



Extraction and investigation of *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucan

Maryam Sadat Mirbagheri Firoozabad¹, Mahdi Bagheri Dehaskari², Mehdi Bayati²

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 $\rightarrow$ 6) and β -(1 $\rightarrow$ 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): 128 - 139

DOI: <https://doi.org/10.82363/jmw.2024.1200939>



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.



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 تشکیل شده 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-بازقورث و استفاده از آب گرم باعث حذف مقدار زیادی از پروتئین‌ها 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.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۶/۱۳

ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۴/۲۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۳/۲

مقدمه

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،

پلی‌ساکاریدها دسته بسیار مهمی از پلیمرهای زیستی هستند که از زنجیره‌های طولانی واحدهای قندی تکرارشونده تشکیل شده‌اند. آن‌ها از نظر ساختاری عمدتاً با نوع واحد مونومر، طول زنجیره، نوع پیوند گلیکوزیدی و درجه انشعاب

(*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.

تلفن: ۰۹۱۳۸۶۷۶۳۷۸

پست الکترونیک: m.mirbagheri@yazd.ac.ir



الکترونی قابل مشاهده است. این ماده دارای وزن مولکولی ۲۴۰ کیلو دالتون و حداکثر طول فیبر ۶۰۰ نانومتر است. بیشترین قسمت بتا ۱-۳ گلوکان بر اساس مطالعات آزمایشگاهی دارای یک ترکیب مارپیچی است که در سلول‌های مخمر به صورت جامد دست نخورده توسط تشدید مغناطیسی هسته‌ای نشان داده و تأیید شده است. بنابراین، ساختار مارپیچ از سه زنجیره هیدروژنی (ترکیب مارپیچ سه گانه) تشکیل شده است. زنجیرها در فاصله ۱/۵۶ نانومتری با یک دوره ۰/۶ نانومتری بین الیاف جدا می‌شوند، در نتیجه هر ساختار مارپیچ شش واحد بتا-D-گلوکوپیرانوز را شامل می‌شود (۷). بتا ۱-۶ گلوکان یک پلی ساکارید بسیار شاخه‌ای است که هر جزء از دیواره سلولی را متصل می‌کند. برخلاف ساختار میکروفیبریلار بتا ۱-۳ گلوکان، در سلول مخمری ساکارومایسس سرویزیه، این پلیمر از نظر ساختار بی‌شکل است، در موقعیت بتا ۱-۶ پیوند خورده است، کوتاه‌تر است و به عنوان یک چسب انعطاف پذیر عمل می‌کند تا پیوندهای عرضی با بتا ۱-۳ گلوکان، کیتین و مانوپروتئین ایجاد کند (۸). چالش اصلی در فرآیند جداسازی گلوکان حذف ناخالصی‌هایی مانند مانوپروتئین‌ها و لیپیدها، بدون از دست دادن مقدار قابل توجهی 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 به عنوان مواد تشکیل دهنده، اما نه به عنوان افزودنی استفاده شود (۷). سازمان ایمنی غذای اروپا (EFSA) نظریه‌ای صادر کرده است که بتاگلوکان مخمر یک ماده غذایی ایمن است که می‌تواند به عنوان یک مکمل غذایی با غلظت حداکثر ۳۷۵ میلی گرم در روز و در مواد غذایی برای مصرف تغذیه‌ای خاص در دوزهای تا ۶۰۰ میلی گرم در روز استفاده شود (۹ و ۱۰). با این حال، این موارد احتمال واکنش‌های نامطلوب ناشی از ناخالصی‌های ناشی از فرآیندهای جداسازی را رد نمی‌کند زیرا در موارد نادر پروتئین‌های انباشته شده می‌توانند باعث آلرژی شوند (۲).

بتاگلوکان جدا شده از ساکارومایسس سرویزیه دارای خواص مفیدی است و کاربردهای بسیار متنوعی در پزشکی انسانی و

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 جدا شده 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 داده شده است. یکی از منابع موجود برای بتاگلوکان، دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه (مخمر نان یا آبجو) است (۳). مخمرها قارچ‌های تک سلولی 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 نه تنها مخمر را برای نانواپی‌ها 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، به عنوان ضایعاتی باقی می‌مانند که تاکنون هیچ کاربرد تجاری برای آن‌ها به جز به عنوان 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٪ پلی ساکارید (الیگوساکاریدهای بتاگلوکان و مانان)، ۳۰-۱۵٪ پروتئین، ۲۰-۵٪ لیپیدها و مقدار کمی کیتین تشکیل شده است (۵). دیواره سلولی مخمر، به ویژه مخمرهای نانواپی و آبجو منبع مهمی از بتاگلوکان است. پلی ساکارید 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: بتا ۱-۳ گلوکان، یک جزء اصلی که بیش از ۵۰-۵۵٪ از دیواره سلولی را شامل می‌شود و بتا ۱-۶ گلوکان که مقدار (۱۵٪) را شامل می‌شود (۶). بتا ۱-۳ گلوکان یک شبکه میکروفیبریلار را در سطح داخلی دیواره سلولی تشکیل می‌دهد که از طریق میکروسکوپ

پیشرفت تومور کمک می‌کند (۱۵). استفاده از بتاگلوکان به همراه باکتری پروبیوتیک *Klebsiella sp. E26*، به عنوان 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 به عنوان اولین مانع در برابر دفاع سلولی در برابر عوامل عفونی در نظر گرفته می‌شوند (۱۷)، این خاصیت به ویژه 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 به شدت بهبود می‌یابند. نمونه‌هایی از استفاده از گلوکان به عنوان 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). در مجموع، می‌توان نتیجه گرفت که بتاگلوکان‌ها از منابع مختلف به‌طور کلی 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 به عنوان 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 به عنوان 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 مورد استفاده قرار گیرد که در آن بتاگلوکان به عنوان عامل تثبیت‌کننده، غلیظ‌کننده و امولسیفایر عمل می‌کند (۲۰). بتاگلوکان همچنین می‌تواند بر روی

دامپزشکی، تقویت سیستم ایمنی، صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی و صنایع شیمیایی و همچنین تولید غذا و خوراک دارد (۱۷ و ۱۸). استفاده از بتاگلوکان فعالیت زیستی و عملکردهای فیزیولوژیکی بالقوه را نشان می‌دهد، همچنین تأثیراتی به عنوان محرک ایمنی، ضدالتهاب، ضد میکروبی، ضد عفونی، ضدویروسی، ضد تومور، کاهش‌دهنده کلسترول، محافظ پرتویی و ترمیم زخم دارد (۱). بتاگلوکان مخمر، با بهبود عملکرد ایمنی روده و افزایش رشد قزل‌آلا، به عنوان 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 بتا-۱-۳ گلوکان از نظر بالینی به عنوان کمکی در درمان سرطان استفاده می‌شوند، و کوردلان (*Curdlan*) مشتق شده از باکتری‌ها به عنوان چسبنده در صنایع غذایی کاربرد پیدا کرده است. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که بتاگلوکان‌ها می‌توانند فعالیت عملکردی ماکروفاژها را افزایش داده و فعالیت ضد میکروبی سلول‌های تک‌هسته‌ای و نوتروفیل‌ها را در شرایط آزمایشگاهی فعال کنند (۷)، این پاسخ ایمنی تقویت شده با افزایش تولید سیتوکین‌های پیش التهابی (*Proinflammatory cytokines*)، 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 (۱۳ و ۱۴). به‌طور خاص، بتاگلوکان به عنوان 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

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 به وسیله 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 استفاده شد.

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 ۲۴ 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 لوله‌آزمایش روی لام نئوبار ریخته شده و لامل به‌آرامی روی آن قرار گرفته و فشار داده شد تا به سطح‌رویی لام بچسبد. در نهایت لام زیر میکروسکوپ نوری گذاشته و تعداد مخمرها شمارش شد.

ج) پیش‌تیمار: 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 ۴۰۰۰g 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 ۲۴ 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 ۴۰۰۰g 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 ۴ 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 ۴۰۰۰g به مدت ۲۵ دقیقه جمع‌آوری و در ۳ برابر آب مقطر معلق شد. پس از اختلاط کامل، سلول‌ها در ۴۰۰۰g به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ترکیبات حاصل برای مرحله بعدی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری می‌شود (۲۴).

و) تیمار/اسیدی: ترکیبات جامد در ۵ برابر اسید استیک (۱/۱۰ مولار) حل شده و در ۸۰ درجه سلسیوس در همزن به مدت ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس گلوله‌ها با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰g به مدت ۲۵ دقیقه جمع‌آوری شد. جامدات به‌دست آمده ۳ بار با آب شسته شد و برای مرحله بعدی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (۲۴).

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 تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۲۵)، اسکن با محدوده طیفی ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ سانتی‌متر محاسبه شد.

یافته‌ها

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

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، مخمرها 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 فضا سازی 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 4000 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.

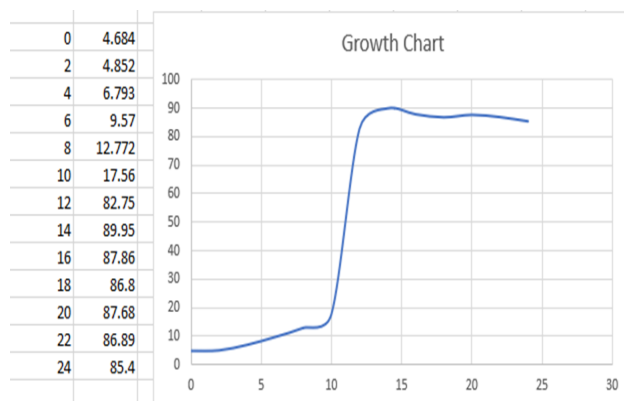
بعد از شمارش تعداد مخمرها و محاسبه غلظت آن‌ها در عرض ۲۴ ساعت، نمودار رشد مخمر ترسیم شد تا الگوی افزایش تجمع سلول‌های زنده را نشان دهد. همچنین، با استفاده از طیف‌سنجی *FTIR*، ترکیب شیمیایی و ساختار پروتئینی مخمر و بتاگلوکان استخراج‌شده تحلیل شد، که حضور پیوندهای مختلف به‌ویژه پیوندهای گلیکوزیدی و هیدروژنی 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.

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

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

در نهایت 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

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

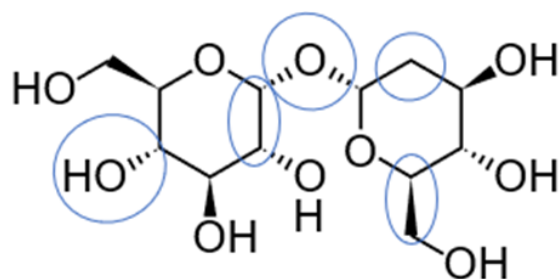
پیک در محدوده 1465 cm^{-1} مربوط به پیوند CH_2

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

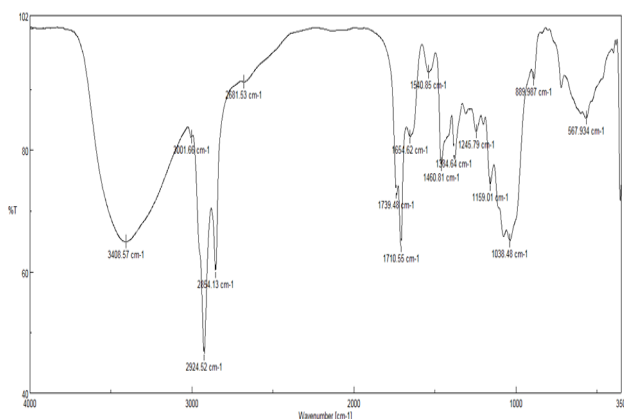
پیک در محدوده $1600-1680\text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند C-C

آلکانها در ترکیبات آروماتیک (حلقوی)

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



شکل ۳: ساختار پلیمرهای قندی.



شکل ۴: طیف FTIR بتاگلوکان استخراج شده.

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

مخمر ساختار پروتئینی (متشکل از آمینواسیدها) و منبع نیتروژن می باشد. به همین دلیل شاهد پیکهایی به شرح زیر مشاهده شد.

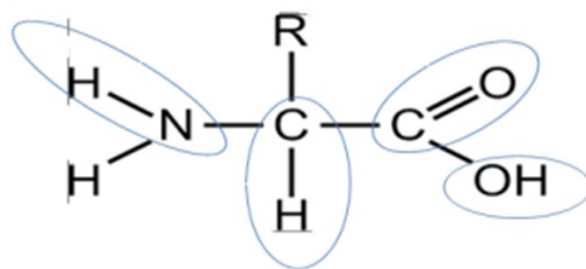
پیک قوی در محدوده $1700-1725\text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند C=O از اسید کربوکسیلیک

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

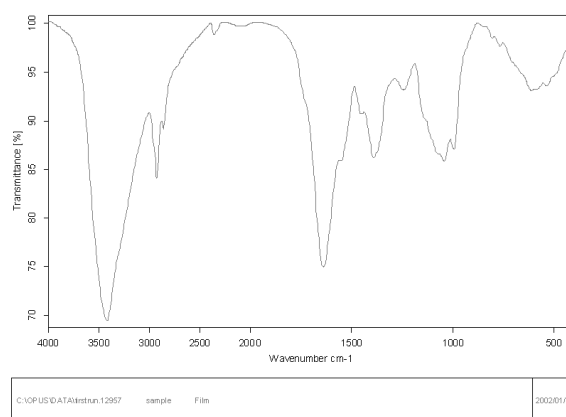
پیک در محدوده 3000 cm^{-1} مربوط به پیوند C-H

پیک در محدوده 3500 cm^{-1} (3400) 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 پلی ساکارید و پلیمر گلوکز است (پیوندهای گلیکوزیدی)

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

کردند (۲۴). احمد و همکاران در تحقیقی دیگر با روش استخراج آنزیمی دست یافتند که بهترین روش استفاده از آنزیم است زیرا نه تنها 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 (۲۶).

نتایج استخراج نشان داد که درصد پروتین اندکی کاهش یافته درحالی که درصد کربوهیدرات در بیومس افزایش یافته 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 درون سلولی تحت تأثیر آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند پروتئینازها، ریبونوکلازها و گلوکانازها تعریف شده است. در طی اتولیز، ساختارهای درون سلولی تخریب می‌شوند، پروتئین‌های قلیایی در سیتوپلاسم آزاد می‌شوند، آنزیم‌ها اجزای پلیمری درون سلولی را هیدرولیز می‌کنند، محصولات هیدرولیز در فضای محدود شده توسط دیواره سلولی و در نهایت منافذ در دیواره سلولی تجمع می‌یابند. چنانچه جرم مولکولی آن‌ها به اندازه کافی کم باشد تا با زیست توده مخمر تازه تلاقی کند، حدود ۷۰ و ۶۹ درصد پروتئین‌ها با اتولیز القایی حذف شده‌اند، درحالی که محتوای کربوهیدرات کل افزایش یافته است (۲۳). در مطالعه لئو و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص شد بهترین شرایط اتولیز، سلول‌های مخمر تنظیم شده به میزان ۱۵٪ (w/v) محتوای جامد و ۵pH در حضور ۳٪ کلرید سدیم به‌عنوان تسریع کننده اتولیز بوده و سپس در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت باز هم زدن 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

شد درحالی که 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. با این حال، بتاگلوکان استخراج شده 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، فرآورده‌های زیادی برای جداسازی و خالص سازی این پلی ساکارید توسعه یافته است. اکثر آن‌ها از تیمار با مواد قلیایی داغ، اسیدها یا ترکیبی از هر دو استفاده می‌کنند که پروتئین‌ها و سایر پلی ساکاریدها را حل می‌کند. باقی مانده نامحلول به‌عنوان "گلوکان مخمر" نامیده می‌شود، اما از نظر شیمی کربوهیدرات‌ها به خوبی معلوم شده است که شرایط اسیدی و قلیایی منجر به تخریب کم و بیش قوی زنجیره‌های گلوکز می‌شود، به‌ویژه اگر اکسیژن در آن دخالت داشته باشد. بنابراین، بازدهی آن‌ها اغلب کم است و در نتیجه قیمت‌های بالایی دارند، یا خلوص گلوکان محدود است (۳). لویی و همکاران با استفاده از اتولیز القایی، آب داغ، همگن سازی، حلال آلی و پروتئینازها 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، راحت تر از بین می‌روند و نسبت سلول‌های شکسته با همگن سازی کمی بیش از ۹۵٪ است. در نتیجه از هم گسیختگی کامل سلول‌های مخمر، خلوص بتاگلوکان‌ها تا ۹۳٪ (w/w) می‌رسد. همچنین در طی این فرآیند، سلول‌های مخمر به‌طور کامل مورد استفاده قرار گرفتند. پنگ کومسری و همکارانش سویه مخمر با محتوای بالای بتاگلوکان را غربالگری و مشخص

اسید را بر اساس وزن کل ذرات گلوکان قبل از بازیابی حذف کند (۲۸-۳۲).

نتیجه گیری

در مقاله حاضر از روش استخراج قلیایی-اسیدی و آب گرم و تلفیق این روش‌ها برای جداسازی بتاگلوکان از دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه استفاده شد. نتایج حاصل از تست FTIR بروی محصول نهایی نشان دهنده وجود ترکیب بتاگلوکان 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 زیست‌شناسی این دانشگاه نهایت تشکر را دارند.

ملاحظات اخلاقی

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

تعارض منافع

وجود ندارد.

مشاهده می‌شود (۲۳). پنگومسری و همکاران گزارش کردند که دیواره سلولی مخمر از اتولیز شامل حدود ۶۰-۶۲٪ پلی‌ساکاریدها و ۱۱-۱۳٪ پروتین است (بیشتر پروتین‌ها به صورت 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 NaOH بود و در ۹۰ درجه سانتی‌گراد در همزن به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. تیمار قلیایی منجر به هیدرولیز و حل شدن مانوپروتین‌های 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 بتا-۶ و ۱ هستند بتا-۳ نیز در حضور محیط قلیایی تشکیل می‌شوند (۲۵).

به‌طورکلی، بتاگلوکان نامحلول در شرایط قلیایی عمدتاً حاوی پیوندهای بتا ۳-۱ با مقدار کمی از بتا ۶-۱ گلوکان است. کل ذرات گلوکان را می‌توان با یک اسید بازیابی کرد تا میزان پیوندهای بتا ۶-۱ را کاهش دهد و در نتیجه 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 بتا ۳-۱ را محدود کنند و به‌طور فراوانی فقط بر روی گلوکان‌های پیوندی بتا ۶-۱ تأثیر بگذارند، جایی که مولکول‌های گلوکان بتا ۶-۱ بزرگ‌ترین کلاس کووالانسی به پروتین‌های دیواره سلولی مرتبط به هم متصل می‌کند (۲۶ و ۲۷). 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

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, Srećec 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, Vrvic 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 from 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.