جداسازی سویه صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* با قابلیت تحمل بالا به اتانول از کارخانه‌های الکل‌سازی ایران

فرشاد درویشی* و نوشین ابوالحسن مقدمی

مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲

چکیده

کاهش سوخت‌های فسیلی، افزایش قیمت سوخت‌ها و انتشار گاز دی اکسید کربن و نگرانی درباره تغییرات آب و هوایی عوامل محرک برای تولید سوخت‌های زیستی هستند. سوخت‌های زیستی میکروبی، سوخت‌های مایع و گازی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. بیواتانول یک سوخت زیستی جایگزین مناسب برای سوخت‌های پایه‌ی نفتی است. برای تولید صنعتی و در مقیاس بالای بیواتانول، اولین مرحله جداسازی سویه‌های مخمری مناسب با تحمل بالا به اتانول و تولید بالای اتانول است. از این رو هدف این تحقیق، جداسازی سویه صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* با قابلیت تحمل بالا به اتانول از کارخانه‌های الکل‌سازی ایران بود. نمونه برداری از چند کارخانه‌های الکل‌سازی برای جداسازی سویه *ساکارومایسس سرویزیه* با بیشترین میزان تولید و تحمل به اتانول صورت گرفت. سویه مخمر منتخب توسط آزمایش‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی نظیر تخمیر قندی، جذب ترکیبات نیتروژنی و کربنی و همچنین با روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. سویه منتخب مخمر ۸ درصد اتانول تولید کرد و به ۱۲ درصد اتانول تحمل داشت. آزمایش‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی تایید کردند که سویه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* است و این سویه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* سهند ۱۰۱ نام‌گذاری شد. سویه صنعتی مخمر جدا شده با ویژگی‌های مناسب از لحاظ تولید و تحمل به اتانول می‌تواند برای مطالعات بعدی و افزایش تولید با روش‌های بهینه‌سازی سازی در سطح ارلن و بیوراکتور بکار رود.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، شناسایی، مخمر، سویه صنعتی، بیواتانول.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۷۲۷۸۹۰۰-۰۴۱ ، پست الکترونیکی: f.darvishi@ymail.com

مقدمه

سوخت‌های فسیلی جزء سوخت‌های تجدیدناپذیر و دارای منابع محدود هستند و به دلیل انتشار گازهای گلخانه‌ای می‌توانند برای محیط زیست مضر باشند (۱۹). حدود ۸۸ درصد از مصرف انرژی جهانی، سوخت‌های فسیلی هستند (۲۴). کم شدن ذخایر سوخت‌های فسیلی، نگرانی درباره تغییرات آب و هوایی و افزایش انتشار گازهای گلخانه‌ای از جمله دی اکسید کربن از جمله دلایل برای سوق دادن به سمت سوخت‌های زیستی می‌باشند (۲۴). سوخت‌های زیستی، سوخت‌های گازی و مایع با منشاء زیستی هستند که از زیست‌توده‌های آلی تجدیدپذیر مشتق می‌شوند. بیو-هیدروژن، بیوگاز، الکل‌های زیستی، بیودیزل و روغن‌های زیستی از سوخت‌های زیستی تجدیدپذیر هستند که تحقیقات جهانی برای تولید این سوخت‌ها و کاهش آلودگی زیست محیطی در جریان است (۱۰).

با توجه به فرآیندهای تخمیر، پیش‌تیمار و هیدرولیز، امکان تولید انواع منابع انرژی، ترکیبات بیوشیمیایی و فرآورده‌های زیستی از پسماندهای لیگنوسلولزی کشاورزی وجود دارد. تولید میکروبی اتانول به عنوان سوخت زیستی

سریعاً در حال توسعه بوده و کارخانه‌های جدید تولید الکل راه اندازی می‌شوند تا میزان تولید را افزایش دهند و در این بین محققان نیز راه‌هایی را برای افزایش میزان اتانول جستجو می‌کنند (۲ و ۴). یکی از راه‌هایی که می‌تواند به افزایش میزان تولید اتانول کمک نماید، توسعه سویه‌های میکروبی مورد استفاده در تخمیر است (۲۳). میکروارگانیسم‌هایی که می‌توانند برای تولید اتانول مورد استفاده قرار گیرند شامل قارچ‌ها مثل *موکور ایندیکوس* (*Mucor indicus*) (۱۴)، باکتری‌ها مثل *زیمومونا‌س موبیلیس*(۲۱) و مخمرها مانند *ساکارومایسس سرویزیه* و *کلاورومایسس مارکسیانوس* (*Kluyveromyces marxianus*) می‌باشند (۲۲).

مخمرها در بسیاری از فرآیندهای صنعتی مثل تولید اتانول، زیست توده (مخمر نان و مخمرهای غذایی) و محصولات متابولیکی متنوع استفاده می‌شوند. علاوه بر این از مخمرها برای تولید انواع محصولات شامل آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، پلی‌ساکاریدها، کارتنوئیدها، الکل‌های پلی هیدریک (Polyhydric alcohols)، لیپیدها، گلیکولیپیدها، اسید سیتریک، اتانول، دی اکسیدکربن و همچنین ترکیبات سنتز شده با ایجاد DNA نو ترکیب استفاده شده است. برخی از این تولیدات به صورت تجاری تولید می‌شوند و برخی از آن‌ها دارای اهمیت زیست فناوری هستند. استفاده از مخمرها به زمان‌های باستان برمی‌گردد که حدود ۷۰۰۰ سال قبل از میلاد در سومر (Sumeria) تولید شد. همچنین رومیان باستان در ۱۰۰ سال قبل از میلاد، مخمر را به صورت مایه نان در نانوایی‌ها مورد استفاده قرار دادند. شیر نیز به صورت کفیر (Kefyr) توسط سویه‌های *کلاورومایسس* در کشورهای آسیایی تولید شد. الکل‌های سوختی و صنعتی معمولاً به وسیله سنتز شیمیایی از نفت به دست می‌آید اما در سال ۱۹۷۷، مخمرها ۲۰ درصد از این تولیدات را به خود اختصاص دادند و درسال ۱۹۸۴ مخمرها سهم خود را در تولید اتانول به ۸۷ درصد رساندند. بسیاری از تحقیقات اکولوژیکی و تکنولوژیکی این فرضیه را تأیید کرده‌اند که *ساکارومایسس سرویزیه* گونه‌های خاصی از مخمرها هستند که تخمیر الکلی آبمیوه‌ها را انجام می‌دهند (۲۰) و نیز مخمری است که بیشترین استفاده را در تولید اتانول صنعتی دارد (۶).

بیشترین تحقیقاتی که تا به امروز مورد توجه قرار گرفته است، جداسازی ارگانیسم‌های تحمل کننده اتانول می‌باشد که دست‌یابی به این پیشرفت به تولید و بازده بیشتر اتانول کمک می‌کند. جهت تولید اتانول در مقیاس بالا و صنعتی، اولین قدم جداسازی سویه‌های مناسب برای تولید اتانول می‌باشد که در این تحقیق سعی بر این بود که سویه‌ی مناسب صنعتی و بومی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* با تحمل بالا نسبت اتانول با نمونه‌برداری از کارخانه‌های الکل‌سازی ایران جداسازی شود.

مواد و روشها

نمونه برداری: در این تحقیق نمونه‌برداری از سه کارخانه الکل‌سازی سهند مراغه در ۱۷ کیلومتری جاده مراغه – تهران، بیدستان قزوین در ۱۰ کیلومتری جاده قزوین– کرج و گلریز میاندوآب در ۱۰ کیلومتری جاده‌ی میاندوآب– شاهین‌دژ انجام گردید. نمونه‌برداری از قسمت‌های مختلف کارخانه (پیش کشت و مرحله‌ی تخمیر) برای جداسازی سویه مناسب انجام شد.

محیط‌های کشت و شرایط کشت مخمرها: نمونه‌ها در محیط کشت YGC (مرک) برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها کشت داده شدند.محیط کشت جامد YGC، که به میزان ۴۰ گرم بر لیتر در آب مقطر حل و بعد از آماده‌سازی، محیط در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. این محیط برای رشد مخمر و عدم رشد باکتری‌ها و جداسازی نمونه‌ها تهیه شد. محیط کشت YPD محیطی مغذی برای رشد مخمرها و بررسی تولید اتانول توسط مخمرها تهیه شد. ترکیبات محیط کشت YPD (Yeast extract peptone dextrose) شامل گلوکز

(۲۰ گرم در لیتر)، پپتون (۲۰ گرم در لیتر) عصاره مخمر (۱۰ گرم در لیتر) و تیامین (۰/۰۵ گرم در لیتر) می‌باشد. برای ساخت محیط جامد ۲ درصد آگار (مرک) را به سایر ترکیبات افزوده و در نهایت محیط در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل گردید. ملاس چغندر قند از کارخانه قند میاندوآب خریداری و محیط کشت ملاس چغندر قند با بریکس ۱۸ آماده گردید. درجه بریکس میزان قند محلول می‌باشد که یک درجه از بریکس شامل یک گرم از ساکارز (مرک) در ۱۰۰ گرم محلول است. این میزان توسط بریکس سنج سنجش شد. ۲ گرم بر لیتر از سولفات آمونیوم (مرک) و ۲ گرم بر لیتر اوره (مرک) نیز برای ساخت این محیط افزوده شد.

بررسی تحمل سویه‌های صنعتی مخمر به اتانول: برای بررسی میزان تحمل سویه‌های مخمر به اتانول، آنها در محیط کشت YPD جامد دارای ۱۰ تا ۱۲ درصد اتانول کشت داده و رشد یا عدم رشد آن‌ها بررسی گردید. رشد سویه‌ها در داخل این محیط نشان‌دهنده تحملشان به اتانول است. در نتیجه ۸۰ سویه جداسازی شده از کارخانه‌ها در محیط‌های دارای اتانول کشت داده شدند تا بهترین نمونه از میان آن‌ها که بیشترین تحمل را به اتانول دارند، انتخاب شوند.

بررسی تولید کمی اتانول توسط مخمر در محیط کشت صنعتی: جهت بررسی کمی میزان اتانول در محیط ملاس، ابتدا سویه مخمر منتخب در محیط YPD جامد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس یک کلنی در محیط ۲۰ میلی لیتری ملاس با بریکس ۱۸ که در ارلن ۱۰۰ میلی لیتری تهیه شده بودند تلقیح گردید و پس از ۲۴ ساعت از هر یک از نمونه‌ها به میزان یک میلی لیتر مجدداً به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر ملاس با بریکس ۱۸ تلقیح شد. محیط‌های کشت ملاس ۲۰ میلی‌لیتری در ارلن، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ و دمای ۲۹ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا در شرایط هوازی رشد کنند، سپس برای ایجاد شرایط بیهوازی، محیط به ظرف‌های دربسته ۵۰ میلی‌لیتری انتقال داده شدند. با قرار دادن سرنگ در روی در ظروف، راهی برای خروج گاز دی اکسید کربن تولید شده توسط مخمر ایجاد گردید. نمونه در دمای ۲۹ درجه سانتیگراد و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه انکوباتور شیکردار قرار داده شد. برای تعیین میزان تولید اتانول و شمارش تعداد سلول‌های مخمر هر روز نمونه‌برداری انجام گرفت.

شناسایی مخمر از طریق ریخت شناسی: برای ریخت-شناسی کلنی‌ها، آن‌ها را روی YPD جامد کشت داده و ویژگی‌های ظاهری کلنی در پلیت بررسی شد. شکل مخمر تک سلولی نیز در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۴۰ مشاهده گردید.

بررسی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مخمر: تخمیر کربوهیدرات‌ها: مخمرها در توانایی تخمیر قندها با هم متفاوتند که این توانایی به وسیله‌ی تولید گاز دی اکسید کربن و تجمع آن در داخل لوله‌ی دورهام اندازه‌گیری می-شود. لوله آزمایش حاوی لوله‌های دورهام شامل ۲ درصد از محلول قندی (به جز رافینوز که معمولاً ۴ درصد است، چون برخی سویه ها فقط یک قسمتی از این مولکول را مصرف می‌کنند) استفاده می‌شود. قندهای مورد استفاده در این بررسی شامل L-آرابینوز، D-مالتوز، D-رافینوز، لاکتوز، D-مانیتول، D-زایلوز، D-گالاکتوز، سوکروز و D-سلبیوز (همه قندها از محصولات مرک) می‌باشند. یک لوله آزمایش حاوی محیط YPD مایع برای سویه‌ی منتخب آماده شد و یک کلنی از YPD جامد در آن تلقیح گردید، سپس در داخل انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا رشد کند و به عنوان محیط تلقیح مورد استفاده قرار گیرد. تهیه‌ی لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت به این صورت انجام شد که ابتدا ۲ گرم از قندها (جز رافینوز که ۴ گرم می‌باشد) به علاوه ۱ گرم از عصاره مخمر در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد سپس لوله‌های دورهام

کوچک را به صورت برعکس داخل محیط انداخته و در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استریل کرده تا لوله‌های دورهام به پایین بروند و در ته قرار بگیرند. لوله‌های حاوی محیط قندی به میزان ۱ درصد، از محیط کشت YPD مایع که حاوی سویه کشت داده شده بود، تلقیح شد. لوله‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۸ روز انکوبه شدند. کدورت محیط و لوله‌های دورهام برای تجمع گاز داخل آنها بررسی شدند که نتایج به صورتی که در جدول ۱ آمده است، خوانده می‌شوند (۱۵).

جذب (Absorption) ترکیبات کربن: لوله‌های آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت که شامل محیط پایه نیتروژن (سیگما)(YNB) و قند و آب مقطر می‌باشد، آماده شد.

جدول ۱- روش تفسیر نتایج تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط مخمرها (۱۱)

+	مثبت قوی	پر شده از گاز تا ۷ روز
L (Late)	مثبت تأخیری	پر شده از گاز به صورت سریع بعد از ۷ روز
S (Slow)	مثبت کم	پر شده از گاز به آرامی بعد از ۷ روز
W (Weak)	مثبت ضعیف	پر شدن گاز کمتر از ۱/۳ لوله دورهام
–	منفی	عدم پرشدن گاز
V (Variant)	متغیر	برخی سویه ها + و برخی دیگر – هستند

بر این اساس ۶/۷ گرم از محیط پایه‌ی نیتروژن و ۵ گرم از قند در۱۰۰ میلی‌لیتر آب تهیه شد و با فیلتراسیون، استریل گردید. قندها شامل آرابینوز، D–مالتوز، D–رافینوز، لاکتوز، D–مانیتول، D–زایلوز، D–گالاکتوز، سوکروز و D–سلبیوز می‌باشند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محیط آماده شده را در ۴/۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کردیم. برای لوله‌های آزمایش، ۱ درصد از محیط کشت YPD حاوی سویه‌ی منتخب، تلقیح کرده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ الی ۴ هفته انکوبه گردید و لوله‌ها هر ۴۸-۲۴ ساعت یک بار بررسی شدند. برای بررسی این لوله‌ها از یک کاغذ سفید رنگ که دارای خطوط سیاه با قطر ۰/۷ میلی‌متر می‌باشد استفاده شد و با قرار دادن کاغذ در پشت محیط نتایج به صورت زیر گزارش شد. اگر خطوط به طور کامل دیده نشود: ۳+؛ خطوط به صورت نامرتب دیده شود : ۲+؛ خطوط قابل تشخیص باشند : ۱+ ؛ خطوط به طورکامل و جدا از هم دیده شوند نتیجه منفی می‌باشد. نتایج به صورت جدول ۲ گزارش می‌شوند (۱۵).

جدول ۲- روش قرائت نتایج حاصل از جذب ترکیبات کربن (۱۱)

مثبت (+)	اگر نتایج ۳+ و ۲+ در طی یک الی دو هفته به دست آید.
مثبت تأخیری (L)	اگر ۳+ و ۲+ بلافاصله بعد از هفته مشخص شود.
مثبت ضعیف (W)	اگر ۱+ خوانده شود.
منفی (–)	اگر خطوط به طور واضح و مشخص دیده شوند.

جذب ترکیبات نیتروژن: محیط استوک نیتروژنی با غلظت ۱۰ برابر، با حل کردن ۱۱/۷ گرم از محیط پایه کربن و با مقادیر ۰/۷۸ گرم نیترات پتاسیم و ۰/۲۶ گرم نیتریت سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب تهیه شد و سپس توسط فیلتراسیون استریل گردید. محیط نهایی با مخلوط کردن ۰/۵ میلی لیتر از محیط استوک با ۴/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل آماده شد. نتایج همانند جذب ترکیبات کربن گزارش می‌شود (۱۵).

شناسایی مولکولی مخمر و رسم درخت فیلوژنی: برای شناسایی مخمر جداسازی شده، پرایمرهای ITS1 و ITS4 با توالی‌هایی که در جدول ۳ آمده است برای تکثیر ژن 18S rRNA مخمر استفاده شد. این پرایمرها از شرکت تکاپوزیست تهیه شدند.

جدول ۳- توالی پرایمرهای برای تعیین توالی و شناسایی مخمر

نام	توالی آغازگر	نوکلئوتید	Tm (ºC)
ITS1	5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′	۱۹	۶۳
ITS4	5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′	۲۰	۵۴/۱

از روش (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) PCR- کلنی برای تکثیر قطعه مورد نظر استفاده شد. در این روش ابتدا یک کلنی ۵-۳ میکرولیتر آب مقطر حل گردید و در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf AG22331) با سیکل ارائه شده در جدول ۴ قرار داده شد تا سلول‌ها لیز شوند.

جدول ۴- چرخه دمایی برای لیز و آزادسازی ژنوم نمونه

دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)
۶۵	۳۰
۸	۳۰
۶۵	۹۰
۸	۶۰
۶۵	۱۸۰
۹۷	۶۰
۶۵	۶۰
۸۰	۱۰ دقیقه

سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ویالی با حجم ۵۰ میکرولیتر طبق جدول ۵ در دستگاه ترموسایکلر انجام شد.

جدول ۵- ترکیبات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

ترکیب	غلظت	حجم(میکرولیتر)
مستر میکس آنزیم فیوژن (2X Master Mix Phusion U)	2X	۲۵
ITS1	۱۰ پیکومول	۱
ITS4	۱۰ پیکومول	۱
محصول کلونینگ	-	۱
آب مقطر استریل	-	۲۲

مستر میکس فیوژن از شرکت ترموساینتیفیک فیشر (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) خریداری شده و انجام واکنش از مخلوط حاصل در سیکل دمایی ارائه شده در جدول ۶ در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت.

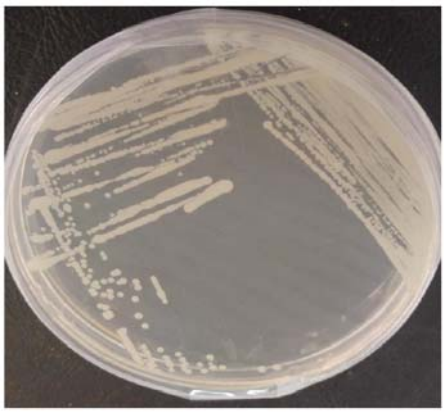
برای الکتروفورز محصول PCR از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد برای تهیه ژل ۰/۲ گرم از پودر آگارز (مرک) در داخل ۲۰ میلی لیتر از 0.5X TBE حل شد و بعد از حرارت و انحلال کامل، با کاهش دمای ژل، ۱ میکرولیتر از محلول RedSafe (iNtRon biotechnology) جهت مشاهده باندها در مقابل اشعه فراء بنفش به ژل افزوده شد. محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست فرستاده شد. این توالی از طریق بانک اطلاعاتی NCBI= National Center for Biotechnology Information و توسط برنامه blastn با سایر ژن‌های موجود مقایسه شده و توالی-های مشابه یافت شد و برای رسم درخت فیلوژنیکی از نرم افزار MEGA 7 استفاده شد.

شکل ۶- چرخه دمایی مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مرحله	دما(درجه سانتی‌گراد)	زمان
واسرشتگی اولیه	۹۴	۵ دقیقه
واسرشتگی	۹۴	۱ دقیقه
اتصال	۵۵	۱ دقیقه
تکثیر	۷۲	۲ دقیقه
رفتن به مرحله	تکرار مرحله ۲-۴ (۳۰ بار)	-
تکثیر	۷۲	۱۰ دقیقه
توقف واکنش	۴	-

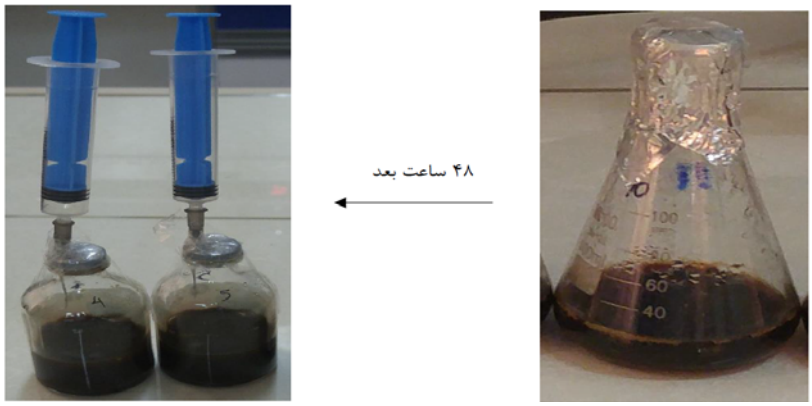
نتایج

بررسی رشد نمونه‌ها و تعیین تحمل به الکل: ۸۰ نمونه از کارخانه‌های تولید اتانول در محیط YGC برای رشد مخمرها و عدم رشد باکتری ها کشت داده شدند که در این مرحله حدود ۸۰ نمونه مخمر خالص‌سازی شدند. با کشت این مخمرها در محیط YPD دارای ۱۰ الی ۱۲ درصد اتانول، یک سویه از بین ۸۰ سویه برای ادامه تحقیقات انتخاب شد که این سویه توانایی تحمل ۱۲ درصد اتانول را داشت (شکل ۱).



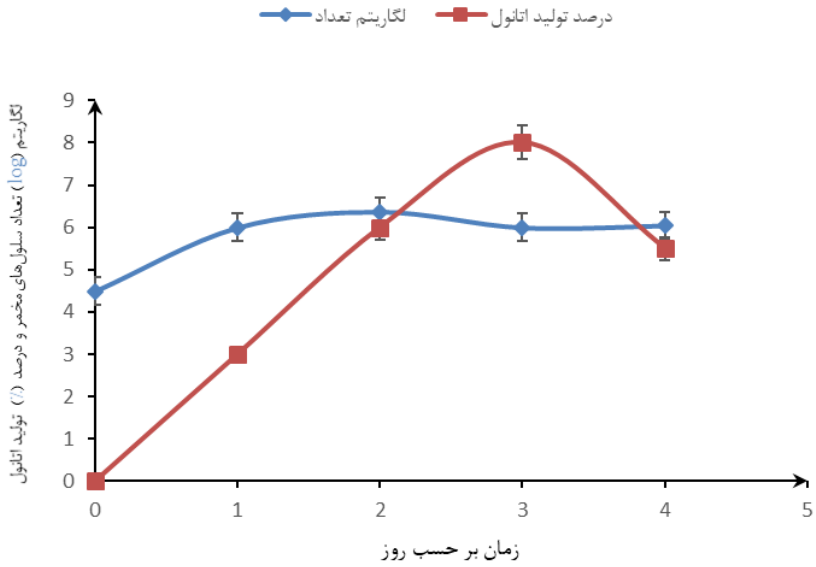
شکل ۱- کلنی سویه منتخب مخمر بر روی محیط YPD دارای ۱۲ درصد اتانول

تولید کمی اتانول توسط سویه مخمر منتخب در محیط کشت صنعتی: ارلن و ظروف دربسته که به ترتیب در شرایط هوازی و بی‌هوازی برای تولید اتانول به کار رفت در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود سویه منتخب مخمر علاوه بر تحمل ۱۲ درصد اتانول، در روز سوم و در زمان اوج تولید ۸ درصد اتانول تولید کرد.



شکل ۲- کشت و تخمیر هوازی (سمت راست) و تخمیر بی‌هوازی (سمت چپ) محیط کشت صنعتی ملاس برای تولید اتانول

شناسایی سویه مخمر منتخب از طریق ریخت‌شناسی: کلنی‌های سویه منتخب دارای سطح نرم و کرم رنگی بوده و حالت تقریبا لزجی داشته و سلول‌های مخمرها در زیر میکروسکوپ به شکل بیضوی مانند مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بودند.



شکل ۳- منحنی رشد و تولید اتانول سویه منتخب مخمر در محیط کشت صنعتی

بررسی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی: پس از کشت نمونه در محیط‌های قندی، پر شدن گاز دی اکسید کربن در داخل لوله‌های دورهام هر ۲۴ ساعت یک بار مورد بررسی قرار گرفت. با مقایسه نتایج با کتاب تاکسونومی مخمرها (۲۰)، مشخص گردید که ویژگی‌های مخمر منتخب مشابه ویژگی‌های مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* می‌باشد. نتایج این آزمایش، پس از بررسی کدورت لوله‌ها هر ۲۴ ساعت یک بار و مشخص شدن و یا نشدن خطوط کاغذ از داخل

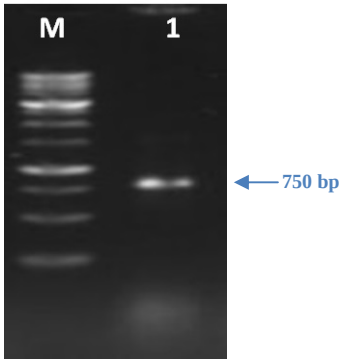
محیط، گزارش شد. برای بررسی این لوله‌ها از یک کاغذ سفید رنگ که دارای خطوط سیاه با قطر ۰/۷۵ میلی‌متر می‌باشد استفاده شد. نتایج نهایی در مقایسه با کتاب تاکسونومی مخمرها (۲۰) نشان داد که این سویه می‌تواند *ساکارومایسس سرویزیه* باشد. همان‌طور که در جدول ۷ مشخص است، این مخمر توانایی تخمیر و استفاده از قند-های گلوکز، آرابینوز، مالتوز، رافینوز، گالاکتوز و سوکروز را دارد.

جدول ۷ – نتایج حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها، جذب ترکیبات کربنی و ترکیبات نیتروژنی توسط سویه مخمر منتخب.

تخمیر کربوهیدرات‌ها	
آرابینوز	+
مالتوز	+
رافینوز	+
لاکتوز	–
مانیتول	–
زایلوز	–
سلبیوز	–
گالاکتوز	+
سوکروز	+
گلوکز	+
جذب ترکیبات کربنی	
مالتوز	+
رافینوز	+
لاکتوز	–
مانیتول	–
زایلوز	–
سلبیوز	–
گالاکتوز	+
سوکروز	+
گلوکز	+
آرابینوز	+
جذب ترکیبات نیتروژنی	
نیترات پتاسیم	–
نیترات سدیم	–
کلرید آمونیوم	–

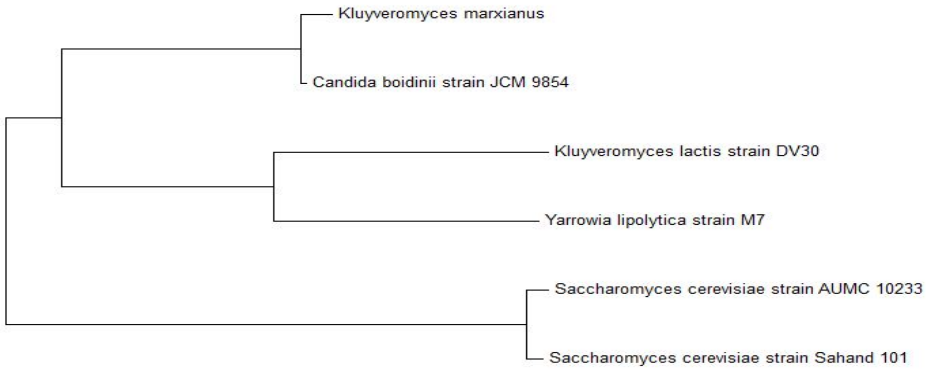
این در حالی است که جذب ترکیبات کربنی برای این قندهای ذکر شده نیز وجود دارد. با توجه به این نتایج مشخص می‌شود که ویژگی‌های ریخت شناسی؛ فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه منتخب مخمر مشابه به *ساکارومایسس سرویزیه* می‌باشد و می‌توان آن را بعنوان سویه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در نظر گرفت (جدول ۷).

شناسایی مولکولی سویه منتخب: پس از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز محصول حاصل از PCR ، باندی به اندازه ۷۵۰ جفت باز دیده شد که در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴- ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن 18S ریبوزمی سویه مخمر منتخب. M: لدر ژن 1kb (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder)، 1: باند مربوط به تکثیر ژن 18S سویه مخمر

مطالعات بیوانفورماتیکی: جهت شناسایی سویه مخمر منتخب قطعه 18S ریبوزمی آن توالی‌یابی گردید. سپس توالی بدست آمده در بانک اطلاعات بیوانفورماتیکی NCBI مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با استفاده از قسمت بلاست در پایگاه مذکور مشخص شد که توالی قطعه 18S سویه هدف با سویه *ساکارومایسس سرویزیه* بیشترین شباهت را داشت بنابراین نتایج تعیین توالی مشخص نمود که سویه‌ی مخمر منتخب *ساکارومایسس سرویزیه* است که این مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* سهند ۱۰۱ نامیده شد. در شکل ۵ درخت فیلوژنی به وسیله نرم افزار MEGA 7 با روش Neighbour-joining رسم شده است.



شکل ۵- درخت فیلوژنی ارتباط توالی ژن 18S rRNA سویه مخمر منتخب *ساکارومایسس سرویزیه* سهند ۱۰۱ با جنس *ساکارومایسس سرویزیه* نشان می‌دهد. همچنین مخمرهای دیگر به عنوان out group هستند.

بحث

بیواتانول یک سوخت سازگار با محیط زیست است. مصرف اتانول سبب کاهش انتشار ترکیبات آلی فرار، مونواکسیدکربن واکسیدهای نیتروژن می‌شود. انتشار گاز-های گلخانه‌ای و سمیت اتانول کمتر از سوخت‌های فسیلی است (۱۲). تولید اتانول توسط کشت‌های مخمری یک صنعت بسیار مهم است که درآینده بمنظور تولید سوخت-های الکلی بر اهمیت آن افزوده خواهد شد. تبدیل اتانول به یک سوخت زیستی تجدیدپذیر اقتصادی نیاز به بهینه-سازی میزان تولید اتانول دارد. بنابراین در این تحقیق سعی بر این بود که سویه‌ای با تحمل بیشتر به اتانول و تولید مناسب اتانول از کارخانجات الکل سازی جداسازی شود (۹).

با توجه به اهمیت تولید بیواتانول از ضایعات لیگنوسلولزی به عنوان سوختی تجدیدپذیر و مقرون به صرفه، افزایش بازده تولید امری ضروری به نظر می‌رسد که می‌توان این هدف را با استفاده از بهینه‌سازی این منابع و تولید حداکثر میزان اتانول انجام داد. مطالعات مختلفی بر روی استفاده از منابع ارزان قیمت، تحمل میکروارگانیسم‌های مسئول فرآیند تخمیر و کاهش هزینه تولید بیواتانول صورت گرفته است (۱ و ۲۵). از جمله دلایل اهمیت مخمرها در تولید این محصولات می‌توان به نگهداری و کشت آسان و غیر ویسکوز، نیازهای محیطی و غذایی ساده، تراکم سلولی بالا ، هزینه کم در محیط تولید اشاره کرد (۳).

با بررسی برخی از تحقیقات می‌توان به این نتیجه رسید که عموماً سلول‌های مخمری از مونوساکاریدها برای رشدشان استفاده می‌کنند و تعداد کمی از آن‌ها به اتانول تبدیل می-شود. دی-گلوکز بهترین نوع سوبسترا است که هم برای برای رشد سلول‌های مخمر و هم برای تولید اتانول استفاده می‌شود که قندهای هگزوز شامل گلوکز، گالاکتوز و مانوز توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها تخمیر می‌شوند (۱۸).

ملاس به دلیل میزان قند بیشتر آن به عنوان سوبسترا برای تخمیر استفاده می‌شود. بنابراین می تواند نیاز کربن مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* را طی متابولیسم آن فراهم کند. در نتیجه استفاده از ملاس به عنوان نسل اول بیواتانول مناسب شناخته می‌شود که در این تحقیق نیز از این منبع کربن استفاده شده است. در مطالعه جایوس و همکاران میزان غلظت قند احیاکننده در طی ۳۶ ساعت انکوباسیون کاهش شدید داشته است که این میزان تا ۷۲ ساعت به آرامی کاهش می‌یابد (۱۷). با در نظرگرفتن این موارد بریکس ۲۱ مورد آزمایش در این تحقیق بعد از ۷۲ ساعت به بریکس ۱۴ رسیده است که نشان از استفاده مخمرها از قندهای موجود در منبع کربن یعنی ملاس چغندر است. افزایش درصد اتانول توسط این سویه از مخمر نقش بسزایی در کاهش آلودگی‌های محیطی کارخانجات تولیدی

دارد که این آلودگی‌ها ناشی از درصد پایین اتانول علی رغم استفاده بیش اندازه از ملاس در کارخانجات می‌باشد.

علاوه بر منبع کربن، منابع نیتروژن نقش بسزایی در رشد مخمر و تولید اتانول دارد. بنابراین در بسیاری از محیط‌های صنعتی منبع نیتروژن شامل مواد مختلفی مثل پپتیدها و اسید آمینه‌های آزاد است. در چنین محیط‌هایی تشکیل گلیسرول نقش اساسی در تنظیم اسمزی سلولی دارد (۷). منبع نیتروژن نمی‌تواند فرآیند جذب قند توسط *ساکارومایسس سرویزیه* را افزایش دهد اما منبع نیتروژن مناسب می‌تواند تشکیل محصولات جانبی را کمتر و بازده اتانول را افزایش دهد. وقتی که اوره به عنوان منبع نیتروژن است، جریان متابولیسم کربن با زمانی که منبع نیتروژن آمونیوم می‌باشد متفاوت است یعنی میزان بازده اتانول با اوره بیشتر می‌شود. چرا که از یک طرف متابولیسم اوره NADH تولید می‌کند و در نتیجه گلیسرول کمتری شکل می‌گیرد و از طرف دیگر در طول تخمیر الکلی اوره می‌تواند به عنوان فیلتر مولکولی با اتصال به پروتئین‌ها عمل کرده و از تخریب پروتئین‌ها به هنگام تولید الکل جلوگیری کند (۱۶). استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی و همچنین روش شناسایی مولکولی راهی رایج برای شناسایی میکروارگانیسم‌هایی است که ارزش صنعتی دارند. بدویی دلفارد و همکاران از آزمایشات بیوشیمیایی و روش شناسایی مولکولی برای شناسایی باسیلوس مولد آنزیم آسپارازیناز استفاده کرده است (۵). در نتیجه استفاده از روش‌های شناسایی مختلف برای دست‌یابی به سویه صنعتی مناسب جهت تولید هر چه بیشتر سوخت‌های پاک و زیستی برای حفظ محیط زیست نیازی مبرم و ضروری می‌باشد.

همچنین برای مقایسه سویه‌های مختلف در تحمل به اتانول، مطالعه‌ای توسط هیراساوا و همکاران صورت گرفته است که براساس آن، کشت دو سویه حاصل از کارخانه شراب‌سازی و آزمایشگاهی در غلظت‌های ۸-۵ درصد از اتانول انجام گردید. با توجه به نتایج مشخص شد که با افزودن ۷-۵ درصد از اتانول به محیط کشت، میزان رشد مخمر حاصل از کارخانه بیشتر از سویه آزمایشگاهی می‌باشد و این تفاوت در غلظت ۵ درصد بارزتر است که نشان‌دهنده‌ی تحمل بیشتر این سویه به اتانول می‌باشد، ولی رشد هر دو سویه در غلظت ۸ درصد به شدت کاهش می‌یابد (۱۳). از طرفی، در مطالعه‌ی براون و همکاران، ممانعت از رشد مخمر با افزایش غلظت اتانول از ۸-۴ درصد مشاهده شد که رشد مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* با سویه‌ی مشخص در حضور ۱۲ درصد از اتانول به طور کامل متوقف گردید (۸ و ۱۱). با توجه به این گزارشات سویه جداسازی شده در این پژوهش، به دلیل تحمل میزان بیشتری از اتانول یعنی ۱۲ درصد می تواند کارایی بهتر و موثرتری در صنعت داشته باشد.

سویه صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* سهند ۱۰۱ جداسازی شده در این تحقیق ۸ درصد اتانول تولید کرد و به ۱۲ درصد اتانول تحمل داشت. این سویه صنعتی مخمر با ویژگی‌های مناسب از لحاظ تولید و تحمل به اتانول می‌تواند برای مطالعات بعدی و افزایش تولید با روش‌های بهینه‌سازی سازی در سطح ارلن و بیوراکتور بکار رود.

سپاسگزاری

از حمایت های مادی و معنوی معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه مراغه و همچنین مدیریت‌های محترم کارخانجات الکل‌سازی سهند مراغه، بیدستان قزوین و گلریز میاندوآب تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. سیمین م، توفیقی آ، آرش اسدی راد م، ۱۳۹۶، تولید بیواتانول توسط ساکارومایسس سرویزیه بومی تثبیت شده در حامل ترکیبی آلژینات-کیتوزان در شرایط تنش فورفورال، دنیای میکروب ها، ۲، ۱۱۴-۱۲۲.

۲. زاهد ا، صالحی جوزانی غ، خداییان ف، ۱۳۹۴، بهینه سازی منبع ازت و میزان اکسیژن محلول برای تولید همزمان اتانول و زایلیتول در کشت همزمان دو مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* و *کاندیدا تروپیکالیس*، پژوهشهای سلولی و مولکولی، ۲۸، ۲۴۹- ۲۳۸.

۳. امینی ل، صعودی م، نصر ش، ۱۳۹۴، جداسازی مخمرها از شالیزارهای برنج و بررسی کیفی آنزیمهای کاتابولیک برون ریز در دو مخمر از جنس پسودوزیما، پژوهشهای زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، ۲۸، ۳۴-۲۳.

4. Antoni D, Zverlov VVSchwarz WH. 2007. Biofuels from microbes. Appl Microbiol Biotechnol. 77(1): 23-35.
5. Badoei-Dalfard A, Karami Z, Ramezani-pour N. 2016. Isolation, molecular identification and production investigation of Bacillus-producing L-Asparaginase from Jiroft microflora. J Microbial world. 9(3):247-256.
6. Benjaphokee S, Hasegawa D, Yokota D, Asvarak T, Auesukaree C, Sugiyama M, Kaneko Y, Boonchird C, Harashima S. 2012. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. New Biotechnol. 29(3): 86-379.
7. Blomberg A, Adler L. 1992. Physiology of Osmotolerance in Fungi. In: Rose AH. Advances in microbial physiology. Academic Press. 33: 145-212.
8. Brown S W, Oliver S G, Harrison D, Righelato R. 1981. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: differences in the magnitude and complexity of the effect. J Appl Microbiol Biotechnol. 11: 151-155.
9. Casey GP, Ingledew WM. 1986. Ethanol tolerance in yeasts. Crit Rev Microbiol. 13(3): 80-219.
10. Chandra R, Takeuchi H, Hasegawa T. 2012.Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. Renew Sust Energ Rev. 16(3): 76-1462.
11. D'Amore T, Panchal C, Russell I, Stewart G. 1990. A study of ethanol tolerance in yeast. Crit Rev Biotechnol. 9(4): 287-304.
12. Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G. 2006. Bio-ethanol–the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends Biotechnol. 24(12): 56-549.
13. Hirasawa T, Yoshikawa K, Nakakura Y, Nagahisa K, Furusawa C, Katakura Y, Shimizu H, Shioya S. 2007. Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. J Biotechnol. 131: 34–44.
14. Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. 2006. Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. Process Biochem. 41(3): 8-653.
15. Kurtzman CP, Fell JW. 1998. The yeast: a taxonomic study. 4th ed. Netherlands. Elsevier press.
16. Lopes DH, Sola-Penna M. 2001. Urea increases tolerance of yeast inorganic pyrophosphatase activity to ethanol: the other side of urea interaction with proteins. Arch. Biochem Biophys. 394(1): 6-61.
17. Mayzuhroh A, Arindhani S, Caroenchai C. 2016. Studies on bioethanol production of commercial baker's and alcohol yeast under aerated culture using sugarcane molasses as the media. Agric. Agric Sci Procedia. 9: 9-493.
18. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol. 96(6): 86-673.
19. Pokhrel CP, Yadav RK, Ohga S. 2008. Agricultural waste residues as potential sources of bioethanol. Sci World J. 6(6): 19-23.
20. Robert V. 2011. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman C, Fell JW. The yeasts, a taxonomic study. 5th ed. Elsevier: 87-110.
21. Rogers PL, Jeon YJ, Lee KJ, Lawford HG. 2007. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. Adv Biochem Engin Biotechnol. 108: 263-288.

22. Sansonetti S, Hobley TJ, Calabrò V, Villadsen J, Sin G. 2011. A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: A batch fermentation and kinetic study. Bioresour. Technol. 102(16): 20-7513.
23. Stanley D, Fraser S, Chambers PJ, Rogers P, Stanley GA. 2010. Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J Ind Microbiol Biotechnol. 37(2): 49-139.
24. Sudhakar MP, Merlyn R, Arunkumar K, Perumal K. 2016. Characterization, pretreatment and saccharification of spent seaweed biomass for bioethanol production using baker's yeast. Biomass Bioenerg. 90: 148-154.
25. Tofighi A, Azin M, Mazaheri Assadi M, Assadi-rad MHA, Nejadsattari T, Fallahian MR. 2010. Inhibitory effect of high concentrations of furfural on industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Int J Environ Res. 4(1): 137-142.

Isolation of industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* with high tolerance to ethanol from Iran's alcohol manufactures

Darvishi F. and Abolhasan Moghaddami N.

Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

Abstract

Reducing fossil fuels, increasing fuel prices and carbon dioxide emissions, and concern about climate change are encouraging factors for biofuels production. Microbial biofuels are liquid and gaseous fuels which produced by microorganisms. Bioethanol is a suitable alternative biofuel for petroleum based fuels. For the industrial and high-scale production of bioethanol, the first step is isolation of suitable yeast strain with high tolerance to ethanol and high-level ethanol production. Hence, the aim of this study was Isolation of industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* with high tolerance to ethanol from Iran's alcohol manufactures. Sampling from several Iran's alcohol manufactures was carried out for the isolation of *Saccharomyces cerevisiae* with the highest ethanol production and tolerance. Selected yeast strain was examined by morphological, biochemical tests such as sugars fermentation, absorption of nitrogen compounds and carbon compounds, and also molecular test. The selected yeast strain produced 8% ethanol and tolerated 12% ethanol. The morphological, biochemical and molecular tests confirmed that the yeast strain is *Saccharomyces cerevisiae*, and this strain was named *Saccharomyces cerevisiae* Sahand 101. The isolated industrial yeast strain with the suitable characteristics in terms of ethanol production and tolerance to ethanol can be used for further studies and increase ethanol production by optimization methods at the level of flask and bioreactor.

Key words: Isolation, Identification, Yeast, Industrial strain, Bioethanol.