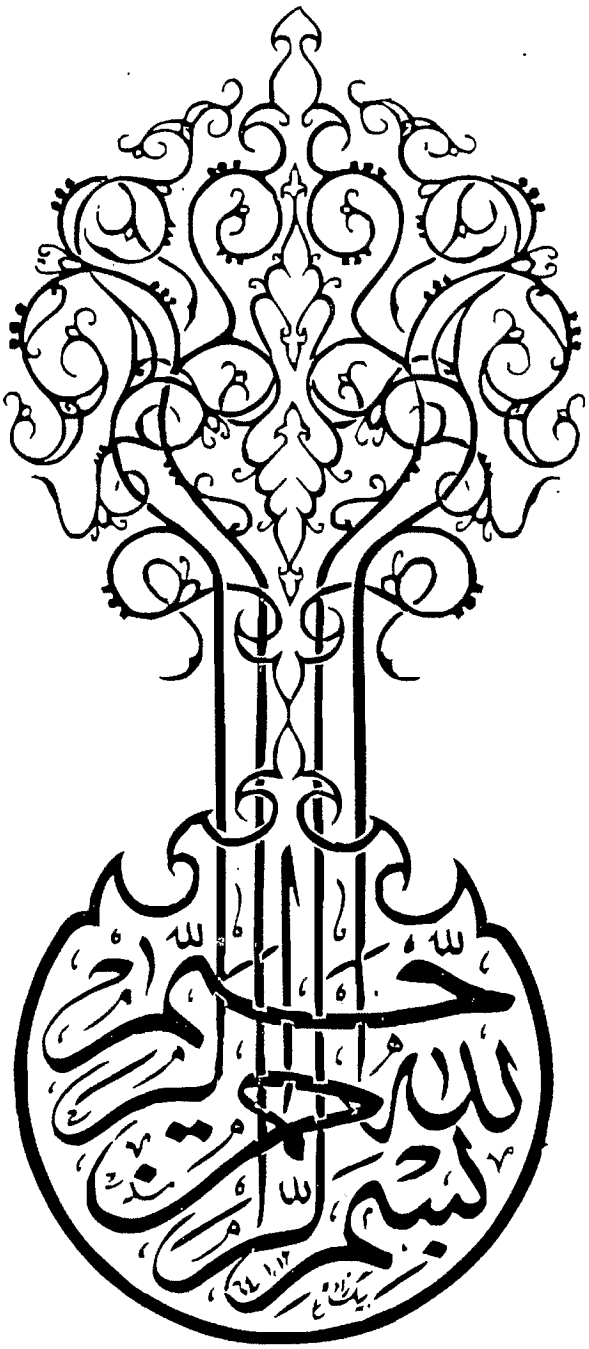

١٢٩٧٠٢

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی- میکروبیولوژی

جداسازی و بررسی سویه‌های مقاوم *ساکارومایسس سرویزیه* به استرس‌های فشار اسمزی و سرما

استادان راهنما:
دکتر ایرج نحوی
دکتر منوچهر توسلی

استاد مشاور:
دکتر محسن مبینی دهکردی

پژوهشگر:
محسن گلابی

۱۳۸۸/۱۰/۲۷

خرداد ماه ۱۳۸۸

۱۲۹۷۰۲

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

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

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی میکروبیولوژی آقای محسن گلابی تحت عنوان

جداسازی و بررسی سویه‌های مقاوم *ساکارومایسس سرویزیه* به استرس‌های فشار اسمزی و سرما

در تاریخ ۱۳۸۸/۳/۱۳ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استادان راهنمای پایان نامه	دکتر ایرج نحوی با مرتبه‌ی علمی استاد	امضا
	دکتر منوچهر توسلی با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا
۲- استاد مشاور پایان نامه	دکتر محسن مبینی دهکردی با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا
۳- استاد داور داخل گروه	دکتر گیتی امتیازی با مرتبه‌ی علمی استاد	امضا
۴- استاد داور خارج از گروه	دکترشهلا شادزی با مرتبه‌ی علمی استاد	امضا

۱۳۸۸/۱۰/۲۷

امضای مدیر گروه

گروه زیست شناسی ۱۳۴۴ Department Of Biology 1965

سپاسگذاری:

در این مجال شایسته است از زحمات بی‌دریغ و راهنمایی‌های حکیمانه‌ی استاد دانشمند و بزرگوارم جناب آقای دکتر ایرج نحوی تشکر و قدردانی نمایم ایشان به جز یک استاد برای بنده الگوی یک انسان فرهیخته بودند و بسیار خوشحال هستم که در زمره‌ی دانشجویان این استاد گرانقدر قرار داشتم و امیدوارم در حد بضاعت و توان خود توانسته باشم پاسخگوی اعتماد ایشان بوده باشم.

همچنین برخود لازم می‌دانم از زحمات استاد فرهیخته جناب آقای دکتر منوچهر توسلی به خاطر راهنمایی-های شایسته در انجام تحقیقات این پایان نامه تقدیر به عمل آورم.

ازجناب آقای دکتر محسن مبینی به خاطر زحمات بی دریغ و صبورانه صمیمانه سپاسگذاری می کنم.

همچنین بر خود واجب می‌دانم از تمامی استادان گروه زیست شناسی بخصوص استادان بخش میکروبیولوژی جناب آقای دکتر گلبانگ، دکتر گیتی امتیازی، دکتر بوذری، دکتر زرکش، دکتر روغنیان و سرکار خانم دکتر اعتمادی‌فر تشکر و قدردانی کنم.

با تشکر فراوان از دوستان عزیزم:

آقایان: کریمی، جوادی، حسن شاهیان، خداوردی، سیلانی، شاکری، بهشتی مآل، آشنگرف، سجادی.

و خانم‌ها: عروجعلیان، جهانشاه، میرباقری، صالح، رهبری، مفاخر، حیدری، حسینی، شاهرخ، حسین‌خانی، میرزایی، خدابخش.

این مجموعه‌ی هرچند کوچک تقدیم به:

پدر بزرگوارم، الگوی صبر و تلاش

مادر مهربانم، الگوی ایثار و فداکاری

و برادرم ابراهیم که تمام داشته‌های امروز را مرهون تشویق‌های دیروز و حمایت‌های همیشگی‌اش می‌دانم.

چکیده :

به‌کارگیری مخمرهای نانوایی (*Saccharomyces cerevisiae*) در فرآوری محصولات قنادی با مشکل روبروست. بدلیل فشار اسمزی بالای موجود در خمیرهای شیرین سلول‌های *ساکارومایسس سرویزیه* فعالیت کمی در این محیط‌ها دارند. مخمرهای مقاوم به فشار اسمزی توانایی فعالیت و فرآوری این محصولات را دارند. در ابتدای مراحل تحقیقاتی چندین نمونه از پودرهای تجاری مخمر نانوایی ایرانی و خارجی تهیه شد و میزان کارآیی این نمونه‌ها در فرآوری خمیرهای شیرین با محتوای متفاوت ساکاروز بررسی شد. اگرچه تفاوت در کیفیت و خصوصیات نمونه‌های تهیه شده مشاهده شد. اما مشخص گردید هیچکدام از نمونه‌های تجاری توانایی فرآوری خمیرهای حاوی ۳۰٪ ساکاروز را ندارند. در ادامه از این نمونه‌ها سویه‌های مخمری جداسازی شد و مورد بررسی قرار گرفت. میزان فعالیت سویه‌ها در محیط‌های مایع مشابه خمیر اندازه‌گیری شد و منحنی رشد سلولی در محیط‌های حاوی غلظت‌های متفاوت گلوکز بررسی گردید. همچنین میزان بقای سلولی در مواجه با شوک اسمزی حاصل از قند سوربیتول، NaCl و شوک حرارتی اندازه گیری شد . بررسی نتایج حاصل نشان داد سویه K مقاومترین سویه به فشار اسمزی و فعالترین سویه در محیط ساکاروز بالا (High sucrose) می‌باشد. ارتباط مکانیسم مقاومت به شوک اسمزی حاصل از قند سوربیتول در سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* با مقاومت به شوک ناشی از NaCl مشاهده شد. همچنین تاثیر میزان تجمع درون سلولی ترهالوز در بقای سلولی در هنگام بروز استرس شوک حرارتی به اثبات رسید.

در نهایت با به‌کارگیری تابش UV و غربالگری سویه‌ها توسط عامل انتخابگر NaCl سه سویه‌ی مقاوم به فشار اسمزی که توانایی تولید توده‌ی زیستی در حد سویه‌ی صنعتی والد را داشتند جداسازی و خالص سازی شد. آزمایش‌های متعدد تایید کننده‌ی مقاومت هر سه سویه به فشار اسمزی حاصل از قندها و همچنین NaCl بود. افزایش میزان ترهالوز و کاهش فعالیت آنزیم اینورتاز بعنوان دو عامل موثر در افزایش مقاومت مخمرها به فشار اسمزی در سویه‌ی جهش یافته‌ی K_3 دیده شد. اما در سویه‌های مقاوم K_2 و K_1 تغییر ترهالوز معنی دار نبود که نشان‌دهنده‌ی وجود عوامل ناشناخته‌ی موثر در مقاومت سلولی به فشار اسمزی می‌باشد. در نهایت میزان فعالیت سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی در محیط‌های مایع مشابه خمیر بررسی شد. سویه K_1 در مقایسه با سویه K در محیط ساکاروز بالا ۲۷٪ افزایش فعالیت نشان داد. همچنین این سویه فعالیت بالایی در محیط Moderate sugar نشان داد. بنابراین این سویه بعنوان یک سویه‌ی صنعتی مقاوم به فشار اسمزی با خصوصیات مطلوب به منظور به‌کارگیری در تولید نان و محدوده‌ی وسیعی از محصولات قنادی شناخته شد.

در ادامه‌ی روند تحقیقات، با موفقیت آمیز بودن به‌کارگیری تابش UV در القای مقاومت در سویه‌ی صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه*، اقدام به جهش‌زایی و جداسازی سویه‌ی مقاوم به سرما شد. جدیدترین روش تولید نان به طریقه‌ی صنعتی، تولید این محصول با استفاده از خمیر یخزده می‌باشد. این روش حجم عمده‌ی تولیدات نان در کشورهای صنعتی را تشکیل می‌دهد. استفاده از این روش قابلیت بسیار بالایی در کاهش حجم عمده‌ی ضایعات نان در کشور ما که سالانه بالغ بر ۶۰۰ هزار تن است را دارا می باشد. به‌کارگیری این روش در تولید نان‌های صنعتی مستلزم استفاده از مخمرهای مقاوم به سرما می‌باشد. میزان مقاومت سویه‌های صنعتی به استرس سرما مورد بررسی قرار گرفت و

سویه‌ی K بعنوان مقاومترین سویه‌ی صنعتی به سرما انتخاب شد و پس از جهش‌زایی و به‌کارگیری روش غربالگری مناسب چهار سویه‌ی مقاوم به سرما جداسازی شد. دو سویه‌ی Ft_1 و Ft_3 با تولید توده‌ی زیستی مناسب انتخاب شده و قدرت تخمیر آنها در محیط Moderate Sugar بررسی شد. در نهایت سویه‌ی Ft_1 بعنوان سویه‌ی صنعتی مناسب و مقاوم به سرما انتخاب شد . قدرت فرآوری خمیر توسط این سویه پس از ۳۰ روز نگهداری خمیرهای تهیه شده در دمای $-20^{\circ}C$ به میزان ۹۵٪ بیشتر از قدرت فرآوری خمیر یخزده‌ی مشابه تهیه شده با استفاده از سویه‌ی K بود. سویه‌ی Ft_1 یک سویه‌ی *ساکارومایسس سرویزیه* مقاوم به سرما و مناسب به منظور فرآوری خمیرهای یخزده می‌باشد. در ادامه، ارتباط میزان مقاومت به فشار اسمزی و سرما در سویه‌های جهش‌یافته بررسی شد. اگرچه سویه‌ی Ft_3 که یک سویه‌ی مقاوم به سرما بود مقاومت بالایی به فشار اسمزی نشان داد ولیکن میزان مقاومت به فشار اسمزی در سویه‌ی Ft_1 برابر با سویه‌ی K بود. همچنین مقاومت به سرما در سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی در حد سویه‌ی والد بود که نشان‌دهنده‌ی مرتبط نبودن مکانیسم‌های مقاومت به سرما و فشار اسمزی می‌باشد.

واژه های کلیدی: *ساکارومایسس سرویزیه*، مخمر نانوایی، فشار اسمزی، مقاومت به سرما، خمیر یخزده، جهش، UV.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱. تاریخچه ۱

۱-۲. خصوصیات سلولی ۳

۱-۲-۱. رده بندی و پراکندگی ۳

۱-۲-۲. ساختار سلولی ۳

۱-۲-۳. ژنوم ۵

۱-۲-۴. چرخه‌ی زندگی ۷

۱-۲-۵. متابولیسم سلولی ۹

۱-۲-۵-۱. نیتروژن ۹

۱-۲-۵-۲. سولفور ۱۰

۱-۲-۵-۵. فسفر ۱۰

۱-۲-۵-۴. عناصر معدنی ۱۱

۱-۲-۵-۵. فاکتورهای رشد ۱۱

۱-۲-۵-۶. اکسیژن ۱۱

۱-۲-۵-۷. کربن ۱۲

۱-۲-۵-۸. اثر پاستور و اثر کرب تری ۱۳

۱-۳. *ساکارومایسس سرویزیه* در نقش مخمر نانوایی ۱۴

۱-۳-۱. خمیرهای شیرین ۱۶

۱-۳-۲. خمیر یخزده ۱۸

۱-۴. استرس و مکانیسم های پاسخ به آن در *ساکارومایسس سرویزیه* ۲۰

۱-۴-۱. استرس های مرتبط با مخمر نانوایی ۲۰

۱-۴-۲. استرس فشار اسمزی ۲۱

۱-۴-۳. استرس سرما ۲۳

۱-۵. جهش و دستیابی به سویه های مقاوم ۲۳

عنوان | صفحه

۱-۵-۱. روش های دستیابی به سویه های مقاوم..... ۲۳
۱-۵-۲. القای جهش در *ساکارومایسس سرویزیه*..... ۲۴

فصل دوم : مواد و روش‌ها

۲-۱. محیط‌های کشت میکروبی و مواد شیمیایی مورد استفاده..... ۲۶
۲-۲. دستگاه های مورد استفاده..... ۲۸
۲-۳. پودرهای مخمر نانوایی مورد استفاده..... ۳۰
۲-۴. میکروارگانیسم های مورد استفاده..... ۳۰
۲-۵. شناسایی گونه های مخمر..... ۳۰
۲-۶. نگهداری سویه های مخمری مورد استفاده..... ۳۱
۲-۷. بررسی قدرت تخمیر مخمرهای تجاری در خمیرهای شیرین..... ۳۱
۲-۸. سیستم اندازه گیری میزان CO_2 تولید شده در خمیر..... ۳۲
۲-۹. اندازه گیری میزان مقاومت سویه ها در برابر استرس فشار اسمزی..... ۳۳
۲-۱۰. اندازه گیری میزان مقاومت سویه های مخمری در برابر استرس سرما..... ۳۴
۲-۱۱. اندازه گیری میزان مقاومت سویه های مخمری در برابر استرس شوک حرارتی..... ۳۴
۲-۱۲. اندازه گیری میزان ترهالوز درون سلولی..... ۳۵
۲-۱۳. تعیین فعالیت آنزیم اینورتاز..... ۳۶
۲-۱۴. بررسی منحنی رشد سلولی..... ۳۷
۲-۱۵. بررسی میزان بقای سلولی در برابر تابش UV..... ۳۸
۲-۱۶. جهش زایی و جداسازی سویه های مقاوم به فشار اسمزی..... ۳۹
۲-۱۷. بررسی مقاومت سویه های مخمری به عوامل استرس زا (spot culture) ۳۹
۲-۱۸. محیط مایع مشابه خمیر..... ۴۰
۲-۱۹. سیستم اندازه گیری تولید CO_2 در محیط مایع..... ۴۰
۲-۲۰. بررسی میزان فعالیت سویه های مخمری در محیط مایع مشابه خمیر..... ۴۱
۲-۲۱. تعیین قدرت بقای سویه ی K در برابر استرس سرما..... ۴۲
۲-۲۲. جهش زایی و جداسازی سویه ی مقاوم به سرما..... ۴۲

عنوان | صفحه

۲-۲۳. بررسی توانایی تخمیر در خمیر یخ زده..... ۴۳
۲-۲۴. بررسی کیفی قدرت تخمیر..... ۴۳
۲-۲۵. روش‌های آماری..... ۴۳

فصل سوم: نتایج

۳-۱. اندازه گیری قدرت تخمیر مخمرهای خشک فعال تجاری..... ۴۴
۳-۲. اندازه گیری قدرت تخمیر سویه های صنعتی در محیط مایع مشابه خمیر..... ۴۶
۳-۳. منحنی رشد سویه های صنعتی در محیط های حاوی غلظت های متفاوت قند..... ۴۷
۳-۴. بررسی میزان مقاومت سویه های صنعتی به شوک اسمزی..... ۵۱
۳-۵. بررسی میزان مقاومت سویه های صنعتی به شوک حرارتی و میزان تجمع درون سلولی ترهالوز..... ۵۲
۳-۶. بررسی میزان مقاومت سویه های صنعتی در برابر استرس سرما..... ۵۳
۳-۷. بررسی روش های غربالگری برای جداسازی سویه ی مقاوم به فشار اسمزی..... ۵۴
۳-۷-۱. محیط های مایع حاوی غلظت های بالای قند..... ۵۴
۳-۷-۲. محیط های جامد حاوی غلظت های بالای قند..... ۵۵
۳-۷-۳. محیط های مایع حاوی NaCl..... ۵۵
۳-۷-۴. محیط های جامد حاویNaCl..... ۵۵
۳-۸. اندازه گیری درصد بقای سلولی سویه‌ی K در برابر تابش UV..... ۵۵
۳-۹. جداسازی سویه های مقاوم به فشار اسمزی..... ۵۶
۳-۱۰. بررسی منحنی رشد سویه های مقاوم به فشار اسمزی..... ۵۶
۳-۱۱. مقایسه میزان مقاومت سویه های جهش یافته به مواد استرس زا..... ۶۰
۳-۱۲. اندازه‌گیری قدرت تخمیر سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی در محیط مایع مشابه خمیر..... ۶۲
۳-۱۳. اندازه‌گیری میزان تجمع درون سلولی ترهالوز و فعالیت آنزیم اینورتاز در سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی..... ۶۳
۳-۱۴. بررسی میزان مقاومت سویه‌ی K در برابر استرس سرما..... ۶۳
۳-۱۵. جداسازی سویه ی مقاوم به سرما..... ۶۴
۳-۱۶. بررسی خصوصیات فیزیولوژیک سویه ی مقاوم به سرمای Ft_1 ..... ۶۵
۳-۱۷. بررسی کارایی سویه ی مقاوم به سرمای Ft_1 در خمیر یخ زده..... ۶۶

عنوان **صفحه**

۳-۱۸. بررسی کارایی سویه‌ی مقاوم به سرمای Ft_1 در خمیر یخ زده.....۶۹
۳-۱۹. بررسی ارتباط مکانیسم‌های مقاومت به فشار اسمزی و سرما در سویه‌های جهش یافته‌ی مقاوم.....۷۱

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات

۴-۱. بررسی مخمرهای نانوایی تجاری.....۷۴
۴-۲. مقایسه و بررسی سویه‌های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه*.....۷۵
۴-۳. جهش زایی و جداسازی سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی.....۸۲
۴-۴. جداسازی سویه‌ی مقاوم به سرما.....۸۵
۴-۵. بررسی ارتباط مقاومت به فشار اسمزی و سرما.....۸۸
۴-۶. نتیجه‌گیری کلی.....۹۱
۴-۷. پیشنهادات ۹۲

پیوست ها:

۱- مسیر متابولیکی مصرف گلوکز در *ساکارومایسس سرویزیه* در تولید انرژی، اتانول وگلیسرول.....۹۳
۲- برخی از تست‌های مهم شناسایی *ساکارومایسس سرویزیه*.....۹۴

منابع و مآخذ.....۹۵

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱. ساختار و ترکیب دیواره ی سلولی *ساکارومایسس سرویزیه*.....۷

شکل ۱-۲. چرخه‌ی زندگی در *ساکارومایسس سرویزیه*.....۸

شکل ۱-۳. نقطه ی ورود نیتروژن معدنی به ترکیبات آلی.....۱۰

شکل ۱-۴. انتقال و متابولیسم قندها در *ساکارومایسس سرویزیه*.....۱۳

شکل ۱-۵. پاسخ سلولی ساکارومایسس سرویزیه در مواجه با استرس فشار اسمزی.....۲۲

شکل ۲-۱. تصویر شماتیک از سیستم اندازه گیری CO_2 تولید شده در خمیر.....۳۳

شکل ۲-۲. منحنی استاندارد ترهالوز به منظور اندازه گیری مقدار ترهالوز در سلول های مخمر.....۳۶

شکل ۲-۳. منحنی استاندارد گلوکز به منظور تعیین فعالیت آنزیم اینورتاز.....۳۷

شکل ۲-۴. دستگاه تابش دهنده ی UV۰ با مقادیر انرژی قابل تنظیم.....۳۸

شکل ۲-۵. تصویر شماتیک از تست بررسی حساسیت با روش Spot culture.....۳۹

شکل ۲-۶. سیستم اندازه گیری تولید CO_2 در محیط مایع.....۴۱

شکل ۳-۱. تاثیر مقادیر متفاوت ساکاروز موجود در خمیر بر فعالیت سلول های مخمر در تولید CO_2.....۴۵

شکل ۳-۲. تاثیر غلظت‌های متفاوت ساکاروز بر فرآوری خمیر توسط مخمرهای خشک فعال.....۴۶

شکل ۳-۳. منحنی رشد سویه‌ی F در محیط کشت YPD حاوی مقادیر متفاوت گلوکز.....۴۸

شکل ۳-۴. منحنی رشد سویه‌ی I در محیط کشت YPD حاوی مقادیر متفاوت گلوکز.....۴۸

شکل ۳-۵. منحنی رشد سویه‌ی Sدر محیط کشت YPD حاوی مقادیر متفاوت گلوکز.....۴۹

شکل ۳-۶. منحنی رشد سویه‌ی M در محیط کشت YPD حاوی مقادیر متفاوت گلوکز.....۴۹

شکل ۳-۷. منحنی رشد سویه‌ی P در محیط کشت YPD حاوی مقادیر متفاوت گلوکز.....۵۰

شکل ۳-۸. منحنی رشد سویه‌ی R در محیط کشت YPD حاوی مقادیر متفاوت گلوکز.....۵۰

شکل ۳-۹. منحنی رشد سویه‌ی K در محیط کشت YPD حاوی مقادیر متفاوت گلوکز.....۵۱

شکل ۳-۱۰. درصد بقای سلولی در مواجهه با استرس شوک اسمزی و NaCl.....۵۲

شکل ۳-۱۱. درصد بقای سلولی در مواجهه با استرس شوک حرارتی و میزان تجمع درون سلولی ترهالوز در سویه های صنعتی.....۵۳

شکل ۳-۱۲. درصد بقای سلولی پس از ذخیره ی سوسپانسیون سلولی سویه های صنعتی در دمای منفی 20°C.....۵۴

شکل ۳-۱۳. درصد بقای سلولی سویه ی K در اثر تابش UV با مقادیر انرژی معین.....۵۶

عنوان | صفحه

شکل ۳-۱۴. منحنی رشد سویه های مقاوم به فشار اسمزی در محیط YPD.....۵۷

شکل ۳-۱۵. منحنی رشد سویه های مقاوم به فشار اسمزی در محیط YPD حاوی ۰/۵MNaCl.....۵۸

شکل ۳-۱۶. منحنی رشد سویه های مقاوم به فشار اسمزی در محیط YPD حاوی۱MNaCl.....۵۸

شکل ۳-۱۷. منحنی رشد سویه های مقاوم به فشار اسمزی در محیط YPD حاوی ۱/۵MNaCl.....۵۹

شکل ۳-۱۸. منحنی رشد سویه های مقاوم به فشار اسمزی در محیط YPD حاوی سوربیتول.....۵۹

شکل ۳-۱۹. منحنی رشد سویه های مقاوم به فشار اسمزی در محیط YPD حاوی ۳۰٪ گلوکز.....۶۰

شکل ۳-۲۰. بررسی و مقایسه ی میزان حساسیت سویه های مقاوم به فشار اسمزی به روش spot culture.....۶۱

شکل ۳-۲۱. مقایسه‌ی کیفی قدرت فرآوری خمیر حاوی ۲۵٪ ساکاروز توسط سویه های مقاوم به فشار اسمزی.....۶۳

شکل ۳-۲۲. درصد بقای سلولی سویه‌ی K پس از اعمال دوره‌های استرس سرما و ذوب شدن.....۶۵

شکل ۳-۲۳. منحنی رشد سویه‌های K، Ft_1 و Ft_3 در محیط YPD.....۶۶

شکل ۳-۲۴. میزان بقای سلولی سویه‌های مقاوم به سرمای Ft_1 و Ft_3 و سویه‌ی K در طی ۲۱ روز ذخیره‌سازی در دمای ۲۰°C-.....۶۷

شکل ۳-۲۵. میزان تولید CO_2 در محیط Moderate sugar توسط سویه‌های مقاوم به سرمای Ft_1 و Ft_3 و سویه‌ی K.....۶۸

شکل ۳-۲۶. میزان تجمع درون سلولی ترهالوز درسویه های مقاوم به سرما.....۶۹

شکل ۳-۲۷. درصد فعالیت مخمر Ft_1 پس از ذخیره سازی در سرما.....۷۰

شکل ۳-۲۸. بررسی کیفی کارایی مخمرهای مقاوم به سرما.....۷۰

شکل ۳-۲۹. منحنی رشد سویه‌های K، Ft_1 و Ft_3 در محیط YPD حاوی ۳۰٪ سوربیتول.....۷۱

شکل ۳-۳۰. منحنی رشد سویه‌های K، Ft_1 و Ft_3 در محیط YPD حاوی ۱/۵ M NaCl.....۷۲

شکل ۳--۳۱. مقایسه میزان حساسیت سویه‌های مقاوم به سرمای Ft_1 و Ft_3 و سویه‌ی K در محیط های حاوی مواد استرس‌زا به روش spot culture.....۷۲

شکل ۳-۳۲. درصد فعالیت مخمرهای K_2 و K_1 پس از ذخیره سازی خمیرهای تهیه دردمای ۲۰°C-... ۷۳

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱. فهرست محیط‌های‌کشت‌میکروبی ،مواد شیمیایی به همراه فرمول و شرکت تولید کننده.....۲۷
جدول ۲-۲. دستگاه‌های مورد استفاده به همراه نام شرکت های تولید کننده‌ی آن.....۲۸
جدول ۲-۳. میزان قندهای قابل تخمیر، سوربیتول و نمک اضافه شده به محیط مایع مشابه خمیر.....۴۰
جدول ۳-۱. میزان تولید CO_2 توسط پودرهای مخمر تجاری در خمیرهای معمولی و شیرین.....۴۵
جدول ۳-۲. میزان تولید CO_2 توسط سویه های صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط مایع
مشابه خمیر.....۴۷
جدول ۳-۳. میزان تولید CO_2 توسط سویه‌های مقاوم به فشار اسمزی در محیط های مایع
مشابه خمیر.....۶۲
جدول ۳-۴. میزان ترهالوز و فعالیت آنزیم اینورتاز در سویه‌های K_3 ، K_2 و K_1 و K.....۶۴

فهرست فرمول‌ها

عنوان **صفحه**

فرمول۲-۱. نحوه‌ی محاسبه‌ی غلظت ترهالوز در سویه‌های مخمر.....۳۵
فرمول۲-۲. نحوه‌ی محاسبه‌ی میزان گلوکز آزاد شده در تعیین فعالیت آنزیم اینورتاز.....۳۷

فصل اول

مقدمه

۱-۱. تاریخچه

استفاده‌ی انسان از مخمرها و به‌کارگیری آن در تولید محصولات غذایی به دوران باستان باز می‌گردد. پیش تر از ۷۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح سومری ها[1] آبجو تولید می کردند و در ۳۵۰۰ سال قبل از میلاد در آشور[2] شراب تولید می‌شده است (Kurtzman and Fell, 1998). شواهد باستان شناسی حاکی از سابقه ۶۰۰۰ ساله‌ی به‌کارگیری مخمرهای جنس *ساکارومایسس سرویزیه* در تولید نان می باشد (Evans, 1990). مصریان باستان با به‌کارگیری توده‌ی زیستی مخمری حاصل از تولید آبجو، نان های با کیفیت بیشری تولید می‌کردند. این مهارت را یونانی‌ها فرا گرفته و آن را توسعه دادند به نحوی که در رم باستان در حدود ۲۵۰ نانوایی وجودداشته که با استفاده از توده‌ی زیستی مخمری به تولید نان می پرداختند (Wirtz, 2003). هر چند انسان ها حداقل به مدت ۹۰۰۰ سال از مخمرها در تولیدات غذایی استفاده می‌کردند اما این استفاده تنها بر حسب تجربه و اتفاق بدست آمده بود. اولین فردی که مخمرها را مشاهده کرد ون لیون هوک[3] در قرن هفدهم میلادی بود. گیلوساک[4]

---

[1] . Sumeria
[2] .Assyr
[3] .Van leeuwenhok
[4] .Gay-lussac

در سال ۱۸۱۰ توانست معادله میزان تولید الکل پس از انجام عمل تخمیر را محاسبه کند اما نتوانست میکروبی بودن این عمل را تشخیص دهد.

شوان[1] طی تحقیقاتی که بین سال های ۱۸۳۶ تا ۱۸۳۸ انجام داد مخمرها را بعنوان نوعی قارچ شناسایی کرد. ژولیوس می‌یرن[2] در سال ۱۸۳۸ سه گونه *ساکارومایسس* را شناسایی و نامگذاری کرد. می‌یرن *ساکارومایسس سرویزیه*[3] را از آبجو، *ساکارومایسس پوموروس*[4] را از آب سیب و *ساکارومایسس وینی*[5] را از شراب جداسازی کرد. در حقیقت می‌یرن اولین شخصی بود که *ساکارومایسس سرویزیه* را شناسایی، جداسازی و نام گذاری کرد. پس از آن تئوری میکروبی بودن عمل تخمیر باعث شد محققان زیادی به آزمایش در این مورد بپردازند و در نهایت پس از ۲۰ سال پاستور در سال ۱۸۶۰ اثبات کرد عمل تخمیر توسط میکروارگانیسم های زنده صورت می گیرد. امیل کریستین هانسن[6] در ابتدای دهه‌ی ۱۸۸۰ با توسعه روش‌های جداسازی و خالص سازی موفق شد تعدادی از سویه های مخمرهای صنعتی را بصورت خالص کشت دهد. هانسن بسیاری از مخمرها را نامگذاری و رده بندی نمود. در حقیقت دست یابی به کشت خالص سویه های استارتر صنعتی نقطه عطفی در توسعه علم بیوتکنولوژی غذایی بود (Donalies et al., 2008). بهینه سازی تولیدات صنعتی و غذایی با ابداع روش های جدید از اواخر قرن نوزدهم شکل گرفت بطور مثال در سال ۱۸۸۶ به‌کارگیری روش هوادهی در تولیدتوده‌ی زیستی مخمری در بریتانیا ابداع شد و در سالهای ۱۹۱۰تا ۱۹۲۰ محققان آلمانی و دانمارکی فرآیند کشت Fed Batch را ابداع کردند. در دهه ۱۹۳۰ تولید مخمر خشک فعال ابداع شد و این محصول به بازار عرضه شد (Wirtz, 2003).

با کشف ساختار DNA و دست یابی انسان به تکنیک های مهندسی ژنتیک تلاش ها برای بهبود خصوصیات صنعتی سویه‌های مخمری انجام شد. در سال ۱۹۹۰ در انگلستان اولین مخمر نانوایی صنعتی دست ورزی شده تولید شد اما به‌دلیل منع قانونی استفاده از میکروارگانیسم‌های دست ورزی شده در صنایع غذایی هیچگاه به بازار عرضه نشد (Kurtzman and Fell, 1998).

---

[1] .Schwan
[2] .Julius meyern
[3] .*Saccharomyces cerevisiae*
[4] .*S.pomorus*
[5] .*S.vini*
[6] . Emil Christian hansen

۱-۲. خصوصیات سلولی

۱-۲-۱. رده بندی و پراکندگی

ساکارومیست از دو لفظ saccharon به معنی قند و myketes در معنی قارچ تشکیل شده است. *ساکارومایسس سرویزیه* یک میکروارگانیسم تک سلولی است که توسط جوانه زنی تکثیر می یابد و یکی از اعضای گروه مخمرها می باشد. واژه yeast از کلمه Gist یا Gyst که یک کلمه انگلیسی قدیمی است گرفته شده و منشا آن در زبان هندواروپایی کلمه yes به معنی Bubble ، Foam، Boil می باشد. واژه yeast در معنی مخمر موقعیت تاکسونومی ندارد. مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* طبق رده بندی الکسوپولس[1] و میمس (۱۹۷۹) در سلسله قارچ ها، شاخه *آسکومایکوتا*[2]، راسته *ساکارومایستال‌ها*[3] فامیل *ساکارومایستاسه*[4]، زیر فامیل *ساکارومایستوایده*[5]، جنس *ساکارومایسس* و گونه *سرویزیه* قرار دارد. اعضای راسته *ساکارومایستال ها* توانایی رشد در محیط هایی با رطوبت کم را دارند بنابراین در محیط‌هایی که برای بسیاری از میکروارگانیسم های دیگر مناسب نیست به راحتی رشد کرده و در رقابت کمتری برای تسخیر نیچ‌های[6] اکولوژیک خاص قرار دارند. گونه های مختلف *ساکارومایستال*ها در مواد مترشحه شیرین گیاهان مثل صمغ های لزج در زخم گیاهان و شهد گلها، در سطح میوه های سالم و پوسیده، در فرآورده های تولید شده از میوه‌جات که غلظت قند بالایی دارند و حتی در آب‌های شور که برای نگهداری ترشیجات استفاده می‌شوند حضور دارند. حتی گونه هایی از آب‌های سطحی شور و شیرین، دستگاه گوارشی پستانداران، مدفوع پستانداران و از حشراتی که آن‌ها را منتشر می کنند جداسازی شده اند (Alexopoulos et al., 2000).

۱-۲-۲. ساختار سلولی

سلول‌های *ساکارومایسس سرویزیه* عموماً بیضی[7] شکل با ابعادی در حدود ۱۰-۵ µm و ۳-۱ µm می باشد، حجم سلول ها بطور متوسط در سلول هاپلوئید ^{3} µm ۲۹ و در سلولهای دیپلوئید ^{3} µm ۵۰ می باشد. سویه‌های صنعتی بدلیل دیپلوئید یا پلی پلوئید بودن از سویه‌های آزمایشگاهی بزرگتر می باشند. همانند دیگر سلول‌های یوکاریوتی یک سلول *ساکارومایسس سرویزیه* حاوی هسته، میتوکندری، شبکه گلژی، وزیکول های ترشحی ،

---

[1] . Alexopoulos and Mims
[2] .*Ascomycota*
[3] .*Saccharomycetales*
[4] .*Saccharomycetaceae*
[5] .*Saccharomycetoideae*
[6] .Niches
[7] .Ellipsoidal

شبکه آندوپلاسمی، واکوئل ها و میکروبادی ها ، ریبوزوم ها، شبکه اسکلت سلولی و پلاسمیدهای احتمالی می باشد. محتوای سلولی توسط پوشش[۱] احاطه شده است . پوشش سلولی از غشای پلاسمایی[۲]، فضای پری پلاسمی[۳] و دیواره سلولی[۴] تشکیل شده است. غشای پلاسمایی به ضخامت ۷۵nm همانند سایر غشاهای زیستی از دو لایه لیپید به همراه پروتئین‌ها تشکیل شده است. اجزای اصلی لیپیدی غشا شامل فسفولیپیدها[۵](فسفاتیدیل کولین[۶]، فسفاتیدیل اتانل امین[۷] و در مقادیر کمتر فسفاتیدیل سرین[۸]، فسفاتیدیل اینوزیتول[۹] و فسفاتیدیل گلیسیرول[۱۰]) و استرول‌ها[۱۱] (ارگوسترول[۱۲]، زیمواسترول[۱۳] و در مقادیر کمتر فکوسترول[۱۴] و لانوسترول[۱۵]) می‌باشد. فسفولیپیدها سبب سیالیت واسترول‌ها سبب یکپارچگی غشاها می‌شوند. مقدار و ترکیب لیپیدها در بین سویه‌ها[۱۶] متفاوت می-باشد. بطور مثال سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* که در صنایع تولید الکل به کار می‌روند میزان فسفاتیدیل کولین غشای سلولی آنها ده برابر بیشتر از سویه‌های به‌کارگرفته در مخمر نانوایی است. در حقیقت بسیاری از خصوصیات صنعتی سویه ها توسط ترکیب غشای پلاسمایی تعیین می‌شود. بطور نمونه توانایی سویه‌های مخمری در تولید و تحمل اتانول وابسته به نوع اسیدهای چرب غیراشباع و استرول های غشایی پلاسمایی است. به طوری که سلولهایی که غشای آنها غنی از اسید چرب لینولئیل[۱۷] و ارگوسترول است مقاومت زیادی به اتانل دارند(Walker, 1998). تغییر هدفمند در نوع اسیدهای چرب تشکیل دهنده غشا می‌تواند منجر به تولید سویه-های مقاوم در برابر استرس شود (Rodriguez-Vargas et al., 2007). اجزای پروتئینی غشا شامل : پروتئین های ناقل، بیوسنتزکنندگان دیواره سلولی، ناقلین سیگنال‌های داخل غشایی، لنگرهای اسلکت سلولی و پروتئین های ناقل کاست‌های[۱۸] متصل شونده به ATP هستند . پس از غشای پلاسمایی، فضای پری پلاسمی به اندازه‌ی Å ۳۵-۳۴ قرار دارد این قسمت حاوی پروتئین‌های ترشحی مثل مانوپروتئین ها[۱۹]، و آنزیم های اینورتاز[۲۰]

---

[1] .Envelope
[2] . Plasmamembrane
[3] . Preplasmic space
[4] . Cell wall
[5] . Phospholipids
[6] . Phosphatidycholine
[7] . Phosphatidylethanolamine
[8] . Phosphatidylserine
[9] . Phosphatidyleninositol
[10] . Phosphatidylglycerol
[11] . Esterols
[12] . Ergosterol
[13] . Zymostrol
[14] . Fecosteroll
[15] . Lanosterol
[16] .Strains
[17] .Linoleyl
[18] .ATP binding cassette transporters
[19] .Manoproteins
[20] . Invertase