علوم و فناوری زیستی مدرس
دورهٔ ۲، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۰

جداسازی و شناسایی مخمر بومی تولیدکننده اسیدسیتریک برای استفاده در صنایع

مریم السادات میرباقری[۱*]، ایرج نحوی[۲]، گیتی امتیازی[۳]، فرشاد درویشی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۲- استاد گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۳- استاد گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
٤- استادیار، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه مراغه

***اصفهان، صندوق پستی ۷۳٦۹٦-۸۱۷٤٦**
maryam_mirbagheri@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۸۹/۵/۸، پذیرش:۹۰/٤/۱۱)

چکیده- اسیدسیتریک یکی از محصولات صنعتی است که در صنایع غذایی، داروسازی، آرایشی و شیمیایی کاربرد فراوان دارد. اگرچه تا سال ۱۹٦۵ در «آسپرژیلوس‌نایجر» تنها سویه تولیدکننده اسیدسیتریک بود؛ اما از آن زمان مشخص شد مخمرها نیز کاندید مناسبی برای تولید اسید سیتریک هستند؛ زیرا مخمرها روی انواع سوبستراهای ارزان‌قیمت و دردسترس از جمله هیدروکربن‌ها و ترکیبات نفتی رشد می‌کنند و حساسیت کمی به یون‌های فلزات موجود در مواد اولیه خام دارند. در این پژوهش مخمر تولیدکننده اسیدسیتریک جداسازی شد. بعد از نمونه‌گیری از صنایع غذایی مختلف مانند گوشت و لبنیات و. .. از کارخانجات اصفهان، جداسازی بیش از ۳٤۰ سویه مخمر روی محیط‌های اختصاصی انجام شد و پس از غربالگری اولیه در نهایت ۱۲ سویه انتخاب شد. در محیط تولید اسیدسیتریک میزان تولید با روش رنگ‌سنجی و با استفاده از کیت، طی ۱۹۲ ساعت بررسی شد. یکی از سویه‌های جداشده از گوشت مرغ با تولید ۵۵/۵ گرم در لیتر بعد از ۱٤٤ ساعت از زمان تلقیح بیشترین بازده تولید را داشت که از بهترین سویه‌های وحشی شناخته‌شده تا امروز برای تولید اسیدسیتریک است. با بررسی تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی این مخمر، یک سویه از مخمر "یاروویا لیپولیتیکا" شناسایی شد و در بانک ژنی با شماره HM011048 ثبت شد.

کلید واژگان: اسیدسیتریک، مخمر، یاروویا لیپولیتیکا، جداسازی.

۱- مقدمه

«اسیدسیتریک» یا ۲ - هیدروکسی۱ و ۲ و ۳ پروپان‌تری کربوکسیلیک‌اسید، یک محصول مهم تجارت جهانی است که به‌خاطر انحلال‌پذیری این اسید در آب، طعم ترش مطبوع، خاصیت سمی بسیار کم، جذب آسان، خواص بافری، تشکیل کلیت و شرکت در سنتزهای شیمیایی، به‌وسیله‌ی سازمان بهداشت جهانی و خوار و بار جهانی برای کاربرد در صنایع مختلف تایید شده است [۱]. تخمین زده می‌شود که ۷۵-۷۰ درصد اسید سیتریک تولیدی جهان در صنایع غذایی، ۱۲-۱۰ درصد در صنایع بهداشتی و دارویی و ۱۸-۱۵ درصد در صنایع دیگر به‌کار می‌رود [۲].

اسیدسیتریک پرمصرف‌ترین اسید آلی در صنایع غذایی است. در درجه اوّل به‌عنوان مطبوع‌کننده اغذیه و ترش‌کننده قوی غذاها استفاده می‌شود. معمولاً با افزودن مقدار بسیار کم، باعث افزایش طعم در مربا، آب‌میوه ها و موادغذایی با طعم میوه‌ای شده و در نوشابه‌ها، آب‌نبات و امثال آن با کاهش pH یا ایجاد کمپلکس نمکی بین سیترات و فلزات کمیاب، به‌عنوان نگه‌دارنده و آنتی‌اکسیدانت استفاده می‌شود؛ چراکه معمولاً فلزات کمیاب باعث اکسیداسیون روغن‌ها و چربی‌ها می‌شوند [۳].

اسیدسیتریک به‌عنوان ایجادکننده و تشدیدکننده طعم شربت‌ها و محلول‌ها کاربرد زیادی دارد. نمک‌های آن مانند تری‌سدیم‌سیترات برای همبند کردن کلسیم خون و لخته شدن آن، به‌عنوان یک ماده ضد انعقاد به‌کار می‌روند. از نمک آمونیوم‌فریک‌سیترات یا کمپلکس آهن و سیترات در کم‌خونی فقر آهن استفاده می‌شود [٤] و [٥].

در سال‌های اخیر با توجه به افزایش روزافزون قیمت ملاس و مواد خام اولیه، تولید و افزایش تقاضای جهانی، قیمت این فراورده رو به افزایش است و دانشمندان در فکر استفاده از منابع کربنی و میکروارگانیسم‌های جدید برای تولید اسیدسیتریک هستند [٦].

تا حدود سال ۱۹٦٥، *آسپرژیلوس نایجرر* تنها ارگانیسم انحصاری برای تولید اسیدسیتریک بود. از این سال به بعد با شناخت مخمرهای تولیدکننده این اسید، تحقیقات روی استفاده از مخمرها برای تولید اسیدسیتریک نیز افزایش چشم‌گیری داشت [۱].

مزیت مخمرها نسبت به قارچ‌ها، رشد روی انواع سوبستراهای ارزان‌قیمت و در دسترس از جمله هیدروکربن‌های متفاوت آلکان‌ها [۷]، پارافین [۸] و الکل‌ها [۹]، اسیدهای چرب، روغن‌ها و پساب‌های روغنی [۷] و [۱۰]، استات، مواد نفتی و هیدروکربن‌های دیگر است [۱۱].

از دیگر مزایای مخمرها این است که می‌توانند مقادیر بالای قند را در محیط کشت تحمل کنند و در نتیجه تغییرات ترکیب محیط کشت در مورد آن‌ها راحت‌تر انجام شود. علاوه بر آن، حساسیت کم آن‌ها به یون‌های فلزات موجود در مواد اولیه خام و یا آن‌ها که جداگانه به محیط اضافه می‌شوند، باعث شده که تیمار اولیه مخمرها برای تولید، خیلی پرهزینه نباشد؛ درحالی‌که در مورد ملاس باید تیمار اولیه انجام شود و این یون‌ها کاهش یابد. استفاده از آسپرژیلوس نایجرر برای تولید اسیدسیتریک با مشکلات محیطی مانند تجمع مواد همراه است و ضمناً پساب‌هایی با میزان بالای فلزات سنگین ایجاد می‌کند [۱۲] و [۱۳].

در کارهای تحقیقاتی برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها از طبیعت ابتدا باید منبع مناسبی برای استخراج میکروارگانیسم با خواص مورد نظر انتخاب شود. جداسازی مخمرها برای استفاده در موارد مختلف

سال‌هاست مطالعه شده و تا به حال بیش از ۱۵۰۰ سویه شناسایی شده است.

امروزه با توجه به افزایش روزافزون تقاضای سیتریک‌اسید، مطالعه روی انواع مخمرهای تولید کننده سیتریک‌اسید مخصوصاً سویه Yarrowia lipolytica به‌عنوان کمک‌کننده یا جایگزین مناسب برای تولید اسیدسیتریک، در حال افزایش است.

اسیدسیتریک طی سیکل کربس در هر موجود زنده‌ای تولید می‌شود؛ در نتیجه نمی‌توان برای جداسازی سویه‌های تولید کننده آن منبع مشخص و معینی را تعیین کرد و جداسازی مخمرهای خاصی که در تحقیقات مختلف به‌عنوان بهترین سویه‌های تولیدکننده‌ی اسیدسیتریک شناخته شده‌اند می‌توانند از راه‌های متفاوت باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی

الف) لبنیات: نمونه‌گیری از لبنیات با استفاده از ظروف استریل از بخش‌های مختلف شرکت کارخانجات شیر و فراورده‌های لبنی پگاه اصفهان واقع در کیلومتر ۵ جاده اصفهان-تهران انجام شد. از قسمت‌های مختلف پساب کارخانه و حتی سطوح مختلف دستگاه‌ها و سطح زمین نیز نمونه‌گیری شد [۱٤]. لازم به ذکر است از انواع مواد لبنی دیگر سطح شهر اصفهان و همچنین لبنیات سنتی همچون کفیر، ماست و پنیر و سرشیرهای سنتی نیز نمونه‌گیری شد.

ب)گوشت و فراورده‌های پروتئینی: نمونه‌گیری از گوشت و فراورده‌های پروتئینی شرکت راک اصفهان واقع در شهرک صنعتی جی در ظروف استریل انجام شد [۱۵] و [۱٦].

پس از نمونه‌گیری از واحدهای ذکر شده، نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شد. در مواردی که به نظر، آلودگی مخمری بالا بود از نمونه‌ها در لوله‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه استریل، سری رقت تهیه و با روش اسپیریدپلیت دو تا از رقت‌ها روی محیط ییست گلوکز کلرامفنیکل آگار (YGCA) برده شد [۱۷].

انکوباسیون به مدت ۲٤ الی ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد و سپس کلنی‌ها از نظر وجود مخمر بررسی شد. این بررسی شامل بررسی مرفولوژی کلنی، تهیه لام، رنگ‌آمیزی و مشاهده زیر میکروسکوپ بود. برای خالص‌سازی، نگه‌داری مخمرها و همچنین تهیه اسلنت محیط حاوی گلوکز، پپتون و عصاره مخمر(YPD) استفاده شد. کشت به‌صورت استریک پلیت روی محیط ذکر شده انجام و پس از آن کلنی‌های مجزا به اسلنت انتقال داده شد [۱۸].

۲-۲- غربالگری اولیه

برای غربالگری اولیه از محیط سنتتیک استفاده شد. این محیط حاوی بروموکروزول سبز یا ارغوانی به‌عنوان معرف بود. مخمرهایی که می‌توانستند اسید تولید کنند در این محیط هاله‌های زرد رنگی ایجاد می‌کردند [۱۹]. با تعیین نسبت قطر هاله به قطر کلنی، غربالگری اولیه‌ای برای به‌دست آوردن سویه‌های مناسب تولیدکننده اسید انجام شد. ترکیبات این محیط، ۲۰ گرم گلوکز، یک گرم KH_2PO_4، ۰/۵ گرم NaCl، ۰/٤ گرم $Ca(NO_3)_2$، ۰/۷ گرم $MgSO_4$ ، ۰/۱ گرم K_2HPO_4، ۸ گرم عصاره مخمر و ۲۰ گرم آگار در لیتر بود.

۲-۳- تولید اسیدسیتریک

برای هر آزمایش ابتدا حجم بالایی از محیط تولید تهیه و سپس ۵۰ میلی‌لیتر از آن داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری توزیع شد. بعد از تلقیح میزان مشخص شده(حدود ۵۰۰ میکرولیتر) از سوسپانسیون ۲٤ساعته مخمرها به داخل ارلن حاوی محیط کشت، آن‌ها در حرارت ۲۹ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور دارای لرزاننده[1] با دور rpm ۲۰۰ انکوبه شدند و تا ساعت ۱۹۲، هر ۲٤ ساعت یک‌بار میزان تولید اسیدسیتریک بررسی شد. با توجه به بهینه‌سازی‌های انجام‌شده در مورد تولید اسیدسیتریک به‌وسیله‌ی مخمرها مخصوصاً مخمر یاروویا، این شرایط بهترین شرایط رشد برای تولید اسیدسیتریک ذکرشده است که بررسی‌های این پژوهش نیز این نکته را ثابت کرد [۱۰]. محیط تولید حاوی g/l ۱۰۰ گلوکز، ۱/۵ g/l $MgSO_4$، ۲/۵ g/lNa_2HPO_4، ۷T g/lKH_2PO_4، ۰/۰۲ g/l ZnSO4، ۰/۲g/l $FeCl_3$، ۰/۲ g/l $CaCl_2$، ۰/۰٦ g/l $MnSO_4$، ۰/۵ g/l $(NH_4)\ 2SO_4$ و ۰/۵ g/l عصاره مخمر بود. در ساخت این محیط باید توجه شود که به‌خاطر داشتن گلوکز بالا(۱۰ درصد) قند به صورت فیلتر شده و استریل، بعد از اتوکلاو کردن محیط، اضافه گردد. با توجه به استفاده از گلوکز در این بررسی به عنوان منبع کربن و ٦ کربنه بودن این قند می‌توان نتایج را تا حدودی به استفاده از هیدروکربن‌های مختلف که تعداد کربن‌های زیادتری در ساختار خود دارند تعمیم داد. یکی از دلایل استفاده از غلظت بالای گلوکز برای تولید اسیدسیتریک به‌وسیله‌ی مخمرها، اهمیت نسبت کربن به نیتروژن در فاز تولید است که بالابودن این نسبت باعث افزایش در تولید می‌شود. طبق بررسی‌های انجام‌شده و با توجه به تحقیقاتی که در این زمینه انجام شده، غلظت گلوکز ۱۰ درصد درنظر گرفته شد. در ضمن دور بالای لرزاننده مانع اثر غلظت بالای گلوکز بر انتقال اکسیژن می‌شد [۱۰]، [۱۲] و [۲۷].

۲-٤- بررسی میزان تولید

الف) روش رنگ‌سنجی: با رعایت نکات ایمنی در زیر هود شیمیایی و با استفاده از ماسک شیمیایی داخل لوله‌های در پیچ‌دار، ۱میلی‌لیتر از نمونه و۱ میلی لیترتری کلرو استیک اسید (به شدت سوزاننده دست است)و ml ۱/۷ پیریدین (یک ترکیب شیمیایی بسیارخطرناک و فرار است) و ml ۵/۸ انیدرید استیک اسید (سوزش‌آور برای چشم) به‌ترتیب اضافه شد. و بعد از ورتکس کردن درب لوله‌ها را محکم بسته و ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۵۰ درجه سانتی‌گراد که از قبل تنظیم شده بود، انکوبه شد. بعد از اتمام این مرحله، نمونه‌ها ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد(دمای محیط) نگه‌داری شده و سپس با اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۲۸ nm جذب خوانده شد [۲۰]، [۲۱].

ب استفاده از کیت: برای بررسی و تأیید نهایی آزمایش‌های رنگ‌سنجی و بررسی میزان اسیدسیتریک تولیدشده به روش آنزیمی، ازکیت شناسایی اختصاصی اسیدسیتریک تولید شرکت مگازیم ایرلند استفاده شد.

۲-۵- شناسایی با استفاده از روش مولکولی (PCR)

هر چند شناسایی بیوشیمیایی مخمرها، سال‌ها به تنهایی برای تعیین نوع جنس و گونه آن‌ها کافی بود ولی، امروزه روش‌های شناسایی مولکولی نیز برای تأیید تست‌های بیوشیمیایی متداول است و شناسایی از این طریق سرعت و دقت کار را بالا می‌برد [۲۲].

برای تشخیص مولکولی، DNA ژنومی از سویه جداسازی‌شده M7 و سویه استاندارد DSM3286

1. shaker

(به‌عنوان یک شاهد و کنترل مثبت) با روش اصلاح شده Senses-Ergulو همکاران (۲۰۰٦) استخراج شد [۲۳].

برای تکثیر DNA با PCR، یک جفت پرایمر استفاده شد که مربوط به قسمتی از منطقه حفاظت‌شده ۱۸S rDNA در مخمرها است [۱٦].

جدول ۱ پرایمرهای تشخیص توالی **۱۸S rDNA** برای سویه‌های مخمری

نام پرایمر	توالی پرایمر
ITS1	5`TCCGTAGGTGAACCTGCGG3`
ITS4	5`TCCTCCGCTTATTGATATGC3`

برای انجام واکنش، محلول واکنش با ترکیب زیر تهیه شد:

نمونه کنترل منفی، شامل مخلوط PCR بدون افزودن DNA هدف هم تهیه شد.

سیکل‌های دمایی دستگاه به این صورت تنظیم شد: آغاز ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سیکل ۳۰ گانه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و پایان: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

۳- یافته‌ها

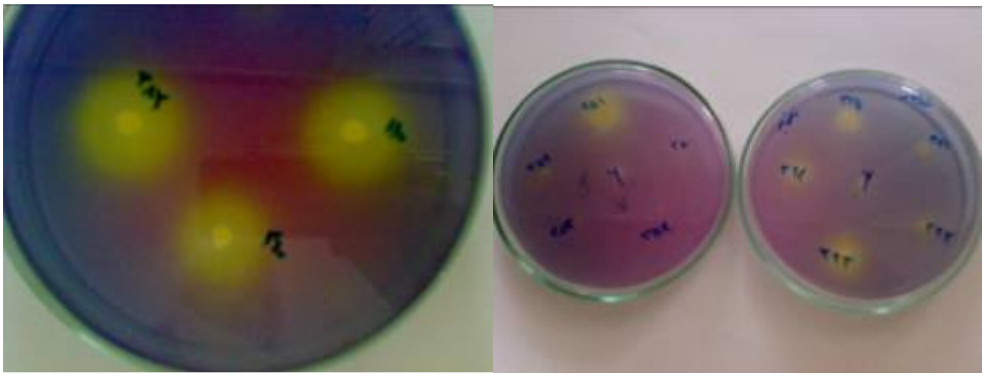
در این پژوهش از انواع لبنیات سالم و تاریخ مصرف گذشته، حدود ۹۲ سویه، از مواد پروتئینی حدود ۱۱۵ سویه، از انواع گوشت حدود ۸۷ سویه و از منابع دیگر بیش از ۵۰ سویه و در مجموع بیش از ۳٤۰ سویه [سویه‌های مخمری روی محیط‌های ذکرشده] جداسازی شد. ازآن‌ها لام گرفته و بررسی مرفولوژیک با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد.

در محیط غربالگری، گلوکز بالای محیط و منبع نیتروژنی پایین، شرایط مناسبی برای رشد مخمرهای تولیدکننده اسیدسیتریک فراهم می‌کند. در این محیط به‌خاطر وجود برموکروزول به عنوان معرف، سویه‌های تولید کننده‌اسید، هاله‌های زردرنگی ایجاد می‌کردند، سویه‌های مخمری که نسبت قطر هاله آن‌ها به کلنی بیشتر از ۳/۵ سانتی‌متر بود به‌عنوان مخمرهای مناسب انتخاب شدند (شکل۱).

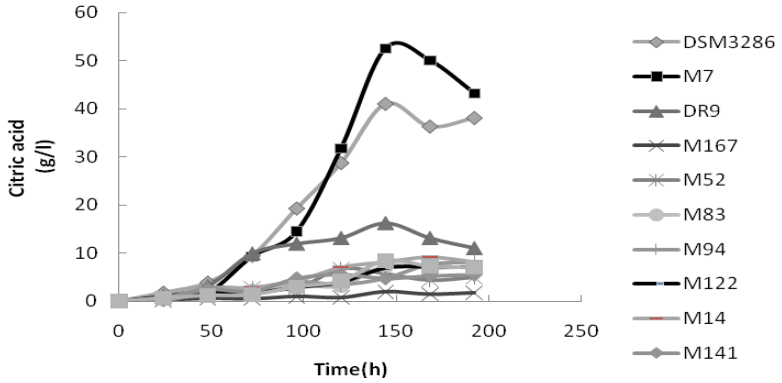
بررسی اسیدسیتریک در محیط تولید با روش کالریمتریک و کیت اختصاصی طی ۱۹۲ ساعت انجام و بهترین زمان تولید بعد از تکرارهای مختلف، ساعت ۱٤٤ اعلام شد.

سویه استاندارد تولیدکننده اسیدسیتریک ۳۲۸٦، *Yarrowia lipolytica* DSM، که میزان بالایی حدود ٤۵/۲ گرم برلیتر اسیدسیتریک تولید می‌کرد به‌عنوان شاهد در همه‌ی مراحل کار برای مقایسه استفاده شد. مقایسه تولید اسیدسیتریک مخمرهای جداسازی شده که بهترین تولید را داشتند با سویه‌های استاندارد درشکل۲ آمده است.

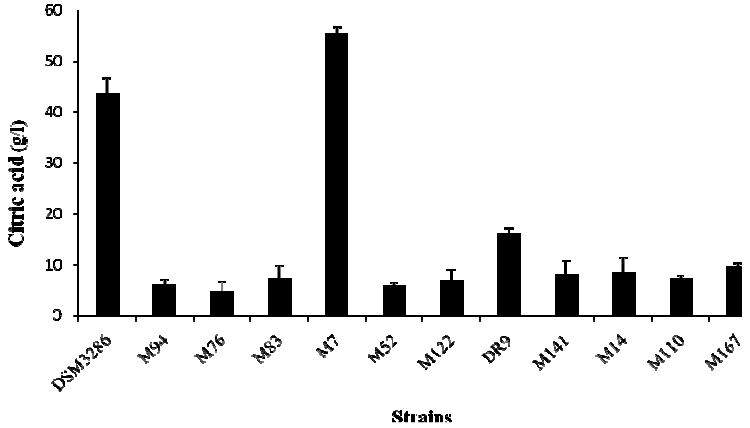
بین مخمرهای جداسازی شده در این پژوهش، سویه‌ای به‌دست آمد که با تولید ۵۵/۵ گرم بر لیتر اسید در ساعت ۱٤٤، حتی از سویه ۳۲۸٦، اسید بیشتری تولید می‌کرد (شکل۳).



شکل ۱ هاله‌های زردرنگ ایجادشده اطراف مخمرهای تولیدکننده اسید در محیط غربالگری اولیه حاوی برموکروزول ارغوانی.



شکل ۲ تولید اسیدسیتریک در مخمرهای غربال‌شده درطی زمان (ساعت) با روش آنزیمی، همان‌طور که در شکل دیده می‌شود بیشینه‌ی تولید در بیشترسویه‌ها بعد از ۱٤٤ ساعت است.



شکل ۳ مقایسه تولید اسیدسیتریک (g/l) در ساعت ۱٤٤ (اوج تولید) اندازه‌گیری شده. نمودار نشان‌دهنده میانگین بیش از ۳ تکرار مختلف است و معنادار بودن اختلاف تولید اسیدسیتریک بین سویه‌ها در سطح ۵ درصد با حروف کوچک مشخص شده است.

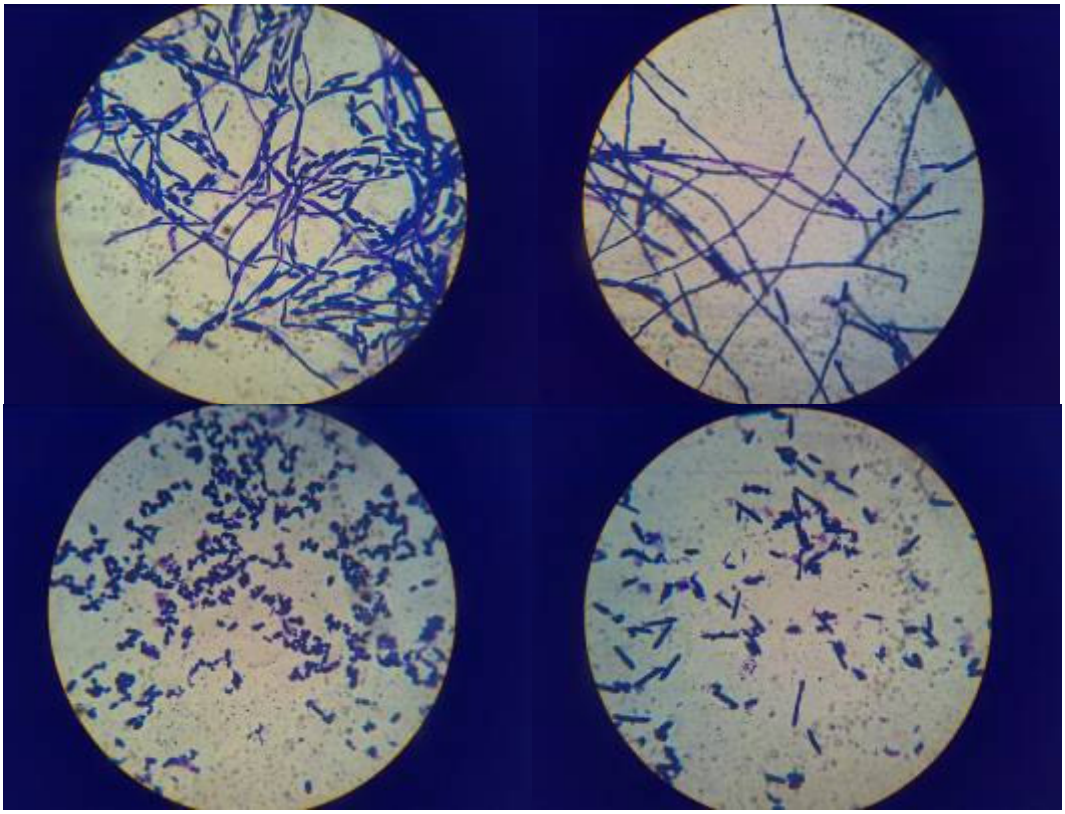
۳-۱- تغییرات مورفولوژی سویه استاندارد و M7در محیط تولید

مخمرهای مورد مطالعه در محیط تولید اسیدسیتریک، رشته‌ای تر و دارای سطحی گسترده‌تر می‌شوند. در این حالت اگر مخمرها را بدون رنگ‌آمیزی زیر میکروسکوپ نگاه کنیم، واکوئل‌های حجیم و بزرگی دارند.

۳-۲- شناسایی مخمرها

نتایج تست تخمیر هیدرات‌های کربن در سویه مخمر مورد بررسی(M7) نشان داد که این مخمر در محیط‌های حاوی قندهای گلوکز، گالاکتوز، سوکرز، مالتوز، لاکتوز، رافینوز و تره‌هالوز که تست‌های شناسایی اصلی تخمیر مخمرهاست گاز تولید نکرده و همه تست‌ها منفی گزارش شدند که این خصوصیت از ویژگی‌های بارز مخمر یاروویاست [۲٤].

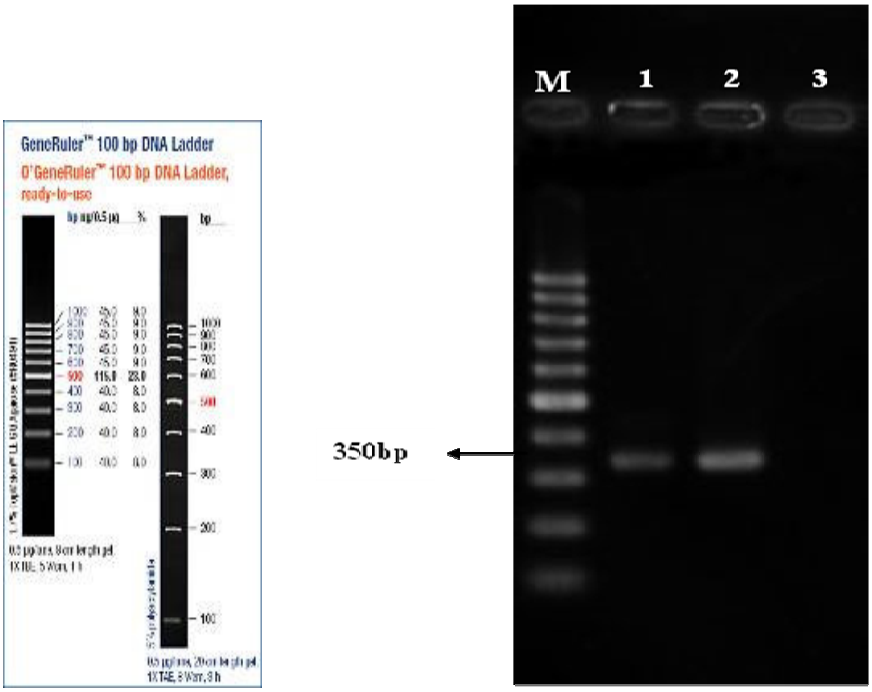
براساس نتایج به‌دست آمده و مطابقت نتایج با کلید تست‌های مخمری و همچنین ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی، سویه M7 شباهت بسیار زیادی به سویه‌های *یاروویا لیپولیتیکا* داشته و به‌عنوان شبه *یاروویا لیپولیتیکا* شناخته شد. بررسی‌های انجام شده نشان داد سیترات‌مثبت بودن مخمر، تأثیر معناداری بر تولید اسیدسیتریک ندارد؛ چون در فاز تولید، رشد مخمرها بسیار ناچیز است بنابراین از سیترات برای رشد استفاده نمی‌کنند.



شکل ٤ بررسی شکل میکروسکوپی مخمرها با رنگ‌آمیزی ساده در محیط تولید اسیدسیتریک(سمت راست)، نسبت به محیط جامد YPD (سمت چپ). بالا: سویه استاندارد DSM3286 و پایین:سویه جداسازی شده M7

جدول ۲ نتایج تست‌های جذب قندها و دیگر منابع کربنی در سویه مورد بررسی **M7**

سویه	سوکرز	گلوکز	سلوبیوز	آرابینوز	مانیتول	ریبوز	زایلوز	اینولین	رافینوز	ترهالوز	مالتوز	گالاکتوز	لاکتوز	د- گلوکز آمین	ریبیتول	گالاکتیکول	رامنوز	نشاسته	ملوبیوز	گلیسرول	اریتریتول	اتانول	آسیل- D-گلوکز آمین	ژلاتین	سیترات
M7	−	+	−+	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	+	+	+	+



شکل ۵ تکثیر ژن ۱۸S rDNA سویه‌های مخمری با روش PCR و تشکیل محصول ۳۵۰ bp. (M: مارکر ۱۰۰ bp، شماره ۱: سویه M7، شماره ۲: سویه استاندارد DSM3286 و شماره ۳: کنترل منفی) نمونه‌ای از مارکر ۱۰۰ bp در سمت چپ نشان داده شده است.

توالی ژن ۱۸S rDNA با استفاده از پرایمرهای عمومی ITS1 و ITS4 تعیین شد و توالی با ۳۳۵ باز به‌دست آمد. پس از بررسی BLAS توالی ۱۸S rDNA با توالی‌های موجود در Genebank در سایت NCBI، بالاترین همولوژی به میزان ۹۹ درصد با *یاروویا لیپولیتیکا* با Accession number HM011048r به‌دست آمد.

٤- بحث

محققان بسیاری تولید اسید سیتریک ازسویه‌هایی از *یاروویا* گزارش کرده‌اند [۷]، [۱۲]. هرچند مطالعاتی روی تولید این اسید به‌وسیله‌ی مخمرهای دیگر مخصوصاً انواع کاندیدا انجام شده است اما *یاروویا لیپولیتیکا* همراه *کاندیدا ائوفیلا* به‌عنوان با ارزش‌ترین سویه‌های مخمری تولیدکننده اسیدسیتریک معرفی شده‌اند [۲۵].

محصولات لبنی و گوشتی، محیط مناسبی برای رشد و جداسازی مخمرهاست، چون مخمرها به‌خاطر سازش با یک سوبسترای غنی شامل پروتئین‌ها، لیپیدها، قندها و اسیدهای آلی، می‌توانند در آن به‌خوبی رشد کنند. مخمرها در صنایع لبنی قادر به تولید فاکتورهای رشد مانند ویتامین B، پنتاتوئیک‌اسید، نیاسین، حتی ریبوفلاوین و بیوتین هستند.

گسترش وسیع مخمرها در صنایع لبنی به‌علت فعالیت‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک، توانایی تخمیر بالا، جذب لاکتوز و استفاده از اسیدهای‌سیتریک، لاکتیک و سوکسینیک است، علاوه بر این مخمرها قادر به رشد در سوبستراهای با غلظت بالای نمک، دمای پایین، pH پایین و فعالیت آب پایین هستند.

در سال ۲۰۰۶ تعدادی از محققین، حدود ۲۲ سویه مخمر را از انواع مواد غذایی از جمله پنیر، جداسازی و با روش‌های مولکولی شناسایی کردند که یکی از سویه‌های شاخص جداسازی شده *یاروویا لیپولیتیکا* معرفی شد و از محیط‌های کشت رزبنگال کلرامفنیکل آگار و تریپتون گلوکز ییست اکسترکت آگار برای جداسازی این سویه‌ها بهره بردند. مخمرها در انواع پنیر و کفیر و کومیس می‌توانند بیوسنتز ترکیبات آروماتیک را تحت تأثیر قرار دهند [۲۳].

در یک بررسی مشخص شد که تعداد و نوع مخمرهای جداسازی‌شده موجود کارخانه لبنیات درطی فرایند پنیرسازی در فصل زمستان، حدود ۹۳ سویه در ۱۰ جنس و در تابستان ۷۶ سویه در ۷ جنس متفاوت مشاهده شده است؛ دلیل این تفاوت احتمالاً نوع مواد اولیه و دستگاه-های به‌کار رفته ذکر شد اما نکته قابل توجه این است که بیشترین تعداد مخمرهای جداسازی شده طی مراحل پایانی پنیرسازی مربوط به *یاروویا لیپولیتیکا* گزارش شد.

در این مطالعه محیط YGCA برای جداسازی مخمرهای شیر و آب پپتونه برای غنی‌سازی استفاده شد [۱۷].

در بررسی دیگر، حدود ۳۹ درصد مخمرهای جداسازی شده ازگوشت مرغ و ماکیان دیگر را *یاروویا لیپولیتیکا* به خود اختصاص داد [۱۶]. جداسازی DNA مخمر یاروویا از بسته‌های همبرگر و جداسازی و شناسایی انواع مخمرهای مواد غذایی از جمله *یاروویا لیپولیتیکا* ازگوشت و موادپروتئینی با روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی گزارش شده است [۱۵].

این مطالعات و تحقیقات دیگر نشان داد لبنیات از جمله شیرخام، لبنیات غیراستریل و یا از استریل خارج‌شده، مواردی است که برای جداسازی مخمرها از جمله *یاروویا لیپولیتیکا* در تحقیقات استفاده شده است و در این پژوهش نیز در فصل زمستان نمونه‌گیری از کارخانه لبنیات پگاه اصفهان انجام شد. با توجه به گزارش‌های فراوان مبنی بر جداسازی سویه‌های مختلف یاروویا لیپولیتیکا از گوشت و فراورده‌های پروتئینی، به همین علت نمونه‌گیری از آن‌ها نیز انجام شد و مشاهده شد نمونه‌های گوشت مخصوصاً گوشت مرغ انواع بسیار زیادی مخمر دارندکه این با یافته‌های ***Deak*** و همکاران مطابقت داشت[۱۶].

با این که هدف این مطالعه، بررسی فلور مخمری مواد غذایی نبود اما مطالعات نشان داد فلور مخمری در کارخانه لبنیات و گوشت اصفهان بسیار بالاست که البته این مخمرها بیشتر مربوط به فرایندهای قبل از پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون بودند. در ضمن می‌توان یکی از بهترین منابع جداسازی مخمرها را گوشت سفید مخصوصاً گوشت مرغ پیشنهاد داد، اما هنوز علت فلور مخمری بالای گوشت مرغ مشخص نشده است.

در واقع یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای اندازه‌گیری مقادیر بالای اسیدسیتریک در نمونه‌ها، روش اسپکتروفوتومتری (کالریمتریک) است و در تحقیقات از این روش برای تعیین اسیدسیتریک ادرار، بافت‌ها، مایعات، و نوشیدنی‌ها، و مواد غذایی مخصوصاً شیر استفاده شده است [۲۶].

در این بررسی بعد از مقایسه روش رنگ‌سنجی استفاده‌شده با روش آنزیمی، مشخص شد روش کالریمتریک هر چند برای تعیین نسبی تولید اسیدسیتریک دقیق است اما میزان دقیق اسیدسیتریک را ارائه نمی‌دهد. بعد از بررسی اثر انیدریداستیک‌اسید و پیریدین‌برایز و سیتریک‌اسید خالص مشخص شد که این دو ماده می‌توانند با ایزوسیتریک‌اسید نیز به میزان کم واکنش داده و رنگ زرد ایجاد کنند و در نمونه‌هایی مثل نمونه‌های این تحقیق، احتمالاً ایزوسیتریک‌اسید مانع به‌دست آوردن یک نتیجه دقیق می‌شود.

با توجه به دی‌مورف بودن سویه‌های یاروویا در محیط‌ها و شرایط مختلف و با توجه به بررسی‌های انجام‌شده در این پژوهش مشخص شد حتی شرایط محیط کشت از نظر مایع و جامد بودن و قرار داشتن مخمرها در فاز رشد یا تولید، هر دو بر شکل مخمر اثر می‌گذارد. در فاز تولید، مخمرها معمولاً دارای سطوح گسترده‌تری می‌شوند که در اثر ایجاد شدن واکوئل‌های بزرگ حاوی مواد تولیدی است که باعث کشیده‌تر شدن شکل مخمر می‌شود. نظرات دیگر محققان که روی این موضوع تأکید کرده بودند نیز نتایج این بررسی را تأیید می‌کرد [۲۸].

نتایج این پژوهش از تولید g/l ۵۵/۵ اسیدسیتریک در ۱۰۰ گرم گلوکز حاصل از جداسازی یاروویالیپولیتیکا ناگت مرغ حکایت داشت که این میزان تولید قطعاً در شرایط کشت repeted-batch و کموستات در فرمانتور بسیار قابل ارتقاء است؛ به‌طوری که تولید اسیدسیتریک به‌وسیله‌ی سویه‌های دیگر یاروویا لیپولیتیکا در این شرایط و در غلظت‌های بالای گلوکز، g/l ۲۴۰-۲۰۰ نیز گزارش شده است [۷]، [۱۲].بررسی قابلیت تولید SCP به‌وسیله‌ی این سویه و همچنین استفاده از آن به‌عنوان کواستارتر در پنیرسازی از مواردی است که با توجه به قابلیت بالای تولید اسیدسیتریک در آن می‌تواند به خوبی مد نظر قرار گیرد. در ادامه این بررسی، بهینه‌سازی اسیدسیتریک تولیدی با استفاده از روش‌های مختلف در حال بررسی است که نتایج این‌جا ذکر نشده است.

۵- مراجع

[1] Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S. (2003) Overview of applied solid-state fermentation in Brazil, *Biochem Eng J.* 13, 205–218.

[2] Soccol, C.R. (2006) New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol Biotechnol*. 44, 141-149.

[3] Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., Nigam, P. (2001) Production of Organic Acids by Solid-State Fermentation. In: Solid-State Fermentation in Biotechnology – Fundamentals and Applications, *Asiatechnol*. 2, 113–126.

[4] Vandenberghe, L.P.S., Soccol, C.R., Pandey, A and Lebeault, J.M. (1999)

Microbial production of citric acid. *Braz Archi Bio Technol*. 42, 263-276.

[5] Antonucci, S., Bravi, M., Bubbico, R., Di Michele, A and Verdone, N. (2001) Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme Microbial Technol*. 2, 189-195.

[6] Yigitoglu, M. (1992) Production of citric acid by Fungi, *J. Islamic Academy of Sci*, 5, 100-106.

[7] Fickers P., Nicaud, J.M, Gaillardin, C, Destain, J and Thonard, P. (2004) Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Appl Microbiol*. 96,742–749.

[8] Crolla, A and Kennedy, K.J. (2004) In-line mixing for production of citric acid by *Candida lipoltica* grown on n-paraffins. *J Chem Technol Biotechnol*. 79, 720-728.

[9] Arzumanov, T.E., Shishkanova, N.V and Finogenova, T.V. (2000) Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*. 53, 525-529.

[10] Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I and Aggelis, G. (2006) Influence of Glucose and Saturated Free-Fatty Acid Mixtures on Citric Acid and Lipid Production by *Yarrowia lipolytica. Curr Microbiol*. 52, 134–142.

[11] Alam, j., Parveen, J and Masrina M. N. (2008) Bioconversion of palm oil mill effluent for citric acid production: statistical optimization of fermentation media and time by central composite design. *World J. Microbiol Biotechnol*. 24, 1177–1185.

[12] Barth G, Gaillardin, C. (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev*. 19, 219–237.

[13] Pazouki, M and Kubicek, C. P. 2000. Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. *Bioprocess Eng*. 22, 353-361.

[14] Suzzi, G.,. Lanorte, M.T., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R and Guerzoni, M.E. (2001) Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-

ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol*. 69, 69–77.

[15] Sanz, A., Martın, R., Ma Belen, M., Pablo E., Hernandez, I., Gonzalez, T and Garcıa L. (2004) Development of a PCR-culture technique for rapid detection of yeast species in vacuum packed ham. *Meat Sci*. 71, 230–237.

[16] Deak, T., Chen, J and Beuchat, L.R. (2000) Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl. Env Microbiol*. 66, 4340–4344.

[17] Lopandic, K., Zelger, S., Banszky, L. K., Eliskases-Lechner, F and Prillinger, H. (2006) Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol*. 23, 341-350.

[18] Forster, A., Jacobs, K., Juretzek, T., Mauersberger, S and Barth, G. (2007) Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol and Biotechnol*. 75, 1409-1417.

[19] Finogenova, T.V., Morgunov, I.G., Kamzolova, S.V and Cherniavskaia, O.G. (2005) Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A review of prospects. *Appl. Biochem Microbiol*. 41, 418-425.

[20] Harvey, E., lndyk, k and Andreas Kurmann. (1987) Routine Spectrophotometric Determination of Citric Acid in Milk Powders. *Analyst*. 2, 112.

[21] Saffran, M and Denstedt, O.F. (1948) A rapid method for the determination of citric acid. *J. biological chem*. 849-852.

[22] Querol, A., Belloch, C., Ferna, T and Barrio, E. (2003) Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. *Int. Microbiol*. 6, 201–205.

[23] Senses-Ergul, S., Agoston, R.B and Agnes D.T. (2006) Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *Int. J. Food Microbiol*. 108, 120-124.

[24] Kurtzman, C.P and Fell, J.W. (2000) In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds.), The Yeasts: A Taxonomic Study. Elsevier, Amsterdam, 1035.

[25] Anastassiadis, S and Rehm, H.J. (2006) Oxygen and temperature effect on continuous citric acid secretion in *Candida oleophila. Elec. J. Biotechnol*. 9, 414-423.

[26] Roostita, R., Fleet, G.H. (1996) Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *Int. J. Food Microbiol*. 31, 205–219.

[27] Moeller, L., Strehlitz, B., Aurich, A., Zehnsdorf, A and Bley, T. (2007) Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*. *Eng. Life Sci*. 7, 504-511.

[28] Perez-Campo, F.M., Dominguez, A. (2001) Factors Affecting the Morphogenetic Switch in Yarrowia lipolytica. *Curr Microiol*. 43, 429-433.