Journal of Microbial World
Volume 17, No. 1, September 2024

Short Communication

Extraction and investigation of *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucan

Maryam Sadat Mirbagheri Firoozabad [1], **Mahdi Bagheri Dehaskari** [2], **Mehdi Bayati** [2]

[1] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.
[2] B.A.Sc, Department of Biotechnology, Faculty of Basic Sciences, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

Abstract

Introduction: Beta-glucan is a polysaccharide formed by the linkage of glucose molecules through β-(1→6) and β-(1→3) glycosidic bonds. This compound is found in various sources, including fungi, algae, yeast, and plants such as barley, however, the beta-glucan present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* exhibits greater biological activity compared to that from other sources. Beta-glucan has numerous applications in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries, contributing to immune system enhancement, anti-tumour effects, and cholesterol reduction. The aim of this study is to extract and purify this compound for use in industries. For extraction of beta-glucan, an alkaline-acidic method was employed, which involves extracting using alkaline solutions followed by neutralization with acid. This process was conducted to maximize the yield and purity of beta-glucan. After extraction, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was utilized to determine and confirm the chemical structure of beta-glucan. This technique allows for the identification of chemical bonds and functional groups present in the beta-glucan composition. The results of these tests indicated that the use of a weak acid-strong base extraction method, combined with hot water extraction, effectively removes a significant amount of proteins and fatty acids from autolyzed yeast, leading to an increase in the carbohydrate content, particularly beta-glucan, in the final product. The development of an appropriate method for the extraction of beta-glucan for industrial application, along with the evaluation of the produced beta-glucan using FTIR, represents a significant achievement of this project.

Keywords: Beta-glucan, *Saccharomyces cerevisiae*, FTIR, extraction.

Received: 22 May 2024 Revised: 15 July 2024 Accepted: 3 September 2024

Correspondence to: Maryam Sadat Mirbagheri Firoozabad
Tel: +98 9138676378
E-mail: m.mirbagheri@yazd.ac.ir
Journal of Microbial World 2024, 17 (2): 107 - 118

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.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفدهم شماره دوم (پیاپی ۵۹) تابستان ۱۴۰۳
صفحات ۱۱۸ – ۱۰۷

Short Communication

استخراج و بررسی تولید بتاگلوکان از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*

مریم السادات میرباقری فیروزآباد*[۱]، مهدی باقری ده‌عسکری[۲]، محمد بیاتی[۲]

[۱] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.
[۲] کارشناسی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.

چکیده

بتاگلوکان پلی‌ساکاریدی است که از اتصال مولکول‌های گلوکز با دو پیوند بتا ۱–۶ و بتا ۱–۳ تشکیل‌شده است. این ترکیب در منابع مختلف مانند قارچ، جلبک، مخمر و گیاهانی مانند جو یافت می‌شود ولی بتاگلوکان موجود در دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* فعالیت بیولوژیکی بیشتری نسبت به بقیه منابع دارد. بتاگلوکان موارد استفاده زیادی در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی بهداشتی دارد که باعث بهبود سیستم ایمنی بدن و ضد تومور و کاهش‌دهنده کلسترول است. هدف از این مطالعه استخراج و خالص‌سازی این ترکیب جهت استفاده در صنایع است. برای استخراج بتاگلوکان، از روش قلیایی–اسیدی استفاده شد که شامل مراحل استخراج با استفاده از محلول‌های قلیایی و سپس خنثی‌سازی با اسید است. این فرآیند به منظور به حداکثر رساندن بازده و خلوص بتاگلوکان انجام شد. پس از استخراج، برای تعیین و تأیید ساختار شیمیایی بتاگلوکان، از طیف‌سنجی FTIR بهره‌برداری گردید. این تکنیک امکان شناسایی پیوندهای شیمیایی و گروه‌های عاملی موجود در ترکیب بتاگلوکان را فراهم می‌کند. آزمون‌ها در این مطالعه مشخص کرد که روش استخراج اسیدضعیف–بازقورت و استفاده از آب گرم باعث حذف مقدار زیادی از پروتین‌ها و اسیدهای چرب مخمر اتولیز شده می‌شود و درصد کربوهیدرات‌ها به‌ویژه بتاگلوکان در محصول نهایی افزایش می‌یابد. به‌دست آوردن یک روش مناسب تولید بتا گلوکان برای ارائه به صنعت و چگونگی ارزیابی بتاگلوکان تولید شده با FTIR از دستاوردهای این پروژه است.

کلمات کلیدی: بتاگلوکان، مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*، FTIR، استخراج.

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۳/۲ ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۴/۲۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۶/۱۳

مقدمه

پلی‌ساکاریدها دسته بسیار مهمی از پلیمرهای زیستی هستند که از زنجیره‌های طولانی واحدهای قندی تکرارشونده تشکیل‌شده‌اند. آن‌ها ازنظر ساختاری عمدتاً با نوع واحد مونومر، طول زنجیره، نوع پیوند گلیکوزیدی و درجه انشعاب مشخص می‌شوند. طبیعت به‌طور مداوم مقادیر زیادی از پلی‌ساکاریدها را سنتز می‌کند که به‌طور ویژه به‌عنوان داربست‌های ساختاری مانند سلولز در گیاهان و کیتین در حیوانات یا به‌عنوان کربوهیدرات‌های ذخیره مانند نشاسته و گلیکوژن عمل می‌کنند (۱). بتاگلوکان‌ها به‌طور گسترده بیوپلیمرهای گلوکز، در بسیاری از موجودات پروکاریوت و یوکاریوت هستند. اگرچه آن‌ها از منابع مختلف مخمر، قارچ،

* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.
تلفن: ۰۹۱۳۸۶۷۶۳۷۸ پست الکترونیک: m.mirbagheri@yazd.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

جلبک، کپک و جو به دست می‌آیند، بسته به منشأ خود برخی از ویژگی‌های فعال بیولوژیکی را نشان می‌دهد. بنابراین، برخی از نویسندگان بیان می‌کنند که بتاگلوکان‌های جداشده از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بالاترین اثر بیولوژیکی را دارند (۲). بیش از ۵۰ سال است که فواید متعدد آن برای سلامت انسان و حیوانات شرح داده‌شده است. یکی از منابع موجود برای بتاگلوکان، دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (مخمر نان یا آبجو) است (۳). مخمرها قارچ‌های تک‌سلولی هستند و هزاران سال است که برای پخت نان و تولید اتانول استفاده می‌شوند. امروزه تولید جهانی این میکروارگانیسم از ۲/۵ میلیون تن فراتر رفته است. برخی از کارخانه‌های مخمر نه‌تنها مخمر را برای نانوایی‌ها تولید می‌کنند، بلکه عصاره‌های مخمر را نیز تولید می‌کنند که پس از اتولیز با پشتیبانی مکانیکی یا آنزیمی به دست می‌آید و قسمت‌های بیرونی سلول‌های مخمر، یعنی دیواره‌های سلولی، به‌عنوان ضایعاتی باقی می‌مانند که تاکنون هیچ کاربرد تجاری برای آن‌ها به‌جز به‌عنوان مکمل برای غذای حیوانات ایجاد نشده است. اختلاف ضخامت دیواره سلولی مخمر بسته به شرایط رشد (محیط رشد، دما، فشار اسمزی، متابولیت‌های سمی و زمان برداشت) و زمینه ژنتیکی حدود ۷۰ تا ۱۰۰ نانومتر است. در مطالعه دیگری ثابت شده است که دیواره سلولی مخمر پس از تخمیر اتانول به ضخامت ۲۰۰ نانومتر هم می‌رسد (۲). دیواره سلولی مخمر از ۶۰-۳۰٪ پلی‌ساکارید (الیگوساکاریدهای بتاگلوکان و مانان)، ۳۰-۱۵٪ پروتین، ۲۰-۵٪ لیپیدها و مقدار کمی کیتین تشکیل‌شده است (۵). دیواره سلولی مخمر، به‌ویژه مخمرهای نانوایی و آبجو منبع مهمی از بتاگلوکان است. پلی‌ساکارید بتاگلوکان مخمر، یک پلیمر زیستی گلوکز است و یک عنصر ساختاری اصلی دیواره سلولی مخمر را تشکیل می‌دهد. در دیواره سلولی مخمر، دو نوع مختلف گلوکان یافت می‌شود: بتا۳-۱گلوکان، یک جزء اصلی که بیش از ۵۰-۵۵٪ از دیواره سلولی را شامل می‌شود و بتا۶-۱گلوکان که مقدار (۱۵٪) را شامل می‌شود (۶). بتا۳-۱ گلوکان یک شبکه میکروفیبریلار را در سطح داخلی دیواره سلولی تشکیل می‌دهد که از طریق میکروسکوپ الکترونی قابل‌مشاهده است. این ماده دارای وزن مولکولی ۲۴۰ کیلو دالتون و حداکثر طول فیبر ۶۰۰ نانومتر است. بیشترین قسمت بتا۳-۱گلوکان بر اساس مطالعات آزمایشگاهی دارای یک ترکیب مارپیچی است که در سلول‌های مخمر به‌صورت جامد دست‌نخورده توسط تشدید مغناطیسی هسته‌ای نشان داده و تأییدشده است. بنابراین، ساختار مارپیچ از سه زنجیره هیدروژنی (ترکیب مارپیچ سه‌گانه) تشکیل‌شده است. زنجیرها در فاصله ۱/۵۶ نانومتری با یک دوره ۰/۶ نانومتری بین الیاف جدا می‌شوند، درنتیجه هر ساختار مارپیچ شش واحد بتا-D-گلوکوپیرانوز را شامل می شود (۷). بتا۶-۱گلوکان یک پلی‌ساکارید بسیار شاخه‌ای است که هر جزء از دیواره سلولی را متصل می‌کند. برخلاف ساختار میکروفیبریلار بتا۳-۱گلوکان، در سلول مخمری *ساکارومایسس سرویزیه*، این پلیمر ازنظر ساختار بی‌شکل است، در موقعیت بتا۶-۱پیوند خورده است، کوتاه‌تر است و به‌عنوان یک چسب انعطاف‌پذیر عمل می‌کند تا پیوندهای عرضی با بتا۳-۱گلوکان، کیتین و مانوپروتئین ایجاد کند(۸). چالش اصلی در فرآیند جداسازی گلوکان حذف ناخالصی‌هایی مانند مانوپروتین‌ها و لیپیدها، بدون از دست دادن مقدار قابل‌توجهی از ترکیبات فعال بیولوژیکی است. سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) بتاگلوکان *S.cerevisiae* را یک ماده غذایی ایمن معرفی کرده که ممکن است در صنایع غذایی به‌عنوان مواد تشکیل‌دهنده، اما نه به‌عنوان افزودنی استفاده شود (۷). سازمان ایمنی غذای اروپا (EFSA) نظریه‌ای صادر کرده است که بتاگلوکان مخمر یک ماده غذایی ایمن است که می‌تواند به‌عنوان یک مکمل غذایی با غلظت حداکثر ۳۷۵ میلی‌گرم در روز و در مواد غذایی برای مصرف تغذیه‌ای خاص در دوزهای تا ۶۰۰ میلی‌گرم در روز استفاده شود(۹و۱۰). بااین‌حال، این موارد احتمال واکنش‌های نامطلوب ناشی از ناخالصی‌های ناشی از فرآیندهای جداسازی را رد نمی‌کند زیرا در موارد نادر پروتین‌های انباشته‌شده می‌توانند باعث آلرژی شوند (۲).

بتاگلوکان جداشده از *ساکارومایسس سرویزیه* دارای خواص مفیدی است و کاربردهای بسیار متنوعی در پزشکی انسانی و

دامپزشکی، تقویت سیستم ایمنی، صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی و صنایع شیمیایی و همچنین تولید غذا و خوراک دارد (۷و۱۱). استفاده از بتاگلوکان فعالیت زیستی و عملکردهای فیزیولوژیکی بالقوه را نشان می‌دهد، همچنین تأثیراتی به‌عنوان محرک ایمنی، ضدالتهاب، ضد میکروبی، ضدعفونی، ضدویروسی، ضد تومور، کاهش‌دهنده کلسترول، محافظ پرتویی و ترمیم زخم دارد (۱). بتاگلوکان مخمر، با بهبود عملکرد ایمنی روده و افزایش رشد قزل‌آلا، به‌عنوان یک جزء مؤثر در پیشگیری از بیماری‌ها و بهبود مقاومت در برابر عفونت‌های ویروسی شناخته می‌شود. این ترکیب به تنظیم میکروبیوم روده و تولید اسیدهای چرب غیراشباع و پپتیدهای ضد میکروبی کمک می‌کند (۱۲). لنتینان (Lentinan)، اسکیزوفیلان (Schizophyllan) و بتا۳-۱گلوکان ازنظر بالینی به‌عنوان کمکی در درمان سرطان استفاده می‌شوند، و کوردلان (Curdlan) مشتق شده از باکتری‌ها به‌عنوان چسبنده در صنایع غذایی کاربرد پیداکرده است. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که بتاگلوکان‌ها می‌توانند فعالیت عملکردی ماکروفاژها را افزایش داده و فعالیت ضدمیکروبی سلول‌های تک‌هسته‌ای و نوتروفیل‌ها را در شرایط آزمایشگاهی فعال کنند (۷)، این پاسخ ایمنی تقویت‌شده با افزایش تولید سیتوکین‌های پیش التهابی (Proinflammatorycytokines)، انفجار اکسیداتیو (Oxidative stress) و تولید کموکاین (chemokine) انجام می‌شود. علاوه بر ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها، عملکرد سلول‌های دندریتیک (Dendritic cells) نیز می‌تواند تحت تأثیر بتاگلوکان‌ها قرار گیرد، لکوسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیال نیز می‌توانند به بتاگلوکان‌ها پاسخ دهند (۱۳و۱۴). به‌طور خاص، بتاگلوکان به‌عنوان یک ماده مؤثر، می‌تواند پاسخ ایمنی ضد توموری سلول‌های B را از طریق فعال‌سازی گیرنده Dectin-1 بهبود بخشد. نتایج نشان می‌دهد که بتاگلوکان موجب تمایز و افزایش تولید سیتوکین و ایمنوگلوبولین‌ها توسط سلول‌های B می‌شود و در ترکیب با آنتی‌بادی‌های مسدودکننده PD-1، تعداد سلول‌های B در محیط میکروتومور و بروز مراکز زاد و ولد در طحال و گره‌های لنفاوی را افزایش می‌دهد و به تأخیر در پیشرفت تومور کمک می‌کند (۱۵). استفاده از بتاگلوکان به همراه باکتری پروبیوتیک Klebsiella sp. E26، به‌عنوان یک روش سین-بیوتیک، منجر به بهبود قابل توجهی در ظرفیت ایمنی و متابولیسم انرژی میگوهای سفید اقیانوس آرام (Penaeus vannamei) تحت شرایط شوری پایین می‌شود. این ترکیب با بهینه‌سازی میکروبیوم روده و فعال‌سازی مسیرهای متابولیسم انرژی، به تقویت سازگاری میگوها با استرس شوری کمک می‌کند (۱۶). کرم‌های حاوی بتاگلوکان با اثر موضعی قوی، ماکروفاژهای پوست را تحریک می‌کنند که به‌عنوان اولین مانع در برابر دفاع سلولی در برابر عوامل عفونی در نظر گرفته می‌شوند (۱۷)، این خاصیت به‌ویژه در درمان زخم در افراد مبتلا به دیابت که دارای وضعیتی به نام نوروپاتی دیابتی هستند و استعداد بالایی در ابتلا به عفونت‌ها و زخم‌های پوستی دارند مفید است، زیرا زخم‌ها به‌شدت بهبود می‌یابند. نمونه‌هایی از استفاده از گلوکان به‌عنوان عوامل ضدویروسی در گیاهان وجود دارد مانند: محافظت از گونه‌های تنباکو در برابر تهاجم ویروس موزاییک یا در برابر ویروسی که باعث حلقه سیاه در گوجه‌فرنگی می‌شود. این گیاهان را می‌توان با تزریق یا اسپری کردن پلیمر گلوکانیک درمان کرد (۱۸). درمجموع، می‌توان نتیجه گرفت که بتاگلوکان‌ها از منابع مختلف به‌طورکلی پاسخ ایمنی لکوسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیال را، عمدتاً با تعدیل تولید سیتوکین، افزایش می‌دهند. بتاگلوکان‌های به‌دست‌آمده از دیواره سلولی مخمرها به دلیل توانایی در نگهداری آب، روغن و چربی می‌تواند در صنایع غذایی به‌عنوان فیبرهای غذایی، جایگزین‌های چربی و امولسیفایرها استفاده شود. ترکیب آن‌ها در غذا به کاهش قند خون کمک می‌کند. عصاره بتاگلوکان مخمر برای کاربردهای خوراکی بی‌خطر در نظر گرفته می‌شود و به‌عنوان GRAS (Generally recognized as safe) شناخته می‌شود (۱۹). بتاگلوکان دارای خواص عملکردی مختلفی است که می‌تواند در صنایع غذایی برای تهیه سوپ، سس، نوشیدنی و سایر محصولات غذایی مورداستفاده قرار گیرد که در آن بتاگلوکان به‌عنوان عامل تثبیت‌کننده، غلیظ کننده و امولسیفایر عمل می‌کند (۲۰). بتاگلوکان همچنین می‌تواند بر روی

بیماری‌ها و اختلالات مختلف مانند سرطان روده بزرگ (۲۱)، پیشگیری از بیماری عروق کرونر قلب (۲۲)، سطح گلوکز خون و مقاومت به انسولین، سطح کلسترول سرم، و میکروفلور روده اثرگذار باشد. هدف از این مطالعه استخراج بتاگلوکان از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* به روش تیمار اسیدی–بازی و تجزیه تحلیل آن به‌وسیله FTIR است.

مواد و روش‌ها

الف) میکروارگانیسم: در این مطالعه از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (مخمر نان) به شماره IBRC-M 30069 تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیک و زیستی ایران استفاده‌شد.

ب) رسم نمودار رشد: از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. سپس مقدار یک میلی‌لیتر از لوله‌آزمایش داخل ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت YPD ریخته و مخلوط شد. محیط کشت در انکوباتور شیکر دار در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شد تا مخمر رشد کند. سپس هر ۲ ساعت مقدار یک میلی‌لیتر از محیط کشت برداشته و داخل یک لوله‌آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته شده و با ورتکس به‌خوبی همزده شد، یک‌بار دیگر نیز یک میلی‌لیتر مایع داخل لوله‌آزمایش قبلی را داخل لوله‌آزمایش دیگری حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته شده و ورتکس شد تا رقت یک‌به‌صد به دست بیاید. سپس یک میلی‌لیتر از مایع لوله آزمایش روی لام نئوبار ریخته شده و لامل به‌آرامی روی آن قرارگرفته و فشار داده شد تا به سطح‌رویی لام بچسبد. درنهایت لام زیر میکروسکوپ نوری گذاشته و تعداد مخمرها شمارش شد.

ج) پیش تیمار: تیمار اولیه با استفاده از شستشوی قلیایی (NaOH)، pH برابر ده ، در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه و جداسازی توسط سانتریفیوژ (MPW – لهستان) با ٤۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه و سه بار شستشو در آب مقطر انجام می‌شود.

د) اتولیز: سلول‌های مخمر پیش تیمار شده به میزان ۱۵٪ (w/v) در آب مقطر به‌صورت محلول درآمده و در pH پنج تنظیم می‌شود، سپس ۳٪ کلرید سدیم به‌عنوان تسریع‌کننده اتولیز اضافه شد. در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت با همزدن در ۱۲۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس اتولیز در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده تا دمای اتاق خنک شود و در ٤۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود تا سلول‌های اتولیز شده باقیمانده از استخراج مخمر جدا شوند. سلول‌های مخمر اتولیز شده برای مرحله بعدی در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد (۲۳).

ه) تیمار قلیایی: سلول‌های مخمر اتولیز شده با پنج برابر NaOH (۱ مولار) مخلوط شده و در ۸۰ درجه سلسیوس در همزن به مدت ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس باقی‌مانده سلولی با سانتریفیوژ در ٤۰۰۰g به مدت ۲۵ دقیقه جمع‌آوری و در ۳ برابر آب مقطر معلق شد. پس از اختلاط کامل، سلول‌ها در ٤۰۰۰g به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ترکیبات حاصل برای مرحله بعدی در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری می‌شود (۲٤).

و) تیمار اسیدی: ترکیبات جامد در ۵ برابر اسید استیک (۱/۰ مولار) حل‌شده و در ۸۰ درجه سلسیوس در همزن به مدت ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس گلوله‌ها با سانتریفیوژ در ٤۰۰۰g به مدت ۲۵ دقیقه جمع‌آوری شد. جامدات به‌دست‌آمده ۳ بار با آب شسته شد و برای مرحله بعدی در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد (۲٤).

ز) فریزدرایر: ترکیبات جامد پس از جمع‌آوری به‌وسیله فرآیند خشک‌کن سرمایشی (فریزدرایر مدل F.D-V-450) خشک شدند.

ح) طیف‌سنجی FTIR: گلوکان استخراج‌شده از روش‌های مختلف توسط طیف‌سنج FTIR (Jasco–ژاپن) با پیروی از روش استاندارد مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت (۲۵)، اسکن با محدوده طیفی ٤۰۰ تا ٤۰۰۰ سانتی‌متر محاسبه شد.

یافته‌ها

در این تحقیق، رشد مخمر و تجزیه‌وتحلیل ساختاری بتاگلوکان به‌عنوان یک پلی‌ساکارید مهم، مورد بررسی قرار گرفته است.

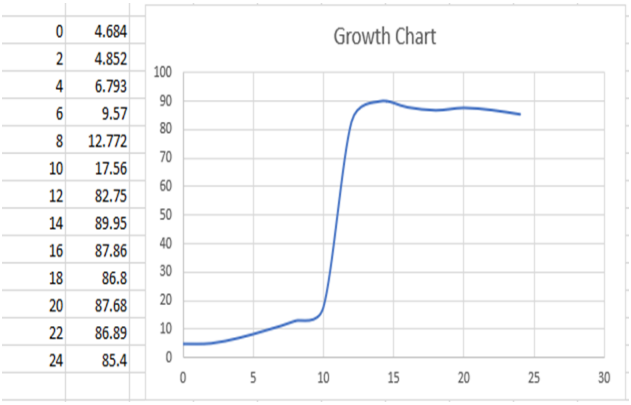
بعد از شمارش تعداد مخمرها و محاسبه غلظت آن‌ها در عرض ۲۴ ساعت، نمودار رشد مخمر ترسیم شد تا الگوی افزایش تجمع سلول‌های زنده را نشان دهد. همچنین، با استفاده از طیف‌سنجی FTIR، ترکیب شیمیایی و ساختار پروتینی مخمر و بتاگلوکان استخراج‌شده تحلیل شد، که حضور پیوندهای مختلف به‌ویژه پیوندهای گلیکوزیدی و هیدروژنی در این ترکیبات تأیید گردید. در نهایت، روش‌های متنوع استخراج بتاگلوکان و تأثیر آن‌ها بر کیفیت و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، به‌عنوان آثاری با پتانسیل بالا برای کاربرد در صنایع غذایی بررسی شد.

الف) نمودار رشد: پس از شمارش تعداد مخمرها در ۲۴ ساعت، غلظت مخمرها با استفاده از محاسبات زیر به دست می‌آید.

$$\text{میانگین تعداد سلول زنده در هر مربع} = \frac{\text{تعداد سلول زنده شمارش شده}}{\text{تعداد مربع}}$$

$$\text{ضریب رقت} = \frac{\text{حجم کل}}{\text{حجم سوسپانسیون سلولی}}$$

درنهایت بعد از به دست آوردن غلظت مخمر در ۲۴ ساعت، نمودار رشد بر اساس غلظت مخمر بر زمان رسم شد.



نمودار ۱: رشد مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در ۲۴ ساعت.

در نمودار ۱ رشد مخمر، محور افقی زمان را بر حسب ساعت و محور عمودی غلظت سلول‌های زنده را نشان می‌دهد. ابتدا، در مرحله تأخیر که در آغاز نمودار دیده می‌شود، سلول‌های مخمر به محیط جدید خود عادت کرده و فعالیت‌های متابولیک خود را افزایش می‌دهند. این مرحله ممکن است چند ساعت طول بکشد و در نمودار به شکل یک خط افقی کم‌شیب نمایان می‌شود.

پس از این مرحله، مخمر ها وارد مرحله رشد نمایی شدند که در آن تعداد سلول‌ها به‌طور چشمگیری افزایش یافت. این قسمت از نمودار به‌صورت یک خط صعودی تند نمایش داده می‌شود که نشان‌دهنده شرایط ایده‌آل برای رشد و تقسیم سلول‌ها است. در این بخش، سلول‌ها به اندازه کافی مواد مغذی و شرایط مناسب دارند تا به سرعت تکثیر شوند.

در ادامه، مرحله ثابت است که در آن نرخ تولید سلول‌ها به حالت تعادل می‌رسد. در این مرحله، که به‌صورت یک خط افقی بر روی نمودار نشان داده شده، تعداد سلول‌ها به طور کلی ثابت ماند، چرا که عوامل محدودکننده مانند کاهش مواد مغذی یا فضاسازی نقش خود را ایفا می‌کنند.

در نهایت، با ورود به مرحله کاهش، تعداد سلول‌ها به دلیل کمبود مواد غذایی یا افزایش ضایعات در محیط، شروع به افت نمود. در این قسمت، نمودار به سمت پایین و نشان‌دهنده کاهش غلظت سلول‌های زنده است. به‌طور کلی، این نمودار به ما بینش خوبی درباره روند رشد و برخی از عوامل مؤثر بر آن می‌دهد و می‌تواند به بهینه‌سازی فرآیندهای کشت مخمر کمک کند.

ب) FTIR: در شکل ۲، نمودار FTIR مربوط به نمونه مورد بررسی نشان داده شده است. محور افقی این نمودار، نمایانگر طول موج در واحد سانتیمتر معکوس (cm^{-1}) است، که از ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} تغییر می‌کند. این دامنه طول موج شامل اطلاعات مربوط به گروه‌های عاملی و پیوندهای شیمیایی مختلف موجود در نمونه است.

بر روی محور عمودی، شدت جذب که معمولاً به صورت درصد جذب (٪) یا نهفته (Absorbance) نمایش داده می‌شود، نشان‌دهنده میزان تعامل مولکول‌های نمونه با تابش نور فروسرخ است. پیک‌هایی که در این نمودار مشاهده می‌شوند، به اطلاعات خاصی درباره نوع پیوندهای شیمیایی موجود در ترکیب اشاره دارند.

مخمر ساختار پروتینی (متشکل از آمینواسیدها) و منبع نیتروژن می‌باشد. به‌همین دلیل شاهد پیک‌هایی به شرح زیر مشاهده شد.

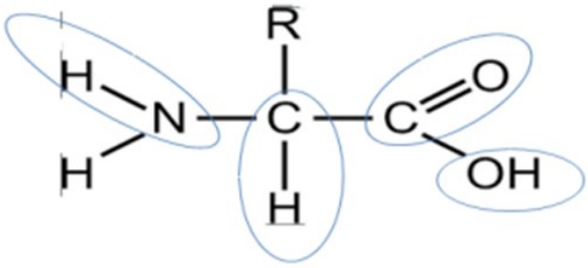
پیک قوی در محدوده $1700\text{-}1725\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند C=O از اسید کربوکسیلیک

پیک متوسط در محدوده (3400) $2400\text{-}3400\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند O-H در اسید کربوکسیلیک

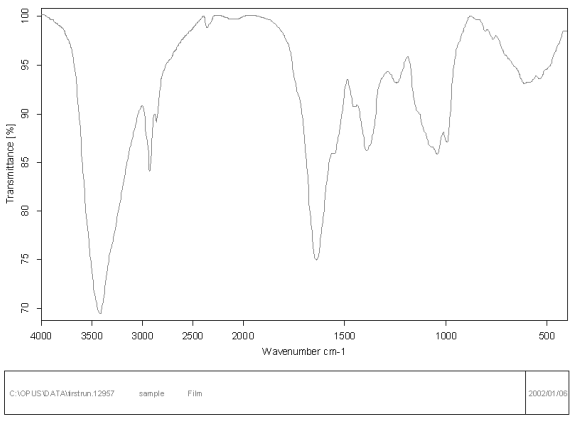
پیک در محدوده $3000\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند C-H

پیک در محدوده $3500\ cm^{-1}$ (3400)-3100 مربوط به پیوند N-H در آمین

پیک در محدوده $1100\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند C-O



شکل ۱: ساختار اسید کربوکسیلیک.



شکل ۲: طیف FTIR پودر مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*.

بتاگلوکان نوعی پلی‌ساکارید و پلیمر گلوکز است (پیوندهای گلیکوزیدی)

پیک متوسط در محدوده $3200\text{-}3500\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند هیدروژنی O-H

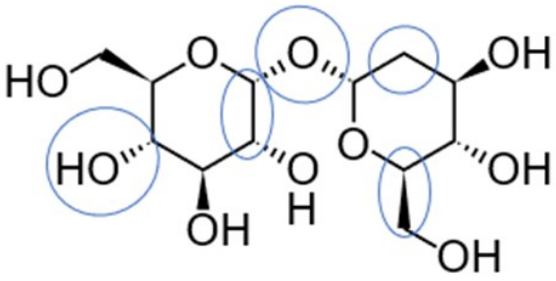
پیک در محدوده $2850\text{-}3000\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند C-H آلکان‌ها

پیک در محدوده $1465\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند CH_2

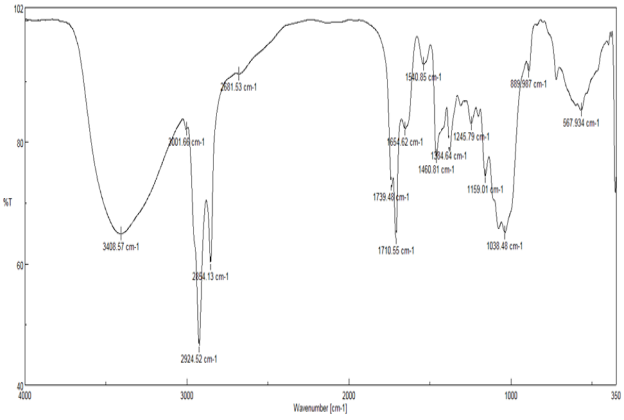
پیک در محدوده $1000\text{-}1300\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند C-O اتری

پیک در محدوده $1600\text{-}1680\ cm^{-1}$ مربوط به پیوند C-C آلکان‌ها در ترکیبات آروماتیک (حلقوی)

و با توجه به مشاهده پیک‌های شاخص ذکر شده، حضور بتاگلوکان تأیید شد.



شکل ۳: ساختار پلیمرهای قندی.



شکل ٤: طیف FTIR بتاگلوکان استخراج‌شده.

در ادامه ترکیبی از استخراج باز قوی (NaOH) و اسید ضعیف (CH_3COOH) توانست بتاگلوکان باکیفیت بالا تولید کند. که از طریق تجزیه‌وتحلیل FTIR به تایید رسید.استخراج آب گرم ۵۰ درجه سلسیوس بازده و بازیابی بالاتری از بتاگلوکان را به همراه داشت. ناخالصی‌های نشاسته‌ای و پروتینی نسبتاً کمتری به ترتیب درروش استخراج اسیدی تنها مشاهده شد. ظرفیت اتصال و کف کردن بالاتر درروش استخراج آب گرم مشاهده

شد درحالی‌که پایداری تحت تأثیر روش‌های استخراج قرار نگرفت. در تمام روش‌های استخراج بتاگلوکان رنگ روشن را به همراه داشت. بر اساس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، تمامی روش‌های استخراج در این مطالعه پتانسیل بالایی برای تولید بتاگلوکان نشان دادند. بااین‌حال، بتاگلوکان استخراج‌شده از روش استخراج آب گرم و ترکیب اسید ضعیف و باز قوی افزودنی ارزان و امیدوارکننده به نظر می‌رسد و پتانسیل زیادی برای استفاده در محصولات غذایی دارد.

بحث

از زمانی که مشخص شد گلوکان حاصل از مخمرها دارای خواص مفیدی برای انسان و حیوانات است، فرآیندهای زیادی برای جداسازی و خالص‌سازی این پلی‌ساکارید توسعه‌یافته است. اکثر آن‌ها از تیمار با مواد قلیایی داغ، اسیدها یا ترکیبی از هر دو استفاده می‌کنند که پروتئین‌ها و سایر پلی‌ساکاریدها را حل می‌کند. باقی‌مانده نامحلول به‌عنوان " گلوکان مخمر" نامیده می‌شود، اما ازنظر شیمی کربوهیدرات‌ها به‌خوبی معلوم شده است که شرایط اسیدی و قلیایی منجر به تخریب کم‌وبیش قوی زنجیره‌های گلوکز می‌شود، به‌ویژه اگر اکسیژن در آن دخالت داشته باشد. بنابراین، بازدهی آن‌ها اغلب کم است و درنتیجه قیمت‌های بالایی دارند، یا خلوص گلوکان محدود است (۳). لویی و همکاران با استفاده از اتولیز القایی، آب داغ، همگن‌سازی، حلال آلی و پروتئازها شرایط جداسازی ملایم را به وجود آوردند، در طی این روش زنجیره بتاگلوکان تخریب نشد و ساختار اصلی بتاگلوکان حفظ شد، بنابراین بتاگلوکان در بازده بالا ۹۱٪ (w/w) نسبت اولیه در دیواره سلولی مخمر به دست آمد (۲۳). سلول‌های مخمری که با آب داغ تیمار شده‌اند، راحت‌تر از بین می‌روند و نسبت سلول‌های شکسته با همگن‌سازی کمی بیش از ۹۵٪ است. درنتیجه ازهم‌گسیختگی کامل سلول‌های مخمر، خلوص بتاگلوکان‌ها تا ۹۳٪ (w/w) می‌رسد. همچنین در طی این فرآیند، سلول‌های مخمر به‌طور کامل مورداستفاده قرار گرفتند. پنگ کومسری و همکارانش سویه مخمر با محتوای بالای بتاگلوکان را غربالگری و مشخص کردند (۲٤). احمد و همکاران در تحقیقی دیگر با روش استخراج آنزیمی دست یافتند که بهترین روش استفاده از آنزیم است زیرا نه‌تنها بالاترین عملکرد را دارد، بلکه نشاسته، چربی و پنتوسان بیشتری در طول استخراج بتاگلوکان حذف می‌شود که نشان می‌دهد گزینه بالقوه خوبی برای استفاده صنعتی است (۲٦).

نتایج استخراج نشان داد که درصد پروتین اندکی کاهش‌یافته درحالی‌که درصد کربوهیدرات در بیومس افزایش‌یافته است. مخمرها به‌ویژه مخمر آبجو حاوی ترکیبات رازک مانند هومولون (Humulone) و لوپولون (Lupulon) (اسیدهای رازک عمدتاً عامل تلخی هستند) هستند، شستشوی قلیایی (pH قلیایی ده ، در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه) برای حذف این ترکیبات بدون هیچ‌گونه اثرات مضر در ارزش غذایی آن استفاده شد. اتولیز به‌عنوان هیدرولیز بیوپلیمرهای درون‌سلولی تحت تأثیر آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند پروتئینازها، ریبونوکلئازها و گلوکانازها تعریف‌شده است. در طی اتولیز، ساختارهای درون‌سلولی تخریب می‌شوند، پروتئازهای قلیایی در سیتوپلاسم آزاد می‌شوند، آنزیم‌ها اجزای پلیمری درون‌سلولی را هیدرولیز می‌کنند، محصولات هیدرولیز در فضای محدودشده توسط دیواره سلولی و در نهایت منافذ در دیواره سلولی تجمع می‌یابند. چنانچه جرم مولکولی آن‌ها به‌اندازه کافی کم باشد تا با زیست‌توده مخمر تازه تلاقی کند، حدود ۷۰ و ٦۹ درصد پروتئین‌ها با اتولیز القایی حذف‌شده‌اند، درحالی‌که محتوای کربوهیدرات کل افزایش‌یافته است (۲۳). در مطالعه لئو و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص شد بهترین شرایط اتولیز، سلول‌های مخمر تنظیم‌شده به میزان ۱۵٪ (w/v) محتوای جامد و pH۵ در حضور ۳٪ کلرید سدیم به‌عنوان تسریع‌کننده اتولیز بوده و سپس در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت باز هم‌زدن در ۱۲۰ دور در دقیقه انکوبه شد. بنابراین، محتوای پروتین در مایع رویی به کاهش و میزان کل کربوهیدرات در دیواره سلولی باقیمانده افزایش یافت (۲۳). نتایج ایشان نشان داد که پس از تیمار قلیایی محصولات اتولیز شده، افزایش در درصد کربوهیدرات و کاهش درصد پروتین

مشاهده می‌شود (۲۳). پنگکومسری و همکاران گزارش کردند که دیواره سلولی مخمر از اتولیز شامل حدود ۶۰-۶۲٪ پلی‌ساکاریدها و ۱۱-۱۳٪ پروتین است (بیشتر پروتین‌ها به‌صورت کووالانسی به مانوپروتین‌های تشکیل‌شده از مانان مرتبط بودند). برای خلاص شدن از مانوپروتین‌ها و به دست آوردن بتاگلوکان با خلوص بالا، باید از غلظت مناسبی از محلول قلیایی آبی مانند هیدروکسید سدیم یا پتاسیم استفاده شود (۲۴) و همکاران دریافتند که بهترین شرایط تیمار قلیایی پنج برابر ۱/۰ مولار NaOHبود و در ۹۰ درجه سانتی‌گراد در همزن به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. تیمار قلیایی منجر به هیدرولیز و حل شدن مانوپروتئین‌های داخل سلولی، اسیدهای نوکلئیک، مانان‌ها و لیپیدهای قطبی به بخش‌های رویی می‌شود. همچنین کیتین با درمان قلیایی به کیتوزان در دیواره سلولی استیل‌زدایی شد. ذرات کامل گلوکان نامحلول در هیدروکسید قلیایی که عمدتاً دارای پیوندهای بتا۱-۶ و هستند بتا۱-۳ نیز در حضور محیط قلیایی تشکیل می‌شوند (۲۵).

به‌طورکلی، بتاگلوکان نامحلول در شرایط قلیایی عمدتاً حاوی پیوندهای بتا ۱-۳ با مقدار کمی از بتا ۱-۶ گلوکان است. کل ذرات گلوکان را می‌توان با یک اسید بازیابی کرد تا میزان پیوندهای بتا ۱-۶ را کاهش دهد و درنتیجه خواص هیدرودینامیکی بتاگلوکان را تغییر دهد. در تصفیه اسید، اسیدهای قوی مانند HCl یا H_2SO_4 را می‌توان استفاده کرد، اما اسید استیک به دلیل اسیدیته ملایم، آسان در جابجایی، سمیت کم، هزینه کم و در دسترس بودن ترجیح داده می‌شود. به‌طورکلی این اسیدها باید به‌اندازه کافی ملایم باشند تا هیدرولیز پیوندهای بتا۱-۳ را محدود کنند و به‌طور فراوانی فقط بر روی گلوکان‌های پیوندی بتا ۱-۶ تأثیر بگذارند، جایی که مولکول‌های گلوکان بتا۱-۶ بزرگ‌ترین کلاس کووالانسی را به پروتین‌های دیواره سلولی مرتبط به هم متصل می‌کنند (۲۶و۲۷). تیمار اسیدی ترجیحاً در دمای ۵۵ تا ۸۵ درجه سلسیوس، غلظت اسید از ۰/۱ تا ۰/۵ مول، غلظت بتاگلوکان از ۰/۱ تا ۱۰ گرم در لیتر انجام می‌شود. این تیمار ممکن است از حدود ۳ تا ۲۰ درصد وزنی مواد محلول در اسید را بر اساس وزن کل ذرات گلوکان قبل از بازیابی حذف کند (۲۸-۳۲).

نتیجه‌گیری

در مقاله حاضر از روش استخراج قلیایی-اسیدی و آب گرم و تلفیق این روش‌ها برای جداسازی بتاگلوکان از دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس‌سرویزیه* استفاده شد. نتایج حاصل از تست FTIR بروی محصول نهایی نشان دهنده وجود ترکیب بتاگوکان در محصول نهایی حاصل از استخراج و حذف مقادیر زیادی از ترکیبات اسیدچرب و پروتین می‌باشد. سهولت اجرا و هزینه کم این روش را برای استفاده در مصارف صنعتی مناسب می‌کند و می‌تواند یک پیش‌ماده مناسب برای خالص‌سازی نهایی بتاگلوکان فراهم کند تا در مصارف دارویی و آرایشی بهداشتی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط دانشگاه یزد مورد حمایت مالی قرار گرفته است. همچنین نویسندگان از حمایتهای کارشناسان آزمایشگاه دانشکده شیمی و زیست شناسی این دانشگاه نهایت تشکر را دارند.

ملاحظات احلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی کلیه نکات اخلاقی اعم از سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها را رعایت کرده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Kogan G. (1→ 3, 1→ 6)-β-d-Glucans of yeasts and fungi and their biological activity. Studies in natural products chemistry. 2000;23:107–52.
2. Petravić-Tominac V, Zechner-Krpan V, Grba S, Srečec S, Panjkota-Krbavčić I, Vidović L. Biological effects of yeast β-glucans. Agriculturae conspectus scientificus. 2010;75(4):149–58.
3. Freimund S, Sauter M, Käppeli O, Polymers HDC, 2003 undefined. A new non-degrading isolation process for 1, 3-β-D-glucan of high purity from baker's yeast Saccharomyces cerevisiae. Elsevier.
4. Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae. FEMS microbiology reviews. 2002;26(3):239–56.
5. Huang GL. Extraction of two active polysaccharides from the yeast cell wall. Zeitschrift für Naturforschung C. 2008;63(11–12):919–21.
6. Varelas V, Liouni M, Calokerinos AC, Nerantzis ET. An evaluation study of different methods for the production of β-D-glucan from yeast biomass. Drug Test Anal. 2016;8(1):46–55.
7. Zeković DB, Kwiatkowski S, Vrvić MM, Jakovljević D, Moran CA. Natural and modified (1→ 3)-β-D-glucans in health promotion and disease alleviation. Crit Rev Biotechnol. 2005;25 (4):205–30.
8. Lesage G, Bussey H. Cell wall assembly in Saccharomyces cerevisiae. Microbiology and molecular biology reviews. 2006;70(2):317–43.
9. Kwiatkowski S, Kwiatkowski SE. Yeast (Saccharomyces cerevisiae) glucan polysaccharides-occurrence, separation and application in food, feed and health industries. The complex world of polysaccharides. 2012;47–70.
10. EFSA Panel on Dietetic Products N and A (NDA). Scientific Opinion on the safety of 'yeast beta-glucans' as a Novel Food ingredient. EFSA Journal. 2011;9(5):2137.
11. Laroche C, Michaud P. New developments and prospective applications for β (1, 3) glucans. Recent patents on biotechnology. 2007;1(1):59–73.
12. Chang T, Lu K, Han F, Xu C, Li E. Effects of β-glucan combined with the gut probiotic Klebsiella sp. E26 on growth, energy metabolism, and immune response in pacific white shrimp (Penaeus vannamei) under low salinity stress. Aquaculture. 2025;742223.
13. Lin YL, Lee SS, Hou SM, Chiang BL. Polysaccharide purified from Ganoderma lucidum induces gene expression changes in human dendritic cells and promotes T helper 1 immune response in BALB/c mice. Molecular pharmacology. 2006;70(2):637–44.
14. Nakagawa Y, Ohno N, Murai T. Suppression by Candida albicans β-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. The Journal of infectious diseases. 2003;187(4):710–3.
15. Bai Y, Ding J, He L, Zhu Z, Pan J, Qi C. β-Glucan induced plasma B cells differentiation to enhance antitumor immune responses by Dectin-1. BMC Immunol. 2025;26(1):2.

16. Shi Y, Kong W, Gong F, Cai C, Zhang Y, Cheng G, et al. Yeast β-glucan enhances the intestinal immune function in coho salmon via the modulation of gut microbiota-mediated lipid metabolism. Aquaculture. 2025;599:742123.
17. AVRĂMIA I, AMARIEI S. Research on obtaining high β-glucans content from different sources of yeast by harnessing their biologically active potential. Food and Environment Safety Journal. 2017;16(4).
18. Kamarulzaman MK, Hisham S, Kadirgama K, Ramasamy D, Samykano M, Saidur R, et al. Improving the thermophysical properties of hybrid nanocellulose-copper (II) oxide (CNC-CuO) as a lubricant additives: A novel nanolubricant for tribology application. Fuel. 2023;332:126229.
19. Zechner-Krpan V, Petravić-Tominac V, Panjkota-Krbavčić I, Grba S, Berković K. Potential application of yeast β-glucans in food industry. Agriculturae Conspectus Scientificus. 2009;74 (4):277–82.
20. Sánchez-Madrigal MÁ, Neder-Suárez D, Quintero-Ramos A, Ruiz-Gutiérrez MG, Meléndez-Pizarro CO, Piñón-Castillo HA, et al. Physicochemical properties of frozen tortillas from nixtamalized maize flours enriched with β-glucans. Food Science and Technology. 2015;35:552–60.
21. Dongowski G, Huth M, Gebhardt E, Flamme W. Dietary fiber-rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats. The Journal of nutrition. 2002;132(12):3704–14.
22. Wang J, Rosell CM, de Barber CB. Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. Food chemistry. 2002;79(2):221–6.
23. Liu XY, Wang Q, Cui SW, Liu HZ. A new isolation method of β-D-glucans from spent yeast Saccharomyces cerevisiae. Food Hydrocolloids. 2008;22(2):239–47.
24. Pengkumsri N, Sivamaruthi BS, Sirilun S, Peerajan S, Kesika P, Chaiyasut K, et al. Extraction of β-glucan from Saccharomyces cerevisiae: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. Food Science and Technology. 2016;37:124–30.
25. Sivamaruthi BS, Prasanth MI, Balamurugan K. Alterations in Caenorhabditis elegans and Cronobacter sakazakii lipopolysaccharide during interaction. Archives of microbiology. 2015;197:327–37.
26. Mirbagheri Firoozabad MS, Mohammadi nasr M, Antimicrobial activities of microbial essential fatty acid against foodborne pathogenic bacteria. Iranian Journal of Microbiology. 2022;14 (2), 214.
27. Ahmad A, Anjum FM, Zahoor T, Nawaz H, Ahmed Z. Extraction and characterization of β-d-glucan from oat for industrial utilization. International journal of biological macromolecules. 2010;46(3):304–9.

28. Mirbagheri M, Nahvi I, Emamzadeh R, Emtiazi G, Shirani E. Oil wastes management: medium optimization for the production of alpha-linolenic acid in Mucor circinelloides. International journal of environmental science and technology. 2016;13:31-8.

29. Mohammadi Nasr M, Nahvi I, Keyhanfar M, Mirbagheri M. The effect of carbon and nitrogen sources on the fatty acids profile of Mortierella vinacea. Biological Journal of Microorganism. 2017;5(20):1-8.

30. Mashhadi Karim M, Azin M, Mousavi Gargari SL, Sarshar M. Comparison of function of immobilized and free Bacillus licheniformis cells in production of alkaline protease. J Microbial World. 2011; 4(1-2): 15-22. [In Persian]

31. Elahe Tajedini, Mahboobeh Madani , Masoud Fouladgar, Rasoul Mohammadi, Ali Zarei Mahmoudabadi, (2023). Optimization of fatty acids produced by Candida glabrata isolated frome soil, Journal of Microbial World, 15(4), 245-258. magiran.com/p2559546

32. Parhamfar M, Abtahi H, Parhamfar M. Optimization of culture conditions for the production of phytase enzyme by Bacillus subtilis soil isolates. Journal of Microbial World. 2017 Jan 1;9 (4):315-25.