تولید زایلیتول توسط سویه مخمری *Debaryomyces hansenii* جداسازی شده از گرده گل پنیرک

فروغ عسگری کرچگانی*[۱]، مرضیه شمعی[۲]، غلامرضا قزلباش[۳]، ایرج نحوی[۴]

تاریخ دریافت: ۹٤/۰۱/۲۲
تاریخ تصویب: ۹۵/۰۳/۰۳

چکیده

زایلیتول یک پلی اُول پنج کربنه با قدرت شیرین کنندگی بالاست. این پلی اُول شیرین ترین پلی الکل می باشد. تولید بیوتکنولوژیکی زایلیتول با استفاده از میکروارگانیسم ها از نظر زیست محیطی ایمن است و به عنوان یک روش جایگزین روش شیمیایی مورد مطالعه قرار می گیرد. با توجه به خواص ارزشمندی که زایلیتول دارد به عنوان جایگزین قند در صنایع شیمیایی، غذایی و دارویی استفاده می شود. بر اساس مطالعات اخیر، در میان میکروارگانیسم ها، مخمرها بهترین تولیدکننده می باشند. در این پژوهش این شیرین کننده ارزشمند توسط سویه مخمری دباریومایسس هانسنی تولید شد. این مخمر از گرده گل پنیرک جداسازی و با تعیین توالی 18srRNA و هم ردیفی با توالی های موجود در پایگاه داده ها شناسایی گردید. زایلیتول در محیط تولید حاوی زایلوز و دیگر مواد معدنی تولید شد و با روش های آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک و با استفاده از کیت مگازایم ایرلند شناسایی و تایید و مقدار آن با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا اندازه گیری گردید. سویه مخمری دباریومایسس

*۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان.
(نویسنده مسئول fo.askary63@yahoo.com)
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان.
۳- استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز
٤- استاد، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی.

هانسنی قادر به تولید ۲۰/۴۵ گرم بر لیتر زایلیتول از ۴۰ گرم بر لیتر زایلوز، بعد از ۴۸ ساعت بود.

واژه های کلیدی: زایلیتول، زایلوز، Debaryomyces hansenii.

مقدمه

الکل های قندی دسته ای از پلی اُول ها[۱] هستند که ازطریق احیای آلدوزها و کتوزها تشکیل می شوند و دارای مزیت هایی از جمله مقدار کالری پایین، آنتی اکسیدانی، کاهش قند خون و قدرت شیرین کنندگی می باشند و به همین دلایل در صنایع غذایی به عنوان مکمل و جایگزین قندی مورد استفاده قرار می گیرند (Granstrom et al., 2007). از جمله پلی اُول ها که به طور وسیعی در حال حاضر استفاده می شود و مورد مطالعه قرار گرفته، زایلیتول[۲] است.

D- زایلیتول یک پلی الکل پنج کربنه می باشد که به طور طبیعی خاصیت شیرین‌کنندگی بالایی دارد (Altamirano et al., 2000). این پلی الکل یک شیرین کننده ی طبیعی غذاست که شیرینی مشابه سوکروز، اما مقدار انرژی کمتری نسبت به سوکروز دارد و برخلاف سوکروز اسید تولید نمی کند و به همین دلیل به عنوان یک عامل مؤثر برای جلوگیری از پوسیدگی دندان، به عنوان جایگزین قند در آدامس، خمیردندان و دهان شویه و صنایع غذای مختلف استفاده می شود(LifHolgerson et al., 2006 ; Zagustina et al., 2001). در میان پلی اُول ها ، زایلیتول شیرین ترین پلی الکل است (Branco et al., 2009) و به دلیل اینکه زایلیتول ویژگی مقاومت به حرارت دارد، به عنوان مکمل غذایی و در صنایع داروسازی کاربردهای فراوانی دارد (Ko et al., 2008). به دلیل اینکه متابولیسم زایلیتول غیروابسته به انسولین است، در شرایط کمبود انسولین یک جایگزین قند مناسب برای افراد دیابتی می باشد (Natah et al., 1997). به دلیل خاصیت ضدمیکروبی بودن زایلیتول می توان از آن در پیشگیری و درمان بیماری های اوتیت[۳]، درماتیت آتوپیک[۴]، فیبروز سیستیک[۵]، پریودنتیت[۶]، پوکی استخوان، کم خونی همولیتیک ناشی از کمبود گلوکز ٦- فسفات دهیدروژناز استفاده کرد (Abou Zeid et al., 2008).

۱-Polyol
۲-Xylitol
۳-Otitis
٤-Atopic dermatitis
٥-Cystic fibrosis
٦-Periodontitis

D- زایلیتول به طور صنعتی از طریق احیای شیمیایی D- زایلوز تولید می شود ولی تولید بیوتکنولوژیکی D- زایلیتول با استفاده از میکروارگانیسم ها به دلیل اینکه نیاز به کاتالیست سمی ندارد و از نظر زیست محیطی ایمن می باشد و با توجه به معایب روش شیمیایی، از اهمیت بسزایی برخوردار است (Cheng et al., 2010). تبدیل میکروبی زایلوز به زایلیتول اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است که در میان میکروارگانیسم ها مخمرها بهترین تولیدکننده می باشند (Rao et al., 2007). مخمرها از مدت ها پیش مناسب ترین منابع میکروبی در صنایع مختلف و صنایع غذایی هستند و به علت عدم بیماریزایی[۱] آن ها را به عنوان یک منبع سالم می دانند (Vakhlu and Kour, 2006). از جمله زیستگاه های مخمرها می توان به گیاهان اشاره کرد. گیاهان به سبب داشتن توانایی فتوسنتز و ساختن بسیاری از ترکیبات کربنی متنوع، زیستگاه های مناسبی را برای مخمرهای مختلف مهیا می سازند (Phaff and Starmer, 1987).

اکثر مخمرهای تولیدکننده زایلیتول از زایلوز به عنوان منبع کربن استفاده می کنند. مسیر کاتابولیکی زایلوز به این صورت است که ابتدا D- زایلوز توسط آنزیم زایلوز ردوکتاز به زایلیتول احیا می شود و سپس زایلیتول توسط زایلیتول دهیدروژناز به D- زایلولوز اکسید می شود و سرانجام D- زایلولوز توسط آنزیم زایلوز کیناز به D- زایلولوز ۵ فسفات فسفریله شده و سپس وارد مسیر پنتوزفسفات می شود (Granstrom et al., 2007). اخیرا مطالعات زیادی در مورد تولید زایلیتول توسط سویه های مختلف کاندیدا و سایر مخمرها صورت گرفته است. از جمله تولید زایلیتول توسط سویه های کاندیدا گوئیلیرموندی (*Candida guilliermondii*)(Cortez and Roberto 2014; Ramesh et al., 2012)، کاندیدا تروپیکالیس (*C. tropicalis*) (Ahmad et al., 2012; Ping et al., 2013)، کاندیدا موجی (*C. mogii*) (Sirisansaneeyakul et al., 2014)، کاندیدا شهاتا (*C. shehatae*) (Li et al., 2012)، کاندیدا آتنسنسیس (*C. athensensis*) (Zhang et al. 2012)، رودوتورولا موسیلاژینوزا (*Rhodotorola mucilaginosa*) (Bura et al., 2012) و دباریومایسس هانسنی (*Debaryomyces hansenii*) (Perez-Bibbins et al., 2013; Perez-Bibbins et al., 2014; Prakasha et al., 2011) گزارش شده است.

هدف از این پژوهش که برای اولین بار در ایران انجام شد، بررسی تولید زایلیتول توسط سویه مخمری دباریومایسس هانسنی (*Debaryomyces hansenii*)جداسازی شده از گرده گل پنیرک بود. در این مطالعه از میان چندین سویه مخمری مولد زایلیتول که از طبیعت جداسازی شدند، به این دلیل که در میان آن ها، این سویه بیشترین تولید

۱-Generally regarded as safe (GRAS)

را داشت انتخاب شد و مورد شناسایی قرار گرفت. تولیدکننده های زایلیتول که بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته اند، مخمرها مربوط به سویه های جنس کاندیدا و گونه دباریومایسس هانسنی می باشند که بهترین تولیدکننده های طبیعی هستند (El-Batal and Khalaf 2004).

مواد و روش ها

جداسازی سویه مخمری مولد زایلیتول

به منظور جداسازی مخمر مولد زایلیتول ابتدا گرده گل پنیرک به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در آب خیسانده شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول فوق به ارلن های 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 سانتی گراد در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه شیک شدند(Rao et al., 2007). بعد از ٤٨ ساعت از محیط مایع بر روی محیط جداسازی جامد کشت داده و بعد از دو روز کلنی ها در زیر میکروسکوپ مشاهده و بررسی شدند. این مخمر در محیط های اسلنت YPD [2] (گلوکز ۲۰، پپتون ۲۰، عصاره مخمر ۱۰ و آگار ۲۰ (گرم بر لیتر) و در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا تولید زایلیتول آن مورد بررسی قرار گیرد (Altamirano et al., 2000).

مطالعه تولید زایلیتول توسط سویه مخمری جدا شده

یک لوپ از مخمر فعال شده مورد نظر به یک ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط پیش تولید زایلیتول (زایلوز ٤۰، 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 سانتی گراد در انکوباتور با ۱۸۰ دور در دقیقه شیک گردید. بعد از ٤٨ ساعت از محیط فوق به نسبت ۵ درصد به ارلن های حاوی محیط تولید (مشابه محیط پیش تولید) انتقال داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با ۱۸۰ دور در دقیقه شیک گردید و تولید زایلیتول، هر ۲٤ ساعت به مدت ۵ روز بررسی شد (Cheng et al. 2010,).

شناسایی زایلیتول

در ابتدا زایلیتول تولید شده توسط سویه مخمری دباریومایسس هانسنی با روش کروماتوگرافی لایه نازک[3] (TLC) 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

۱-Yeast extract Pepton Xylose

۲-Yeast Pepton Dextrose Agar

۳-Thin Layer Chromatography (TLC)

جداسازی می شوند. به این ترتیب که مقدار ۱ میکرولیتر از محیط حاوی زایلیتول تولید شده توسط مخمر را 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 لکه های ایجاد شده، کاغذ با رنگ (هیدروکسید سدیم- پرمنگنات پتاسیم) اسپری شد و بعد از خشک شدن، تولید زایلیتول مورد بررسی قرار گرفت(Zagustina et al. 2001). سپس زایلیتول تولید شده توسط مخمر مورد نظر که ابتدا با روش TLC جداسازی گردید، با استفاده از کیت مگازایم ایرلند شناسایی شد و مورد تایید قرار گرفت. اساس کار این کیت بر پایه ۲ واکنش و شامل ۳ محلول است. طبق واکنش اول، زایلیتول تولید شده توسط مخمر، در حضور محلول ۱ (INT[1]) و توسط آنزیم زایلیتول دهیدروژناز به زایلولوز اکسید و از ترکیب TEA[2] بعنوان محلول بافر (محلول۲) استفاده شد. در واکنش دوم، INT در حضور محلول ۳ (دیافورز) به INT-formazan احیا گردید. در این واکنش مقدار INT-formazan با مقدار زایلیتول متناسب است که از طریق افزایش جذب در ٤٩٢ نانومتر اندازه گیری شد. به منظور تشخیص کیفی و کمی زایلیتول تولید شده توسط مخمر و هم چنین اندازه گیری مقدار زایلوز باقی مانده طی این فرآیند تخمیر از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) استفاده گردید. در این روش از ستون آمینی 100NH2-5 Nucleosil ساخت شرکت Knauer آلمان استفاده شد. فاز متحرک، استونیتریل: آب (۲۰:۸۰) است، که با سرعت ۱ میلی لیتر در دقیقه از ستون عبور داده شد. دتکتور مورد استفاده RI بوده و ۲۰ میکرولیتر از نمونه ها به دستگاه تزریق شد.

اندازه گیری بیومس میکروبی

اندازه گیری توده زنده همزمان با اندازه گیری ماکزیمم تولید زایلیتول صورت گرفت. به این ترتیب که محیط کشت تخمیری را در ٦٠٠٠ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و با آب مقطر ۲ بار شستشو داده شد. سپس در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد تا ثابت شدن وزن، خشک گردید (Altamirano et al., 2000).

شناسایی مخمر با استفاده از روش مولکولی

مخمر مولد زایلیتول جدا شده از طبیعت توسط تعیین توالی 18srRNA شناسایی شد. در این پژوهش از توالی ITS (ناحیه رونویسی شونده داخلی) به عنوان پرایمر استفاده گردید. برای استخراج DNA مخمرها، ابتدا مخمر مورد نظر در محیط عصاره مخمر-

۱-Iodo Nitrotetrazolium Chloride (INT)

۲-Triethanolamine (TEA)

پپتون- گلوکز[۱] مایع کشت داده شد و سلول ها جداسازی و با استفاده از آب مقطر شستشو داده شدند. سپس سلول ها با بافر لیزکننده[۲]، دانه های شیشه یی (۶۰۰-۴۲۵ میکرون)، محلول فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) مخلوط شده و طی مخلوط سازی[۳] شدید به مدت ۵-۳ دقیقه شکسته شدند. بافر لیزکننده حاوی تریتون ۱۰۰[۴]- X ، سدیم دودسیل سولفات[۵]، کلرید سدیم، تریس-اسید کلریدریک[۶] و اتیلن دی آمین تترا استیک[۷] اسید بود. سپس به محتویات فوق بافر TE اضافه شد و به منظور انحلال DNA در بافر TE عمل مخلوط سازی به آرامی انجام شد. بعد از سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه 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 می گردد. 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[۸] عمل مخلوطسازی به آرامی انجام شد. بعد از سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه[۹] 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 می گردد. 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 ورتکس آرام و میکروسانتریفوژ در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد تا برای PCR مورد استفاده قرار گیرد(Hoffman, 1997).

PCR قطعه مورد نظر با استفاده از پرایمرهای(ITS1(5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' به عنوان پرایمر رو به جلو و(ITS4(5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' به عنوان پرایمر برگشتی انجام شد(Deak et al., 2000). 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 وتوالی بدست آمده در سایت NCBI جستجو شد تا نام جنس و

۱-Yeast Extract Peptone Glucose (YPD)
۲-Lysing Buffer
۳-Vortex
٤-Triton X۱۰۰-
٥-Sodium Dodesil Sulphate (SDS)
٦-Tris-HCl
۷-Ethylene diamine tetra acetic Acid (EDTA)
۸-Tris-EDTA buffer
۹-Revolutions per minute (rpm)

گونه مخمر مورد نظر مشخص شد. واکنش زنجیری پلی مرازی حاوی سه مرحله ی واسرشت اولیه[۱] (۹۵ درجه، ۵ دقیقه)، دوره [۲]سی گانه که شامل ۹۵ درجه برای ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه، و در نهایت بسط نهایی[۳] (۷۲ درجه، ۱۰ دقیقه) می باشد.

نتایج

جداسازی و شناسایی مخمرهای مولد زایلیتول

در این بررسی سویه مخمری مولد زایلیتول از گرده گل پنیرک در فروردین ماه جداسازی گردید و به عنوان بهترین تولیدکننده برای بررسی های بعدی انتخاب شد.

شناسایی مخمرها توسط تعیین توالی RNA ریبوزومی

قطعات به دست آمده از هر مخمر بعد از PCR بر روی ژل آگارز برده شد تا خالص بودن و اندازه نسبی آن ها مشخص شود. طول قطعات به دست آمده با پرایمرهای ITS1 و ITS2 در مخمرهای مختلف متفاوت و شامل "قسمتی از18s rRNA - ITS1- 5.8S rRNA- ITS2 و قسمتی از "28s rRNA است. بعد از تعیین توالی و تطابق در سایت NCBI مشخص شد که جدایه مورد نظر، دباریومایسس هانسنی بود. دباریومایسس هانسنی دارای کلنی های نرم، صاف و کرم رنگ بر روی محیط PDA[۴] بود.

توالی فوق بعد از هم ردیفی، تشابه ۹۸ درصدی را با دباریومایسس هانسنی نشان داد (شکل ۱).

۱-Initial denaturation

۲-Cycle

۳-Final extension

٤-Potato Dextrose Agar

Debaryomyceshansenii strain ATCC ۶۰۹۷۸

```
Query  ۱
AAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTA ۶۰
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  ۱۴۸۲
AAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTA ۱۵۴۱

Query  ۶۱
GTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGT  ۱۲۰
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  ۱۵۴۲
GTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGT  ۱۶۰۱

Query  ۱۲۱
CGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGTTTAAAGAAGGGGGCAAC  ۱۸۰
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  ۱۶۰۲
CGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGTTTAAAGAAGGGGGCAAC  ۱۶۶۱

Query  ۱۸۱
TNCATCTTGGAACCGAAAAGCTGGTCAAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA  ۲۴۰
| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  ۱۶۶۲
TCCATCTTGGAACCGAAAAGCTGGTCAAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA  ۱۷۲۱
Query  ۲۴۱
CAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTCTTTTTGCCAGCGCTT  ۳۰۰
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  ۱۷۲۲
CAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTCTTTTTGCCAGCGCTT  ۱۷۸۱

Query  ۳۰۱
AATTGCGCGGCCAAAAAACCTTACACACAGTGTNTTTNGTTATTACAAGNACTTTTGCTT  ۳۶۰
||||||||||| |||||||||||||||||||||| ||| ||||||||||| ||||||||||
Sbjct  ۱۷۸۲
AATTGCGCGGCGAAAAAACCTTACACACAGTGTTTTTTGTTATTACAAGAACTTTTGCTT  ۱۸۴۱

Query  ۳۶۱
TGGTCTGGACTAGAAATAGTTTGGGCCAGAGGTTTACTGAACTAAACTTCAATATTTATA  ۴۲۰
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  ۱۸۴۲
TGGTCTGGACTAGAAATAGTTTGGGCCAGAGGTTTACTGAACTAAACTTCAATATTTATA  ۱۹۰۱

Query  ۴۲۱   TTGAATTGTTATTTATTTNATTGTCAATTTGTTGATTAAA  ۴۶۰
              |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||
Sbjct  ۱۹۰۲  TTGAATTGTTATTTATTTAATTGTCAATTTGTTGATTAAA  ۱۹۴۱
```

شکل ۱ : مقایسه توالی DNA سویه مخمری جداسازی شده و سویه ای که بیشترین تشابه را از سایت NCBI نشان داد.

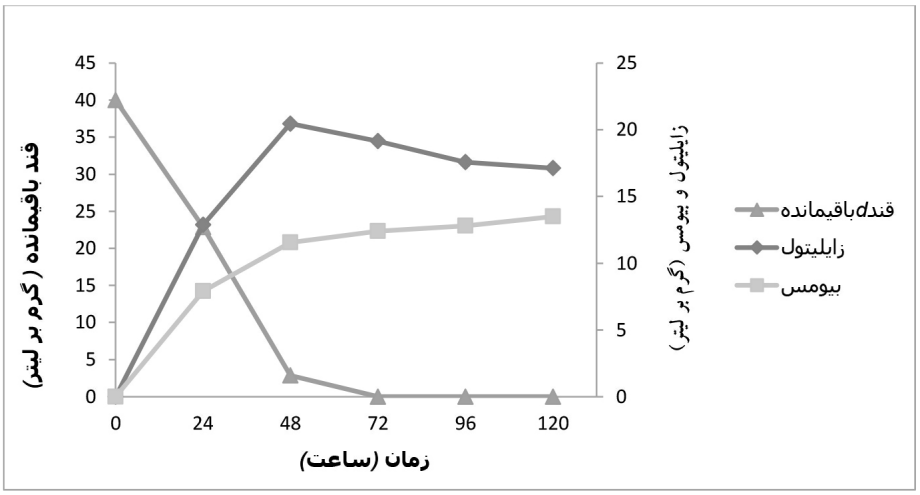
شناسایی کیفی و کمی زایلیتول تولید شده توسط سویه *Dataryum Hansen*

مخمر *Debaryomyces hansenii* بعد از ۲٤ ساعت قادر به تولید زایلیتول از قند زایلوز می باشد. زایلیتول تولید شده در روز دوم بر روی کاغذ TLC در شکل ۲ 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. هم چنین مقدار تولید با استفاده از روش HPLC اندازه گیری شد که همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود این مخمر در روز دوم بعد از ٤٨ ساعت بیشترین تولید زایلیتول (٢٠/٤٥ گرم بر لیتر) را داشت. هم چنین مقدار قند زایلوز باقی مانده و مقدار بیومس، طی این فرآیند تخمیر اندازه گیری شد (شکل ۳).

X *S*

شکل ۲: TLC حاصل از زایلیتول تولید شده توسط سویه *Debaryomyces hansenii* باند زایلیتول تولید شده توسط مخمر (S) در مقابل باند زایلیتول شاهد (X)



شکل ۳ : تولید زایلیتول و مصرف قند زایلوز توسط سویه دباریومایسس هانسنی و اندازه گیری آن ها با استفاده از HPLC

بحث

در این مطالعه زایلیتول، این شیرین کننده ارزشمند به عنوان محصول اصلی متابولیسم زایلوز توسط مخمر *Debaryomyces hansenii* که از گرده گل پنیرک جداسازی گردید، تولید و مقادیر زایلیتول تولید شده با روش بسیار دقیق کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) اندازه گیری شد. معمولاً زایلیتول توسط میکروارگانیسم هایی که به طور

طبیعی مصرف کننده زایلوز هستند تولید می شود و این میکروارگانیسم ها دارای آنزیم زایلوز ردوکتاز می باشند و زایلیتول محصول اصلی متابولیسم زایلوز است (Saha and Bothast. 1999). تولید میکروبی زایلیتول از منابع کربنی دیگر در موارد نادر انجام شده است. تولید زایلیتول از گلوکز تنها در یک مورد توسط اونیشی و سوزوکی گزارش شد (Onishi and Suzuki, 1969) و نیز تولید زایلیتول از لاکتوز در یک مورد، طی یک فرآیند سه مرحله ای با استفاده از میکروارگانیسم ها انجام گرفت(Toyoda and Ohtaguchi 2009). یکی از بهترین تولیدکننده های طبیعی زایلیتول که مورد مطالعه قرار گرفته گونه مخمری *Debaryomyces hansenii* می باشد. آلتامیرانو و همکاران مخمرهای *Debaryomyces hansenii* را از مزارع انگور و از علف های ذرت که در سیلوها انبار شده، جداسازی کردند (Altamirano et al., 2000). در مطالعه ای که رامش و همکاران انجام دادند زایلیتول را از زایلوز توسط سویه مخمری *Debaryomyces hansenii* واریته هانسنی تولید کردند (Ramesh et al., 2013). میسرا و همکاران سویه ای از مخمر *Debaryomyces hansenii* گزارش کردند که قادر به تولید ۹/۳۳ گرم بر لیتر زایلیتول از ۵۰ گرم بر لیتر زایلوز بود (Misra et al., 2012). پراکاشا و همکاران سویه ی دیگری از مخمر دباریومایسس هانسنی گزارش کردند که قادر به تولید ٦٨/٦ گرم بر لیتر زلیلیتول از ۱۰۰ گرم بر لیتر زایلوز بود (Prakasha et al., 2011). سامپایو و همکاران تقریباً ۲۷۰ مخمر برای تولید زایلیتول جداسازی کردند که به عنوان تنها منبع کربن از زایلوز استفاده می کردند و بهترین تولید کننده، دباریومایسس هانسنی گزارش شد و از ۱۰ گرم بر لیتر زایلوز، ٥/٨٤ گرم بر لیتر زایلیتول تولید کرد (Sampaio et al., 2008). در مطالعه ی کاروالهیرو و همکاران، از سویه مخمری CCMI ۹٤۱ دباریومایسس هانسنی به منظور تولید زایلیتول از زایلوز استفاده شد (Carvalheiro et al., 2006). در این بررسی سویه مخمری دباریومایسس هانسنی جداسازی شده از گرده گل پنیرک ۲۰/٤٥ گرم بر لیتر زایلیتول از ٤۰ گرم بر لیتر زایلوز تولید کرد و مقدار زایلیتول تولید شده توسط این سویه نزدیک به مطالعات انجام شده ی مشابه می باشد.

نتیجه گیری

با توجه به خواص ارزشمندی که زایلیتول دارد و با در نظر گرفتن اینکه روش شیمیایی تولید زایلیتول نیاز به فشار و دمای بالا، استفاده از کاتالیست گران و مراحل هوادهی و خالص سازی گرانقیمت به منظور حذف محصولات فرعی برای استفاده در صنایع غذایی و استانداردهای دارویی دارد، این شیرین کننده طبیعی از طریق سنتز زیستی

توسط سویه مخمری جداسازی شده از طبیعت تولید شد. سنتز زیستی فرآیندی است که با استفاده از قارچ ها، باکتری ها، مخمرها یا آنزیم های خالص سازی شده از این میکروارگانیسم ها انجام می شود (El-Batal and Khalaf, 2004) . می توان از زایلیتول به عنوان بهترین جایگزین قندی در صنایع مختلف شیمیایی، غذایی و دارویی استفاده کرد (Cheng et al., 2010). به دلیل اینکه زایلوز، فراوان ترین مونومر قندی موجود در ترکیبات همی سلولزی هیدرولیز شده است، از لحاظ اقتصادی تولید زایلیتول از این منبع ارزان قیمت، می تواند بسیار مقرون به صرفه باشد. فرآیند تخمیر که در مخمرها منجر به تولید زایلیتول می شود از طریق یک سری فاکتورها کنترل می گردد. از جمله این فاکتورها شامل: غلظت زایلوز، منبع نیتروژن، هوادهی، دما و pH می باشند. برای افزایش بازدهی فرآیند بیوتکنولوژیکی زایلیتول می توان این پارامترها را بهینه سازی نمود. جداسازی سویه های مخمری مولد زایلیتول و شناسایی اولیه این سویه ها گامی نخست در جهت دستیابی به سویه های برتر برای تولید زایلیتول می باشد.

منابع

Abou Zeid, A. A., El-Fouly, M. Z., El-Zawahry, Y. A., El-Mongy, T.M., El-Aziz, A.B.A. (2008) Bioconversion of rice straw xylose to xylitol by a local strain of candida tropicalis Journal of Applied Sciences Research 4(8): 975-986.

Ahmad, I., Shim, W.Y., Ieon, W.Y., Yoon, B.H., Kim, J.H. (2012) Enhancement of xylitol production in *Candida tropicalis* by co-expression of two genes involved in pentose phosphate pathway Bioprocess and Biosystes Engineering 35(1-2): 199-204.

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.

Branco, R.F., Santos, J.C.D., Sarrouh, B.F., Rivaldi, J.D., Jr, A.P., Silva, S.S.D. (2009) Profiles of xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylitol production under different oxygen transfer volumetric coefficient values Journal of Chemical Technology and Biotechnology 84: 326-330.

Bura, R., Vajzovic, A., Doty, S.L. (2012) Novel endophytic yeast Rhodotorula mucilaginosa strain PTD3I: production of xylitol and ethanol Journal of Industrial

Microbiology and Biotechnology 39(7): 1003-1011.

Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Lopes, S., parajo, J.C., Pereira, H., Girio, F.M. (2006) Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941 Journal of Microbiology Biotechnology 33: 646- 654.

Cheng, k.k., Ling, H.Z., Zhang, J.A., Ping, W.X., Huang, W., Ge, J.P., Xu, J.M. (2010) Strain isolation and study on process parameters for xylose- to- Xylitol bioconversion Food Biotechnology 24(1): 1606- 1611.

Cortez, D.V., Roberto, I.C. (2014) Optimization of D-xylose to xylitol biotransformation by *Candida guilliermondii* cells permeabilized with Triton x-100 Biocatalysis and Biotrasformation 32(1): 34-38.

Deak, T., Chen, J., Beuchat, L.R. (2000) Molecular characterization of Yarrowia lipolytica and *Candida zeylanoides* isolated from poultry Applied and Environental Microbiology 66: 4340-4344.

El-Batal, A.I., Khalaf, S.A. (2004) Xylitol production from corn corbs hemicellulosic hydrolysate by *Candida tropicalis* immobilized cells in hydrogel copolymer carrier Journal of Agricultural *Biological* 6(6) 1066_1073.

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

Hoffman, CS (1997) Current Protocols in Molecular Biology John Wiley and Sons, New York.

Ko, C.H., Chiang, P.N., Chiu, P.C., Liu, C.C., Yang, C.L., Shiau, I.L. (2008) Integrated xylitol production by fermentation of hardwood wastes Journal of Chemical Technology Biotechnology 83: 534-540.

Li, Y., Park, J.Y., Shiroma, R., Ike, M., Tokuyasu, K. (2012) Improved ethanol and reduced xylitol production from glucose and xylose mixtures by the mutant strain of *Candida shehatae* ATCC22984 Applied Biochemistry Biotechnology 166:1781-1790.

LifHolgerson, P., Stecksen Blicks, C., Sjostrom, I., Oberg, M., Twetman, S. (2006) Xylitol

concentration in saliva and dental plaque after use of various xylitol-containing products. Caries Research 40: 393-397.

Misra, S., Raghuwanshi, S., Saxena, R.K. (2012) Fermentation behavior of an osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* for xylitol production Biotechnology Progress 28(6): 1457-1465.

Natah, S.S., Hussien, K.R., Tuominen, J.A., Koivisto, V.A. (1997) Metabolic response to lactitol and xylitol in healthy men Journal of Clinical Nutrition 65: 947-950.

Onishi, H., Suzuki, T (1969) Microbial production of xylitol from glucose Applied Microbiology 18: 1031-1035.

Perez-Bibbins, B., Salgado, J.M., Torrado, A., Aguilar-Uscanga, M.G., Dominguez, J.M. (2013) Culture parameters affecting xylitol production by *Debaryomyces hansenii* immobilized in alginate beads Process Biochemistry 48(3): 387-397.

Perez-Bibbins, B., Oliveira, R.R.S., Torrado, A., Aguilar-Uscanga, M.G., Dominguez, J.M. (2014) Study of the potential of the air lift bioreactor for xylitol production in fed-boten cultures by *Debaryomyces hansenii* immobilized in alginate beads-Biotechnol. Process Engineering 98: 151-161.

Phaff, H.J., Starmer, W.T. (1987) Yeast associated with plants, insect and soil Pp. 123-180. In: Rose, A.H.and Harrison, J.S. (eds). The yeasts: Biology of yeasts second edition, Academic Press, Orlando, Florida.

Ping, y., Ling, H.Z., Song, G., Ge, J.P. (2013) Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis* Biochemical Engineering Journal 75:89-91.

Prakasha, G., Varma, A.J., Prabhune, A., Shouche, Y., Rao, M. (2011) Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* Bioresource Technology 102(3): 3304-3308.

Ramesh, S., Muthuvelayudham, R., Rajesh Kannan, R., Viruthagiri, T. (2012) Application of factorial design to the study of xylitol production from corncob hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii* Journal of Biochemical and Technology 4(1): 518-523.

Ramesh, S., Muthuvelayudham, R., Kannan, R.R., Viruthagiri, T. (2013) Stastical optimization of process variables for corncob hemicellulose hydrolysate to xylitol by Debaryomyces *hansenii* var *hansenii* International Journal of Chemical and Technology 5(1): 186-196.

Rao, R.S., Bhadra, B., Shivaji, S. (2007) Isolation and characterization of xylitol- producing yeasts from the gut of colleopteran insects Current Microbiology 5: 441-446.

Rao, R.S., Prahasham, R.S., Prasad, K.K., Rajesham, S., Sarma, P.N., Rao, L.V. (2004) Xylitol production by *Candida* sp.: Parameter optimization using Taguchi approach .Process Biochemistry 39: 951- 956.

Saha, B.C., Bothast, R.J. (1999) Production of xylitol by Candida peltata Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 22: 633- 636.

Sampaio, F.C., Chaves-Alves, V.M., Converti, A., Lopes Passos, F.M., Cavalcante Coelho, J.L. (2008) Influence of cultivation conditions on xylose-to xylitol bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii* Bioresource Technology 99: 502-508.

Sirisansaneeyakul, S., Kop, B., Tochampa, W., Wannawilai, S., Chaveesuk, R., Lee, W.C. (2014) Sodium benzoate stimulates xylitol production by Candida mogii Journal of Institute Chemical Engineering 45(3): 734-743.

Toyoda, T., Ohtaguchi, K. (2009) Xylitol production from lactose by biotransformation Journal of Biochemical Technology 2: 126-132.

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

Zagustina, N.A., Rodionova, N.A., Mestechkina, N.M., Shcherbukhin, V.D., Bezborodov, A.M. (2001) Xylitol production by a culture of *Candida guilliermondii* 2581 Applied Microbiology Biotechnology 37(5):489-492.

Zhang, J., Geng, A., Yoo, C., Lu, Y., Li, Q. (2012) Xylitol production from D-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of Candida athensensis SB18 Bioresource Technology 105: 134-141.