دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

بررسی اثر صمغ فارسی، صمغ عربی و شیر خشک بدون چربی روی زنده‌مانی چهار میکروب با کاربردهای صنعتی طی خشک‌کردن انجمادی

پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی

الیاس محمدی گورجی

اساتید راهنما

دکتر محمود شیخ زین‌الدین

دکتر صبیحه سلیمانیان‌زاد

۱۳۹۲

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم و صنایع غذایی آقای الیاس محمدی گورجی

تحت عنوان

بررسی اثر صمغ فارسی، صمغ عربی و شیر خشک بدون چربی روی زنده‌مانی چهار میکروب با کاربردهای صنعتی طی خشک‌کردن انجمادی

در تاریخ ۹۲/۵/۲۸ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر محمود شیخ زین‌الدین
۲- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر صبیحه سلیمانیان‌زاد
۳- استاد داور	دکتر میلاد فتحی
۴- استاد داور	دکتر مسعود علیخانی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر جهانگیر خواجه علی

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس خدای را، آن نخستین بی‌پیشین را و آن آخرین بی‌پسین را، خداوندی را که دیده‌ی بینایان از دیدارش قاصر آید و اندیشه‌ی واصفان از نعت او فروماند. آفریدگان را به قدرت خود ابداع کرد و به مقتضای مشیت خویش جامه‌ی هستی پوشید و به همان راه که ارادت او بود روان داشت و رهسپار طریق محبت خویش گردانید.

از پدر و مادر عزیزم، آنان که آفتاب مهرشان در آستانه‌ی قلبم همچنان پابرجاست، بی نهایت سپاسگزارم.

از اساتید راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر شیخ زین‌الدین و سرکار خانم دکتر سلیمانیان‌زاد که خداوند افتخار کسب علم و معرفت را در محضرشان نصیب من ساخت تشکر می‌کنم.

از اساتید داور جناب آقایان دکتر فتحی و دکتر علیخانی که زحمت بازخوانی این پایان نامه را بر عهده داشتند، بسیار سپاسگزارم.

از اساتید محترم گروه علوم و صنایع غذایی جناب آقایان دکتر شاهدی، دکتر کرامت و دکتر همدمی که در محضرشان کسب علم و اخلاق نمودم و سایر اساتید گروه جناب آقایان دکتر کدیور، دکتر گلی و دکتر نصیرپور صمیمانه سپاسگزارم.

مراتب سپاس خود را از سرکار خانم مهندس ستاری و تکنسین آزمایشگاه آقای کریمی که طی انجام مراحل مختلف این تحقیق همواره از کمک های آنها بهره‌مند شدم، اعلام می‌دارم.

از جناب آقای مهندس بهرامی که افتخار شاگردی ایشان را داشتم، سپاسگزارم.

دگربار از خدای مهربان سپاسگزارم که در این مدت لطف خود را از طریق دوستان عزیزم نیز بر من جاری ساخت.

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

و تقدیم به همه کسانی که لحظه‌ای بعد انسانی و وجدانی خود را فراموش نمی کنند و بر آستان گران سنگ انسانیت سر فرود می آورند و انسان را با همه تفاوت‌هایش ارج می‌نهند.

فهرست مطالب

عنوان ..... **صفحه**

فهرست مطالب ..... هفت
فهرست شکل‌ها ..... ده
فهرست جداول ..... یازده
چکیده ۱

فصل اول: مقدمه و اهمیت موضوع

۱-۱- مقدمه و اهمیت موضوع ۲

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- اهمیت کلکسیون‌های کشت میکروبی در بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی ۶
۲-۲- کاربرد و نقش کلکسیون‌های میکروبی ۷
۲-۲-۱- کشاورزی ۷
۲-۲-۲- صنایع غذایی ۷
۲-۲-۳- صنایع دارویی و شیمیایی ۷
۲-۳- حفظ و نگهداری سویه‌ها در کلکسیون‌های میکروبی ۷
۲-۴- روش‌های نگهداری میکروارگانیسم‌ها ۸
۲-۴-۱- تشکیل کف ۸
۲-۴-۲- خشک‌کردن پاششی ۹
۲-۴-۳- خشک‌کردن بستر سیال ۹
۲-۴-۴- خشک‌کردن انجمادی ۹
۲-۵- مراحل روش خشک‌کردن انجمادی ۱۰
۲-۶- خشک‌کردن انجمادی کشت میکروبی ۱۲
۲-۷- مزایای روش خشک‌کردن انجمادی ۱۲
۲-۸- معایب روش خشک‌کردن انجمادی ۱۳
۲-۹- عوامل موثر بر بقای کشت‌های ذخیره‌ی میکروبی در فرآیند خشک‌کردن انجمادی ۱۳
۲-۹-۱- فاکتورهای ذاتی ۱۳
۲-۹-۲- فاکتورهای رشد ۱۴
۲-۹-۳- تنش های کمتر از حد کشندگی ۱۶
۲-۹-۴- عوامل محافظت کننده ۱۸

۲-۹-۵- انبارمانی ۱۸
۲-۹-۶- آبدهی مجدد ۲۰
۲-۱۰- عوامل محافظت‌کننده ۲۲
۲-۱۰-۱- مکانیسم‌های عمل محافظت‌کننده در برابر انجماد ۲۳
۲-۱۰-۲- ارزیابی کارایی محافظت‌کننده ۲۵
۲-۱۰-۳- تقسیم‌بندی عوامل محافظت‌کننده در برابر انجماد ۲۵
۲-۱۱- نمونه‌ای از میکرو ارگانیسم‌های با قابلیت کاربرد صنعتی ۳۸
۲-۱۱-۱-*اشریشیا کلای* ۳۸
۲-۱۱-۲-*زانتوموناس آگزونوپودیس* ۳۹
۲-۱۱-۳-*مخمر ساکارومایسس سرویزیه* ۴۰
۲-۱۱-۴-*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۴۱

فصل سوم: مواد وروش‌ها

۳-۱- میکروارگانیسم ها، مواد و تجهیزات ۴۸
۳-۱-۱- میکروب‌های مورد آزمایش ۴۸
۳-۱-۲- مواد مصرفی ۴۹
۳-۱-۳- تجهیزات مورد استفاده ۵۱
۳-۲- عملیات میکروبی ۵۲
۳-۲-۱- فعال سازی، آماده سازی و نگهداری کشت میکروبی ۵۲
۳-۲-۲- آزمون‌های تاییدی باکتری‌ها ۵۲
۳-۳- رسم منحنی رشد باکتری ۵۳
۳-۴- خشک‌کردن انجمادی ۵۳
۳-۴-۱- خشک‌کردن انجمادی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۵۳
۳-۴-۲- خشک‌کردن انجمادی *اشریشیا کلای* ۵۴
۳-۴-۳- خشک‌کردن انجمادی *زانتوموناس آگزونوپودیس* ۵۵
۳-۴-۴- خشک‌کردن انجمادی *ساکارومایسس سرویزیه* ۵۶
۳-۵- تعیین درصد زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها ۵۶
۳-۶- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها ۵۷

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- نتایج آزمون‌های تاییدی شناسایی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ ..... ۵۸

۴-۱-۱- رسم منحنی رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ ..... ۵۹
۴-۱-۲- اثر محافظت‌کننده‌ها روی زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ ..... ۶۰
۴-۲- اثر محافظت‌کننده‌ها روی زنده‌مانی *اشریشیا کلای* ۶۴
۴-۲-۱- زنده‌مانی *اشریشیا کلای* بعد از ۱۴ روز انبارمانی ۶۵
۴-۳- مقایسه زنده‌مانی *اشریشیا کلای* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ بعد از خشک‌کردن انجمادی ۶۵
۴-۴- اثر محافظت‌کننده‌ها روی زنده‌مانی *زانتوموناس آگزونوپودیس* ۶۷
۴-۴-۱- زنده‌مانی باکتری *زانتوموناس آگزونوپودیس* بعد از ۱۴ روز انبارمانی ۶۸
۴-۵- مقایسه زنده‌مانی *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ بعد ازخشک‌کردن انجمادی ۶۹
۴-۶- اثر محافظت‌کننده‌ها روی زنده‌مانی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* ۷۰
۴-۶-۱- زنده‌مانی *ساکارومایسس سرویزیه* بعد از ۱۴ روز انبارمانی ۷۱
۴-۷- مقایسه زنده‌مانی *ساکارومایسس سرویزیه* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ بعد از خشک‌کردن انجمادی ۷۲

فصل پنجم: نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات

۵-۱- نتیجه‌گیری کلی ۷۴
۵-۲- پیشنهادها ۷۵
منابع ۷۷

فهرست شکل‌ها

نمودار ۴-۱- منحنی رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ در محیط کشت MRS ۵۹
نمودار ۴-۲- نتایج زنده‌مانی *اشریشیا کلای* بعد ۱۴ روز از زمان خشک‌کردن انجمادی ۶۵
نمودار ۴-۳- نتایج زنده‌مانی *زانتوموناس آگزونوپودیس* بعد ۱۴ روز از زمان خشک‌کردن انجمادی..... ۶۸
نمودار ۴-۴- نتایج زنده‌مانی *ساکارومایسس سرویزیه* بعد ۱۴ روز از زمان خشک‌کردن انجمادی..... ۷۱

فهرست جداول

جدول ۳-۱- اجزای سازنده محیط کشت MRS مایع ۴۹
جدول ۳-۲- اجزای سازنده محیط نوترینت براث ۴۹
جدول ۳-۳- اجزای سازنده محیط کشت نوترینت آگار ۵۰
جدول ۳-۴- اجزای سازنده محیط YED ۵۰
جدول ۳-۵- اجزای سازنده محیط PDA ۵۰
جدول ۴-۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷..... ۵۸
جدول ۴-۲- نتایج اثر محافظت‌کننده‌های مختلف روی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ ..... ۶۰
جدول ۴-۳- نتایج اثر محافظت‌کننده‌های مختلف روی زنده‌مانی *اشریشیا کلای* ۶۴
جدول ۴-۴- مقایسه زنده‌مانی *اشریشیا کلای* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در حضور محافظت‌کننده‌های مختلف ۶۶
جدول ۴-۵- نتایج اثر محافظت‌کننده‌های مختلف روی زنده‌مانی *زانتوموناس آگزونوپودیس* ۶۷
جدول ۴-۶- مقایسه زنده‌مانی *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در حضور محافظت‌کننده‌های مختلف ۶۹
جدول ۴-۷- نتایج اثر محافظت‌کننده‌های مختلف روی زنده‌مانی *ساکارومایسس سرویزیه* ۷۰
جدول ۴-۸- مقایسه زنده‌مانی *ساکارومایسس سرویزیه* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در حضور محافظت‌کننده‌های مختلف ۷۲

چکیده

در حال حاضر، روش خشک‌کردن انجمادی رایج‌ترین روش نگهداری کشت‌های میکروبی صنعتی است. در این روش، انتخاب نوع محافظت‌کننده بر روی زنده‌مانی میکروب اثر مستقیم دارد. در این تحقیق، چهار میکروارگانیسم صنعتی مهم با استفاده از این روش خشک شدند. هدف این تحقیق، بررسی اثر محافظت‌کنندگی صمغ فارسی و مقایسه‌ی آن با صمغ عربی و شیر خشک بدون چربی روی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷، *اشریشیا کلای*، *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *ساکارومایسس سرویزیه* طی فرآیند خشک‌کردن انجمادی بود. به این منظور، بعد از فعال‌سازی کشت میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه و رساندن آنها به فاز سکون رشد، سلول‌هایی در ابتدای فاز سکون کشت میکروارگانیسم‌ها با استفاده از سانتریفوژ جدا شدند و پس از شست و شو با سرم فیزیولوژی، با آن رقیق شده و به روش مایلز میزرا کشت داده شدند. محلول‌های صمغ فارسی، صمغ عربی و شیر خشک بدون چربی و ترکیبی از آنها تهیه شده و استریل شدند. سوسپانسیون‌های میکروبی با محلول‌های محافظت‌کننده، مخلوط شدند و بعد از همگن شدن، درون ویال‌ها ریخته شده و در فریزر ۸۰- °C منجمد شدند. پس از انجماد، درون خشک‌کن انجمادی خشک شدند. زنده‌مانی بلافاصله بعد از خشک‌کردن و بعد از ۱۴ روز انبارمانی (۴ °C) بررسی شد. اثر محافظت‌کنندگی صمغ فارسی ۱٪ (W/V) در مقایسه با اثر محافظت‌کنندگی صمغ عربی ۵٪ و ۱۰٪ (W/V) و شیر خشک بدون چربی ۱۰٪ (W/V) روی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). همچنین، اثر محافظت‌کنندگی صمغ فارسی ۶٪ (W/V) در مقایسه با اثر محافظت‌کنندگی صمغ عربی ۶٪ (W/V)، ترکیب صمغ فارسی ۳٪ (W/V) و صمغ عربی ۳٪ (W/V) و نیز شیر خشک بدون چربی ۱۰٪ (W/V) روی زنده‌مانی *اشریشیا کلای* معنی داری نبود. اما اثر شیر خشک بدون چربی ۱۰٪ (W/V) روی زنده‌مانی *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *ساکارومایسس سرویزیه*، معنی‌دار بود. بعد از ۱۴ روز انبارمانی (۴ °C)، تاثیر صمغ فارسی ۶٪ (W/V) روی زنده‌مانی *اشریشیا کلای* و تاثیر صمغ عربی ۶٪ (W/V) روی زنده‌مانی *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *ساکارومایسس سرویزیه* معنی‌دار بود. بنابراین، با توجه به نتایج می‌توان گفت: *اشریشیا کلای*، *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *ساکارومایسس سرویزیه*، با وجود افزایش غلظت صمغ‌ها، مقاومت کمتری نسبت به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ طی خشک‌کردن انجمادی داشتند. صمغ فارسی برای *اشریشیا کلای* و شیر خشک بدون چربی برای *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *ساکارومایسس سرویزیه*، می‌تواند جایگزین محافظت‌کننده‌های دیگر شود. صمغ فارسی ۶٪ (W/V) برای *اشریشیا کلای* و صمغ عربی ۶٪ (W/V) برای *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *ساکارومایسس سرویزیه*، بهترین محافظت‌کننده‌ها طی ۱۴ روز انبارمانی (۴ °C) بودند. همچنین می‌توان از صمغ فارسی به عنوان یک محافظت‌کننده‌ی جایگزین به جای شیر خشک بدون چربی و صمغ عربی جهت خشک‌کردن انجمادی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ استفاده کرد. از آنجا که صمغ فارسی، صمغی ایرانی و ارزان‌تر می‌باشد و غلظت کمتر آن کارایی مشابه صمغ عربی و شیر خشک بدون چربی را داشت، کاربرد آن در صنعت مقرون به صرفه خواهد بود.

کلمات کلیدی: خشک‌کردن انجمادی، شیر خشک بدون چربی، صمغ عربی، صمغ فارسی، کشت‌های ذخیره‌ی میکروبی

فصل اول
مقدمه و اهمیت موضوع

۱-۱- مقدمه و اهمیت موضوع

تحقیقات گسترده در میکروبیولوژی نشان داده است که میکروارگانیسم‌ها اثرات مثبت فرآوانی برای طبیعت از جمله، در چرخه‌ی بیوژئوشیمیایی مواد، تجزیه‌ی آلاینده‌ها و تولید اکسیژن دارند. میکروب‌ها جزء اصلی صنایع بیوتکنولوژیکی هستند و برای تولید انرژی و سوخت‌های زیستی، شرکت در واکنش‌های تخمیری، تولیدات میکروبی با استفاده از کشت‌های میکروبی و فعالیت‌های مهندسی ژنتیک استفاده می‌شوند. پس از مطالعات آزمایشگاهی و انتخاب سویه‌های مناسب برای کاربردهای صنعتی، در این مقطع مشکل عمده، حفظ بقا و ویژگی‌های متابولیکی این میکروارگانیسم‌ها تا زمان مصرف می‌باشد و شرایط نگهداری باید کمترین آسیب به ویژگی‌های متابولیکی آنها وارد کند. از طرفی نگهداری کشت‌ها برای تحقیقات آینده ضروری است. عدم استفاده از روش نگهداری مناسب، منجر به نابودی میکروارگانیسم‌ها یا از دست رفتن ویژگی‌های با ارزش آنها خواهد شد [۵۵]. نگهداری میکروارگانیسم‌ها با روش خشک‌کردن، برای نگهداری طولانی مدت کشت‌های میکروبی ارجح است [۴۸]. روش‌هایی که برای خشک‌کردن میکروارگانیسم‌ها به کار رفته است شامل تشکیل کف[۱]، خشک‌کردن پاششی، خشک‌کردن بستر سیال و خشک‌کردن انجمادی می‌باشد که هر کدام مزایا و معایبی دارند. فرآیند تشکیل کف بدون نیاز به انجماد انجام می‌شود. با این وجود این روش منجر به از دست رفتن ۴۰٪ بقای سلول می‌شود [۲۰]. خشک‌کردن پاششی روش غالب در صنعت لبنیات است و نسبت به خشک‌کردن انجمادی کم هزینه‌تر است. اما میکروارگانیسم خشک‌شده نسبتاً قابلیت زنده‌مانی کم و فاز تاخیر طولانی قبل از شروع رشد دارد [۱۷]. در خشک‌کردن بستر سیال نیز زمان و انرژی کمتری نسبت به خشک‌کردن انجمادی نیاز است. اما این روش هنوز به طور گسترده استفاده نمی‌شود.

۱- Foam formation

خشک‌کردن انجمادی، رایج‌ترین و بهترین روش نگهداری کلکسیون‌های میکروبی و کشت‌های آغازگر می‌باشد که برای نگهداری طولانی مدت سوسپانسیون‌های میکروبی که حاوی بیش از 10^8 cells/mL هستند، به کار می‌رود. امروزه، زمینه‌ی کاربردهای خشک‌کردن انجمادی محدوده‌ای از غذاهای نسبتاً ساده، محصولات دارویی یا بیوتکنولوژیکی بسیار پیچیده تا حفظ و نگهداری کشت‌های باکتریایی و قارچی می‌باشد [۲۲ و ۴۸]. این روش برای مواد بیولوژیکی بسیار مناسب است. زیرا خشک‌کردن در دمای کم انجام می‌شود و سرعت واکنش شیمیایی و تجزیه‌ی حرارتی کاهش می‌یابد. خشک‌کردن انجمادی نسبت به روش‌های دیگر نگهداری به خاطر تسهیل عمل‌آوری، انبارمانی، بازاریابی و کاربرد ارجح است [۲۰ و ۶۱].

با این حال، اگرچه روش خشک‌کردن انجمادی روش غالب نگهداری میکروب‌ها برای استفاده در صنعت است، بدون کاهش در زنده‌مانی سلول‌ها نیست و مرحله انجماد، علت اصلی آسیب میکروارگانیسم‌ها می‌باشد [۴۸ و۶۰]. عوامل زیادی بر حفظ این کشت‌ها در برابر انجماد موثرند که مهم‌ترین عامل، انتخاب یک محافظت‌کننده‌ی مناسب در برابر انجماد است. محافظت‌کننده‌ها زنده‌مانی و فعالیت عملکردی کشت‌های آغازگر را بعد از خشک‌کردن انجمادی به طور قابل توجهی افزایش می‌دهند. گلیسرول و دی متیل سولفوکساید برای اولین بار جهت حفاظت سلول‌های یوکاریوت استفاده شدند و تاکنون گسترده‌ترین کاربرد را در میکروبیولوژی داشته‌اند. بعد از این دو محافظت‌کننده، سرم آلبومین، شیر بدون چربی، ساکارز، پپتون، عصاره‌ی مخمر، گلوکز، پلی وینیل پیرولیدون، متانول، سوربیتول، عصاره‌ی مالت، دکستران و اتیلن گلیکول بیشترین کاربرد را در میکروبیولوژی داشته‌اند. به مرور زمان انتخاب نوع محافظت‌کننده‌ها بسته به نوع میکروارگانیسم از دقت بیشتری برخوردار بوده است [۳۳].

در این تحقیق، صمغ فارسی برای اولین بار به عنوان یک محافظت‌کننده به جهت در دسترس بودن و قیمت ارزان استفاده شد. این صمغ از نظر خواص، بسیار با صمغ عربی شباهت دارد. صمغ عربی بعضاً برای حفاظت باکتریوفاژها و سیانوباکتری‌ها در مصارف صنعتی به کار رفته است. همچنین شیر خشک بدون چربی یک محافظت‌کننده‌ی رایج و پرکاربرد می‌باشد و به عنوان نمونه‌ی شاهد در کنار آب مقطر برای مقایسه‌ی اثر محافظت‌کنندگی آن با صمغ‌ها استفاده شد.

از میکروارگانیسم‌های به کار رفته در این تحقیق، *اشریشیا کلای*، مورد استفاده در انجام مطالعات آزمایشگاهی و مهندسی ژنتیک، *زانتوموناس آگزونوپودیس* به دلیل تولید صنعتی زانتان برای مصرف در صنایع غذایی و *ساکارومایسس سرویزیه* به عنوان مخمر نانوایی در تولید فرآورده‌های غله‌ای تخمیری حائز اهمیت می‌باشند. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷، یک باکتری اسید لاکتیک بومی جدا شده از مدفوع نوزاد شش ماهه‌ی تغذیه شده از شیر مادر می‌باشد که ویژگی‌های منحصر به فرد این باکتری از جمله تفاوت در سرعت رشد، توانایی رقابت در کشت‌های مخلوط، سازگاری با سوبستراهای مختلف، خصوصیات ضد میکروبی، تولید آنزیم‌های متنوع و غیره، کاملاً آن را از کشت‌های آغازگر تجاری متمایز کرده است. فراهم آوردن امکان استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک بومی، در تولید فرآورده‌های

تخمیری صنعتی سبب افزایش راندمان تولید شده و محصول تولیدی با ذائقه‌ی مصرف‌کنندگان داخلی تطابق بیشتری خواهد داشت. در حال حاضر در ایران هیچ موسسه‌ای برای تولید خالص و انبوه کشت‌های میکروبی به منظور مصرف در صنایع مختلف غذایی، دارویی و غیره وجود ندارد و ما هنوز برای تولید محصولات تخمیری به واردات کشت‌های میکروبی لیوفیلیزه نیازمندیم که در حال حاضر برای رفع این نیاز مبالغ هنگفتی ارز از مملکت خارج و همچنین بتدریج باعث از بین رفتن سویه‌های بومی می‌شود. *اشریشیا کلای* و *زانتوموناس آگزونوپودیس* از باکتری‌های گرم منفی هستند و *ساکارومایسس سرویزیه* از مخمرها می‌باشد و نسبت به باکتری گرم مثبت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷ در فرآیند خشک‌کردن انجمادی آسیب بیشتری می‌بینند. در نتیجه، زنده‌مانی این چهار میکروارگانیسم در فرآیند خشک‌کردن انجمادی به عنوان مثالی از گروه‌های مختلف میکروارگانیسم‌های یوکاریوت و پروکاریوت که در صنعت غذا و صنایع دیگر کاربرد دارند، مطالعه شد.

بنابراین، هدف این تحقیق، بررسی اثر محافظت‌کنندگی صمغ فارسی و مقایسه‌ی آن با صمغ عربی و شیرخشک بدون چربی روی زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A۷، *اشریشیا کلای*، *زانتوموناس آگزونوپودیس* و *ساکارومایسس سرویزیه* طی فرآیند خشک‌کردن انجمادی بود.

فصل دوم
بررسی منابع

۲-۱- اهمیت کلکسیون‌های کشت میکروبی در بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی

میکروارگانیسم‌ها برای تداوم بقای گیاهان و حیوانات ضروری‌اند. لوییس پاستور برای اولین بار ارتباط بین میکروارگانیسم‌ها و بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی را کشف کرد. او دریافت، میکروارگانیسم‌ها نقش ویژه‌ای در بیماری انسان و حیوان و فساد مواد غذایی و نوشیدنی دارند. شناسایی و کنترل میکروارگانیسم‌ها طی سالیان متمادی توسعه یافته است و رویه‌ی بیوتکنولوژی، که در آن میکروارگانیسم‌ها به عنوان ابزار بیولوژیکی به کار می‌روند، به سرعت در حال افزایش است. استفاده از کودهای بیولوژیکی، محرک‌های رشد و حشره‌کش‌های بیولوژیکی، همگی نوید افزایش راندمان تولید را می‌دهند. در داروسازی، پروتئین‌های خون، هورمون‌ها، اینترفرون، محرک‌های رشد سلول، انسولین و غیره پیش از این تولید می‌شدند و تحقیقات برای تولید داروهای جدید همچنان ادامه دارد. تولید گازها، الکل‌ها، جایگزین‌های نفت و منابع دیگر انرژی‌های تجدیدپذیر توسط عوامل میکروبی امکان پذیر است. فرآیندهای بازیافت بیوتکنولوژیکی غالباً روش ارزان و موثر دفع فاضلاب می‌باشند. علاوه بر آن، میکروارگانیسم‌ها برای تشخیص سویه‌های بیماری‌زا در انسان، گیاه و حیوان و مطالعات اکولوژیکی و تاکسونومی مورد نیازند. تمام چنین کاربردهایی در میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی به تامین صحیح کشت‌های زنده‌ی میکروارگانیسم‌ها وابسته است. بنابراین، ضروری است سویه‌های شاخص و دارای ارزش بالقوه برای اهداف صنعتی، دارویی، کشاورزی و فعالیت‌های علمی دیگر حفظ و نگهداری شوند. مسئولیت این عمل مهم، بر عهده‌ی کلکسیون‌های کشت میکروبی می‌باشد که نقش مستندسازی، حفظ، نگهداری و توزیع سویه‌های شاخص از وظایف آنهاست. به طور کلی، کلکسیون‌ها محدوده‌ی وسیعی از میکروارگانیسم‌های مربوط به گذشته، حال و آینده را نگهداری می‌کنند [۴۰].

۲-۲- کاربرد و نقش کلکسیون‌های میکروبی

کاربرد کشت‌های موجود در کلکسیون‌های میکروبی، در حیطه‌های کشاورزی، صنایع غذایی، دارویی، شیمیایی و ژئومیکروبیولوژی می‌باشد. چنین کلکسیون‌هایی جزء ذخایر جهانی هستند [۴۰].

۲-۲-۱- کشاورزی

فعالیت‌های کلکسیون باکتریایی در حوزه‌ی کشاورزی بسیار مهم و گسترده است. میکروب‌ها برای بازیافت مواد و عناصر موجود در خاک و مشروط کردن مناسب آن و تداوم بقای گیاهان و حیوانات ضروری می‌باشند. با همزیستی بین بقولات و باکتری‌های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن از جنس ریزوبیوم، غده روی ریشه تشکیل می‌شود. همچنین گونه‌های ریزوبیوم در تحقیقات مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌های دارای توانایی تثبیت نیتروژن به ارگانیسم‌های دیگر و تلاش برای القای این توانایی به گونه‌های دیگر حائز اهمیت می‌باشند. چنین مطالعاتی نیازمند ارگانیسم‌های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن مختلف به صورت زنده و پایدار می‌باشد [۴۰].

۲-۲-۲- صنایع غذایی

میکروارگانیسم‌ها در بسیاری از فرآیندهای تخمیری تولید مواد غذایی شرکت می‌کنند. به عنوان مثال در کارخانجات لبنی، از کشت‌های باکتری‌های اسید لاکتیک برای تولید محصولات لبنی نظیر ماست، پنیر و غیره استفاده می‌شود. استفاده از آنزیم‌های میکروبی در بیوسنسورها و کاربرد آنها در کنترل تخمیر، در حال حاضر مورد توجه ویژه است [۴۰].

۲-۲-۳- صنایع دارویی و شیمیایی

کاربرد کلکسیون‌های میکروبی در صنعت، با تحقیقات در زمینه‌ی ارگانیسم‌های جدید تولید کننده‌ی آنتی بیوتیک و ارگانیسم‌های مورد استفاده در مطالعات شیمی درمانی افزایش یافته است. علاوه بر آن، طیف گسترده‌ای از محصولات در صنایع دارویی و نیز صنایع شیمیایی نظیر حلال‌های آلی، اسیدهای آلی، آنزیم‌ها و بسیاری از ترکیبات دیگر از میکروارگانیسم‌ها بدست آمده است [۴۰].

برای تولید سوخت و جایگزین‌های نفت نظیر متان، بیوگاز و هیدروژن، باکتری‌های متانوژنیک و فتوتروفیک استفاده می‌شوند. همچنین چند گونه‌ی کلوستریدیوم برای تولید استون، بوتانول و اتانول استفاده می‌شوند [۴۰].

۲-۳- حفظ و نگهداری سویه‌ها در کلکسیون‌های میکروبی

بعد از جداسازی سویه‌ها از طبیعت، ممکن است نگهداری مداوم آن‌ها در محیط‌ها و شرایط مصنوعی منجر به ناپایداری و بی‌ثبات‌شدن آن‌ها شود. همچنین میکروارگانیسم‌های حاوی ژن‌های دست‌کاری شده و DNA خارج کروموزومی می‌توانند تغییر یابند. استفاده از روش نگهداری مناسب چنین سلول‌هایی مسئله‌ی مهمی است. زیرا کاهش زنده‌مانی و پایداری چنین میکروارگانیسم‌هایی می‌تواند منجر به آسیب شدید فرآیندهای صنعتی شود. هزینه‌های بالای تحقیق، توسعه و انتخاب سویه نیازمند حفظ درست و تولید کارآمد سویه‌هایی است که اساس صنایع بیوتکنولوژیکی را تشکیل می‌دهند. بنابراین، حفظ زنده‌مانی و فعالیت متابولیکی همه‌ی سویه‌های میکروبی امری ضروری است.

حفظ کشت‌های میکروبی و سلول‌های زنده، نیازمند دانش در مورد هر میکروارگانیسم و آشنایی با روش‌های پیشرفته‌ی نگهداری می‌باشد. روش‌های کاربردی نگهداری، باید حداقل آسیب به سلول‌ها وارد کند و از نظر ژنوتیپی و فنوتیپی ثبات داشته باشند. بنابراین، کلکسیون‌های بزرگ کشت میکروبی، غالباً روش‌های جدید نگهداری را می‌پذیرند [۴۰].

۲-۴- روش‌های نگهداری میکروارگانیسم‌ها

کشت‌دادن و تعیین ویژگی‌های میکروارگانیسم‌ها به تنهایی بدون روش‌های نگهداری کافی نیست. زیرا ثبات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی سویه‌های خالص امری ضروری است. نگهداری کشت‌ها برای تحقیقات آینده و کاربردهای صنعتی ضروری می‌باشد [۵۵]. یک روش نگهداری، عموماً با توانایی حفظ ویژگی‌های مهم کشت و زنده‌مانی آن در طولانی مدت ارزیابی می‌شود. روش فراگیری برای نگهداری طولانی مدت وجود ندارد. زیرا جنس‌ها، گونه‌ها و سویه‌های مختلف، حساسیت‌های متفاوتی به روش‌های نگهداری مختلف دارند. نگهداری میکروارگانیسم‌ها با روش خشک‌کردن، روش غالب برای نگهداری طولانی مدت کشت‌های میکروبی بوده است [۴۸]. سویه‌های جدید کشف‌شده نیاز به توجه بیشتری برای نگهداری دارند. زیرا عدم بهینه‌سازی روش‌های نگهداری موجود، منجر به نابودی میکروارگانیسم‌ها یا از دست رفتن ویژگی‌های با ارزش آنها خواهد شد. گروه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها واکنش‌های متفاوتی به روش نگهداری مشابه می‌دهند. حتی سویه‌های مختلف یک گونه ممکن است واکنش‌های متفاوتی را ایجاد کنند. به علت تنوع گسترده‌ی حیات میکروبی و زمان‌بر بودن تحقیقات به منظور نگهداری، بهینه‌سازی همه‌ی گونه‌های یک جنس یا همه‌ی سویه‌های یک گونه غیر ممکن است [۵۵].

در صنعت، میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به شکل مایع، خشک‌شده‌ی پاششی، منجمد یا اشکال لیوفیلیزه نگهداری و توزیع شوند. اگرچه، در کارخانجات لبنی افزایش تمایل به کشت‌های لیوفیلیزه‌ی آماده‌ی مصرف برای تلقیح مستقیم به وت[۱]های شیر اهمیت بیشتری در تولید کشت آغازگر و روش‌های نگهداری یافته است که زنده‌مانی و فعالیت سلول را ارتقا می‌دهد [۲۰و۳۲].

۲-۴-۱- تشکیل کف

تشکیل کف[۲] روشی جدید در خشک‌کردن می‌باشد که از قندهای محافظت‌کننده برای تبدیل سوسپانسیون‌های بیولوژیکی به کف‌های خشک پایدار از لحاظ مکانیکی استفاده می‌شود. این کف‌ها با جوشاندن آنها تحت خلاء در دماهای محیط با القای یک فرآیند تحت عنوان شیشه‌ای‌شدن[۳] ایجاد می‌شوند که مستقیماً از یک مایع کف‌های شیشه‌ای، غیر کریستاله، بی شکل و تثبیت شده تولید می‌شود.

۱- Vat

۲- Foam formation

۳- Vitrification