CC BY

DOR: 20.1001.1.17354226.1400.16.2.6.1

Original paper

Isolation and molecular identification of yeast cells and their evaluation for producing yeast extract and beta glucan

Ranjbar Z, Baserisalehi M *

Department of Microbiology, College of Science, Kazeroun Branch, Islamic Azad University, Kazeroun, Iran

***Corresponding author:** e-mail: majidbaserisalehi682@gmail.com, https://orcid.org/ 0000-0003-2194-4257

Received: 12/25/2021 Accepted:1/15/2022

Abstract

Yeast is a unicellular fungus with thick cell wall and nucleus. Nowadays this microorganism considered as important fungi in commercial industry because of their products specially yeast extract and beta glucan. The purpose of this study was isolation and identification and screening of yeast cells for production of beta glucan and yeast cells. Yeast cells were isolated from plant and dairy samples and destruction of their cell walls was carried out using acidic condition, kiwi extract and change of osmotic pressure methods. In addition, isolation, purification and verification of beta glucan were done by modified acid/alkaline and callose and Proton nuclear magnetic (H_1NMR) methods respectively. The results obtained indicated that yeast cells were isolated from all samples. Two yeast cells based on their sizes and potential of growth were selected for further study. 18SrDNA gene sequencing of isolated strains identified them as *Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae.* Our finding indicated that kiwi extract and change of osmotic pressure were favorable methods ($p \leq 0.05$) for production of yeast extract. Furthermore the results of Callose and H_1NMR methods verified the production and purification of beta glucan. Hence based on our results production of beta glucan in industry scales is possible in our country Iran.

Keywords: Beta glucan, Yeast extract, Yeast cells

مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی مولکولی سلول های مخمر و ارزیابی آنها جهت تولید عصاره مخمر و بتا گلوکان

زهره رنجبر، مجید باصری صالحی*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: majidbaserisalehi682@gmail.com، https://orcid.org/0000-0003-2194-4257

محل انجام تحقیق: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۱۰/۴ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۱۰/۲۵

چکیده

امروزه سلول های مخمر به علت تولیدات مختلف از جمله تولید عصاره مخمر و بتا گلوکان یکی از قارچ های مهم در صنعت محسوب می گردد. هدف از این تحقیق جدا سازی و شناسایی سلول های مخمر و ارایه روش های جدید و عملی جهت تولید صنعتی عصاره مخمر و بتا گلوکان می باشد. در این مطالعه سلول های مخمر از نمونه های میوه، سبزیجات و لبنیات جدا گردید و تخریب دیواره سلولی آنها باروش های استفاده از اسید، عصاره کیوی و تغییر فشار اسمزی انجام گرفت. بعلاوه برای جدا سازی و خالص سازی بتا گلوکان از روش تغییر یافته اسید/قلیا و برای تایید از آزمون های کالوز و Proton (H_1NMR) nuclear magnetic resonanceاستفاده گردید. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که سلول های مخمر از تمامی نمونه ها جدا گردیدند، اگرچه دو جنس مخمر به علت اندازه بزرگ و پتانسیل رشد سریع برای تولید عصاره مخمر و بتا گلوکان مناسب تشخیص داده شد. این دو سلول مخمر بر اساس توالی ژن 18SrDNA *ساکارومیسیس سرویسیه* و *کولورومیسس ماگسیانوس* شناسایی شدند. بعلاوه روش های استفاده از عصاره کیوی و تغییر فشار اسمزی برای تولید عصاره مخمر با $p\leq0.05$مناسب تشخیص داده شد. از طرف دیگر بر اساس نتایج آزمون های کالوز و H_1NMR تولید و خالص سازی بتا گلوکان از دیواره این مخمر ها مورد تایید قرار گرفت که می تواند نویدی برای تولید این محصولات در ابعاد صنعتی در کشور ایران در نظر گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: بتا گلوکان، عصاره مخمر، سلول های مخمر

مقدمه

مخمرها قارچ های تک سلولی می باشند که دارای دیواره سلولی و هسته مشخص می باشند. امروزه سلول های مخمر به علت تولید محصولات مختلف مانند اتانول، دی اکسید کربن، پروتئین‌ها، ویتامین‌هاوترکیبات طعم دهنده بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. علاوه بر تولیدمحصولاتی که به صورت سنتی با استفاده از سلول های مخمر تولید می شوند امروزه تولید عصاره مخمر و بتا گلوکان دیواره مخمر از جمله محصولات مورد توجه در صنعت می باشد. عصاره مخمر ترکیب پایه بسیاری از محصولات غذایی، مکمل های دام و طیور و دارویی است که از نظر اقتصادی اهمیت ویژه ایی دارد. در واقع عصاره مخمر محتویات سلول مخمر است که شامل پروتئین (بخصوص گلوتامیک اسید) و ویتامین‌های گروه B بغیر از B12 می باشد. این ترکیب به عنوان طعم دهنده و در مواقعی بعنوان مواد مغذی محیط های کشت میکروبی مورد استفاده قرار می گیرد (۱).

بتاگلوکان از مکمل‌های غذایی است که نقش درمانی آن امروزه به اثبات رسیده است. در بسیاری از مطالعات که بر روی مدل‌های حیوانی انجام گرفته است به اثرهای قابل

توجه بتاگلوکان‌ها بر جلوگیری از رشد تومور اشاره می-نماید (۲). این ترکیب باعث افزایش عملکرد پدیده فاگوسیتوز و تکثیر فاگوسیت ها- گرانولوسیت‌های تخصصی، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک می شود (۳). همچنین بتا گلوکان می تواند باعث افزایش مقاومت بدن در برابر بیماری های ویروسی، سل، مننژیت و ذات الریه گردد (۴). اگرچه این ترکیب توسط باکتری، کپک و مخمر ها تولید می شود، اما بتا گلوکان دیواره سلولی مخمرها به علت داشتن تعداد زیاد اتصالات بتا ۱ و ۶، بهترین نوع ساختار این ماده آلی در نظر گرفته می‌شود (۵). بطور کلی، ترکیبات دیواره سلولی مخمرها متشکل از بتاگلوکان، پروتئین مانان و کیتین می باشند که بتا گلوکان‌ها و پروتئین مانان در سطح بیرونی دیواره سلولی قرار دارد که باعث شکل دهی به سلول، استحکام و مقاومت در برابر فشارهای اسمزی می گردد (۶). استحکام ساختار دیواره سلولی مخمرها باعث می گردد که با روش-های ساده تخریب نشود، به همین علت محصولاتی که از تخریب دیواره سلولی مخمرها به دست می آید پر هزینه و از نظر تجاری مقرون به صرفه نمی باشد. بنابر این در تحقیق حاضر جهت کاهش هزینه ها و بهینه سازی روش تولید عصاره، دیواره سلولی و بتا گلوکان، سلول های مخمر از منابع گوناگون جدا شده و با استفاده از روش های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی مخمرها

در تحقیق حاضر ۱۲۴ نمونه جمع آوری گردید که ۵۴ نمونه از میوه‌های گوناگون، ۴۶ نمونه از سبزیجات و ۲۴ نمونه از محصولات لبنی بودند. تمامی نمونه ها پس از جمع آوری حداکثر بعد از ۲ ساعت به آزمایشگاه انتقال یافتند و مورد آنالیز میکروبی قرار گرفتند. برای جداسازی مخمرها از محیط سابوراد دکستروز آگار حاوی کلرآمفینیکل (Himedia, India) استفاده گردید. بدین منظور ۵ گرم از نمونه ها در هاون حاوی ۱۰ میلی لیتر نرمال سالین استریل ریخته و پس از هوموژن کردن یک لوپ از سوسپانسیون برداشته و روی محیط سابوراد دکستروز آگار کشت داده و در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. پس از ۱ تا ۳ روز کلنی‌های رشد یافته از نظر فنوتیپی مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت شناسایی جدایه های مخمر پس از مطالعه‌ی ماکروسکوپی کلنی‌ها، مطالعه میکروسکوپی (میکروسکوپ نوری لیتز آلمان) با استفاده از رنگ آمیزی ساده متیلن بلو انجام گرفت. پس از مشاهده سلول های مخمر همراه با جوانه‌ها از نظر اندازه و ریخت شناسی مورد بررسی و اطلاعات ثبت گردید. سپس قابلیت رشد سلول-های مخمر بر روی محیط آگار خونی با استفاده از قندهای ساکاروز، مالتوز، گلوکز و لاکتوز بطور مجزا و همچنین قابلیت رشد بر روی محیط های حاوی کلرید آمونیوم، سولفات آمونیوم و نیترات سدیم مورد ارزیابی قرار گرفت (۷).

تخریب دیواره سلولی مخمر ها با استفاده از روش-های مختلف

جهت تخریب دیواره سلولی در مرحله اول تعداد سلول مخمرهای جدا شده افزایش یافتند. بدین گونه که بر روی محیط های سابوراد دکستروز آگار حاوی کلرامفیکل کشت داده شدند و به مدت سه روز در حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس سلول های رشد کرده به محیط کشت مایع مخمر، پپتون، گلوکز (YPG) (Himedia, India) انتقال یافتند و به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور (۱۵۰ rpm) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سلول‌های مخمری رشد کرده با استفاده از سانتریفیوژ (با دور ۸۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه) رسوب و جمع‌آوری شده و سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند و در نهایت مخمرهای رسوب یافته توزین شده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۸).

تخریب دیواره سلولی با استفاده از اسیدی نمودن محیط

تخریب دیواره سلولی مخمرها با استفاده از pH اسیدی انجام گرفت (۹). برای انجام این آزمون ۴ ارلن حاوی سوسپانسیونی متشکل از ۱۰ میلی لیتر آب و ۲ گرم مخمر تهیه کرده و سپس pH آنها را با استفاده از اسید کلریدریک و سود ۲، ۳، ۴ و ۵ تنظیم گردید. سپس تمام ارلن ها در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده و پس از ۷۲ ساعت تولید عصاره به صورت مایع قهوه ای رنگی در بخش سطحی و دیواره سلولی تخریب شده در ته ارلن

مشاهده گردید. لازم به ذکر است از حجم مایع عصاره مخمر تولید شده، بهترین pH برای تولید این محصول ارزیابی گردید.

تخریب دیواره سلولی با استفاده از عصاره میوه کیوی

جهت تخریب دیواره سلولی مخمرها با استفاده از عصاره میوه کیوی ۲۵۰ گرم کیوی تهیه شد و پس از خرد کردن عصاره هموژن خالص با استفاده از فیلتر واتمن ۱۰ بدست آمد. سپس ۱۰ میلی لیتر عصاره میوه کیوی و ۲ گرم مخمر مخلوط گردید و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده و پس از ۷۲ ساعت تولید عصاره به صورت بخش سطحی به رنگ قهوه ای و سلول های تخریب شده در ته ارلن مورد ارزیابی قرار گرفت.

تخریب دیواره سلولی با استفاده از تغییر فشار اسمزی

جهت تخریب دیواره سلولی مخمرها با استفاده از تغییر فشار اسمزی (Kot et al., 2020) ۲ گرم سلول های مخمر به نسبت ۱ به ۴ با محلول کلرید سدیم ۸٪ و فسفات آمونیوم (۰/۲٪) مخلوط شده و سوسپانسیون یکنواخت تهیه و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز نگهداری شد. سپس دو فاز ایجاد گردید که فاز زیرین دیواره مخمر پاره شده بودند.

لازم به ذکر است که میزان تخریب دیواره سلولی مخمر در روش های مختلف از طریق تعیین نسبت سلول های پاره شده به سلول های سالم پس از رنگ آمیزی محلول و مشاهده میکروسکوپی تعیین گردید. بدین گونه که یک لوپ از محلول در سطح یک سانتی متر مربع اسلاید که قبلا محدوده آن تعیین شده پخش و با استفاده از حرارت تثبیت گردید. سپس با استفاده از رنگ کریستال ویولت به مدت ۳۰ ثانیه رنگ شده و پس از شستن و خشک کردن اسلایدها مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. در این مرحله تعداد سلول های سالم و پاره شده در ۵ میدان میکروسکوپی شمارش شده و پس از تعیین میانگین، نسبت های سلول های پاره شده به سلول های سالم در هر روش تعیین و ثبت گردید. این آزمون برای هر روش با ۴ تکرار انجام شد وسپس با استفاده از نرم افزار اکسل، آزمون آنالیز واریانس یکطرفه با $p< 0.05$ انجام و معنا دار بودن اختلاف داده ها در سه روش بیان شده مورد ارزیابی قرار گرفت. بیشترین نسبت به عنوان بهترین روش جهت تخریب دیواره مخمر محاسبه گردید.

شناسایی مولکولی سویه های مخمر بر اساس ژن 18Sr DNA

واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز در تحقیق حاضر با استفاده از پرایمرعمومی ژن 18SrDNA انجام گرفت. پرایمر رفت و برگشت در جدول ۱ نشان داده شده است. در این آزمون از سویه مخمر ATCC 2366 به عنوان استاندار استفاده گردید.

جدول۱ -پرایمرعمومی ژن 18SrDNA (۱۰).

طول قطعه(bp)	توالی	پرایمر ژن
۵۶۴	*F-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT* *R-GGCACCAGACTTGCCCTC*	18SrDNA

DNA با استفاده از کیت سینا ژن ایران جدا گردید. سپس خلوص DNA با استفاده از طول موج های 260/280 مورد ارزیابی و پس از اطمینان از خلوص و کسب عدد1/9 واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده µl ۱۲/۵ مستر میکس ساخت سینا کلون، ایران (آنزیم دی ان ا پلی مراز در بافر 4 , 3 mM MgCl, 0.08 units/ul mM DATP, 0.4 mM dCTE, 0.4 mM dGTP and 0.4 mM dTTP)، پرایمر رفت و برگشت هر کدام ۱۰ پیکومول، ۲ نانوگرم DNA استخراج شده (برای هر نمونه) و ۶µl آب مقطر استریل (حجم نهاییµl25) انجام گردید. برنامه دمایی مورد استفاده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به صورت: واسرشت اولیه (۹۵C°، 5min یک سیکل)، واسرشت ثانویه (۹۴C°، 30sec)، هم سرشت (۶۰C°، 30sec)، طویل سازی (۷۲C° 7/5min) و طویل سازی نهایی (۷۲C°، ۱۰min) سی و پنج سیکل می باشد.

الکتروفورز

جهت بررسی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژل آگارز (مرک، آلمان) 1/5% تهیه و ۵ µl محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در چاهک ها ریخته و سپس شدت جریان دستگاه را بر روی ۱۴۰ تنظیم گردید. پس از ۳۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ژل داک (سیگما آلدریچ، آمریکا) باندهای ایجاد شده در ژل مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس محصول واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (در حجم ۵۰ ماکرولیتر) جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید و توالی های بدست آمده با استفاده از سایت NCBI بلاست و اطلاعات ثبت گردیدند.

خالص سازی بتاگلوکان با روش تغییر یافته اسید/قلیا

برای خالص سازی بتاگلوکان از دو جنس مخمر که از نظر سرعت رشد و اندازه سلول مناسب بودند و با روش مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند استفاده گردید. برای انجام این آزمون از رسوبات بدست آمده پس از مرحله تولید عصاره مخمر استفاده گردید. بدین گونه که ۵ میلی لیتر عصاره کیوی بر ۵ گرم از رسوباتی که سلول های پاره شده مرحله تولید عصاره مخمر بودند ریخته و در دمای ۴۵ تا ۵۰ سلسیوس قرار گرفتند. پس از ۱۲ ساعت با استفاده از سود ۱ نرمال pH به ۱۰ رسانده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۰ درجه سلسیوس حرارت داده شدند. سپس محلول ها سانتریفوژ (دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰دقیقه) شده ۲ تا ۳ بار با استفاده از آب مقطر استریل شستشو داده و pH رسوب های به دست آمده با استفاده از اسید فسفریک pH را به ۴ رسانده و در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت حرارت داده شد. در مرحله آخر محلول به دست آمده را در بافر سیترات حل کرده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شدند. سپس محلول به دست آمده سانتریفیوژ (دور rpm ۶۰۰۰ به مدت ۱۰دقیقه) و با آون خشک گردید (۱۱).

ارزیابی استخراج و تایید بتاگلوکان

آزمون کالوز

کالوز (callose) در حقیقت نام دیگر بتا ۱ و ۳ گلوکان است. این آزمون برای تأیید وصول ترکیب بتا ۱ و ۳ گلوکان انجام می گیرد. برای انجام آزمون، ۱۰ میلی‌گرم از پودر به دست آمده با ۱۰۰۰ ماکرولیتر اتانل مخلوط و سپس از مخلوط حاصل، ۶۰۰ ماکرولیتر برداشته به ۶۰۰ ماکرولیتر پروکسید سدیم ۱ نرمال افزوده و در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه یکنواخت گردید. سپس ماده همگن حاصل در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و به ۴۰۰ µl از محلول رویی، ۸۰۰ µl آنیلین بلو (Aniline Blue ٪ ۰/۰۵) و ۴۰۰ µl اسید کلریدریک ۱ نرمال و 2 ml بافر ۱ مولار گلایسین/ هیدروکسید سدیم (pH 9) اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتیگراد و 30دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. در انتها در صورت مشاهده رنگ فلوئورسنس وجود بتاگلوکان بیشتر از 5µg/ml مورد تایید قرار می گیرد (۱۲).

طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ای (H_1NMR) جهت تایید بتا گلوکان استخراج شده از سویه های مخمر

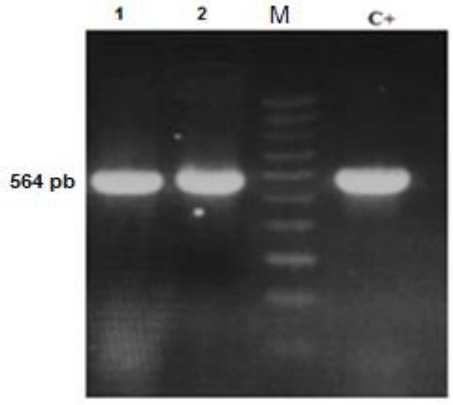
یکی از مهم ترین روش های شناسایی ساختار ترکیبات آلی طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ای است که در این تحقیق برای تایید وجود بتا گلوکان، مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام این آزمون نمونه های استخراج شده به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان فرستاده شد و با دستگاه 500 MHz Brucker Biospin Switzerland فرایند انجام گردید. لازم به ذکر است که اطلاعات به دست آمده از آنالیز نمونه های این تحقیق با بتا گلوکان خالص استاندارد مورد مقایسه و تایید قرار گرفت (۱۳).

نتایج

شناسایی مخمرها و و تعیین ویژگی برخی از آنها

نتایج به دست آمده از جداسازی و شناسایی مخمرها نشان داد که سلول های مخمر از تمامی نمونه ها جدا گردیدند. ارزیابی میکروسکوپی این جدایه ها نشان داد که تمامی آنها دارای اشکال گرد، بیضی، در مواقعی به صورت هایفی کاذب، دارای جوانه و اندازه آنها حدود ۵ تا ۷µm بودند. از نظر پتانسیل رشد و اندازه سلول، دو مخمر دارای ویژگی مناسب برای ادامه مطالعه انتخاب گردید. مطالعه ماکروسکوپی این دو مخمر اندازه کلنی آنها را حدود mm ۲ به رنگ کرمی و دارای قوام آبکی نشان داد. نتایج به

دست آمده از آزمون مولکولی این دو جدایه مخمر را *ساکارومیسیس سرویزیه*[1] و *کلووورومیسس مارکسیانوس*[2] شناسایی نمود که هر دو سویه از نمونه های میوه جدا سازی گردیده بودند (جدول ۲ و شکل ۱). از طرف دیگر یافته های تحقیق نشان داد که دو جدایه مخمر در دمای اولیه ۲۸ درجه سانتیگراد و pH 5 در مدت زمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت به خوبی رشد کردند. بعلاوه رشد مخمر ها بر روی محیط آگار خوندار حاوی گلوکز و سولفات آمونیوم در مقایسه به ترکیبات دیگرافزایش نشان داد که باعث تولید بیومس بیشتر مخمر ها می گردید.



شکل ۱- ژل الکتروفورز محصول واکنش زنجیرهایی پلی مراز ژن 18SrDNA . ۱و۲: جدایه های مخمر،M: مارکر مولکولی استاندار 1 kb. +C:*ساکارومیسیس سرویزیه* ATCC 2366

تولید عصاره مخمر

نتایج به دست آمده از تخریب دیواره سلولی مخمرها با استفاده از روش های مختلف نشان داد که *ساکارومیسیس سرویزیه* و *کلووورومیسس مارکسیانوس* قادر به تولید عصاره مخمر به مقدار زیاد بودند. اگرچه *ساکارومیسیس سرویزیه* بعد از ۲۴ ساعت و *کلووورومیسس مارکسیانوس* بعد ۳۶ ساعت شروع به تولید عصاره نمودند. بیشترین عصاره با استفاده از عصاره کیوی و سپس تغییر فشار اسمزی تولید گردید. نتایج به دست آمده از آزمون آماری آنالیز واریانس داده های به دست آمده از سه روش استفاده از عصاره میوه کیوی، تغییر فشار اسمزی و استفاده از اسید نشان داد که کمترین تخریب دیواره سلولی مخمر مربوط به استفاده از روش اسید و بیشترین مربوط به روش استفاده از میوه کیوی می باشد (جدول ۳). شکل ۳ نشان دهنده اثر عصاره میوه کیوی جهت تخریب دیواره سلولی مخمر و تولید عصاره می باشد. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می گردد در ساعت های اولیه سلول های مخمر به صورت گوس شکل (ghost shape) شدند، سپس سلول ها پاره شده و عصاره مخمر از سلول خارج می گردد که این پدیده در شکل ۲ برای دو روش استفاده از میوه کیوی و تغییر فشار اسمزی نشان داده شده است. همانگونه که دراین شکل مشاهده می گردد عصاره مخمر در سطح محلول و در قسمت پایین سلول های سالم و پاره شده مشاهده می گردد (شکل ۳).

آزمون کالوز

در آزمون کالوز مشاهده رنگ فلورسنس و در آزمون H1NMR مشاهده پیک در ناحیه ۴/۷ نشان دهنده وجود بتا گلوکان در دیواره مخمر های *ساکارومیسیس سرویزیه* و *کلووورومیسس مارکسیانوس* می باشد. شکل های ۴ و ۵ نشان دهنده وجود بتا گلوکان در نتایج به دست آمده از آزمون H1NMR می باشد.

بحث

بطور کل تولید بیومس مخمر می تواند تحت تاثیر فاکتور های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک باشد و بهینه سازی این فاکتورها می تواند مقدار بیومس مخمرها را افزایش داد. مهمترین فاکتور موثر جهت رشد مخمر ها دما است که تغییر آن می تواند باعث افزایش رشد و فعالیت های آنزیم های اتولیز گردد. دومین فاکتور pH ست که بهینه آن به طور معمول ۵ تا ۶ارزیابی می گردد، اگرچه این فاکتور بر اساس جنس و گونه مخمر می تواند متغیر باشد (۱۵،۱۴). از نظر ترکیبات شیمیایی موثر بر رشد سلول های مخمر کلرید آمونیوم و نیترات سدیم به عنوان منبع نیتروژن عموما مورد استفاده قرار می گیرند (۱۶). اگرچه نتایج این تحقیق دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و pH 5 مناسب در نظر گرفته شد. از طرف دیگر محیط آگار خونی حاوی گلوکز و سولفات آمونیوم در مقایسه به ترکیبات دیگردارای قابلیت بیشتری جهت تولید بیومس مخمر ها بودند. از طرف دیگر برای تخریب دیواره سلول

[1] *Saccharomyces cerevisiae*
[2] *Kluyveromyces marxianus*

های مخمر جهت خلوص و دستیابی به ترکیباتی مانند بتا گلوکان، مانان الیگوساکارید و کیتین روش سونیکایشن پیشنهاد می گردد که این روش در اندازه های صنعتی پر هزینه می باشدو نمی تواند به عنوان روشی مطلوب در تجارت محسوب گردد (۱۷). تخریب دیواره سلولی علاوه بر دستیابی به ترکیباتی که عنوان گردید می تواند باعث تولید عصاره مخمر گردد که حاوی مقدار زیادی پروتیین و ویتامین می باشد. بنابر این در صورت ارایه روش های عملی با هزینه کم، این صنعت بسیار مفید و اقتصادی در نظر گرفته می شود. امروزه فعالیت آنزیم های آتولیز در فرایند رشد مخمرها از جمله فاکتور های مهم برای جوانه زدن و افزایش تعداد این سلول ها محسوب می گردد (۱۸).

جدول ۲- شناسایی مولکولی جدایه های مخمر بر اساس ژن 18Sr DNA.

کد سویه	جنس و گونه	٪ تشابه	کد دسترسی
Q2	*Kluyveromyces marxianus* MON-24	۹۸	MT079142.1
E12	*Saccharomyces cerevisiae* NJJUMSS12	۹۹	MH104611.1

جدول ۳ آنالیز آماری داده های مربوط به نسبت سلول های مخمر پاره شده به سلول های سالم.

Anova: Single Factor

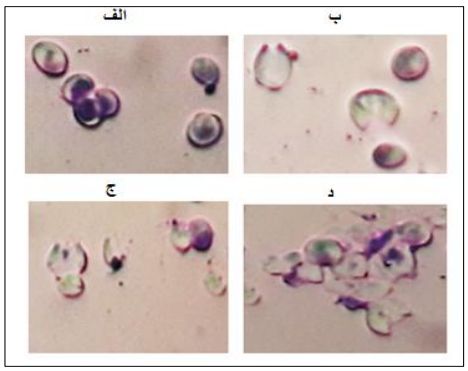
SUMMARY

Variance	*Average*	*Sum*	*Count*	*Groups* *
0.003333	0.25	1	4	AC
0.0025	0.475	1.9	4	OS
0.008333	0.6	2.4	4	Ki

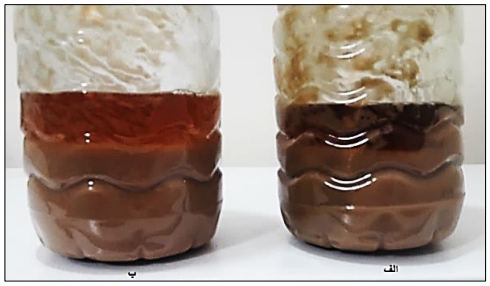
ANOVA

F crit	*P-value*	*F*	*MS*	*df*	*SS*	*Source of Variation*
4.256495	0.000166	26.64706	0.125833	2	0.251667	Between Groups
			0.004722	9	0.0425	Within Groups
				11	0.294167	Total

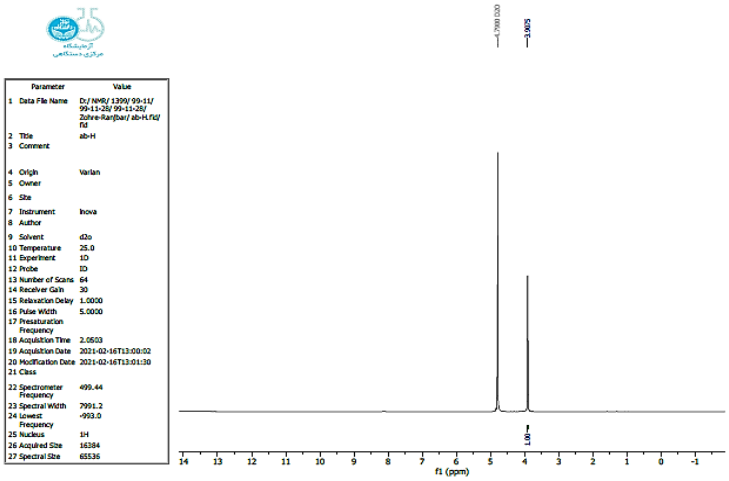
*KI: استفاده از عصاره میوه کیوی،OS: استفاده ازتغییر فشار اسمزی و AC:استفاده از اسید



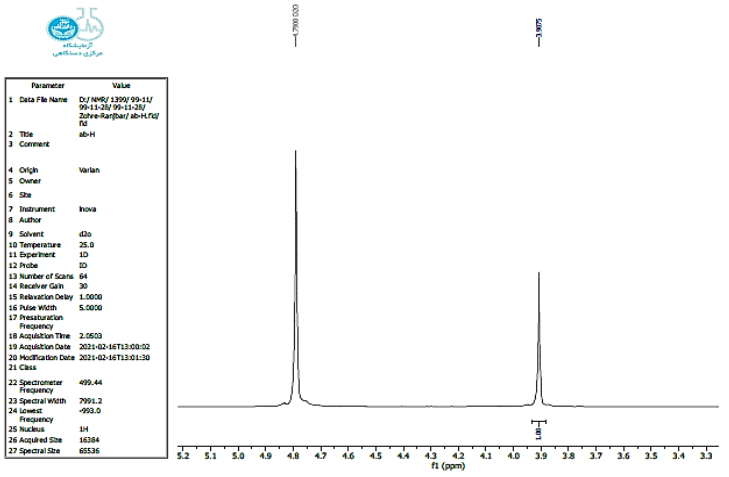
شکل ۲- مراحل پاره شدن سلول های مخمر با استفاده از عصاره کیوی: الف: سلول های *ساکارومیسیس سرویزیه* و گوس شکل، ب ، ج و د: مراحل پاره شدن سلول های *ساکارومیسیس سرویزیه*.



شکل ۳- تولید عصاره مخمر و رسوب سلول های پاره شده *ساکارومیسیس سرویزیه* ، الف- با استفاده از عصاره کیوی و ب- با استفاده از تغییر قشار اسمزی.



شکل ۴- بتا گلوکان تولیدی *Saccharomyces cerevisiae*. پیک ناحیه ۴/۷ در آزمون H1NMR نشان دهنده وجود بتا گلوکان در دیواره مخمر های *ساکارومیسیس سرویزیه*.



شکل ۵- بتاگلوکان تولیدی ***Kluyveromyces marxianus***. پیک ناحیه ۴/۷ در آزمون H1NMR نشان دهنده وجود بتا گلوکان در دیواره مخمر های *کلووروميسس مارکسیانوس* می باشد.

اگرچه فعالیت بیش از حد نیار این آنزیم می تواند باعث تخریب سلول مخمر گردد. بنابر این تحقیق حاضر از روش های گوناگون مانند استفاده از اسید، عصاره میوه کیوی و تغییر فشار اسمزی استفاده شد که نتایج به دست آمده نشان داد که روش استفاده از عصاره میوه کیوی و افزایش دما قادر به تخریب دیواره سلولی مخمر ها به میزان بیشتری می باشد. در تحقیقی که زارعی و همکارانش جهت تولید عصاره مخمر انجام دادند از اتوکلاو استفاده نمودند (۱۹) که به علت استفاده از اتوکلاو (حرارت ۱۱۵ درجه سانتیگراد) می تواند باعث از بین رفتن ترکیبات حساس به حرارت عصاره مخمر (مانند ویتامین ها) گردد. در حالی که در روش های استفاده شده در تحقیق حاضر بدون استفاده از حرارت عصاره مخمر تولید گردید که می تواند تولید محصولی با کیفیت بیشتری شود. احتمالا این نتیجه به علت وجود آنزیم پروتئاز در میوه کیوی و اثر سینرژیست آن بر آنزیم های اتولیز مخمر در ماکزیمم فعالیت آنزیم در دما ۵۰ درجه سانتیگراد است.

از نظر استفاده از سلول مخمر در بسیاری از تحقیقات و مراکز تولید عصاره مخمر در کشور های مختلف از سویه *ساکارومیسیس سرویزیه* استفاده می شود (۲۰). اگرچه نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که علاوه بر *ساکارومیسیس سرویزیه* و *کلوورومیسس مارکسیانوس* می‌تواند به عنوان سویه ایی مناسب جهت تولید عصاره مخمر در نظر گرفته شود.نتایج به دست آمده از آزمون-های کالوز و H1NMR نشان داد که مخمرهای *ساکارومیسیس سرویسیه* و *کولورومیسس ماگسیانوس* قادر به تولید بتا گلوکان بودند. اگرچه باید ذکر گردد که این آزمون ها کیفی است و قادر به تعیین میزان به صورت کمی نمی باشند. از طرف دیگر روند تخلیص سازی بتا گلوکان با استفاده از روش تغییر یافته اسید قلیا مطلوب در نظر گرفته شد. عموما روش اسید قلیا جهت تخلیص سازی بتا گلوکان مستقیما بر روی سلول سالم مخمر انجام می پذیرد (۲۱)، در حالی که در تحقیق حاضر خالص سازی بتا گلوکان در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول با استفاده از روش های گوناگون عصاره مخمر و سلول‌های پاره شده مخمر تولید گردید. سپس با استفاده از اسید و قلیا سعی بر خالص سازی ترکیب بتا گلوکان گردید. بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که روش تغییر یافته اسید قلیا از نظر اقتصادی به علت تولید دو محصول عصاره مخمر و بتا گلوکان در ابعاد صنعتی مقرون به صرفه تر است. همانگونه که عنوان گردید بتا گلوکان دیواره هر دو مخمر در تحقیق حاضر در ناحیه ۴/۷ پیک تشکیل داده‌اند که بر اساس گزارش های موجود در مقاله های گوناگون وجود پیک در ناحیه ۴/۶ تا ۴/۸ در آزمون H1NMR تایید کننده وجود ترکیب بتا گلوکان می باشد (۲۰, ۲۲). در شکل های ۴و ۵ پیک هایی در ناحیه ۳/۹ مشاهده شد که نشان دهنده نا خالصی و به احتمالی مانان الیگو ساکارید متصل به پروتیین می باشد. امروزه اثبات شده است که مصرف روزانه ۳ گرم بتاگلوکان باعث کاهش چربی خون و در نتیجه حفظ سلامتی قلب و عروق می‌شود. این ترکیب با به دام انداختن اسیدهای صفراوی در روده‌ی باریک و دفع آن باعث کاهش کلسترول بد خون می گردد (۲۳, ۲۴). اثرات مفید بتا گلوکان باعث شده است که تولید و خالص سازی آن از نظر بهداشت، سلامتی و اقتصاد بسیار صنعت مفیدی باشد. یافته های این مطالعه نشان داد که استفاده از روش اسید قلیا اگرچه نمی توان خالص سازی صد در صد بتا گلوکان را تضمین نماید اما با بهینه سازی آن می توان درصد خلوص را افزایش داد. البته باید ذکر گردد که تحقیق حاضر به صورت کیفی انجام گرفت، اگرچه در صورت تفکر صنعتی جهت تولید ترکیب بتا گلوکان با استفاده از روش های ارایه شده می توان به صورت کمی روش ها را بهینه نمود تا بتوان به درصد خلوص ۶۰ تا ۸۰ درصد رسید(۲۵). بطور کل مطالعه حاضر نشان داد که بعضی از سویه های مخمر به غیر از *ساکارومیسیس سرویزیه* به علت اندازه سلولی و نیاز های رشد مناسب می تواند به صورت تجاری برای تولید عصاره مخمر و بتا گلوکان مورد استفاده قرار گیرند. از طرف دیگر استفاده از عصاره میوه کیوی در مقایسه با تغییر فشار اسمزی و روند اسیدی باعث تولید عصاره و دیواره سلولی مخمر می گردید که می تواند در اندازه های صنعتی مورد استفاده قرارگیرد. در این تحقیق خالص سازی بتا گلوکان از دیواره مخمر ها با استفاده از روش اسید و قلیا که کم هزینه و عملی می باشد انجام گرفت که در ابعاد صنعتی می تواند مورد استفاده قرار گیرد. بنابر این بتا گلوکان و عصاره مخمر به علت اثرات مفید در آینده تقا ضای زیادی برای مصرف به عنوان پری بیوتیک و مکمل مواد غذایی خواهد داشت که امکان تولید آنها بر اساس روش های

عنوان شده وجود دارد که از نظر اقتصادی کاملا توجیه پذیر است.

تقدیر و تشکر

از همه کسانی که در انجام این تحقیق همکاری کرده اند سپاسگزایم.

منابع مورد استفاده

1. Nikulin, J., Vidgren, V., Krogerus, K., Magalhães, F., Valkeemäki, S., Kangas-Heiska, T., & Gibson, B. 2020. Brewing potential of the wild yeast species Saccharomyces paradoxus. European Food Research and Technology, 246(11), 2283-2297.
2. Choromanska, A., Kulbacka, J., Rembialkowska, N., Pilat, J., Oledzki, R., Harasym, J., & Saczko, J. 2015. Anticancer properties of low molecular weight oat beta-glucan–An in vitro study. International journal of biological macromolecules, 80, 23-28.
3. Samadi Jirdehi, Z., Qajarbeygi, P., & Khaksar, R. 2013. Effect of prebiotic beta-glucan composite on physical, chemical, rheological and sensory properties of set-type low-fat Iranian yogurt. J. Basic. Appl. Sci. Res, 3(9), 205-210.
4. Hetland, G., Ohno, N., Aaberge, I. S., & Løvik, M. 2000. Protective effect of β-glucan against systemic Streptococcus pneumoniae infection in mice. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 27(2), 111-116.
5. Villares, A., Mateo-Vivaracho, L., & Guillamón, E. 2012. Structural features and healthy properties of polysaccharides occurring in mushrooms. Agriculture, 2(4), 452-471.
6. Guggenheim, A. G., Wright, K. M., & Zwickey, H. L. 2014. Immune modulation from five major mushrooms: application to integrative oncology. Integrative Medicine: A Clinician's Journal, 13(1), 32.
7. Pincus, D. H., Orenga, S., & Chatellier, S. 2007. Yeast identification—past, present, and future methods. Medical mycology, 45(2), 97-121.
8. Wang, J., Ding, H., Zheng, F., Li, Y., Liu, C., Niu, C., & Li, Q. 2019. Physiological changes of beer brewer's yeast during serial beer fermentation. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 77(1), 10-20.
9. Kot, A. M., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Błażejak, S., & Kurcz, A. 2020. Comparison of simple and rapid cell wall disruption methods for improving lipid extraction from yeast cells. Journal of Microbiological Methods, 176, 105999.
10. Wang, Y., Tian, R. M., Gao, Z. M., Bougouffa, S., & Qian, P. Y. 2014. Optimal eukaryotic 18S and universal 16S/18S ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis. PloS one, 9(3), e90053.
11. Pérez-Mendoza, D., Rodríguez-Carvajal, M. Á., Romero-Jiménez, L., de Araujo Farias, G., Lloret, J., Gallegos, M. T., & Sanjuán, J. 2015. Novel mixed-linkage β-glucan activated by c-di-GMP in Sinorhizobium meliloti. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(7), E757-E765.
12. Sanmartín, N., Pastor, V., Pastor-Fernández, J., Flors, V., Pozo, M. J., & Sánchez-Bel, P. 2020. Role and mechanisms of callose priming in mycorrhiza-induced resistance. Journal of Experimental Botany, 71(9), 2769-2781.
13. Peymaeei, F., Sadeghi, F., Safari, E., Khorrami, S., Falahati, M., Mohammadi, S. R., & Roudbary, M. 2020. Candida albicans beta-glucan induce anti-cancer activity of mesenchymal stem cells against lung cancer cell line: An in-vitro experimental study. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 21(3), 837.
14. Thomas, K. C., Hynes, S. H., & Ingledew, W. M. 2002. Influence of medium buffering capacity on inhibition of Saccharomyces cerevisiae growth by acetic and lactic acids. Applied and environmental microbiology, 68(4), 1616-1623.
15. Ghorbani, F., & Younesi, H. 2013. The kinetics of ethanol production from cane molasses by Saccharomyces cerevisiae in a batch bioreactor. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 35(11), 1073-1083.
16. Yue, G., Yu, J., Zhang, X., & Tan, T. 2012. The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice. Biomass and Bioenergy, 39, 48-52.
17. Tanguler, H., & Erten, H. 2008. Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature. Food and bioproducts processing, 86(4), 317-321.
18. Jacob, F. F., Striegel, L., Rychlik, M., Hutzler, M., & Methner, F. J. 2019. Spent yeast from brewing processes: a biodiverse starting material for yeast extract production. Fermentation, 5(2), 51.
19. Zarei, O., Dastmalchi, S., & Hamzeh-Mivehroud, M. 2016. A simple and rapid protocol for producing yeast extract from Saccharomyces cerevisiae suitable for preparing bacterial culture media. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 15(4), 907.

20. Dai, Z., Gu, H., Zhang, S., Xin, F., Zhang, W., Dong, W., ... & Jiang, M. 2017. Metabolic construction strategies for direct methanol utilization in Saccharomyces cerevisiae. Bioresource technology, 245, 1407-1412.
21. Utama, G. L., Irena, F., Lembong, E., Kayaputri, I. L., Tensiska, T., & Balia, R. L. 2020. The Utilization of Vegetable and Fruit Wastes for Saccharomyces cerevisieae Cell Wall Based β-Glucan Production with Antioxidant Activity. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 68(1), 119-127.
22. Wangpaiboon, K., Padungros, P., Nakapong, S., Charoenwongpaiboon, T., Rejzek, M., Field, R. A., & Pichyangkura, R. 2018. An α-1, 6-and α-1, 3-linked glucan produced by Leuconostoc citreum ABK-1 alternansucrase with nanoparticle and film-forming properties. Scientific reports, 8(1), 1-10.
23. Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., & Jamnong, P. 2006. β-Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. Food hydrocolloids, 20(1), 68-78.
24. Vetvicka, V., Vannucci, L., Sima, P., & Richter, J. 2019. Beta glucan: supplement or drug? From laboratory to clinical trials. Molecules, 24(7), 1251.
25. Mahmoud Amer, E., Saber, S. H., Abo Markeb, A., Elkhawaga, A. A., Mekhemer, I., Zohri, A. N. A., ... & Abd-Allah, E. A. 2021. Enhancement of β-glucan biological activity using a modified acid-base extraction method from Saccharomyces cerevisiae. Molecules, 26(8), 2113.