مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره چهارم (پیاپی ۲۵) زمستان ۱۳۹۴
صفحات ۳۲۹-۳۲۰

Original Article

بررسی تولید سوربیتول توسط *دبروما یسس هانسنئی*

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

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه زیست شناسی، [۴] استاد، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

چکیده

سابقه و هدف: سوربیتول یک پلی الکل شش کربنه است و خاصیت شیرین کنندگی و محلولیت بالای آن موجب شده تا از این پلی-اُل در صنایع غذایی به عنوان یک پیش ماده در تولید بسیاری از محصولات استفاده شود. امروزه تولید میکروبی سوربیتول به دلیل شرایط مناسب واکنش تخمیری، مقرون به صرفه بودن تولید آن و مشکلات محیطی ناچیز مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی تولید سوربیتول از سوکروز، توسط سویه مخمری *دبروما یسس هانسنئی* جداسازی شده از طبیعت انجام شد.

مواد و روش ها: به منظور جداسازی سویه مخمری تولید کننده سوربیتول از محیط کشت حاوی ٤٠ درصد گلوکز و ١ درصد عصاره مخمر استفاده گردید. پس از شناسایی مخمر با استفاده از تعیین توالی ژن ITS، چگونگی تخمیر و تولید سوربیتول از سوکروز مورد مطالعه قرار گرفت. سوربیتول تولید شده با روش های آنالیزی کروماتوگرافی لایه نازک، رنگ سنجی و کیت مگازایم مورد مطالعه کیفی و کمی قرار گرفت.

یافته ها: سویه مخمری تولید کننده سوربیتول، از گرده گل پنیرک جداسازی شد و به عنوان *دبروما یسس هانسنئی* شناسایی گردید. این سویه مخمری در محیط حاوی ۱۵۰ گرم بر لیتر سوکروز، پس از پنج روز میزان ۵/۲۳ گرم بر لیتر سوربیتول تولید نمود.

نتیجه گیری: در این بررسی سوربیتول توسط سویه مخمری *دبروما یسس هانسنئی* جداسازی شده از طبیعت تولید شد. با توجه به راندمان خوب تولید سوربیتول از سوکروز توسط مخمر، جداسازی مخمرهای بومی مولد سوربیتول و بهینه سازی شرایط تولید آن ها از اهمیت بسزایی برخوردار است.

واژگان کلیدی: سوربیتول، سوکروز، صنایع غذایی، *دبروما یسس هانسنئی*.

دریافت مقاله: اردیبهشت ماه ٩٤ پذیرش برای چاپ: مرداد ماه ٩٤

مقدمه

الکل های قندی دسته ای از پلی الکل ها هستند که دارای مزیت هایی مانند مقدار کالری پایین، خاصیت آنتی اکسیدانی، قدرت شیرین کنندگی و کاهش قند خون می باشند. به همین دلایل امروزه در صنایع غذایی به عنوان مکمل و جایگزین قندی مورد استفاده قرار می گیرند (١). سوربیتول (Sorbitol) از جمله پلی الکل هایی است که در حال حاضر به طور وسیعی استفاده می شوند. سوربیتول یک پلی الکل با طعم شیرین می باشد که به عنوان شیرین کننده، نرم کننده و یک ماده جاذب رطوبت در صنایع غذایی به کار می رود. تولید ویتامین C، سوربوز، پلاستیک های سنتزی، صمغ، کالاهای کاغذی (٢ و ٣) هیدروژن (٤)، سرامیک های آغشته با کربن (٥)، آلکان های مایع (٦) و پارافین (٧) از دیگر کاربردهای این پلی الکل می باشد (٢ و ٣). از آنجایی که این شیرین کننده وابسته به انسولین نمی باشد می توان از آن در غذاهای رژیمی افراد دیابتی نیز استفاده نمود (٨).

تولید جهانی سوربیتول بیش از ٥٠٠٠٠٠ تن در سال تخمین زده می شود. این ماده به طور متداول از طریق هیدروژناسیون

*) آدرس برای مکاتبه: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ٠٩١٣١٢٦٤١٤٦ پست الکترونیک: ایمیل: marzieh.shamee@yahoo.com

کاتالیتیکی شیره دی-گلوکز و با استفاده از کاتالیزور نیکل در دما و فشار تولید می گردد (۹). پس از هیدروژناسیون کاتالیتیکی، سوربیتول جمع آوری و خالص سازی می شود. اما این مراحل هزینه فرآیند تولید را بالا می بردند (۸).

تولید بیوتکنولوژیکی پلی الکل ها با استفاده از میکروارگانیسم ها به عنوان یک روش جایگزین صنعتی مورد مطالعه بسیاری قرار گرفته است (۱٦-۱۰). در سال ۱۹۸٤ تولید سوربیتول توسط باکتری *زایموموناس موبیلیس* (*Zymomonas mobilis*) از سوکروز یا مخلوط گلوکز و فروکتوز بررسی گردید (۱۷). تولید سوربیتول توسط این باکتری از طریق آنزیم گلوکز-فروکتوز اکسیدوردوکتاز موجود در پری پلاسم باکتری صورت می گیرد که به طور همزمان گلوکز را به گلوکونوگامالاکتون و فروکتوز را به سوربیتول تبدیل می کند (۲۰-۱۸). سوربیتول تولید شده در پری پلاسم باکتری تجمع می یابد تا سلول ها را از تاثیرات مضر فشار اسمزی بالای محیط حفظ نماید (۸). علاوه بر تولید سوربیتول توسط باکتری *زایموموناس موبیلیس* مطالعات دیگری در مورد تولید بیوتکنولوژیکی سوربیتول توسط مخمرها نیز صورت گرفته است. مخمرها از مدت ها پیش در صنایع مختلف و صنایع غذایی مورد استفاده قرار گرفته اند. به طوری که به دلیل عدم بیماریزایی به عنوان یک منبع سالم شناخته شده اند (۲۱). مجموعه عوامل بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی در پراکندگی موفق مخمرها دخالت دارند (۲۲). از جمله زیستگاه های مخمرها می توان به گیاهان اشاره کرد. گیاهان به دلیل داشتن توانایی فتوسنتز و ساختن بسیاری از ترکیبات کربنی متنوع، زیستگاه مناسبی را برای مخمرهای مختلف مهیا می سازند. از جمله مخمرهای مولد سوربیتول می توان به سویه های *کاندیدا بوئیدینی* (*Candida boidinii*) (۲۳)، *آئروبازیدیوم پولولانس* (*Aureobasidium pullulans*) (۲٤) و *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) (۲۵) اشاره نمود.

این مطالعه برای اولین بار در ایران با هدف بررسی تولید سوربیتول توسط سویه مخمری *دبرومایسس هانسنئی* جداسازی شده از گرده گل پنیرک انجام شد.

مواد و روش ها

الف) جداسازی مخمرهای مولد سوربیتول: جداسازی سویه مخمری در اردیبهشت ۹۲ از پارک های شهر اصفهان انجام شد. به منظور جداسازی مخمر مولد سوربیتول ابتدا نمونه هایی مانند برگ درختان، گل ها و میوه ها به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس در آب خیسانده شدند.

سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول های یاد شده به ارلن های حاوی محیط های جداسازی (٤۰٪ گلوکز و ۱٪ عصاره مخمر و pH ۵) منتقل گردیدند و در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند (۲٦). پس از ۵ روز، از محیط های مایع به محیط های جداسازی جامد تلقیح شد و پس از دو روز گرماگذاری ویژگی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی ها بررسی گردید. این مخمرها در محیط های شیب دار YPD (Yeast Pepton Dextrose Agar) (مرک، آلمان) حاوی ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۲۰ گرم بر لیتر پپتون، ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۲۰ گرم بر لیتر آگار در دمای ٤ درجه سلیسیوس تا زمان بررسی تولید سوربیتول نگهداری شدند (۲۷).

ب) تولید سوربیتول توسط مخمرهای جدا شده: به منظور تولید توده زنده (بیومس) یک لوپ از مخمر مورد نظر به فلاسک های ارلن مایر ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت شامل ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲۰ گرم بر لیتر پپتون، ۱ گرم بر لیتر سولفات منیزیم، ۲ گرم بر لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات و ۱ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم اضافه گردید و در دمای ۲۸ درجه سلیسیوس به مدت ۳٦ ساعت بر روی شیکر (۱۸۰ دور در دقیقه) گرماگذاری شد. سپس با سانتریفیوژ کردن محلول ها در ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه، سلول های مخمری رسوب داده شدند. پس از ۲ بار شستشوی این سلول ها با آب دیونیزه، توانایی آن ها در تبدیل سوکروز به سوربیتول بررسی گردید. واکنش تبدیل در ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی

۱۵۰ گرم بر لیتر سوکروز و ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر انجام شد (۲٤ و ۲۵).

ج) *شناسایی سوربیتول:* در مراحل ابتدایی از کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layar Chromatography (TLC)) به عنوان یک روش آنالیزی ساده و سریع به منظور شناسایی کیفی سوربیتول استفاده شد. در این روش ترکیبات بر اساس قطبیت و وزن مولکولی جداسازی می شوند. به طور خلاصه مقدار ۱ میکرولیتر از محیط حاوی سوربیتول تولید شده توسط مخمر بر روی کاغذهای سیلیکاژل TLC (مرک، آلمان) قرار گرفت. کاغذ به مدت ۲ ساعت در حلال شامل پروپانل-بوتانل-آب (مرک، آلمان) به نسبت ۱:۲:۷ قرار داده شد. سپس به منظور ظهور لکه های ایجاد شده، بر روی کاغذ رنگ (هیدروکسید سدیم-پرمنگنات پتاسیم) (مرک، آلمان) اسپری گردید. پس از خشک شدن، تولید سوربیتول مورد بررسی قرار گرفت (۲۸). در ادامه سوربیتول تولید شده توسط مخمر مورد نظر که ابتدا با روش کروماتوگرافی لایه نازک جداسازی گردید، با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت مگازایم ایرلند نیز شناسایی و مورد تایید قرار گرفت.

به منظور تشخیص کیفی و کمی سوربیتول تولید شده توسط مخمر، از روش رنگ سنجی (Colorimetric method) نیز استفاده گردید. در این روش ابتدا مقداری از محیط براث تخمیری که حاوی سوربیتول تولید شده بود، در اپندرف ۱۰۰۰ میکرولیتری ریخته شد. پس از انجام سانتریفیوژ به منظور رسوب سلول های مخمری، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول روماند با ٤۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این مخلوط با ۱ میلی لیتر سدیم متاپریودات ۰/۰۱۵ مولار که در اسیدکلریدریک ۰/۱۲ مولار حل شده بود، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ۲ میلی لیتر رامنوز ۰/۱ درصد و در نهایت ٤ میلی لیتر معرف ناش (۱۵۰ گرم بر لیتر آمونیوم استات، ۲ میلی لیتر بر لیتر استیک اسید و ۲ میلی لیتر بر لیتر استیل استن) به آن اضافه گردید. مخلوط یاد شده به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۵۳ درجه سلیسیوس نگهداری شد. پس از سرد کردن، مقدار سوربیتول تولید شده در طول موج ٤۱۲ نانومتر اندازه گیری گردید (۲۹).

د) *اندازه گیری قند باقی مانده:* از سوکروز به عنوان منبع کربن استفاده و منحنی قند باقی مانده رسم گردید. در اندازه گیری قند سوکروز از معرف آنترون استفاده شد. به طور خلاصه به منظور ساخت معرف آنترون مقدار ۰/۸ گرم معرف آنترون به ۵۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک سرد و رقیق (برای تهیه اسید رقیق، ٤۸۵ میلی لیتر از اسید سولفوریک غلیظ را با ۵۰ میلی لیتر از آب سرد مخلوط کرده، سپس آن را به مدت ۱۲ ساعت در یخچال قرار داده تا اسید حاصله سرد گردد) اضافه گردید. معرف یاد شده رنگی بین زرد-سبز دارد و ایجاد هر گونه رنگ سبز تیره معرف آلودگی ظروف با قند است.

به منظور اندازه گیری سوکروز با آنترون ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از براث فاقد سلول با ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید. سپس به ۱۰ میکرولیتر از آن که با ۹۹۰ میکرولیتر آب مقطر ترکیب شده بود، مقدار ۵ میلی لیتر معرف آنترون اضافه شد. نمونه یاد شده به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سلیسیوس جوشانده شد. در نهایت جذب آن در طول موج ٦۲۰ نانومتر (محلول کنترل: آب مقطر) مطالعه گردید (۳۰).

ه) *اندازه گیری بیومس میکروبی:* اندازه گیری توده زنده هم زمان با اندازه گیری بیشینه تولید سوربیتول صورت گرفت. به این ترتیب که محیط کشت تخمیری در ٦۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس با آب مقطر ۲ بار شستشو داده شد. در نهایت در دمای ۱۰۰ درجه سلیسیوس تا ثابت شدن وزن، خشک گردید (۲۷).

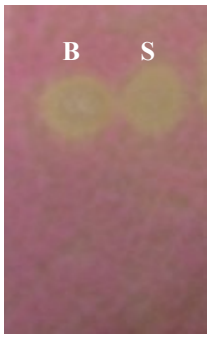
و) *استخراج DNA:* برای این منظور ابتدا مخمر مورد نظر در محیط عصاره مخمر-پپتون-گلوکز (Yeast Extract Peptone Glucose) مایع کشت داده شد. سلول ها پس از جداسازی با استفاده از آب مقطر شستشو داده شدند. سپس سلول ها با بافر لیز کننده (حاوی تریتون X-100 سدیم دودسیل سولفات (SDS)، کلرید سدیم، تریس-اسید کلریدریک و اتیلن-دی-آمین-ترا استیک اسید)، دانه های شیشه ای (٦۰۰-٤۲۵ میکرون) و محلول فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۵:۲٤:۱)

ترکیب شدند. مخلوط یاد شده به مدت ۵-۳ دقیقه شدیداً ورتکس گردید. سپس به محتویات یاد شده بافر Tris-EDTA (حاوی ۱۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک (pH ۷/٦) و یک میلی مولار اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (pH ۸)) اضافه شد. به منظور انحلال DNA در بافر Tris-EDTA عمل مخلوط سازی به آرامی انجام شد.

پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، به محلول روماند به میزان دو برابر حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. این مخلوط چند مرتبه به آرامی معکوس شد. پس از سانتریفیوژ، محلول روماند دور ریخته شد و پس از تبخیر شدن ایزوپروپانول، در زیر هود به رسوب باقی مانده ۱۰۰ میکرولیتر بافر Tris-EDTA اضافه شد. DNA در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری گردید (۳۱).

ز) *شناسایی مخمرها با استفاده از روش مولکولی:* برای این منظور از پرایمرهای ITS (Internal Transcribed Spacer) با توالی ITS1-F:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' و ITS4-R:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' استفاده گردید (۳۲). واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره پلی مرازی (10x)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۲۵ میلی مولار)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم تک پلی مراز (۵ واحد بر میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدها (۰/۲ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد.

سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (اپندرف، آلمان) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس محصول PCR به ژل آگارز ۱



شکل ۱: کروماتوگرافی لایه نازک حاصل از سوربیتول تولید شده. B: سوربیتول شاهد، S: سوربیتول تولید شده توسط سویه *دبروماییسس هانسنئی*.

درصد منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه BioDoc Analyze مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت محصول PCR توسط شرکت فزاپژوه تعیین توالی شد. توالی به دست آمده در سایت NCBI جستجو شد تا نام جنس و گونه مخمر مورد نظر مشخص شود.

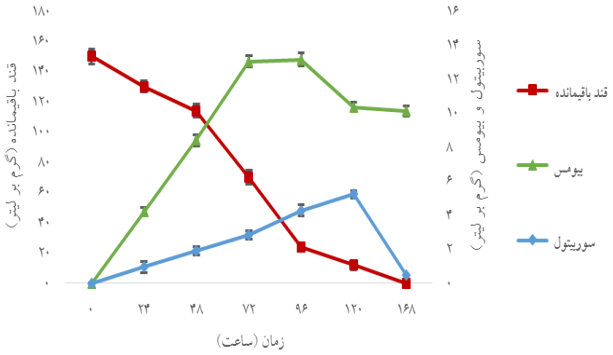
یافته ها

الف) جداسازی مخمرهای مولد سوربیتول: در این مطالعه در مجموع ٦ جدایه مخمری مولد سوربیتول جداسازی گردید. ایزوله شماره ٦ سویه مخمری به عنوان *دبروماییسس هانسنئی* معرفی شد. *دبروماییسس هانسنئی* دارای کلنی های نرم، صاف و کرم رنگ بر روی محیط پپتون- دکستروز-آگار بود.

ب) شناسایی کیفی و کمی سوربیتول تولید شده: مخمر *دبروماییسس هانسنئی* پس از ۲٤ ساعت توانست سوربیتول را از قند سوکروز تولید نماید. سوربیتول تولید شده در روز سوم بر روی کاغذ TLC در شکل ۱ نشان داده شده است. مقدار ۱۰ گرم بر لیتر سوربیتول به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. همچنین سوربیتول تولید شده با استفاده از کیت نیز شناسایی و مورد تایید قرار گرفت. اما میزان سوربیتول تولیدی تنها با استفاده از روش رنگ سنجی اندازه گیری شد. بیشترین میزان تولید سوربیتول ۵/۲۳ گرم بر لیتر در روز پنجم مشاهده شد همچنین مقدار قند سوکروز باقی مانده و مقدار بیومس، طی این فرآیند تخمیر اندازه گیری شد.

جدول ۱: مقادیر اندازه گیری شده حاصل از فرآیند تخمیر انجام شده توسط سویه مخمری *دبروماییسس هانسنئی* .

زمان (ساعت)	سوربیتول (گرم بر لیتر)		بیومس (گرم بر لیتر)		سوکروز (گرم بر لیتر)	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
۰	۰	۰/۰۰	۰	۰/۰۰	۱۵۰	٤/۷٦
۲٤	۰/۹۵	۰/۳۱	٤/۲۰	۰/۲۳	۱۳۰	۳/٦۹
٤۸	۱/۹۰	۰/۲٤	۸/٤	۰/۳٤	۱۱٤	٤/۲۳
۷۲	۲/۸۵	۰/۲٦	۱۳/۰٤	۰/۳۲	۷۰	٤/۵
۹٦	٤/۲۸	۰/۳۱	۱۳/۱٤	۰/۳۹	۲٤	۲/۷۱
۱۲۰	۵/۲۳	۰/۲۱	۱۰/۳٦	۰/۲۹	۱۲	۳/۱۳
۱٦۸	۰/٤۷	۰/۰۰	۱۰/۱۲	۰/۲۸	۰	۰/۰۰



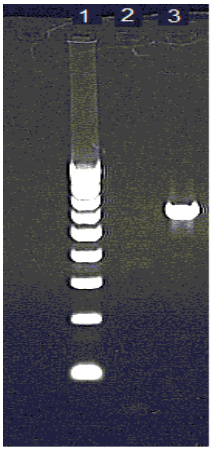
نمودار ۱: منحنی تولید سوربیتول توسط مخمر *دبروماییسس هانسنئی* .

مقدار بیومس در این روز ۱۰/۳٦ گرم بر لیتر بود که پس از گذشت ٦ روز مقدار سوربیتول به ۰/٤۷ گرم بر لیتر کاهش یافت (جدول ۱ و نمودار ۱).

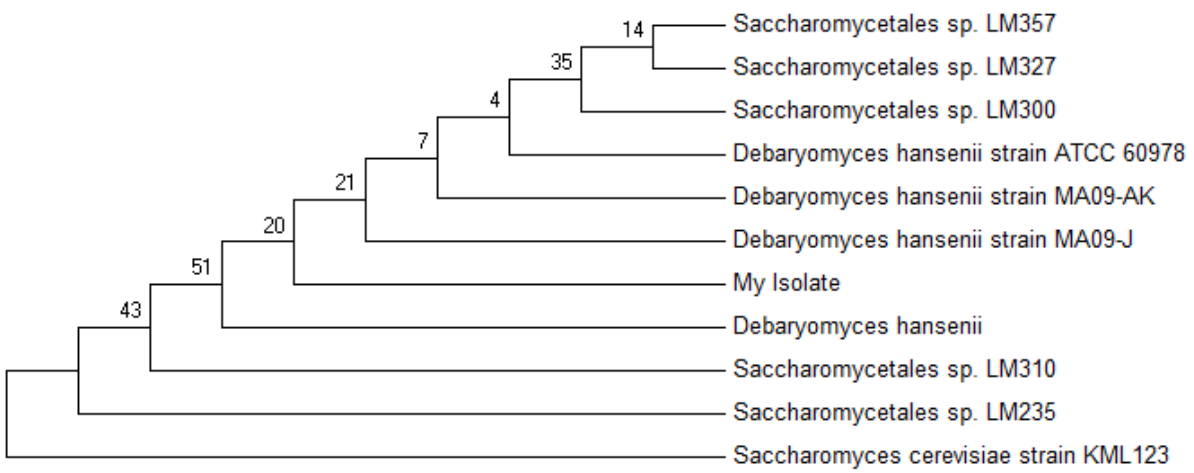
ج) شناسایی مخمرها توسط تعیین توالی RNA ریبوزومی: قطعات به دست آمده از هر مخمر پس از PCR بر روی ژل آگارز برده شدند تا خالص بودن و اندازه نسبی آن ها مشخص گردد. طول قطعات به دست آمده با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 در مخمرهای مختلف، متفاوت و شامل قسمتی از ITS4–5.8srRNA–ITS1–18srRNA و قسمتی از 28S rRNA بود (شکل ۲). نتایج تعیین توالی حاکی از تشابه ۹۸ درصدی مخمر جداسازی شده با *دبروماییسس هانسنئی* بود. شکل ۳ درخت فیلوژنی را به کمک نرم افزار مگا ۵ و با الگوریتم حداکثر درست نمایی (Maximum likelihood) و Neighbour joining نشان می دهد.

بحث

در این مطالعه برای اولین بار، سوربیتول به عنوان محصول اصلی متابولیسم سوکروز توسط مخمر *دبروماییسس هانسنئی* (جدا شده از گرده گل پنیرک)، تولید گردید. مقادیر سوربیتول تولید شده با استفاده از روش رنگ سنجی اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که میزان تولید سوربیتول تا روز پنجم روند افزایشی داشته است. اما پس از گذشت ۱۲۰ ساعت با اتمام قند موجود در محیط، تولید سوربیتول کاهش و نهایتاً به صفر رسید. نکته قابل توجه این که اگر قند موجود در محیط بیشتر باشد به دلیل افزایش اسمولاریته



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR سویه جداسازی شده. ستون ۱) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲) کنترل منفی (آب مقطر)، ستون ۳) مخمر *دبروماییسس هانسنئی* .



شکل ۳: درخت فیلوژنی سویه جداسازی شده در این مطالعه.

محیط، خارج از پتانسیل اسمزی مخمر مورد نظر خواهد بود. به همین دلیل است که بیشترین میزان سوربیتول تولید شده در روز پنجم مشاهده می شود.

بیشترین مطالعات مربوط به تولید سوربیتول بر روی سویه مخمری *کاندیدا بوئیدینی* انجام شده است. وانگ سوانلرت (Vongsuvanlert) و تانی (Tani) آنزیم زایلوز ایزومراز را که در تولید سوربیتول از گلوکز درگیر است را از این مخمر متانولی تخلیص و جداسازی نمودند (۲۳).

ساساهارا (Sasahara) و ایزوموری (Izumori) سویه LP 23 *آئروبازیدیوم پولولانس* را از خیسانده سس سبوس در محیط کشت حاوی یک درصد L فروکتوز و ۰/۱ درصد D گلوکز جداسازی کردند. این سویه قادر به تولید L سوربیتول از L فروکتوز بود. بررسی ها نشان داد که با افزودن اریتریتول به مخلوط واکنش، سرعت تولید افزایش می یابد (۲٤).

میکروارگانیسم دیگری که بیشترین مطالعات بر روی آن صورت گرفته *زایمومونس موبیلیس* می باشد. در یک بررسی ویکاری (Viicari) و همکاران قابلیت باکتری *زایمومونس موبیلیس* مولد اتانول را در تولید سوربیتول از سوکروز تعیین نمودند. آنها به این نتیجه رسیدند که در محیط حاوی سوکروز به دلیل تولید سوربیتول و لوان بازده تولید اتانول کمتر از محیط کشتی است که دارای گلوکز یا فروکتوز می باشد. نتایج نشان داد که در محیط حاوی ۱۵۰ گرم بر لیتر سوکروز راندمان تولید لوان و سوربیتول به ترتیب ۸ و ۱۱ درصد است (۱۷).

سوخئو (Sookkheo) و همکاران نیز تولید سوربیتول را از سوکروز در این باکتری بررسی کردند. آن ها از دو سویه *زایمومونس* استفاده و فعالیت هیدرولیز سوکروز و تشکیل سوربیتول را در آن ها مقایسه نمودند. از آنجایی که بازده سوربیتول *زایمومونس موبیلیس* IFO 13756 بیشتر بود، تخمیر قند در این سویه مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی آن ها نشان داد که بیشترین بازده سوربیتول زمانی است که این سویه ۲۵۰ گرم بر دسی متر مکعب سوکروز را در محیط کشتی با pH ۷/۵ و دمای ۳۰ درجه سلیسیوس استفاده می کند (۳۳).

رو (Ro) و کیم (Kim) تبدیل زیستی سوکروز به سوربیتول توسط *زایمومونس موبیلیس* تیمار شده با تولوئن و اینورتاز را مورد ارزیابی قرار دادند (۳٤). در مطالعه دیگری باروس (Barros) و همکاران تولید سوربیتول توسط *زایمومونس موبیلیس* را با بهینه سازی غلظت سوکروز بررسی کردند. آن ها نشان دادند که بهترین سوربیتول تولیدی در محیط کشت حاوی ۲۰۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۳٦/۰۹ گرم بر لیتر، در مدت زمان ۳٦ ساعت بود. اما پس از این زمان مقدار سوربیتول تولید شده با کاهش همراه بود (۲).

با توجه به این مطالعات در پژوهش حاضر برای اولین بار مخمر *دبرومایسس هانسنئی* به عنوان مولد سوربیتول از طبیعت جداسازی و معرفی گردید. این مخمر توانست ۵/۲۳ گرم بر لیتر

سوربیتول را در محیط حاوی ۱۵۰ گرم بر لیتر سوکروز تولید کند. این میزان تا حدودی نزدیک به یافته های به دست آمده در مطالعات دیگر می باشد.

نتیجه گیری

با توجه به خواص ارزشمندی که سوربیتول دارد و با در نظر گرفتن معایب روش شیمیایی تولید سوربیتول، این شیرین کننده طبیعی به طریق بیوتکنولوژیکی توسط سویه مخمری جداسازی شده از طبیعت تولید شد. بنابراین می توان از آن به عنوان جایگزین قندی در صنایع مختلف شیمیایی، غذایی و دارویی استفاده نمود. امید است با جداسازی سویه های مخمری مولد سوربیتول، شناسایی اولیه این سویه ها و بهینه سازی شرایط محیطی واکنش زیستی در آینده از مخمرها به عنوان زیست واکنشگرهایی کارآمد برای تولید زیستی سوربیتول در مقیاس های بزرگتر از مقیاس آزمایشگاهی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان و دانشگاه آزاد فلاورجان به دلیل حمایت های مالی همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Granstrom TB, Izumori K, Leisola M. A rare sugar xylitol PartI: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. Appl Microbiol Biotechnol. 2007; 2: 277-281.
2. Barros M, Celligoi MAPC, Vignoli JA, Vargas LHM. Influence of ultrasound on sorbitol release by *Zymomonas mobilis* grown on high sucrose concentration. Braz Arch Biol Technol. 2006; 49(3): 371-374.
3. Silveira MM, Jonas R. The biotechnological production of sorbitol. Appl Microbiol Biotechnol. 2002; 59(4-5): 400-408.
4. He L, Chen D. Hydrogen production from glucose and sorbitol by sorption-enhanced steam reforming: challenges and promises. Chem Sus Chem. 2012; 5(3): 587-595.
5. Neira D'Angelo MF, Ordomsky V, Schouten J C, van der Schaaf J, Nijhuis TA. Carbon-coated ceramic membrane reactor for the production of hydrogen by aqueous-phase reforming of sorbitol. Chem Sus Chem. 2014; 7(7): 2007-2015.
6. Zhang Q, Wang T, Xu Y, Zhang Q, Ma L. Production of liquid alkanes by controlling reactivity of sorbitol hydrogenation with a Ni/HZSM-5 catalyst in water. Energ Convers Manage. 2014; 77: 262-268.
7. Zhang J, Li J, Wu SB , Liu Y. Advances in the catalytic production and utilization of sorbitol. Ind Eng Chem Res. 2013; 52(34): 11799-11815.
8. Barros M, Celligoi MAPC. Synthesis of sorbitol by *Zymomonas mobilis* under high osmotic pressure. J Microbiol. 2006; 37(3): 324-328.
9. Akinterinwa O, khankal R, Cirino PC. Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. Curr Opin Biotechnol. 2008; 19(5): 461-467.
10. Wei W, Wu K,- Qin Y, Xie Z, Zhn X. Intergeneric protoplast fusion between *Kluyveromyces* and *Saccharomyces cerevisiae*- to produce sorbitol from Jerusalem artichokes. Biotech Let. 2001; 23 (10): 799-803.

11. Tomaszewska L, Rywińska A, Gładkowski W. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. J Ind Microbiol Biotechnol. 2012; 39 (9): 1333-1343.

12. Tomaszewska L, Rakicka M, Rymowicz W, Rywińska A. A comparative study on glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. FEMS Yeast Res. 2014; 14(6): 966-976.

13. Ghezelbash G, Nahvi I, Rabbani M. Study of polyols production by *Yarrowia lipolytica* in batch culture and optimization of growth condition for maximum production. Jundishapur J Microbiol. 2012; 5(4): 546-549.

14. Prakash G, Varma AJ, Prabhune A, Shouche Y, Rao M. Microbial production of xylitol from d-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Bioresource Technol. 2011; 102(3): 3304-3308.

15. Perez-Bibbins B, Oliveira RRS, Torrado A, Aguilar-Uscanga MG, Dominguez JM. 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 Eng. 2014; 98: 151-161.

16. Perez-Bibbins B, Salgado JM, Torrado A, Aguilar-Uscanga MG, Dominguez JM. Culture parameters affecting xylitol production by *Debaryomyces hansenii* immobilized in alginate beads. Process Biochem. 2013; 48(3): 387-397.

17. Viikari L. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. Appl Microbiol Biotechnol. 1984; 19(4): 252-255.

18. Bekers M, Laukevics L, Karsakevich A, Ventina E, Kaminska E, Upit D, Vina I, Linde R, Scherbaka R. Levan ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilised by attachment and entrapment. Process Biochem. 2001; 36(10): 979-986.

19. Springer GA. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. FEMS Microbiol Lett. 1996; 145(3): 301-307.

20. Wang C, Liu C, Hong J, Zhang K, Ma Y, Zou S, Zhang M. Unmarked insertional inactivation in the *gfo* gene improves growth and ethanol production by *Zymomonas mobilis* ZM4 in sucrose without formation of sorbitol as a by-product, but yields opposite effects in high glucose. Biochem Eng J. 2013; 72: 61-69.

21. Vakhlu J, Kour A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electron J Biotechn. 2006; 9(1): 69-85.

22. Kurtzman CP, Fell JW. The yeast: a taxonomic study. 4th ed. Elsevier publication. New York; 1998.

23. Vongsuvanlert V, Tani Y. Purification and characterization of xylose isomerase of a methanol yeast, *Candida boidinii*, which is involved in sorbitol production from glucose. Agricl Biol Chem. 1988; 52(7) :1817-1824.

24. Sasahara H, Izumori K. Production of l- sorbitol from l-fructose by *Aureobasidium pullulans* LP23 isolated from soy sauce mash. J Biosci Bioeng. 2005; 100(2): 223-226.

25. Duvnjak Z, Turcotte G, Duan ZD. Production of sorbitol and ethanol from Jerusalem artichokes by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36859. Appl Microbiol Biotechnol. 1991; 35(6): 711-715.

26. Rao RS, Prahasham RS, Prasad KK, Rajesham S, Sarma PN, Rao LV. Xylitol production by Candida sp. : Parameter optimization using Taguchi approach. Process Biochem. 2004; 39(8): 951- 956.

27. Altamirano A, Vazquez De, Figueroa LIC. Isolation and identification of xylitol- producing yeasts from agricultural residues. Folia Microbiol. 2000; 45(3): 255-258.

28. Zagustina NA, Rodionova NA, Mestechkina NM, Shcherbukhin VD, Bezborodov AM. Xylitol production by a culture of *Candida guilliermondi* 2581. Appl Biochem Microbiol. 2001; 37(5): 489-492.

29. Bok SH, Demain A. An improved colorimetric assay for polyols. Ann Rev Biochem. 1977; 81 (1): 18-20.

30. Millier GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959; 31(3): 426-428.

31. Hoffman CS. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons. New York; 1997.

32. Deak T, Chen J, Beuchat LR. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. Appl Environ Mirobiol. 2000; 66: 4340- 4344.

33. Sookkheo B, Phutrakul S, Kanasawud P. Production of sorbitol and ethanol from sucrose by *Zymomonas mobilis*: sugar fermentation. J Sci Soc Thailand. 1991; 17(3-4): 123-135.

34. Ro H, Kim H. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from sucrose using invertase and an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. Enzyme Microb Technol. 1991; 13 (11): 920-924.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 4, January 2016

Original Article

Evaluation of sorbitol production by *Debaryomyces hansenii*

Marzieh Shamee[1], **Forough Asgary Karchegany**[1], **Gholamreza Ghezelbash**[2], **Vajiheh Karbasizade**[3], **Iraj Nahvi**[4]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Falavarjan branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Biology, Falavarjan branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
[4]Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Sorbitol is a 6- carbon polyol, which is used in food industries as a precursor for production of many products due to its sweetness and high solubility. The application of microbial process for sorbitol production has recently been becoming of point of interest because of requirement for suitable fermentative conditions, being cost effective and less environmental pollutions. The purpose of this study was to produce sorbitol from sucrose by *Debaryomyces hansenii* isolated from the nature.

Materials & Methods: The sorbitol producing yeast strain was isolated in a medium containing 40% glucose and 1% yeast extract. Following identification of yeast using ITS gene sequencing, we focused on the process of fermentation and production of sorbitol from sucrose. The quality and quantity of sorbitol production was analyzed by thin layer chromatography, colorimetric method and Megazime kit.

Results: The sorbitol producing yeast strain was isolated from pollen of *Malva sylvestris* flower, and was identified as *D. hansenii*. This strain produced 5.23 g l^{-1} sorbitol after 5 days in medium containing of 150 g l^{-1} sucrose.

Conclusion: In this study sorbitol was produced by a *D. hansenii* isolated from the nature. Due to high efficiency of sorbitol production from sucrose by yeast, isolation of sorbitol producing native yeasts and optimization of the production conditions can be helpful for increases in quality and quantity of sorbitol production.

Keywords: Sorbitol, Sucrose, Industrial food, *Debaryomyces hansenii.*

Correspondence to: Marzieh Shamee

Tel: +98 9131264146

E-mail: marzieh.shamee@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 8(4): 320-329.