

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

Iraj Nahvi¹, Rasool Shafiee²,
Behzad Shareghi³

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

ایرج نحوی^۱ رسول شفیعی^۲ بهزاد شارق^۳

(دریافت ۸۳/۱۰/۱۹ پذیرش ۸۴/۵/۵)

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 ($>55^{\circ}\text{C}$), 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.

چکیده

نشاسته پلی ساکاریدی گیاهی است که طی سالهای اخیر به دلیل افزایش تولید و فراوری آن در ایران، پساب حاصل از آن از آلاینده‌های زیست محیطی محسوب می‌گردد. در این تحقیق، پس از جداسازی یک گونه مخمری مصرف کننده نشاسته (مولد آمیلاز) و شناسایی آن به عنوان کریپتوکوکوس آیروس، برخی خصوصیات آن از لحاظ الگوی ترشح آمیلازها، نحوه تجزیه نشاسته، ویژگی آمیلازهای مترشحه و قابلیت آن در تولید کاروتنوئیدها با استفاده از کشت توأم مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده مخمر کریپتوکوکوس آیروس قادر به تجزیه و مصرف نشاسته محلول و نشاسته خام ذرت است؛ مصرف نشاسته خام در میان مخمرها جزء صفات نادر بوده و از لحاظ صنعتی اهمیت ویژه‌ای دارد. همچنین مخمر مولد آمیلاز قادر به تجزیه کامل نشاسته 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 نشاسته خام و محلول، مقاومت دمایی مناسب (کمتر از 55°C) مجموعه آمیلازهای مترشحه و نیز pH مطلوب حدود ۵/۵-۶ برای فعالیت مجموعه 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 کاروتنوئیدها که به عنوان مرحله آزمایشگاهی تولید کاروتنوئیدها انجام گرفت، طیف جذبی کاروتنوئیدهای تولید شده در ۳٪w/v نشاسته محلول بررسی گردید و مشخص شد که کیفیت کاروتنوئیدهای تولید شده نسبت به کشت خالص مخمر رودوتورولا، تغییری نیافته است.

واژه‌های کلیدی: نشاسته، آمیلاز، مخمر، کریپتوکوکوس

آیروس، کاروتنوئید، کشت توأم.

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

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

نشاسته، پلی ساکاریدی است که عمدتاً از گیاهان به دست می‌آید و از واحدهای گلوکوزی متصل به هم با پیوندهای $(\alpha \rightarrow 4)$ و $(\alpha \rightarrow 6)$ تشکیل شده است. در اثر تجزیه نشاسته قندهای احیاء کننده نظیر گلوکز، مالتوز و ... بدست می‌آید [۱ و ۲]. با توجه به خصوصیات منحصر به فرد این پلی ساکارید امروزه از نشاسته و محصولات حاصل از تجزیه 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 [۴].

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 [۵ و ۶]. مخمرها به دلیل برتریهای ویژه‌ای که نسبت به باکتریها و دیگر میکروارگانیسم‌ها در صنایع تخمیری دارند، در فرآیندهای بهینه‌سازی از ارزش خاصی برخوردار می‌باشند [۶]. حدود ۲۵٪ مخمرهایی که تاکنون جداسازی شده‌اند، قادرند از نشاسته به صورت هوازی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند [۸، ۷ و ۹]؛ اما قدرت آنها در تولید انواع آمیلازها محدود بوده و تنها چند جنس معروف، نظیر گونه‌های جنس *شورونیوماسیس*، *کریپتوکوکوس*، *لیپوماسیس* و *اندومایکویسیس* دارای قدرت فراوان در تولید آمیلازها می‌باشند [۶]. 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 [۶ و ۹] و برخی فرآورده‌های با ارزش دارویی - غذایی نظیر ترهالوز [۱۱، ۱۲ و ۱۳] و کاروتنوئیدها [۹ و ۱۴] و ... دست یافت.

کاروتنوئیدها 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 [۱۴ و ۱۵]. امروزه از کاروتنوئیدها در جیره غذایی آبزیان، ماکیان و نیز تولید مواد غذایی مورد نیاز انسان استفاده می‌شود [۱۴، ۱۶ و ۱۷]. اگرچه برخی از مخمرهای مولد کاروتنوئید 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 تجزیه نشاسته در آنها تولید می‌گردد که همین امر باعث طولانی شدن فرآیند تجزیه 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 آمینه لیزین و ... استفاده شده است و امروزه تولید این ترکیبات با کیفیت مناسب به طریقه 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 نشاسته محلول، الگوی تولید آمیلازها و کینتیک 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 کاروتنوئیدها به اثبات رسیده است [۱۹ و ۲۰]، در یک کشت توأم برای تولید کاروتنوئیدها از نشاسته محلول مورد استفاده قرار گرفتند.

۲- مواد و روشها

۲-۱- جداسازی مخمرها

غربال‌گری و جداسازی مخمر مولد آمیلاز به روش آگرانوگراف 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 آگرانوگراف که برای جداسازی مخمرها استفاده می‌شود، مراحل مختلفی وجود دارد که به اختصار عبارتند از: کشت نمونه بر روی محیط مایع (حاوی نشاسته و یک عامل بازدارنده رشد باکتریها)، بررسی رشد و ایجاد کدورت در محیط مایع، بررسی میکروسکوپی کشتهای، 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 خالص‌سازی شد و در همین محیط در دمای ۴°C نگهداری گردید. در این تحقیق، همچنین از یک گونه مخمری از جنس *رودوتورولا* که قادر به مصرف نشاسته نمی‌باشد [۷] و بر اساس مطالعات و تحقیقات نحوی و همکاران [۱۹]، به عنوان گونه مولد کاروتنوئیدها شناسایی شده است، استفاده گردید.

۲-۲- شناسایی مخمر مصرف کننده نشاسته

پس از جداسازی و تخلیص مخمر مصرف کننده نشاسته (مولد آمیلازها)، این مخمر بر اساس روش‌های بیوشیمیایی و

¹ Yeast Extract Glucose Choloramphenic Agar

مورفولوژیک طبق روش کرگر-ون-ریج^۱، 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 می شود [۷].

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

پس از جداسازی مخمر مصرف کننده نشاسته، قدرت آن در تجزیه نشاسته محلول و نشاسته خام گندم با استفاده از کشت بر روی محیط جامد حاوی ۰/۵٪ نشاسته (خام ذرت و یا محلول)، ۰/۵٪ سولفات آمونیوم، ۰/۱۴٪ فسفات دی هیدروژن پتاسیم، ۰/۵٪ سولفات دی هیدروژن سدیم، ۰/۰۲٪ کلرید کلسیم و ۱/۵٪ آگار تعیین گردید. میزان هاله ایجاد شده اطراف کلونیا پس از کشت مخمر به روش خطی (استریک) و انکوباسیون در دمای ۳۰°C به مدت ۲۴ ساعت، به عنوان معیار قدرت مخمر در مصرف نشاسته، استفاده شد [۸ و ۲۱].

۲-۴- 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 در حد ۵/۵ تنظیم شد. محیط مایع به میزان ۱۰ mL در لوله های آزمایش در دار به ابعاد ۱۶x۱۲۵ میلی متر اضافه شد و پس از استریل برای تعیین الگو استفاده شد. مخمر مولد آمیلاز پس از کشت بر روی محیط مایع درون لوله های آزمایش در دار، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰°C در دور ۱۸۰rpm انکوبه گردید. میزان نشاسته باقیمانده، هر ۴ ساعت یکبار به روش یدومتری با استفاده از محلول ید در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد [۲۲].

۲-۵- اندازه گیری فعالیت مجموعه آمیلازهای مترشحه توسط مخمر مصرف کننده نشاسته در محیط مایع

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

¹ Kerger-Van-Rij

مخمر مولد آمیلازها بر روی محیط YGC آگار به صورت خطی (استریک) کشت داده شد و به مدت ۳۶ 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، ۰/۱۴٪ فسفات دی پتاسیم هیدروژن، ۰/۰۵٪ فسفات دی هیدروژن سدیم، ۰/۰۵٪ سولفات منیزیم، ۰/۰۲٪ کلرید کلسیم و pH= ۵/۵ به میزان ۱۰۰ mL درون ارلن ۵۰۰ mL تهیه گردید و ۲-۳ 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 ۲۴ ساعت با ۱۸۰rpm هوادهی شد. پس از ۲۴ 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 ساعتهای مختلف نمونه برداری شد و برای تعیین فعالیت مجموعه آمیلازها استفاده شد.

۲-۶- نحوه اندازه گیری فعالیت آنزیمی مجموعه آمیلازها

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

- اندازه گیری میزان گلوکز آزاد محیط: با استفاده از کیت گلوکز اکسیداز شرکت "زیست شیمی"، میزان گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت آمیلازها بر روی نشاسته اندازه گیری شد.
- اندازه گیری میزان نشاسته باقیمانده: میزان نشاسته باقیمانده در محلول رویی با استفاده از محلول ید و در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد [۴].

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

بر اساس تعریف، یک واحد آنزیمی، مقداری از آنزیم است که قادر باشد طی مدت یک دقیقه در دمای ۳۰°C از نشاسته محلول (۱٪)، یک میکرومول مالتوز آزاد نماید. بر این اساس واحد فعالیت آنزیمی $\mu\text{mol}(\text{maltose})/\text{min}$ می باشد.

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

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

بخش ۲-۵ است. محیط‌های کشت، درون ارلنهای به حجم ۱۰۰۰ mL به میزان ۲۵۰ mL 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 30°C با 180 rpm به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. پس از پایان مدت کشت، از مخلوط سلولهای موجود درون ارلنها به روش واعظ و همکاران عصاره‌گیری انجام شد و طیف جذبی آن به دست آمد [۲۰].

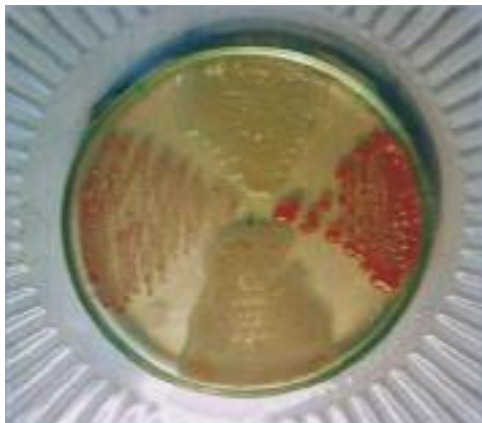
۳- نتایج

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 آيروس شناسایی شد. کلونی مخمر مولد آمیلازها، یعنی کریپتوکوکوس آيروس کشت داده شده به صورت خطی و خالص در محیط YGC، در شکل ۱ نشان داده شده است. کلونیهای کریپتوکوکوس آيروس پس از ۳۶ ساعت کشت، بزرگ، گرم رنگ، با سطوح چروکیده و غیر لزوج است. کلونی مخمر کریپتوکوکوس آيروس به همراه مخمر مولد کاروتنویید، رودتورولا، 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.

۳-۲- تعیین خصوصیات مخمر کریپتوکوکوس آيروس از لحاظ تولید آمیلازها

نحوه تجزیه نشاستهٔ محلول توسط مخمر کریپتوکوکوس آيروس 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 آيروس و یک گونه از مخمر رودتورولا

برای تعیین اثر دما از ۷ گام مختلف دمایی (30°C - 90°C) 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 ($2/5$ - $9/5$) استفاده گردید. بافرهای به کار رفته برای تهیه pH های مورد نیاز شامل بافر اسیدسیتریک، بافر اسید فسفریک و بافر سولفات آمونیوم است [۲ و ۲۳]. بافرهای مذکور جایگزین بافر فسفات در روش اندازه‌گیری فعالیت مجموعهٔ آمیلازی (بخش ۲-۶) شد.

جهت بررسی تأثیر اوره بر روی فعالیت مجموعهٔ آمیلازهای تولید شده، محلولهای استاندارد اوره به میزان 20 g/L - 1 در بافر فسفات ($\text{pH} = 6/9$) ساخته شد. سپس حجم معینی (۱ mL) از محلول حاوی آنزیم با همان حجم از محلول‌های اوره مخلوط گردید و در دمای 30°C 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 رودتورولا

- محیط‌های کشت

محیط کشت اولیه: هر دو مخمر بر روی محیط کشت جامد YGC به روش خطی (استریک) به مدت ۳۶ ساعت در دمای 30°C کشت داده شدند.

محیط کشت ثانویه: هر دو مخمر در محیط YGC مایع با تلقیح ۲-۳ کلونی از محیط اولیه، و انکوباسیون در دمای 30°C با 180 rpm به مدت ۳۶ ساعت کشت داده شدند.

محیط کشت اصلی: محیط کشت اصلی حاوی 3 w/v نشاستهٔ محلول بوده و بقیهٔ ترکیبات آن شبیه محیط کشت مایع اولیه در



شکل ۱- کلنی‌های مخمر کریپتوکوکوس آيروس

جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی مخمر کریپتوکوکوس آيروس

| رشد بی هوازی | | رشد هوازی | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|-------------------|-----------|---------|--------|--------|--------|---------|----------|--------|---------|--------|--------|--------|--------------|-------------|-------------|---------|-----------|------------|------------|------|
| زیگیات | کریپتوکوکوس آيروس | گلوز | گلانگوز | ساکروز | مالٹوز | لاکتوز | رافینوز | تراهالوز | لاکتوز | نیساسته | سیترات | نیترات | نیتريت | بدون ویتامین | رشد در ۳۷°C | رشد در ۴۰°C | اورد آژ | آ-آرانیوز | دی-آرانیوز | ال-آرانیوز | |
| | | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی | منفی |

۴- بحث و نتیجه گیری

بر اساس تحقیقات ریچ در سال ۱۹۸۴، مشخص شده که ۲۵٪ 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^۱ 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 نداشتند و لذا در این تحقیق از روش آگرانوگراف برای جداسازی 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 [۲۴و۲۵]. میزان pH محیط کشت در اغلب مطالعات انجام شده مابین ۶-۵ تنظیم شده است. با توجه به این مسائل، غلظت اولیه نشاسته محیط کشت ۲٪/۰ و pH حدود ۵/۴ تنظیم شد. با توجه به اینکه محیطها پس از

ید، نشانه مصرف نشاسته است. کلونیهای کشت داده شده مخمر کریپتوکوکوس آيروس بر روی نشاسته خام و هاله سفید اطراف کلونی‌ها که نشانه تجزیه نشاسته خام ذرت است، در شکل ۴ مشاهده می‌گردد. (رنگهای مورد اشاره در شکلهای رنگی قابل مشاهده است).

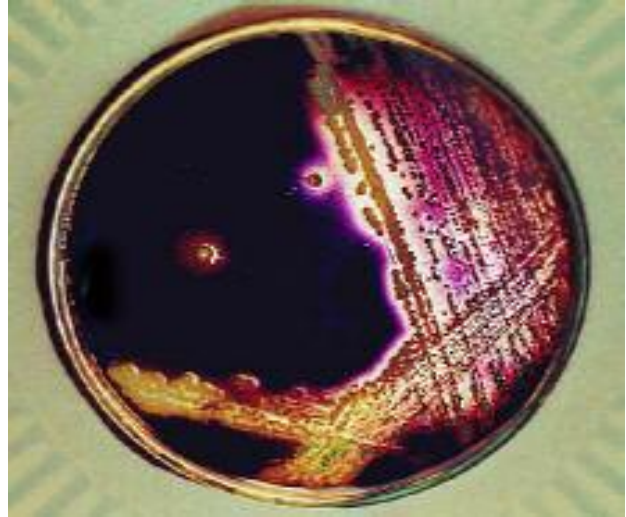
رابطه میان تولید آمیلازها توسط مخمر کریپتوکوکوس آيروس و تولید گلوکز و مصرف نشاسته محلول طی ۲۰ ساعت کشت مخمر در دمای ۳۰°C در شکل ۵ آورده شده است. در شکل ۶، رابطه میان تولید آمیلازها توسط مخمر کریپتوکوکوس آيروس و تولید گلوکز از نشاسته و مصرف نشاسته طی ۲۰ ساعت کشت در دمای ۳۰°C نشان داده شده است.

میزان فعالیت مجموعه آمیلازهای مترشحه توسط مخمر کریپتوکوکوس آيروس در دماهای مختلف و pH های مختلف به ترتیب در شکل های ۷ و ۸ آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود حداکثر فعالیت مجموعه آمیلازها در دمای ۶۰°C می‌باشد، همچنین در ۶-۵/۵ pH، فعالیت مجموعه آمیلازها به مطلوب ترین حالت می‌رسد. میزان مقاومت مجموعه آمیلازهای مترشحه توسط مخمر کریپتوکوکوس آيروس در برابر غلظتهای مختلف اوره در شکل شماره ۹ آورده شده است. همان طور که مشخص است فعالیت مجموعه آمیلازها در برابر غلظتهای مختلف اوره نسبت به شاهد کاهش چشمگیری دارد.

۳-۳- بررسی تولید کار و تنویدها در کشت توأم مخمر کریپتوکوکوس آيروس و رودتورولا

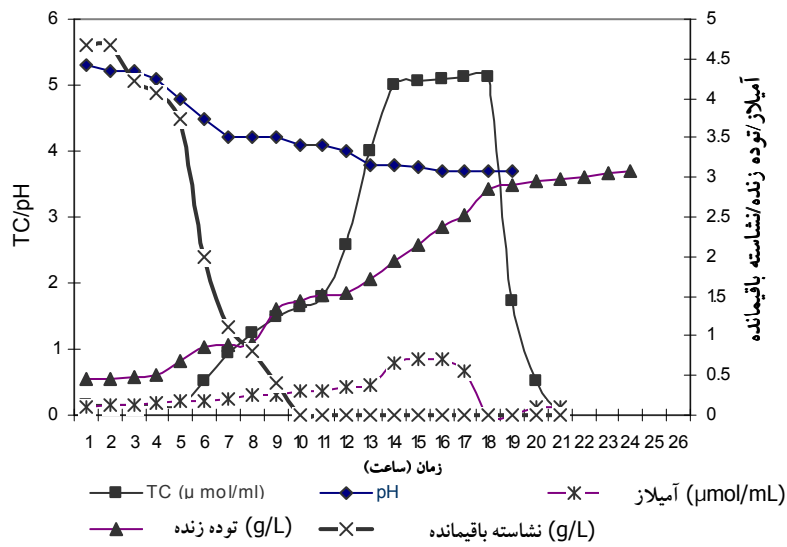
طیف جذبی عصاره کاروتنوید حاصل از کشت توأم دو مخمر ذکر شده در شکل ۱۰ نشان داده شده است. میزان جذب سه رنگیزه B- کاروتن، ترولین و ترولورودین در این شکل مشخص است.

¹ Valter et al.

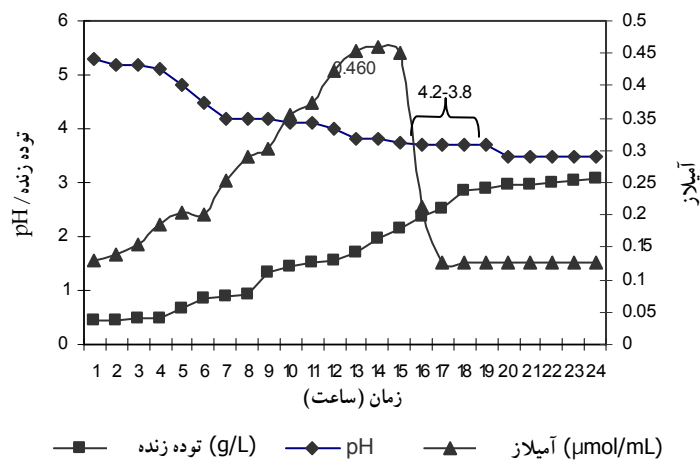


شکل ۴- کشت مخمر کریپتوکوکوس آيروس بر روی نشاسته خام ذرت (هاله‌های بیرنگ نشانه تجزیه نشاسته است)

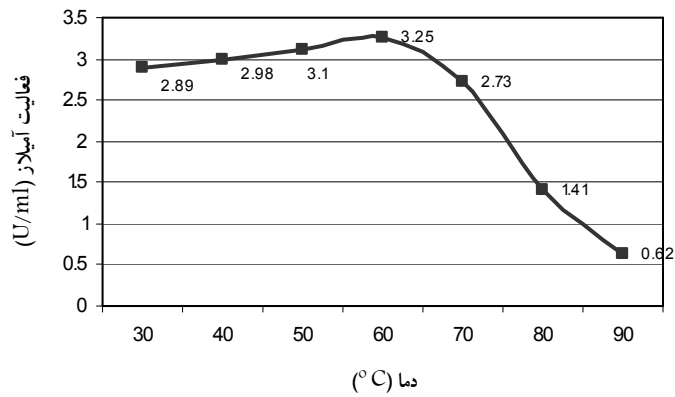
شکل ۳- کشت مخمر کریپتوکوکوس آيروس بر روی نشاسته محلول (هاله‌های بیرنگ و صورتی-قرمز نشانه تجزیه نشاسته است)



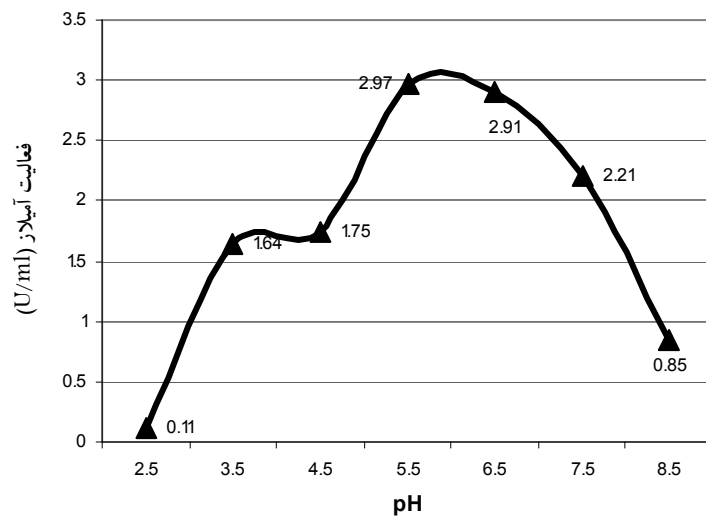
شکل ۵- رابطه میان تولید آمیلاز و تولید گلوکز و مصرف نشاسته



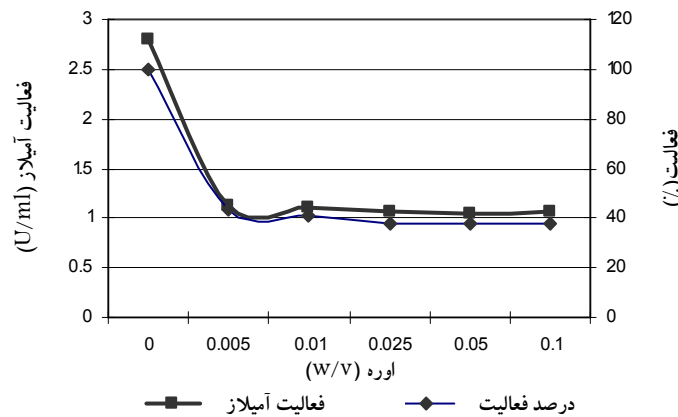
شکل ۶- رابطه تولید آمیلاز با میزان مصرف نشاسته و تولید گلوکز از نشاسته



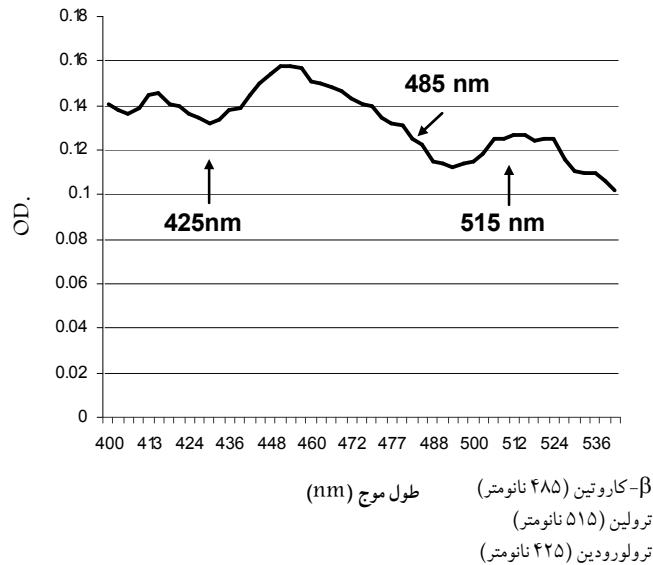
شکل ۷- تأثیر دما بر روی فعالیت مجموعه آمیلازهای مترشحه توسط مخمر کریپتوکوکوس آيروس



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



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



شکل ۱۰- طیف جذبی عصاره سلولهای حاصل از کشت توأم مخمر کریپتوکوکوس آيروس و یک گونه از مخمر رودتورولا

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 شوانیوما یسس 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 می نمایند که دلیل آن تولید مقادیر زیادی آندو آمیلاز^۱ (نظیر α - آمیلاز) در ساعات اولیه کشت است که منجر به شکسته شدن زنجیره های نشاسته می گردد [۵]. بر اساس همین مطالعات، دسته دیگری از مخمرها تجزیه نشاسته را به صورت سریع و همراه با تولید مقادیر فراوانی قند احیاء کننده، انجام می دهند که نشانه تولید آندو آمیلازها (α - آمیلاز) همراه با آگزو آنزیم^۳ هایی نظیر گلوکو آمیلاز است. گروه دیگری از مخمرها نشاسته را کند تجزیه می نمایند؛ اما تجزیه کند به همراه آزاد شدن مقادیر فراوانی قند احیاء کننده است که دلیل آن تولید زیاد آگزو آنزیمها و فعالیت محدود آندو آنزیمها است [۵]. با توجه به هاله های اطراف کلونی های مخمر کریپتوکوکوس آيروس (شکل ۳) و نیز بررسی نحوه تجزیه نشاسته محلول در محیط مایع (بخش ۲-۵ و ۶) مشخص می گردد که مخمر کریپتوکوکوس آيروس دارای الگوی تجزیه سریع نشاسته می باشد و به احتمال زیاد قادر به تولید مقادیر زیادی آگزو آنزیم (نظیر α - آمیلاز) است؛ این امر با

آماده شدن، برای استریل کردن نیاز به اتوکلاو داشتند، و امکان تجزیه نشاسته در دمای بالا (121°C) و فشار زیاد وجود داشت؛ لذا از استریل کردن در دمای پایین (110°C) به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. علاوه بر تأثیر pH و غلظت نشاسته، نوع منبع نیتروژنی محیط هم اهمیت دارد. بر اساس مطالعات قبلی، بهترین منابع نیتروژن برای جداسازی مخمرهای مصرف کننده نشاسته، منابع غیر آلی نظیر سولفات آمونیوم و یا فسفات دی آمونیوم است [۷، ۸، ۲۵]. اما استفاده از منابع آلی نظیر عصاره مخمر معمولاً توصیه نمی شود؛ چرا که بر حسب روش های تولید عصاره مخمر، امکان موجود بودن منابع کربنی مختلف نظیر برخی دی ساکاریدها در آن وجود دارد، که به نوبه خود می تواند از بیان ژن های آمیلاز جلوگیری به عمل آورد [۱].

به دنبال جداسازی و سپس خالص سازی، اقدام به شناسایی مخمرهای مصرف کننده نشاسته شد. اصولاً شناسایی بر اساس ویژگی های مورفولوژیک و آزمایش های بیوشیمیایی است [۷]. براساس نتایج به دست آمده (جدول ۱)، مخمر کریپتوکوکوس آيروس کاملاً هوازی است و لذا استفاده از آن در فرآیندهای بی هوازی - نظیر تولید الکل از نشاسته با استفاده از کشت خالص - غیرممکن است. همچنین به دلیل این که مخمر کریپتوکوکوس آيروس می تواند از نترات و یا نیتريت به 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^۱ در سال ۱۹۸۴، پرقدرت ترین دسته از

² Endo Amylase

³ Exo Enzyme

¹ De Mot et al.

بررسی نحوه تولید مجموعه آمیلازها در محیط مایع بررسی گردید و همان طور که در شکل ۵ مشخص است، در طی ۱۰ ساعت اولیه کشت، با تولید مجموعه آمیلازها 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 می‌گردد؛ به طوری که نشاسته دیگر قادر به ایجاد کمپلکس رنگی با I_2 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 تجزیه نشاسته انجام می‌دهند. از طرف دیگر، این مسئله می‌تواند به نحوی گویای این نکته باشد، که القاء آمیلازها در مخمر کریپتوکوکوس آيروس بیش از آنچه که توسط مولکولهای دست نخورده نشاسته انجام می‌گیرد، توسط محصولات حاصل از تجزیه نشاسته نظیر مالتوز و مالتو تریوز و... صورت می‌گیرد. بر اساس مطالعات دوهانیک^۱ در سال ۱۹۸۷ مشخص گردیده که مالتوز نه تنها یک عامل سرکوبگر تولید آمیلازها در مخمر *شوانیوما یسیس* کاستلی نمی‌باشد، بلکه به عنوان یک محرک بسیار قوی تر نسبت به نشاسته 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^۲ در سال ۱۹۹۶، بسیاری از مخمرهای تجزیه کننده نشاسته نظیر گونه‌های *شوانیوما یسیس*، توانایی تجزیه نشاسته خام را ندارند [۲۵]. با توجه به این که مخمر کریپتوکوکوس آيروس دارای قدرت تجزیه نشاسته خام نیز می‌باشد (شکل ۴)، لذا استفاده از آن در مورد تجزیه و کاهش BOD مربوط به پساب‌های حاوی نشاسته خام امکان پذیر است.

بحث درباره نوع آنزیم‌های ترش‌چی توسط مخمر کریپتوکوکوس آيروس نیاز به خالص‌سازی دقیق آنزیم‌های تولید شده دارد. آنچه مسلم است، مخمر کریپتوکوکوس آيروس علی‌رغم 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 جزئی دارای قندهای احیاء کننده است که قابلیت واکنش با معرف DNS را دارا می‌باشند (شکل ۵). با توجه به الگوی به دست آمده برای رشد مخمر کریپتوکوکوس آيروس 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 قبلاً نیز در فرآیند تولید انبوه مخمر *ساکارومایسیس 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 (شکل ۷) مجموعه آمیلازی مخمر کریپتوکوکوس آيروس در محدوده دمایی $60-55^\circ C$ دارای حداکثر فعالیت است؛ ولی با توجه به این که معمولاً عمل مایع‌سازی نشاسته در صنعت در دمای بالاتر از $70^\circ C$ انجام می‌گیرد [۱]، این مجموعه آنزیمی دارای نوعی محدودیت کاربردی می‌باشد. مسئله جالب و قابل تأمل این که، مخمر کریپتوکوکوس آيروس در دمای بیش از $40^\circ C$ 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.

همان‌طور که در شکل ۹ دیده می‌شود، اوره بدون توجه به غلظت آن، تأثیر منفی بر فعالیت مجموعه آنزیمی دارد. تأثیر منفی اوره بر آمیلازها قبلاً نیز به اثبات رسیده، ولی در اکثر موارد تأثیر منفی اوره و عمل بازدارندگی آن مربوط به تأثیر 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 آيروس هم صادق باشد، کاهش چشم‌گیر فعالیت مجموعه آمیلازهای مخمر کریپتوکوکوس آيروس در حضور اوره قابل توجیه است.

بر اساس مطالعات ابوزاید و همکاران^۳ در سال ۱۹۸۶، مشخص شده است که در کشت توأم حاوی نشاسته به عنوان منبع کربن، به دلیل افزایش مصرف قندهای حاصل از تجزیه نشاسته (نظیر گلوکز) توسط گونه دوم و کاهش 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

³ Abouzed et al.

¹ Dowhanic

² Iefuji et al.

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 ۶). با عنایت به این نکته از کشت توأم مخمر کریپتوکوکوس آیروس و یک گونه از مخمر رودتورولا در ۳٪ W/V نشاسته استفاده گردید. بر اساس نتایج به دست آمده از

طیف‌سنجی عصاره مخمرهای کشت داده شده و مقایسه آن با تحقیقات نحوی و همکاران 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 کاروتنوئیدها و اندازه‌گیری دقیق میزان تولید کاروتنوئیدها نیاز به تحقیقات وسیع‌تری دارد.

۵- مراجع

- ۱- مرتضوی، ع. (۱۳۷۶). "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 membranes by trehalose." *Comparative Biochemistry and Physiology. 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 carotenoids, 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 astaxanthin 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 کاروتنوئید درختان توس در شمال ایران، روستای شهرستانک." *مجله پژوهش و سازندگی*، شماره ۴۸، ۷۴-۷۰.
- ۲۰- واعظ، م. (۱۳۷۸). "جداسازی و شناسایی مخمرهای تولید کننده کاروتنوئید و کاربرد آن در صنعت." *پایان نامه کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی 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* amyolytic 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 antartica* 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 glucoamylase 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.