مطالعه تولید زایلیتول توسط مخمر *رودوتورولا موسیلاژینوزا* جداشده از طبیعت

فروغ عسگری [۱]، غلامرضا قزلباش [۲]*، ایرج نحوی [۳]

۱ - کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۲ - استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز
۳- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۸)

چکیده

D- زایلیتول یک پلی‌اُل پنج کربنه با قدرت شیرین‌کنندگی بالا است و با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی و تکنولوژیکی که این پلی‌اُل دارد، در صنایع شیمیایی، غذایی و دارویی بسیار ارزشمند می‌باشد. با در نظر گرفتن اینکه تولید بیوتکنولوژیکی زایلیتول با استفاده از میکروارگانیسم‌ها بسیار اختصاصی است و نیاز به مصرف انرژی کمتری دارد، به طور وسیعی به عنوان یک روش جایگزین تولید شیمیایی مورد مطالعه قرار گرفته است. اطلاعات نشان می‌دهد در میان میکروارگانیسم‌ها، مخمرها بهترین تولیدکننده می‌باشند. در این بررسی این پلی الکل ارزشمند توسط سویه مخمری *رودوتورولا موسیلاژینوزا* که از برگ گیاه بنجامین جداسازی گردید، از زایلوز تولید شد. زایلیتول تولید شده توسط این مخمر با روش آنالیزی کروماتوگرافی لایه نازک و با استفاده از کیت و نیز روش رنگ‌سنجی مورد مطالعه کیفی وکمی قرار گرفت. این مخمر قادر به تولید ۶/۴۲ گرم بر لیتر زایلیتول از ۴۰ گرم بر لیتر زایلوز، بعد از ۴۸ ساعت بود. اثر افزایش غلظت زایلوز از ۸۰ تا ۱۶۰ گرم بر لیتر بر روی تولید زایلیتول توسط *رودوتورولا موسیلاژینوزا* نشان داد که بهترین غلظت زایلوز برای تولید زایلیتول توسط این سویه ۱۴۰ گرم بر لیتر است و بیشترین غلظت زایلیتول (۴۹/۲۸ گرم بر لیتر) و بازدهی (۰/۵۹ گرم بر گرم) در این غلظت قندی بدست آمد اما افزایش بیشتر غلظت زایلوز منجر به کاهش تولید و بازدهی زایلیتول شد.

کلید واژگان : زایلیتول ، زایلوز، *رودوتورولا موسیلاژینوزا*، تخمیر

* مسئول مکاتبات: gh.r.ghezelbash@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-07]

۱- مقدمه

الکل‌های قندی دسته‌ای از پلی‌اُل‌ها[1] هستند که دارای مزیت‌هایی از جمله مقدار کالری پایین، توان آنتی اکسیدانی، قدرت شیرین-کنندگی و کاهش قند خون می‌باشند و به همین دلیل در صنایع غذایی به عنوان مکمل و جایگزین قندی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱]. زایلیتول[2] از جمله پلی‌اُل‌هایی است که به طور وسیعی در حال حاضر استفاده می‌شود.

D- زایلیتول یک پلی‌الکل پنج کربنه می‌باشد که به طور طبیعی خاصیت شیرین‌کنندگی بالایی دارد [۲]. این پلی‌اُل یک شیرین کننده‌ی طبیعی غذاست که شیرینی مشابه ساکاروز دارد اما با مقدار انرژی کمتر (۲/۵ در مقایسه با ۴ (کالری بر گرم)) و با توجه به مقدار کالری کم، به عنوان جایگزین قند در صنایع غذایی در تولید نبات، شیرینی، شکلات، بستنی و نوشیدنی ها استفاده می‌شود [۳]. زایلیتول برخلاف ساکاروز اسید تولید نمی‌کند و به همین دلیل به عنوان یک عامل مؤثر برای جلوگیری از پوسیدگی دندان در آدامس، خمیر دندان و دهان‌شویه استفاده می‌شود [۴]. به دلیل اینکه متابولیسم زایلیتول غیر وابسته به انسولین است، در شرایط کمبود انسولین یک جایگزین قند مناسب برای افراد دیابتی می‌باشد [۵].

D- زایلیتول به طور صنعتی از طریق احیای شیمیایی D- زایلوز تولید می‌شود. از جمله معایب فرآیند شیمیایی تولید زایلیتول می‌توان نیاز به فشار و دمای بالا، استفاده از کاتالیست و نیز مراحل هوادهی و خالص‌سازی گران قیمت را نام برد [۶]. تولید بیوتکنولوژیکی D- زایلیتول با استفاده از میکروارگانیسم‌ها به دلیل اینکه نیاز به کاتالیست سمی ندارد، نسبتاً آسان است و از نظر زیست محیطی ایمن می‌باشد و با توجه به معایب روش شیمیایی، از اهمیت بسزایی برخوردار است [۷]. تبدیل میکروبی زایلوز به زایلیتول اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است که در میان انواع میکروارگانیسم‌ها مخمرها بهترین تولید کننده می‌باشند [۸]. مخمرها از مدت‌ها پیش قابل قبول‌ترین منابع میکروبی در صنایع مختلف و صنایع غذایی هستند و به علت عدم بیماریزایی اغلب آنها به‌عنوان یک منبع سالم[3] معرفی می‌شوند [۹].

مجموعه عوامل بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی در پراکندگی موفق مخمرها دخالت دارند و باعث می گردند که اجتماعات مخمری زیستگاه‌های متنوعی را تصرف کنند. از جمله زیستگاه‌های مخمرها می‌توان به گیاهان اشاره کرد. گیاهان به سبب داشتن توانایی فتوسنتز و ساختن بسیاری از ترکیبات کربنی متنوع، زیستگاه‌های مناسبی را برای مخمرهای مختلف مهیا می‌سازند. بخش‌های مختلف گیاهان از جمله پهنک برگ جایگاه زیست خاصی برای مخمرها به شمار می‌رود [۱۰]. سطح برگ گیاهان که توسط میکروب‌ها کلونیزه می‌شود را فیلوسفر[4] می‌نامند و از جمله میکروارگانیسم‌های این زیستگاه طبیعی مخمرها می-باشند [۱۱].

از جمله مخمرهایی که قادر به تبدیل زایلوز به زایلیتول هستند می‌توان *Pichia*، *Debaryomyces*، *Pachysolen*، *Candida*، *Rhodotorola* و *Saccharomyces* مهندسی شده را نام برد[۷]. اکثر مخمرهای تولید کننده زایلیتول از زایلوز به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. مسیر کاتابولیکی زایلوز به این صورت است که ابتدا D- زایلوز توسط آنزیم زایلوز ردوکتاز به زایلیتول احیا می‌شود و سپس زایلیتول توسط زایلیتول دهیدروژناز به D- زایلولوز اکسید می‌شود و سرانجام D- زایلولوز توسط آنزیم زایلوز کیناز به D- زایلولوز ۵ فسفات فسفریله شده و سپس وارد مسیر پنتوزفسفات می‌شود [۱]. *کاندیدا تروپیکالیس* و *کندیدا گولرموندی* مخمرهایی هستند که از آنها در تولید میکروبی زایلیتول گزارشات زیادی وجود دارد.

1. Polyols
2. Xylitol
3. Generally regarded as safe (GRAS)
4. Phyllosphere

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-07]

هدف از این پژوهش، جداسازی، شناسایی و بررسی تولید زایلیتول از مخمر جداسازی شده از طبیعت بود که به علت فراوانی مخمرها در گیاهان سطوح گیاهی به عنوان منبع جداسازی انتخاب شد.

۲- مواد و روش‌ها

جداسازی مخمرهای مولد زایلیتول

به منظور جداسازی مخمرهای مولد زایلیتول ابتدا نمونه-هایی مانند برگ درختان، گل‌ها و میوه‌ها به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در آب خیسانده شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول فوق به ارلن‌های حاوی محیط جداسازی YePX[1](عصاره مخمر ۱۰، پپتون ۲۰، زایلوز ۲۰ (گرم بر لیتر) با pH : ۵) انتقال داده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه شیک شدند [۱۲]. بعد از ۴۸ ساعت از محیط مایع بر روی محیط جداسازی جامد کشت داده و بعد از دو روز کلنی‌ها در زیر میکروسکوپ مشاهده و بررسی شدند. این مخمر در محیط‌های اسلنت YPD[2](گلوکز ۲۰، پپتون ۲۰، عصاره مخمر ۱۰ و آگار ۲۰ (گرم بر لیتر)) و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا تولید زایلیتول آن مورد بررسی قرار گیرد [۲].

مطالعه تولید زایلیتول توسط مخمرهای جدا شده

یک لوپ از مخمر فعال شده مورد نظر به یک ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط پیش تولید زایلیتول (زایلوز ۴۰، سولفات آمونیوم ۵، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۲، سولفات منیزیم ۰/۵، عصاره مخمر ۵ و پپتون ۱ (گرم بر لیتر) با pH: ۵/۵) انتقال داده شد و سپس ارلن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور با ۱۸۰ دور در دقیقه شیک گردید. بعد از ۴۸ ساعت از محیط فوق به نسبت ۵ درصد به ارلن‌های حاوی محیط تولید (مشابه محیط پیش تولید) انتقال داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با ۱۸۰ دور در دقیقه شیک گردید و تولید زایلیتول، هر ۲۴ ساعت به مدت ۵ روز بررسی شد[۷].

شناسایی زایلیتول

در ابتدا زایلیتول تولید شده توسط سویه مخمری *رودوتورولا موسیلاژینوزا* با روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)[3] به عنوان یک روش آنالیزی ساده و سریع به صورت کیفی مورد شناسایی قرار گرفت. در این روش ترکیبات بر اساس قطبیت و وزن مولکولی جداسازی می‌شوند. به این ترتیب که مقدار ۱ میکرولیتر از محیط تخمیری حاوی احتمالی زایلیتول تولید شده خارج سلولی بر روی کاغذهای سیلیکاژل TLC گذاشته و کاغذ به مدت ۲ ساعت در حلال شامل پروپانل- بوتانل- آب با نسبت ۷ : ۲ : ۱ قرار داده شد. سپس به منظور ظاهر شدن لکه‌های ایجاد شده، کاغذ با رنگ (هیدروکسید سدیم- پرمنگنات پتاسیم) اسپری شد و بعد از خشک شدن، تولید زایلیتول مورد بررسی قرار گرفت [۱۳].به علاوه زایلیتول تولید شده توسط مخمر مورد نظر با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت مگازایم ایرلند شناسایی شد و مورد تایید قرار گرفت.

به منظور تشخیص کیفی و کمی زایلیتول تولید شده توسط مخمر، در این بررسی از روش رنگ سنجی [4] استفاده گردید. این روش شامل اکسیداسیون ملایم زایلیتول با استفاده از سدیم متا پریودات تحت شرایط ملایم اسیدی (کلریدریک اسید) به مدت ۱۰ دقیقه و سپس مخلوط سازی با رامنوز و در نهایت استفاده از معرف ناش (آمونیوم استات ۱۵۰ گرم بر لیتر، استیک اسید ۲ و استیل استن ۲ (میلی‌لیتر بر لیتر)) می باشد. مخلوط فوق را به مدت ۱۵ دقیقه در

1. Yeast extract Pepton Xylose
2. Yeast Pepton Dextrose Agar
3. Thin layer chromatography
4. Colorimetric method

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-07]

بن ماری ۵۳ درجه سانتی‌گراد حرارت داده و بعد از سرد کردن آن، مقدار زایلیتول تولید شده در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه-گیری شد [۱۴]. زایلیتول خالص نیز برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد.

اندازه‌گیری قند باقی‌مانده

از زایلوز به عنوان منبع کربن استفاده و منحنی استاندارد قند باقی‌مانده رسم گردید. در اندازه‌گیری قند زایلوز از معرف دی نیتروسالیسیلات[1] استفاده شد. به براث تخمیری که طی سانتریفوژ سلول‌های آن جدا شده، معرف دی نیتروسالیسیلات (هیدروکسید سدیم ۱۶، معرف دی نیتروسالیسیلات ۱۰ و نمک تارتارات سدیم- پتاسیم ۲۵۰ (گرم بر لیتر)) اضافه کرده و بعد از حرارت دادن آن به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، در آب یخ سرد شده و جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر یادداشت شد [۱۵].

اندازه‌گیری توده زیستی

اندازه‌گیری توده زیستی همزمان با اندازه‌گیری ماکزیمم تولید زایلیتول صورت گرفت. به این ترتیب که محیط کشت تخمیری را در شرایط ۶۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و با آب مقطر ۲ بار شستشو داده شد. سپس در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا ثابت شدن وزن، خشک گردید [۲].

بهینه‌سازی غلظت منبع کربن

غلظت اولیه زایلوز در تولید زایلیتول توسط بهترین سویه مخمری بر اساس مقدار تولید و بازده جدا شده بهینه شد. بدین منظور از محیط‌های پیش‌تولید و تولید استفاده و تاثیر درصدهای مختلف قند زایلوز از ۸۰ تا ۱۶۰ گرم بر لیتر، بر تولید زایلیتول مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس بازده تولید، بهترین غلظت قندی به منظور تولید زایلیتول توسط این سویه انتخاب شد.

شناسایی مخمرها توسط تعیین توالی RNA ریبوزومی

مخمرهای مولد زایلیتول جدا شده از طبیعت توسط تعیین توالی قطعه‌یی از ژنوم ریبوزومی شناسایی شدند. پرایمرهای بکار رفته در این پژوهش از نوع فضا ساز نسخه‌برداری[2] بودند. برای استخراج DNA مخمرها، ابتدا مخمر مورد نظر در محیط عصاره مخمر- پپتون- گلوکز[3] مایع کشت داده شد و سلول‌ها جداسازی و با استفاده از آب مقطر شستشو داده شدند. سپس سلول‌ها با بافر لیز کننده[4]، دانه‌های شیشه‌یی (۶۰۰-۴۲۵ میکرون)، محلول فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) مخلوط شده و طی مخلوط سازی[5] شدید به مدت ۵-۳ دقیقه شکسته شدند. بافر لیزکننده حاوی تریتون X-100[6] ، سدیم دودسیل سولفات[7]، کلرید سدیم، تریس-اسید کلریدریک[8] و اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید[9] بود. سپس به محتویات فوق بافر TE[10] اضافه شد و به منظور انحلال DNA در بافر TE عمل مخلوط‌سازی به آرامی انجام شد. بعد از سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه[11] به مدت ۱۰ دقیقه، به محلول بالایی جدا شده به میزان دو برابر حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد و مخلوط فوق چند مرتبه به آرامی معکوس شد. حرکت سریع و یا ورتکس در این مرحله موجب قطعه قطعه شدن DNA می‌گردد. بعد از سانتریفوژ، محلول فوقانی دور ریخته شد و بعد از تبخیر شدن ایزوپروپانول در زیر هود به رسوب باقی مانده ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE اضافه شد و بعد از

5. Dinitrosalicylate (DNS)

2. Internal Transcribed Spacer (ITS)
2. Yeast Extract Peptone Glucose (YPD)
4. Lysing Buffer
5. Vortex
6. Triton X-100
7. Sodium Dodesil Sulphate (SDS)
8. Tris-HCl
9. Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)
10. Tris-EDTA buffer
11. Revolutions per minute (rpm)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-07]

ورتکس آرام و میکروسانتریفوژ در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد تا برای PCR مورد استفاده قرار گیرد [۱۶].

PCR قطعه مورد نظر با استفاده از پرایمرهای ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') به عنوان پرایمر رفت و ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') به عنوان پرایمر برگشتی انجام شد [۱۷]. ابتدا درجه خلوص و اندازه نسبی محصول PCR بدست آمده بر روی ژل آگارز (۱/۵ درصد) تعیین شد و سپس توسط شرکت فزا پژوه تعیین توالی شد و توالی بدست آمده در سایت NCBI جستجو شد تا نام جنس و گونه مخمر مورد نظر مشخص شد. واکنش زنجیری پلی‌مرازی حاوی سه مرحله‌ی واسرشت اولیه[1] (۹۵ درجه، ۵ دقیقه)، دوره[2] سی‌گانه که شامل ۹۵ درجه برای ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه، و در نهایت بسط نهایی[3] (۷۲ درجه، ۱۰ دقیقه) می‌باشد.

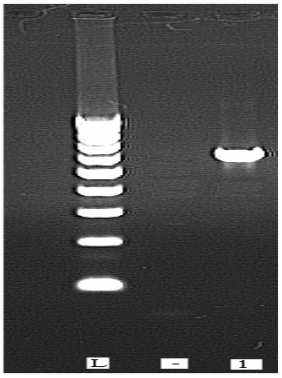
۳- نتایج

جداسازی و شناسایی مخمرهای مولد زایلیتول

در این بررسی ابتدا ۱۰ ایزوله مخمری جدا شد که ایزوله ۶ بیشترین تولید را داشت که این مخمر از برگ گیاه بنجامین و در اسفند ماه جداسازی شد.

شناسایی مخمرها توسط تعیین توالی RNA ریبوزومی

قطعه بدست آمده از هر مخمر بعد از PCR بر روی ژل آگارز برده شد تا خالص بودن و اندازه نسبی آن‌ها مشخص شود. طول قطعات بدست آمده با پرایمرهای ITS1 و ITS2 در مخمرهای مختلف متفاوت و شامل "قسمتی از ITS1-18srRNA - ITS2 -5.8srRNA و قسمتی از 28srRNA" است. شکل ۱، ژل آگارز محصول PCR مخمر جدا شده در این بررسی را نشان می‌دهد که طولی حدود ۷۰۰-۶۰۰ جفت باز دارد. بعد از تعیین توالی و تطابق قطعه‌ای ۵۲۴ جفت بازی از محصول فوق در سایت NCBI مشخص شد که ایزوله ۶، *رودوتورولا موسیلاژینوزا* بود (شکل ۲). شکل ۳ درخت فیلوژنی توالی فوق را به کمک نرم افزار مگا[4] و با الگوریتم حداکثر درست نمایی[5] و Neighbour joining نشان می‌دهد. *رودوتورولا موسیلاژینوزا* دارای کلنی‌های نرم، صاف، موکوئیدی و به رنگ قرمز-نارنجی بر روی محیط PDA می‌باشد.



شکل ۱ تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR سویه جدا شده

1. Initial denaturation
2. Cycle
3. Final extension

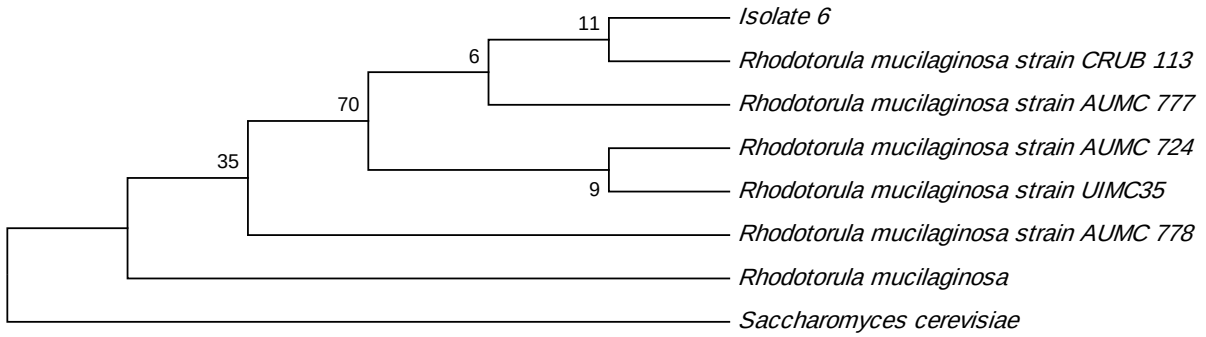
4. Mega (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), Version 5
5. Maximum likelihood

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-07]

L : Ladder (فرمنتاز، ۱۰۰ بازی)، – : کنترل منفی (آب مقطر)، 1 : *رودوتورولا موسیلاژینوزا*

```
Query  1    CTTAACTTGGAGTCCGAACTCTCACTTTCTAACCCTGTGCATTTGTTTGGGATAGTAACT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  40   CTTAACTTGGAGTCCGAACTCTCACTTTCTAACCCTGTGCATTTGTTTGGGATAGTAACT  99

Query  61   CTCGCAAGAGGGCGAACTCCTATTCACTTATAAACACAAAGTCTATGAATGTATTAAATT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  100  CTCGCAAGAGGGCGAACTCCTATTCACTTATAAACACAAAGTCTATGAATGTATTAAATT  159

Query  121  TTATAACAAAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  160  TTATAACAAAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGC  219

Query  181  AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  220  AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG  279

Query  241  CACCTTGCGCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAATACTTCAA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  280  CACCTTGCGCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAATACTTCAA  339

Query  301  CCCTCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTAGG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  340  CCCTCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTAGG  399

Query  361  GTCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  400  GTCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAA  459

Query  421  TAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGACTAGAGCCGGGTTGGGTTAAAGGAAGC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  460  TAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGACTAGAGCCGGGTTGGGTTAAAGGAAGC  519

Query  481  TTCTAATCAGAATGTCTACATTTTAAGATTAGATCTCAAATCAG  524
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  520  TTCTAATCAGAATGTCTACATTTTAAGATTAGATCTCAAATCAG  563
```

شکل ۲ نتیجه تطابق قطعه ۵۲۴ جفت بازی در NCBI و تشابه ۱۰۰ درصدی با *رودوتورولا موسیلاژینوزا*



شکل ۳ درخت فیلوژنی ایزوله ۶

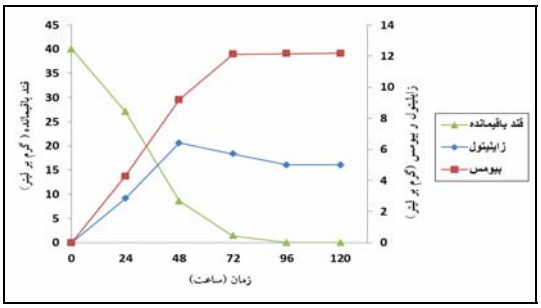
شناسایی کیفی و کمی زایلیتول تولید شده توسط سویه *رودوتورولا موسیلاژینوزا*

مخمر *رودوتورولا موسیلاژینوزا* بعد از ۲۴ ساعت قادر به تولید زایلیتول از قند زایلوز می‌باشد. زایلیتول تولید شده در روز دوم بر روی کاغذ TLC در شکل ۴ نشان داده شده است (مقدار ۱۰ گرم بر لیتر زایلیتول به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت). سپس زایلیتول تولید شده توسط این مخمر با استفاده از کیت مگازایم شناسایی و تایید گردید. هم‌چنین مقدار تولید با استفاده از روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد که همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود این مخمر در روز دوم بیشترین تولید زایلیتول (۶/۴۲ گرم بر لیتر) را در محیط با ۴۰ گرم بر لیتر زایلوز داشت. هم‌چنین مقدار قند زایلوز باقی‌مانده و مقدار توده زیستی، طی فرآیند تخمیر اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-07]

X S

شکل ۴ TLC حاصل از رابیتوز تولید شده توسط سویه *رودوتورولا موسیلاژینوزا* ، باند زایلیتول تولید شده توسط مخمر (S) در مقابل باند زایلیتول شاهد (X)



شکل ۵ منحنی تولید زایلیتول در سویه *رودوتورولا موسیلاژینوزا* در ۴۰ *گرم بر لیتر زایلوز*

بهینه سازی غلظت منبع کربن

به منظور افزایش تولید زایلیتول در سویه *رودوتورولا موسیلاژینوزا* تاثیر غلظت های مختلف منبع کربن سنجش شد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت زایلوز از ۸۰ تا ۱۴۰ گرم بر لیتر در سویه *رودوتورولا موسیلاژینوزا* منجر به افزایش تولید زایلیتول شد، اما افزایش بیشتر غلظت زایلوز باعث کاهش تولید و بازدهی زایلیتول شد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، با توجه به بازده تولید، بر اساس قند مصرفی ($Y_{P/S}$: ۰/۵۹ گرم بر گرم) و بر اساس توده سلولی ($Y_{P/X}$: ۳/۳۵ گرم بر گرم) هر دو نشان داد که بهترین غلظت زایلوز به منظور تولید زایلیتول توسط سویه *رودوتورولا موسیلاژینوزا*، ۱۴۰ گرم بر لیتر است و بیشترین مقدار زایلیتول (۴۹/۲۸ گرم بر لیتر) در این غلظت قندی بدست آمد. افزایش غلظت زایلوز هم‌چنین منجر به طولانی‌تر شدن زمان تخمیر شد.

جدول ۱ تاثیر افزایش غلظت زایلوز بر تولید زایلیتول توسط سویه *رودوتورولا موسیلاژینوزا*

زایلوز اولیه (گرم بر لیتر)	زمان (ساعت)	بیومس (گرم بر لیتر)	قند مصرفی (گرم بر لیتر)	زایلیتول (گرم بر لیتر)	$Y_{P/S}$ (گرم بر گرم)	$Y_{P/X}$ (گرم بر گرم)
۸۰	۱۹۲	۱۲/۸	۷۴/۲۹	۳۴/۲۸	۰/۴۶	۲/۶۷
۱۰۰	۱۹۲	۱۳/۲	۷۷/۱۵	۳۷/۱۴	۰/۴۸	۲/۸۱
۱۲۰	۱۹۲	۱۳/۷	۸۰	۴۴/۲۸	۰/۵۵	۳/۲۳
۱۴۰	**۱۹۲**	**۱۴/۷**	**۸۲/۸۶**	**۴۹/۲۸**	**۰/۵۹**	**۳/۳۵**
۱۶۰	۱۹۲	۱۲/۲	۵۷/۱۶	۳۱/۴۲	۰/۵۴	۲/۵۷

$Y_{P/S}$ (گرم بر گرم)، نسبت زایلیتول تولید شده (گرم بر لیتر) به مقدار قند مصرفی (گرم بر لیتر) است و $Y_{P/X}$ (گرم بر گرم)، نسبت زایلیتول تولید شده (گرم بر لیتر) به مقدار توده سلولی (گرم بر لیتر) می‌باشد

[۱۸].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-07]

۴- بحث

در فرآیند تولید تخمیری زایلیتول که توسط میکروارگانیسم‌ها مخصوصا" مخمرها صورت می‌گیرد، به منظور افزایش تولید و بازدهی، می‌توان پارامترهایی شامل غلظت سوبسترا، منبع نیتروژن، دما، pH و هوادهی را بهینه‌سازی کرد. یکی از مهمترین فاکتورهای موثر بر تولید زایلیتول ، غلظت اولیه زایلوز است [۷].

ایکوچی و همکاران به منظور بهینه سازی تولید زایلیتول توسط سویه *کاندیدا* 9-559، اثر افزایش غلظت اولیه زایلوز از ۵۰ تا ۳۰۰ گرم بر لیتر را بر تولید زایلیتول بررسی کردند و بهترین غلظت قندی برای تولید زایلیتول توسط این سویه ۲۰۰ گرم بر لیتر گزارش شد و مقدار زایلیتول تولید شده ۱۷۳ گرم بر لیتر بود [۱۹]. چنگ و همکاران اثر افزایش غلظت زایلوز را بر تولید زایلیتول توسط سویه W103 *کاندیدا تروپیکالیس* جداسازی شده از خاک بررسی و بهترین غلظت قندی را ۱۲۰ گرم بر لیتر با بازدهی ۰/۷۳ گرم بر گرم و مقدار ۸۷/۱ گرم بر لیتر زایلیتول گزارش کردند [۷]. بورا و همکاران گزارش کردند که سویه مخمری PTD3 *رودوتورولا موسیلاژینوزا* که از ساقه درخت صنوبر جداسازی شد، قادر به تولید زایلیتول با بازدهی ۶۷ درصد، از ۱۵۰ گرم بر لیتر زایلوز بود [۲۰].

همانطور که مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد، تاثیر فاکتور غلظت اولیه زایلوز در بهینه‌سازی تولید زایلیتول، به نوع سویه مخمری و نیز شرایط کشت بستگی دارد [۱۸].

در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف زایلوز بر تولید زایلیتول توسط *رودوتورولا موسیلاژینوزا* بررسی شد و نتایج بدست آمده بر اساس مقدار تولید و بازدهی زایلیتول نشان داد که افزایش غلظت زایلوز منجر به افزایش تولید و بازدهی زایلیتول شد، اما هم‌چنین منجر به طولانی‌تر شدن زمان تخمیر شد و این سویه در مدت زمان بیشتری زایلوز را مصرف کرد. بهترین غلظت زایلوز به منظور تولید زایلیتول توسط این سویه، ۱۴۰ گرم بر لیتر بود و مقدار زایلیتول تولید شده در این غلظت قندی، ۴۹/۲۸ گرم بر لیتر با بازدهی ۰/۵۹ گرم بر گرم (بر اساس قند مصرفی) در مدت زمان ۱۹۲ ساعت بود و افزایش بیشتر غلظت زایلوز منجر به کاهش بازدهی و تولید زایلیتول شد، که به علت اثر فشار اسمزی ناشی از غلظت افزایش یافته زایلوز بر سلول‌های مخمری بود.

برای غلبه بر این مشکل می‌توان از محیط کشت تغذیه شونده[1] استفاده کرد که در مقایسه با کشت بسته بازدهی بیشتر و سرعت بالاتر تولید زایلیتول بدست می‌آید [۲۱].

تولید میکروبی زایلیتول با توجه به معایب روش شیمیایی یک روش جایگزین مناسب است. معمولاً زایلیتول توسط میکروارگانیسم‌هایی که به طور طبیعی مصرف‌کننده زایلوز هستند تولید می‌شود و این میکروارگانیسم‌ها دارای آنزیم زایلوز ردوکتاز می‌باشند که زایلیتول محصول اصلی متابولیسم زایلوز است [۲۲]. در اکثر مطالعات، منبع کربنی زایلوز به عنوان سوبسترا و فراوان‌ترین قند موجود در ترکیبات همی‌سلولزی هیدرولیز شده برای تولید زایلیتول مورد استفاده قرار گرفته است. بررسی‌ها نشان دادند که تولید زایلیتول از گلوکز در یک مورد طی یک فرآیند سه مرحله‌ای از طریق آرابیتول و زایلولوز انجام شد [۲۳]. هم‌چنین تولید زایلیتول از لاکتوز موجود در آب‌پنیر در یک مورد طی یک فرآیند سه مرحله‌ای گزارش گردید [۲۴].

جداسازی سویه‌های مخمری مولد زایلیتول و شناسایی اولیه این سویه‌ها گام نخست در جهت دستیابی به سویه‌های برتر برای تولید زایلیتول می‌باشد.

۵- منابع

[1] Granstrom T B, Izumori K, Leisola M, 2007, A rare sugar xylitol PartI: the biochemistry and biosynthesis of xylitol, Applied Microbiology and Biotechnology, 2: 277-281.

[2] Altamirano A, Vazquez F, De Figueroa L I C, 2000, Isolation and identification of xylitol-producing yeasts from agricultural residues, Folia Microbiological, 45[3]: 255-258.

[3] EL- Batal A I and Khalaf S A, 2004, Xylitol production from corn cobs hemicellulosic hydrolysate by *Candida tropicalis* immobilized cells in hydrogel copolymer carrier, Journal of Agricultural Biological,1066-1073.

[4] Lif Holgerson P, StecksenBlicks C, Sjostrom I, Oberg M, Twetman S, 2006, Xylitol concentration in saliva and dental plaque after

1. Fedbatch Culture

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-07]

use of various xylitol-containing products, Caries Research, 40: 393-397.

[5] Natah SS, Hussien KR, Tuominen JA, Koivisto VA, 1997, Metabolic response to lactitol and xylitol in healthy men, Journal of Clinical Nutrition, 65: 947-950.

[6] Meinander N, Hahn-Hagerdal B, Linko M, Linko P, Ojamo H, 1994, Fed- batch xylitol production with recombinant XYL-1 expressing *Saccharomyces cerevisiae* using ethanol asa co-substrate, Applied Microbiology and Biotechnology, 42: 334-339 .

[7] Cheng kk, Ling HZ, Zhang JA, Ping WX, Huang W, Ge JP and Xu JM, 2010, Strain isolation and study on process parameters for xylose- to- Xylitol bioconversion, Food Biotechnology, 24[1]: 1606- 1611.

[8] Rao RS, Bhadra B, Shivaji S, 2007, Isolation and characterization of xylitol- producing yeasts from the gut of colleopteran insects, Current Microbiology, 5: 441-446.

[9] Vakhlu J and Kour A, 2006, Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning, Electronic Journal of Biotechnology, 9: 69-85.

10. Kurzman C P and Fell J W, 1998, The yeast, a taxonomic study, Fourth edition, Elsivier Publication, 1-100 and 891- 946.

[11] Lindow S E and Brandl M T, 2003, Microbiology of phyllosphere, Applied and Environmental Mirobiology, 69[4]: 1875-1883.

[12] Rao RS, Prahasham RS, Prasad KK, Rajesham S, Sarma PN, Rao LV, 2004, Xylitol production by *Candida* sp. : Parameter optimization using Taguchi approach, Process Biochemistry, 39: 951- 956.

[13] Zagustina NA, Rodionova NA, Mestechkina NM, Shcherbukhin VD, Bezborodov AM, 2001, Xylitol production by a culture of *Candida guilliermondii* 2581, Applied Microbiology and Biotechnology,37[5]:489-492.

[14] Bok S H and Demain A, 1977, An improved colorimetric assay for polyols, Annual Review Biochemistry, 81: 18-20.

[15] Millier GL, 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Annual Review Chemistry, 31: 426- 428.

[16] Hoffman CS, 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York.

[17] Deak T, Chen J, Beuchat LR, 2000, Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry, Applied and Environmental Mirobiology, 66: 4340-4344.

[18] Mussatto SI, Roberto IC, 2008, Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*, Process Biochemisrty, 43: 540- 546.

[19] Ikeuchi T, Azuma M, kato J, Ooshima H, 1999, Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentrations of xylose, Biomass Bioenergy, 333-339.

[20] Bura R, Vajzovic A, Doty SL, 2012, Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3I: production of xylitol and ethanol, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 39[7]: 1003-1011.

[21] Vandeska E, Amartey S, Kuzmanova S, Jeffries TW, 1996, Fed batch culture for xylitol production by *Candida boidinii*, Process Biochemistry, 31: 265-270.

[22] Saha BC, Bothast RJ, 1999, Production of xylitol by *Candida peltata*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 22: 633- 636.

[23] Onishi H and Suzuki T, 1969, Microbial production of xylitol from glucose, Applied Microbiology, 18: 1031-1035.

[24] Toyoda T and Ohtaguchi K, 2009, Xylitol production from lactose by biotransformation, Journal of Biochemical Technology, 2: 126-132.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-07]

The study of xylitol production by *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from nature

Asgary, F. [1], Ghezelbash, GH. [2*], Nahvi, I. [3]

1. Expert of Research Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Iran
2. PhD, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
3. Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Iran

(Received: 92/2/20 Accepted: 92/10/8)

Xylitol is a naturally five – carbon polyol with a high sweetening power. Owing to its physicochemical and technological properties, make it of high value to pharmaceutical, food and chemical industries. The biotechnological method of producing xylitol by microorganisms has been studied as an alternative to the chemical method. This method is of interest because it requires little energy and is very specific. Among the microorganisms, yeasts are considered as the best xylitol producer. In this study xylitol was produced by *Rhodotorola mucilaginosa* that isolated from leaf of Benjamina. The produced xylitol by *R. mucilaginosa* was determined and measured by thin layer chromatography, kit and colorimetric methods. This strain produced 6.42 g l^{-1} xylitol after 48 hours in medium congaing of 40 g l^{-1} xylose. Consequences of increasing the initial xylose concentration from 60 to 140 g l^{-1}, the final xylitol concentration and yield were also increased. Maximum concentration of produced xylitol by *R. mucilaginosa* was 49.28 g l^{-1} (yield of 0.59 g g^{-1}) at 140 g l^{-1} initial xylose concentration. However further increasing of xylose concentration to 160 g l^{-1}, led to a drastic decrease in xylitol production and yield.

Keywords: Xylitol, Xylose, *Rhodotorola mucilaginosa*, Fermentation.

* Corresponding Author E-Mail Address: gh.r.ghezelbash@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-07]