بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی – میکروبیولوژی

جداسازی و شناسایی مخمرهای تولید کننده اسید سیتریک ازمنابع متفاوت

استادان راهنما:

دکتر ایرج نحوی

دکتر گیتی امتیازی

پژوهشگر:

مریم السادات میرباقری

اسفندماه ۱۳۸۸

شیوه نگارش پایان نامه
رعایت شده است.
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی- میکروبیولوژی

خانم مریم السادات میرباقری تحت عنوان

جداسازی و شناسایی مخمرهای تولید کننده اسید سیتریک ازمنابع متفاوت

در تاریخ ۱۳۸۸/۱۲/۱۹ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر ایرج نحوی با مرتبه ی علمی استاد امضا

۲- استاد راهنمای پایان نامه دکتر گیتی امتیازی با مرتبه ی علمی استاد امضا

۳- استاد داور داخل گروه دکتر زهرا اعتمادی فر با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۴- استاد داور خارج از گروه دکتر محسن مبینی دهکردی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

امضای مدیر گروه

گروه زیست شناسی Department Of Biology 1995

پروردگارا !

ای هستی بخش وجود، ای که نعمت بودن، زیستن، آموختن و محبت کردن را به من ارزانی داشتی؛ مرا بر نعمات بیکرانت توان شکر نیست و ذره ذره وجودم برای تو می تپد.

الهی !

مرا مدد کن تا دانش اندکم، نه نردبانی برای فزونی غرور و نه حلقه‌ای برای اسارت و نه دست مایه‌ای برای تجارت، بلکه گامی باشد برای تجلیل از تو و متعالی ساختن زندگی خود و دیگران.

بر خود لازم می دانم تا از زحمات اساتید راهنمای گرانقدرم

جناب آقای دکتر ایرج نحوی استاد بزرگی که اندیشیدن می آموزد، انسان توانمندی که سرتاسر وجودشان مملو ازاحترام، نظم، محبت، سخاوت، پشتکار و ممارست است.

و **سرکارخانم دکتر گیتی امتیازی** استاد با محبتی که به من تلاش و علم آموزی، حقیقت بینی و زندگی آموختند.

بسیار قدردانی نمایم. این دو استاد بزرگوار نه تنها افتخار گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان بلکه افتخار میکروبیولوژی ایرانند و برای من همین بس که توفیق شاگردی ایشان را داشتم.

بهترین درودها و سلام‌هایم را تقدیم می‌دارم به **پدر** زحمتکش ، عزیز و بزرگوارم و **مادر** فداکار، پر عاطفه و صمیمی‌ام، آنها که هر آنچه من امروز دارم مدیون تلاش های دیروز آن‌هاست.

از **همسر** همدل و همراهم ، او که نویدبخش آینده‌ای روشن برایم بوده و هست به واسطه همه محبت‌ها و همیاری‌ها و صبوری‌هایش نهایت سپاسگزاری را دارم.

دستان پر مهر **برادران و خواهران** مهربان و خوبم و دیگر اعضای خانواده‌ام، مشوقین و حامیان من در طول مسیر تحصیل و زندگی را به گرمی می‌فشارم و همواره برایشان بهترین‌ها را از خداوند منان آرزومندم.

از اساتید بزرگوارم جناب آقای دکتر مبینی و سرکار خانم دکتر اعتمادی فر که قبول زحمت نموده و داوری خارج وداخل این پایان نامه را بر عهده گرفتند صمیمانه سپاسگزارم و از سرکار خانم دکتررضایی ناظر محترم تحصیلات تکمیلی نهایت تشکر را دارم.

در طول دوران کارشناسی و کارشناسی ارشد از محضر اساتید بزرگواری همچون آقای دکتر نحوی، خانم دکتر کرمانشاهی، خانم دکتر امتیازی، آقای دکترگلبانگ، آقای دکتر روغنیان،آقای دکتر بوذری، آقای دکتر زرکش اصفهانی، آقای دکتر ربانی،دکتر مبینی و سرکار خانم دکتر اعتمادی‌فر بهره‌های فراوان گرفتم، همواره برایشان سلامتی و موفقیت را آرزو دارم. همچنین از کارشناسان آزمایشگاه جناب آقای دباغ، سرکار خانم حکمیان و سرکار خانم عباسی به واسطه کمک‌هاشان بسیار متشکرم.

لازم می‌دانم از دو همکار پایان نامه‌ام جناب آقای دکتر درویشی انسان با اخلاقی که همچون مشاوری دلسوز در تمام لحظات پایان نامه مرا همراهی نمودند و سرکار خانم لادن مفاخر دوست با محبتی که با همیاری‌ها و دلگرمی‌هایش همواره در سختی‌های دوران پایان نامه گره‌گشایم بود، بسی قدردانی نمایم.

از دانشجویان دکترا آقایان آشنگرف، شاکری، قزل باش و خانم‌ها حسین خانی و میرحسینی که همیشه با رویی گشاده، تجربیات دوران کار و تحصیلشان را در اختیار ما قرار دادند همواره سپاسگزارم.

بهترین دوران تحصیلم در کنار دوستان صمیمی و همکلاسان عزیزم خانم‌ها مفاخر، رهبری، خدابخش، حسینی،کریمی، قربانی، شاهرخ، رضایی، مستاجران، مرادی، جعفری و حیدری و آقایان کمیجانی، گلابی و ضیایی رقم خورد، انشاءا... همیشه شاد و موفق باشند.

تقدیم به

عزیزان زندگی‌ام

پدر و مادر با محبت، دلسوز و صمیمی ام

آن‌ها که مفهوم زیستن را با ایثار و محبتشان معنا می کنند.

همسر مهربان ، همدل و همراهم

اوکه وجودش آرامش و بودنش امید زندگی است.

چکیده:

اسید سیتریک، یک محصول صنعتی با کاربرد بسیارگسترده است.. به واسطه انحلال پذیری بالا در آب، طعم ترش مطبوع، خاصیت سمی بسیار کم و جذب آسان، خواص بافری و همچنین شرکت در سنتزهای شیمیایی در صنایع غذایی، داروسازی ، آرایشی و بهداشتی و دیگر صنایع کاربرد فراوانی دارد. پیش بینی می‌شد تولید جهانی اسید سیتریک در سال ۲۰۰۹ به بیش از ۲ میلیون تن برسد.

تا حدود سال ۱۹۶۵آسپرژیلوس نایژر تنها ارگانیسم انحصاری برای تولید اسید سیتریک بود اما از آن سال به بعد با شناخت مخمرهای تولید کننده این اسید؛ مطالعه بر روی آن‌ها در جهت تولید اسید سیتریک افزایش چشمگیری داشته است. استفاده از آسپرژیلوس نایژر برای تولید اسید سیتریک با مشکلات محیطی بسیاری همراه است و ضمناً پساب‌هایی با میزان بالای فلزات سنگین را ایجاد می‌نماید. مزیت مخمرها نسبت به قارچ‌های کپکی رشد بر روی انواع سوبستراهای ارزان‌قیمت و قابل دسترس از جمله هیدروکربن‌ها وترکیبات نفتی است. از دیگر مزایای مخمرها این است که می‌توانند مقادیر بالای قند را تحمل کنند و در نتیجه تغییرات ترکیب محیط کشت در مورد آن‌ها راحت‌تر صورت می‌گیرد. علاوه بر آن ، حساسیت کم آنها به یون‌های فلزات موجود در مواد اولیه خام، باعث شده که تیمار اولیه مخمرها جهت تولید خیلی هزینه زا نباشد.

این تحقیق برای نخستین بار جداسازی مخمرها را با هدف تولید اسید سیتریک مورد بررسی قرار می‌دهد. از آن‌جا که اسید سیتریک در طی سیکل کربس در هر موجود زنده‌ای تولید می‌شود در نتیجه نمی‌توان برای جداسازی سویه‌های تولید کننده آن، منبع مشخص و معینی را ذکر نمود؛ بنابر این جداسازی مخمرهای یاروویا لیپولیتیکا به عنوان بهترین مخمرهای تولید کننده اسید سیتریک، از منابع متفاوت لبنی و گوشتی در اولویت کار قرار گرفت.

بعد از نمونه گیری از کارخانه شیر پگاه و شرکت فراورده‌های پروتئینی راک اصفهان و جمع‌آوری نمونه‌های مختلف دیگر، جداسازی بیش از ۳۴۰ سویه مخمر بر روی محیط‌های اختصاصی صورت گرفت و سپس غربالگری اولیه بر روی محیط حاوی برموکروزول ارغوانی ، انجام پذیرفت . در نهایت ۱۲ سویه که بهترین قطر هاله را به کلنی داشتند؛ غربالگری شدند. آزمایش‌ها در محیط تولید در شرایط کشت بسته(منقطع) ادامه یافت و بررسی میزان تولید اسید سیتریک از طریق روش کالریمتریک و همچنین روش آنزیمی با کیت، در طول زمان ۱۹۲ ساعت هر ۲۴ ساعت یک بار انجام شد و بهترین زمان تولید ساعت ۱۴۴ تعیین گردید. در پایان از بین سویه‌های غربال شده سویه‌ای از ناگت مرغ به دست آمد که با بازده g_{cit}/g_{glc} ۰/۵۵ به عنوان یکی از بهترین سویه‌های وحشی تا به امروز شناخته شده در تولید اسید سیتریک معرفی می‌شود. با بررسی تست‌های بیوشیمیایی و استفاده از روش مولکولی PCR، این سویه مورد شناسایی قرار گرفته و از انواع یاروویا لیپولیتیکا شناخته شد. لازم به ذکر است در طول مراحل کار از یک سویه استاندارد خوب تولید کننده اسیدسیتریک *Yarrowia*

Yarrowia lipolytica M7 نیز بهره گرفته شد و سویه جداشده *lipolytica* DSM3286 از نظر بازده تولید اسید سیتریک و وزن خشک به دست آمده در ساعت اوج تولید از این سویه نیز برتر بود.

با بهینه سازی‌های انجام شده مشخص شد در غلظت‌های بالای گلوکز در کشت بسته، تولید در هر دو سویه پایین می‌آید و بهترین غلظت تولید اسید در سویه M7 حدود ۱۰ درصد و در DSM3286 حدود ۵ درصد تعیین شد؛ ضمن اینکه از بین انواع منابع کربن مورد آزمایش، بازده تولید اسید در M7 و DSM3286 به ترتیب در روغن زیتون حدود g/g ۰/۶۲ و g/g ۰/۳۵ و در گلیسرول به ترتیب g/g ۰/۲۷ وg/g ۰/۲۳ به دست آمد. نتایج این تحقیق نشان داد کاهش غلظت نیتروژن باعث بالارفتن معنادار تولید اسید سیتریک می‌گردد و نسبت C/N در تولید اسید سیتریک توسط مخمرها از فاکتورهای بسیار مهم است. بهترین منبع نیتروژن آلی در سویه M7 سویا و در مورد DSM3286 عصاره مخمر شناخته شد و بهترین pH برای شروع تولید، حدود ۶/۵ به دست آمد.

نکته مهمی که در نتیجه این تحقیق برای اولین بار به آن پی برده شد این بود که افزودن موادی مانند سورفکتانت‌ها که نفوذپذیری غشاء را در نیمه رشد لگاریتمی تحت تأثیر قرار می‌دهند، مانند تریتون۱۰۰- X با غلظت ۲ درصد می‌تواند بازده تولید اسید سیتریک را تا حدود ۱/۵ برابر افزایش دهد. استفاده از ویسکوزکننده‌های مختلف نیز آشکار ساخت غلظت‌های خاص از بعضی مواد مثل آگار، پلی اتیلین گلیکول وCMC بسته به نوع سویه می‌تواند بازده تولید اسید سیتریک را به طور چشمگیر و معناداری افزایش دهد.

جداسازی سویه‌های مناسب جهت کارهای میکروبیولوژی صنعتی و بیوتکنولوژی اولین گام در شروع یک تحقیق بنیادی و کاربردی است، از آن‌جا که این سویه از انواع یاروویا لیپولیتیکا شناخته شد که از جمله مخمرهای غیر معمول با قابلیت‌های بسیار بالاهستند، می‌توان بر روی توانمندی‌های احتمالی دیگر آن مانند تولید آنزیم‌ها ، اسیدها و متابولیت‌های دیگر و همچنین تولید بیوسورفکتانت و توانایی حذف فلزات و آلودگی‌های نفتی و ... از پساب‌ها و نیز قابلیت استفاده از آن به عنوان کواستارتر در پنیر سازی تحقیقات مناسب و هدفمندی را انجام داد.

کلمات کلیدی: مخمر، اسید سیتریک، جداسازی و شناسایی، یاروویا لیپولیتیکا، بهینه سازی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱ مقدمه ۱

۱-۲ مخمرها ۲

۱-۲-۱ اکولوژی مخمرها..... ۲

۱-۲-۲ اهمیت مخمرها در زندگی بشر..... ۳

۱-۳ تولید اسیدهای آلی به وسیله مخمرها..... ۵

۱-۳-۱ اسید استیک..... ۵

۱-۳-۲ اسید آسکوربیک..... ۶

۱-۳-۳ اسید سوکسینیک ۶

۱-۴ اسید سیتریک..... ۷

۱-۴-۱ تاریخچه ۷

۱-۴-۲ تولید جهانی اسید سیتریک..... ۸

۱-۴-۳ تولید اسید سیتریک در ایران..... ۱۰

۱-۴-۴ خواص اسید سیتریک..... ۱۰

۱-۴-۵ کاربرد اسید سیتریک..... ۱۳

۱-۴-۵-۱ کاربرد در صنایع غذایی..... ۱۳

۱-۴-۵-۱-۱ کاربرد اسید سیتریک در تولید غذاها و میوه جات منجمد..... ۱۳

۱-۴-۵-۲ کاربرد در صنایع دارویی و آرایشی..... ۱۴

۱-۴-۵-۳ کاربرد در صنایع دیگر..... ۱۴

۱-۴-۶ فراوانی اسید سیتریک..... ۱۵

۱-۴-۷ بیو شیمی تولید اسید سیتریک..... ۱۶

۱-۴-۸ میکروارگانیسم‌های تولید کننده اسید سیتریک..... ۱۸

۱-۴-۸-۱ قارچ‌ها..... ۱۹

عنوان **صفحه**

۱-۴-۸-۱-۱ آسپرژیلوس نایژر ۲۰
۱-۴-۸-۲ مخمرها ۲۰
۱-۴-۸-۲-۱ یاروویا لیپولیتیکا ۲۱
۱-۴-۸-۲-۱-۱ جذب منابع کربن ۲۲
۱-۴-۸-۲-۱-۲ تجزیه اسیدهای چرب و استفاده از آن‌ها ۲۲
۱-۴-۸-۲-۱-۳ جذب الکل‌ها ۲۳
۱-۴-۸-۲-۱-۴ جذب استات ۲۳
۱-۴-۸-۲-۱-۵ کاربردهای بیوتکنولوژیکی مخمر یاروویا لیپولیتیکا ۲۴
۱-۴-۸-۲-۱-۶ تولید اسیدهای آلی ۲۵
۱-۴-۹ روش تولید اسید سیتریک به وسیله آسپرژیلوس نایژر ۲۵
۱-۴-۱۰ روش تولید اسید سیتریک به وسیله مخمرها ۲۷
۱-۴-۱۱ مرحله استخراج، تخلیص و کریستالیزاسیون ۲۷
۱-۵ اسید گلوکونیک ۲۹
۱-۵-۱ کاربرد اسید گلوکونیک ۳۰
۱-۵-۲ میکروارگانیسم‌های تولید کننده اسید گلوکونیک ۳۱
۱-۵-۳ اسید گلوکونیک و آنزیم بتاگلوکوزیداز ۳۱

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ مواد و وسایل مورد استفاده ۳۳
۲-۱-۱ وسایل و دستگاه‌ها ۳۳
۲-۱-۲ مواد مورد استفاده ۳۵
۲-۲ روش تهیه برخی از محیط‌های کشت ۳۷
۲-۲-۱ آب پپتونه ۳۸
۲-۲-۲ محیط کشت ییست گلوکز کلرامفنیکل آگار ۳۸
۲-۲-۳ محیط کشت YPD ۳۸

عنوان **صفحه**

۲-۲-۴ محیط کشت غربالگری اولیه ۳۸
۲-۲-۵ محیط کشت تولید اسید سیتریک ۳۹
۲-۲-۶ محیط کشت شناسایی جذب قندها توسط مخمرها ۴۰
۲-۲-۷ محیط کشت شناسایی تست‌های تخمیری هیدرات کربن ۴۱
۲-۳ جداسازی ۴۲
۲-۳-۱ نمونه گیری ۴۲
۲-۳-۲ روش جداسازی ۴۳
۲-۳-۳ خالص سازی و نگهداری مخمرها ۴۴
۲-۴ غربالگری اولیه ۴۴
۲-۵ تلقیح اولیه ۴۴
۲-۶ تولید اسید سیتریک ۴۴
۲-۷ بررسی میزان تولید اسید سیتریک با روش کالریمتریک ۴۵
۲-۸ ترسیم منحنی استاندارد اسید سیتریک ۴۶
۲-۹ شناسایی اسید سیتریک با روش آنزیمی ۴۸
۲-۹-۱ شیوه استفاده از کیت ۴۹
۲-۹-۲ اندازه گیری اسید سیتریک نمونه ها ۴۹
۲-۹-۳ محاسبات ۵۰
۲-۱۰ روش اندازه گیری بیومس سلولی ۵۱
۲-۱۱ اندازه گیری pH ۵۱
۲-۱۲ بررسی میزان گلوکز از روش آنزیمی ۵۲
۲-۱۳ رسم منحنی رشد مخمرها در محیط تولید ۵۳
۲-۱۴ بهینه سازی ۵۳
۲-۱۴-۱ تغییر غلظت گلوکز ۵۳
۲-۱۴-۲ تغییر نوع منبع کربن محیط تولید اسید سیتریک ۵۴

عنوان **صفحه**

۲-۱۴-۳ تغییر غلظت $(NH_4)_2So_4$ ۵۴
۲-۱۴-۴ تغییر منبع نیتروژن آلی ۵۴
۲-۱۴-۵ تغییر pH اولیه ۵۵
۲-۱۴-۶ بررسی اثر سورفکتانت بر تولید اسید سیتریک ۵۵
۲-۱۴-۷ اثر مواد ویسکوزکننده بر تولید اسید سیتریک توسط مخمرها ۵۶
۲-۱۴-۸ کشت توام مخمرها ۵۷
۲-۱۴-۹ اثر هورمون اندول استیک اسید ۵۷
۲-۱۵ شناسایی دیگر اسیدهای آلی تولید شده به وسیله مخمرها ۵۷
۲-۱۵-۱ محلول‌های مورد استفاده ۵۸
۲-۱۵-۲ رسم منحنی استانداردگلوکز ۵۸
۲-۱۵-۳ روش بررسی آنزیم بتاگلوکوزیداز ۵۹
۲-۱۶ روش شناسایی مخمرها ۶۰
۲-۱۶-۱ انجام آزمایش جذب قندها ۶۱
۲-۱۶-۲ انجام آزمایش‌های تخمیر هیدرات کربن ۶۲
۲-۱۶-۳ بررسی توانایی جذب برخی دیگر از منابع کربن ۶۳
۲-۱۷ شناسایی با استفاده از روش مولکولی PCR ۶۳
۲-۱۷-۱ استخراج DNA ۶۴
۲-۱۷-۲ بافر لیزکننده ۶۶
۲-۱۷-۳ بافر TE ۶۶
۲-۱۷-۴ روش انجام PCR ۶۷
۲-۱۷-۵ فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل ۶۷
۲-۱۷-۶ الکتروفورز ۶۸
۲-۱۷-۷ روش کار الکتروفورز ۶۸
۲-۱۸ آنالیز آماری و رسم نمودارها ۷۰

عنوان **صفحه**

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۳-۱ جداسازی مخمرها ۷۱

۳-۲ خالص سازی و نگهداری ۷۵

۳-۳ غربالگری اولیه ۷۵

۳-۴ تلقیح اولیه ۷۸

۳-۵ تولید اسید سیتریک ۸۰

۳-۵-۱ تولید اسید سیتریک در طول زمان ۸۱

۳-۵-۲ مقایسه تولید اسید سیتریک در ساعت ۱۴۴ ۸۲

۳-۶اندازه گیری وزن خشک سلولی در طول زمان ۸۴

۳-۷ بررسی تغییرات گلوکز در طی روند تولید اسید سیتریک ۸۶

۳-۸ بررسی تغییرات pH در طی روند تولید اسید سیتریک ۸۶

۳-۹ تغییرات مرفولوژی سویه استاندارد و M7 در محیط تولید ۸۸

۳-۱۰ منحنی رشد ۸۹

۳-۱۱ بهینه سازی ۹۰

۳-۱۱-۱تغییر غلظت گلوکز ۹۰

۳-۱۱-۲ تغییر نوع منبع کربن محیط تولید اسید سیتریک ۹۱

۳-۱۱-۳ تغییر غلظت $(NH_4)_2So_4$ ۹۲

۳-۱۱-۴ تغییر منبع نیتروژن آلی ۹۳

۳-۱۱-۵ تغییرpH اولیه ۹۴

۳-۱۱-۶ بررسی اثر سورفکتانت بر تولید اسید سیتریک ۹۵

۳-۱۱-۷ اثر مواد ویسکوزکننده بر تولید اسید سیتریک توسط مخمرها ۹۹

۳-۱۱ -۸ اثر هورمون اندول استیک اسید ۱۰۲

۳-۱۱-۹ کشت توام مخمرها ۱۰۲

۳-۱۲ بررسی بتاگلوکوزیداز ۱۰۴

عنوان **صفحه**

۳-۱۳شناسایی مخمرها..... ۱۰۵

۳-۱۳-۱ تست های بیوشیمیایی..... ۱۰۵

۳-۱۴ نتایج آزمایشات مولکولی شناسایی مخمرها..... ۱۰۷

۳-۱۵ تعیین توالی ژن۱۸ S rDNA..... ۱۱۰

۳-۱۶ درخت فیلوژنی..... ۱۱۲

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱ جداسازی..... ۱۱۳

۴-۲ سنجش اسید سیتریک..... ۱۱۷

۴-۳ بررسی بتاگلوکوزیداز..... ۱۲۰

۴-۴ بهینه سازی تولید اسید سیتریک..... ۱۲۱

۴-۵ تاثیر ویسکوزکننده ها بر تولید اسید سیتریک..... ۱۲۵

۴-۶ تاثیر سورفکتانت‌ها بر تولید اسید سیتریک..... ۱۲۶

نتیجه‌گیری کلی ۱۲۹

پیشنهادات ۱۳۰

منابع و مآخذ ۱۳۱

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

فصل اول

شکل۱-۱: مصرف جهانی اسید سیتریک در سال ۲۰۰۹.....۹
شکل۱-۲: ساختار اسید سیتریک.....۱۱
شکل ۱-۳ : چرخه اسید سیتریک یا سیکل کربس.....۱۷
شکل۱-۴ : ساختار اسید گلوکونیک.....۲۹
شکل۱-۵: میزان مصرف جهانی اسیدگلوکونیک در سال ۲۰۰۴ بر طبق گزارشBCC.....۴۶

فصل دوم

شکل ۲-۱: بررسی λMax اسید سیتریک در طول موج ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومترتوسط اسپکتروفوتومتر.....۴۷
شکل۲-۲: نمودار استاندارد اسیدسیتریک در طول موج ۴۲۸ نانومتر.....۴۹
شکل۲-۳: لوله‌های آزمایش حاوی غلظت‌های مختلف اسید سیتریک و معرف‌ها جهت ترسیم منحنی استاندارد
شکل۲-۴: منحنی استاندارد گلوکز ترسیم شده بر اساس روش مندل و وبر.....۵۹

فصل سوم

شکل۳-۱: جداسازی مخمرها بر روی محیط YGCA.....۷۱
شکل۳-۲: انواع مورفولوژی میکروسکوپی مخمرهای جداسازی شده بر روی محیطYGCA.....۷۴
شکل۳-۳: خالص‌سازی مخمرها بر روی YPD پس از ۴۸ ساعت.....۷۵
شکل۳-۴: هاله‌های زرد رنگ ایجاد شده در اطراف مخمرهای تولید کننده اسید در محیط غربالگری اولیه حاوی برموکروزول ارغوانی.....۷۷
شکل۳-۵: محیط غربالگری اولیه به صورت براث.....۷۸
شکل۳-۶: کشت ۲۴ ساعته از از مخمرها در محیط YPDبراث جهت تلقیح اولیه.....۷۸
شکل۳-۷: مقایسه مورفولوژی در محیط YPDجامد.....۸۰
شکل۳-۸: تولید اسید سیتریک در مخمرهای غربال شده درطی زمان(ساعت)با روش کالریمتریک.....۸۱
شکل۳-۹: تولید اسید سیتریک در مخمرهای غربال شده درطی زمان(ساعت) با روش آنزیمی ۸۱

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱۰: محیط تولید اسید سیتریک در شرایط کشت بسته در ساعت ۱۴۴.....۸۲
شکل۳-۱۱: مقایسه تولید اسید سیتریک(g/l) در ساعت ۱۴۴ (اوج تولید).....۸۳
شکل۳-۱۲: بررسی تولید وزن خشک سلولی در طول زمان در سویه‌های جداسازی شده از مواد پروتئینی و گوشتی مختلف و از منابع دیگر.....۸۵
شکل ۳-۱۳: مقایسه روند تغییر گلوکز (منبع کربن) در طی تولید اسید سیتریک و وزن خشک سلولی در سویه استاندارد و M7 در طول زمان.....۸۷
شکل ۳-۱۴: تغییرات pH محیط تولید اسید سیتریک در طی زمان.....۸۸
شکل ۳-۱۵: بررسی شکل میکروسکوپی مخمرها با رنگ آمیزی ساده در محیط تولید اسید سیتریک.....۸۹
شکل۳-۱۶: منحنی رشد بهترین سویه‌های تولید کننده اسید سیتریک در محیط تولید هر ۴ ساعت یک‌بار.....۹۰
شکل۳-۱۷: بررسی تولید اسید سیتریک در غلظت‌های متفاوت گلوکز در دو سویه استانداردDSM3286 و M7 در ساعت ۱۴۴.....۹۱
شکل ۳-۱۸: تأثیر منابع کربنی مختلف با غلظت ۱۰ درصد بر تولید سیتریک اسید در دو سویه M7 وDSM3286.....۹۲
شکل۳-۱۹: اثر تغییر غلظت منبع نیتروژن $(NH_4)_2SO_4$) محیط کشت بر تولید اسید سیتریک توسط سویه استاندارد DSM3286 و سویه جداسازی شده M7.....۹۳
شکل ۳-۲۰: تأثیر منابع نیتروژنی مختلف بر تولید اسید سیتریک در سویه استاندارد و M7.....۹۴
شکل۳-۲۱: تأثیر pH اولیه بر تولید اسید سیتریک توسط سویه جداسازی شده M7 و سویه استاندارد DSM3286.....۹۵
شکل ۳- ۲۲ : بررسی چگونگی اثرسورفکتانت (دترجنت)ها با غلظت ۰/۵ درصد بر تولید اسید سیتریک نسبت به شاهد فاقد سورفکتانت در دو سویه استاندارد و M7.....۹۶
شکل ۳-۲۳ : بررسی تغییر غلظت تریتون $X-۱۰۰$ بر تولید اسید سیتریک در ساعت ۱۴۴.....۹۷
شکل۳- ۲۴ : مقایسه مورفولوژی میکروسکوپی در محیط تولید سیتریک اسید در ساعت ۱۴۴.....۹۸
شکل۳- ۲۵: تأثیرمواد ویسکوز کننده مختلف بر میزان تولید اسید سیتریک در ساعت ۱۴۴ نسبت به کنترل فاقداین مواد در سویه استانداردDSM3286 و مخمر جداسازی شده M7.....۱۰۰
شکل۳-۲۶: بررسی اثر هورمون اندول استیک اسید(۰/۵ میلی مولار) بر تولید اسید سیتریک.....۱۰۲

عنوان **صفحه**

شکل۳- ۲۷: اندازه گیری وزن خشک و تولید اسید سیتریک در استفاده توأم دو سویه DSM3286 و M7 نسبت به هر کدام از سویه‌ها به طور مجزا در ساعت ۱۴۴.....۱۰۳
شکل۳-۲۸ : شکل میکروسکوپی از کشت توأم مخمرها در محیط تولید اسید.....۱۰۴
شکل۳-۲۹: تکثیر ژنrDNA ۱۸S سویه های مخمری با روش PCR و تشکیل محصولbp ۳۵۰.....۱۰۹
شکل ۳-۳۰: تعیین توالی ژنrDNA ۱۸Sبا استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS2.....۱۱۰
شکل ۳-۳۱: نتیجه قسمتی ازBLAST توالی ژنrDNA ۱۸S با سویه جداسازی شده M7 با توالی های موجود دربانک ژنی NCBI ۱۱۱
شکل۳-۳۲: درخت فیلوژنی ترسیم شده با استفاده از نرم افزار Mega4.....۱۱۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

فصل اول

جدول۱-۱ : ویژگی‌های مورد استفاده درتقسیم‌بندی گونه‌های مخمری و تشخیص سویه‌ها.....۳
جدول۱-۲: بررسی خواص فیزیکی اسید سیتریک ۱۱

فصل دوم

جدول۲-۱: تعدادی از وسایل به کار برده شده در تحقیق.....۳۴
جدول۲-۲:ترکیبات محیط کشت غربالگری اولیه.....۳۸
جدول۲-۳: ترکیبات محیط تولید اسیدسیتریک.....۳۹
جدول ۲-۴: مخلوط مواد برای تعیین A1.....۴۹
جدول ۲-۵: ترکیب مواد جهت تعیین گلوکز ۵۴
جدول۲-۶: بیو سورفکتانت‌های مورد استفاده و غلظت آن.....۵۵
جدول۲-۷: انواع ویسکوز کننده‌های مورد استفاده و غلظت آنها.....۵۶
جدول۲-۸: پرایمرهای تشخیص توالی ۱۸S rDNA برای سویه جداسازی شده M7 و سویه استاندارد DSM3286.....۶۴
جدول۲-۹ : مخلوط PCR مورد استفاده برای تکثیر DNA مخمرها.....۶۷

فصل سوم

جدول۳-۱: تعداد انوا ع سویه‌های مخمرجداشده از لبنیات مختلف.....۷۲
جدول۳-۲: انواع مخمرهای جداسازی شده از فراورده‌های پروتئینی متفاوت.....۷۳
جدول۳-۳: نسبت قطر هاله به کلنی در تعدادی از مخمرهای جداسازی شده در محیط غربالگری اولیه.....۷۶
جدول۳-۴: ماکزیمم کدورت نمونه‌های مخمر غربال شده بعد از ۲۴ ساعت رشد در محیطYPD براث ۷۹
جدول ۳-۵: بررسی تولید اسید سیتریک(g/l)، وزن خشک(g/l) و بازده تولید اسید سیتریک(g/g) در ساعت ۱۴۴.....۸۴

عنوان **صفحه**

جدول۳-۶ : نتایج مربوط به بررسی وزن خشک و Yield در طی تغییر غلظت تریتون۱۰۰ − X در دوسویه استانداردDSM3286 و M7 در ساعت ۱۴۴.....۹۸

جدول۳- ۷ : مقایسه وزن خشک(بیومس)و Yield در ساعت ۱۴۴ برای سویه استاندارد DSM3286 و سویه جداسازی شده M7 در حضور و عدم حضور مواد ویسکوزکننده.....۱۰۱

جدول ۳-۸: مقایسه تولید بتاگلوکوزیداز و وزن خشک سلولی در دو سویه آئروبازیدیوم پلولانس و M382 در ساعت.....۱۰۵

جدول۳-۹: مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی سویه‌های مخمری استاندارد و جداسازی شده.....۱۰۶

جدول۳- ۱۰ :نتایج تست تخمیر هیدرات‌های کربن در سویه‌های مخمر مورد بررسی.....۱۰۶

جدول۳- ۱۱: نتایج تست‌های جذب قندها و دیگر منابع کربنی در سویه‌های مورد بررسی.....۱۰۷

جدول ۳-۱۲: بررسی جذب DNA استخراج شده مخمرهای M7 و سویه استاندارد DSM3286 به وسیله دستگاه بیوفوتومتر.....۱۱۰

فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع

1-۱- مقدمه:

میکروبیولوژی صنعتی دانشی است که در رابطه با استفاده از امکانات ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها و یا متابولیت‌های آنها جهت تولید فراورده‌های مختلف در مقیاس صنعتی بحث می‌کند و به عبارت ساده‌تر موضوع اصلی آن استفاده از قوای حیاتی میکروارگانیسم‌ها در جهت تولید محصولات مختلف است(مرتضوی و همکاران، ۱۳۸۱).

از جمله این محصولات اسیدهای آلی است که به عنوان مواد افزودنی در صنایع غذایی و همچنین به عنوان مواد شیمیایی اولیه در بسیاری از صنایع کاربرد دارد. فرایندهای تخمیری، نقش زیادی در تولید اکثر اسیدهای آلی دارند. تمامی اسیدهای چرخه تری‌کربوکسیلیک‌اسید را می‌توان توسط میکروب‌ها و با بازدهی بالا تولید کرد. علاوه بر این اسیدهای آلی که به طور غیر مسقیم از چرخه کربس مشتق می‌شوند(مانند اسید ایتاکونیک[۱])، نیز می‌توانند توسط میکروارگانیسم‌ها تولید شوند. سایر اسیدهای آلی که مستقیماً از گلوکز به دست می‌آیند مانند اسید گلوکونیک[۲] و یا به عنوان محصولات نهایی پیرووات یا اتانول تهیه می‌شوند مانند اسید لاکتیک[۳] و اسید استیک[٤]،نیز می‌توانند به روش میکروبی تهیه شوند (Mattey et al, 1999).

---

[1] *Itaconic acid*
[2] *Gluconic acid*
[3] *Lactic acid*
[4] *Acetic acid*