



Evaluation of the effect of different drying methods and Protective agents on the viability of *Wickerhamomyces anomalus* yeast

Somayeh Rahaiee¹, Marzieh Ghapanchipour², Mohammad Hadi Eskandari³, Mojtaba Ranjbar⁴

¹Associate professor, Department of Microbial Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

²MSc degree, Department of Microbial Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

³Professor, Department of Food Science and Technology, Shiraz University, Shiraz, Iran.

⁴Associate professor, Department of Bioinformatic and applied Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Today, much attention has been paid to the study of application of non-*Saccharomyces* yeasts, mainly in fermented foods and beverages so that to ensure a suitable storage method to preserve the characteristics and fermentation capabilities of yeasts over long periods of time. The aim of this research is to compare the three methods of freeze drying, spray drying, and vacuum drying, using protective agents' maltodextrin and whey protein concentrate, to preserve *Wickerhamomyces anomalus* yeast.

Materials & methods: In this research, yeast was cultured and maltodextrin and whey protein concentrate were added at a rate of 5% w/v to the culture medium and different drying methods were used. Then, the damage to yeast and its survival rate during the storage period were evaluated using scanning electron microscope images, counting the number of colonies during process, and staining cells with methylene blue and rhodamine B.

Results: The results showed that the survival rate of freeze-dried yeast with a pre-freezing temperature of -20 °C was higher than with the spray-drying and vacuum-drying methods. The storage period was significantly effective on the survival rate of yeast, so that vacuum drying lead to a higher survival rate of yeast at $0.85 \pm 0.02 \times 10^8$ CFU/mL during the 60-day storage period. Also, the scanning electron microscopy analysis showed that the vacuum-dried yeast samples have a smoother surface and less structural damage, despite the presence of sharp edges.

Conclusion: The findings showed that both freeze-drying and vacuum-drying methods have good potential for increasing the widespread use of *W.anomalus* yeast.

Keywords: Microbial starter cultures, Drying, Protective agents, Viability of cells, *Wickerhamomyces anomalus*.

Received: 6 July 2025

Revised: 27 July 2025

Accepted: 29 August 2025

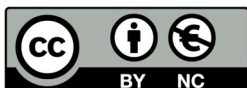
Correspondence to: Somayeh Rahaiee

Tel: +98 1144442136

E-mail: S.rahaiee@ausmt.ac.ir

Journal of Microbial World 2025, 18 (2): 126 - 140

DOI: <https://doi.org/10.82363/jmw.2025.1216663>



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



ارزیابی اثر روش‌های مختلف خشک کردن و مواد محافظت‌کننده بر زنده‌مانی مخمر ویکرها مومایسس آنومالوس

سمیه رهایی^{۱*}، مرضیه قبانچی پور^۲، محمدهادی اسکندری^۳، مجتبی رنجبر^۴

^۱ دانشیار، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
^۲ کارشناسی ارشد، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
^۳ استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
^۴ دانشیار، گروه بیوانفورماتیک و زیست فناوری کاربردی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه به مطالعه و استفاده از مخمرهای غیرساکارومایسس در غذاها و نوشیدنی‌های تخمیری توجه زیادی می‌شود به گونه‌ای که قابلیت‌های تخمیری مخمر در مدت زمان طولانی نگهداری حفظ گردد. هدف از این پژوهش، مقایسه سه روش خشک کردن انجمادی، پاششی و تحت‌خلأ با استفاده از ترکیبات محافظت‌کننده مالتودکسترین و کنسانتره پروتئین آب‌پنیر برای حفظ مخمر ویکرها مومایسس آنومالوس بوده است.

مواد و روش‌ها: بعد از کشت مخمر و افزودن مالتودکسترین و کنسانتره پروتئین آب‌پنیر به میزان ۵٪ وزنی/حجمی به محیط کشت، از روش‌های نام‌برده خشک کردن استفاده گردید. آنگاه، میزان آسیب به مخمر و سنجش نرخ زنده‌مانی آن در طول دوره نگهداری با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، شمارش تعداد کلنی‌ها قبل و پس از خشک کردن، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با متیلن‌بلو و رودامین‌بی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان زنده‌مانی این مخمر با روش خشک‌کن انجمادی در دمای پیش‌انجماد ۲۰- درجه سلسیوس نسبت به دو روش پاششی و تحت‌خلأ بالاتر است. همچنین طول دوره نگهداری به طور معنی‌داری بر روی میزان زنده‌مانی مخمر موثر بود به گونه‌ای که بالاترین میزان زنده‌مانی بعد از گذشت ۶۰ روز ذخیره‌سازی $10^4 \times 0.02 \pm 0.85$ CFU/mL توسط روش خشک‌کن تحت‌خلأ به ثبت رسید. همچنین، در آنالیز تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه‌های مخمر خشک‌شده با خشک‌کن تحت‌خلأ با وجود حاشیه‌های تقریباً تیز، سطحی صاف‌تر و آسیب کمتری را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که دو روش خشک‌کردن انجمادی و تحت‌خلأ می‌توانند پتانسیل خوبی را در افزایش استفاده گسترده از مخمر ویکرها مومایسس آنومالوس داشته باشند.

کلمات کلیدی: کشت‌های آغازگر میکروبی، خشک کردن، مواد محافظت‌کننده، زنده‌مانی سلول‌ها، ویکرها مومایسس آنومالوس.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۶/۷

ویرایش مقاله: ۱۴۰۴/۵/۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۴/۱۵

مقدمه

ارزش غذایی و بخشیدن خواص جدید به مواد غذایی انجام می‌شود، همچنین در معنای گسترده‌تری جهت استفاده از میکروارگانیسم‌هایی مانند مخمرها، باکتری‌ها و قارچ‌ها برای تولید محصولات مختلف (زیست توده، آنزیم‌ها، متابولیت‌های

فرآیند تخمیر عمدتاً برای افزایش طعم، عطر، ماندگاری، بافت،

(*) آدرس برای مکاتبه: گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

پست الکترونیک: S.rahaiee@ausmt.ac.ir

تلفن: ۰۱۱۴۴۴۲۱۳۶



anomalus) با نام قدیمی پیکیا آنومالا، یک آسکومایست هتروتالیک از خانواده ویکرهامومایسته می‌باشد که قادر به تولید مثل جنسی (از طریق ایجاد آسکوپورها یا کلاه‌شکل) و غیرجنسی (از طریق جوانه‌زدن) است (۱۰-۱۲). این سویه به عنوان میکروارگانیزم سطح یک ایمنی زیستی طبقه‌بندی می‌شود و می‌تواند تحت شرایط استرس شدید مانند pH بالا و پایین، شوری محیط، شرایط بی‌هوایی، کم‌آبی و فشار اسمزی بالا رشد کند (۹-۱۲). این مخمر به عنوان یک منبع پروتئینی با کیفیت، قادر به تولید گلیکوپروتئین‌هایی است که رقت‌های بالایی از میکروب‌ها را مهار می‌کنند (۱۱ و ۱۳). از طرف دیگر این مخمر دارای فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی نیز می‌باشد که می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده زیستی مورد استفاده قرار گیرد (۱۱). این میکروارگانیزم‌ها می‌توانند ترکیبات معطر دیگری را از طریق واکنش‌های آنزیمی تولید کنند، محتوای اتانول و اسیدپتیک را کاهش دهند، تولید گلیسرول را افزایش دهند و رنگ را تثبیت کنند (۷ و ۱۴). یکی از دلایل عمده در عدم استفاده از مخمرهای غیر ساکارومایسس، پارامتر نگهداری مناسب آن‌ها می‌باشد (۱۵). منظور از نگهداری، حفظ قابلیت کشت، زنده‌مانی و پایداری آن‌ها می‌باشد. عامل مهم دیگر در فرآیندهای حفاظتی، استرسی است که مخمرها در زمان نگهداری در معرض آن قرار می‌گیرند و این استرس عمده‌تاً استرس اکسیداتیو می‌باشد (۶).

خشک‌کردن یکی از قدیمی‌ترین روش‌های نگهداری فرآورده‌های غذایی است که توسط انسان مورد استفاده قرار گرفته است. در تمام فرآیندهای خشک‌کردن، همزمان با حذف آب تغییرات مختلفی مانند آسیب دیواره سلولی و واسرشت اجزای کلیدی سلول مختل‌کننده فعالیت سلولی و تولید مثل رخ می‌دهد (۱۶). برخی از اجزای سلولی حساس به حرارت شامل DNA، RNA، ریبوزوم، پروتئین، آنزیم و غشای سلولی است که جهت بقای سلولی به یکدیگر وابسته هستند. طی فرآیند خشک شدن، برخی از اسیدهای موجود در غذاها (مانند اسیداستیک یا اسیداسکوریک) می‌توانند بر پایداری حرارتی میکروارگانیزم‌ها تأثیر بگذارند، اما در عین حال توانایی

اولیه و ثانویه، محصولات نو ترکیب و محصولات تبدیل زیستی) در مقیاس صنعتی به کار می‌رود (۱ و ۲). در حال حاضر، نوشیدنی‌های تخمیری همچون مالت و ماء‌الشعیر در طعم‌ها و برندهای مختلف در ایران تولید می‌گردند. هدف بسیاری از تولیدکنندگان این نوع نوشیدنی‌ها، دستیابی به سویه مناسب در انجام فرآیند تخمیر می‌باشد که هم تغییری در کیفیت محصول آن‌ها ایجاد نشود و هم از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد. برای دستیابی به محصولات غیرالکلی دو رویکرد عمده وجود دارد: نخست دخالت در جنبه‌های بیولوژیکی فناوری تولید آن‌ها مانند اعمال محدودیت در پروسه تخمیر به منظور عدم تولید الکل و یا استفاده از مخمرهای خاص و دوم حذف الکل تولید شده در پروسه تخمیر با استفاده از تکنیک‌های تبخیری و روش‌های غشایی (۳ و ۴).

مخمرها به عنوان گروهی از میکروارگانیزم‌های مهم، به عنوان کشت‌های آغازگر یا به عنوان کمکی (آغازگر ثانویه) در تولید محصولات تخمیری و همچنین برای سایر کاربردهای بیوتکنولوژیکی مانند توسعه داروها، کنترل زیستی، خوراک حیوانات و حفاظت زیستی استفاده می‌شوند. (۵). اگرچه به طور سنتی امکان کشت سویه‌های میکروارگانیزم (باکتری و مخمر) از ابتدا وجود دارد اما کشت میکروارگانیزم‌ها از کشت‌های آغازگر حفظ شده ترجیح داده می‌شود، زیرا کلونی‌های تازه کشت شده اغلب به دنبال یک ویژگی نسبتاً عمومی هستند که کشت اولیه و اصلی از آن مشتق شده است، از این رو نیاز به زمان برای سازگاری دارند (۶). داشتن شکل حفظ شده میکروارگانیزم‌ها به صورت سویه‌های لیوفیلیزه به عنوان آغازگر در مقایسه با کلونی‌های تازه، یک جایگزین عملی مناسب در تولید محصولات تخمیری است (۷). استفاده از کشت‌های آغازگر میکروبی جهت حفظ کیفیت محصول و ایجاد خواص عملکردی مانند عطر، طعم، بافت، pH با محتوای الکل در غذاهای تخمیر شده ضروری است. با فعالیت این کشت‌ها، تخمیرها قابل پیش‌بینی، کارآمد، کنترل پذیر و قابل تولید هستند (۸ و ۹).

مخمر ویکرهامومایسس آنومالوس (*Wickerhamomyces*)

زنده‌مانی مخمر در طی فرآیند خشک‌کردن حفظ گردد و بتوان از آن به‌عنوان یک کشت آغازگر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی در راستای تهیه و توسعه‌ی نوشیدنی‌های تخمیری بهره جست.

مواد و روش‌ها

(الف) مواد: مواد مورد نیاز در این پژوهش شامل محیط کشت پوتیتو دکستروز براث (PDB) و آگار (شرکت کیولب، کانادا) خریداری گردید. مواد محافظت‌کننده مالتودکستریزین از شرکت زر فروکتوز (ایران) و کنسانتره پروتئین آب پنیر از شرکت پگاه فارس (ایران) تهیه شد. سایر مواد مورد نیاز در این پژوهش از جمله رنگ‌های رودامین بی و متیلن بلو، گلوکز، گلیسرول و سایر نمک‌های مورد نیاز از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. مخمر ویکرها مومایسس آنومالوس (PTCC ۵۱۱۸) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

(ب) فعال سازی مخمر: از محیط کشت PDB به منظور کشت مخمر استفاده گردید. بعد از کشت مخمر در محیط کشت استریل پوتیتو دکستروز براث، آنرا به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار قرار داده تا مخمر فعال شود. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای یخچال و دور ۸۵۰۰ rpm برای سه بار عمل سانتریفیوژ انجام گرفت و ته نشین حاصله با محلول بافر سالین شستشو داده شد (۷).

(ج) آماده‌سازی مخمر برای خشک‌کن انجمادی: برای خشک کردن با روش انجمادی، به سوسپانسیون حاصل از ته نشین بدست آمده مواد محافظت‌کننده‌ی شامل کنسانتره پروتئین آب پنیر و مالتودکستریزین به میزان ۵٪ وزنی/حجمی اضافه شدند و به‌خوبی مخلوط گردیدند. سوسپانسیون آماده شده به‌طور مساوی در ظروف آلومینیومی استریل ریخته شدند آنگاه، نمونه‌ها تحت دمای پیش‌انجماد مجزا (دمای ۲۰-، ۸۰- و ۱۹۶- درجه سلسیوس (تحت ازلت مایع)) قرار گرفته و برای مدت زمان ۲۴ ساعت در خشک‌کن انجمادی خشک گردیدند و سپس برای انجام آنالیزهای بعدی به یخچال منتقل شدند (۵).

(د) آماده‌سازی مخمر برای خشک‌کن پاششی: برای آماده

میکروارگانیسم‌ها را برای زنده‌ماندن در طول کم‌آبی افزایش می‌دهند. به همین دلیل، چنین اجزایی (قندها، پلی‌پپتیدها، پلی‌الکل‌ها، اسیدهای آمینه) در طول خشک‌کردن سویه‌های مختلف، مانند کشت آغازگر/خالص استفاده می‌شوند. در تهیه محصولات مخمر خشک، می‌توان از روش‌های متعددی استفاده کرد که به‌طور کلی بر پایه‌ی دو حالت انجمادی و حرارتی هستند. خشک‌کردن انجمادی می‌تواند سلول‌های مخمر را از آسیب و آلودگی محافظت کند و زنده‌مانی طولانی‌تری را برای آن‌ها ایجاد کند (۱۷). خشک‌کردن پاششی بر پایه‌ی حرارت نیز می‌تواند منجر به آسیب نمونه‌ها گردد، اما با توجه به ظرفیت تولید بالای این روش در مدت زمان کوتاه، در بسیاری از صنایع به‌ویژه تولید شیرخشک کاربرد دارد. خشک‌کردن انجمادی در مقایسه با سایر روش‌ها می‌تواند به‌طور موثری فعالیت پروبیوتیکی را حفظ کند. این تکنیک آسیب کمتری به بافت‌های بیولوژیک و ساختارها و ویژگی‌های سلولی وارد می‌کند و به‌طور موثر از پایداری و فعالیت پروبیوتیک‌ها محافظت می‌کند. در پروبیوتیک‌ها، یکی از مهم‌ترین عوامل ذاتی در میزان بقای انجماد، نوع میکروارگانیسم و یکی از مهم‌ترین عوامل بیرونی، پروتکل انجماد است. اثرات بیشتر عوامل بیرونی، مانند نرخ انجماد، دمای ذوب، نوع و غلظت ماده‌ی محافظت‌کننده در طول فرآیند قبل از انجماد، ویزه سویه است. با وجود تمام چالش‌ها، علت بهره‌برداری از خشک‌کن انجمادی در صنایع میکروبی و تولید آغازگر، قابلیت نگهداری طولانی مدت نمونه‌ها، نرخ بقای سلولی بالا در نگهداری دراز مدت، استفاده آسان و هزینه پایین نگهداری نمونه‌ها می‌باشد (۱۸). خشک‌کردن تحت خلاء نوع دیگری از خشک‌کردن بر پایه‌ی حرارت ملایم است که در تفاوت با خشک‌کن انجمادی نمونه‌ها در حالت غیر یخ‌زده باقی می‌مانند و از نظر متابولیسی فعال هستند و در تفاوت با خشک‌کن پاششی گرمای خشک به وجود می‌آورد (۱۹).

هدف از مطالعه حاضر، کاربرد روش‌های مختلف خشک‌کردن به منظور تهیه کشت آغازگر ویکرها مومایسس آنومالوس به کمک مواد محافظت‌کننده‌ی مناسب است تا بالاترین سطح

میانگین شدت فلورسانس نمونه‌ها در طول موج تابش (λ_{em}) ۵۵۵ نانومتر و طول موج نشر (λ_{ex}) ۵۷۹ نانومتر گزارش شد. هر چه شدت فلورسانس نمونه‌ها در مقایسه با نمونه‌ی کنترل بالاتر باشد، میزان زنده‌مانی بیشتری را نشان می‌دهد. فرمول (۲) نحوه‌ی محاسبه‌ی میانگین شدت فلورسانس نمونه‌ها را نشان می‌دهد (۱۳):

$$\text{فرمول (۲):} \quad \text{پلاریزاسیون} = \frac{x_1 + x_2}{2}$$

در این فرمول شدت فلورسانس نمونه در طول موج تابش ۵۵۵ نانومتر و شدت فلورسانس همان نمونه در طول موج نشر ۵۷۹ نانومتر را نشان می‌دهد.

ح) روش رنگ‌آمیزی متیلن بلو: پس از تهیه سوسپانسیون از مخمر خشک شده با محلول فسفات بافر سالین، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگ متیلن بلو اضافه شد. سپس سلول‌های زنده و مرده مخمر توسط لام در زیر میکروسکوپ نوری شمارش گردید. اعداد به دست آمده بر اساس فرمول (۳) ارزیابی شد (۱۳).

$$\text{فرمول (۳):} \quad \text{نرخ بقا} = \frac{\text{سلول های زنده}}{\text{مجموع سلول های زنده و مرده}}$$

در این فرمول میزان بقا نشان دهنده‌ی نرخ زنده‌مانی مخمر، سلول‌های زنده‌ی مخمر که در زیر میکروسکوپ بی‌رنگ دیده می‌شوند و سلول‌های مرده‌ی مخمر در زیر میکروسکوپ آبی‌رنگ دیده می‌شوند.

ط) آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی: برای تعیین ساختار و مورفولوژی سطح سلول‌های مخمر خشک شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی Tescan-Vega3 ساخت جمهوری چک استفاده گردید.

ی) تجزیه و تحلیل آماری: به منظور تجزیه و تحلیل نتایج به‌دست آمده از نرم افزارهای SPSS 28 و Excell 2016 استفاده شد. اختلاف معنی‌دار از طریق آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ارزیابی شد. نتایج مطالعه به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد (Mean $\pm$ SD) گزارش گردید. مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار

سازی مخمر جهت خشک شدن با خشک‌کن پاششی، به محلول ته نشین حاصله از سانتیفیوژ مواد محافظت‌کننده‌ی کنستانتره پروتئین آب‌پنیر و مالتودکستریزین به ترتیب هر یک به میزان ۱۰ گرم و ۱۰ میلی‌لیتر اضافه شد و به‌خوبی مخلوط گردید. سوسپانسیون پس از گذشت چند دقیقه از قرارگیری در خشک‌کن پاششی به‌طور کامل خشک و پودر حاصل برای آنالیز بعدی به‌دای یخچال منتقل گردید (۱۸).

ه) آماده‌سازی مخمر برای خشک‌کن تحت خلاء: پس از کشت و فعال‌سازی مخمر و جمع‌آوری ته‌نشست طی عمل سانتیفیوژ، به سوسپانسیون آماده شده مواد محافظت‌کننده‌ی کنستانتره پروتئین آب‌پنیر و مالتودکستریزین به میزان ۵٪ وزنی/حجمی افزوده شد و به‌خوبی مخلوط گردید. این سوسپانسیون با قرارگیری در خشک‌کن تحت خلاء و پس از گذشت چهار تا هشت ساعت به‌طور کامل خشک گردید، سپس در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد (۵).

و) بررسی زنده‌مانی مخمر با روش رقت سریالی: شمارش تعداد کلونی‌ها با استفاده از روش رقت سریالی و کشت سطحی بر روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار به‌منظور بررسی زنده‌مانی مخمر خشک شده صورت گرفت. شمارش کلنی‌ها در هر آزمون از پلیت‌های حاوی ۳۰-۳۰۰ کلنی صورت گرفت و براساس واحد CFU/mL گزارش شد.

میزان زنده‌مانی مخمر براساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{فرمول (۱):} \quad \text{بعد از خشک کردن} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{قبل از خشک کردن} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right)}{\text{قدرت زنده مانی} (\%)} \times 100$$

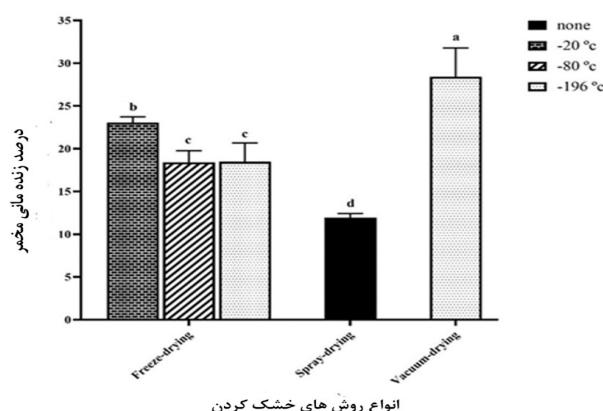
در فرمول مذکور، صورت کسر تعداد کلنی‌های شمارش شده‌ی حاصل از کشت مخمر خشک شده به روش‌های مختلف و مخرج کسر تعداد کلنی‌های شمارش شده‌ی حاصل از کشت سوسپانسیون قبل از خشک کردن است (۷).

ز) روش رنگ‌آمیزی رودامین بی و بررسی آسیب به غشای میتوکندری: جهت بررسی آسیب به غشای میتوکندری سلول‌های مخمر در اثر خشک شدن، میزان ۱۰۰ میکرولیتر رنگ رودامین بی با غلظت ۱۰۰ نانومولار به نمونه مخمرهای خشک شده حاصله در پلیت‌های ۹۶ خانه افزوده شد. آنگاه،

در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

الف) مقایسه میزان زنده‌مانی سویه مخمر قبل و بعد از خشک کردن به روش رقت سازی سریالی: جهت ارزیابی میزان زنده‌مانی سویه مخمر قبل و بعد از خشک کردن، از روش رقت‌سازی سریالی استفاده گردید. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمون نشان داد که بالاترین میزان زنده‌مانی مخمر بلافاصله پس از خشک کردن از طریق روش خشک کردن تحت خلأ به میزان $1.0 \times 10^4 \pm 1/41$ CFU/mL بوده است. همچنین پایین‌ترین میزان زنده‌مانی مخمر به میزان $1.0 \times 10^4 \pm 0/62$ CFU/mL نیز توسط روش خشک‌کن پاششی به ثبت رسید. نتایج به‌دست



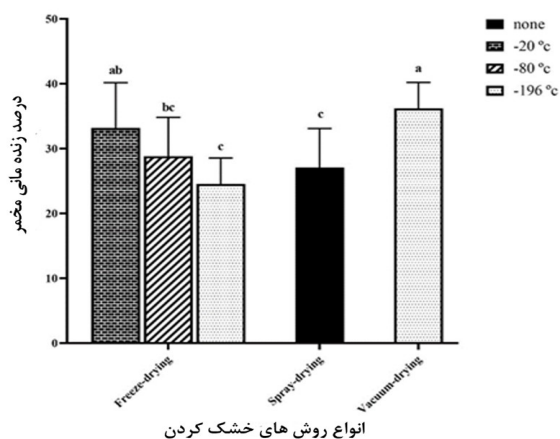
شکل ۱: میزان زنده‌مانی سویه مخمر قبل و بعد از خشک کردن توسط روش‌های مختلف براساس درصد زنده‌مانی. (ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند، بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری ندارند).

جدول ۱: مقایسه میزان زنده‌مانی سویه مخمر قبل و پس از خشک کردن بر اساس طول دوره ذخیره‌سازی.

روش خشک کردن	پیش انجماد (°C)	قبل از خشک شدن (CFU×10 ⁸ /mL)	پس از خشک شدن (CFU×10 ⁸ /mL)		
			۵ روز نگهداری	۳۰ روز نگهداری	۶۰ روز نگهداری
انجمادی	-۲۰	۵/۲۲ ± ۰/۳۴ ^a	۱/۰۶ ± ۰/۱۱ ^c	۰/۸۴ ± ۰/۰۸ ^{ef}	۰/۷۹ ± ۰/۰۶ ^{fg}
	-۸۰	۵/۲۲ ± ۰/۳۴ ^a	۰/۸۸ ± ۰/۰۷ ^{de}	۰/۷۷ ± ۰/۰۴ ^{fg}	۰/۶۹ ± ۰/۰۴ ^{gh}
	-۱۹۶	۵/۲۲ ± ۰/۳۴ ^a	۰/۹۱ ± ۰/۱۱ ^{de}	۰/۷۵ ± ۰/۰۳ ^{fg}	۰/۶۱ ± ۰/۰۴ ^{hi}
پاششی		۵/۲۲ ± ۰/۳۴ ^a	۰/۵۸ ± ۰/۰۳ ^{hi}	۰/۵۰ ± ۰/۰۱ ^{ij}	۰/۴۰ ± ۰/۰۱ ^j
تحت خلأ		۵/۲۲ ± ۰/۳۴ ^a	۱/۲۴ ± ۰/۱۴ ^b	۰/۹۴ ± ۰/۰۵ ^d	۰/۸۵ ± ۰/۰۲ ^{def}

* میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند، بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری ندارند.

آزمیزی متیلن‌بلو مورد بررسی قرار گرفت و تعداد سلول‌های زنده و مرده‌ی مخمر در زیر میکروسکوپ نوری شمارش گردید. براساس نتایج به‌دست آمده از این آزمون مشخص شد که روش خشک‌کردن تحت خلاء و روش خشک‌کردن انجمادی با دمای پیش انجمادی ۲۰- درجه سلسیوس به ترتیب با درصد زنده‌مانی $4/6 \pm 36/2$ و $7/1 \pm 33/17$ نرخ زنده‌مانی بیشتری را نسبت به سایر روش‌ها به ثبت رساندند (شکل ۳). درصد زنده‌مانی سویه مخمر خشک شده با روش‌های مختلف را بر اساس رنگ‌آزمیزی متیلن‌بلو نشان می‌دهد.

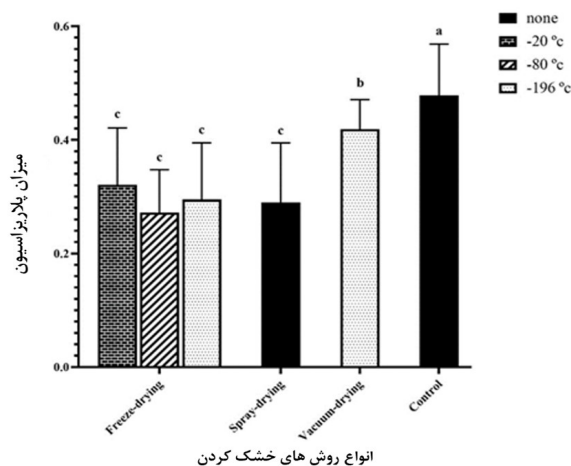


شکل ۳: مقایسه درصد زنده‌مانی سویه مخمر خشک شده توسط روش‌های مختلف از طریق رنگ‌آزمیزی با متیلن‌بلو.
* ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند، بر مبنای آزمون چند دامنه‌ی دانکن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری ندارند.

(د) آنالیز مخمرهای خشک شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی: ریخت‌شناسی و بررسی سطح مخمرهای خشک شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مشاهدات میکروسکوپی در شکل (۴) نشان داد که سطح مخمرهای خشک شده با خشک‌کن انجمادی با دمای پیش‌انجماد ۲۰- درجه سلسیوس، دانه‌دار هستند و به‌صورت ساختارهایی با حاشیه‌های نسبتاً تیز می‌باشند. سطح مخمرهای خشک شده با خشک‌کن انجمادی با دمای پیش‌انجماد ۸۰- درجه سلسیوس دارای شکنندگی‌های زیاد، شکل هندسی تقریباً مکعبی و حاشیه‌های صاف و بدون دندانه هستند. همچنین، سطح

انجماد ۸۰- درجه سلسیوس در مقایسه با ۱۹۶- درجه سلسیوس به طور معنی‌داری پایین‌تر بود (جدول ۱).

(ب) مقایسه میزان زنده‌مانی سویه مخمر خشک‌شده با استفاده از روش رنگ‌آزمیزی رودامین‌بی: میزان زنده‌مانی مخمرهای خشک‌شده توسط روش رنگ‌آزمیزی با رودامین‌بی بر اساس شدت فلورسانس نمونه‌ها گزارش گردید (شکل ۲). براساس نتایج به‌دست آمده مشخص شد که میزان زنده‌مانی مخمرهای خشک‌شده با روش‌های مختلف در مقایسه با نمونه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است. همسو با نتایج به‌دست آمده از روش رقت‌سازی سریالی، بالاترین میزان زنده‌مانی مخمرهای خشک شده در این آزمون نیز در روش خشک‌کن تحت خلاء با شدت فلورسانس $0/08 \pm 0/49$ به ثبت رسید. درحالی که در بین داده‌های به‌دست آمده از سایر روش‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. شکل (۲) مقایسه شدت فلورسانس مخمرهای خشک‌شده با خشک‌کن انجمادی، پاششی و تحت خلاء را از طریق رنگ‌آزمیزی با رودامین‌بی نشان می‌دهد.



شکل ۲: مقایسه میزان زنده‌مانی سویه مخمر خشک‌شده با روش‌های مختلف از طریق رنگ‌آزمیزی با رودامین‌بی.

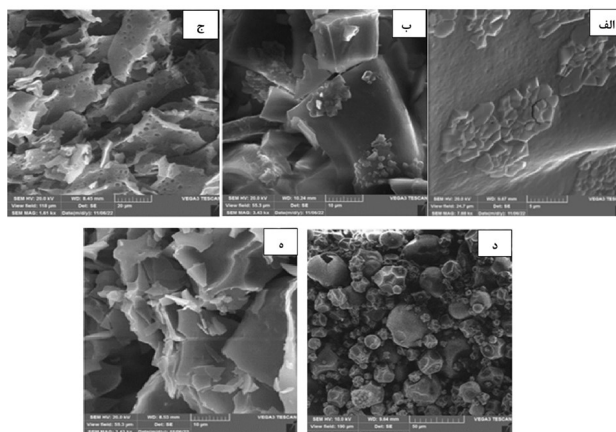
* ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشابه هستند، بر مبنای آزمون چند دامنه‌ی دانکن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری ندارند.

(ج) مقایسه میزان زنده‌مانی سویه مخمر خشک شده با استفاده از روش رنگ‌آزمیزی با متیلن‌بلو: به‌منظور ارزیابی دقیق‌تر، میزان زنده‌مانی مخمرهای خشک‌شده با روش رنگ

رشدی آن، روش حفظ کردن و شرایط نگهداری آن تعیین می‌گردد. خشک کردن میکروارگانیسم‌ها فرآیندهای مربوط به همانندسازی DNA، رونویسی و ترجمه، یکپارچگی غشاها و سایر فرآیندهای متابولیکی ضروری برای زنده ماندن سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از طرفی کاهش آب منجر به رخداد همزمان غلظت بالای اکسیژن و استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۱). با وجود این تغییرات، خشک کردن میکروارگانیسم‌ها فرصتی را برای حفظ ویژگی‌های فیزیولوژیکی کشت‌های مختلف به عنوان تولیدکننده‌ی مواد فعال بیولوژیکی، آغازگرها و غیره در دوره‌های نگهداری طولانی فراهم می‌کند. در مطالعات اخیر، توجه ویژه‌ای به مخمرها شده است، زیرا از یک طرف مدل ایده‌آل سلول‌های یوکاریوتی هستند و از طرف دیگر در حالت دهیدراته به طور گسترده برای تولید نان، نوشیدنی، اتانول و برخی از مواد غذایی با ارزش دیگر استفاده می‌شوند (۲۲ و ۲۳).

مطالعات گذشته نشان داده‌اند که قندهایی مانند ترهالوز، ساکارز، سوربیتول و مالتودکسترین، به دلیل تثبیت غشاها با جایگزینی آب در اطراف باقیمانده‌های قطبی و جلوگیری از دناتوره شدن پروتئین‌ها با تشکیل پیوندهای هیدروژنی و کمک به حفظ ساختار سوم پروتئین در غیاب آب و جلوگیری از کریستالیزاسیون، به زنده ماندن میکروارگانیسم‌ها در شرایط نامطلوب کمک می‌کنند. از طرفی استفاده از پروتئین‌ها همچون شیر بدون چربی، زنده‌مانی مطلوبی را برای میکروارگانیسم‌ها ایجاد کرده است. بنابراین به نظر می‌رسد که کارآمدترین مواد محافظتی در برابر خشک شدن میکروارگانیسم‌ها مخلوطی از پروتئین و قند است (۲۴). در این مطالعه، به منظور خشک کردن مخمر به روش انجمادی، به سوسپانسیون حاصل از ته نشین به دست آمده، کنسانتره پروتئین آب پنیر و مالتودکسترین به عنوان مواد محافظت‌کننده اضافه شد. مکانیسم عملکردی مواد محافظت‌کننده، کپسوله کردن میکروارگانیسم‌ها و تشکیل پیوند هیدروژنی با بخش‌های قطبی غشای فسفولیپیدی است (۱۸). مالتودکسترین به عنوان یک ماده‌ی محافظتی مناسب با غلظت‌های متفاوت در ترکیب با سوربیتول، شیر بدون چربی و

مخمرهای خشک شده با خشک‌کن انجمادی با دمای پیش‌انجماد ۱۹۶- درجه سلسیوس دارای حاشیه‌های تیز و ساختار متخلخل می‌باشند. آنالیز میکروسکوپی نشان داد که خشک کن پاششی منجر به ایجاد سطح تقریباً یکنواخت، گرد و همراه با چروکیدگی سلول‌های مخمر می‌شود. سطح مخمرهای خشک شده توسط خشک‌کن تحت خلاء بدون دمای پیش‌انجماد نیز دارای شکل هندسی نامشخص همراه با حاشیه‌های تیز هستند اما دانه دار و متخلخل نیستند و شکنندگی ندارند.



شکل ۴: تصاویر میکروسکوپی (FE-SEM) مخمر خشک شده با بزرگمایی 3kx، الف: با دمای پیش‌انجماد ۲۰- درجه سلسیوس، ب: دمای پیش‌انجماد ۸۰- درجه سلسیوس، ج: دمای پیش‌انجماد ۱۹۶- درجه سلسیوس توسط خشک‌کن انجمادی، د: خشک‌کن پاششی، ه: خشک کن تحت خلاء.

بحث

کاربرد فرم پودری میکروارگانیسم‌ها در صنعت غذا چندین مزیت دارد از جمله افزایش پایداری، افزایش طول مدت نگهداری، آسانی حمل و نقل و راحتی کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی. همچنین، استفاده از پروبیوتیک‌ها و استارترها در حال افزایش است و رایج‌ترین روش‌های خشک کردن آن‌ها، روش‌های خشک‌کن انجمادی و پاششی می‌باشد (۲۰). در دهه‌های اخیر، پژوهش‌های زیادی در زمینه‌ی حفظ میکروارگانیسم‌ها و بهینه‌سازی شرایط نگهداری آن‌ها انجام شده است. مطالعات در این حوزه بسیار گسترده است و با توجه به نوع میکروارگانیسم و تعیین خصوصیات و ویژگی‌های

طرفی دمای پیش‌انجماد بیش از حد پایین نیز، نه تنها مصرف انرژی را افزایش می‌دهد بلکه نرخ بقای برخی از میکروارگانیسم‌ها را پس از خشک کردن کاهش می‌دهد (۲۷). روش خشک کردن انجمادی یک فرآیند فیزیکی بسیار پیچیده است که در آن بقای سلول تحت تأثیر بسیاری از پارامترهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی قرار می‌گیرد. از عوامل فیزیکوشیمیایی موثر بر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها می‌توان به شرایط سلولی، نوع مواد محافظتی، دمای انجماد، تصعید و ذوب، درجه کم‌آبی به‌دست‌آمده، محیط بازسازی، شرایط و زمان نگهداری و آب‌رسانی مجدد اشاره نمود (۲۸). در مطالعه‌ی هان و همکاران (۲۰۲۱) بر روی بهینه‌سازی خشک کردن انجمادی مخمر دریایی *اسپورییدیوبولوس*، مشخص شد که میزان بقای مخمر در دمای نگهداری ۴ درجه سلسیوس به طور معنی‌داری بالاتر از میزان زنده‌مانی آن در دمای ۲۰ درجه سلسیوس بود، به‌طوری که پس از گذشت ۳ ماه نگهداری، میزان بقای ۶۶/۵ درصد در دمای ۴ درجه سلسیوس حاصل شد (۲۹). همچنین، در طی مطالعه‌ای دیگر توسط سیلوا و همکاران (۲۰۲۵)، اثر خشک کردن به روش انجمادی و افزودن محافظت کننده‌های سوکروز، گلوکز و فروکتوز در غلظت‌های ۲۰-۱۰٪ بر کالچر استارترهای به‌دست آمده از میوه و کاربرد استارتر در تولید نان‌های تهیه شده با خمیر ترش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد که سوکروز در غلظت ۱۰٪ بهترین محافظت کننده استارترهای مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک بوده و منجر به زنده‌مانی آن‌ها در مدت زمان نگهداری ۵۶ روز در دمای یخچال می‌شود و استارترهای خشک شده به روش انجمادی می‌توانند به طور موفقیت‌آمیزی در تولید خمیر ترش به‌کار روند (۳۰).

هو و همکاران (۲۰۲۴) اثر دو ماده محافظت کننده گالاتکتوگلوکومانان‌ها و گلوگونونوزیالان‌ها بر میزان زنده‌مانی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* خشک شده به روش پاششی مورد مطالعه قرار دادند چنانچه با افزودن دو ترکیب مذکور، میزان زنده‌مانی بالای ۹۸-۹۲٪ در طی شرایط نگهداری سلول‌های مخمر حاصل شد. نتایج نشان داد که دما و رطوبت

سایر مواد محافظتی به فراوانی استفاده می‌شود. این ماده جذب رطوبت را تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد و از چسبندگی پودر حاصل از خشک کردن در طول نگهداری جلوگیری می‌کند. کنستانتتره پروتئین آب‌پنیر به عنوان یک ماده‌ی محافظ مقاوم به تغییرات دمایی با آگومیزاسیون یا انباشته‌شدن، منجر به تشکیل یک شبکه‌ی منسجم به دور مخمر شده و از آن محافظت می‌کند (۲۵).

در مطالعه حاضر، به‌منظور ارزیابی میزان زنده‌مانی سویه مخمر قبل و بعد از خشک کردن توسط روش‌های مختلف (انجمادی، تحت خلاء و پاششی)، از روش‌های رقت سازی سریالی و رنگ‌آمیزی (توسط رودامین بی و متیلن بلو) استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده از آزمون رقت سازی سریالی نشان داد که بالاترین و پایین‌ترین میزان زنده‌مانی مخمر بلافاصله پس از خشک کردن، به‌ترتیب از طریق روش خشک کردن تحت خلاء و خشک کن پاششی بوده است. همچنین براساس نتایج به دست آمده مشخص شد که طول دوره‌ی نگهداری به‌طور معنی‌داری بر روی میزان زنده‌مانی مخمر موثر بوده است. به طوری که مخمرهای خشک شده توسط روش خشک کن تحت خلاء در مقایسه با دو روش دیگر از زنده‌مانی بالاتری برخوردار بوده‌اند.

براساس مطالعات پیشین مشخص شده است که در روش خشک کردن انجمادی، در صورتیکه سلول‌ها بدون پیش‌انجماد خشک شوند، ساختارهای سلولی همچنان به فعالیت خود ادامه می‌دهند و در نتیجه واکنش‌های میکروبیولوژیکی و شیمیایی مهار نمی‌شوند. در واقع، انجماد به‌عنوان یک فرآیند محافظ مواد بیولوژیکی در دماهای برودتی، معمولاً ۸۰- یا ۱۹۶- درجه سلسیوس تعریف می‌شود. دمای پایین منجر به حرکات آهسته‌ی آب سلولی و در نتیجه جلوگیری از آسیب به پروتئین‌ها و DNA می‌شود (۱۸ و ۲۶). بهینه‌سازی این دما برای هر میکروارگانیسم، عامل حیاتی جهت تضمین بقای آن و بهبود فرآیندهای تولید آغازگر می‌باشد. اگر دمای پیش‌انجماد به اندازه کافی پایین نباشد نمونه به طور کامل منجمد نمی‌شود و در طی فرآیند تصعید در خلأ منبسط شده و کف می‌کند. از

پایین برای حفظ زنده‌مانی سلول‌های مخمر ضروری است. همچنین، نتایج میکروسکوپی بیانگر نقش لایه حفاظتی ترکیبات افزوده شده بر سطح سلول‌های مخمر بود (۳۱).

عوامل بیولوژیکی مانند نوع میکروارگانیسم، غلظت اولیه، سن سلول‌ها و حضور املاح سازگار در سیتوپلاسم هستند که می‌توانند بر بقای سلول‌های خشک شده در انجماد تأثیر بگذارند. همچنین ویژگی‌های خاص هر میکروارگانیسم مانند توانایی تحمل فشار اسمزی، اندازه، دیواره سلولی، ترکیبات غشا و ویژگی‌های دیگر ممکن است منجر به حساسیت و پاسخ متفاوت میکروارگانیسم‌ها نسبت به خشک‌کن انجمادی گردد (۳۲).

از این رو، در مطالعه حاضر، جهت خشک‌کردن مخمر از طریق روش خشک‌کن انجمادی، سه دمای پیش‌انجماد ۲۰-، ۸۰- و ۱۹۶- درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان زنده‌مانی مخمر در خشک‌کن انجمادی با دمای پیش‌انجماد ۲۰- درجه سلسیوس به‌طور معنی‌داری بالاتر از دو دمای پیش‌انجماد دیگر بوده است. در مطالعه‌ای مشابه که توسط پولو و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد، اثر سه دمای پیش‌انجماد در خشک‌کردن انجمادی، بر زنده‌مانی مخمرها و باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از یک نوشیدنی تخمیری با مواد محافظت‌کننده‌ی شیر بدون چربی و گلوکز بررسی شد. نتایج نشان داد که دمای پیش‌انجماد به‌طور معنی‌داری بر بقای مخمر و باکتری تأثیرگذار بوده است. بالاترین نرخ بقا در ۲۰- درجه سلسیوس و ۸۰- درجه سلسیوس برای مخمرها، و در دمای ۱۹۶- درجه سلسیوس برای باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌دست آمد. تفاوت عمده در میزان بقا در میان مخمرهای خشک شده با انجماد ثبت شد، اما برای باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌طور معنی‌داری کمتر بود. بالاترین قابلیت زنده‌ماندن پس از خشک‌شدن انجمادی برای مخمرها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس و برای باکتری‌ها در دمای ۱۹۶- درجه سلسیوس ثبت شد (۲۷). ونگ و همکاران (۲۰۲۰) نیز تأثیر دمای پیش‌انجماد را بر زنده‌ماندن سه سویه‌ی مختلف لاکتوباسیلوس پلانتراروم مورد بررسی قرار دادند. طبق این

بررسی‌ها مشخص شد که دمای قبل از انجماد یک عامل حیاتی در خشک‌کردن انجمادی است و انتخاب دمای قبل از انجماد بستگی به سویه و ماده‌ی محافظت‌کننده دارد. استفاده از محلول نمک بافر فسفات و سوربیتول به عنوان مواد محافظت‌کننده و پیش‌انجماد در دماهای ۱۹۶- درجه سلسیوس، ۴۰- درجه سلسیوس و ۲۰- درجه سلسیوس بالاترین نرخ بقا را پس از خشک‌کردن انجمادی برای گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس پلانتراروم (AR307، AR113 و WCFS1) تضمین کرد. با استفاده از ترهالوز، پیش‌انجماد در دمای ۲۰- درجه سلسیوس بالاترین میزان بقا را برای AR113 ایجاد کرد و دمای ۶۰- درجه سلسیوس بهترین دمای قبل از انجماد برای سویه‌ی AR307 بود (۲۸). این نتایج به وضوح نشان داد که دمای قبل از انجماد را می‌توان برای بهبود میزان بقای میکروارگانیسم تغییر داد و این اثر ویژه‌ی سویه است. در مطالعه ریورا پتینو و همکاران (۲۰۲۵)، دو ترکیب محافظت‌کننده مالتودکسترین و ترهالوز و دو روش خشک‌کردن پاششی و خشک‌کن پاششی الکتروستاتیک برای مخمر ساکارومایسس سرویزیه به‌کار رفت. خشک‌کردن مخمر به روش پاششی منجر به بقای ۹۲٪ سلول‌ها با جمعیت میکروبی 10^8 CFU/g شد. نتایج مطالعه نشان داد که دماهای ورودی پایین تر سبب زنده‌مانی بالاتر مخمر می‌شود (۲۰).

از طرف دیگر، براساس نتایج به‌دست‌آمده از زنده‌مانی مخمر ویکرهامومایسس آنومالوس با خشک‌کن پاششی مشخص شد که این مخمر در برابر دمای بالا مقاومت پایینی دارد که می‌تواند منجر به آسیب به دیواره‌ی سلولی مخمر و همچنین اکسیداسیون لیپیدها یا لیپوپراکسیداسیون شود. این امر می‌تواند منجر به اختلال در عملکرد گیرنده‌های غشایی، غیرفعال شدن آنزیم‌های انتقال و همچنین کاهش نفوذپذیری یونی و سیالیت غشا گردد (۱۴ و ۳۳). همسو با نتایج مطالعه حاضر، تونتول و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های استریپتوکوکوس ترموفیلوس، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، گونه‌های بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس خشک‌شده با خشک‌کن انجمادی و پاششی گزارش نمودند که

زنده‌مانی سویه‌ها در روش پاششی بین ۱۴/۹۳ تا ۲۷/۹۵ درصد و در روش انجمادی بین ۳۳/۴۵ تا ۳۴/۹۵ درصد متغیر بوده است (۳۴). دلیل کم‌بودن میانگین زنده‌مانی در روش خشک‌کن پاششی عمدتاً غیر فعال شدن گرمایی است. در حالیکه، علل اصلی از دست دادن زنده‌مانی پس از خشک‌کردن انجمادی، احتمالاً تشکیل کریستال یخ، اسمولاریته بالا به دلیل افزایش غلظت املاح داخلی و دنا توره شدن ماکرومولکول‌ها به دلیل حذف آب است (۷).

همچنین، میزان زنده‌مانی مخمرهای خشک‌شده توسط روش رنگ‌آمیزی با رودامین بی مورد ارزیابی قرار گرفت و براساس نتایج به دست آمده مشخص شد که میزان زنده‌مانی مخمرهای خشک‌شده با روش‌های مختلف در مقایسه با نمونه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است. به گونه‌ای که بالاترین میزان زنده‌مانی مخمرهای خشک شده در روش خشک‌کن تحت خلاء به ثبت رسید. درحالی که در بین داده‌های به دست آمده از سایر روش‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. رودامین بی یک رنگ فلورسانس کاتیونی است و با قرارگیری داخل غشای میتوکندری، قادر به اندازه‌گیری شدت فلورسانس خواهد بود (۳۵). اگر غشای میتوکندری به هر علت آسیب ببیند، پلاریزاسیون افزایش می‌یابد و تجمع رودامین بی داخل غشا کم می‌شود و شدت فلورسانس کاهش می‌یابد. کاهش شدت فلورسانس بیانگر دیپلاریزاسیون غشا است که منجر به فعالیت نامنظم سلول می‌گردد و در نهایت مرگ سلولی را به دنبال دارد (۳۶). در مطالعه حاضر، سلول‌های مخمر خشک‌شده با خشک‌کن تحت خلاء در مقایسه با نمونه کنترل بیشترین جذب و بیشترین میزان حفظ پتانسیل غشا میتوکندری را نشان دادند. از طرفی میزان جذب نمونه‌های خشک شده با خشک‌کن انجمادی با دمای پیش‌انجماد ۲۰- درجه سلسیوس در مقایسه با نمونه کنترل قابل توجه بود. علاوه بر این، میزان زنده‌مانی مخمرهای خشک‌شده با روش رنگ‌آمیزی متیلن‌بلو نیز مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده مشخص شد که روش‌های خشک‌کردن تحت خلاء و خشک‌کردن انجمادی با دمای پیش‌انجماد ۲۰- درجه سلسیوس به ترتیب نرخ

زنده‌مانی بیشتری را نسبت به سایر روش‌ها به ثبت رساندند. با توجه به سخت بودن تشخیص و تفکیک سلول‌های زنده از مرده در روش رنگ‌آمیزی با متیلن‌بلو، در این روش خطای اندازه‌گیری وجود دارد (۳۷ و ۳۸). براساس مطالعات آتاناسوا و همکاران (۲۰۱۹) بر روی ارزیابی زنده‌مانی مخمر ساکارومایسس کارلس برجنسیس با روش رنگ‌آمیزی با متیلن‌بلو، وجود خطای اندازه‌گیری به میزان ۲۰ تا ۳۰ درصد نیز مشخص گردید (۳۹). با این وجود، نتایج به دست آمده از این آزمون با دو تست زنده‌مانی دیگر (رقت سریالی و رنگ‌آمیزی با رودامین بی) تقریباً مشابه بود.

همچنین، ریخت‌شناسی و بررسی سطح مخمرهای خشک شده از طریق روش‌های مختلف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که تصاویر حاصل از خشک‌کن انجمادی و تحت خلاء فاقد شکل هندسی مشخصی بوده و برجستگی‌ها و فرورفتگی‌هایی در آن‌ها مشاهده می‌شود. بر این اساس، نمونه‌های خشک‌شده با خشک‌کن تحت خلاء با وجود حاشیه‌های تقریباً تیز، سطحی صاف‌تر و آسیب کمتری را نشان دادند، در حالی که تصاویر حاصل از خشک‌کن پاششی دارای چروکیدگی‌های کاملاً مشخص بودند. مطالعات نشان داده‌اند که یکی از واکنش‌های محافظتی سلول‌های مخمر در حالت دهیدراته، چین‌خوردگی غشای پلاسمایی آن‌ها است. این چین‌خوردگی، یکپارچگی غشا را تحت شرایطی که اندازه سلول به طور قابل توجهی کاهش یافته است، حفظ می‌کند. در واقع، ساختار و ترکیب دیواره‌ی سلولی یکی از عوامل مهمی است که به شدت بر زنده‌مانی مخمر در طول فرآیندهای کم‌آبی-آبرسانی مجدد تأثیر می‌گذارد. براساس مطالعات میکروسکوپی، کم‌آبی علاوه بر کاهش قابل توجه اندازه سلول، باعث طویل شدن سلول‌ها، ایجاد چروکیدگی‌ها، فرورفتگی‌ها و برجستگی‌هایی بر روی مخمر می‌شود (۱۸ و ۴۰). این تغییرات ساختاری منجر به افزایش نفوذپذیری غشا و نشت قابل توجهی از ترکیبات مختلف درون سلولی در مرحله‌ی آبرسانی مجدد

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله تمامی نکات اخلاقی از قبیل عدم سرقت ادبی، انتشار همزمان، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را رعایت نموده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر با هدف حفظ مطلوب مخمر ویکرها مومالیس آنومالوس با استفاده از روش‌های پرکاربرد موجود در صنعت خشک‌کردن صورت پذیرفت. در این پژوهش از سه روش خشک‌کردن انجمادی، پاششی و تحت خلاء استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده از سه روش سنجش زنده‌مانی در این پژوهش، بیشترین نرخ زنده‌مانی را برای نمونه‌های مخمر حاصل از خشک‌کن تحت خلاء نشان داد. در روش شمارش کلنی‌ها، زنده‌مانی در طول دوره‌ی نگهداری مخمرهای خشک‌شده با خشک‌کن تحت خلاء، در مقایسه با دو روش دیگر به طور معنی‌داری بالاتر بود. همچنین، آنالیز تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که نمونه‌های خشک‌شده با خشک‌کن تحت خلاء سطحی صاف‌تر دارند و آسیب کمتری به آن‌ها وارد شده است. بر این اساس، روش خشک‌کردن تحت خلاء می‌تواند روشی امیدوارکننده برای حفظ مخمر ویکرها مومالیس آنومالوس است و ترکیب این روش با فناوری‌های نوین و بهینه‌سازی شرایط فرآیند می‌تواند منجر به تولید محصولاتی از جمله نوشیدنی‌های غیر الکلی با کیفیت بالاتر شود. همچنین امکان توسعه فرمولاسیون‌های پروبیوتیک با پایداری بالاتر و قابلیت کاربرد در محصولات مختلف فراهم می‌سازد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل می‌باشد و بخش عملی آن در دانشگاه شیراز انجام یافته است، به این وسیله از کلیه افراد تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Maicas S. The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*. 2020; 8(8).
2. Yang H, Hao L, Jin Y, Huang J, Zhou R, Wu C. Functional roles and engineering strategies to improve the industrial functionalities of lactic acid bacteria during food fermentation. *Biotechnology Advances*. 2024;108397.
3. Jackowski M, Trusek A. Non-alcoholic beer production – an overview. *Polish Journal of Chemical Technology*. 2018;20(4):32-8.
4. Vinicius De Melo Pereira G, De Carvalho Neto DP, Junqueira ACDO, Karp SG, Letti LAJ, Magalhães Júnior AI, Soccol CR. A Review of Selection Criteria for Starter Culture Development in the Food Fermentation Industry. *Food Reviews International*. 2020;36(2):135-67.
5. Köhler S, Schmachl M, Malchow S, Wolff L, Senz M. Preparation of freeze dried and vacuum dried yeast starter cultures: Evaluation of relevant viability detection analyses. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 2020;73:42.
6. Tan DT, Poh PE, Chin SK. Microorganism preservation by convective air-drying—A review. *Drying Technology*. 2018;36(7):764-79.
7. Stefanello RF, Nabeshima EH, Iamanaka BT, Ludwig A, Fries LLM, Bernardi AO, Copetti MV. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International*. 2019;115:90-4.
8. Capece A, Romaniello R, Siesto G, Romano P. Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. *Fermentation* [Internet]. 2018; 4(2).
9. Michel M, Hardulak L, Meier-Dörnberg T, Morinière J, Hausmann A, Back W, Haszprunar G, Jacob F, Hutzler M. High throughput sequencing as a novel quality control method for industrial yeast starter cultures. *Brewing Science*. 2019(3-4):63-8.
10. Haile M, Kang WH. Antioxidant Properties of Fermented Green Coffee Beans with *Wickerhamomyces anomalus* (Strain KNU18Y3). *Fermentation* [Internet]. 2020; 6(1).
11. Passoth V, Fredlund E, Druvefors UÄ, Schnürer J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research*. 2006;6(1):3-13.
12. Passoth V, Olstorpe M, Schnürer J. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2011;99(1):121-5.
13. Junges DSB, Delabeneta MF, Rosseto LRB, Nascimento BL, Paris AP, Persel C, Loth EA, Simão RCG, Menolli RA, Paula CR, Gandra RF. Antibiotic Activity of *Wickerhamomyces anomalus* Mycocins on Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Ecology*. 2020;80(2):278-85.
14. Brusletten M. Fermentation and downstream processing of yeast for production of single-cell proteins and exopolysaccharides: Norwegian University of Life Sciences, Ås; 2019.
15. Wang J, Yan J, Zhang W, Zhang Y, Dong Z, Luo H, Liu M, Su J. Comparison of potential *Wickerhamomyces anomalus* to improve the quality of Cabernet Sauvignon wines by mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT*. 2023;173:114285.
16. Guerrero Sanchez M, Passot S, Campoy S, Olivares M, Fonseca F. Effect of protective agents on the storage stability of freeze-dried *Ligilactobacillus salivarius* CECT5713. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2022;106(21):7235-49.
17. Bhurt M, Li X, Zhang N, Yang W, Xu M, Liu Y, Yu Y, Sun B. Glycoside-Mediated Enhancement of Stability in Aluminum Oxyhydroxide Nanoadjuvants during Freeze-Drying. *Langmuir*. 2024;40(46):24613-21.
18. Rockinger U, Funk M, Winter G. Current Approaches of Preservation of Cells During (freeze-) Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;110(8):2873-93.

19. Alp D, Bulantekin Ö. The microbiological quality of various foods dried by applying different drying methods: a review. *European Food Research and Technology*. 2021;247(6):1333-43.
20. Patiño JD, Torrejón-Cabello A. Survival of lactic acid bacteria and yeasts to encapsulation process comparing spray drying to electrostatic spray drying. *Applied Food Research*. 2025 ;5(1):100756.
21. Manzanera M. Dealing with water stress and microbial preservation. *Environmental Microbiology*. 2021;23(7):3351-9.
22. Tofalo R, Fusco V, Böhnlein C, Kabisch J, Logrieco AF, Habermann D, Cho G-S, Benomar N, Abriouel H, Schmidt-Heydt M. The life and times of yeasts in traditional food fermentations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020;60(18):3103-32.
23. Mirbagheri Firoozabad MS, Bagheri Dehaskari M, Bayati M. Extraction and investigation of *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucan. *Journal of Microbial World*. 2025; 17(2), 128-139 (in persian).
24. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*. 2006;66(2):183-93.
25. Duongthingoc D, George P, Katopo L, Gorczyca E, Kasapis S. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. *Food Chemistry*. 2013;141(3):1782-8.
26. Padilla B, Gil JV, Manzanares P. Challenges of the Non-Conventional Yeast *Wickerhamomyces anomalus* in Winemaking. *Fermentation* [Internet]. 2018; 4(3).
27. Polo L, Mañes-Lázaro R, Olmeda I, Cruz-Pio L, Medina Á, Ferrer S, Pardo I. Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;122(6):1603-14.
28. Wang G-Q, Pu J, Yu X-Q, Xia Y-J, Ai L-Z. Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*. 2020;103(4):3066-75.
29. Han P, Ni L, Wei Y, Jiang S, Xu F, Wang H, Shao X. Optimization of the freeze-drying of marine yeast *Sporidiobolus pararoseus* ZMY-1 for its application in biocontrol of fungal infections. *Biological Control*. 2021;161:104707.
30. da Silva JL, Silva DL, Polonio JC, Porciuncula BD, Scanavacca J, Barros BC. Evaluation of the effect of freeze drying and cryoprotectant addition on a starter culture obtained from star fruit and its application in sourdough bread. *Food Bioscience*. 2025 ;65:106132.
31. Ho TM, Yousefvand A, Suhonen H, Saris PE, Mikkonen KS. Protective role of wood hemicelluloses: Enhancing yeast probiotics survival in spray drying and storage. *Future Foods*. 2024;10:100437.
32. Gagneten M, Passot S, Cenard S, Ghorbal S, Schebor C, Fonseca F. Mechanistic study of the differences in lactic acid bacteria resistance to freeze-or spray-drying and storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2024;108(1):361.
33. Arslan S, Erbas M, Tontul I, Topuz A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;63(1):685-90.
34. Tontul İ, Ergin F, Eroğlu E, Küçükçetin A, Topuz A. Physical and microbiological properties of yoghurt powder produced by refractance window drying. *International Dairy Journal*. 2018;85:169-76.
35. Hassibian S, Esmaelpourfarkhani M, Abnous K, Amin M, Ghazvinian F, Alibolandi M, Ramezani M, Nameghi MA, Mollasalehi H, Farrokhi N. A turn-on fluorescent aptasensor for Pb²⁺ detection based on rhodamine B dye leakage from the internal cavity of hollow gold nanoparticles. *Food Chemistry*. 2025;463:141440.
36. Bellali S, Bou Khalil J, Fontanini A, Raoult D, Lagier J-C. A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiological Research*. 2020;236:126454.

37. Chin Y-W, Lee S, Yu HH, Yang SJ, Kim T-W. Combinatorial Effects of Protective Agents on Survival Rate of the Yeast Starter, *Saccharomyces cerevisiae* 88-4, after Freeze-Drying. *Microorganisms* [Internet]. 2021; 9(3).
38. Guowei S, Yang X, Li C, Huang D, Lei Z, He C. Comprehensive optimization of composite cryoprotectant for *Saccharomyces boulardii* during freeze-drying and evaluation of its storage stability. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2019;49(9):846-57.
39. Atanasova M, Yordanova G, Nenkova R, Ivanov Y, Godjevargova T, Dinev D. Brewing yeast viability measured using a novel fluorescent dye and image cytometer. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2019;33(1):548-58.
40. Rapoport A, Golovina EA, Gervais P, Dupont S, Beney L. Anhydrobiosis: Inside yeast cells. *Biotechnology Advances*. 2019;37(1):51-67.
41. Koselny K, Mutlu N, Minard AY, Kumar A, Krysan DJ, Wellington M. A genome-wide screen of deletion mutants in the filamentous *Saccharomyces cerevisiae* background identifies ergosterol as a direct trigger of macrophage pyroptosis. *MBio*. 2018;9(4):10.1128/mbio. 01204-18.