



Production of Yeast Extract Based on the Use of Beet Molasses in the Cultivation of *Saccharomyces Cerevisiae*

S. Kanjouri¹, A. R. Habibi^{2*}

1- M. Sc. Student of Chemical Engineering, Razi University

2- Associate Professor of Chemical Engineering, Razi University

Email: a.habibi@razi.ac.ir

Abstract

*This study aimed to reduce the production cost of yeast extract by the batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* on beet molasses as the sole carbon source under the aerobic condition. The inhibitory effect of the substrate on yeast growth up to a concentration of 100 g L⁻¹ was not observed and the Monod-kinetic model with constants $\mu_{max} = 0.151 \text{ h}^{-1}$ and $K_S = 10.30 \text{ g L}^{-1}$ described perfectly the yeast growth. Also, in the cell maintenance energy modeling, the values of $m_S = 0.0518 \text{ g g}_{cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $Y_{XS,t} = 1.739 \text{ g g}^{-1}$ were determined which is in agreement with the high cell dense achievement in the fermentation stage. After fermentation, the processes of autolysis, plasmolysis, and ultrasound were studied for the disruption of cell-wall and the results showed that a combination of the plasmolysis process using 0.5 M NaCl and ultrasound at 20 kHz and 25 °C for 60 min was the best conditions to obtain the highest production efficiency of yeast extract from biomass (Y_{PX}) of about 0.813 g g⁻¹ with a protein purity percent (Y_P) of 72.8%.*

Received: 29 June 2024

Accepted: 30 October 2024

Page Number: 19-33

Keywords:

Industrial Microbiology,
Microbial Growth Kinetics,
Cell Wall Disruption,
Autolysis,
Plasmolysis,
Ultrasound Waves

Please Cite this Article Using:

Kanjouri, S., & Habibi, A. R. (2025). Production of Yeast Extract Based on the Use of Beet Molasses in the Cultivation of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 24(141), 19-33, [In Persian].



تولید عصاره مخمر بر پایه استفاده از ملاس چغندر در کشت ساکارومایسس سرویزیه

سحر کنجوری^۱، علیرضا حبیبی^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه رازی

۲- دانشیار مهندسی شیمی، دانشگاه رازی

پیام نگار: a.habibi@razi.ac.ir

چکیده

هدف از این مطالعه، کاهش هزینه‌های تولید عصاره مخمر با انجام کشت ناپیوسته تحت شرایط هوازی از ساکارومایسس سرویزیه بر ملاس چغندر (68 °Brix) و قند کل $1 \text{ g molasses}^{-1} (0.75)$ به عنوان تنها منبع تأمین کننده کربن است. اثر بازدارندگی استفاده از ملاس بر رشد مخمر تا غلظت 100 g L^{-1} دیده نشد و معادله سینتیکی مونود با ثابت‌های $\mu_{max} = 0.151 \text{ h}^{-1}$ و $KS = 10.30 \text{ g L}^{-1}$ رشد مخمر را با دقت خوبی توصیف کرد. همچنین، در مدل سازی انرژی نگهداری سلولی مقادیرهای $ms = 0.0518 \text{ g g cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ و $Y_{X/S,t} = 1/739 \text{ g g}^{-1}$ تعیین شد که نشانگر دستیابی به توده زیستی متراکم در مرحله تخمیر بود. پس از تخمیر، فرایندهای اتولیز، پلاسمولیز و امواج فراصوت برای واپاشی دیواره سلولی، مطالعه شد و نتایج نشان داد که ادغام پلاسمولیز با استفاده از محلول 0.5 M NaCl و فراصوت 20 kHz در دمای $25 \text{ }^\circ\text{C}$ پس از 60 min بهترین عملکرد را در دستیابی به بیشترین بازده تولید عصاره مخمر از توده زیستی (Y_{PX}) به میزان 0.813 g g^{-1} با درصد خلوص پروتئین (Y_P) 72/8٪ داشت.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۲

شماره صفحات: ۱۹ تا ۳۳

کلیدواژه‌ها:

میکروبیولوژی صنعتی،
سینتیک رشد میکروبی،
واپاشی دیواره سلولی،
اتولیز،
پلاسمولیز،
امواج فراصوت

* کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت

استناد به مقاله:

کنجوری، سحر، و حبیبی، علیرضا. (۱۴۰۴). تولید عصاره مخمر بر پایه استفاده از ملاس چغندر در کشت ساکارومایسس سرویزیه، نشریه مهندسی شیمی ایران، ۲۴(۱۴۱)، ۱۹-۳۳.

عصاره مخمر^۱ یک محصول زیستی، حاصل پروتئین‌های محلول است که از واپاشی دیواره سلولی مخمر اغلب به شکل پودر خشک زردرنگ تولید و به بازار عرضه می‌شود. این ماده سرشار از ویتامین‌های گروه ب، پروتئین و مواد معدنی به ویژه کروم، فسفر و سلنیوم است [۱]. عصاره مخمر هم‌چنین حاوی مقدار زیادی فیبر است، به طوری که در هر g ۱۰۰ از عصاره مخمر خشک در حدود g ۱۸-۲۰ فیبر محلول در آب گزارش شده است [۱]. ارزش غذایی این ماده، موجب کاربردهای گسترده‌ای از آن در صنایع غذایی (اغلب به شکل طعم‌دهنده) [۱]، مکمل دارویی [۱]، آزمایش‌های بالینی کشت میکروبی [۲] و تولید فراورده‌های زیستی در میکروبیولوژی صنعتی [۳] شده است. هم‌اکنون، ارزش معاملات این محصول در جهان ۲/۲۳ بیلیون دلار تعیین شده است و پیش‌بینی می‌شود که با یک رشد سالانه ۸/۹۲٪ به ۴/۴۱ بیلیون دلار در سال ۲۰۳۴ برسد [۴].

منبع اصلی تولید عصاره مخمر، استفاده از مخمر پسماند حاصل از تخمیر الکلی^۲ است که پس از طی فرایندهای واپاشی دیواره سلولی و خالص‌سازی به عصاره مخمر تبدیل می‌شود [۵]. اما با توجه به کاربردهای گسترده عصاره مخمر در سال‌های گذشته و افزایش تقاضای جهانی آن، استفاده از کشت هوازای سلول‌های مخمر به منظور افزایش میزان تولید توده زیستی در مقایسه با فرایندهای بی‌هوازی محل توجه قرار گرفته است [۶]. اگرچه عصاره مخمر را می‌توان از تمامی سلول‌های مخمری تولید کرد، اما استفاده از ساکارومایسس سرروزیه^۳ به دلیل شناخته شده بودن، غیر بیماری‌زایی، توانایی تحمل مقادیر بالای قند از جمله ساکارز و عدم حساسیت به حضور یون فلزات هم‌چون آهن - که در اغلب پسماندهای صنعتی موجود است - در کاربردهای صنعتی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است [۷].

در سال‌های گذشته و با در نظر گرفتن اصول شیمی سبز در مدیریت پسماندهای صنعتی، مطالعات گسترده‌ای در خصوص استفاده از ضایعات کشاورزی و محصولات جانبی فرایندهای صنایع غذایی به عنوان ماده اولیه فرایندهای میکروبیولوژی صنعتی انجام گرفته است. به کارگیری این مواد در فرایندهای میکروبیولوژی

صنعتی ضمن مرتفع کردن بخش عظیمی از مشکلات محیط زیستی ناشی از تجمع پسماندهای صنعتی، می‌تواند کاهش هزینه تولید محصولات زیستی را فراهم آورد. یکی از مناسب‌ترین منابع در تولید عصاره مخمر، محصول جانبی حاصل از تولید قند از چغندر و نیشکر است که با نام ملاس شناخته می‌شود [۸]. وجود ترکیبات کربوهیدرات متنوع قابل تخمیر در ملاس، آن را به عنوان یک منبع - کربن ارزان قیمت (قیمت هر کیلو ملاس بسته به کیفیت آن ۳۸۳۰۰-۲۷۷۰۰ تومان است) در میکروبیولوژی صنعتی خصوصاً تولید بیواتانول مطرح ساخته است [۹ و ۱۰]. بازده توده زیستی از مواد قندی موجود در ملاس به میزان g-1 ۰/۲۳ و g-1 ۰/۵۲ به ترتیب در کشت ناپیوسته^۴ و نیمه پیوسته^۵ از یک گونه تایلندی ساکارومایسس سرروزیه (TISTR 5020) گزارش شده است [۱۱]. علت بهبود بازده تولید توده زیستی در کشت نیمه پیوسته، کنترل غلظت مواد قندی و کاهش اثر بازدارندگی ملاس ذکر شده است [۱۱]. از دیگر مواد استفاده شده در کشت مخمر، پسماند کارخانه‌های فراوری نشاسته از ذرت است. البته نیاز است که این پسماند قبل از فرایند تخمیر با استفاده از روش‌های شیمیایی - آنزیمی هیدرولیز شود و به دکستروزهای قابل تخمیر تبدیل شود [۱۲]. استفاده از پسماند نشاسته هیدرولیز شده در کشت هوازای مخمر نانوبی پس از ۴۸ h، بازده تولید توده زیستی به سوبسترا در حدود g-1 ۰/۴۷۲ گزارش کرده است [۱۲]. هم‌چنین، امکان استفاده از آب نیپر و هیدرولیز شده نشاسته در کشت هم‌زمان دو مخمر ساکارومایسس سرروزیه و کلایورومایسس مارکسیانوس، مطالعه شده است [۱۳]. نتایج نشان داد که ابتدا کلایورومایسس مارکسیانوس رشد می‌کند و قند لاکتوز را به وسیله آنزیم‌های خود هیدرولیز می‌کند. سپس، مخمر با استفاده از گلوکز تولیدی با بازده g-1 ۰/۴۸ تکثیر می‌یابد [۱۳]. این نتایج نشان می‌دهد که بازده تولید توده زیستی وابسته به شرایط کشت مخمر، از جمله: گونه مخمر، نوع و غلظت سوبسترا متغیر است. در تولید عصاره مخمر نیاز است تا پس از عملیات تخمیر، فرایندهایی برای استخراج، بازیابی و خالص‌سازی پروتئین‌های درون سلولی انجام شود. کیفیت و نوع عملیات پایین دستی بسته به درجه محصول و کاربرد آن متفاوت است، اما در تمامی کاربردها عملیات واپاشی دیواره سلولی^۶ مخمر به عنوان یک مرحله کلیدی وجود دارد.

4. Batch Cultivation
5. Fed-Batch Cultivation
6. Cell Wall Disruption

1. Yeast Extract
2. Waste Brewer's Yeast
3. *Saccharomyces Cerevisiae*

روش‌های مختلفی برای شکست دیواره سلول مخمر تاکنون، مطالعه و استفاده شده‌است. یکی از روش‌های ساده و کاربردی واپاشی سلولی استفاده از فرایند اتولیز است. در این فرایند، آنزیم‌های هیدرولیزکننده موجود در فضای پری‌پلاسمی سلول برای هضم دیواره سلولی مخمر فعال می‌شوند و در نتیجه، بدون نیاز به افزودن عامل شیمیایی اضافی، فرایند هضم نسبی دیواره سلولی مخمر حاصل می‌شود [۱]. اما اغلب بازده تولید در روش اتولیز به دلیل هضم ناقص دیواره سلولی محدود است. از این‌رو، روش‌های فیزیکی همانند آسیاب گلوله‌ای و هموژناسیون در فشار بالا^۱ در مقیاس‌های صنعتی برای افزایش کارایی اتولیز در هضم دیواره سلولی و استخراج آنزیم‌های درون سلولی استفاده می‌شوند [۱]. استفاده از هموژناسیون فشار بالا در شرایط ۶۰۰-۲۰۰ bar، دمای ۵۲ °C و pH ۵/۵ به عنوان پیش تیمار قبل از فرایند اتولیز سلول‌های ساکارومایسس سرویزیه نشان داد که اثری بر تولید پروتئین‌های استخراج شده از مخمر (عصاره مخمر) نداشت، اما باقی مانده جامد فرایند اتولیز را (که برای استخراج β-گلوکان به کار می‌رود) به میزان ۱۵٪ افزایش داد [۳]. فرایند هموژناسیون فشار بالا نیازمند انرژی و فشار بالا است و به دلیل تخریب کامل دیواره سلول، موجب پیچیدگی در فرایندهای خالص سازی پایین دستی تولید عصاره مخمر می‌شود. روش‌های شیمیایی شکست دیواره سلولی، عمدتاً مبتنی بر استفاده از مواد شیمیایی، همانند شوینده‌ها، حلال‌های آلی، مواد قلیایی و با آنزیم‌ها است. تأثیر دما (۷-۴۳ °C)، pH (۳/۵-۷) و غلظت اتانول (۲۵٪-۶) بر اتولیز دیواره سلولی ساکارومایسس سرویزیه با اعمال پیش تیمار میدان الکتریکی پالسی^۲ بررسی شده است [۲]. میدان الکتریکی استفاده شده با قدرت ۱ cm-1 kv ۲۵ با پالس زمانی ۳ μs در دمای ۳۰ °C برای مدت ۲۱ روز اعمال شد و نتایج نشان داد که اعمال این میدان الکتریکی پالسی موجب افزایش دوبرابری استخراج مانوز (به عنوان محصول شکست دیواره سلولی مخمر) می‌شود [۲]. در اصلاح فرایند اتولیز، هم‌چنین با افزودن ترکیبات یونیزه شونده مانند نمک‌های معدنی می‌توان فشار اسمزی به دیواره سلول را در حین اتولیز افزایش داد تا در واپاشی بهتر دیواره سلولی مخمر مؤثر باشد [۱۳ و ۳]. این فرایند با نام پلاسمولیز شناخته می‌شود. استفاده از امواج فراصوت و در نتیجه، بهره گرفتن از پدیده کاویتاسیون برای

شکست دیواره سلولی راه کار دیگری است که از ظرفیت کاربرد بالایی برخوردار است. فراصوت یکی از فناوری‌های نوظهور با کاربردهای متنوع در صنایع غذایی است [۱۴]. پیش از این، مقاومت سلول‌های ساکارومایسس سرویزیه در برابر امواج فراصوت با فرکانس ۲۰ kHz در دماها و pH‌های مختلف، بررسی شده است [۱۵]. در مورد اثر pH در بازه ۳-۵/۶ تغییر محسوسی در مقاومت سلول مخمر به هنگام اعمال امواج فراصوت دیده نشد و بیشترین تأثیر امواج فراصوت در همراهی با اتولیز در دمای ۴۵ °C مشاهده شده است [۱۵]. اما افزایش بیشتر دما در استفاده هم‌زمان از اتولیز و فراصوت تا ۵۵ °C واپاشی سلولی را احتمالاً به دلیل فعالیت‌زدایی آنزیم‌های هیدرولیتیک فضای پری‌پلاسمی مخمر کاهش داد [۱۵].

در تحقیق حاضر، به منظور استفاده از ملاس چغندر به عنوان ماده اولیه مقرون به صرفه برای کشت ساکارومایسس سرویزیه استفاده شد. اگرچه ملاس پیش از این در کشت ساکارومایسس سرویزیه استفاده شده است، اما مطالعات سینتیکی بر روی این فرایند کشت سلولی در شرایط هوایی و به منظور تولید عصاره مخمر انجام نشده است. بنابراین، با توجه به اهمیت تعیین سینتیک رشد و بازده تولید توده زیستی از سوبسترا برای افزایش مقیاس و استفاده در بیوراکتورهای صنعتی، ثابت‌های سینتیکی رشد و ضرب نگهداری سلولی مخمر بر روی ملاس به عنوان تنها منبع تأمین کننده کربن تعیین شد. سپس، برای انجام واپاشی دیواره سلولی، فرایندهای ساده و کارآمد شامل اتولیز، پلاسمولیز و امواج فراصوت و نیز ادغام این فرایندها بررسی شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد

ملاس چغندر (۶۸ °Brix) از کارخانه قند بیستون تهیه شد. بر اساس اندازه‌گیری قند کل، ۷۵/۱٪ از مواد محلول در این ملاس را مواد قندی تشکیل می‌داد که به عنوان تنها منبع تأمین کننده کربن در کشت سلول‌های مخمر به کار گرفته شد. برای کشت مخمر، عصاره مخمر و پپتون ساخت شرکت مرک به عنوان منبع نیتروژن استفاده شد.

1. High Pressure Homogenization
2. Pulsed Electric field

۲-۲ ریزاندامگان

ریزاندامگان ساکارومایسس سرویزیه (PTCC 5052) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد.

۳-۲ کشت مخمر

به منظور تکثیر و نگهداری مخمر، مخمر مادر در شرایط استریل بروی محیط کشتی حاوی محتویات زیر به روش خطی کشت شد: $(g L^{-1})$: [۱۶]: پیتون، ۳/۵؛ عصاره مخمر، ۳؛ KH_2PO_4 ، ۲؛ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۱؛ $(NH_4)_2SO_4$ ، ۱؛ گلوکز، ۲۰؛ و آگار، ۲۵. کشت به مدت ۴۸ h در یک انکوباتور با دمای $30^\circ C$ انجام شد تا کلنی‌های سفید مایل به شیری رنگ در سطح کشت ظاهر شوند.

کشت‌های مخمر در محیط مایع در ارلن‌مایر با حجم ۲۵۰ mL حاوی ۱۰۰ mL از محیط کشت حاوی ملاس به عنوان تنها منبع کربن انجام شد. این آزمایش‌ها با استفاده از محیط کشت فوق و با جایگزینی مقادیر مختلفی از ملاس به جای گلوکز انجام شد. غلظت‌های ملاس بررسی شده، شامل: ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵۰ و $100 g L^{-1}$ بود. ابتدا pH محیط کشت‌های تهیه شده روی ۶/۰ تنظیم و سپس، در یک اتوکلاو با دمای $121^\circ C$ برای مدت ۲۰ min استریل شد. پس از سرد شدن، ۱۰ mL از سوسپانسیون مخمر با چگالی نوری ۰/۵ به عنوان مایه تلقیح به هر ارلن‌مایر اضافه شد. بر اساس مطالعات گذشته، انکوباسیون در دمای $30^\circ C$ و سرعت گردش ۱۵۰ rpm به مدت ۲۷ h ادامه یافت [۳]. در طی این مدت، در فواصل زمانی ۲ h از کشت‌های مخمر نمونه برداری شد تا میزان رشد مخمر و مصرف منبع کربن اندازه‌گیری شود.

۴-۲ روش‌های واپاشی سلولی

پس از پایان کشت مخمر، سلول‌های مخمر با عملیات سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ min به شکل توده زیستی سفیدرنگ از محیط کشت، جداسازی شد. توده زیستی در یک اون، خشک و سپس، برای واپاشی سلولی استفاده شد. در تحقیق حاضر، از سه روش اتولیز، پلاسمولیز و امواج فراصوت برای واپاشی دیواره سلولی مخمر و استخراج پروتئین‌های محلول درون سلولی استفاده شد.

در روش اتولیز، بر اساس مطالعات گذشته به سلول‌های جدا شده ۱۰۰ mL محلول بافر فسفات (M ۰/۵، pH= ۵/۵) اضافه شد. اتولیز در

دو دمای $25^\circ C$ و $55^\circ C$ برای مدت ۲۴ h با سرعت گردش ۱۰۰ rpm انجام شد [۱۳ و ۱].

در واپاشی سلولی به روش پلاسمولیز، به طور جداگانه از ۱۰۰ mL محلول NaCl و KCl با غلظت ۰/۵ M در دو دمای $25^\circ C$ و $55^\circ C$ برای مدت ۲۴ h استفاده شد [۱۶ و ۱۷].

در بررسی اثر موج فراصوت، اثر موج با فرکانس ۲۰ kHz با توان ۲۰۰ w به صورت ۱۰ min اعمال موج و ۵ min توقف به طوری که بازه زمانی اعمال موج ۳۰، ۶۰ و ۹۰ min باشد در دمای $25^\circ C$ در حضور بافر فسفات (M ۰/۵، pH= ۵/۵) بررسی شد. همچنین، به منظور بررسی اثر استفاده هم‌زمان از فرایندهای پلاسمولیز و فراصوت، از محلول NaCl ۰/۵ M به جای محلول بافر فسفات در شرایط مشابه فوق استفاده شد.

در پایان هر عملیات واپاشی، لاشه‌های سلولی با استفاده از عملیات سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ rpm برای ۱۰ min جداسازی شد و محلول حاوی پروتئین برای سنجش میزان پروتئین استخراج شده، نگهداری شد.

۵-۲ روش‌های سنجش

برای سنجش غلظت توده زیستی مخمر از روش وزن خشک سلولی^۱ استفاده شد. ابتدا، سلول‌های مخمر بروی ملاس، به مدت ۲۴ h انجام شد. سلول‌های مخمر پس از کشت، در ۶۰۰ rpm به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد تا سلول‌ها جدا شوند. سپس، سوسپانسیون‌هایی با استفاده از آب مقطر از توده زیستی مخمر تهیه شد. جمعیت میکروبی مخمر در این سوسپانسیون‌ها با استفاده از روش شمارش کلنی تعیین شد. ضمناً این سوسپانسیون‌ها جداگانه در یک اون با دمای $80^\circ C$ تا رسیدن به یک جرم ثابت، خشک شد. پس از خشک شدن توده زیستی، غلظت مخمر با تقسیم جرم مخمر خشک به حجم هر سوسپانسیون به دست آمد. بر اساس داده‌های تجربی به دست آمده، رابطه (۱) برای تبدیل جمعیت مخمر ($CFU mL^{-1}$) به غلظت جرم خشک توده زیستی (CX) استفاده شد.

$$C_X (g L^{-1}) = 3.4 \times 10^{-7} (CFU mL^{-1}) \quad (1)$$

1. Dry Cell Weight
2. Colony Forming Unit

باتوجه به اهمیت مطالعات سینتیک رشد برای استفاده از یک سوبسترا در فرایندهای میکروبیولوژی صنعتی، سرعت ویژه رشد مخمر در فاز لگاریتمی (μ) با استفاده از رابطه (۲) تعیین شد:

$$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = \frac{\ln(C_x/C_{x0})}{t} \quad (2)$$

جایی که، C_x و C_{x0} به ترتیب غلظت توده زیستی در ابتدا و حین فاز لگاریتمی رشد است و t زمان فاز لگاریتمی است.

باتوجه به حضور مواد مختلف محلول در ملاس، اندازه گیری مستقیم ساکارز با استفاده از دستگاه رفاکتومتر با خطا روبه رو است. بنابراین، در این تحقیق ابتدا قندهای غیراحیای موجود در ۵ mL از هر یک از نمونه ها با استفاده از ۵ mL اسید هیدروکلریک غلیظ در دمای ۵۰ °C برای مدت ۲۰ min هیدرولیز شد. سپس، محتوای قند کل (TS^1) بر حسب گلوکز پس از واکنش با محلول قلیایی ۳ و ۵ دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS^2) اندازه گرفته شد [۱۸]. برای این منظور، ابتدا ۳۰ g از سدیم پتاسیم تارتارات در ۵۰ mL آب مقطر حل شد. هم چنین، ۱ g از DNS در ۲۰ mL از محلول ۲ M سدیم هیدروکسید حل شد. سپس، این دو محلول با هم مخلوط و تا رسیدن به یک محلول واکنش گر کاملاً شفاف به هم زده شد. در یک لوله آزمایش دربار، ۱ mL از محلول واکنشگر با ۳ mL از محلول حاوی قند احیا، مخلوط شد و برای مدت ۵ min در یک حمام آب گرم با دمای حداقل ۹۰ °C قرار گرفت. در طی این مدت، قندهای احیای موجود در مخلوط واکنش با DNS واکنش داد و با احیای DNS، مخلوط واکنش از رنگ زرد اولیه به رنگ سرخ ارغونی تغییر کرد. اندازه گیری میزان جذب نور در ۵۴۰ nm (Abs_{540}) در برابر نمونه شاهد (محلول فاقد قند احیا) انجام شد. برای کالیبره بندی جذب خوانده شده از محلول های استاندارد گلوکز در بازه غلظتی ۰-۳۰۰ mg L⁻¹ استفاده شد. براساس داده های کالیبره بندی، رابطه (۳) برای تبدیل میزان جذب به غلظت قند کل (CTS) استفاده شد.

$$C_{TS} \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 366.76 \text{ ABS}_{540 \text{ nm}} \quad (3)$$

مقدارهای تجربی بازده توده زیستی به سوبسترا ($Y_{X/S}$) براساس رابطه (۴) برای مقدارهای مختلف ملاس تعیین شد:

$$Y_{X/S} \text{ (g g}^{-1}\text{)} = \frac{C_{Xf} - C_{X0}}{C_{TS0} - C_{TSf}} \quad (4)$$

که در این رابطه، C_{Xf} و C_{X0} به ترتیب غلظت توده زیستی در ابتدا و پایان کشت مخمر و C_{TSf} و C_{TS0} به ترتیب غلظت قند کل در آغاز و پایان کشت است.

پس از انجام عملیات واپاشی دیواره سلولی، میزان بازده تولید عصاره مخمر از توده زیستی ($Y_{P/X}$) با استفاده از رابطه (۵) تعیین شد [۳]:

$$Y_{P/X} \text{ (g g}^{-1}\text{)} = \frac{M_f}{M_o} \quad (5)$$

در این رابطه، M_o و M_f به ترتیب جرم خشک توده زیستی اولیه و جرم خشک محصول عصاره مخمر تولید شده پس از جداسازی لاشه سلولی با عملیات سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰×g برای مدت ۶ min بود. برای تعیین غلظت پروتئین آزاد شده (C_p) از روش بیورت استفاده شد [۱۹]. برای کالیبره بندی اندازه گیری پروتئین از محلول آلبومین گاوی در غلظت های مختلف ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹ و ۱/۰ g L⁻¹ استفاده شد. محلول واکنشگر بیورت به این روش تهیه شد: ۵/۱ g CuSO₄ با ۶ g از سدیم پتاسیم تارتارات در ۵۰۰ mL آب مقطر حل شد. سپس، ۳۷۵ mL از محلول ۲ M سدیم هیدروکسید به محلول فوق اضافه شد و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسید. برای اندازه گیری، حجم برابر از واکنشگر بیورت و محلول حاوی پروتئین با هم مخلوط شد. رنگ آبی حاصل از واکنش پروتئین با واکنشگر بیورت در مقابل نمونه شاهد (محلول فاقد پروتئین) به روش طیف نورسنجی در طول موج ۵۴۰ nm اندازه گیری شد. برای تعیین درصد پروتئین در عصاره مخمر (Y_p) از رابطه (۶) استفاده شد:

$$Y_p \text{ (\%)} = 100 \times \frac{C_p V_L}{M_f} \quad (6)$$

در این رابطه، V_L حجم محلول حاصل از عملیات سانتریفیوژ پس از فرایند واپاشی سلولی است.

1. Total Sugars
2. 3,5-Dinitrosalicylic Acid

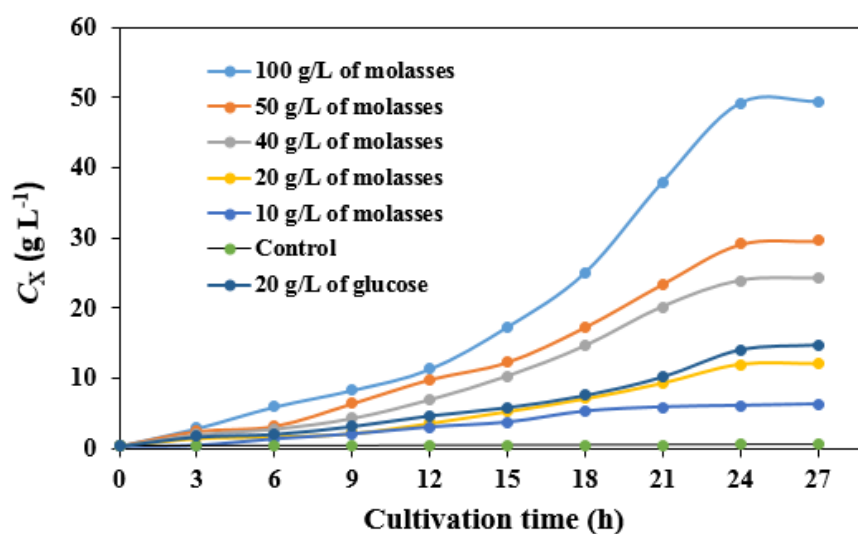
ملاس به عنوان منبع کربن است. رشد سلول‌های مخمر در تمامی غلظت‌های ملاس، بدون مشاهده فاز تأخیر از همان ابتدای کشت مشاهده می‌شود. دلیل این امر، وجود قندهای ساده هم‌چون گلوکز در ملاس است که به عنوان یک سوبسترای آرمانی می‌تواند به وسیله سامانه آنزیمی مخمر، فرایند اکسایش و تأمین انرژی را طی کند تا در ادامه از ترکیبات ساده تولید شده همانند پیروات در مسیرهای آنابولیسمی برای تولید اجزای سلولی استفاده شود [۲۱]. بیشترین تغییرات توده زیستی در بازه زمانی ۱۲-۲۴ h از کشت دیده می‌شود که نشان دهنده وقوع فاز لگاریتمی رشد است. پس از طی این دوره، رشد سلول‌های مخمر، متوقف و سلول‌ها وارد فاز سکون می‌شود. علت وقوع این روند، مصرف مواد مغذی از جمله قندها در کشت و به تبع آن کاهش دسترسی به مواد مغذی برای تولید توده زیستی است. با ادامه کشت در چنین حالتی، سلول‌ها وارد فاز مرگ خواهند شد که در آن کاهش میزان توده زیستی به دلیل پیشی گرفتن مرگ بر رشد سلولی با گذشت زمان مشاهده می‌شود. از آنجایی که تولید عصاره مخمر به عنوان یک محصول درون سلولی، با میزان توده زیستی تولید شده ارتباط مستقیم دارد، ورود سلول‌ها به فازهای سکون و مرگ مطلوب نیست و بهتر است در پایان فاز لگاریتمی - که سلول‌ها از جمعیت بالا و کیفیت بهتری برخوردار هستند - کشت متوقف و برای انجام عملیات واپاشی سلولی منتقل شود [۷].

به منظور بررسی کیفی عملیات واپاشی، سلول‌های واپاشی شده از سلول‌های سالم مخمر با عکس برداری به وسیله میکروسکوپ نوری در بزرگ‌نمایی ۱۰۰ پس از انجام رنگ آمیزی با تریپان بلو (۰/۷٪) شناسایی شد [۲۰]. زیرا، در سلول‌های واپاشی شده، این رنگ به داخل سیتوپلاسم نفوذ می‌یابد و در نتیجه، سلول‌های واپاشی شده با رنگ آبی از سلول‌های بدون رنگ که سالم بودند، شناسایی شدند.

۳. نتایج و بحث

۳-۱- کشت مخمر ساکارومایسس سرویزیه

باتوجه به غنی بودن ملاس از مواد کربوهیدرات، و به منظور کاهش هزینه‌های تولید عصاره مخمر، استفاده از این ماده به عنوان تنها منبع تأمین کننده کربن سلول‌های مخمر ساکارومایسس سرویزیه در کشت ناپیوسته مد نظر قرار گرفت. باتوجه به گزارش اثر بازدارندگی ملاس در مطالعات گذشته و به منظور تعیین غلظت بهینه مصرف این ماده، به عنوان منبع کربن، غلظت‌های مختلفی از ملاس چغندر بررسی شد که نتایج آن در شکل (۱) آورده شده است. شکل (۱) تغییرات زمانی توده زیستی تولیدی را به هنگام رشد بر روی محیط کشت حاوی ملاس نشان می‌دهد. مقایسه نتایج آزمایش کنترل (بدون افزودن منبع کربن) با سایر آزمایش‌ها، نشان می‌دهد که مقدار توده زیستی در حضور ملاس از مقدار ناچیز اولیه، افزایش یافته است که این مطلب نشان دهنده توانایی سلول‌های مخمر برای استفاده از



شکل ۱. تغییرات زمانی غلظت توده زیستی مخمر (C_x) به هنگام رشد بر روی مقادیر مختلف ملاس.

Figure 1. Time changes of yeast biomass concentration (C_x) during the cultivation on different concentrations of molasses.

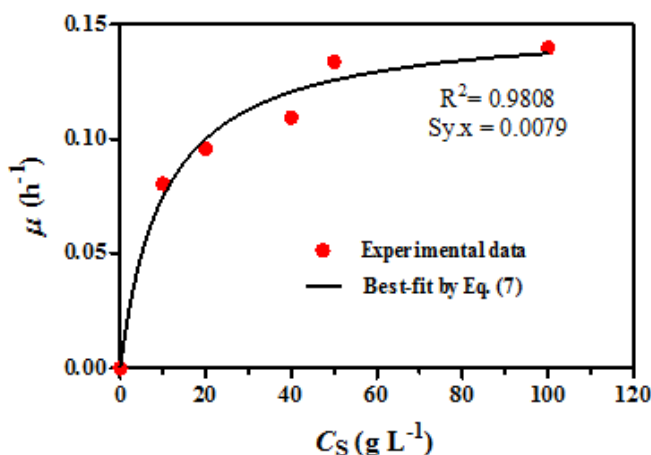
1. Trypan Blue

است که بنابه تعریف، مقدار غلظتی از سوبسترا است که در آن سرعت ویژه رشد به نصف مقدار بیشینه خود می‌رسد. برای تعیین این ثابت‌ها سینتیکی، رگرسیون غیرخطی داده‌های تجربی شکل (۲) با رابطه (۷) انجام شد و بهترین نتیجه با مقادیر $\mu_{max} = 0.151 \text{ h}^{-1}$ و $K_S = 10.30 \text{ g L}^{-1}$ حاصل شد. در شکل (۲)، میزان پیش‌بینی مدل مونود با استفاده از این ثابت‌ها سینتیکی نمایش داده شده است. همان‌طور که دیده می‌شود، این معادله با ثابت‌های تعیین شده به خوبی با مقادیر تجربی هم‌خوانی دارد ($R^2 = 0.994$). پیش‌از این، مطالعه سینتیک رشد مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر روی گلوکز در یک کشت ناپیوسته هوازی بررسی شد و ثابت‌های سینتیکی معادله مونود به ترتیب 0.377 h^{-1} و 0.157 g L^{-1} گزارش شده است [۲۳]. دلیل ثابت نیمه‌اشباع کوچک در این کار در مقایسه با کار حاضر احتمالاً به دلیل استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن است. در حالی که ملاس چغندر به دلیل وجود مواد مختلف، خالص از کربوهیدرات نیست و حتی بخشی از ترکیبات کربوهیدرات آن را مواد فیبری محلول تشکیل می‌دهند که تمایل سلول به استفاده از آن‌ها کمتر از قندهای ساده هم‌چون گلوکز و فروکتوز است. هم‌چنین، بررسی سنتیک رشد ساکارومایسس سرویزیه در حین تولید بیواتانول در کارهای گذشته $\mu_{max} = 0.084 \text{ h}^{-1}$ و $K_S = 213/6 \text{ g L}^{-1}$ را نشان می‌دهد [۲۴]. دلیل سرعت ویژه پایین در تولید بیواتانول در مقایسه با کار حاضر، تولید بیواتانول در تخمیر الکلی به عنوان یک محصول بازدارنده رشد است.

در شکل (۲)، میزان حساب شده μ برای مقادیر مختلف اولیه ملاس نمایش داده شده است. مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت ملاس مقدار μ افزایش یافت، به طوری که در غلظت 100 g L^{-1} سرعت ویژه رشد مخمر به بیشترین مقدار یعنی 0.14 h^{-1} رسید. در مقایسه با این نتیجه، استفاده از گلوکز به عنوان تنها منبع کربن در غلظت 20 g L^{-1} موجب دستیابی به رشد مخمر با سرعت ویژه 0.14 h^{-1} شد. مقایسه این نتایج نشان‌دهنده رشد بالای مخمر بر روی ملاس به عنوان یک محصول جانبی ارزان قیمت در مقایسه با گلوکز است. هم‌چنین، نتایج شکل (۲) نشان می‌دهد که در بازه غلظتی مورد مطالعه، ملاس اثر بازدارندگی بر روی رشد مخمر ندارد. اما استفاده از غلظت‌های بالاتر ملاس به دلیل افزایش فشار اسمزی حاصل از مواد محلول در محیط کشت، می‌تواند موجب اثر بازدارندگی شود. با توجه به ضرورت تولید توده زیستی بیشینه برای تولید حداکثری عصاره مخمر، عدم بروز بازدارندگی از سوی سوبسترا از اهمیت بالایی برخوردار بود. با مشاهده نشدن اثر بازدارندگی سوبسترا در این تحقیق، برای تعیین ثابت‌های سینتیکی رشد مخمر بر روی ملاس از معادله سینتیکی مونود به شرح زیر استفاده شد [۲۲].

$$\mu = \frac{\mu_{max} \times C_S}{K_S + C_S} \quad (7)$$

در این رابطه، وابستگی μ به غلظت اولیه ملاس (C_S) با در نظر گرفتن دو ثابت سینتیکی تعیین می‌شود. μ_{max} بیشینه سرعت ویژه رشد ریزاندامگان را نشان می‌دهد و K_S ثابت نیمه‌اشباع سوبسترا



شکل ۲. مقایسه نتایج تجربی و پیش‌بینی شده با مدل مونود در تعیین وابستگی سرعت رشد مخمر (μ) به غلظت اولیه ملاس (C_S).

Figure 2. Comparison of experimental and predicted results by Monod model to determine the dependence of yeast growth rate (μ) on the initial concentration of molasses (C_S).

در حالت کلی، ارتباط بین سرعت رشد توده زیستی و سرعت مصرف سوبسترا را می‌توان با استفاده از رابطه (۸) بیان کرد:

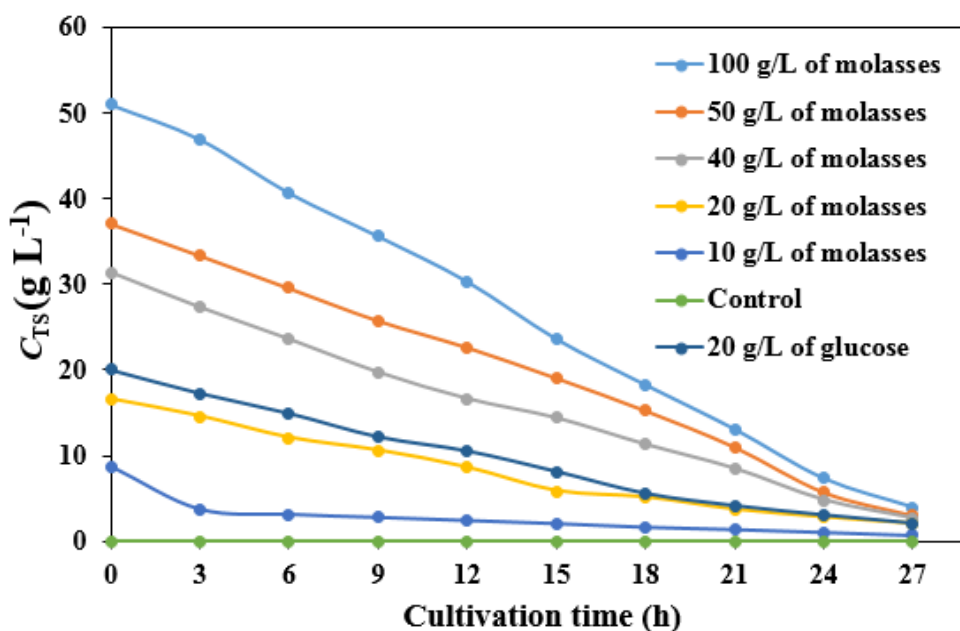
$$\frac{dc_x}{dt} = -Y_{x/s} \frac{dc_s}{dt} \quad (8)$$

جایی که، $Y_{x/s}$ مقدار تئوری بازده زیستی به سوبسترا و بنابراین مفهوم انرژی نگهداری سلولی زمانی حاصل می‌شود که سهمی از انرژی آزاد شده از اکسایش سوبسترا صرف نگهداری سلولی^۲ نشود و صرفاً برای تولید توده زیستی به کار گرفته شود. بدین ترتیب، $Y_{x/s}$ بیان‌گر بیشترین میزان بازده قابل حصول خواهد بود. برای در نظر گرفتن انرژی نگهداری سلولی (m_s) از رابطه (۹) موسوم به رابطه انرژی نگهداری پیرت^۳ استفاده می‌شود [۲۵]:

$$\frac{1}{Y_{x/s}} = \frac{1}{Y_{x/s}^0} + \frac{m_s}{\mu} \quad (9)$$

بنابراین، می‌توان با رسم نمودار $1/Y_{x/s}$ در برابر $1/\mu$ و تعیین شیب نمودار خطی حاصل، مقدار m_s را از شیب نمودار به دست آورد و از عرض از مبدأ نمودار مذکور می‌توان مقدار بازده تئوری توده زیستی از سوبسترا را تعیین کرد.

در شکل (۳)، میزان قند کل موجود در محیط در حین کشت مخمر بر روی غلظت‌های اولیه مختلف از ملاس آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با گذشت زمان از مقدار قند موجود در کشت کاسته می‌شود. زیرا، این مواد به‌عنوان منبع کربن به‌وسیله سلول‌های مخمر مصرف می‌شوند. سرعت مصرف قند از محیط، با افزایش غلظت اولیه ملاس افزایش یافته است که این مطالب در هماهنگی با مشاهده نشدن بازدارندگی در غلظت‌های بررسی شده است. برای مقایسه، گلوکز به‌عنوان تنها منبع کربن در غلظت 20 g L^{-1} استفاده شد. سرعت مصرف گلوکز به‌وسیله سلول‌های مخمر $1/40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ تعیین شد. در حالی که، سرعت مصرف قند برای ملاس در غلظت اولیه 20 g L^{-1} به $1/41 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ رسید. سرعت بالای مصرف سوبسترا برای تأمین انرژی کافی برای تولید مؤثر توده زیستی ضروری است. در صورتی که سرعت مصرف سوبسترا محدود باشد، انرژی آزاد شده از اکسایش سوبسترا صرفاً برای تأمین انرژی نگهداری سلولی^۱ مصرف خواهد شد و افزایش توده زیستی مؤثری مشاهده نخواهد شد [۸]. با توجه به نتایج ارائه شده، ملاس در غلظت اولیه 100 g L^{-1} به‌عنوان منبع کربن سلول‌های مخمر برای تولید بیشینه توده زیستی در ادامه مطالعات استفاده شد.



شکل ۳. تغییرات غلظت قند کل (C_{TS}) در حین کشت بر روی مقادیر مختلف ملاس.

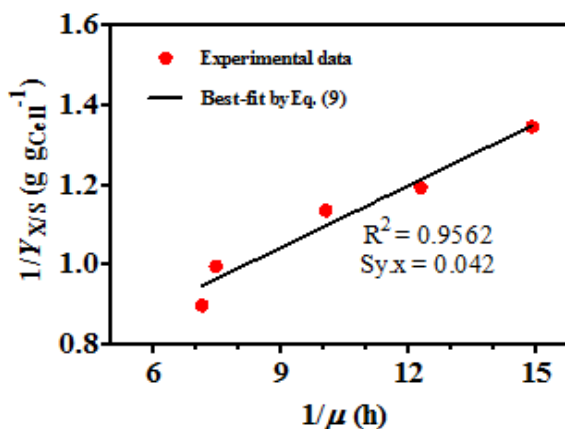
Figure 3. Changes in the concentration of total sugar (C_{TS}) during the cultivation on different concentrations of molasses.

1. Microbial Maintenance Energy Demand

2. Cell Maintenance Energy

3. Pirt-Maintenance Energy Equation

مقادیر تجربی $1/Y_{X/S}$ در برابر $1/\mu$ در شکل (۴) نمایش داده شده است. بر اساس مشاهدات تجربی، مقدار بازده توده زیستی به سوبسترا از 0.897 g g^{-1} در غلظت 10 g L^{-1} از ملاس تا $1/346 \text{ g g}^{-1}$ در غلظت 100 g L^{-1} از ملاس افزایش نشان داد. باتوجه به رفتار خطی مشاهده شده در شکل (۴)، رگرسیون خطی داده‌ها نشان داد که رابطه (۹) برای توصیف رشد مخمر بر ملاس صادق است و لذا، مقادیر ms به میزان $0.518 \text{ g cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ و $Y_{X/S}$ به میزان $1/739 \text{ g g}^{-1}$ تعیین شد. مقدار نسبتاً پایین ms در این تحقیق نشان می‌دهد که انرژی نگهداری سلولی به هنگام رشد مخمر بر ملاس، چندان محدودکننده نیست و لذا، انرژی آزادشده از اکسایش قندهای موجود در ملاس می‌تواند به صورت مؤثری برای تولید میزان چشم‌گیری از توده زیستی به کار گرفته شود. در مقایسه با کار حاضر، میزان بازده تولید توده زیستی از سوبسترا در یک تخمیر الکلی به وسیله سلول‌های ساکارومایسس سروریزیه 0.136 g g^{-1} گزارش شد [۲۴]. به تبع افزایش انرژی نگهداری سلول در حین تخمیر الکلی به دلیل انباشتگی اتانول به عنوان محصول مستقیم از متابولیسم انرژی می‌تواند دلیل بازده توده زیستی اندک باشد [۲۴].



شکل ۴. نمودار $1/Y_{X/S}$ در برابر $1/\mu$ برای تعیین ضریب نگهداری (ms) و بازده تئوری توده زیستی به سوبسترا ($Y_{X/S,t}$) بر پایه مدل پیرت.

Figure 4. Plot of $1/Y_{X/S}$ versus $1/\mu$ to determine the maintenance coefficient (ms) and the theoretical yield ($Y_{X/S,t}$) based in the Pirt model.

۳-۲ فرایند واپاشی دیواره سلولی

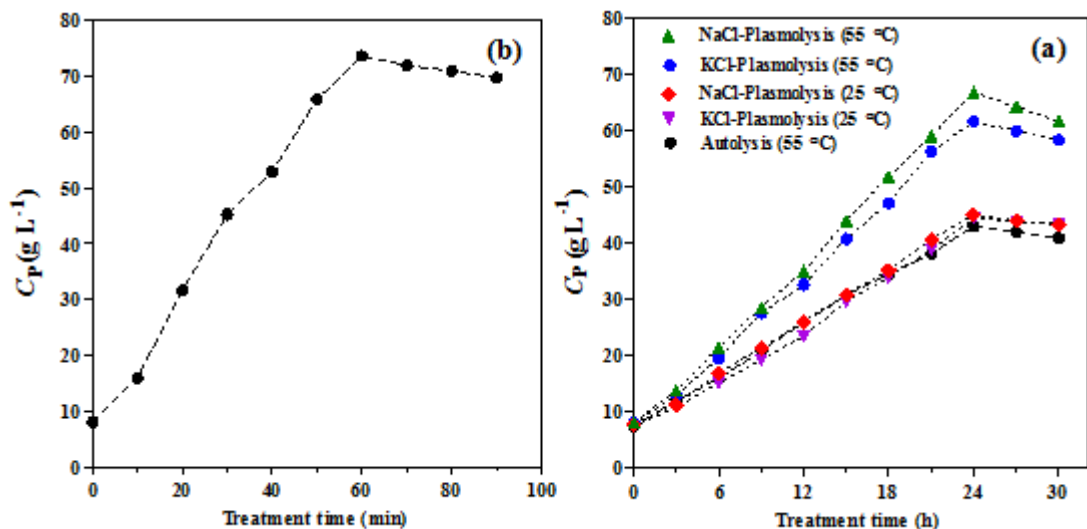
شکل (۵) روند تغییرات زمانی پروتئین آزادشده از سلول‌های مخمر را در حین فرایند واپاشی دیواره سلولی مخمر نشان می‌دهد.

همان‌طور که در شکل (۵) (a) پیدا است، با افزایش زمان در فرایندهای اتولیز و پلاسمولیز میزان پروتئین آزادشده افزایش یافته است. علت این امر، شکست دیواره سلول‌های مخمر به وسیله آنزیم‌های هیدولیزکننده موجود در فضای پری پلاسمی مخمر است، که با فعالیت خود موجب هضم دیواره سلولی و به تبع، رهش پروتئین‌های موجود در سیتوپلاسم به خارج سلول می‌شوند. نکته قابل توجه دیگر، نزدیکی داده‌های زمانی حاصل از فرایند اتولیز است که در دمای 55°C انجام شده با داده‌های پلاسمولیز در دمای 25°C است. اما استفاده از فرایندهای پلاسمولیز در دمای 55°C خصوصاً در حضور NaCl موجب افزایش محسوس پروتئین استخراجی، شده است. در توجیه این رفتار می‌توان گفت که افزایش دما اثر اسمزی وجود مواد یونیزه را بر دیواره سلولی بر اساس رابطه وانتروف^۱ افزایش می‌دهد.

$$\pi = i MRT \quad (10)$$

در رابطه وانت هوف، π فشار اسمزی، i تعداد اجزای حاصل از ماده حل‌شونده، M مولاریته، R ثابت عمومی گازها و T دمای مطلق است. توجه شود که اعمال فرایند در زمان‌های طولانی، موجب کاهش پروتئین استخراجی شد. علت این امر احتمالاً دناتوره شدن پروتئین‌های استخراج شده و در نتیجه، لخته‌سازی بخشی از آن‌ها پس از ۲۴ h از فرایند اتولیز و پلاسمولیز است. روند مشابهی در مطالعات گذشته نیز دیده شده است [۲۶]. شکل (۵) (b) روند تغییرات پروتئین آزادشده را در فرایند فراصوت نشان می‌دهد. مقایسه نتایج با اتولیز و پلاسمولیز نشان می‌دهد که این فرایند در زمان حدود ۱ h، بسیار کارآمد بوده است و میزان پروتئین محلول به $73/6 \text{ g L}^{-1}$ می‌رسد. این نتایج، هم‌چنین نشان می‌دهد که امواج فراصوت 20 kHz توانایی واپاشی دیواره سلولی مخمر را داشتند و موجب آزادسازی پروتئین‌های داخل سلولی شدند. اما اعمال فراصوت طولانی مدت نیز به دلیل دناتوره کردن پروتئین‌ها که ناشی از تنش برشی بالای حاصل از پدیده کاویتاسیون است، مطلوب نیست. از دیگر مشکلات انجام فراصوت در طولانی مدت، سختی کنترل دمایی فرایند است. از این‌رو، زمان بیش از ۶۰ min در فراصوت مطلوب نبود.

1. Van't Hoff Equation



شکل ۵. غلظت پروتئین آزاد شده از سلول‌های مخمر در حین فرایند واپاشی دیواره سلولی مخمر. (a) اتولیز و پلاسمولیز، (b) فراصوت.

Figure 5. Protein concentration released from yeast cells during the cell wall disruption processes: (a) Autolysis and plasmolysis (b) ultrasound.

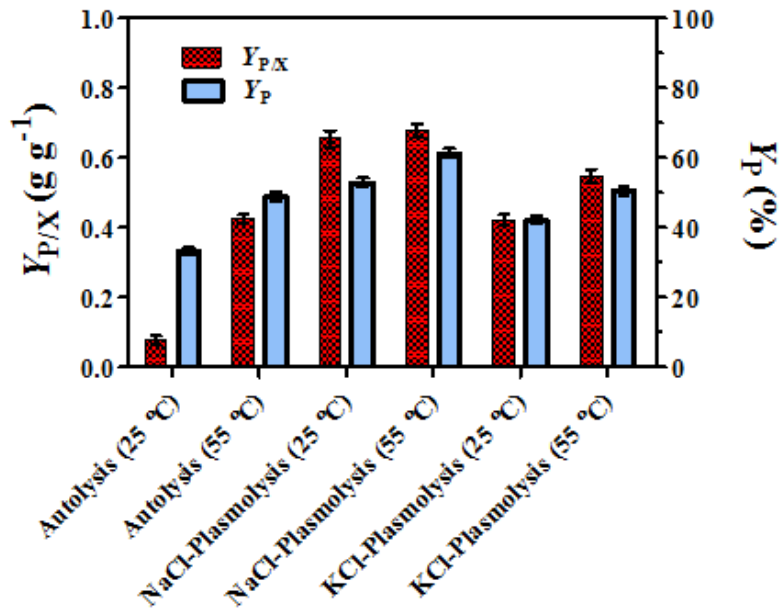
فرایند نفوذ مولکولی مواد، اثرگذاری بیشتر یون‌ها بر نفوذپذیر نمودن دیواره سلولی و در نهایت، بهبود فعالیت آنزیم‌های هیدرولیزکننده برای استخراج مواد درون سلولی خصوصاً پروتئین‌ها باشد. نتایج شکل (۶) نشان می‌دهد که در یک شرایط مشابه، یونیزاسیون NaCl بیش از KCl در هضم دیواره سلول‌های مخمر ساکارومایسس سرویزیه مؤثر است. بهترین بازده $Y_{P/X}$ با استفاده از پلاسمولیز در حضور NaCl در دمای $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ به میزان 0.679 g g^{-1} به دست آمد. مقدار Y_P نیز در فرایند پلاسمولیز در حضور NaCl با دمای $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ نسبت به پلاسمولیز با KCl بهبود قابل ملاحظه‌ای را نشان داد و به 0.613% رسید.

نتایج شکل (۷) نشان می‌دهد که استفاده از امواج فراصوت 20 kHz در دمای $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ به شکل مؤثری در استخراج مواد درون سلولی اثرگذار بوده است. استفاده از فراصوت طی مدت 30 min و 60 min به ترتیب توانست $Y_{P/X}$ را در میزان 0.552 g g^{-1} و 0.784 g g^{-1} فراهم کند. با افزایش بیشتر زمان استفاده از فراصوت در واپاشی سلولی به 90 min ، بازده تولید عصاره مخمر به 0.598 g g^{-1} کاهش یافت. علت این امر، دشواری کنترل مناسب دما در حین فرایند فراصوت است که موجب تغییرات ناخواسته و حتی دنا توره شدن پروتئین می‌شود. به طوری که، مقادیر Y_P در زمان‌های 30 ، 60 و 90 min به ترتیب 0.633% ، 0.579% و 0.525% بود. بنابراین، انجام فرایند فراصوت در بلندمدت از نظر خلوص پروتئینی نیز مطلوب نبود.

مقدار بازده عصاره مخمر تولیدی از توده زیستی ($Y_{P/X}$) و درصد خلوص پروتئین (Y_P) در پایان فرایندهای اتولیز و پلاسمولیز در شکل (۶) با یکدیگر مقایسه شد. مقدار $Y_{P/X}$ در اتولیز با دمای $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ و $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ به ترتیب 0.078 g g^{-1} و 0.426 g g^{-1} پس از 24 h بود. این بازده پایین خصوصاً در دمای $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ نشان می‌دهد که بخش زیادی از مواد درون سلولی به دلیل عدم هضم کامل دیواره سلولی مخمر در روش اتولیز، در توده زیستی باقی مانده است. توجه شود که در این شرایط مقدار Y_P به ترتیب $0.33/2\%$ و $0.48/9\%$ بود که نشان می‌دهد بخش اعظم مواد استخراج شده، غیر پروتئین بود. افزایش دما موجب افزایش سرعت هیدرولیز دیواره سلولی در حین اتولیز می‌شود، اما اعمال دمای بالا در زمان طولانی اثر نامطلوبی بر روی پروتئین‌های استخراج شده، می‌گذارد. از این رو، در ادامه مطالعات فرایند پلاسمولیز بررسی شد. برای انجام پلاسمولیز از محلول NaCl و KCl در غلظت 0.5 M در دماهای $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ و $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ استفاده شد. نتایج شکل (۶) نشان می‌دهد که فشار اسمزی حاصل از افزودن این ترکیبات موجب بهبود بازده $Y_{P/X}$ شده است. کمترین عملکرد پلاسمولیز در حضور KCl در دمای $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ بود که دارای $Y_{P/X} = 0.422\text{ g g}^{-1}$ بود. انجام پلاسمولیز با همین سامانه در دمای $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ موجب افزایش بازده تولید عصاره مخمر تا 0.548 g g^{-1} شد. مقدار Y_P در این فرایند پلاسمولیز در نتیجه افزایش دمای یاد شده، افزایش از $0.42/1\%$ به $0.50/5\%$ را نشان داد. علت این امر می‌تواند بهبود

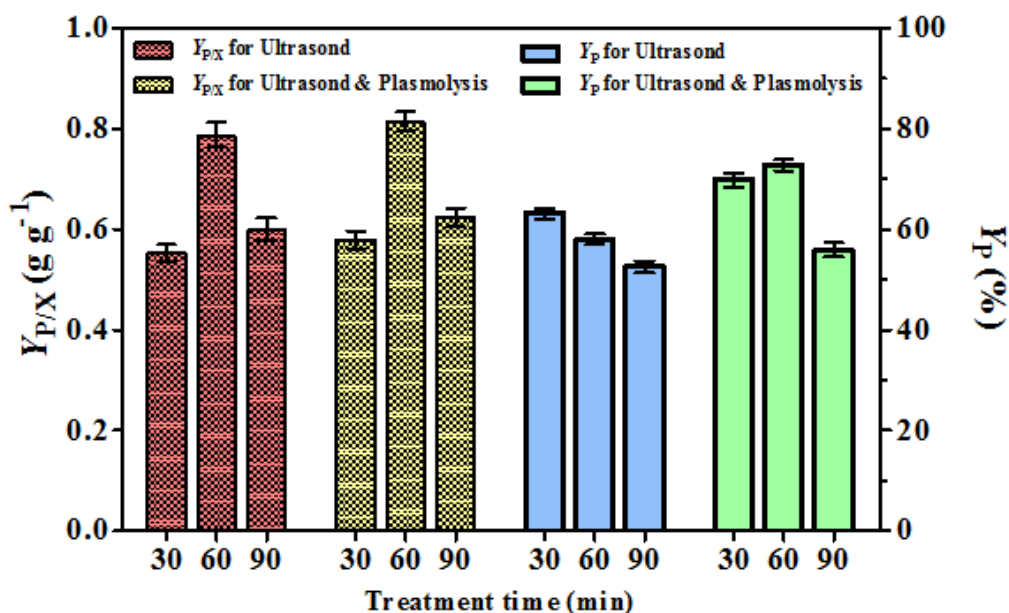
شرایط، درصد خلوص پروتئین در نمونه عصاره مخمر ۰/۷۲/۸ رسید. این نتایج نشان می‌دهد که ادغام پلاسمولیز در حضور NaCl و فراصوت می‌تواند بازده تولید عصاره مخمر بالاتر و نیز بازده خلوص پروتئین بیشتری را در مقایسه با استفاده جداگانه از پلاسمولیز و فراصوت در دمای کمتر و زمان کوتاه‌تر فراهم آورد.

مطالعات بیشتر در خصوص واپاشی دیواره سلولی مخمر با استفاده از فرایند ادغام فراصوت و پلاسمولیز در حضور NaCl بررسی شد که نتایج آن در شکل (۷) ارائه شده است. بر اساس این نتایج، بالاترین بازده به میزان $0/813 \text{ g g}^{-1}$ با ادغام فرایند پلاسمولیز NaCl و فراصوت در دمای 25°C و زمان ۶۰ min حاصل شده است. در این



شکل ۶. مقایسه $Y_{P/X}$ حاصل از فرایندهای اتولیز و پلاسمولیز دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه پس از ۲۴ h.

Figure 6. Comparison of $Y_{P/X}$ resulting from the autolysis and plasmolysis processes of *Saccharomyces cerevisiae* after 24 h.



شکل ۷. اثر زمان بر مقادیر $Y_{P/X}$ و Y_P حاصل از فرایند فراصوت و ادغام فراصوت- پلاسمولیز با NaCl (دمای 25°C).

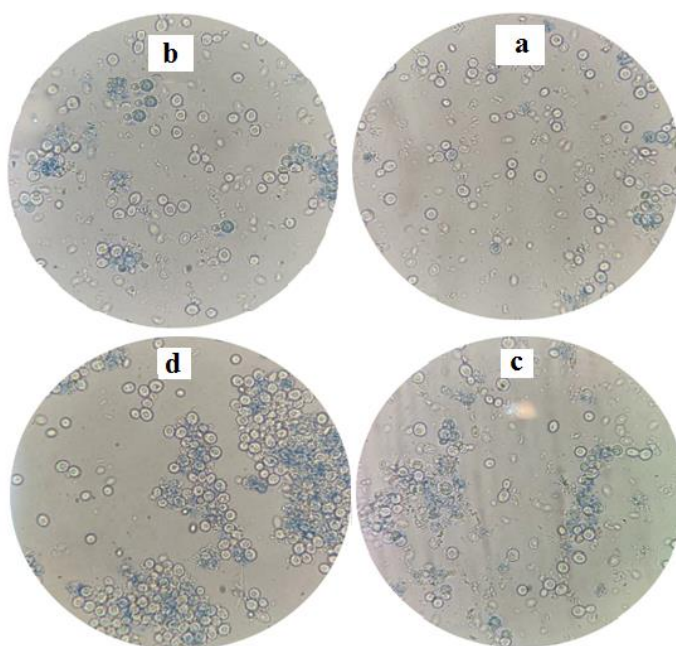
Figure 7. The effect of time on $Y_{P/X}$ and Y_P values obtained by the ultrasound process and a combining ultrasound- NaCl plasmolysis (Temp = 25°C).

رشد بر روی ملاس چغندر در بازه غلظتی $100-0 \text{ g L}^{-1}$ را به عنوان تنها منبع تأمین کننده کربن با ثابت های $\mu_{\max} = 0.151 \text{ h}^{-1}$ و $K_s = 10/30 \text{ g L}^{-1}$ نشان داد. تشکیل توده زیستی متراکمی پس از 24 h از کشت هواری مخمر با بازده تئوری $1/739 \text{ g cell g}^{-1}$ نشان از رشد مناسب داشت. اگرچه استفاده از NaCl در مقایسه با KCl اثر بیشتری بر دیواره سلولی داشت و افزایش دما از 25°C به 55°C موجب کارآمدی بیشتر این فرایند شد، اما اتولیز و پلاسمولیز به تنهایی بازده بالایی از تولید عصاره مخمر - به دلیل هضم ناکافی دیواره سلولی - حاصل نکردند. استفاده از امواج فراصوت 20 kHz برای مدت 60 min در واپاشی دیواره سلولی مخمر مؤثر بود و بالاترین بازده تولید عصاره مخمر و درصد خلوص پروتئین به ترتیب به میزان 0.113 g g^{-1} و $72/8\%$ با ادغام فرایند پلاسمولیز NaCl و فراصوت در 25°C حاصل شد. بازده بالای تولید عصاره مخمر در این تحقیق نشان دهنده ظرفیت روش استفاده شده در تولید این محصول ارزشمند از ملاس بود، اما برای تولید این محصول با کاربردهای پزشکی نیاز است تا ناخالصی های غیر پروتئینی هم چون اسیدهای نوکلئیک با انجام فرایندهای خالص سازی از محصول جداسازی شود.

شکل (۸) تصاویر میکروسکوپی از سلول های مخمر را قبل و بعد از عملیات واپاشی سلولی نشان می دهد. با افزودن رنگ تریپان بلو، در صورت انجام عملیات هضم دیواره سلولی این رنگ به دیواره سلولی مخمر نفوذ می کند و این سلول های واپاشی شده به رنگ آبی دیده می شوند، اما سلول های با دیواره سالم، پذیرنده این رنگ نبودند و بی رنگ باقی می ماندند. مقایسه شکل (a) و (b) و (c) نشان می دهد که سلول های آبی رنگ پس از فرایند پلاسمولیز بیشتر از اتولیز در دما و زمان یکسان بوده است. همچنین، در حضور NaCl در مقایسه با KCl میزان سلول های آبی افزایش یافته است (شکل (b,c)). افزایش چشم گیر سلول های آبی رنگ پس از تیمار با ادغام پلاسمولیز NaCl و فراصوت در شکل (d) نشان می دهد که بخش اعظمی از سلول های مخمر به وسیله این عملیات واپاشی شده است. بنابراین، افزایش بازده $Y_{p/x}$ در ادغام فرایندهای پلاسمولیز NaCl و فراصوت در نتیجه بهبود واپاشی دیواره سلول مخمر، با این تصاویر میکروسکوپی هم خوانی داشت.

۴. نتیجه گیری

براساس نتایج به دست آمده، مخمر ساکارومایسس سرویزیه امکان



شکل ۸. تصاویر میکروسکوپی از سلول های مخمر پس از عملیات واپاشی دیواره سلولی: (a) اتولیز، (b) پلاسمولیز با KCl ، (c) پلاسمولیز با NaCl و (d) ادغام فراصوت و پلاسمولیز NaCl .

Figure 8. Microscopic images of yeast cells after cell wall disruption processes: (a) Autolysis, (b) plasmolysis with KCl , (c) plasmolysis with NaCl , and (d) a combination of the ultrasound and NaCl -plasmolysis.

مراجع

- [1] Takaloo, Z., Nikkiah, M., Nemati, R., Jalilian, N., & Sajedi, R. H. (2020). Autolysis, plasmolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): a comparative study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(5), 68. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02840-3>
- [2] Martínez, J. M., Delso, C., Aguilar, D., Cebrián, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2018). Factors influencing autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells induced by pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 73, 67-72.
- [3] Dimopoulos, G., Tsantes, M., & Taoukis, P. (2020). Effect of high pressure homogenization on the production of yeast extract via autolysis and beta-glucan recovery. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 62(5), 102340.
- [4] <https://www.fortunebusinessinsights.com/yeast-extract-market-106656>
- [5] Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., Jiang, Y., Huang, D., & Wang, T. (2023). Yeast extract: Characteristics, production, applications and future perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2), 151-166.
- [6] Malairuang, K., Krajang, M., Sukna, J., Rattanapradit, K., & Saethawat Chamsart, S. (2020). High cell density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* with intensive multiple sequential batches together with a novel technique of fed-batch at cell level (FBC). *Processes*, 8, 1321. Doi:10.3390/pr8101321.
- [7] Robotjazi, R., Azin, M., & Sohraby, N. (2020). Optimization of a culture medium for the production of *Saccharomyces cerevisiae* using glucose syrup and corn steep liquor. *Biological Journal of Microorganism*, 9(35), 29-39, [In Persian].
- [8] Medizi, P., Maskoki, A., Elahi, M.M & Mortazavi, S. A. (2014). Investigating and comparing the replacement of molasses by dates, raisins and whey in the production of baker's yeast (*S. cerevisiae*). *Iran Journal of Food Science and Industry Research*, 10(1), 1-8, [In Persian].
- [9] <https://www.selinawamucii.com/insights/prices/iran/molasses/#retail-prices>
- [10] Ferrari, M. D., Bianco, R., Froche, C., & Loperena, M. L. (2001). Baker's yeast production from molasses/cheese whey mixtures. *Biotechnology Letters*, 23(1), 1-4.
- [11] Win S. S., Impoolsup, A., & Noomhorm, A. (1996) Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(1), 117-123.
- [12] Haddadin, J. S. (2009). Production of biomass from whey permeate and starch hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Egyptian Journal of Agricultural Sciences*, 60(1), 74-85.
- [13] Guyot, S., Pottier, L., Bertheau, L., Dumont, J., Miokono, E. D. H., Dupont, S., Ragon, M., Denimal, E., Marin, A., Hallsworth, J. E., Beney, L., & Gervais, P. (2021). Increased xerotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* during an osmotic pressure ramp over several generations. *Microbial Biotechnology*, 14(4), 1445-1461.
- [14] Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D. Y. M. M., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410-427.
- [15] Guerrero, S., López-Malo, A., & Alzamora, S. M. (2001). Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2(1), 31-39.
- [16] Hezarjaribi, M., Ardestani, F., & Ghorbani, H. R. (2016). Single cell protein production by *Saccharomyces cerevisiae* using an optimized culture medium composition in a batch submerged bioprocess. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179, 1336-1345.
- [17] Běchalová, B., & Beran, K. (1986). Autolysis of disintegrated cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biotechnologica*, 6(2), 1147-152.
- [18] DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(2), 350-356.
- [19] Berzosa, A., Delso, C., Sanz, J., Sánchez-Gimeno, C., & Raso, J. (2023). Sequential extraction of compounds of interest from yeast biomass assisted by pulsed electric fields. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1197710.
- [20] Krantz, M., Nordlander, B., Valadi, H., Johansson, M., Gustafsson, L., & Hohmann, S. (2004). Anaerobicity prepares *Saccharomyces cerevisiae* cells for faster adaptation to osmotic shock. *Eukaryotic cell*, 3(6), 1381-1390.
- [21] Shahmohammadi, A., & Fanaei Shikholislami, M. A., (2011). Bioreactor modeling of bakery yeast production in batch and fed-batch cultivations. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 10, 55. Doi:20.1001.1.17355400.1390.10.55.4.7 (In Persian)
- [22] Habibi, A., & Vahabzadeh, F. (2013). Degradation of formaldehyde at high concentrations by phenol-adapted *Ralstonia eutropha* closely related to

- pink-pigmented facultative methylotrophs. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(3), 279-292.
- [23] Ardestani, F., & Shafiei, S., (2014). Non-structured kinetic model for the cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a batch culture. *Iranica Journal of Energy and Environment*, 5(1), 8-12.
- [24] Ahmad, F., Jameel, A. T., Kamarudin, M. H., & Mel, M. (2011). Study of growth kinetic and modeling of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Biotechnology*, 16(81), 18842-18846.
- [25] Nourouzpour, M. M., Habibi, A., & Amiri, F. (2024). Kinetic studies and dynamic modeling of sophorolipids production by *Candida catenulata* using different carbon sources. *Chemical Product and Process Modeling*, <https://doi.org/10.1515/cppm-2023-0078>.
- [26] Otero, M. A., Wagner, J. R., Vasallo, M. C., García, L., & Añón, M. C. (2000). Thermal behavior and hydration properties of yeast proteins from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. *Food Chemistry*, 69(2), 161-165.