسته، پلی ساکاریدی است که عمدتاً از گیاهان به دست می‌آید و از واحدهای گلوکزی متصل به هم با پیوندهای (α ۱ ← ٤) و (α ۱ ← ٦) تشکیل شده است، در اثر تجزیهٔ نشاسته قندهای احیاء کننده نظیر گلوکز، مالتوز و ... بدست می‌آید [۱ و۲]. با توجه به خصوصیات منحصر به فرد این پلی ساکارید امروزه از نشاسته و محصولات حاصل از تجزیهٔ آن در صنایع مختلفی از قبیل صنایع غذایی- تخمیری، دارویی، بهداشتی، نساجی و صنایع مختلف شیمیایی نظیر تهیه انواع چسب، لاک و انواع پوشش دهنده‌ها و ... استفاده می‌شود[۳].

بر این اساس طی سال‌های اخیر در ایران واحدهای مختلف تولید کننده و یا فرآوری نشاسته به بهره‌برداری رسیده که با عنایت به ظرفیت بالای آنها در تولید و یا مصرف نشاسته، پساب فراوانی حاوی مقادیر قابل توجهی نشاسته بر جا می‌ماند که باید به طریقی تصفیه و یا بهینه‌سازی شوند[٤].

به صورت کلی بهینه‌سازی بیولوژیک پسابها و یا به عبارت دیگر تبدیل آنها به محصولات با ارزش منوط به در اختیار داشتن گونه‌های میکروبی مناسب و سازگار با محتویات پساب است [٥ و٦]. مخمرها به دلیل برتریهای ویژه‌ای که نسبت به باکتریها و دیگر میکروارگانیسم‌ها در صنایع تخمیری دارند، در فرآیندهای بهینه‌سازی از ارزش خاصی برخوردار می‌باشند[٦]. حدود ۲۵٪ مخمرهایی که تاکنون جداسازی شده‌اند، قادرند از نشاسته به صورت هوازی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند [۸،۷ و۹]؛ اما قدرت آنها در تولید انواع آمیلازها محدود بوده و تنها چند جنس معروف، نظیر گونه‌های جنس *شووانیوماسیس*، *کریپتوکوکوس* ، *لیپوماسیس* و *اندومایکوپسیس* دارای قدرت فراوان در تولید آمیلازها می‌باشند [٦]. امروزه ثابت شده که با استفاده از مخمرهای مصرف کننده نشاسته و کشت آنها بر روی نشاسته می‌توان به محصولاتی با ارزش نظیر الکل[۱۰]، پروتئین تک‌یاخته [٦ و۹] و برخی فرآورده‌های با ارزش دارویی- غذایی نظیر ترهالوز[۱۲،۱۱و۱۳]و کاروتنویید ها[۹و١٤] و... دست یافت .

کاروتنوییدها از جمله رنگدانه‌های مهم موجود در طبیعت می‌باشند که در گیاهان و برخی میکروارگانیسم‌ها ساخته می‌شوند. این رنگدانه‌ها دارای وظایف خاص در فیزیولوژی جانوران، خاصیت ایجاد رنگ در حیوانات پرورشی و تأثیر مثبت در مرغوبیت فرآورده‌های حاصله از آنها دارند [١٤و١٥]. امروزه از کاروتنوییدها در جیره غذایی آبزیان، ماکیان و نیز تولید مواد غذایی مورد نیاز انسان استفاده می‌شود[۱۶،۱۴ و۱۷]. اگرچه برخی از مخمرهای مولد کاروتنویید دارای قدرت مصرف نشاسته هستند[۷]، اما به طور کلی تولید آمیلازها و متعاقب آن مصرف نشاسته توسط آنها ضعیف بوده و تنها یک یا دو آنزیم مؤثر در تجزیهٔ نشاسته در آنها تولید می‌گردد که همین امر باعث طولانی شدن فرآیندتجزیهٔ نشاسته در آنهاست [۸]. در چنین مواردی استفاده از کشتهای توأم، یک راه حل مناسب برای کاهش زمان تولید است. در این حالت یک گونه میکروبی مسئول آماده‌سازی ترکیبات پیش نیاز برای ساخت محصول نهایی توسط گونه‌ای دیگر است. از کشتهای توأم در تهیه سرکه ، اسید آمینهٔ لیزین و ... استفاده شده است و امروزه تولید این ترکیبات با کیفیت مناسب به طریقهٔ تخمیری و با استفاده از کشت توأم می‌باشد [۱۸].

در این تحقیق، پس از جداسازی یک گونه مخمری مناسب برای تولید آمیلازها و شناسایی آن، نخست خصوصیات آن از لحاظ الگوی مصرف نشاستهٔ محلول ،الگوی تولید آمیلازها و کنیتیک آنزیمی مجموعه آمیلازهای تولیدی توسط آن، مورد بررسی قرار گرفت و سپس هم این گونه و هم یک گونه مخمری دیگر از جنس *رودوتورولا* که در تحقیقات قبلی جداسازی شده و توانایی آن در تولید کاروتنوییدها به اثبات رسیده است [۱۹و ۲۰]، در یک کشت توأم برای تولید کاروتنوییدها از نشاستهٔ محلول مورد استفاده قرار گرفتند.

۲- مواد و روشها

۲-۱- جداسازی مخمرها

غربال‌گری و جداسازی مخمر مولد آمیلاز به روش اگزانوگراف در محیط (مایع و جامد) حاوی نشاسته و آنتی بیوتیک کلرآمفنیکل (۰/۱ g/L) به عنوان عامل حذف کننده باکتریها انجام گرفت. در روش اگزانوگراف که برای جداسازی مخمرها استفاده می‌شود، مراحل مختلفی وجود

www.SID.ir

Archive of SID

دارد که به اختصار عبارتند از: کشت نمونهٔ بر روی محیط مایع (حاوی نشاسته و یک عامل بازدارنده رشد باکتریها)، بررسی رشد و ایجاد کدورت در محیط مایع، بررسی میکروسکوپی کشتها، و خالص‌سازی مخمرها [۷]. مخمر مولد آمیلاز از یک نمونه آب راکد موجود در صنایع تولید نشاسته از آرد گندم جدا سازی گردید و پس از جداسازی، با استفاده از محیط YGC [1] خالص‌سازی شد و در همین محیط در دمای ٤°C نگهداری گردید. در این تحقیق، همچنین از یک گونهٔ مخمری از جنس *رودتورولا* که قادر به مصرف نشاسته نمی‌باشد[۷] و بر اساس مطالعات و تحقیقات نحوی و همکاران [۱۹]، به عنوان گونه مولد کاروتنوییدها شناسایی شده است، استفاده گردید.

۲-۲- شناسایی مخمر مصرف کنندهٔ نشاسته

پس از جداسازی و تخلیص مخمر مصرف کنندهٔ نشاسته (مولد آمیلازها)، این مخمر بر اساس روش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیک طبق روش کرگر- ون- ریج [2]، شناسایی گردید؛ در این روش بر اساس فیزیولوژی و مورفولوژی مخمرها از محیطهای مختلف برای بررسی توانایی مخمر در تخمیر و جذب منابع کربنی و نیتروژنی، رشد در دماهای مختلف، توانایی جذب ترکیبات آلی، رشد در غیاب ویتامین‌ها و ... استفاده شده و در نهایت با توجه به الگوی به دست آمده از این آزمایشها، مخمر شناسایی می‌شود[۷].

۲-۳- اندازه‌گیری قدرت تولید آنزیمهای آمیلاز توسط مخمر جداسازی شده در محیط جامد

پس از جداسازی مخمر مصرف کنندهٔ نشاسته، قدرت آن در تجزیهٔ نشاستهٔ محلول و نشاسته خام گندم با استفاده از کشت بر روی محیط جامد حاوی ٪۰/۵ نشاستهٔ (خام ذرت و یا محلول)، ٪۰/۰۵ سولفات آمونیوم، ٪۰/۰۱٤ فسفات دی پتاسیم هیدروژن پتاسیم، ٪۰/۵ فسفات دی هیدروژن سدیم، ٪۰/۰۵ سولفات منیزیم، ٪۰/۰۲ کلرید کلسیم و ٪۱/۵ آگار تعیین گردید. میزان هاله ایجاد شده اطراف کلونیها پس از کشت مخمر به روش خطی (استریک) و انکوباسیون در دمای ۳۰°C به مدت ۲٤ ساعت، به عنوان معیار قدرت مخمر در مصرف نشاسته، استفاده شد [۸ و ۲۱].

۲-٤- تعیین الگوی ترشح آنزیمی توسط مخمر مصرف کننده نشاسته

برای تعیین الگوی مصرف نشاسته توسط مخمر مولد آمیلاز، از محیط کشت مایع (بدون آگار) حاوی ترکیبات موجود در محیط کشت جامد (بخش ۲-۳) استفاده شد. pH محیط مایع با استفاده از اسید کلریدریک و سود یک نرمال درحد ۵/۵ تنظیم شد. محیط مایع به میزان ۱۰ mL در لوله‌های آزمایش در دار به ابعاد ۱۲۵ x۱٦ میلی‌متر اضافه شد و پس از استریل برای تعیین الگو استفاده شد. مخمر مولد آمیلاز پس از کشت بر روی محیط مایع درون لوله‌های آزمایش در دار، به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۰°C در دور ۱۸۰rpm انکوبه گردید . میزان نشاستهٔ باقیمانده، هر ٤ ساعت یکبار به روش یدومتری با استفاده از محلول ید در طول موج ٦۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد[۲۲] .

۲-۵- اندازه‌گیری فعالیت مجموعهٔ آمیلازهای مترشحه توسط مخمر مصرف کننده نشاسته در محیط مایع

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی مخمر مولد آمیلازها، مراحل کشت به ترتیب زیر انجام گرفت:

مخمر مولد آمیلازها بر روی محیط YGC آگار به صورت خطی (استریک) کشت داده شد و به مدت ۳٦ ساعت در دمای ۳۰°C انکوبه گردید. سپس محیط کشت مایعی (محیط کشت مایع اولیه) با ترکیبات حاوی ٪۲ نشاسته محلول، ٪۰/۰۵ سولفات آمونیوم، ٪۰/۰۱٤ فسفات دی پتاسیم هیدروژن ، ٪۰/۰۵ فسفات دی هیدروژن سدیم ،٪۰/۰۵ سولفات منیزیم ، ٪۰/۰۲ کلرید کلسیم و ۵/۵ =pH به میزان ۱۰۰ mL درون ارلن ۵۰۰ mL تهیه گردید و ۳-۲ کلنی از مخمر مولد آمیلاز که بر روی YGC آگار کشت داده شده بود، به آن تلقیح شد و در دمای ۳۰°C به مدت ۲٤ ساعت با ۱۸۰ rpm هوادهی شد. پس از ۲٤ ساعت، ۱ mL از محیط کشت مایع اولیه به محیطی مشابه محیط کشت اولیه (محیط کشت مایع ثانویه) تلقیح شد و تحت همین شرایط انکوبه گردید. از محلول این مایع طی

[1] Yeast Extract Glucose Choloramphenic Agar
[2] Kerger-Van-Rij

www.SID.ir

Archive of SID

ساعتهای مختلف نمونه‌برداری شد و برای تعیین فعالیت مجموعهٔ آمیلازها استفاده شد.

۲-۶- نحوه اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی مجموعهٔ آمیلازها

پس از کشت مخمرها درون محیط کشت مایع ثانویه، هر ۲ ساعت یکبار، mL ۱ از محیط کشت تحت شرایط استریل برداشته شد و پس از سانتریفوژ، با سرعت ۳۰۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه از محلول رویی به دست آمده برای آزمایشهای زیر استفاده گردید:

– اندازه‌گیری میزان گلوکز آزاد محیط: با استفاده از کیت گلوکز اکسید از شرکت "زیست شیمی"، میزان گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت آمیلازها بر روی نشاسته اندازه‌گیری شد.

– اندازه‌گیری میزان نشاسته باقیمانده: میزان نشاسته باقیمانده در محلول رویی با استفاده از محلول ید و درطول موج ٦٢٠ نانومتر اندازه‌گیری شد[٤].

– اندازه‌گیری فعالیت مجموعهٔ آمیلازها: میزان قندهای احیا کنندهٔ حاصل از تاثیر آمیلازهای موجود در محلول رویی بر روی نشاسته بافره (محلول ٪۱ نشاستهٔ محلول در بافر فسفات با pH= ۹/۶ با استفاده از معرف دی نیتروسالسیلیک اسید (DNS) اندازه‌گیری شد [۲۳].

بر اساس تعریف، یک واحد آنزیمی، مقداری از آنزیم است که قادر باشد طی مدت یک دقیقه در دمای ۳۰°C از نشاستهٔ محلول (٪۱)، یک میکرومول مالتوز آزاد نماید. بر این اساس واحد فعالیت آنزیمی µmol(maltose)/min می‌باشد.

۲-۷- بررسی تأثیر دما ،pH و غلظتهای مختلف اوره بر روی فعالیت مجموعهٔ آمیلازهای مترشحه توسط مخمر مولد آمیلازها

از محلول رویی کشت ثانویه، جهت تعیین اثر دما و pH بر روی فعالیت مجموعهٔ آمیلازها طبق روش زیر استفاده گردید:

برای تعیین اثر دما از ۷ گام مختلف دمایی (°C۹۰-۳۰) استفاده شد. محلول رویی به مدت ۳ دقیقه در هر دما قرار داده شد و سپس فعالیت آمیلازهای آن با استفاده از معرف DNS اندازه‌گیری گردید.

برای بررسی تأثیر pH بر روی فعالیت مجموعهٔ آمیلازها از ۸ گام مختلف (۹/۵-۲/۵) استفاده گردید. بافرهای به کار رفته برای تهیه pH های مورد نیاز شامل بافر اسیدسیتریک، بافر اسید فسفریک و بافر سولفات آمونیوم است[۲و۲۳]. بافرهای مذکور جایگزین بافر فسفات در روش اندازه‌گیری فعالیت مجموعهٔ آمیلازی(بخش ۲-٦) شد.

جهت بررسی تأثیر اوره بر روی فعالیت مجموعهٔ آمیلاز های تولید شده، محلولهای استاندارد اوره به میزان g/L۲۰- ۱ در بافر فسفات (pH= ٦/٩)ساخته شد. سپس حجم معینی (mL۱) از محلول حاوی آنزیم با همان حجم از محلول‌های اوره مخلوط گردید و در دمای °C۳۰ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. پس از این مدت از این محلول برای تعیین فعالیت مجموعهٔ آمیلازی استفاده گردید. در نهایت با احتساب ضریب رقت به کار گرفته شده، فعالیت مجموعهٔ آمیلازها، محاسبه شد.

۲-۸- بررسی تولید کاروتنویید با استفاده از کشت توأم مخمر مولد آمیلازها و یک گونه از مخمر رودوتورولا

- محیط های کشت

محیط کشت اولیه: هر دو مخمر بر روی محیط کشت جامدYGC به روش خطی(استریک) به مدت ٣٦ ساعت در دمای °C۳۰ کشت داده شدند.

محیط کشت ثانویه: هر دو مخمر در محیط YGCمایع با تلقیح ۳-۲ کلونی از محیط اولیه، و انکوباسیون در دمای °C۳۰ با rpm ۱۸۰ به مدت ٣٦ ساعت کشت داده شدند.

محیط کشت اصلی: محیط کشت اصلی حاوی ٪w/v ۳ نشاستهٔ محلول بوده و بقیهٔ ترکیبات آن شبیه محیط کشت مایع اولیه در بخش ۲-۵ است. محیط‌های کشت، درون ارلنهایی به حجم mL۱۰۰۰ به میزان mL ۲۵۰ ساخته شدند.

- روش کشت

برای کشت توأم دو مخمر مذکور، تحت شرایط استریل مقادیر حجمی یکسان از کشت ثانویه به ارلنهای حاوی محیط کشت اصلی انتقال داده شد.سپس ارلنها در دمای °C۳۰ با rpm ۱۸۰ به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند.پس از پایان مدت کشت، از مخلوط سلولهای موجود درون ارلنها به روش واعظ وهمکاران عصاره‌گیری انجام شد و طیف جذبی آن به دست آمد[۲۰].

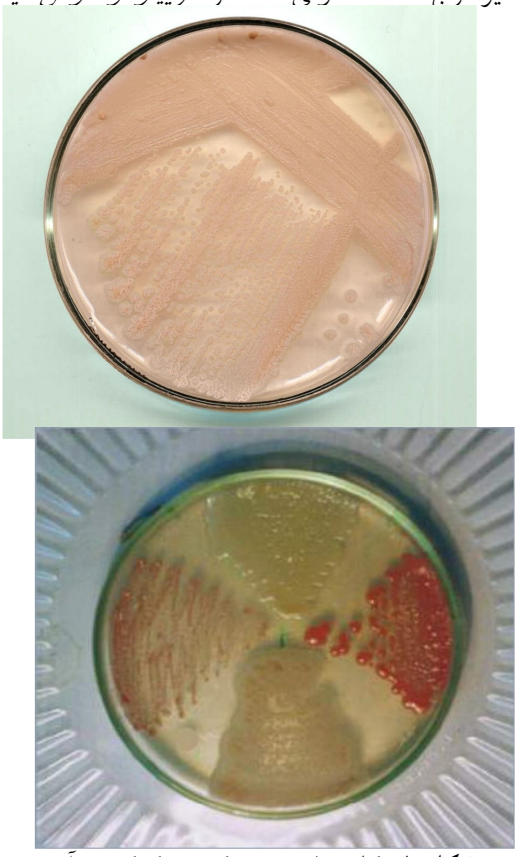
www.SID.ir

Archive of SID

۳- نتایج

۳-۱- جداسازی و شناسایی مخمرها

خصوصیات بیوشیمیایی مخمر مولد آمیلاز، تحت شرایط هوازی و بی‌هوازی از لحاظ مصرف قندها و ترکیبات دیگر در جدول ۱ آورده شده است. بر این اساس و با توجه به خصوصیات مورفولوژیک، این مخمر به نام *کریپتوکوکوس آیروس* شناسایی شد. کلونی مخمر مولد آمیلازها، یعنی *کریپتوکوکوس آیروس* کشت داده شده به صورت خطی و خالص درمحیط YGC ، درشکل ۱ نشان داده شده است. کلونیهای *کریپتوکوکوس آیروس* پس از ۳۶ ساعت کشت، بزرگ، کرم رنگ، با سطوح چروکیده و غیر لزج است. کلونی مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* به همراه مخمر مولد کاروتنویید، رودوتورولا، در شکل ۲ نشان داده شده است که چنانچه شکل رنگی در دسترس باشد. رنگ صورتی – قرمز مخمر مولد کاروتنویید که از جمله مشخصه‌های تولید کاروتنویید‌ها می‌باشد، قابل مشاهده است.



شکل ۱- کلنی‌های مخمر *کریپتوکوکوس آیروس*

۳-۲-تعیین خصوصیات مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* از لحاظ تولید آمیلازها

نحوه تجزیه نشاستهٔ محلول توسط مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* در محیط کشت جامد در شکل ۳ نشان داده شده است.هاله‌های سفید رنگ و صورتی- قرمز اطراف کلونیهای آغشته شده با محلول

شکل ۲- کلنی مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* و یک گونه از مخمر *رود وتورولا*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی مخمر *کریپتوکوکوس آیروس*

	رشد بی‌هوازی											رشد هوازی											
ترکیبات																							
کریپتوکوکوس آیروس																							

یید، نشانهٔ مصرف نشاسته است. کلونیهای کشت داده شده مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* بر روی نشاسته خام و هاله سفید اطراف کلونی‌ها که نشانه تجزیه نشاستهٔ خام ذرت است، در شکل ٤ مشاهده می‌گردد. (رنگهای مورداشاره در شکلهای رنگی قابل مشاهده است).

رابطه میان تولید آمیلازها توسط مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* و تولید گلوکز و مصرف نشاستهٔ محلول طی ۲۰ ساعت کشت مخمر در دمای ۳۰°C در شکل ٥ آورده شده است. در شکل ٦ ، رابطه میان تولید آمیلازها توسط مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* و تولید گلوکز از نشاسته و مصرف نشاسته طی ۲۰ ساعت کشت در دمای ۳۰°C نشان داده شده است.

میزان فعالیت مجموعهٔآمیلازهای مترشحه توسط مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* در دماهای مختلف و pH های مختلف به ترتیب در شکل‌های ۷ و۸ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود حداکثر فعالیت مجموعهٔ آمیلازها در دمای ٦۰°C می‌باشد، همچنین در٦-pH=٥/٥ ، فعالیت مجموعهٔ آمیلازها به مطلوب‌ترین حالت می‌رسد. میزان مقاومت مجموعهٔ آمیلازهای مترشحه توسط مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* در برابر غلظتهای مختلف اوره در شکل شماره ۹ آورده شده است. همان طور که مشخص است فعالیت مجموعهٔ آمیلازها در برابر غلظتهای مختلف اوره نسبت به شاهد کاهش چشمگیری دارد.

۳-۳- بررسی تولید کار و تنویدها در کشت توأم مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* و *رودوتورولا*

طیف جذبی عصاره کاروتنویید حاصل از کشت توأم دو مخمر ذکر شده در شکل ۱۰ نشان داده شده است. میزان جذب سه رنگیزه β- کاروتن، ترولین و ترولورودین در این شکل مشخص است.

٤- بحث و نتیجه‌گیری

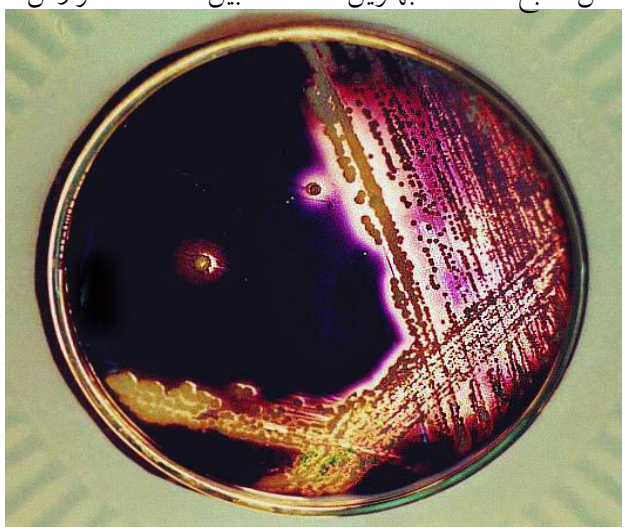
بر اساس تحقیقات ریج در سال ۱۹۸٤، مشخص شده که ٪۲٥ مخمرهای شناخته شده قدرت استفاده از نشاسته را دارند [۷و۸]. از طرفی مشخص گردیده که تولید آنزیم آمیلاز در محیط جامد توسط قارچهای رشته‌ای نسبت به محیط مایع بهتر صورت می‌گیرد. همچنین ثابت شده که محیطهای کشت نیمه جامد، محیطهای بهتری نسبت به محیطهای مایع، برای تولید و القاء آنزیم α- آمیلاز توسط مخمرها می‌باشند. تولید آنزیمهای آمیلاز در میان مخمرها همچون دیگر صفات فیزیولوژیکی یک صفت وابسته به سویه است؛ به این ترتیب که سویه‌های مختلف یک گونه هر کدام از لحاظ میزان تولید و نحوه تولید آمیلازها نسبت به یکدیگر متفاوت می‌باشند[۸].بر پایه نتایج گزارش شده توسط والتر و همکاران[1] در سال ۱۹۹۰ ، امکان جداسازی مخمرها در محیطهای جامد نظیر محیط‌های پایه حداقل همراه با آگار که منبع کربن آن نشاسته است وجود دارد [۸]ولی با این که این روش در برخی از منابع معتبر نظیر کتاب معروف طبقه‌بندی مخمرها، نیز آورده شده است [۷]، به دلایل مختلف اعم از رشد سریع کپکها ، خشک شدن محیط به دلیل نیاز به انکوباسیون زیاد محیطهای کشت، و احتمالاً ایجاد استرس برای میکروارگانیسمهای کشت شده روی آنها ، در این تحقیق کارایی لازم را

[1] Valter et al.

www.SID.ir

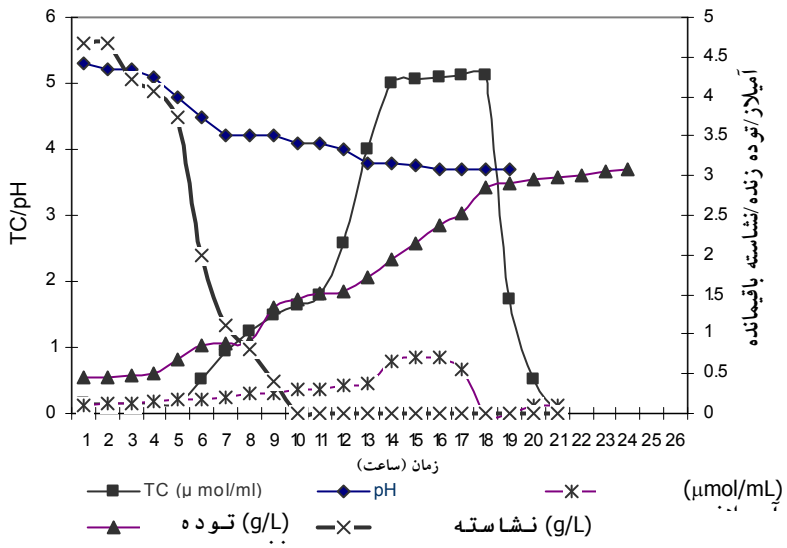
Archive of SID

نداشتند و لذا در این تحقیق از روش اگزانوگراف برای جدا سازی استفاده شد. آنچه در جداسازی اولیه مخمرهای مصرف کننده نشاسته اهمیت دارد، میزان غلظت نشاسته اولیه محیط کشت ، pH و نوع منبع نیتروژنی است. بر اساس منابع مختلف، بهترین غلظت مابین ٪۲-٪۱ گزارش شده است [۲٤و۲۵] . میزان pH محیط کشت در اغلب مطالعات انجام شده مابین ٦-٥ تنظیم شده است. با توجه به این مسائل، غلظت اولیهٔ نشاستهٔ محیط کشت ٪۰/۲ وpH حدود٥/٤ تنظیم شد. با توجه به اینکه محیط‌ها پس از



شکل ۳- کشت مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* بر روی نشاسته محلول (هاله‌های بیرنگ و صورتی-قرمز نشانه تجزیه نشاسته است)

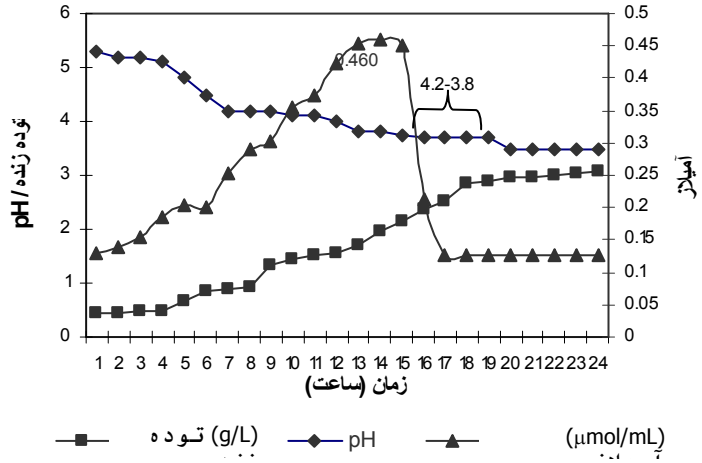
شکل ٤- کشت مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* بر روی نشاسته خام ذرت (هاله‌های بیرنگ نشانه تجزیه نشاسته است)



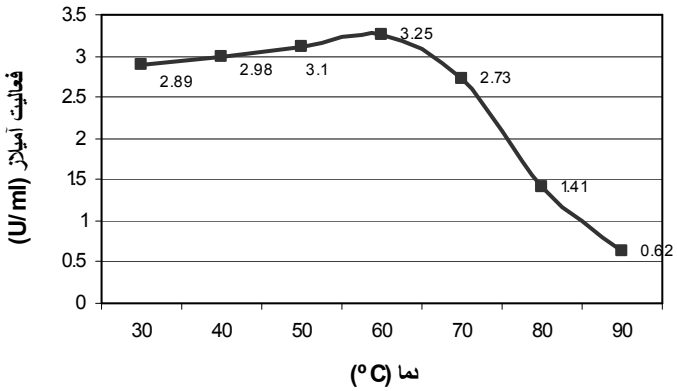
شکل ۵- رابطه میان تولید آمیلاز و تولید گلوکز و مصرف نشاسته

www.SID.ir

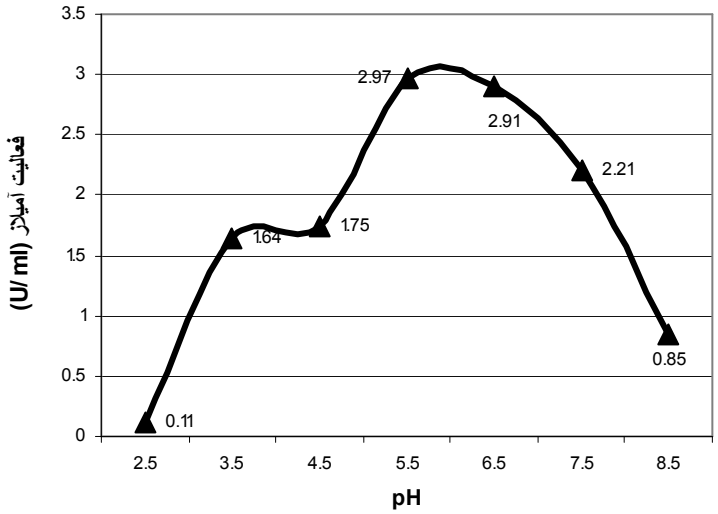
Archive of SID



شکل ٦- رابطه تولید آمیلاز با میزان مصرف نشاسته و تولید گلوکز از نشاسته



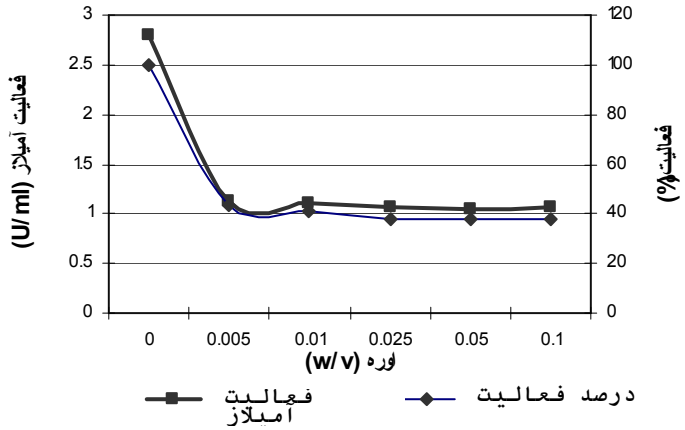
شکل ۷- تأثیر دما بر روی فعالیت مجموعه آمیلازهای مترشحه توسط مخمر *کریپتوکوکوس آیروس*



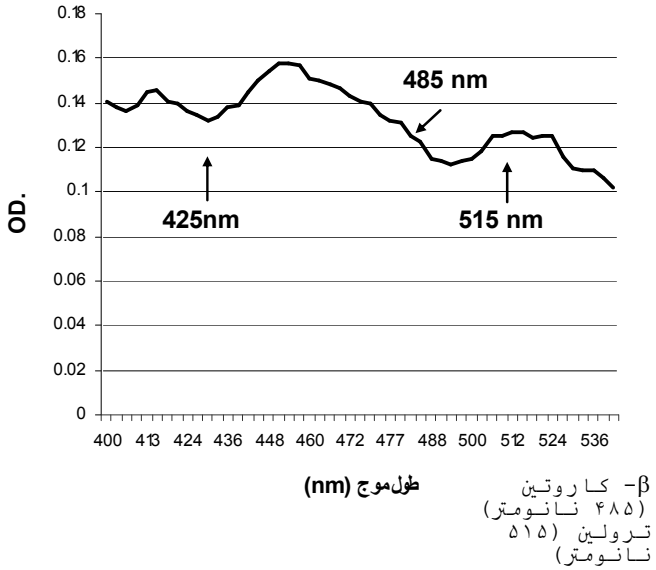
شکل ۸- تأثیر pH بر روی فعالیت مجموعه آمیلازهای مترشحه از *کریپتوکوکوس آیروس*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۹- تأثیر غلظتهای مختلف اوره بر روی فعالیت مجموعه آمیلازهای مترشحه توسط *کریپتوکوکوس آیروس*



شکل ۱۰- طیف جذبی عصاره سلولهای حاصل از کشت توأم مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* و یک گونه از مخمر *رودوتورولا*

آماده شدن، برای استریل کردن نیاز بـه اتـوکلاو داشـتند، و امکان تجزیه نشاسته در دمـای بـالا(۱۲۱°C) و فـشار زیـاد وجود داشت؛ لذا از استریل کردن در دمای پـایین (۱۱۰°C) به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. علاوه بر تأثیر pH و غلظـت نشاسته ، نوع منبع نیتروژنـی محـیط هـم اهمیـت دارد. بـر اساس مطالعات قبلی، بهترین منابع نیتروژن برای جداسازی مخمرهای مـصرف کننـده نـشاسته، منـابع غیـر آلـی نظیـر سولفات آمونیوم و یا فسفات دی آمونیـوم اسـت [۷ ، ۸ و ۲۵]. اما استفاده از منابع آلی نظیـر عـصاره مخمـر معمـولاً توصیه نمی‌شود؛ چرا که بر حسب روش‌های تولید عصاره مخمر، امکان موجود بودن منابع کربنی مختلف نظیر برخی دی ساکاریدها در آن وجود دارد، که به نوبه خود می‌توانـد از بیان ژن‌های آمیلاز جلوگیری به عمل آورد[۱].

به دنبال جداسازی و سپس خالص‌سازی، اقدام به شناسایی مخمرهای مصرف کنندهٔ نشاسته شد .اصولاً شناسایی بر اساس ویژگیهای مورفولوژیک و آزمایشهای بیوشیمیایی است[۷]. براساس نتایج به دست آمده (جدول ۱)، مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* کاملا هوازی است و لذا استفاده از آن درفرآیندهای بی‌هوازی- نظیر تولید الکل از نشاسته با استفاده از کشت خالص

-غیرممکن است. همچنین به دلیل این که مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* می‌تواند از نیترات و یا نیتریت به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان منبع نیتروژنی استفاده نماید (جدول ۱)، لذا محدودیتی در استفاده از منابع نیتروژنی معدنی وجود ندارد. بر اساس مطالعات انجام شده توسط دی مُت و همکاران[1] در سال ۱۹۸٤، پرقدرت‌ترین دسته از مخمرهای مولد آنزیمهای آمیلاز، گروهی هستند که قادرند در مدت زمان کوتاهی پس از کشت، در محیط حاوی نشاسته ، با ترشح آمیلازهای متنوع و شکستن مولکول نشاسته، نظم مولکولی نشاسته را چنان ناپایدار سازند که از ایجاد رنگ توسط کمپلکس ید – نشاسته جلوگیری به عمل آورند[۲۴] . سردسته این گروه، مخمرهایی نظیر *کریپتوکوکوس فلاووس* و *شوانیومایسس آلوویوس* بوده که ضمن از بین بردن نظم و حالت طبیعی مولکول نشاسته در اولین ساعات کشت بر روی آن، کمترین میزان قند احیاء کننده را تولید می‌نمایند که دلیل آن تولید مقادیر زیادی آندو آمیلاز[2] (نظیر α – آمیلاز) در ساعات اولیهٔ کشت است که منجر به شکسته شدن زنجیره‌های نشاسته می‌گردد [۵]. بر اساس همین مطالعات، دستهٔ دیگری از مخمرها تجزیهٔ نشاسته را به صورت سریع وهمراه با تولید مقادیر فراوانی قند احیاء کننده، انجام می‌دهند که نشانهٔ تولید آندو آمیلازها (α – آمیلاز) همراه با اگزو آنزیم[3] هایی نظیرگلوکوآمیلاز است. گروه دیگری از مخمرها نشاسته را کند تجزیه می‌نمایند؛ اما تجزیهٔ کند به همراه آزاد شدن مقادیرفراوانی قند احیاء کننده است که دلیل آن تولید زیاد اگزوآنزیم‌ها و فعالیت محدود اندوآنزیمها است[۵]. با توجه به هاله‌های اطراف کلونی‌های مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* (شکل ۳) و نیز بررسی نحوه تجزیه نشاسته محلول در محیط مایع (بخش ۲–۵ و ۲–٦) مشخص می‌گردد که مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* دارای الگوی تجزیهٔ سریع نشاسته می‌باشد و به احتمال زیاد قادر به تولید مقادیر زیادی اگزوآنزیم(نظیر α – آمیلاز) است؛ این امر با بررسی نحوهٔ تولید مجموعهٔآمیلازها در محیط مایع بررسی گردید و همان طور که در شکل ۵ مشخص است، در طی ۱۰ ساعت اولیهٔ کشت، با تولید مجموعهٔآمیلازها تمام نشاسته تجزیه می‌گردد و پس از آن نه تنها تولید آمیلازها کاهش نمی‌یابد، بلکه در ساعت دوازدهم تا چهاردهم کشت به حداکثر می‌رسد؛ این امر می‌تواند مبین تولید آندوآمیلازهایی نظیر α – آمیلاز باشد که باعث به هم ریختن نظم مولکولی نشاسته می گردد؛ به طوری که نشاسته دیگر قادر به ایجاد کمپلکس رنگی با یُد نیست و احتمالاً زنجیره‌هایی از نشاسته (به صورت چندین مولکول گلوکز متصل به هم) در محیط کشت وجود دارند که القاء آمیلازها را حتی پس از تجزیهٔ نشاسته انجام می‌دهند. از طرف دیگر، این مسئله می‌تواند به نحوی گویای این نکته باشد ، که القاء آمیلازها در مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* بیش از آنچه که توسط مولکولهای دست نخورده نشاسته انجام می‌گیرد، توسط محصولات حاصل از تجزیهٔ نشاستهٔ نظیر مالتوز و مالتو تریوز و... صورت می‌گیرد. بر اساس مطالعات دوهانیک[4] در سال ۱۹۸۷ مشخص گردیده که مالتوز نه تنها یک عامل سرکوبگر تولید آمیلازها در مخمر *شوانیومایسس* کاستلی نمی‌باشد ، بلکه به عنوان یک محرک بسیار قوی‌تر نسبت به نشاستهٔ محلول می‌تواند تولید گلوکوآمیلازها را القاء نماید [۲۶]. با عنایت به این مسئله ، افزایش همزمان میزان فعالیت آمیلازها با افزایش قندهای احیاء کننده طی ساعات دوازدهم تا شانزدهم(شکل ۵) قابل توجیه است.

بر اساس مطالعات انجام شده توسط ایفوجی و همکاران[5] در سال ۱۹۹٦ ،بسیاری از مخمرهای تجزیه کنندهٔ نشاسته نظیر گونه‌های *شوانیومایسس* ، توانایی تجزیهٔ نشاستهٔ خام را ندارند [۲۵]، با توجه به این که مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* دارای قدرت تجزیهٔ نشاستهٔ خام نیز می‌باشد (شکل ٤)، لذا استفاده از آن در مورد تجزیه و کاهش BOD مربوط به پساب‌های حاوی نشاسته خام امکان پذیر است.

بحث درباره نوع آنزیم‌های ترشحی توسط مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* نیاز به خالص‌سازی دقیق آنزیمهای تولید شده دارد. آنچه مسلم است، مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* علی رغم توانایی فوق‌العاده برای مصرف نشاسته، احتمالاً با فقدان و یا ضعف برخی آنزیمها برای شکستن بعضی پیوندهای نشاسته روبرو است ؛ چرا که حتی پس از اتمام نشاسته محیط و به پایان رسیدن رشد مخمر(ساعت هیجدهم کشت به بعد) ، محیط حاوی سلولهای مخمری به میزان جزیی دارای قندهای احیاء کننده است که قابلیت

[1] De Mot et al.
[2] Endo Amylase
[3] Exo Enzyme
[4] Dowhanic
[5] Iefuji et al.

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش با معرف DNS را دارا می‌باشند (شکل ۵). با توجه به الگوی به دست آمده برای رشد مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* بر روی نشاسته ، مشخص شد که ضمن تولید آمیلازها و مصرف نشاسته، میزان pH محیط به شدت کاهش می‌یابد (شکل ۵). کاهش pH محیط یک امر کاملاً طبیعی است؛ چرا که با توجه به نوع منبع نیتروژنی موجود (سولفات آمونیوم)، با مصرف یونهای آمونیوم، میزان زیادتری از یون‌های HSO_4^- در محیط باقی می‌مانند که موجبات کاهش pH را فراهم می‌سازند؛ این مسئله قبلا نیز در فرآیند تولید انبوه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* به عنوان خمیر مایه به اثبات رسیده است[۷].

مقاومت آنزیم‌ها در برابر حرارت در گونه‌های مختلف مخمری براساس نوع آنزیم‌ها بسیار متنوع است و محدوده‌های بسیار متغیری را می‌پوشاند؛ اما آنچه مسلم است بر اساس تحقیقات مختلف، α-آمیلازهای مخمری نسبت به بقیه گروه‌های آمیلازی مقاومت گرمایی بالاتری دارند [۲۷] . همان‌طور که ثابت شد (شکل۷) مجموعهٔآمیلازی مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* در محدوده دمایی ۶۰-۵۵°C دارای حداکثر فعالیت است ؛ ولی با توجه به این که معمولاً عمل مایع‌سازی نشاسته در صنعت در دمای بالاتر از ۷۰°C انجام می‌گیرد[۱]،این مجموعه آنزیمی دارای نوعی محدودیت کاربردی می‌باشد. مسئله جالب و قابل تأمل این که، مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* در دمای بیش از ۴۰°C قابلیت رشد ندارد (جدول ۱)، ولی برخی از آنزیمهای آن، نظیر مجموعه آمیلازی ذکر شده، دارای حداکثر فعالیت در دمای بالاتر از دمای محدود کننده رشد هستند . این واقعیت، در مورد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها صادق است و تناقضی در این رابطه وجود ندارد.

همان طور که در شکل ۹ دیده می‌شود ، اوره بدون توجه به غلظت آن، تأثیر منفی بر فعالیت مجموعهٔ آنزیمی دارد . تأثیر منفی اوره بر آمیلازها قبلا نیز به اثبات رسیده، ولی در اکثر موارد تأثیر منفی اوره وعمل بازدارندگی آن مربوط به تاثیر آن بر α-آمیلازها بوده و بقیه آنزیم‌های آمیلازی نسبت به این ترکیب آلی حساسیت ندارند[۲۳]؛ لذا در صورتی که این تأثیر منفی، بر روی α-آمیلاز مترشحه توسط مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* هم صادق باشد، کاهش چشم‌گیر فعالیت مجموعهٔ آمیلازهای مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* در حضور اوره قابل توجیه است.

بر اساس مطالعات ابوزاید و همکاران[1] در سال۱۹۸۶، مشخص شده است که در کشت توأم حاوی نشاسته به عنوان منبع کربن،به دلیل افزایش مصرف قندهای حاصل از تجزیهٔ نشاسته (نظیر گلوکز) توسط گونهٔ دوم وکاهش شدید تأثیر این قندها بر سیستم القایی تولید آمیلازها، مدت زمان کشت و مصرف نشاسته به شدت کاهش می‌یابد[۱۰]. با توجه به این که مشخص شد مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* از لحاظ رشد بر روی نشاسته دارای الگوی مخمرهای تند رشد است، لذا در طی کشت، در زمانی خاص غلظت قندهای احیاء کننده نظیر گلوکز و... به حدی بالا می‌رود که از تولید آمیلازها جلوگیری می‌شود (شکل ٦). با عنایت به این نکته از کشت توأم مخمر *کریپتوکوکوس آیروس* و یک گونه از مخمر *رودوتورولا* در ۳٪ w/v نشاسته استفاده گردید. بر اساس نتایج به دست آمده از طیف‌سنجی عصارهٔ مخمرهای کشت داده شده و مقایسه آن با تحقیقات نحوی وهمکاران در سال ۱۳۷۹ [۱۹] طیف جذبی عصاره نسبت به کشت خالص آن از لحاظ رنگدانه‌های ترولین، ترولورودین و بتا کاروتن تفاوتی نشان نداد (شکل ۱۰). بهینه‌سازی محیط کشت، برای تولید حداکثر میزان کاروتنوییدها و اندازه‌گیری دقیق میزان تولید کاروتنوییدها نیاز به تحقیقات وسیع‌تری دارد.

[1] Abouzied et al.

www.SID.ir

Archive of SID

۵- مراجع

۱- مرتضوی، ع. (۱۳۷٦) . " بیوتکنولوژی، میکروبیولوژی صنعتی"، *دانشگاه فردوسی، مشهد*، ۳۵۷-۳۳۶.

2- Lehninger, A. (1982). "Principles of biochemistry." *Worth publication, Inc*. 277-299.

۳- شهیدی ،ف.، جعفری، م. (۱۳۷۸). " *کارخانه‌های مواد غذایی*"، *دانشگاه فردوسی، مشهد*، ۲۵۲-۲۳۲.

4-"Iranian information about industries. <http : // www. Farsindustry.org.ir> (2005/01/09).

5- Berry, D. R., Russell, I., and Stewart, G. G. (1987). "Yeast biotechnology." *Allen and Unwin*, 289-293.

6- Reed, G., and Nagodawithana, T.W. (1991). "Yeast technology." second ed., *Van Nostrand Reinhold*, 37-89.

7- Kurtzman, C. P., and Fell, J. W. (1998). "The yeast (Ataxonomic study)." Elsvier.

8- Valter, R.L., and Machado, K.M.G. (1990). "Production of amylases by yeasts." *J. Can. Microbiol*., 36, 751-753.

9-Walker, G.M. (2000). "Yeast physiology and biotechnology." *John Wiley and Sons*, England, 54, 283-311.

10- Abouzied, M. M., and Reddy, C. A. (1986)." Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of Aspergillus niger and Saccharomyces cerevisiae." *J. Appl. Environ. Microbiol.,* 52(5), 1055-1059.

11- Chi, Z., Liu, J., and Zhang,W.(2001)."Trehalose accumulation from soluble starch by Saccharomycopsis fibuligera sdu." *J. Enzyme and Microbial Technology*, 28, 240-245.

12- Crowe, L.M. (2000). "Lesson from nature: Preservation of memberanes by trehalose." Comparative Biochemistry and Phisiology.Part A, 126, S1-S163.

13- Housna, C.G., Brandet, E.V., Thevelein, J., Hohman, S., and Prior, B. (1998). "Role of trehalose in survival of Saccharomyces cerevisiae under osmotic stress." *J. Microbiology*, 144, 671-680.

14- Johnson, E. A., and Schroeder, W. A. (1995). "Microbial carotenoids." *J. Advance in Biochemical Engineering*, 53, 119-178.

15- Margalith, P. Z. (1992). "The carotenoieds, in: Pigment microbiology." First ed., *Chapman and Hall*, London, 32-76.

16- Johnson, E. A., Villa, T. G., and Lewis, M. J. (1980). "Phaffia rhodozyma as an asthazanthin source in salmonoid diets." *J. Aquaculture,* 20, 123-134.

17- Johnson, E. A., Lewis, M. J., and Grau, C. R. (1980). "Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast Phaffia rhodozyma." *J. Poultry Science.,* 59, 1777-1782.

18- Waites, M. J., Morgan, N., Rockey, J.S., and Higton, G. (2001). "Industrial microbiology, An introduction." *Blackwell Science*, 94-109.

۱۹- نحوی ، ا.، واعظ ، م. ، امتیازی ، گ. (۱۳۷۹). **"بررسی مخمرهای تولید کننده کاروتنویید درختان توس در شمال ایران، روستای شهرستانک."** *مجله پژوهش و سازندگی*، شماره ٤٨، ۷۴-۷۰.

۲۰- واعظ، م. (۱۳۷۸). **"جداسازی و شناسایی مخمرهای تولید کننده کاروتنویید و کاربرد آن در صنعت."** *پایان نامه کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان*.

21- Macfaddin, J. F. (2000). "Biochemical tests for identification of medical bacteria." Third, ed., *Lippincott Williams and Wilkins*, 412-423.

22-Willson, J.J., and Ingeledew, W.M. (1982). "Isolation and characterization of schwaniomyces alluvius amylolytic enzyme." *J. Appl. Environ. Microb.,* 44 (2), 301-307.

23- Bernfeld, P., Colowick,S. P., and Kalpan, N. O. (1995). "Methods in enzymology." Vol 1, *Academic press,* New York, 1149.

24- De Mot, R., and Verachtert, H . (1987). "Purification and characterization of extracellular α-amylase and glucoamylase from the yeast candida antractica CBS 6678." *J. Biotech.*, 104(12)644-649.

25- Iefuji, H., Chino, M., Kato, M., and Iimura, Y. (1996). "Raw-starch digesting and thermostable α-amylase from the yeast Cryptococcus sp.S-2: purification, characterization,cloning and sequencing." *J. Biochem*., 318, 989-996.

26- Dowhanick, T. M., Russell, S. W., Scherer, G. G., and Seligy, V. (1990). "Expression and regulation of glucoamylas from the yeast schwaniomyces castellii. " *J. Bacteriol.,* 172 (52), 2360-2366.

27- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., and Singh, D. (2000). "Review article: Advances in microbial amylases." *J. Biotechnol. Appl. Biochem*., 31, 135-152.

www.SID.ir