پژوهش و سازندگی
امور دام و آبزیان شماره ۷۵ تابستان ۱۳۸۶

تولید پروتئین تک یاخته از نشاسته خام به روش کشت ناپیوسته تغذیهٔ شونده با استفاده از کشت توأم مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و *Cryptococcus aerius*

• ایرج نحوی و • رسول شفیعی
دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی
تاریخ دریافت: آذرماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: خردادماه ۱۳۸۴
Email: Iranahvi@yahoo.com

چکیده

امروزه پساب‌های حاوی نشاستهٔ خام از جمله منابع آلوده‌کنندهٔ محیط‌زیست در کشورهای درحال توسعه بوده و با توجه به ارزش صنعتی و غذایی نشاسته و توسعهٔ صنایع مرتبط با آن، نیاز به تصفیه و بهینه‌سازی این پساب‌ها روز به روز بیشتر احساس می‌گردد. در این تحقیق پس از جداسازی و شناسایی یک گونهٔ مخمری مولد آمیلاز موسوم به *C. aerius* که قادر به مصرف نشاستهٔ محلول و خام است تولید پروتئین تک یاخته با سه الگوی مختلف کشت ناپیوسته تغذیه شونده در فرمانتورهای آزمایشگاهی به حجم نهایی ۷ لیترمورد بررسی قرار گرفت. در الگوی اول یعنی کشت خالص مخمر *C. aerius* برروی نشاسته خام گندم، نسبت به الگوی دوم یعنی کشت توأم و همزمان مخمر *C. aerius* با مخمر *S. cerevisiae* برروی نشاسته خام گندم، میزان بیوماس تولید شده و متعاقب آن میزان پروتئین خام سلولی تولید شده در واحد حجم کاهش چشمگیری دارد. در الگوی کشت سوم که به نحوی نمونهٔ تغییر یافته از الگوی دوم است، به دلیل عدم مصرف کامل قندهای حاصل از تجزیهٔ نشاسته میزان کاهش BOD_5 قابل توجه نمی‌باشد. در نهایت مشخص گردید که با استفاده از الگوی دوم می‌توان علاوه بر کاهش BOD_5پساب به میزان (۹۵-۸۵٪ نسبت به پساب اولیه) به تودهٔ سلولی با ۴۰/۲w/w٪ پروتئین خام دست یافت.

کلمات کلیدی: پروتئین تک یاخته، *Saccharomyces cerevisiae*، *Cryptococcus. aerius*، کشت توأم، کشت ناپیوسته تغذیه شونده، نشاسته

Pajouhesh & Sazandegi: No 75 pp: 33-38

Single cell protein production from raw starch in fed_batch culture by coculture of *Cryptococcus aerius* and *Saccharomyces cerevisiae*

By: I. Nahvi, Professor of Biotechnology, Department of Microbiology, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, Iran.

R. Shafiei, M.Sc in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, Iran.

These days, with regard to food and industrial value of starch, wastewater containing starch is one of the main source of environmental contaminant in developing countries. In this research, after isolation and identification of an amylase producing yeast called *Cryptococcus aerius* which was capable of raw and soluble starch assimilation, single cell protein (SCP) production with three different culture patterns was investigated in lab fermenters with total volume of 7 l. In the first pattern, which was a pure-culture of *C. aerius* on raw wheat starch, final biomass and raw cell protein production was less than the second pattern of culture which was a coculure of *C. aerius* and *S. cerevisiae*. In the third culture pattern which was a modification of the second culture pattern, due to incomplete carbohydrate assimilation by yeasts, BOD_5 decrease was not considerable. Finally it was proved that with the second culture pattern, 85- 95% of BOD_5 was decreased (compared with the initial wastewater) and biomass with 40.2% (w/w) raw protein content could be achieved.

Key words: Coculture, *Cryptococcus aerius*, Fed-batch, *Saccharomyces cerevisiae* , Single cell protein, Starch.

مقدمه

نشاسته پلی‌ساکاریدی است که از واحدهای گلوکزی متصل به هم با پیوندهای گلیکوزیدی α(۱→۴) و α(۱→۶) تشکیل شده است. به دلیل قابلیت سریع تجزیه نشاسته و نیز به دلیل خصوصیات مختلف شیمیایی و فیزیکی موجود در نشاسته، این پلی‌ساکارید در رژیم غذایی انسان‌ها جایگاه ویژه‌ای دارد(۷، ۲۱).

بیشترین نشاستهٔ مورد استفاده در دنیا از دانه‌های غلات و غده‌های گیاهی نظیر سیب زمینی، کاساوا و... بدست می‌آید. براساس روش تولید نشاسته، نوع خالص‌تر و مرغوب‌تر آن در صنایع غذایی از جمله تهیه کیک و شیرینی، ژله‌ها، دسرها، غذای نوزادان و محصولات گوشتی به کار می‌رود. نشاسته همچنین در صنایع شیمیایی، سرامیک سازی، نساجی، کاغذسازی و صنایع دارویی و بهداشتی کاربرد فراوان دارد (۲، ۱۳، ۲۱)، تحقیقات فراوانی نیز جهت تولید نگهدارنده‌های دارویی و غذایی نظیر ترهالوز از نشاسته به روش‌های تخمیری در حال انجام است (۱۷) با توجه به ویژگیهای منحصر به فرد نشاسته، امروزه تولید آن در کشورهای درحال توسعه روبه افزایش است (۱۴). براساس روش تولید نشاسته، میزان پساب و محتوای آن متفاوت بوده؛ ولی به صورت معمول در یک کارخانهٔ تولیدکنندهٔ نشاستهٔ صنعتی با ظرفیت حدود ۴-۳ تن در روز حدود ۱۲۰-۱۰۰ m^3 پساب تولید می‌گردد که به دلیل ماهیت آن قابلیت زیادی در آلوده ساختن محیط‌زیست دارد (۱۲، ۱۴).

امروزه هرچند تصفیهٔ فاضلاب‌های صنعتی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است؛ اما بهینه‌سازی پساب‌ها اصولاً از لحاظ اقتصادی برای صاحبان صنایع با صرفه‌تر است. در این راستا در برخی کشورها نظیر سوئد اقدام به تولید پروتئین تک یاخته از نشاسته شده و پساب حاصل از یک کارخانهٔ فرآوری سیب زمینی با روش کشت توأم[1] موسوم به روش سیمبا[2] به محصولی با محتوای پروتئینی مناسب تبدیل شده است که ارزش تغذیه‌ای فراوان در خوراک دام را دارا است. توانایی این سیستم جهت تیمار ۲۰ m^3 پساب در روز است و در هر ساعت ۲۵۰ kg مخمر خشک تولید می‌نماید. میزان کارآمد بودن این سیستم در حد استاندارد است به صورتیکه BOD_5 اولیه پساب (۱۶۴۰ mg/l) پس از تیمار به روش سیمبا به حدود ۱۰۰ mg/l کاهش می‌یابد (۱۴، ۲۰). در برخی از کشورها نظیر هند نیز از نشاسته جهت تولید الکل استفاده می‌شود(۱۳، ۱۹، ۲۰).

با توجه به تحقیقات قبلی مولفان در زمینه کشت ناپیوسته[3] مخمر مولد آمیلاز(۱، ۱۶، ۱۷) هدف از این تحقیق در مرحلهٔ اول بررسی امکان تولید پروتئین تک یاخته از نشاستهٔ خام در فرمانتورهای آزمایشگاهی به روش کشت ناپیوسته تغذیه شونده[4] و سپس گزینش بهترین روش جهت تولید محصول(توده سلولی) با محتوای پروتئینی بالا و کاهش BOD_5 نمونه حاوی نشاسته است.

مواد و روش

گونه‌های میکروبی

گونهٔ میکروبی *S. cerevisiae* از کلکسیون میکروبی گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان تهیه گردید. گونهٔ مخمری مولد آمیلاز موسوم به *C. aerius* از یک نمونه آب راکد به روش غنی سازی در محیط حاوی نشاسته جداسازی گردید(۱، ۶، ۱۶)و پس از شناسایی توسط روش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیک مورد استفاده قرار گرفت (۶) تا به حال گزارشی

مبنی بر بیماریزایی این گونه داده نشده است (۶).

روش و شرایط کشت

کشت اولیه: هر دو گونهٔ مخمری ذکر شده پس از کشت در دمای محیط (حدود ۳۰-۲۵درجه‌سانتی‌گراد) به مدت ۲۴ ساعت برروی محیط YGC آگار، درون محیط مایعی حاوی ۱۰g/l گلوکز مونو هیدرات، ۵g/l سولفات آمونیوم، ۵g/l فسفات مونوآمونیوم، ۰/۵g/l سولفات منیزیم هپتا هیدرات و ۰/۲g/l کلرید کلسیم دی هیدرات کشت داده شد وبه مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با ۱۸۰rpm انکوبه گردیدند.

کشت ثانویه: کشت ثانویه در محیطی مایع با ترکیباتی مشابه با محیط مایع کشت اولیه انجام گرفت. تنها برای مخمر مصرف‌کنندهٔ نشاسته (کریپتوکوکوس آیروس) به جای گلوکز از ۱۰g/l نشاستهٔ خام گندم استفاده گردید. شرایط انکوباسیون مشابه شرایط کشت اولیه است. لازم به ذکر است که pH محیط کشت اولیه و ثانویه ۵/۲ ± ۰/۲ بوده که با استفاده از HCl(۱N) وNaOH(۱N) تنظیم شده است.

کشت اصلی: کشت اصلی در فرمانتورهای Infors مدل AG ۴۱۰۳ Bottminger به حجم نهایی۷ لیتر(و حجم مفید ۵l) انجام گرفت. دمای محیط کشت در طول فرایند تولید در حد ۳۲ ± ۰/۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید و هوادهی به میزان ۵vvm و دور همزن ۲۵۰rpm انجام شد.

طرح آزمایش

در الگوی اول، کشت ثانویه از مخمر مولد آمیلازها به حجم ۵۰۰ml به فرمانتورها انتقال یافته و خوراکی حاوی ۵۰g/l نشاستهٔ محلول همراه با نمکهای معدنی (با همان غلظت موجود در کشت اولیه) با سرعت‌های متفاوت طبق روش زیر به فرمانتور انتقال یافت وپس از پایان تخمیر برخی از پارامترها مورد آزمایش قرار گرفت.

در الگوی دوم آزمایشها، کشت توأم مخمر مولد آمیلاز به حجم ۵۰۰ml همراه با ۵۰۰ml از کشت مخمر ساکارومایسس سرویزیه به فرمانتور انتقال یافت و خوراک دهی طبق روش زیر انجام شد وپس از پایان تخمیر برخی پارامترها مورد آزمایش قرار گرفت.

در الگوی سوم آزمایشها، کشت ثانویه از مخمر مولد آمیلاز به حجم ۵۰۰ml به فرمانتور انتقال یافته و خوراک دهی طبق روش زیر انجام شد پس از پرشدن حجم مفید فرمانتور، دمای فرمانتور به ۵۰ ± ۱ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد و هوادهی قطع گردید و ۲ ساعت در این دما نگه‌داشته شد؛ هدف از این کار افزایش فعالیت آنزیم‌های آمیلاز برون سلولی و تجزیه سریع‌تر نشاسته موجود در محیط بود. پس از طی این مدت با کاهش دما نیمی از محلول فرمانتور به جز سلول‌های ته‌نشین شده به فرمانتور مشابهی انتقال داده شد و ۵۰۰ml از کشت ثانویهٔ مخمر *S. cerevisiae* به آن منتقل شد و هوادهی شبیه الگوهای کشت اصلی انجام گرفت.

خوراک استفاده شده برای تغذیه فرمانتورها حاوی ۵۰g/l نشاسته خام گندم و نمکهای معدنی (به میزان اشاره شده در کشت اولیه) بوده است.pH خوراک در حد ۵/۲ تظیم گردید.میزان خوراک‌دهی فرمانتورها بر اساس تجربیات قبلی در زمینهٔ مقدار تحمل نشاسته توسط مخمر *C. aerius* انجام شد(۱، ۱۹) بر اساس تحقیقات قبلی با افزایش مقدار نشاسته از ۳w/v٪ میزان تجزیهٔ نشاسته توسط مخمر مولد آمیلاز (*C. aerius*) کاهش می‌یابد؛ لذا سعی گردید در طول تخمیر غلظت نشاسته درون فرمانتور با کاهش و افزایش سرعت خوراک دهی در حد ایده ال (۳w/v٪) برای مخمر مولد آمیلاز حفظ شود. خوراک دهی با حفظ غلظت(۳w/v٪) نشاسته خام تا پرشدن فرمانتورها (حجم مفید ۵l) ادامه یافت و سپس خوراک‌دهی قطع شد. زمان کل تخمیر پس از قطع خوراک دهی۴۸ ساعت بوده است.

اندازه‌گیری BOD

میزان BOD خوراک فرمانتورها و نیز محلول داخل فرمانتورها پس از پایان تخمیر به وسیلهٔ دستگاه BOD متر Lovibond اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه سه باراندازه‌گیری BOD_5 انجام شد.

اندازه‌گیری میزان نشاستهٔ باقیمانده

میزان نشاستهٔ باقیمانده به روش یدومتری با طول موج ۶۲۰nm اندازه‌گیری شد (۹، ۱۰، ۱۸).

اندازه‌گیری میزان قند احیاءکننده باقیمانده

میزان قند احیاء کنندهٔ باقیمانده با استفاده از روش برن فلد و معرف دی‌نیتروسالسیلیک اسید(DNS)اندازه‌گیری گردید (۳).

اندازه‌گیری پروتئین خام سلولی

میزان پروتئین خام سلولی، پس از هضم سلولها با محلول قلیایی سود داغ با استفاده از کوماسی‌بلواندازه‌گیری گردید (۵، ۱۵).

محاسبه نتایج

کلیهٔ آزمایش‌ها اعم از الگوهای تخمیری واندازه‌گیری پارامترها در سه بار تکرار انجام گردید و نتایج ارایه شده میانگین حاصل از سه بار آزمایش تحت شرایط یکسان است.

نتایج وبحث

بررسی مصرف نشاسته توسط سویهٔ مخمری جداسازی شده

براساس مطالعات قبلی حدود ۲۵٪ مخمرهای جداسازی شده قدرت مصرف نشاستهٔ محلول را دارا می‌باشند (۶، ۸)؛ از طرفی مصرف نشاستهٔ خام توسط سویه‌های مخمری مختلف یا کلاً انجام نمی‌گیرد و یا بسیار ضعیف است به صورتیکه گونه‌های مختلف جنس شوانیومایسس[5] که از لحاظ تولید آمیلازها تنوع و قدرت بالایی دارند قادر به رشد برروی نشاستهٔ خام و ایجاد هاله نمی‌باشند. از این رو با توجه به اینکه مخمر جداسازی شده قدرت بالایی در مصرف نشاستهٔ خام و محلول دارد (شکل ۱) و همچنین با توجه به تفاوتهای فیزیولوژیک آن با مخمر *S. cerevisiae* (جدول ۱) می‌توان از آن در تولید SCP استفاده نمود.

بررسی رابطهٔ میان بیوماس تولیدی و نحوهٔ کشت مخمرها درون فرمانتورها

براساس نتایج بدست آمده (جدول ۲) مشخص گردید که تفاوت

شکل ۱- فرمانتور آزمایشگاهی Infors با حجم VL

قابل توجهی در میزان بیوماس تولید شده در کشت توأم نسبت به کشت ساده وجود دارد به صورتیکه در کشت توأم میزان بیوماس تولید شده به ازای هر ۳۰g/l نشاسته، حدود ۲g/l بیشتر است. آنچه مسلم است مخمر *S. cerevisiae* به دلیل عدم تولید آمیلازها، در کشت توأم تنها یک مصرف‌کننده است و از محصولات حاصل از تجزیهٔ نشاسته توسط مخمر *C. aerius* استفاده می‌کند (۱)؛ از طرفی با توجه به اینکه ثابت شده مخمرها اصولاً تنوع محدودی در تولید آمیلازها دارند (۴، ۱۱)، لذا می‌توان نتیجه گرفت که محصولات حاصل از تجزیهٔ نشاسته توسط آمیلازها احتمالاً حاوی ترکیباتی نظیر دکسترین‌های محدود است که توسط مخمر *C. aerius* قابل جذب‌شدن نبوده و در محیط کشت باقی می‌ماند؛ درحالیکه در کشت توأم مخمر *S. cerevisiae* به دلیل توانایی در جذب این ترکیبات قادر است بیوماس بیشتری را تولید نماید. این مسأله اگرچه در نگاه اول یک حدس ساده به نظر می‌رسد اما با اندازه‌گیری میزان قند احیاء کنندهٔ محیط پس از پایان تخمیر (جدول ۲) مشخص گردید که حتی پس از فاز سکون رشد مخمرها در کشت ساده،اندکی قند احیاءکننده در محیط کشت باقیمانده است که توسط مخمر *C. aerius* قابل استفاده نمی‌باشد. ولی در محیط کشت حاوی مخمر *S. cerevisiae* و *C. aerius* تمامی ترکیبات حاصل از تجزیهٔ نشاسته مصرف می‌شود به صورتی که میزان قند باقیمانده قابل سنجش با روش برن فلد نمی‌باشد. بنابر آنچه گفته شد، در کشت توأم، دو مخمر با مصرف کامل منبع کربنی یعنی نشاسته، میزان بیوماس محیط تاحد نهایی افزایش می‌یابد. از طرف دیگر با توجه به اینکه از ۳۰g/l نشاسته، در نهایت تحت شرایط ایده‌آل حدود ۱۱/۲g/l بیوماس تولید شده است؛ لذا راندمان یا بازده تولید نسبت به صنایع دیگر نظیر تهیهٔ SCP از ملاس چغندر، یا نیشکراندکی پایین‌تر است (۱۲).

بررسی رابطهٔ میان تولید پروتئین خام سلولی و روش کشت مخمرها در فرمانتورها

میزان پروتئین خام سلولی رابطهٔ مستقیمی با روش کشت و نوع سلولهای به کار برده شده در حین تخمیر دارد، به صورتیکه در تهیه انواع SCP از جمله فاکتورهای مهم در گزینش سویه‌های برتر را میزان پروتئین موجود در محصول نهایی می‌دانند (۵) از طرفی روش خوراک دهی در میزان پروتئین خام حاصل اهمیت ویژه‌ای دارد به صورتیکه معمولاً در کشت ناپیوسته به دلایل متعدد میزان پروتئین سلولی نسبت به کشت ناپیوستهٔ تغذیه شونده کاهش می‌یابد و لذا در صنایع تولید پروتئین تک یاخته اصولاً از کشت‌های ناپیوستهٔ تغذیه شونده و یا کشت مداوم با خوراک دهی برنامه‌ریزی شده برای منابع کربنی، نیتروژنی و فسفری استفاده می‌شود (۱۲، ۱۴).

براساس نتایج بدست آمده در جدول ۲ با استفاده از کشت‌های توأم دو مخمر، میزان پروتئین خام سلولی حاصل نسبت به کشت‌های ساده بیشتر است. در کشت‌های ساده و توأم نوع و میزان خوراک دهی یکسان است اما آنچه موجب شده که در کشت توأم میزان پروتئین خام سلولی بیشتر باشد احتمالاً ویژگی مخمر *S. cerevisiae* در تولید پروتئین‌های خام درون سلولی است. به هرحال آنچه براساس آزمایش‌های انجام شده مشخص است

جدول ۱- مقایسهٔ برخی خصوصیات دوگونه مخمری به کار رفته در الگوهای مختلف کشت

نام آزمایش	تخمیر										
نام مخمر	گلوکز	مالتوز	ساکارز	گلوکز	مالتوز	لاکتوز	نیترات	نشاسته	سیترات	اوره	رشد در دمای ۴۰°C
S. cerevisiae	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−
C. aerius	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	−

* Fermentation = تخمیر

**Assimilation = جذب

جدول ۲- میزان بیوماس، پروتئین و قند احیاکنندهٔ نهایی باقیمانده در الگوهای مختلف کشت

پارامتر الگوی کشت	بیوماس نهایی (g/l)*	میزان پروتئین خام (٪)**	میزان قند نهایی باقیمانده (mg/۱۰۰ml)***
الگوی اول	۹/۲۵	۳۲/۱۱	۳۴
الگوی دوم	۱۱/۲	۴۰/۲	۰
الگوی سوم	۶/۴	۳۵/۱	۱۹۰

* بیوماس نهایی براساس گرم سلول خشک در واحد حجم فرمانتور(پس از پایان تخمیر) ذکر شده است.

**میزان پروتئین براساس مقدار گرم پروتئین در ۱۰۰g از محصول خشک (مخمر خشک شده) ذکر شده است.

*** میزان قند نهایی برحسب میلی‌گرم قند احیاءکننده باقیمانده در ۱۰۰ml از محلول فرمانتور (پس از پایان تخمیر) ذکر شده است

با استفاده از کشت توأم علاوه براینکه میزان پروتئین در هر گرم محصول نهایی زیادتر است در واحد حجم فرمانتورها نیز میزان تولید بیوماس و به طبع آن تولید پروتئین بیشتر خواهد بود.

رابطهٔ میان BOD_5 نهایی محلول فرمانتورها و طرح کشت درون فرمانتورها

در تمامی روش‌ها پس از مدت زمان مشخصی میزان نشاستهٔ موجود به حد صفر می‌رسد، درواقع به دلیل نوع واکنش میان ید و نشاسته که دراندازه‌گیری میزان نشاستهٔ باقیمانده انجام می‌گیرد، با تأثیر آمیلازها برروی نشاسته و قطعه قطعه‌شدن نشاسته، امکان واکنش ید با زنجیره‌ها به حداقل رسیده و لذا محلول داخل فرمانتورها در ظاهر عاری از نشاسته است. با توجه به اینکه در صنعت تهیهٔ نشاسته به روش‌های مدرن و سنتی میزان نشاستهٔ‌پساب براساس عملکرد و دستگاه‌های خط تولید مابین ۵-۲٪ و گاهاً بیشتر متغیر است؛ و از طرفی با توجه به اینکه محلول‌های بیش از ۳۰g/l نشاسته دارای ویسکوزیتهٔ بالایی بوده و نفوذ اکسیژن در آنها به سختی انجام می‌گیرد و اثر نامطلوب غلظت بالاتر از ۳۰g/l بر مخمر *C.aerius* در تحقیقات قبلی مشخص شده است(۱۶)؛ لذا درصورت استفاده از این پسابها[۷] باید میزان نشاستهٔ موجود در آنها تعیین گردد و پس از تعیین غلظت میزان خوراک‌دهی در حدی تنظیم گردد که ویسکوزیتهٔ محیط درحداقل مقدار ممکن باقی بماند، از طرف دیگر درصورت عدم رعایت چنین مسأله‌ای هدف اصلی انجام چنین پروژه‌ای یعنی کاهش BOD_5 پساب به حداقل می‌رسد؛ چرا که سلول‌های مخمری در غیاب اکسیژن محلول نه قادر به شکستن نشاسته‌اند و نه رشد مؤثری دارند(۱، ۱۶). درصورت رعایت این مسأله همانطور که نتایج نشان می‌دهد(شکل ۲) میزان BOD_5 الگوی دوم کشت حدود ۹۰-۸۰٪ نسبت به BOD_5 محلول نشاستهٔ اولیه کاهش نشان می‌دهد. درواقع در کشت توأم همانطوری که قبلاً هم توضیح داده شد به دلیل مصرف کامل قند موجود در محیط، میزان کاهش BOD_5 بسیار بیشتر است.

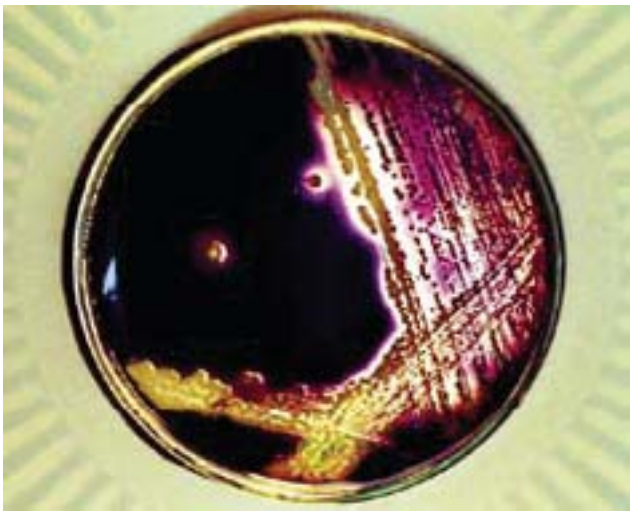
بررسی طرح‌های کشت و گزینش روش برتر جهت صنعت

براساس آنچه تاکنون ذکر شد امکان استفاده از سه روش ذکر شده در صنعت وجود دارد؛ اما هرکدام از روش‌ها معایب و محاسنی دارد:

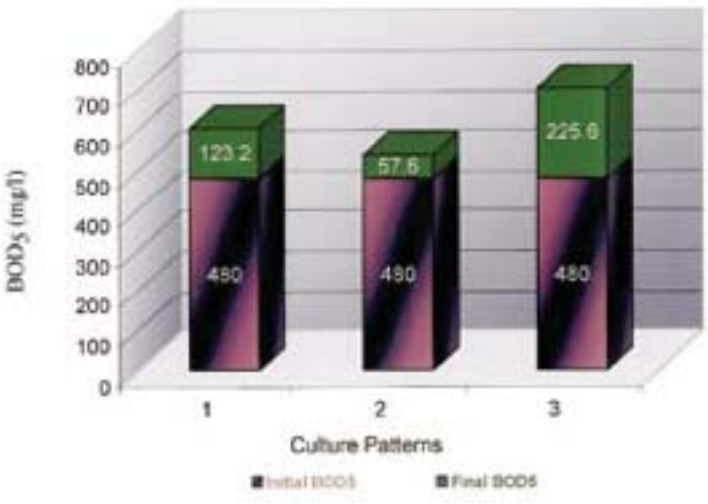
الگوی اول کشت، در این روش همانطوری که ذکر شد، از مخمر *C. aerius* در یک کشت ناپیوستهٔ تغذیه شونده استفاده شد. به دلیل سادگی این روش در کشت اولیه، نیاز به یک گونه مخمر و عدم نیاز به کنترل کامل و دقیق مراحل تخمیر این روش از لحاظ نیروی کار مقرون به‌صرفه‌تر است؛ اما با توجه به اینکه این روش تأثیر کمتری در حذف BOD_5 داشته و محصول نهایی نیز دارای مقدار پروتئین کمتری بوده و بیوماس تولید شده نیز در واحد حجم فرمانتور کمتر است؛ لذا استفاده از آن محدود می‌گردد.

در الگوی دوم کشت، که روشی مشابه با روش سیمبا می‌باشد علیرغم اینکه نسبت به الگوی اول پیچیده‌تر است اما به دلایل متعدد از جمله بازده زیاد در تولید بیوماس و پروتئین میکروبی و کاهش بیشتر BOD_5 به‌عنوان یک روش برتر درنظر گرفته می‌شود.

الگوی سوم کشت، با اینکه از دو الگوی قبلی پیچیده‌تر و درحد صنعتی نیاز به تجهیزات پیچیده‌تر و نیروی کار ماهرتری دارد ولی از لحاظ بازده تولید بیوماس و پروتئین نسبت به دو الگوی دیگر برتری خاصی نداشته؛ و با توجه به اینکه از جمله اهداف بهینه‌سازی پساب‌ها کاهش BOD_5 آن



شکل ۲- مخمر *C. aerius* کشت داده شده برروی نشاستهٔ محلول
(هاله‌های سفیدنشان دهندهٔ مصرف نشاسته وبخشهای آبی رنگ نشانهٔ عدم مصرف نشاسته است)



شکل ۳- تأثیر الگوهای مختلف کشت بر روی تغییرات BOD_5 اولیه محلول ۳۰ g/l نشاسته

است، نمی‌تواند به عنوان یک روش مناسب به کار برده شود.

پاورقی‌ها

1- Coculture
2- Jymba
3- Batch Culture
4- Fed-Batch Culture
5- Schwanniomyces SP.

منابع مورد استفاده

۱ - شفیعی، ر. ۱۳۸۲؛ جداسازی و بهینه سازی مخمرهای مولد آمیلاز و کاربرد آن در صنعت. پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد، دانشگاه اصفهان، گروه زیست شناسی.

۲ - ملک زاده، فریدون، م. صعودی و ش. ملک زاده. ۱۳۷۹. بیوتکنولوژی میکروبی، جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران، شمارهٔ ۲۴۸۹ صفحه ۳۲۴-۳۱۳.

3- Bernfeld, P., S. P. Colowick, and N. O. Kalpan. 1995; Method in enzymology. Vol 1, Academic Press, New York, 36-44.

4- Haruguki, I., M. Chino and K. Miyoshi. 1996; Raw-starch digesting and thermostable α-amylase from the yeast Cryptococcus 5-2: purification, characterization and sequencing. Biochemistry Journal. 318, 989-996.

5- Jgensen, H. J., L. Olsson and E. A. Palmquist. 2000; Fed-Batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation. Applied Microbiology and Biotechnology. 59, 310-317.

6- Kurtzman, C. P., J. W. Fell. 1998; The Yeasts: A taxonomic study. Fourth edition, Elsevier, Amsterdam.

7- Lehninger, A.L. 2000; Principle of biochemistry. Worth publishers,Inc.New York. 287-288.

8- Linardi, R. V. and K. M. G. Machado. 1990; Production of amylase by yeasts. Canadian Journal of Bacteriology. 36, 751-753.

9- Lusena, C.V., C. C. Champangene and G. B. Calleja.1985; Secretion and export of amylolytic activities in Schw. alluvius. Canadian Journal of Bacteriology. Cell. Biol., 63, 366-371.

10- Macfaddin, J. F. 2000; Biochemical tests for identification of medical bacteria. Third editions, Lippincott William and Williams, 412-439.

11- Pandy, A., P. Nigam, C. R. Soccol and D. Singh. 2000; Review article: Advance in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry. 31, 135-152.

12- Reed, G., and T. W. Nagoda withana. 1991; Yeast Technology, Second edition, Uanostrand Reinhold, 37-89.

13- Roeher, M.. 2001; The Biotechnology of ethanol: Classical and future applications, Willey-VCH. 35-42.

14- Rose, A. H. 1979; Microbial biomass. Academic press. 289-311.

15- Scopes, P. K. 1994; Protein purification: Principle and practice. Springer-Verlag, New York INC, 31-32, 349-350.

16- Shafiee, R., Nahvi, I., Emtiazi, G. 2005; Bioconversion of raw starch to SCP by coculture of *Cryptococcus aerius* and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Science. 5,(6), 717-723.

17- Shafiee, R., Nahvi, I., Emtiazi, G. 2005; Trehalose production by an starch assimilating yeast *Cryptococcus aerius*. Biotechnology. 4(4), 279-283

18- Siendes, B. S. 1984. Purification and characterization of the extracellular amylases of the yeast Schwaniomyces alluvius. Canadian Journal of Bacteriology. 30, 1163-1170.

19- Verma, G., Nigam, P., Singh, D., Chaudhary, K. 2000; Bioconversion o1f raw starch to ethanol in a single step process by co-culture of amylolytic yeast and *Saccharomyces cerevisiae* 21. Bioresource Technology. 72, 261-266.

20- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., Higton, G.2001; Industrial microbiology: An Introduction. BlackWell Science. 144-165, 218-229.

21- Whistler, R. L. and E. F. Paschall. 1984; Starch: Chemistry and technology. Second edition, Academic Press, INC. 234-236.