

Optimization of a Culture Medium for the Production of *Saccharomyces cerevisiae* using Glucose Syrup and Corn Steep Liquor

Razieh Robotjazi

Department of Biotechnology, Biology Faculty, Payam Noor University of Tehran East, Tehran, Iran, raziehrabat@gmail.com

Mehrdad Azin

Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran, azin@irost.ir

Nooshin Sohraby

Department of Biotechnology, Biology Faculty, Payam Noor University of Tehran East, Tehran, Iran, nsohrabi75@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Saccharomyces cerevisiae* is the dominant yeast in the bakery industry used throughout the world. One of the most widely used sources of carbon for the bread yeast culture medium is molasses. In recent years, due to the expansion of the fermentation industries and the increased demand for carbon and nitrogen sources in these industries, and the shortage of raw materials and their high cost, the possibility of using by-products produced in food industry factories has been considered.

Materials and methods: In this study, the use of corn steep liquor as the nitrogen source and glucose syrup as the carbon source has been studied. The amount of biomass production and yeast activity was measured in the form of carbon dioxide gas production and sugar consumption in separate tests. In all treatments, the fermentation time was 16 hours, and stirring on a shaker was at 30 °C and 150 rpm.

Results: At the optimized point, where the amount of the glucose syrup and corn steep liquor was 12.82 mL/100 mL and 4.31 mL/100 mL, respectively, the amount of produced CO₂ increased about 12.5%, and the time of rising of the dough reduced from 25 to 14 minutes showing a significant progress.

Discussion and conclusion: To replace the carbon and nitrogen sources in the yeast culture medium, the factors and their levels were selected from previous studies. Because of the shortage of sugar beet molasses, which has recently appeared in Iran's fermentation industry, we tried to introduce two cheap but still valuable replacements, for both the carbon and nitrogen sources. The result showed that using glucose syrup and corn steep liquor is not only feasible but also better than the conventional sources.

Key words: Optimization, *Saccharomyces cerevisiae*, Corn steep liquor, Glucose syrup, Design of experiments

* Corresponding author

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)

سال نهم، شماره ۳۵، پاییز ۱۳۹۹، صفحه ۲۹ - ۳۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵

Doi: [10.22108/BJM.2020.118286.1218](https://doi.org/10.22108/BJM.2020.118286.1218)

بهینه‌سازی محیط کشت مخمر ساکارومایسس سروزیه با استفاده از شربت گلوکز و عصاره خیسانده ذرت

راضیه رباط‌جزی: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌فناوری میکروبی، دانشگاه پیام نور تهران شرق، تهران، ایران، raziéhrobot@gmail.com
مهرداد آذین*: دانشیار پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، azin@irost.ir
نوشین سهرابی: استادیار دانشگاه پیام نور تهران شرق، تهران، ایران، nsohrabi75@yahoo.com

چکیده

مقدمه: ساکارومایسس سروزیه، مخمر اصلی در صنعت نانوائی است که در سراسر جهان استفاده می‌شود. ملاس یکی از پرکاربردترین منابع کربن برای تهیه محیط کشت مخمر نان است. طی سال‌های اخیر و با توجه به گسترش صنعت تخمیر و افزایش تقاضا برای منابع کربن و نیتروژن در این صنعت و کمبود مواد اولیه و گرانی آن، امکان استفاده از محصولات جانبی تولیدشده در کارخانه‌های صنایع غذایی مدنظر قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، استفاده از عصاره خیسانده ذرت (منبع نیتروژن) و شربت گلوکز (منبع کربن) مطالعه شد. میزان تولید زیست‌توده و فعالیت مخمر در قالب میزان تولید گاز دی‌اکسید کربن و میزان مصرف قند در آزمون‌های جداگانه سنجیده شد. در تمام تیمارها، زمان تخمیر ۱۶ ساعت، هم‌زدن روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

نتایج: در نقطه بهینه که مقدار نهایی شربت گلوکز ۱۲/۸۲ میلی‌لیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر و عصاره خیسانده ذرت ۴/۳۱ میلی‌لیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر تعیین شد، میزان تولید گاز دی‌اکسید کربن ۱۲/۵ درصد افزایش یافت و زمان بالآ آمدن خمیر از ۲۵ دقیقه به ۱۴ دقیقه کاهش یافت که مقادیر درخور توجهی است.

بحث و نتیجه‌گیری: به‌منظور جایگزین کردن منابع کربن و نیتروژن در محیط کشت مخمر، مقدار اولیه متغیرها با مطالعه و پژوهش انتخاب شد. با توجه به کمبود ملاس چغندر که به‌تازگی در صنعت تخمیر ایران ظاهر شده است، سعی شد دو جایگزین ارزان‌قیمت و باارزش برای منابع کربن و نیتروژن معرفی شوند. نتایج نشان دادند استفاده از شربت گلوکز و عصاره خیسانده ذرت نه تنها امکان‌پذیر است، بلکه بهتر از منابع مرسوم عمل می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، ساکارومایسس سروزیه، عصاره خیسانده ذرت، شربت گلوکز، طراحی آزمایش‌ها

مقدمه

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

منحصر به فرد، مصارف بسیار زیادی دارد؛ همچنین مدلی ابتدایی از موجودات یوکاریوتیک است که بسیار در مطالعه‌ها استفاده می‌شود. ساکارومایسس سرروزیه در طبقه‌بندی جزو گروه آسکومایسس‌ها قرار دارد (۲).

بررسی‌های بسیاری در زمینه تاریخ و فناوری صنعت نان و مخمر نانوائی انجام شده‌اند. در بین گونه‌ها، گونه ساکارومایسس سرروزیه مهم‌ترین گونه‌ایست که مقادیر زیاد ساکارز را تحمل می‌کند و تحمل منجمد شدن و گرم شدن دوباره، استفاده سریع از مالتوز و تولید دی‌اکسید کربن زیاد را دارد. گونه‌های مخمر نان باید بتوانند به‌طور مؤثر از مالتوز استفاده کنند. گونه‌های مخمر نان که مقدار زیاد گلوکز را تحمل می‌کنند و مالتوز را به‌سرعت استفاده می‌کنند، به‌طور ژنتیکی توسعه یافته‌اند و استفاده تجاری دارند (۲).

به‌طور کلی، مخمرها در دمای ۲۵ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط هوازای زندگی می‌کنند و کشت مخمر خالص در محیط با منابع کربن، نیتروژن، مواد معدنی و آب انجام می‌شود (۳). فعالیت اصلی مخمر نان (ساکارومایسس سرروزیه) در خمیر نان، تولید دی‌اکسید کربن از قند است. خمیر در محیط گرم و مرطوب قرار می‌گیرد و مخمر با تولید و تکثیر گاز دی‌اکسید کربن در طول تخمیر باعث افزایش حجم خمیر می‌شود (۳).

امروزه، انواع مختلفی از ملاس وجود دارد و به‌طور کلی، هر مایعی که در اجزای تشکیل‌دهنده آن بیش از ۴۳ درصد قند وجود داشته باشد، ملاس خوانده می‌شود؛ این قند عموماً ساکارز است. ترکیب ملاس بسیار متفاوت است و به مراحل تصفیه شکر، موقعیت آب‌وهوایی و فصل بستگی دارد. مخمر ساکارز را به دو مونوساکارید گلوکز و فروکتوز هیدرولیز و آن را

مخمرها موجودات تک‌سلولی بسیار کوچکی‌اند که از نظر شکل ظاهری عموماً کروی، تخم‌مرغی شکل یا استوانه‌ای‌اند. هر سلول ساکارومایسس سرروزیه حدود ۸ میکرون قطر و دیوارهٔ دولایه‌ای دارد که دارای منافذی برای عبور و مرور مواد است و از طریق آن، غذاهای اساسی به درون سلول راه می‌یابند و متابولیت‌های زائد از سلول خارج می‌شوند. دمای مناسب (دمای بهینهٔ ۲۵ تا ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد)، رطوبت و مواد غذایی کمترین نیازهای مخمر برای رشد مناسب به شمار می‌آیند و سرما فرایند رشد را کند می‌کند و از آن برای نگهداری و ذخیرهٔ مخمرها استفاده می‌شود (۱).

بسیاری از مواد غذایی با استفاده از مخمرها تهیه می‌شوند که نان یکی از مهم‌ترین آنهاست. در فرایند تولید نان، مخمرها از کربوهیدرات‌های موجود در آرد تغذیه می‌کنند. رشد مخمر مستلزم وجود اکسیژن کافی است. این گروه از قارچ‌ها به‌محض تغذیهٔ مواد غذایی، دی‌اکسید کربن در محیط آزاد می‌کنند و حباب‌های دی‌اکسید کربن موجب افزایش حجم خمیر و در نتیجه، پخت بهتر نان می‌شوند. مخمرها مواد قندی را تخمیر می‌کنند و در این فرایند، اتانول و دی‌اکسید کربن تولید می‌شود که موجب ورآمدن خمیر و در نتیجه، بهبود کیفیت نان می‌شوند؛ بنابراین، مخمرها نقش بسیار مهمی را در صنایع غذایی و تولید فراورده‌های مختلف بر عهده دارند و استفاده از ویژگی‌ها و قابلیت‌های این گروه از قارچ‌ها در تولید فراورده‌های مختلف موجب بهبود کیفی تولید می‌شود.

ساکارومایسس سرروزیه مخمری اساسی است که در زیست‌فناوری در سراسر جهان استفاده می‌شود و به‌علت نقش کلیدی در تخمیر بسیاری از غذاها و فیزیولوژی

که از هیدرولیز آنزیمی نشاسته ذرت به دست می‌آید و در صنایع مختلف کاربرد دارد. شربت گلوکز، محلول قندی غلیظ و تصفیه‌شده و یکی از بهترین جایگزین‌های شکر است که میزان شیرینی آن معادل ۰/۷ شیرینی شکر است. شربت گلوکز در درجه‌های مختلفی وجود دارد که با شاخص‌های D.S (ماده جامد^۲) و D.E (معادل دکستروز^۳) مشخص می‌شوند. ضرورت استفاده از مخمر (ترکیب کلیدی در صنعت نانوائی) بر کسی پوشیده نیست و موضوع مهم در این زمینه، توانایی تولید گاز و قابلیت زنده‌مانی مخمر و ظرفیت بهینه نگهداری آن در خمیر است که پیش‌نیازهای اصلی برای تولید موفق نان هستند. گونه‌های صنعتی ساکارومایسس سرروزیه تأثیر روشن و مهمی در مراحل صنعتی از جمله تخمیر سریع و کامل گلوکز، افزایش تولید الکل و شکل‌گیری طعم‌ها و عطرهای مدنظر، توانایی استفاده از دی‌ساکاریدها، تری‌ساکاریدها و کاهش ویژگی کف کردن دارند؛ دیگر ویژگی‌های ژنتیکی و فنوتیپی گونه‌های صنعتی ساکارومایسس سرروزیه به‌علت سازگار شدن با محیط صنعتی مانند کارخانه‌های آبمیوه‌گیری، شراب‌سازی و نانوائی‌ها و همچنین استفاده مداوم در مراحل صنعتی شکل گرفته‌اند (۸).

هزینه محیط کشت در مراحل تخمیر یکی از عوامل اصلی است که پایداری اقتصادی را تأمین می‌کند و بسیار مهم است ترکیبات محیط کشت بتوانند تمام مواد غذایی لازم برای رشد و فعالیت خوب مخمر را با هزینه کم فراهم کنند. در سال‌های اخیر، افزایش قیمت ملاس به‌طور روزافزون در کشور ملاحظه شده است که این موضوع به‌علت ظهور رقبای مصرف‌کننده ملاس و افزایش قیمت نهاده‌های اولیه در صنعت قند و شکر است. در چنین وضعیتی، خوشبختانه محصولات مشابهی در

به‌شکل منبع کربن در مسیرهای متابولیک خود استفاده می‌کند. ملاس چغندر یا نیشکر ماده اولیه و اصلی در تولید مخمر است که انتخاب آن به دو علت اصلی زیر برمی‌گردد:

۱- مخمر به‌خوبی از قند موجود در ملاس استفاده و رشد می‌کند؛

۲- استفاده از ملاس از نظر اقتصادی به‌صرفه است؛ زیرا پسایی است که بدون انجام هیچ عملیاتی از تصفیه شکر به دست می‌آید.

ملاس نیشکر محصول جانبی کارخانه تولید شکر از نیشکر است که دست کم ۴۶ درصد قند دارد و بریکس آن نباید کمتر از ۷۹/۵ درصد باشد (۴). ملاس چغندر محصول جانبی تولید شکر از چغندر است که دارای دست کم ۴۸ درصد قند و بریکس ۷۹/۵ است (۵).

مقادیر ویتامین در ملاس‌های چغندر و نیشکر در جدول ۱ آورده شده است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند فرایندهای پردازشی سبب افزایش میزان ویتامین‌های مقاوم به گرما و قلیا در ملاس نهایی می‌شوند؛ علاوه‌بر ویتامین‌های یادشده در جدول ۱، ملاس نیشکر حدود ۶۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اینوزیتول، ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیاسین و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پیریدوکسین است (۶).

جدول ۱- مقادیر ویتامین در ملاس‌های چغندر و نیشکر (۷)

ویتامین (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	ملاس چغندر	ملاس نیشکر
بیوتین	۰/۴۶	۰/۳۶
کولین	۷۱۶	۷۴۵
پنتوتینیک اسید	۷	۲۱
ریبوفلاوین	۱/۴	۱/۸
تیامین	-	۰/۹

شربت گلوکز مایعی شفاف، بی‌رنگ و شیرین است

صنعتی برای تولید مخمر نان استفاده می‌شود، ترکیبات زیر را دارد (بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب): ۰/۸ گرم $(NH_2)_2CO$ ، ۰/۰۳۵ گرم $MgSO_4$ ، ۲۰ گرم ملاس، ۰/۲۶۵ گرم $(NH_4)_2HPO_4$ ، ۰/۰۰۸ گرم $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ و ۰/۰۰۱۱ گرم بیوتین. این محیط کشت برای مقایسه با محیط‌های طراحی شده جایگزین در پژوهش حاضر استفاده شد.

سنجش فعالیت

سنجش فعالیت مخمر به سه روش زیر انجام شد:

آزمون افزایش حجم خمیر: این روش بر پایه اندازه‌گیری افزایش حجم خمیر که در مزور انجام می‌شود، بنا شده است. در تمام آزمون‌ها، خمیر به روش پیشنهاد شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۲۵۷۷ تهیه شد. خمیر به دست آمده در استوانه مدرج دهانه گشاد کاملاً صاف قرار داده شد و سطح اولیه خمیر (A_1) یادداشت شد. در مزور با ورقه پلاستیکی و کش به طور محکم بسته و مزور به مدت یک ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد؛ پس از یک ساعت، سطح خمیر (A_2) دوباره یادداشت شد. میزان افزایش حجم خمیر طبق رابطه زیر محاسبه شد (۹):

$$(A_2 - A_1) \times 100 / A_1$$

آزمون سرعت بالا آمدن: در این روش، ایجاد حباب‌های دی‌اکسید کربن درون خمیر که به سبک شدن و صعود آن به سطح آب منجر می‌شود، مبنای سنجش فعالیت مایه خمیر قرار می‌گیرد؛ به این منظور، ابتدا دمای بن ماری روی ۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و به تعداد نمونه‌ها، بشر ۲۰۰ میلی‌لیتری انتخاب و ۱۵۰ میلی‌لیتر آب معمولی درون آنها ریخته شد. بشرها درون بنماری قرار داده شدند تا آب آنها به دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد برسد و سپس خمیری که به شکل گلوله درآمده بود، درون بشر

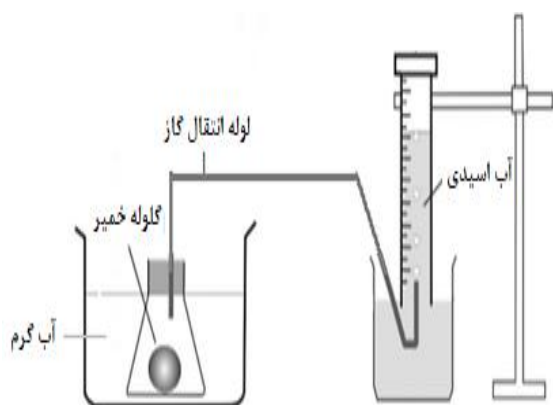
کشور وارد بازار شده‌اند که می‌توانند جایگزین ملاس پرتقاضا شوند. کارخانه‌های تولیدکننده شربت‌های گلوکز و فروکتوز که از هیدرولیز آنزیمی نشاسته به واسطه آلفا-آمیلاز و گلوکوآمیلاز برای تولید گلوکز و نهایتاً ایزومریزاسیون آن به فروکتوز به وسیله گلوکزایزومراز استفاده می‌کنند، محصولات جانبی دیگری همچون شربت گلوکز و عصاره خیسانده ذرت^۴ تولید می‌کنند که به شکل منابع کربن و نیتروژن به ترتیب جایگزین ملاس و اوره در محیط‌های کشت صنعتی مخمر نان می‌شوند؛ از این رو، در مطالعه حاضر سعی شد با بهینه‌سازی محیط کشت مخمر ساکارومایسس سروزیه، ملاس و منابع نیتروژن حذف و شربت گلوکز و عصاره خیسانده ذرت جایگزین آنها شوند.

مواد و روش‌ها

کشت و مدت نگهداری مخمر ساکارومایسس سروزیه:

در پژوهش حاضر، سویه مخمر ساکارومایسس سروزیه IZ مخصوص نانوائی از شرکت اشپیگل مایر اتریش تهیه و استفاده شد. به منظور تکثیر و نگهداری اسلنت اولیه، ابتدا مخمر مادر در شرایط استریل روی اسلنت‌های حاوی محیط کشت YPG متشکل از ۳/۵ گرم پودر پیتون، ۳ گرم عصاره مخمر، ۲ گرم KH_2PO_4 ، ۱ گرم $MgSO_4$ ، ۱ گرم $(NH_4)_2SO_4$ ، ۲۰ گرم گلوکز و ۲۵ گرم آگار به روش خطی پاساژ و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا رشد مخمر کامل شود و کلنی‌های سفید مایل به شیری ظاهر شوند. کشت‌های مخمر در محیط مایع یادشده بدون آگار و با افزودن ۲۰ درصد (v/v) گلیسرول در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت طولانی نگهداری شدند.

محیط کشت ملاس که به طور معمول در کارخانه‌های



شکل ۱- طرح سیستم اندازه‌گیری تولید گاز دی‌اکسید کربن

تعیین غلظت بهینه شربت گلوکز و عصاره خیسانده

ذرت: شربت گلوکز (منبع کربن) با دو غلظت مختلف ۱۴ و ۹۵ درصد دکستروز از کارخانه زرفروکتوز (هشتگرد، استان البرز) به عنوان جایگزین ملاس تهیه و استفاده شد. عصاره خیسانده ذرت با وزن خشک ۵۲ درصد (وزن در حجم) نیز به عنوان منبع نیتروژن و جایگزین اوره از کارخانه یادشده تهیه شد. نرم‌افزار مینی‌تب^{۱۷} برای طراحی آزمایش‌ها و تحلیل نتایج استفاده شد. ابتدا روش پلاکت برمن برای تعیین عوامل مؤثر به کار گرفته شد و دو منبع مختلف قند و یک منبع نیتروژن تشکیل‌دهنده سه متغیر مستقل بودند که با بررسی مطالعه‌های گذشته و اطلاعات موجود، دو سطح مختلف برای عوامل انتخاب شد (جدول ۲). تیمارهای طراحی شده همراه با پاسخ‌های گرفته‌شده در بخش نتایج (جدول ۴) نشان داده شده‌اند.

جدول ۲- عوامل و سطوح استفاده‌شده در طراحی آزمایش پلاکت برمن

عصاره خیسانده ذرت (میلی لیتر بر ۱۰۰ میلی لیتر)	شربت گلوکز (DE=14) (میلی لیتر بر ۱۰۰ میلی لیتر)	شربت گلوکز (DE=95) (میلی لیتر بر ۱۰۰ میلی لیتر)
۶	۱۰	۴
۱۲	۱۶	۸

یادشده و برای دستیابی به سطح بهینه دو عامل (عصاره

انداخته شد و زمان به سطح آب آمدن گلوله اندازه‌گیری شد (۹).

آزمون اندازه‌گیری میزان تولید گاز

دی‌اکسید کربن^۷: این روش بر پایه اندازه‌گیری حجم گاز دی‌اکسید کربنی که مخمر در خمیر تولید می‌کند، قرار دارد. در این آزمون نیز ابتدا دمای بنماری روی ۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم و به تعداد نمونه‌ها، ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری تهیه شد؛ سپس خمیر به شکل گلوله درآورده شد و درون ارلن انداخته شد، در ارلن با چوب پنبه به طور محکم بسته شد و ارلن درون بنماری قرار گرفت. مزور مدرج پلاستیکی که به انتهای آن شیر یا بست پلاستیکی متصل شده بود، به طور برعکس درون ظرف آب معمولی قرار داده شد و با لوله شیشه‌ای که قبلاً از وسط چوب پنبه عبور داده شده بود، بر سر ارلن قرار گرفت. شیلنگ سیلیکونی از یک سمت درون لوله شیشه‌ای قرار داده شد و از سوی دیگر درون مزور قرار گرفت (شکل ۱). میزان جابه‌جایی آب پس از ۱۲۰ دقیقه اندازه‌گیری شد.

به منظور جلوگیری از انحلال گاز دی‌اکسید کربن درون آب ظرف، اسیدیته آب با استیک اسید ۲ مولار به ۳/۵ رسانده شد (۱۰).

سنجش قند: سنجش قند محیط در تمام مراحل به روش آنزیمی کیت گلوکز اکسیداز پارس آزمون (شرکت پارس آزمون، تهران) طبق دستورعمل فروشنده انجام شد (۱۱).

پس از مشخص شدن دو عامل مؤثر از بین سه عامل

جدول ۳- طراحی آزمایش RSM با عوامل انتخاب‌شده

تیمار	عصاره خیسانده ذرت	شربت گلوکز DE=14
۱	۳/۱۷	۱۰
۲	۸	۸
۳	۸/۸۲	۱۰
۴	۶	۱۰
۵	۶	۱۲/۸۲
۶	۶	۱۰
۷	۴	۱۲
۸	۶	۷/۱۷
۹	۴	۸
۱۰	۶	۱۰
۱۱	۶	۱۰
۱۲	۸	۱۲
۱۳	۶	۱۰

خیسانده ذرت و شربت گلوکز با (DE=14)، بهینه‌سازی به روش RSM^۹ از طریق مدل CCD^{۱۰} در نرم‌افزار مینی‌تب ۱۷ انجام شد. هر عامل در پنج سطح بررسی شد که در جدول ۳ مشخص شده است.

نتایج

در نخستین بخش پژوهش حاضر تلاش شد با استفاده از روش پلاکت برمن، مؤثرترین عوامل از بین سه عامل شربت گلوکز DE=95، شربت گلوکز DE=14 و عصاره خیسانده ذرت تعیین شوند. در جدول ۲، عوامل همراه با سطوح تعیین شده در تیمارهای مختلف و نتایج آزمون‌ها بیان شده‌اند؛ با توجه به این داده‌ها می‌توان میزان تأثیر عوامل را مشخص و عوامل مؤثر را همراه با سطوح بهینه آنها برای مراحل بعدی انتخاب کرد.

جدول ۴- طراحی تیمارها و نتایج در روش پلاکت برمن

تیمارها	عوامل			پاسخها				
	عصاره خیسانده ذرت (میلی لیتر در ۱۰۰ میلی لیتر)	شربت گلوکز DE=14 (میلی لیتر در ۱۰۰ میلی لیتر)	شربت گلوکز DE=95 (میلی لیتر در ۱۰۰ میلی لیتر)	زمان بالا آمدن (دقیقه) ^۱	افزایش حجم (درصد)	میزان تولید گاز دی‌اکسید کربن (میلی لیتر در ۱۲۰ دقیقه)	اسیدیته نهایی	وزن خشک مخمر (گرم در ۱۰۰ میلی لیتر)
۱	۱۲	۱۰	-	۲۱	۲۷/۹۰	۵۵	۴/۰۶	۲/۹۴۰
۲	۱۲	-	۴	۲۳	۳۱/۷۰	۷۰	۴/۵۸	۳/۵۲۴
۳	۱۲	-	۸	۴۰	۵۵/۸۱	۴۰	۴/۳۸	۴/۳۹۲
۴	۶	-	۸	۱۵	۵۷/۱۴	۹۰	۵/۱۰	۳/۸۳۰
۵	۱۲	۱۶	-	۲۰	۴۳/۵۲	۸۵	۴/۲۰	۵/۷۸۰
۶	۶	-	۴	۱۹	۲۲/۹۸	۸۵	۵/۳۱	۴/۰۱۰
۷	۶	۱۶	-	۱۰	۴۱/۸۶	۸۵	۴/۳۶	۵/۱۴۰
۸	۶	۱۰	-	۱۱	۳۰/۲۵	۹۰	۴/۳۶	۵/۱۶۰
کنترل ^۲	(NH ₂) ₂ CO	-	ملاس	۲۵	۳۲/۱۰	۷۵	۵/۱۹	۷/۴

گرم ۰/۰۳۵ (NH₂)₂CO، گرم ۰/۰۳۵ MgSO₄.7H₂O، گرم ۰/۰۰۸ (NH₄)₂HPO₄، گرم ۰/۰۰۸ ملاس، گرم ۰/۲۶۵

هرچه گلوله خمیر زودتر بالا بیاید، فعالیت بهتر مخمر را نشان می‌دهد. ترکیب محیط کشت شاهد: ۰/۸

عصاره خیسانده ذرت در محیط کشت ملاس تأثیر چندانی بر فعالیت مخمر نداشت (P value=0.134)، اما افزودن شربت گلوکز به جای ملاس بسیار مؤثر بود (P value=0.000).

در آزمون زمان بالا آمدن، فعالیت بیشتر مخمر با تولید بیشتر گاز دی‌اکسید کربن همراه است و سبب بالا آمدن سریع تر گلوله خمیر از ته ظرف می‌شود. در این آزمون، جایگزین کردن عصاره خیسانده ذرت به جای اوره صنعتی در محیط ملاس تأثیر معناداری داشت (P value= 0.009)، اما افزودن شربت گلوکز (منبع کربن) اثر معناداری نداشت (P value=0.280).

در آزمون افزایش حجم خمیر، افزودن عصاره خیسانده ذرت به جای اوره صنعتی و شربت گلوکز به جای ملاس در محیط کشت ملاس تأثیر معناداری بر تولید گاز دی‌اکسید کربن نداشت (به ترتیب P value=0.745 و P value =0.614).

بحث و نتیجه گیری

استفاده از شربت گلوکز و عصاره خیسانده ذرت به جای ملاس و اوره سبب افزایش میزان تولید گاز دی‌اکسید کربن می‌شود. عصاره خیسانده ذرت با میزان ۴/۳۱ میلی‌لیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر و شربت گلوکز نوع A ($DE=14$) به مقدار ۱۲/۸۲ میلی‌لیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر تأثیر مثبتی در میزان تولید گاز دی‌اکسید کربن و فعالیت مخمر داشتند. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، تولید گاز دی‌اکسید کربن در آزمون اندازه‌گیری میزان تولید گاز به ۸۷/۵ درصد و در آزمون افزایش حجم خمیر به ۶۱/۷۰ درصد افزایش یافت و طی آزمون سرعت بالا آمدن خمیر، زمان به ۱۴/۳۳ دقیقه کاهش یافت؛ اما وزن خشک مخمر با جایگزین کردن عصاره

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ و ۰/۱۱ میلی‌گرم بیوتین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب. میزان قند محیط پس از کشت در تمام تیمارها برابر صفر بود.

در مرحله بعد برای رسیدن به نقطه بهینه نهایی، طراحی به روش RSM انجام شد و با توجه به نتایج مرحله پلاکت برمن و انتخاب عوامل مؤثر و سطوح نزدیک به نقطه بهینه، تمام آزمون‌ها انجام شدند که نتایج آنها در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵- عوامل منتخب در طراحی RSM همراه با نتایج آزمون‌های انجام شده

تیمارها	عوامل			پاسخها		
	عصاره خیسانده ذرت	شربت گلوکز DE=14	زمان بالا آمدن (دقیقه)	افزایش حجم (درصد)	میزان تولید گاز دی‌اکسید کربن (میلی‌لیتر در ۱۲۰ دقیقه)	وزن خشک (گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)
۱	۳/۱۷	۱۰	۲۲	۳۶/۳۶	۸۰	۴/۳۷۶
۲	۸	۸	۲۴	۴۶/۵۱	۶۵	۴/۶۴۲
۳	۸/۲	۱۰	۲۶	۳۰/۵۸	۶۰	۵/۰۰۴
۴	۶	۱۰	۱۸	۳۰/۲۳	۸۵	۴/۶۶۸
۵	۶	۱۲/۸	۲۰	۵۳/۶۵	۸۵	۵/۴۱۰
۶	۴	۱۲	۱۶	۵۹/۵۲	۹۵	۵/۴۱۶
۷	۶	۱۷/۷	۱۵	۷۲/۵۰	۸۰	۴/۲۲۲
۸	۴	۸	۲۳	۷۷/۷۷	۷۰	۵/۰۵۶
۹	۸	۱۲	۱۵	۴۳/۱۸	۸۰	۴/۳۴۷

بررسی‌ها نشان دادند در آزمون اندازه‌گیری میزان گاز دی‌اکسید کربن، جایگزین کردن عصاره خیسانده ذرت در محیط ملاس تأثیر معناداری بر فعالیت مخمر دارد (P value=0.003)، اما شربت گلوکز تأثیر چندانی بر فعالیت مخمر ندارد (P value=0.125). در آزمون سنجش وزن تر مخمر، جایگزین کردن

شد؛ از این رو، شربت گلوکز که یکی دیگر از محصولات جانبی کارخانه تولید روغن ذرت است، انتخاب شد.

در پژوهش حاضر با تحلیل‌های انجام شده توانستیم به سطح مدنظر از هر دو عامل به‌طور هم‌زمان برسیم و محیط کشت کاملی از نظر منبع کربن و نیتروژن تهیه کنیم که افزایش عملکرد و افزایش کیفیت زیست‌توده مخمر را به همراه داشته باشد.

در جدول ۶، نقطه بهینه پیشنهاد شده نرم‌افزار همراه با پیش‌بینی نتایج آزمون‌ها آمده است؛ این نقطه، سطح بهینه نهایی برای عوامل در نظر گرفته شد و تمام آزمون‌ها با محیط کشت بهینه‌شده تکرار و نتایج با محیط کشت ملاس مقایسه شدند.

خیسانده ذرت و شربت گلوکز کاهش یافت و از ۷/۴ به ۵/۴۵ (گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) رسید.

نتایج پژوهش حاضر نشان دادند عصاره خیسانده ذرت (منع نیتروژن) می‌تواند جایگزین اوره صنعتی و ملاس در محیط کشت شود. باتوجه به اینکه عصاره خیسانده ذرت ترکیبات بسیار متنوعی دارد، اضافه کردن آن به محیط کشت سبب افزوده شدن مقدار زیادی از عناصر میکرو و ویتامین‌ها به محیط می‌شود و مخمر می‌تواند این مواد را استفاده کند؛ در نتیجه، نیازی به اضافه کردن جداگانه این ترکیبات به محیط کشت مخمر وجود نخواهد داشت.

در پژوهش حاضر با حذف ملاس از محیط کشت و باتوجه به میزان قند کم موجود در عصاره خیسانده ذرت، نیاز به اضافه کردن منبع کربن به محیط کشت احساس

جدول ۶- پاسخ بهینه پیش‌بینی شده نرم‌افزار و نتایج تجربی

نتایج تجربی	نتایج پیش‌بینی شده		عوامل	
	۸۵	۹۳/۴۸	میزان تولید گاز دی‌اکسید کربن (میلی‌لیتر در ۱۲۰ دقیقه)	۱۲/۸۳
۶۱/۷۰	۶۷/۲۰	افزایش حجم خمیر (درصد)		
۱۴	۱۷/۶۱	زمان بالآمدن خمیر (دقیقه)	۴/۳۰	عصاره خیسانده ذرت

می‌توان این مواد دورریز را به مواد باارزشی تبدیل کرد که در صنایع تخمیری از جمله تولید مخمر نانویی به کار می‌روند و جایگزین مناسبی از نظر قیمت و دسترسی نسبت به ملاس به شمار می‌آیند؛ اما باید توجه داشت اگرچه کربوهیدرات‌ها یا قندها از جمله فراوان‌ترین مواد آلی روی کره زمین به‌عنوان منبع کربن هستند، محدودیت‌های استفاده از آنها برای پیش‌ماده خمیرمایه عبارتند از:

✓ اشکال مختلف کربوهیدرات‌ها (مونوساکاریدها، الیگوساکاریدها، دی‌ساکاریدها، پلی‌ساکاریدها و

بررسی نتایج نشان می‌دهد جایگزین کردن عصاره خیسانده ذرت و شربت گلوکز در محیط کشت ملاس به جای ملاس و اوره صنعتی تأثیر زیادی در تولید گاز دی‌اکسید کربن و فعالیت مخمر دارد. باتوجه به استفاده گسترده از ملاس در دیگر صنایع از جمله صنعت الکل‌کشی و محدود بودن منابع اولیه، استفاده از جایگزینی که ارزان‌تر و در منطقه در دسترس باشد، می‌تواند در راستای ارتقای رقابت صنعتی به کار گرفته شود (۱۲). ضایعات کشاورزی از جمله منابع غنی از کربوهیدراتند که چنانچه از آنها به‌درستی استفاده شود،



شکل ۲- نمودار مقایسه فعالیت مخمر تولیدشده در محیط کشت ملاس و محیط بهینه‌شده

چامپگنی^{۱۲} رشد ساکارومایسس سرورزیه را روی آب پنیر هیدرولیز شده به واسطه آنزیم مطالعه و از محلول سولفات آمونیوم و عصاره خیسانده ذرت به عنوان منابع نیتروژن برای رشد مخمر استفاده کرد. او آزمایش‌های خود را در اسیدپته‌های مختلف انجام داد و به رشد مطلوب مخمر نانوائی روی آب پنیر هیدرولیز شده با استفاده از محلول خیسانده ذرت (منبع نیتروژن) در اسیدپته ۵ تا ۶ رسید (۱۵).

اسپینگو^{۱۳} و همکاران طی پژوهشی در سال ۲۰۰۹، شربت گلوکز و عصاره خیسانده ذرت را به شکل منبعی از پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و عناصر معدنی جایگزین ملاس کردند؛ به این منظور، تخمیرهای فدیج^{۱۴} با حجم ثابت برای بررسی اثر شربت گلوکز جایگزین ملاس در غلظت‌های صفر، ۳۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد انجام شدند. نتایج با توجه به رشد زیست توده، ضریب تبدیل پیش ماده به زیست توده، بازده زیست توده به ازای نیتروژن و فسفر (به شکل P_2O_5) ارزیابی شدند. در غلظت ۱۰۰ درصد از مخلوط ملاس چغندر و نیشکر استفاده شد و عناصر

قندهای دیگر) و ضرورت تبدیل آنها به قند قابل استفاده برای مخمر؛

✓ صرفه اقتصادی جریان تبدیل و تولید قند قابل مصرف مخمر؛

✓ محدودیت‌های جمع آوری و دسترسی به منابع؛

✓ وجود عوامل بازدارنده رشد و تولید خمیرمایه (۱۳).

بنابراین بررسی جامع منابع کربوهیدراتی که دارای کمترین محدودیت استفاده باشند، اهمیت دارد.

در پژوهش حاضر تلاش شد عصاره خیسانده ذرت و شربت گلوکز به جای ملاس و اوره صنعتی در محیط کشت استفاده شود که هم صرفه اقتصادی داشته باشد و هم به علت اینکه عصاره خیسانده ذرت ماده‌ای طبیعی است، انتظار می‌رود در جایگزینی به جای اوره صنعتی در فعالیت مخمر مؤثرتر باشد.

در پژوهش حاضر، مقدار هر دو عامل با تحلیل‌های انجام شده بهینه شد و محیط کشت کاملی از نظر منبع کربن و نیتروژن تهیه شد که نه تنها افزایش عملکرد و کیفیت زیست توده مخمر را به همراه دارد، از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است.

ایجیفور^{۱۱} و همکاران مطالعاتی در زمینه کیفیت مخمر نانوائی تولید شده روی هیدرولیز نشاسته کاساوا انجام دادند. آنها نشاسته کاساوا را با استفاده از حرارت و آنزیم هیدرولیز و سپس با رشد مخمر به مدت ۲۸ ساعت، شاخص‌های سینتیک رشد آن را بررسی کردند. آنها دریافتند تفاوت معناداری بین توانایی تولید گاز توسط مخمر رشد یافته روی نشاسته کاساوا و مخمر تجاری وجود ندارد و هیدرولیز نشاسته ضایعات کاساوا جایگزین کم هزینه و مناسبی برای گلوکز در تولید مخمر نانوائی با کیفیت مطلوب است (۱۴).

References

- (1) Ali A., Shehzad A., Khan MR., Shabbir MA., Amjid MR. Yeast, its types and role in fermentation during bread making process- A. *Pakistan Journal of Food Sciences* 2012; 22(3): 171-179.
- (2) Johnson EA., Echavarri-Erasun C. Yeast biotechnology. In: Kurtzman CP., Fell JW., Boekhout T. editors. *The yeasts: A taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2011: 21-63.
- (3) Huang WC., Tang IC. Bacterial and yeast cultures-process characteristics, products, and applications. In: *Yang S-T. editor Bioprocessing for value-added products from renewable resources*. Dublin: Elsevier; 2007: 185-223.
- (4) Fishell V., Aberle E., Judge M., Perry T. Palatability and muscle properties of beef as influenced by preslaughter growth rate. *Journal of Animal Science* 1985; 61(1): 151-157.
- (5) Gulshan A. *Bioethanol and recombinant proteins production from milk whey and molasses*. Spain: Universidade da Coruña; 2014.
- (6) Elshreef AY. Effect of molasses levels source of energy on broiler performance. Sudan: University of Science and Technology; 2005.
- (7) Curtin LV. Molasses-general considerations. *Molasses in Animal Nutrition* 1983: 1-10.
- (8) ISIRI 2577: 1998, Revision 2nd 2003. Baker's yeast -Specifications and test methods.
- (9) Peighambardoust S., Fallah E., Hamer R., Van der Goot A. Aeration of bread dough influenced by different way of processing. *Journal of cereal science* 2010; 51(1): 89-95.
- (10) Visvanathan R., Jayathilake C., Liyanage R. A simple microplate-based method for the determination of α -amylase activity using the glucose assay kit (GOD method). *Food Chemistry* 2016; 211: 853-859.

نیترورژن، فسفر، بیوتین، تیامین، اینوزیتول، تیکوتینیک اسید، پیروودوکسین و روی با افزودن عصاره خیسانده ذرت و احتساب ترکیبات آنها اضافه شدند. ارزیابی تأثیر قند ملاس که با شربت گلوکز جایگزین شده بود به اضافه عصاره خیسانده ذرت نشان داد محیط کشتی که حاوی ملاس با غلظت ۶۰ درصد باشد، به کاهش محتوای نیترورژن زیست توده منجر می شود و در محیط کشتی که شربت گلوکز و عصاره خیسانده ذرت موجود باشد، میزان و کیفیت زیست توده به دست آمده تقریباً مانند زیست توده حاصل از ملاس است. هنگامی که شربت گلوکز به طور کامل جایگزین شد و با اضافه کردن عصاره خیسانده ذرت، محیط کشت کامل و عملکرد زیست توده بیشتری مشاهده شد (۱۶). نتایج یاد شده یافته‌های پژوهش حاضر را تأیید می کنند.

سپاسگزاری

انجام پژوهش حاضر مدیون پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌ها برای در اختیار گذاردن امکانات آزمایشگاهی و همکاران آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی به ویژه سرکار خانم اصفهانی بلندبالایی است؛ همچنین از شرکت زرفروکتوز به ویژه سرکار خانم مهندس غلامی برای تأمین شربت‌های گلوکز و عصاره خیسانده ذرت سپاسگزاری می شود.

- (11) Keturah I., Sandrasegarampillai B., Arasaratnam V. Baker's yeast biomass production with rice as carbon and soy meal as nitrogen sources. *Malaysian Journal of Microbiology* 2014; 10(3): 205-214.
- (12) Pagani MA., Bottega G., Mariotti M. Technology of baked goods. In: Gobetti M., Gänzle M. editors. *Handbook on sourdough biotechnology*. Boston, MA: Springer; 2013: 47-83.
- (13) Ejiofor AO., Chisti Y., Moo-Young M. Culture of *Saccharomyces cerevisiae* on hydrolyzed waste cassava starch for production of baking-quality yeast. *Enzyme and Microbial Technology* 1996; 18(7): 519-525.
- (14) Champagne C., Goulet J., Lachance R. Production of bakers' yeast in cheese whey ultrafiltrate. *Applied and Environmental Microbiology* 1990; 56(2): 425-430.
- (15) Spigno G., Fumi M., De Faveri D. Glucose syrup and corn steep liquor as alternative to molasses substrates for production of baking-quality yeast. *Chemical Engineering Transactions* 2009; 17: 843-848.
- (16) Marsden WL., Gray PP., Nippard GJ., Quinlan MR. Evaluation of the DNS method for analysing lignocellulosic hydrolysates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1982; 32(7-12): 10-16.

¹- *Saccharomyces cerevisiae*

²- Dry substance

³- Dextrose equivalent

⁴- Corn steep liquor (CSL)

⁵- Rising power

⁶- Rising time

⁷- Liquid displacement

⁸- Minitab Inc. USA

⁹- Response surface methodology

¹⁰- Central Composite Design

¹¹- Ejiofor

¹²- Champagne

¹³- Spigno

¹⁴- Fed-batch