

## بررسی رشد و تولید CO<sub>2</sub> در سویه‌های صنعتی ساکارومایسس سرویزیه مناسب برای تولید مخمر نانوایی

محسن گلابی<sup>۱\*</sup>، منوچهر توسلی<sup>۲</sup>، ایرج نحوی<sup>۳</sup>، محسن مبینی دهکردی<sup>۴</sup>

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.

۴- استادیار و هیات علمی گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد.

(تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۱۲، تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۱۶)

### چکیده

در این تحقیق میزان تولید CO<sub>2</sub> 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 محیط‌های مایع مشابه خمیر و سامانه‌ی اندازه‌گیری تولید گاز در محیط مایع، قدرت تخمیر کنندگی این سویه‌ها مقایسه گردید. میزان تولید CO<sub>2</sub> توسط سویه‌های صنعتی ساکارومایسس سرویزیه در مقایسه با یک سویه‌ی استاندارد این گونه‌ی مخمری نشان‌دهنده‌ی این واقعیت بود که تولید سریع CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>، ساکارومایسس سرویزیه، محصولات قنادی

### ۱- مقدمه

سویه‌ها منجر به تولید محصولی با عنوان مخمر نانوایی شد [۱-۳]. 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 [۴]. سویه‌های ساکارومایسس سرویزیه که به عنوان مخمر نانوایی مورد استفاده

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 خلص سازی این

\* مسئول مکاتبات: [Mohsen.Golabi@Gmail.com](mailto:Mohsen.Golabi@Gmail.com)

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 همه ی نقاط شرایط یکسانی را برای مقایسه سویه های مخمری فراهم می آورد. 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 می شود. 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 می شود همچنین مواد معدنی و ویتامین های موجود در این محیط ساختگی مشابه با محیط خمیر طراحی شده است [۱۶ و ۱۵ و ۱۳]. هدف از این تحقیق بررسی ویژگی های شاخص سویه های صنعتی ساکارومایسس سرویزیه به منظور شناخت ویژگی های کلیدی یک سویه ی صنعتی مناسب برای تولید مخمر نانوائی و ارائه ی روش های آزمایشگاهی سریع و کارآمد در بررسی نمونه های تجاری و آزمایشگاهی مخمر ساکارومایسس سرویزیه می باشد.

## ۲- مواد و روش ها

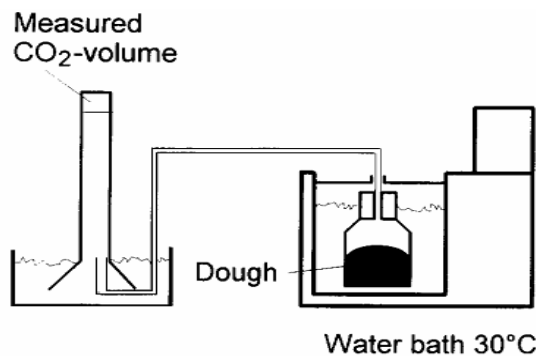
### ۲-۱- نمونه های مخمر تجاری و ریزسازواره های

#### مورد استفاده

شش نمونه پودر مخمر نانوائی تجاری خشک فعال در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. چهار نمونه ی آن تولید شده توسط شرکت های تجاری ایرانی و دو نمونه ی آن خارجی بود. به منظور جداسازی سویه های صنعتی ساکارومایسس سرویزیه، از هر نمونه ی تجاری، ۱ گرم در آب مقطر سترون حل شد و پس از تهیه ی سری رقت در محلول آب پیتونه ی سترون از رقت ۱۰<sup>-۰</sup> در محیط جامد YPD ( گلوکز ۲٪، پپتون ۲٪، عصاره مخمر ۱٪) کشت انجام گرفت و در دمای ۳۰°C به مدت ۲-۴ روز گرمخانه گذاری گردید. پرگنه های بدست آمده خالص سازی شد و با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی

قرار می گیرند می بایست متابولیسم تنفسی را بخوبی انجام دهند و سرعت تکثیر بالایی داشته باشند. این خصوصیات در مرحله تولید توده ی زیستی در صنایع تولید کننده ی مخمر نانوائی اهمیت دارد. همچنین باید از قدرت تخمیری خوبی برخوردار باشند. در حقیقت اصلی ترین وظیفه مخمر در هنگام به کارگیری 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 می شود. همچنین مخمرها با تولید متابولیت های جانبی، منجر به ایجاد طعم و عطر مطبوع در محصول می شود [۵ و ۶]. خصوصیات و ویژگی های صنعتی سویه های مناسب در تولید مخمر نانوائی از گونه ی ساکارومایسس سرویزیه در مقایسه با سویه های صنعتی تولیدکننده ی بیواتانول و سویه های آزمایشگاهی این مخمر بسیار متفاوت می باشد [۷ و ۸]. از این رو تعیین خصوصیات و ویژگی های شاخص سویه های میکروبی مورد استفاده در هر صنعت به منظور شناسایی و جداسازی سویه های ایده آل برای آن صنعت از نظر اقتصادی بسیار با اهمیت می باشد [۹ و ۱۰]. مخمرهای نانوائی علاوه بر استفاده در تولید نان، در فرآوری محصولات قنادی نیز به کار می روند اما وجود قند در خمیرهای شیرین سبب افزایش فشار اسمزی محیط خمیر شده که منجر به کاهش فعالیت مخمرها می شود در نتیجه به کارگیری مخمرها در تولید محصولات قنادی با محدودیت روبروست. اما سویه های مخمری که از مقاومت بالاتری به فشار اسمزی برخوردار باشند به منظور فرآوری این گروه از محصولات غذایی مطلوب تر هستند [۱۱ و ۱۲]. میزان تولید CO<sub>2</sub> در محیط های ساختگی مایع مشابه خمیر در شرایط آزمایشگاهی شاخصی از قدرت تخمیر یک سویه در شرایط حضور در خمیر است [۱۳ و ۱۴]. به کارگیری این محیط ها دارای مزیت هایی نسبت به اندازه گیری قدرت تخمیر در محیط خمیر می باشد. از جمله می توان 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 می گردد [۱۶-۱۴]. همچنین به کارگیری محیط خمیر بدلیل حضور ریزسازواره های ناخواسته ی موجود در آرد می تواند منجر به ایجاد خطا در آزمایش

شده به دلیل کم حجم بودن و دقت بالا در شرایط آزمایشگاهی بسیار کارتر از دستگاه فرمانتومتر (دستگاه متداول اندازه گیری  $CO_2$  تولید شده توسط خمیر در صنعت) می باشد.



شکل ۱ تصویر شماتیک از سامانه اندازه گیری  $CO_2$ ی تولید شده در خمیر

## ۲-۳- محیط های مایع مشابه خمیر

در این تحقیق از دو نوع محیط مایع مشابه خمیر Moderate sugar و High sucrose استفاده گردید که طبق روش می یرز و همکاران ساخته شد [۱۳]. این محیط ها حاوی ۳٪ گرم کازوآمینواسید، ۲/۳ گرم  $KH_2PO_4$ ، ۰/۸ گرم  $(NH_4)_2SO_4$ ، ۰/۷۵ گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۱ گرم  $CaCl_2$ ، ۱/۴۵ گرم اسیدسیتریک، ۱۲/۱۷ گرم تری سدیم سیترات، ۱۰ میلی گرم تیامین HCl، ۱۰ میلی-گرم پیریدوکسین HCl، ۵۱ میلی گرم نیکوتینیک اسید، ۲۰ میلی گرم کلسیم پانتوتات 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، ۴۵ گرم سوربیتول، ۲۶ گرم گلوکز، ۰/۶ گرم فروکتوز، ۲ گرم ساکاروز و ۲۰ گرم مالتوز در لیتر بود و محیط مایع مشابه خمیرهای شیرین (High sucrose) حاوی ۶ گرم کلرید سدیم، ۱۶۵ گرم سوربیتول، ۲۶ گرم گلوکز، ۰/۶ فروکتوز، ۳۰۰ گرم ساکاروز و ۲۰ گرم مالتوز در لیتر بود. این محیط ها توسط دستگاه میلی پور سترون شد [۱۹].

شناسایی جنس و گونه‌ی مخمرها انجام گرفت. توانایی مصرف اتانول، تولید رنگدانه، تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، گالاکتوز، لاکتوز و ساکاروز مهمترین آزمون های انجام شده در شناسایی گونه‌ی مخمرها بود. برای تعیین توانایی مخمرها در تخمیر قندهای مورد نظر از محیط کشت پایه که حاوی ۳٪ عصاره‌ی مخمر، ۰/۵٪ پپتون، معرف برومو تیمول بلو و قند مورد نظر در غلظت ۲٪ می باشد، استفاده شد. یک پرگنه‌ی تازه از مخمر مورد نظر به لوله‌ی آزمایش حاوی ۴/۵ml محیط مربوطه تلقیح شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $28^{\circ}C$  گرمخانه گذاری 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 ۰/۰۲٪، کلرید پتاسیم ۰/۰۲٪، فنل رد ۰/۰۰۲٪) که حاوی ۲٪ (حجم/حجم) اتانول بود، پس از گرمخانه گذاری در  $28^{\circ}C$  به مدت ۴۸ ساعت بررسی شد [۱۹]. بررسی ویژگی های مورفولوژی مخمرهای رشد کرده در محیط جامد YPD و تولید رنگدانه و هیف مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۸]. در نهایت سویه های بدست آمده با حروف R، I، F، M، K و S نام گذاری 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 نمونه های تجاری

خمیر با استفاده از ۲۰ گرم آرد سفید (آرد ۰۰۰ شرکت افخم)، ۱۰ میلی لیتر آب مقطر، ۰/۴ گرم نمک و ۱ گرم پودر مخمر تهیه شد. برای تهیه خمیرشیرین به محیط فوق ساکاروز در غلظت ۱۰، ۲۰ و 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  $30^{\circ}C$  قرار گرفت و  $CO_2$ ی تولید شده در مدت زمان ۱۵۰ دقیقه اندازه گیری شد. تجربیات آزمایشگاهی ما نشان داد که این سامانه‌ی طراحی

کشت مقدار ۱۰۰ μl به ۲۵ ml محیط کشت YPD و محیط کشت-های YPD حاوی درصدهای متفاوت گلوکز اضافه گردید و گرمخانه گذاری در ۳۰°C و ۱۵۰ rpm انجام شد. تمامی آزمایش‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد و جذب نوری هر ۶ ساعت در ۶۲۰ nm ثبت گردید [۲۰]. در تمامی محیط کشت‌هایی که حاوی مقادیر قندی بالاتر از ۲٪ بود، سترون کردن محیط کشت توسط فیلتراسیون با استفاده از دستگاه میلی پور انجام گرفت..

## ۶-۲- بررسی میزان فعالیت سویه‌های مخمیری در

### محیط مایع مشابه خمیر

سلول‌های مخمر در YPD به مدت ۴۸ ساعت کشت شدند. از این سوسپانسیون نمونه‌های ۵ میلی لیتری تهیه و سانتریفوژ (g ۳۰۰۰، ۵ min) گردید. مایع رویی دور ریخته شد و توده‌ی زیستی باقیمانده در ۵ میلی لیتر محیط مایع مشابه خمیر حل شد و به سامانه اندازه گیری تولید CO<sub>2</sub> منتقل گردید. از محیط کشت اولیه نمونه‌های ۵ میلی لیتری به منظور محاسبه میزان وزن خشک موجود در این مقدار سوسپانسیون سلولی تهیه شد و در نهایت پس از اندازه‌گیری میزان گاز تولید شده توسط مخمرها طی ۱۲۰ دقیقه، این میزان برحسب گاز CO<sub>2</sub> تولید شده توسط هر گرم وزن خشک سلولی برای هر سویه محاسبه و گزارش گردید.

## ۷-۲- تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

به منظور انجام تحلیل‌های آماری از روش‌های آزمون t و تجزیه واریانس استفاده گردید و میزان معناداری 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 نمونه-

#### های مخمر تجاری

نمونه‌های مختلف پودرهای تجاری مخمر نانوائی، میزان فعالیت متفاوتی را در محیط فاقد ساکاروز نشان دادند. بالاتر بودن این شاخص توسط یک نمونه تجاری در روش انجام گرفته نشان‌گر بالاتر بودن کیفیت آن نمونه در فرآوری خمیرهای معمولی می‌باشد. قدرت

## ۲-۴- سامانه طراحی شده برای اندازه گیری میزان

### تولید گاز در محیط‌های مایع

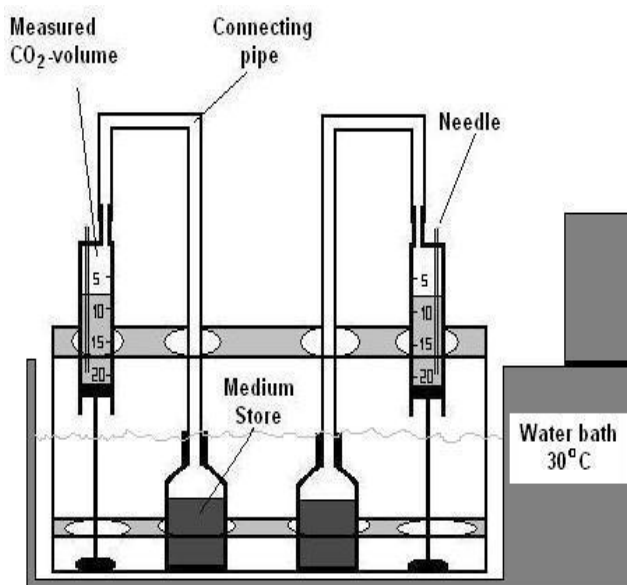
این سامانه از سه قسمت تشکیل شده است:

۱- مخزن حاوی محیط کشت و مخمر.

۲- لوله‌ی رابط که انتقال دهنده‌ی گاز تولید شده در محیط مایع 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<sub>2</sub> تولیدی توسط ریزسازواره‌ها بوسیله لوله‌ی رابط به درون سرنگ وارده شده و جایگزین آب داخل سرنگ می‌گردد. آب جایگزین شده توسط CO<sub>2</sub> از طریق سوزن واقع در سرنگ به بیرون هدایت می‌شود. چندین عدد از این سامانه در یک جا لوله‌ای ثابت 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

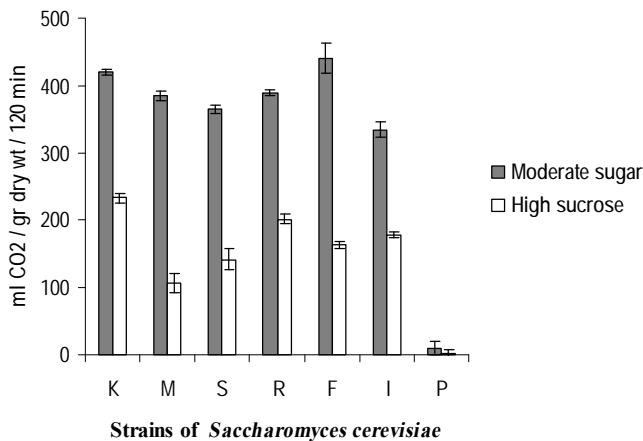
## ۲-۵- بررسی منحنی رشد سلولی

بررسی منحنی رشد سلولی در محیط YPD و محیط YPD که حاوی غلظتهای ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۳۵ درصد گلوکز بود انجام شد. هر سویه‌ی مخمیری ابتدا در محیط YPD بمدت یک روز کشت شد سپس این محیط کشت با محیط کشت YPD تازه و سترون رقیق شد تا جذب نوری در ۶۲۰ nm معادل با ۰/۷ شود. از این محیط

### ۲-۳- بررسی قدرت تخمیر سویه‌های مخمیری در

#### مقیاس آزمایشگاهی

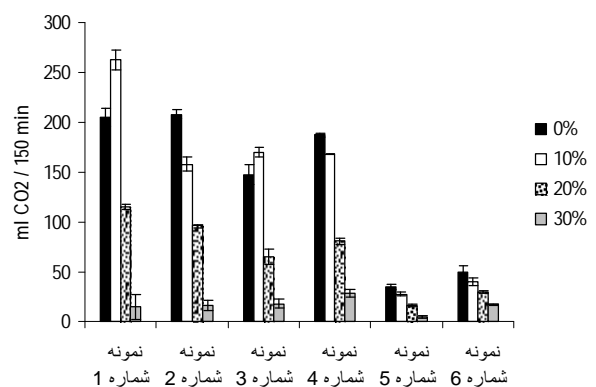
در شکل شماره ۴ میزان فعالیت سویه‌های صنعتی ساکارومایسس سرویزیه در محیط‌های مایع مشابه خمیر نشان داده شده است. در محیط Moderate sugar اختلاف میزان فعالیت دو سویه‌ی F و K با دیگر سویه‌ها در سطح ۵٪ معنا دار است ( $p < 0.05$ ). همچنین میزان فعالیت سویه‌ی K در محیط High sucrose با دیگر سویه‌ها در سطح ۱٪ معنا 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 مخمیری 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.



**شکل ۴** میزان تولید  $CO_2$  بر حسب میلی‌لیتر بر گرم وزن خشک سلولی در مدت ۱۲۰ دقیقه گرمخانه گذاری در دمای  $30^\circ C$  در محیط‌های مایع مشابه خمیر توسط سویه‌های صنعتی ساکارومایسس سرویزیه از نژاد مخمر نانوائی 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  $CO_2$  سی‌سی بسیار پایین توسط سویه‌ی P در این شرایط (بعنوان یک سویه‌ی شاهد) بخوبی نشان دهنده‌ی تفاوت ویژگی‌های خاص سویه‌های صنعتی مورد کاربرد بعنوان مخمر نانوائی

تخمیر مخمرهای نانوائی در خمیر توسط فشار اسمزی ناشی از آرد، نمک و بخصوص قندها کاهش می‌یابد. 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 ۴ 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 ۱ و 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.



**شکل ۳** میزان تولید  $CO_2$  بر حسب میلی‌لیتر در خمیر معمولی و خمیرهای حاوی غلظت‌های مختلف ساکاروز توسط پودرهای مخمر نانوائی تجاری در مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای  $30^\circ C$

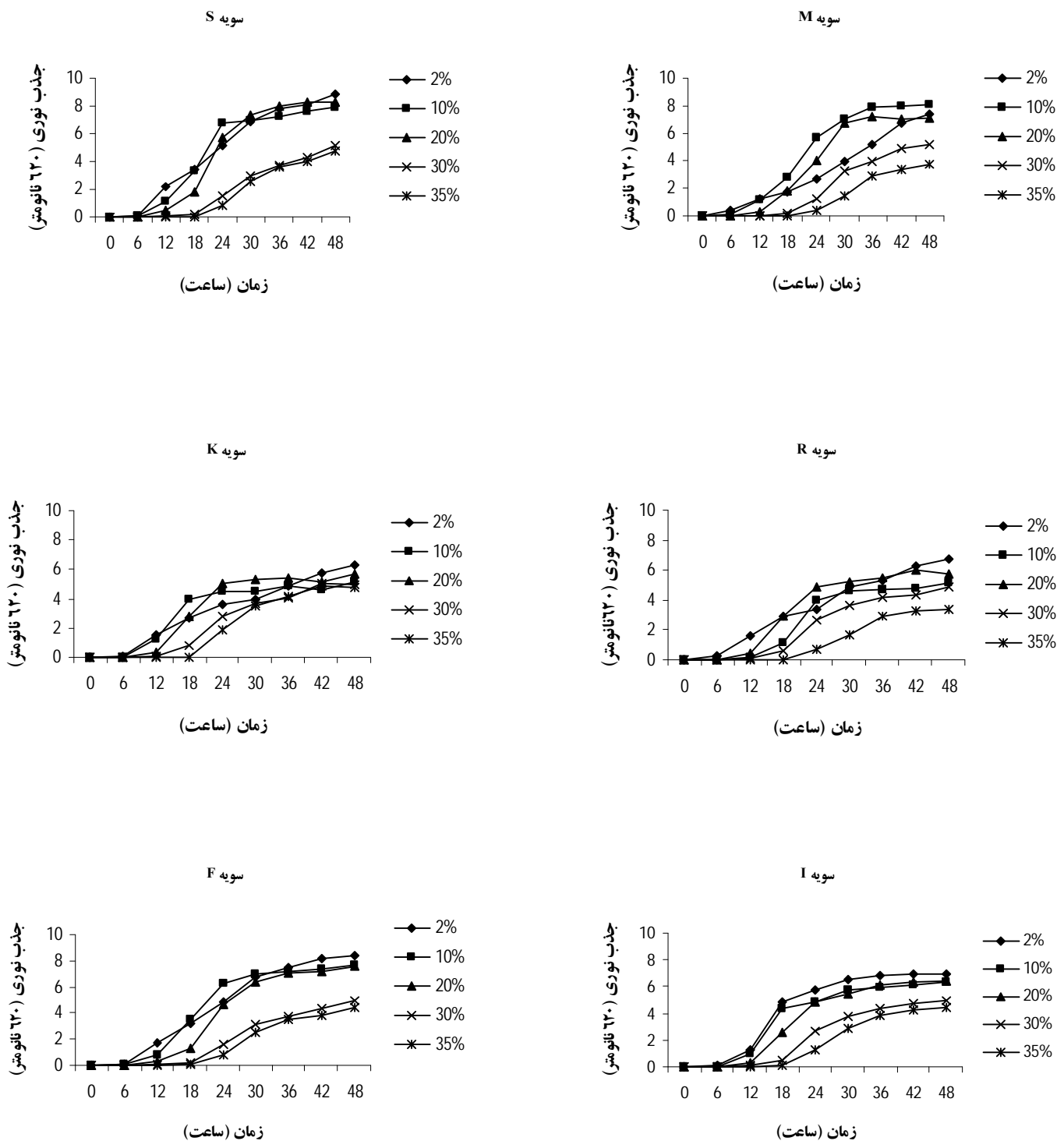
متفاوت از دیگر سویه ها می باشد به صورتی که در غلظت ۳۰٪، فاز تاخیر در این دو سویه برابر با ۱۲ ساعت بوده اما در دیگر سویه ها نزدیک به ۱۸ ساعت می باشد که نشان دهنده توانایی بالاتر این دو سویه در تطابق با شرایط فشار اسمزی بالا و مقاومت بالاتر به فشار اسمزی است.

مطالعات نشان داده سویه هایی از مخمر ساکارومایسس سرویزیه که سیلان گلیکولیتیکی (Glycolytic flux) قویتری دارند، نسبت به سویه های دیگر از توانایی بالاتری برای فعالیت در خمیرهای شیرین و تطابق با محیط های حاوی فشار اسمزی بالا برخوردار هستند [۲۵]. این مطالعات با مشاهدات ما از رفتار دو سویه های R و K در میزان فعالیت در محیط High sucrose و تطابق سریعتر در محیط حاوی ۳۰٪ گلوکز با یافته های ذکر شده تطابق دارد. بررسی منحنی رشد سویه های مخمر وحشی مقاوم به فشار اسمزی از گونه های 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 غلظت های ۱۵٪ و ۲۰٪ گلوکز بیشترین میزان تولید توده زیستی را نشان می دهند و با افزایش غلظت گلوکز میزان نهایی تولید توده زیستی کاهش می یابد [۲۶]. بررسی منحنی رشد سویه های مورد آزمایش نشان داد که در تمامی سویه ها به جز سویه های R و K افزایش غلظت گلوکز در محیط کشت از ۲۰٪ به ۳۰٪ تأثیر شدیدی بر میزان تولید توده زیستی نهایی دارد اما تغییرات غلظت در محدوده ۲٪ تا ۲۰٪ در میزان تولید توده زیستی نهایی چندان اثرگذار نیست. بنابراین در این سویه ها حد بحرانی غلظت گلوکز بین ۲۰٪ تا ۳۰٪ قرار دارد. اما در سویه های R میزان بحرانی غلظت در محدوده ای بین ۳۰٪ تا ۳۵٪ است همچنین با توجه به معنی دار نبودن اختلاف میزان نهایی تولید توده زیستی در غلظت های ۳۵٪ از قند با دیگر غلظت ها در سویه های K انتظار می رود حد بحرانی غلظت قند در این سویه بالاتر از ۳۵٪ باشد که نشان دهنده مقاومت بیشتر به استرس فشار اسمزی در این دو سویه نسبت به دیگر سویه های مورد بررسی می باشد که با نتایج قبلی تطابق دارد. با توجه به نتایج حاصل به نظر می رسد سویه هایی که میزان مقاومت بالاتری به فشار اسمزی دارند از توانایی بالاتری در تولید CO<sub>2</sub> در خمیرهای شیرین برخوردار هستند این قابلیت باعث وسیع تر شدن موارد کاربرد این سویه ها در صنایع غذایی شده که از نظر اقتصادی اهمیت بالایی دارد.

در مقابل سویه های دیگر گونه های ساکارومایسس سرویزیه می باشد. هر چند سویه های صنعتی مورد استفاده به عنوان مخمر نانوائی نیز با یکدیگر در میزان تولید CO<sub>2</sub> متفاوت می باشند اما این تفاوت در مقایسه با سویه های P به شدت چشمگیر است که نشان دهنده شاخصه تولید سریع و زیاد CO<sub>2</sub> توسط سویه های مطلوب صنعتی مورد استفاده در تولید مخمر نانوائی می باشد. میزان فعالیت سویه ها در محیط High sucrose تفکیک کننده سویه ها در توانایی تخمیر در محیط هایی با فشار اسمزی بالا می باشد. به کارگیری محیط مایع حاوی مقادیر قند بالا و مقایسه قدرت تخمیر در این محیط به منظور شناسایی سویه های ساکارومایسس سرویزیه مناسب به منظور به کارگیری در خمیرهای شیرین یک روش کاربردی می باشد [۱۲ و ۱۴]. در سویه های صنعتی مورد آزمایش، سویه های K بالاترین قدرت تخمیر را نسبت به دیگر سویه ها در محیط High sucrose نشان داد. بنابراین در میان سویه های مورد آزمایش سویه های K بعنوان قویترین سویه های تخمیر کننده در شرایط خمیر شیرین شناخته شد.

### ۳-۳- بررسی منحنی رشد سلولی

یکی از ویژگی های مهم صنعتی یک سویه مناسب ساکارومایسس سرویزیه به منظور تولید مخمر نانوائی، سرعت تکثیر و توانایی تولید توده زیستی می باشد. سوبستراهای مورد استفاده در تولید صنعتی این محصول حاوی غلظت های بالای قند می باشد. حضور غلظت های بالای گلوکز در محیط کشت علاوه بر ایجاد فشار اسمزی سبب سرکوب مسیره های متابولیکی گلوکونئوز، تنفسی و جذب قندهای دیگر از طریق جلوگیری از بیان ژن در این مسیره ها می شود. قطع مسیر تنفسی و چرخه های TCA در این شرایط به اثر کرب تری (Crabtree effect) معروف است [۲۴ و ۲۳]. با توجه به منحنی رشد سویه های ساکارومایسس سرویزیه که در شکل ۵ نشان داده شده است افزایش میزان قند در محیط های کشت، در تمامی سویه ها منجر به افزایش فاز تاخیر منحنی رشد گردیده و همچنین کاهش در میزان نهایی تولید توده زیستی پس از مدت ۴۸ ساعت مشهود است. تفاوت منحنی رشد در دو غلظت ۲۰ و ۳۰ درصد گلوکز در سویه های M, S, F و I معنی دار است اما در سویه های K و R این اختلاف در میزان توده زیستی تولید شده پس از ۴۸ ساعت در این دو سویه در غلظت های ۲۰ و ۳۰ درصد معنی دار نیست. همچنین اگرچه افزایش غلظت قند در محیط کشت بطور کلی سبب افزایش فاز تاخیر منحنی رشد در تمامی سویه ها می شود اما تأثیر این عامل در سویه های R و K



شکل ۵ منحنی رشد سلولی سویه‌های صنعتی ساکارومایسس سرویزیه در محیط کشت YPD حاوی غلظت‌های متفاوت گلوکز در شرایط  $30^{\circ}\text{C}$  و  $150\text{rpm}$  به مدت ۴۸ ساعت.

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 Biotechnology. 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., Loiez, 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.

## ۴- نتیجه گیری

در جداسازی و انتخاب سویه های مناسب ساکارومایسس سرویزیه به منظور تولید مخمر نانویی به دلیل تفاوت چشمگیر تولید CO<sub>2</sub> در این سویه ها نسبت به دیگر سویه های گونه ای ساکارومایسس سرویزیه ، این ویژگی باید به عنوان اولین صفت مورد بررسی در نظر گرفته شود. روش های آزمایشگاهی ارائه شده در این تحقیق از قابلیت بالایی در غربالگری سریع سویه های مختلف برخوردار می باشد. سویه های مقاومتر در مرحله ی تولید توده ی زیستی در صنایع تولید کننده از نظر اقتصادی از بازده بیشتری برخوردار هستند همچنین این سویه ها به دلیل توانایی بالاتر در فرآوری محصولات قنادی، محدودی و وسیع تری از موارد مصرف را تحت پوشش قرار می دهند.

## ۵- سپاسگزاری

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

## ۶- 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



- [24] Ganced, J. M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbial 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.
- [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 *Torulaspota delbrueckii*. *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.

## The study of CO<sub>2</sub> production and growth rate in suitable industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for production of bakers yeast

Golabi, M. <sup>1\*</sup>, Tavassoli, M. <sup>2</sup>, Nahvi, I. <sup>3</sup>, Mobini Dehkordi, M. <sup>4</sup>

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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> production was measured in a model liquid dough media using the gas measuring system. The comparison between the amounts of CO<sub>2</sub> production by standard and industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* revealed that rapid CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>, *Saccharomyces cerevisiae*, confectionary industry.

---

\* Corresponding Author E-Mail address: [Mohtsen.Golabi@Gmail.com](mailto:Mohtsen.Golabi@Gmail.com)