بررسی خواص پری‌بیوتیکی پلی ساکارید حاصل از مخمرهای جدا شده از پساب کارخانجات صنایع غذایی

محدثه لاری پور[a*]، محمد گلقران[b]، غزاله فتوحی[c]، علی اخوان سپهی[d]، رضا سمسامی[e]

[a] دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[c] دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد بین المللی کیش، دانشگاه آزاد اسلامی، جزیره کیش، ایران
[d] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[e] دانشیار گروه شیمی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰

چکیده

مقدمه: شیوع روز افزون مشکلات روده و معده، توجه به مصرف مکمل‌های غذایی و پروبیوتیکی را افزایش داده است. هدف از این مطالعه ارزیابی خواص پری بیوتیک پلی ساکارید حاصل از مخمرهای جداشده از پساب کارخانجات صنایع غذایی است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری و خالص‌سازی مخمر از پساب کارخانه مواد غذایی انجام شد. سپس مخمرها به روش مورفولوژی، بیوشیمیایی و میکروسکوپی شناسایی شدند. خصوصیات پری‌بیوتیکی پلی‌ساکارید مخمرها با اینولین مقایسه شد. آنالیز ساختاری با استفاده از تبدیل فوریه مادون قرمز انجام شد و مقاومت آن در برابر هضم اسیدی و آنزیمی، اثربخشی در رشد باکتری‌های پروبیوتیک، ویژگی‌های تکنولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی مورد ارزیابی قرار گرفت و بهترین سویه تولید کننده پری‌بیوتیک، با روش مولکولی PCR شناسایی شد.

یافته‌ها: پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از *Saccharomyces cerevisiae*، *Candida kefyr*، *Geotrichum candidum* مقاومت به هضم قابل مقایسه و حتی بهتر از اینولین را نشان دادند. توانایی نگهداری آب و جذب روغن در پلی‌ساکاریدهای جداشده از *Saccharomyces cerevisiae* (۰/۰۳ ± ۴/۶۴، ۰/۰۳ ± ۱/۸۱)، *Candida kefyr* (۰/۰۳ ± ۴/۵۸، ۰/۰۳ ± ۱/۸۷)، *Geotrichum candidum* (۰/۰۳ ± ۴/۵۲، ۰/۰۳ ± ۱/۹۲) قابل مقایسه و حتی بیشتر از اینولین بوده است. *Saccharomyces cerevisiae* حدود۴۰ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر از دو سویه *Candida kefyr*، *Geotrichum candidum* داشته است. در غلظت‌های مورد مطالعه ارتباط مستقیمی بین غلظت پلی‌ساکارید و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که پلی‌ساکاریدهای جدا شده از مخمر قابلیت پری‌بیوتیکی بهتر از اینولین بامنشا گیاهی را دارند. بنابراین دیواره مخمری نه تنها می‌تواند جایگزین مناسبی برای اینولین با منبع گیاهی باشد، بلکه به حفظ گیاهان نیز کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *اینولین، پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، پلی‌ساکارید، مخمر*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

مقدمه

اولین بار پری بیوتیک‌ها در سال ۱۹۹۵ رایج شدند و این عبارت به موادی اشاره دارد که غیرقابل هضم بوده و به‌طور انتخابی موجب تحریک فعالیت و متابولیسم باکتری‌های مفید می‌شوند. این فرآیند به تشکیل کلونی این باکتری‌ها کمک کرده و در نهایت تعادل میکروفلور دستگاه گوارش میزبان را حفظ می‌کند (Fuller *et al*., 1997). برخلاف پروبیوتیک‌ها که شامل میکروارگانیسم‌های زنده هستند، پری‌بیوتیک‌ها نوعی کربوهیدرات غیرقابل هضم محسوب می‌شوند که رشد باکتری‌های مفید روده را بهبود بخشیده و تأثیر مثبتی بر سلامت میزبان دارند. از جمله انواع مختلف پری‌بیوتیک‌ها می‌توان به فروکتواولیگوساکاریدها، گلوکواولیگوساکاریدها و مانان‌اولیگوساکاریدها اشاره کرد (Cutfield *et al*., 2007). پروبیوتیک‌ها در حقیقت میکروارگانیسم‌هایی هستند در قسمت‌های مختلف بدن (بویژه در روده) به تعداد مناسب که زنده و فعال هستند و با کارایی زیستی خود از طریق حفظ و بهبود توازن میکروبی در روده تاثیر مثبتی روی سلامت میزبان می‌گذارند و تعادل بهتری بر فلور دستگاه گوارش به خصوص به هضم دارند. فیبرها، به تحریک سیستم ایمنی و پیشگیری و درمان اسهال کمک می‌کنند (Liu *et al*., 2018). مکانیسم عمل پروبیوتیک‌ها شامل مهار چسبندگی باکتری‌ها، افزایش عملکرد سد مخاطی، تعدیل سیستم ایمنی ذاتی و تنظیم سیستم عصبی روده‌ای و مرکزی می‌باشد (DeVrese *et al*., 2008). تشخیص پروبیوتیک‌ها از طریق روش‌های میکروب‌شناسی یک امر مشکل است که هزینه و وقت زیادی نیاز دارد. بنابراین گرایش‌های مولکولی اخیراً، راه‌حل مناسبی جهت شناسایی آنها و همینطور میکروب‌های غیر قابل کشت در نمونه‌های روده‌ای شده است که شامل بررسی رشد و مقاومت میکروارگانیسم در اسیدیته و دماهای مختلف و همچنین در برابر ترشحات معده و روده می‌باشد. در کل مخمرهای جدا شده از محیط به عنوان پروبیوتیک، قدرت ماندگاری بیشتری در مراحل تولیدی محصولات پروبیوتیکی دارد و همچنین پروبیوتیک جدا شده از محیط، به دلیل حضور آنها در اکوسیستم طبیعی، سازگاری بیشتر و قدرت پروبیوتیکی بیشتری نیز دارد (Markowiak *et al*., 2017). استفاده از پروبیوتیک‌های بومی در محصولات غذایی این مزیت را دارد که این میکروارگانیسم‌ها در طول زمان با سیستم گوارش سازش پیدا می‌کنند و می‌توانند اثرات بهتر و بیشتری را در بهبود کیفیت حیات میزبان نشان دهند. همچنین مخمرها در مقایسه با گونه‌های باکتری به دلیل ویژگی‌ها و برتری‌هایی که دارند از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند و در فرآیندهای پروبیوتیکی و بهینه‌سازی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. مخمرها موجودات یوکاریوتی تک سلولی هستند و جزء قارچ‌ها می‌باشند. مخمرها تکثیر خود را به روش جوانه زنی انجام می‌دهند، به این صورت که سلول دختر یا کوچکتر روی سلول مادر تشکیل می‌شود. مخمرها در کاربردهای سنتی و قدیمی عمدتاً در تهیه غذاهای تخمیر شده استفاده می‌شدند. در حالی که در کاربردهای مدرن، می‌توان به تولید سوخت‌های الکلی، پروتئین‌های تک سلولی و سایر متابولیت‌های ارزشمند اشاره کرد (Lourens-Hattingh *et al*., 2001). مخمرها به رغم عدم حضور عمومی مانند باکتری‌ها، در محیط‌های طبیعی به‌شکل پراکنده وجود دارند. این سلول‌های تک‌سلولی فاقد کلروفیل و از نوع شیمیوارگانوتروف هستند، به این معنی که برای رشد و توسعه به منابع آلی و کربن تثبیت شده نیاز دارند. به همین دلیل، انتخاب نوع ماده غذایی تأثیر زیادی بر تنوع گونه‌های مخمر در زیستگاه‌های مختلف دارد (Partyka enzymes *et al*., 2012). روده جانوران، سطح گیاهان، خاک و همچنین محصولات غذایی، مناطقی هستند که دارای تنوع بالایی از باکتری‌ها و مخمرها می‌باشند و این موجودات معمولاً به صورت همزیست زندگی می‌کنند. برخی از این میکروارگانیسم‌ها که به عنوان پروبیوتیک‌ها شناخته می‌شوند، علاوه بر اینکه به هضم مواد غذایی پیچیده کمک می‌کنند، قادر به تولید ترکیبات مفیدی همچون ویتامین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که در بهبود گوارش و سلامت کلی میزبان نقش مهمی دارند. سین‌بیوتیک‌ها به ترکیباتی اطلاق می‌شود که به صورت همزمان پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها را شامل می‌شوند. هدف از استفاده همزمان این دو عامل ایجاد هم‌افزایی در تأثیرات مثبت آن‌ها بر سلامت است. فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک از جمله محصولات غذایی با ارزش افزوده محسوب می‌شوند که می‌توانند به بهبود سلامت انسان کمک می‌کند (Holzapfel *et al*., 2001). مخمرها منبع مهم

آنزیم‌های پرکاربرد در صنایع غذایی، کشاورزی و تولید مواد شیمیایی و دارویی هستند. استفاده رو به رشد از مخمرها به عنوان منبع آنزیمی در صنایع شیمی و داروسازی منجر به تولیدات جدیدی مانند حد واسط هایی برای تولید مواد دارویی شده است (Sohail *et al*., 2022). از آنجایی که اثرات سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها ثابت شده و با توجه به شیوع روز افزون مشکلات روده و معده، سرطان‌های از این قبیل در جهان در حال افزایش می‌باشد، اهمیت باکتری‌ها و محصولات پروبیوتیک بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است (Kurtzman *et al*., 1998). هدف از این مطالعه ارزیابی خواص پری یوتیک پلی ساکارید حاصل از مخمرهای جداشده از پساب کارخانجات صنایع غذایی است.

مواد و روش‌ها

- نمونه برداری

از پساب مواد غذایی ۶ کارخانه بنام شرکت قارچ دزفول، خمیر مایه دز، فرآورده‌های گوشتی تکین، مواد پروتئینی و کشتارگاه هدایت، رب گوجه دزفول،روغن ساعی ۳۰نمونه جمع آوری شد. برای کشت۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های $۱۰^{-۴}$ و تعداد کلنی /میلی لیتر $۱۰^{-۵}$ به پلیت (گلوکز۱۰ گرم بر لیتر ،۲۰ گرم بر لیتر ،پپتون۲۰ گرم بر لیتر ، تکمیل شده با ۰/۰۵ ٪ کلرامفنیکل) اضافه و به روش کشت چمنی، کشت داده شد و در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه گردیدوتا جداسازی به صورت تک کلنی این مرحله تکرار شد. سپس نمونه‌های خالص را سانتریفیوژ کرده و پس از رسوب، سوپرناتانت و کل نمونه‌ها هم برای افزایش احتمال جداسازی به صورت مجزا مجدد کشت داده شد (Larypoor *et al*., 2023).

- شناسایی مورفولوژی و تشخیص اولیه جدایه ها

به منظور بررسی کلنی‌ها، رنگ کلنی، شکل کلنی، قوام خامه ای اندازه کلنی، مورفولوژی از بالا، از نیم رخ، رنگ و حالت کلنی بررسی شد تا کلنی مخمرها از کلنی قارچ‌های رشته ای قابل تفکیک باشد.سپس برای تشخیص اولیه مخمر از باکتری، گسترشی از مخمر آماده شد و رنگ آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو انجام شده و با استفاده از روغن ایمرسیون ولنز ۱۰۰ مشاهده‌ی سلول‌های مخمری با جوانه یا بدون جوانه انجام گردید. هر کدام از کلنی‌های متفاوت و خالص با استفاده از روش کشت خطی بر روی محیط‌های پایه مانند عصاره مخمرآگار ، پوتیتو دکستروز اگار ومحیط کشت کورن میل آگار کشت داده شده و کلنی‌های خالص بدست آمد.

- شناسایی بیوشیمیایی و میکروسکوپی

شناسایی گونه کاندیدا با انجام آزمایشات مختلف بیوشیمیایی براساس روش استاندارد ۲۰۲۲CLSI صورت گرفت.

الف) تست جذب وتخمیرقند: کشت تازه مخمر بر روی محیط واجد قند کشت داده شد. ترکیب محیط تخمیر قند فنل رد براث، قند مورد بررسی، اسیدیته محیط در محدوده ۶/۷ تا ۷ تنظیم شد. قندهای مورد استفاده در این بررسی شامل آرابینوز، مالتوز، رافینوز، لاکتوز، مانیتول، زایلوز، گالاکتوز، سوکروز و سلبیوز می‌باشند. محیط کشت به مدت چهل و هشت ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد و نتایج مثبت گزارش شد.

ب) تست جذب ازت: یک کلنی از کشت تازه مخمر برداشته و در محیط حاوی نیترات تلقیح نموده وسپس نمونه‌ها را به مدت دو روز گرماگذاری شدند. ظهور رنگ قرمز پس از افزودن دو معرف، نشانه وجود نیتریت در محیط و مثبت بودن آزمایش بود که گزارش گردید.

ج) تست تولید آسکواسپور: تولید آسکواسپور بالغ به رنگ آبی متمایل به سبز وسلول‌های زایا به رنگ قرمز می‌باشد.

د) تست لوله زایا: کاندیدا در این محیط لوله زایا ایجاد می‌کند که طول آن ۲/۹ برابر قطر سلول مادر می‌شود.

- جداسازی دیواره پلی ساکاریدی مخمر

در این تحقیق از روش سونیکاسیون به منظور تخریب سلول‌های مخمر استفاده شد. ابتدا یک سوسپانسیون از رسوب سلول‌های مخمر که از طریق سانتریفیوژ به دست آمده بود، با استفاده از بافر فسفات سدیم سرد (با غلظت ۰/۱ مولار برابر و با ۲/۷اسیدیته) تهیه گردید. سپس این سوسپانسیون به مدت دو دقیقه با دامنه‌ی ۶۰ درصد در دستگاه سونیکاتور تحت تاثیر قرار گرفت. به‌منظور

جلوگیری از افزایش دمای محلول و پروب سونیکاتور، دستگاه به مدت چهار دقیقه خاموش شد و این فرآیند چندین بار تکرار گردید. ارزیابی میزان تخریب سلول‌های مخمری با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد. پس از اطمینان از تخریب سلول‌ها، سوسپانسیون به مدت یک دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۵۰۰ ×g سانتریفیوژ شد تا سلول‌های سالم از سلول‌های تخریب شده جدا شوند. رسوب به دست آمده به عنوان دیواره سلولی در نظر گرفته شد و سپس با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون درآمد. این سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۰۰۰ ×g سانتریفیوژ شد. فرآیند شستشوی دیواره سلولی سه بار تکرار گردید و نهایتاً رسوب حاصل به روش لیوفیلیزه شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای تهیه بافر لیزکننده فسفات سدیم ۰/۱ مولار، ابتدا ۰/۰۷۱۶ گرم از $Na_2HPO_4.7H_2O$ و ۰/۰۲۸۵ گرم از $Na_2H_2PO_4.2H_2O$ وزن شده و در یک لیتر آب مقطر حل شده و سپس اتوکلاو گردید. این مراحل به دقت انجام شد تا اطمینان حاصل شود که شرایط لازم برای تخریب سلول‌ها فراهم شده است و دیواره‌های سلولی با کیفیت مطلوبی به دست می‌آیند (Nasiri Paruje *et al.*, 2021).

- تهیه سوش استاندارد پروبیوتیک

باکتری *لاکتوباسیلوس کازیی* IBRC-M 10711 *Lactobacillus casei* به عنوان سوش استاندارد پروبیوتیک از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد.

- شناسایی پلی ساکارید با روش فوریه مادون قرمز (FTIR)

ساختار پلی‌ساکارید استخراج شده با استفاده از دستگاه تبدیل فوریه مادون قرمز شناسایی شد. طیف تبدیل فوریه مادون قرمز از ۴۰۰۰ تا m^{-1} ۶۵۰ با قدرت تفکیک cm^{-1} ۱ با استفاده از اسپکترومترساخت شرکت Bruker مجهز به سیستم ATR ثبت شد. به منظور بررسی مقاومت به هضم پلی ساکاریدها، بر اساس روش‌های ژان و همکاران شیره معده شبیه سازی وتهیه شد. (Adt, *et al.*, 2006) و در همان زمان اینولین تجاری با پلی ساکارید استخراج شده به عنوان یک پری بیوتیک شاخص مقایسه شد. برای شبیه سازی کلرید سدیم معده و مخلوط هیدروکلرایداسید به نسبت مشخص استفاده شد واسیدیته آن به ۰/۵± ۲ /۱ تنظیم می شد (بافر۱) برای شبیه سازی شرایط روده از پتاسیم دی هیدروژن فسفات و سود به نسبت‌های مشخص و اسیدیته آن به ۷/۴رسانده شد (بافر۲) برای شبیه سازی مخلوط معده و روده از بافرهای ۱ و ۲ به نسبت ۳۹:۶۱ مخلوط شده و اسیدیته آن به ۴/۵ تنظیم شد. پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از مخمر و اینولین به بافرهای مشخص شده اضافه شده و در انکوباتور شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از یک ساعت، سانتریفیوژ انجام شد و بافر رویی برای ارزیابی غلظت قندهای آزاد نمونه برداری شد. میزان قند آزاد با استفاده از روش دی نیتروسالسیلیک اسید (DNS) اندازه گیری شد و درجه هیدرولیز بر اساس نسبت قند آزاد آزاد شده نسبت به محتوای قند کل محاسبه شد. در مرحله سوم هضم، آنزیم آلفا آمیلاز به بافر ۳ وارد شد و مقاومت آن در برابر هیدرولیز آنزیمی پس از آن مورد ارزیابی قرار گرفت.در مرحله سوم هضم به بافر 3آنزیم آلفا آمیلاز اضافه شد و مقاومت آن به هیدرولیز آنزیمی نیز ارزیابی گردید. (Mohammadi Afshar *et al.*, 2024)

- اثر پلی‌ساکارید استخراج شده بر رشد باکتری پروبیوتیک

باکتری *لاکتو باسیلوس کازئی* *Lactobacillus casei* IBRC-M 10711 به عنوان سوش استاندارد پروبیوتیک از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. فعال سازی میکروب مذکور دو بار در محیط یست اکسترکت آگارانجام گرفت. محیط پایه برای اضافه کردن ترکیب پروبیوتیک محیط یست اکسترکت آگار بدون قند انتخاب شد و اجزا تشکیل دهنده محیط مذکور باهم ترکیب شدند. سپس برای بررسی رشد باکتری در حضور ترکیب پری بیوتیک به محیط مورد نظر به نسبت (وزنی/حجمی ۲٪) پلی ساکارید استخراج شده از مخمر اضافه شد.به منظور مقایسه رشد باکتری پروبیوتیک در حضور پلی ساکارید جدا شده از مخمر محیط‌های شامل ۲٪ گلوکز و ۲٪ اینولین به عنوان پری بیوتیک تجاری شاخص تهیه شد. باکتری فعال شده به نسبت (۲٪ حجمی/حجمی) به محیط‌های مذکور

اضافه گردید. از محیط های مذکور در زمان‌های ۰, ۲۴ , ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه برداری شده و طبق روش مایلز- میسرا در سال ۱۹۳۸ کشت و شمارش انجام شد. اسیدیته نمونه‌ها نیز در زمان‌های مذکور اندازه گیری شدند. برای بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج شده از جدایه ۱ (*Saccharomyces cerevisiae*)، جدایه ۲ (*Candida kefyr*)، جدایه ۳ (*Geotrichum candidum*) شبیه سازی شیره‌های گوارشی در سه مرحله انجام شد. درصد هیدرولیز پلی ساکارید استخراج شده از این سه سویه، همراه با اینولین به عنوان یک پری بیوتیک تجاری استاندارد، در طی سه مرحله هضم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

- بررسی خصوصیات زیست فناوری

ظرفیت نگه‌داری آب (WHC) و ظرفیت جذب چربی (LAC) پلی‌ساکارید استخراج شده از مخمر و نیز اینولین به عنوان پری بیوتیک شاخص، طبق روش کاروال هو و همکاران در سال ۲۰۰۹ اندازه گیری شد. در این روش برای اندازه‌گیری ظرفیت نگه داری آب، ۳۰ میلی لیتر آب مقطر به ۱ گرم نمونه اضافه شده و خوب هم زده شد. مخلوط مورد نظر ۱ ساعت در دمای اتاق نگه داری و سپس در گرم ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته و باقیمانده وزن شد. ظرفیت نگه داری آب به صورت نسبت وزن آب به وزن نمونه گزارش شد. با اندازه گیری ظرفیت جذب چربی، ۳ گرم از نمونه را با ۱۸ میلی لیتر روغن آفتابگردان مخلوط کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار دادند. سپس مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰ ×g سانتریفیوژ شد و پس از آن روغن اضافی دور ریخته شد. باقی مانده پس از آن وزن شد. ظرفیت جذب چربی به عنوان نسبت وزن روغن به وزن نمونه گزارش گردید. ترکیباتی که قابلیت بالایی در نگهداری آب دارند، می‌توانند با افزایش گرانروی توده غذایی در دستگاه گوارش، حجم مدفوع و تعداد دفعات دفع را افزایش دهند و بدین ترتیب به کاهش سرعت جذب مواد غذایی کمک کنند. این ویژگی در کنترل وزن و بهبود وضعیت سلامتی، به ویژه در پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی و دیابت، مؤثر است. ظرفیت جذب روغن به توانایی شبکه پلی‌ساکارید در جذب روغن بستگی دارد. ترکیباتی که توانایی بالایی در جذب روغن دارند و از نظر خواص زیست‌فناوری مناسب هستند، می‌توانند در پایداری بافت امولسیون‌های پرچرب مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، از نظر فیزیولوژیکی، به دلیل توانایی در جذب چربی، می‌توانند به کاهش جذب چربی‌های غذایی به خون کمک کنند. در واقع، یکی از مکانیسم‌های مؤثر فیبرها در کاهش چربی خون، کنترل وزن و بهبود وضعیت سلامتی، به خاطر قابلیت‌های آن‌ها در جذب آب و چربی است. با توجه به ویژگی جذب چربی و آب مطلوب پلی‌ساکاریدهای جدا شده از مخمرها و هم چنین اثبات خصوصیت پری بیوتیکی آن در بخش قبل می‌تواند گزینه مناسبی به عنوان یک پلی‌ساکارید زیست فعال و قابل رقابت با اینولین برای کاربردهای زیست فناوری در مواد غذایی و یا حتی دارویی باشد.

- بررسی خصوصیت آنتی اکسیدانی

برای بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج‌شده از مخمر،۰/۲ گرم از این پلی‌ساکارید با ۵ میلی‌لیتر متانول ترکیب و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور همزن‌دار به‌طور مداوم هم زده شد. سپس نمونه g۳۰۰۰ × به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی به‌دست‌آمده برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از مخمر با اینولین به‌عنوان پری بیوتیک استاندارد، درشرایط مشابهی برای اینولین بررسی شد. همچنین، به‌عنوان کنترل مثبت، از محلول ۱۰۰۰ میکرومولار اسید اسکوربیک استفاده شد. برای بررسی تأثیر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید استخراج‌شده از مخمر، محدوده غلظتی ۰/۰۴ تا ۰/۰۵ گرم بر میلی‌لیتر نمونه تهیه و سپس مراحل هم‌زدن و سانتریفیوژ کردن مشابه قبل انجام گرفت. برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، از روش سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش رادیکال DPPH استفاده گردید.

برای انجام این آزمایش، ۵۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی به سرعت به ۵ میلی لیتر محلول متانولی با غلظت ۰,۱ میلی مولار اضافه شد و به خوبی مخلوط شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در محیط تاریک نگهداری شد و سپس جذب آن در طول موج ۵۱۷

نانومتر اندازه گیری شد. همچنین میزان جذب محلول متانولی خود در طول موج ۵۱۷ نانومتر برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی مشاهده و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Baliyan *et al.*, 2022).

$$\text{Scavenging activity\%} = (Abs_{blank} - Abs_{sample}) / Abs_{blank} \times ۱۰۰$$

Abs_{blank}: جذب محلول متانولی بدون نمونه پلی ساکاریدی رزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش رادیکال (DPPH)

Abs_{sample}: جذب محلول متانولی با نمونه پلی‌ساکاریدی رزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش رادیکال

- شناسایی مولکولی

پس از خالص‌سازی مخمر و انجام آزمایشات زیستی تعداد حداقل ۵ سویه مخمری، دو سویه از بهترین مخمرها از نظر فعالیت زیستی به صورت ژنتیکی شناسایی و معرفی شد. برای شناسایی مخمر جداسازی شده، پرایمرهای ITS1 و ITS4 با توالی‌هایی که در جدول ۱ آمده است برای تکثیر ژن ۱۸ S rRNA مخمر استفاده گردید. این پرایمرها از شرکت تکاپوزیست تهیه شدند. از روش واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR -) کلنی برای تکثیر قطعه مورد نظر استفاده شد. برای شناسایی از جفت پرایمرهای NL1 و NL4 به منظور تکثیر ناحیه D1/D2 و از جفت پرایمرهای ITS1 و ITS4 برای تکثیر قسمت انتهای ژن زیرواحد کوچک ریبوزومی ۱۸S، ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده درونی (ITS1)، ژن ریبوزومی ۵/۸S، ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده درونی (ITS4) و قسمت ابتدایی ژن زیرواحد بزرگ ریبوزومی (S ۲۶/۲۸) استفاده گردید. توالی این پرایمرها از شرکت سیناژن گرفته شد.

یافته‌ها

۳۰ نمونه از پساب مواد غذایی از ۶ کارخانه بنام شرکت قارچ دزفول، خمیر مایه دز، فرآورده‌های گوشتی تکین، مواد پروتئینی و کشتارگاه هدایت، رب گوجه دزفول،روغن ساعی جمع‌آوری شد. مشخصات نمونه‌ها شامل مکان نمونه برداری، اسیدیته و شماره نمونه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

- جداسازی مخمرها

شکل یک تصاویر مخمرهای جداسازی شده با روش اسپرید پلیت بر روی محیط یست اکسترکت گلوکز کلرامفنیکل آگار و بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌های مخمری و پس از۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری ، تعیین ویژگی‌های کلنی که در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد ، ظاهر کلنی ازنظر برجستگی، قوام، رنگ و حاشیه با استریومیکروسکوپ بررسی شد و همچنی تعداد مخمرهای جداسازی شده در این کار تحقیقاتی حدود ۲۵ سویه مخمری بود که در جدول شماره ۳ آمده است.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژنتیکی

Table 1- Specifications of primers used for genetic identification

Primer name	sequence Primer	Nucleotide	Melting point (℃)	Reference
NL1	5′-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3′	18	70–50	
NL4	5′-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3′	22	70–50	(Hesham *et al.*,2014)
ITS1	5′-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3′	19	63	
ITS4	5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′	20	1.54	(Morshed *et al.*, 2017)

جدول ۲- مشخصات نمونه‌های جمع آوری شده از پساب مواد غذایی

Table 2- Characteristics of samples collected from food waste

pH	Sample number	Sampling location
7	5–1	Dezful Mushroom Company
8	10–6	Dez Yeast Paste
9	15–11	Takin Meat Products
6	20–16	Hedayat Protein Materials and Slaughterhouse
6	25–21	Dezful Tomato Paste
9	30–26	Saei Oil

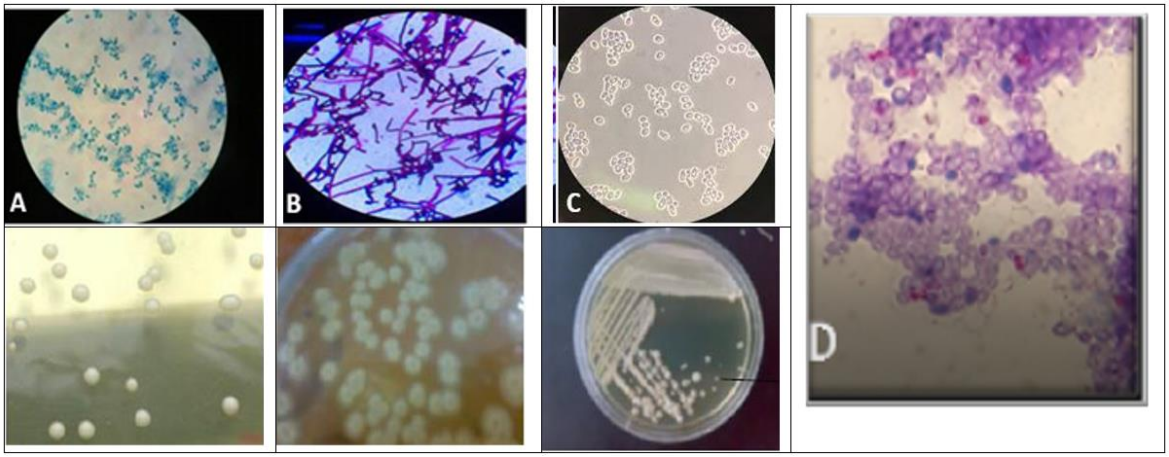

Figure 1- Identified yeasts Identification by macroscopic and microscopic methods Isolated yeasts. A: *Candida kefyr, B: Geotrichum candidum*, C: *Saccharomyces cerevisiae* D Result of red ascospore test from food factory effluent

شکل۱- مخمرهای شناسایی شده شناسایی با روش‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی

مخمرهای جداسازی شده. A: *Candida kefyr*، B: *Geotrichum candidum*، C: *Saccharomyces cerevisiea* D نتیجه تست آسکوسپوربه رنگ قرمز از پساب کارخانه مواد غذایی

جدول ۳- خصوصیات مورفولوژی مخمرها

Table 3- Morphological characteristics of yeasts

l Number of strains	Microscopic shape	Fermentative material	Identified isolates
8	Round and sometimes with sprouts	Yeast/Yogurt	001
10	Oval and filamentous	Proteinaceous materials	002
7	Oval or cylindrical	mushroom/yeast	003

- شناسایی مخمرها

نتایج شناسایی سه جدایه از مخمرها به روش‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی انجام شد و نتایج بیوشیمیاییآن در جدول شماره ۴ دیده می‌شود.

- شناسایی خصوصیات ساختاری پلی ساکاریدی استخراج شده با روش تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

روش تبدیل فوریه مادون قرمز معمولا در پلی‌ساکاریدها برای بررسی نوع پیوندهای گلیکوزیدی، نوع مونوساکاریدها و گروه های عاملی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Curk *et al.*, 1998). نتایج باندهای مشاهده شده در ۱۰۲۳، ۱۰۸۰ و ۱۱۵۲cm^{-1} مرتبط با پیوندهای C-C و C-O می‌باشند. باند مشاهده شده در ۲۹۲۳ cm^{-1} مربوط به پیوند C-H بوده که این باند به عنوان باند شاخص را نشان می‌دهد. وجود باندهای ۱۳۷۲، ۱۲۴۱ و ۱۴۱۹cm^{-1} مربوط به پیوندهای C-H، COH و C-O-C می‌باشد. وجود باند در ناحیه ۸۵۷ و ۹۲۶ cm^{-1} مبین وجود پیوندهای آلفا و بتا در فرم پیرانوزی نشان دهنده قندهاست. باند مشاهده شده در ناحیه ۷۶۳ cm^{-1} مربوط به حضور دی زایلور است. مشاهده باندهای شاخص در ناحیه ۳۳۸۷، ۳۳۹۱ و ۳۳۰۰ cm^{-1} وجود پلی‌ساکارید به عنوان ترکیب اصلی و غالب به ترتیب در *ساکارومایسس سرویزیه*، *ژئوتریکوم کاندیدوم* و *کاندیدا کفیر* استخراج شده است.که در شکل۲ نشان داده شده است.

- مقاومت به هضم اسیدی وآنزیمی پلی‌ساکارید استخراج شده

شبیه‌سازی شیره‌های گوارشی در سه مرحله انجام گرفت. درصد هیدرولیز محاسبه شده برای پلی‌ساکارید استخراج شده از این سه سویه و اینولین به عنوان پریبیوتیک شاخص تجاری در سه مرحله هضم در شکل۳ نشان داده شده است. درصد هیدرولیز پلی‌ساکارید استخراج شده از مخمرها در مرحله اول هضم یعنی در معده بسیار کمتر از اینولین بوده و در سطح ۱٪ با هم اختلاف معنی‌دار دارند. ($P<۰/۰۱$) در مرحله دوم یعنی مخلوط معده و روده و در مرحله سوم یعنی روده و در حضور آنزیم آلفا آمیلاز درصد هیدرولیز هر دو نمونه (پلی‌ساکارید استخراج شده از

مخمرهای شناسایی شده و اینولین) بسیار ناچیز بوده تقریباً مشابه همدیگر بوده‌اند. نتایج این بخش نشان می‌دهد پلی‌ساکارید جدا شده از مخمرها در مقایسه با اینولین بسیار مقاوم‌تر بوده به طوری که تقریبا بیش از ۸۵ درصد آن هیدرولیز نشده باقی می‌ماند.

- اثر پلی‌ساکارید استخراج شده از مخمرها بر رشد باکتری پروبیوتیک

نتایج بدست آمده از شمارش مخمر پروبیوتیک نشان داد، پلی‌ساکارید استخراج شده اثر تحریک کننده بر رشد باکتری داشته است به طوری که جمعیت آن پس از ۲۴ ساعت افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است. از طرفی قابلیت زنده ماندن میکروب تا ۷۲ ساعت مطالعه شده افزایش یافته است در حالی که جمعیت باکتری در محیط حاوی گلوکز پس از ۲۴ ساعت کاهش شدیدی نشان داده است. علاوه بر این، رفتار باکتری در محیط حاوی پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از سویه‌های مخمر ، بهبود بقا را در مقایسه با آنچه در محیط حاوی اینولین، (پری بیوتیک تجاری) مشاهده می‌شود، نشان داد.نتایج مقایسه شده در شکل ۴ نشان داده است.

جدول ٤- تست‌های بیوشیمیایی مخمرهای شناسایی شده

Table 4 - Biochemical tests of identified yeasts

isolated	Growth at 25°C	Urease	ascospore	Acetic acid	Assimilation							Fermentation						
					KNO_3	Lactose	Fructose	Trehalose	Galactose	Sucrose	Glucose	Lactose	Fructose	Trehalose	Galactose	Sucrose	Glucose
001	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
002	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
003	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+

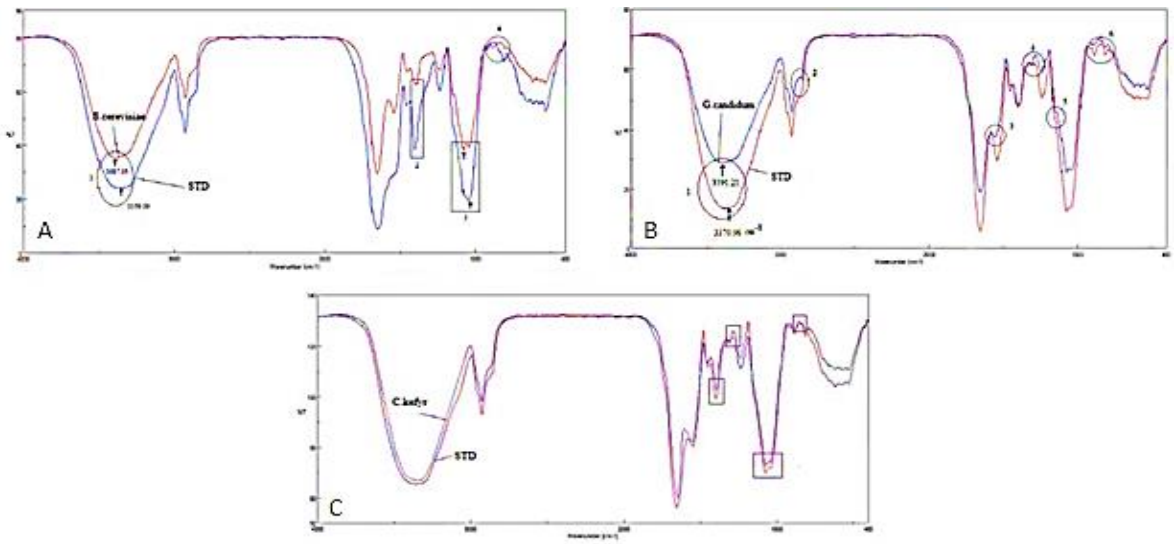

Figure 2- A Fourier transform infrared spectrum of polysaccharide extracted from *Saccharomyces cerevisiae*/B Fourier transform infrared spectrum of polysaccharide extracted from *Geotrichum candidum*/C Fourier transform infrared spectrum of polysaccharide extracted *from Candida kefyr* Results of investigation of resistance to acid and enzymatic digestion of extracted polysaccharide.

شکل ۲- A طیف تبدیل فوریه مادون قرمز پلی‌ساکارید استخراج شده از *Saccharomyces cerevisiae*/ *B* طیف تبدیل فوریه مادون قرمز پلی‌ساکارید استخراج شده از *Geotrichum candidum C* /طیف تبدیل فوریه مادون قرمز پلی‌ساکارید استخراج شده از *Candida kefyr*.

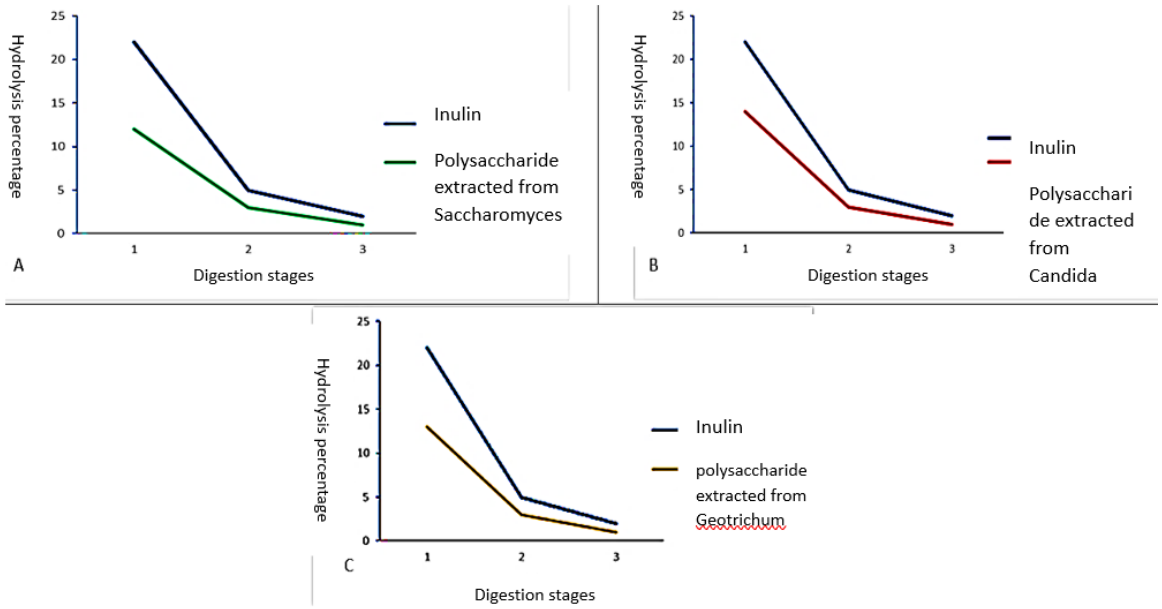

Figure 3-A. Investigation of the resistance to digestion of polysaccharides extracted from *Saccharomyces cerevisiae* B / Investigation of the resistance to digestion of polysaccharides extracted from Candida kefyr / C. Investigation of the resistance to digestion of polysaccharides extracted from *Geotrichum candidum*.

شکل ۳–A. بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج شده از *Saccharomyces cerevisiae* B / بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج شده از *Candida kefyr* / C. بررسی مقاومت به هضم پلی‌ساکارید استخراج شده از *Geotrichum candidum*.

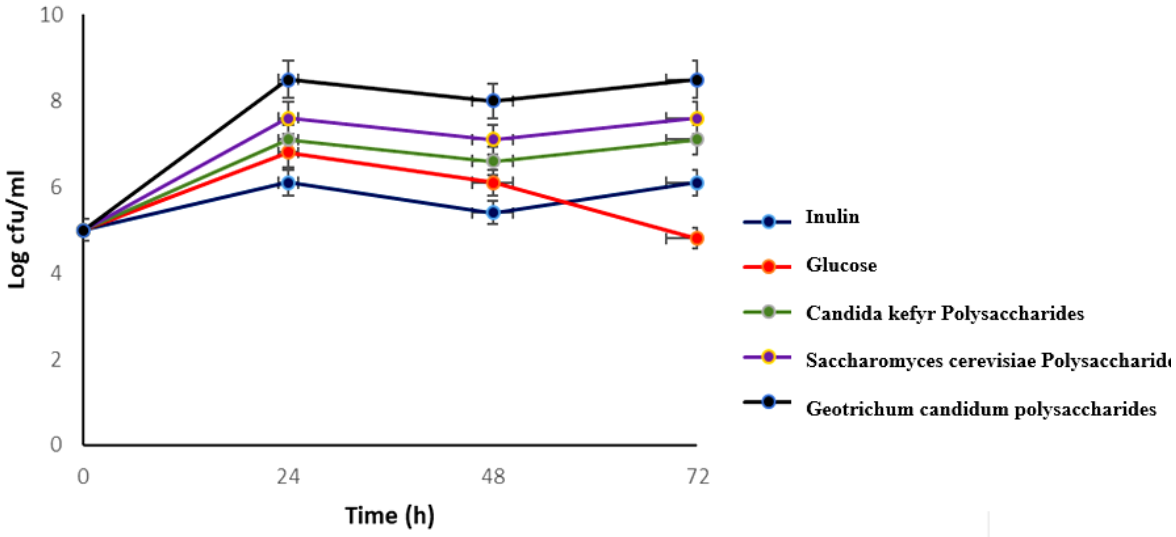

Figure 4 - Growth curve of *Lactobacillus casei* in the presence of identified yeast polysaccharides compared to inulin and glucose (study medium: yeast extract agar without sugar and 2% inulin, without sugar and 2% polysaccharides isolated from yeasts, yeast extract agar without sugar and 2% glucose.

شکل ٤ – منحنی رشد *لاکتو باسیلوس کازئی* در مجاورت پلی‌ساکارید مخمرهای شناسایی شده در مقایسه با اینولین و گلوکز (محیط مورد مطالعه *yeast extract agar* بدون قند و ۲٪ اینولین، بدون قند و ۲٪ پلی‌ساکاریدهای جدا شده از مخمرها *yeast extract agar* بدون قند و ۲٪گلوکز).

- اسیدیته

نتایج مربوط به کاهش اسیدیته محیط‌های مورد بررسی در شکل ۵ نشان می‌دهد،که اسیدیته هر سه محیط با هم اختلاف معنی داری دارند که با توجه به کاهش بسیار شدید اسیدیته در محیط حاوی گلوکز و جمعیت بالای باکتری پروبیوتیک در محیط های حاوی اینولین و پلی ساکاریدهای مخمرها احتمالا حاکی از طی مسیرهای متابولیکی متفاوت به وسیله میکروارگانیسم در سه محیط مورد بررسی می‌باشد. نتایج این بخش به همراه نتایج بخش مقاومت به هضم، قابلیت پری بیوتیکی پلی ساکاریدهای مخمرها را اثبات می‌کنند.

- خصوصیات زیست فناوری پلی‌ساکاریدها

برای بررسی قابلیت کاربرد زیست فناوری پلی‌ساکاریدهای جدا شده از جدایه ۱(*Saccharomyces cerevisiae*)، جدایه ۲ (*Candida kefyr*)، جدایه ۳ (*Geotrichum candidum*) در بافت های تغذیه ای و اثر آن بر پایداری خصوصیت توانایی نگهداری آب(WHC) و توانایی جذب روغن (LAC) در بافت اندازه گیری شد. نتایج مربوط به LAC و WHC پلی‌ساکاریدهای جدا شده از این مخمرها بر اساس داده‌ها ی میانگین حاصل از سه تکرارمی باشد، که مقایسه آن با اینولین در جدول ۵ نشان داده شده است. همان‌طور که دیده می‌شود، توانایی نگهداری آب در پلی‌ساکاریدهای مخمر به‌مراتب بیشتر از اینولین است و این تفاوت در سطح ۱ درصد به‌طور معناداری قابل‌توجه است. ویژگی بافتی توانایی نگهداری آب (WHC) به قابلیت شبکه پلی‌ساکاریدی برای جذب و حفظ آب اشاره دارد. این خصوصیت از جنبه‌های زیست‌فناوری و فیزیولوژی اهمیت بسزایی دارد.

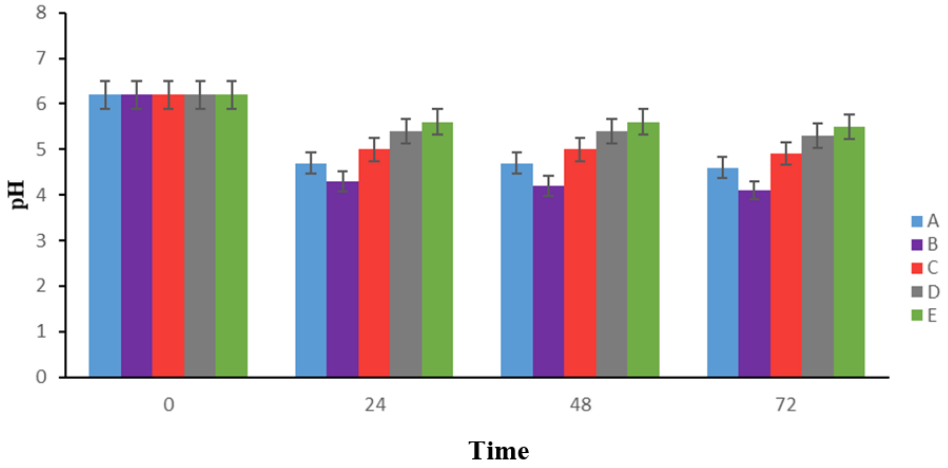

Figure 5- Results related to the reduction of acidity of the studied media. A: Yeast extract agar medium without sugar and 2% inulin, B: Yeast extract agar medium without sugar and 2% glucose, C: Yeast extract agar medium without sugar and 2% polysaccharide isolated from Candida, D: Yeast extract agar medium without sugar and 2% polysaccharide isolated from Saccharomyces, E: Yeast extract agar medium without sugar and 2% polysaccharide isolated from Geotrichum. (Data are the average of three replicates).

شکل۵- اسیدیته محیط‌های مورد بررسی.A: محیط yeast extract agar بدون قند و ۲٪ اینولین، B: محیط yeast extract agar بدون قند و ۲٪ گلوکز، C: محیط yeast extract agar بدون قند و ۲٪ پلی‌ساکارید جدا شده از کاندیدا، D: محیط yeast extract agar بدون قند۲٪ پلی‌ساکارید جدا شده از ساکارومایسس، E: محیط yeast extract agar بدون قند و ۲٪ پلی‌ساکارید جدا شده از ژئوتریکوم. (داده‌ها حاصل از میانگین سه تکرار می‌باشد).

جدول۵- اندازه گیری خصوصیات تکنولوژیکی و فیزیولوژیکی پلی‌ساکاریدهای جدا شده از مخمرها

Table 5-Measurement of technological and physiological properties of polysaccharides isolated from yeasts

Polysaccharide	Water retention ability	Oil absorption ability
Inulin	**0.68 ± 0.03**	**1.83 ± 0.03**
Candida Extracted Polysaccharide	**1.81 ± 0.03**	**4.64 ± 0.03**
Saccharomyces Extracted Polysaccharide	**1.87 ± 0.03**	**4.58 ± 0.03**
Geotrichum Extracted Polysaccharide	**1.92 ± 0.03**	**4.52 ± 0.03**

- خصوصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از مخمرهای شناسایی شده

در مطالعات انجام شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدها را مرتبط با خصوصیات ساختاری آن‌ها از جمله نوع مونوساکاریدهای تشکیل دهنده، نوع پیوندهای گلیکوزیدی، وزن مولکولی، وجود برخی گروه‌ها مانند کربونیل، سولفونیل، آمینو، کربوکسیل دانسته اند.همان طور که در شکل۶ مشاهده می‌شود اثر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدهای جدا شده از مخمرها با افزایش غلظت فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب پلی‌ساکاریدهای جداشده از مخمرها می‌تواند یکی از دلایل افزایش زنده ماندن در میکروب‌های پروبیوتیک در محیط کشت حاوی پلی‌ساکاریدهای جدا شده از مخمرها باشد.

- شناسایی مولکولی سویه‌ها

برای شناسایی از جفت پرایمرهای NL1 و NL4 به منظور تکثیر ناحیه D1/D2 و از جفت پرایمرهای ITS1 و ITS4 برای تکثیر قسمت انتهای ژن زیرواحد کوچک ریبوزومی ۱۸S، ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده درونی (ITS1)، ژن ریبوزومی S ۵/۸، ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده درونی۴ (ITS4) و قسمت ابتدایی ژن زیرواحد بزرگ ریبوزومی (S ۲۶/۲۸) استفاده گردید. توالی این پرایمرها از شرکت سیناژن گرفته شد.نتایج حاصل برای تصویر ژل الکتروفورز قطعات حاصل PCR اینگونه بود که در ردیف A که مربوط به نمونه *ساکارومایسس سرویزیه* بود باند در ناحیه ۵۰۰bp و برای *ژئوتریکوم کاندیدوم*در ردیف B ناحیه ۸۶۰ bp و در نهایت در ردیف C برای *کاندیدا کفیر* در ناحیه ۷۰۰ bp مشاهده شد. جهت شناسایی سویه مخمر منتخب قطعه ۱۸Sریبوزمی آن توالی یابی گردید. سپس توالی بدست آمده در بانک اطلاعات بیوانفورماتیک NCBI مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با استفاده از قسمت بلاست در پایگاه مذکور مشخص شد که توالی قطعه ۱۸Sسویه هدف با سویه *ساکارومایسس سرویزیه* بیشترین شباهت را داشت بنابراین نتایج تعیین توالی مشخص نمود که سویه‌ی مخمرمنتخب ساکارومایسز سرویزیه است که این مخمر *Saccharomyces cerevisiae* گل ۲۳۵ نامیده شد.

شکل ۸ نشان دهنده درخت فیلوژنی بر اساس داده‌های مولکولی و توالی به دست آمده می‌باشد.

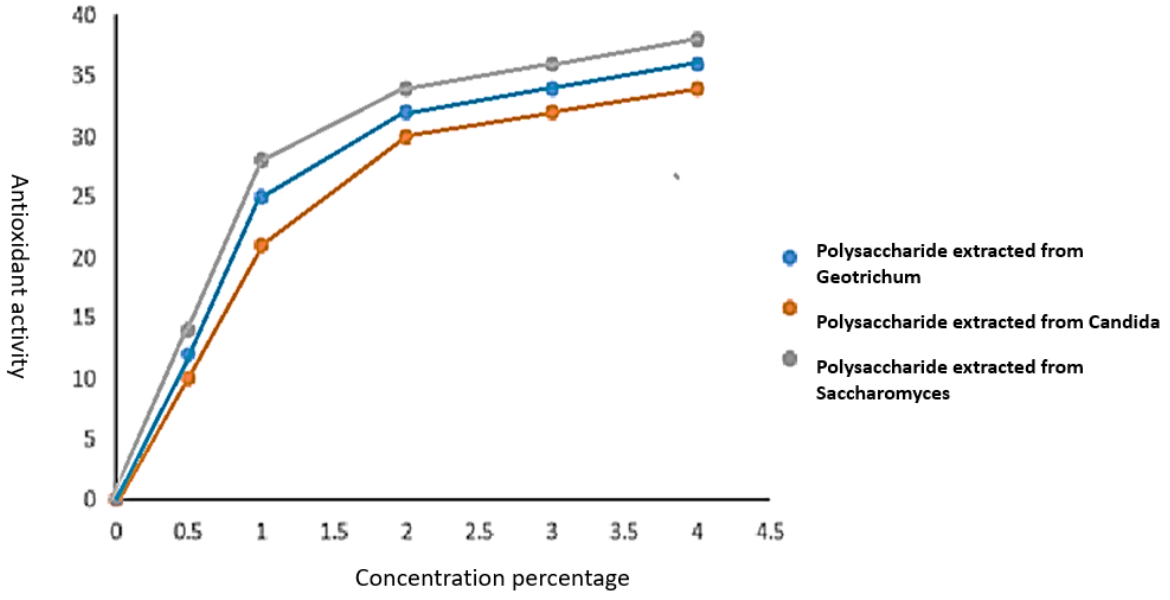

Figure 6- Effect of concentration on the antioxidant activity (nm) of identified polysaccharides

شکل ٦- اثر غلظت بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (جذب نوری) پلی‌ساکاریدهای شناسایی شده

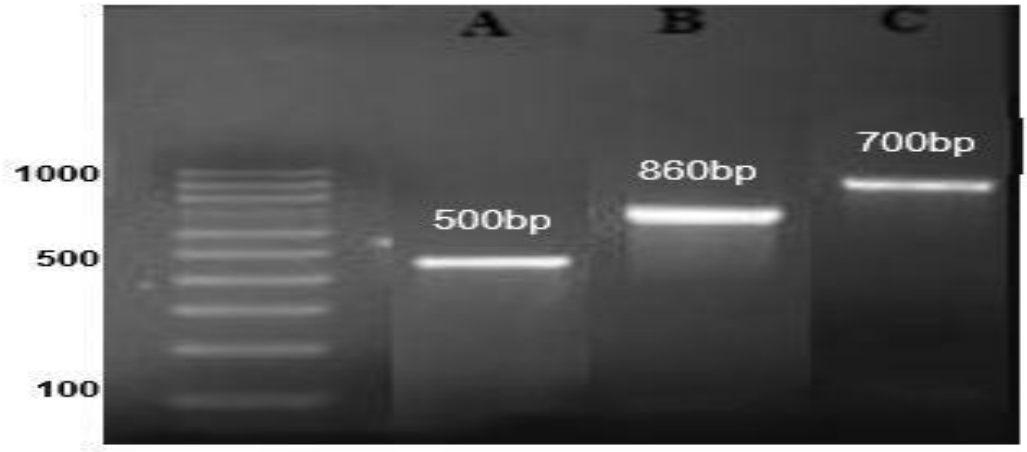

Figure 7- Electrophoresis results from PCR. A: Saccharomyces sample, B: Candida sample, C: Geotrichum sample. DNA Ladder. On the left: Band related to the amplification of the S gene of 18 yeast strains.

شکل ۷- نتایج الکتروفورز حاصل از PCR ا A: نمونه ساکارومایسس، B: نمونه کاندیدا، C: نمونه ژئوتریکوم DNA Ladder در سمت چپ: باند مربوط به تکثیر ژن S ۱۸ سویه مخمر.

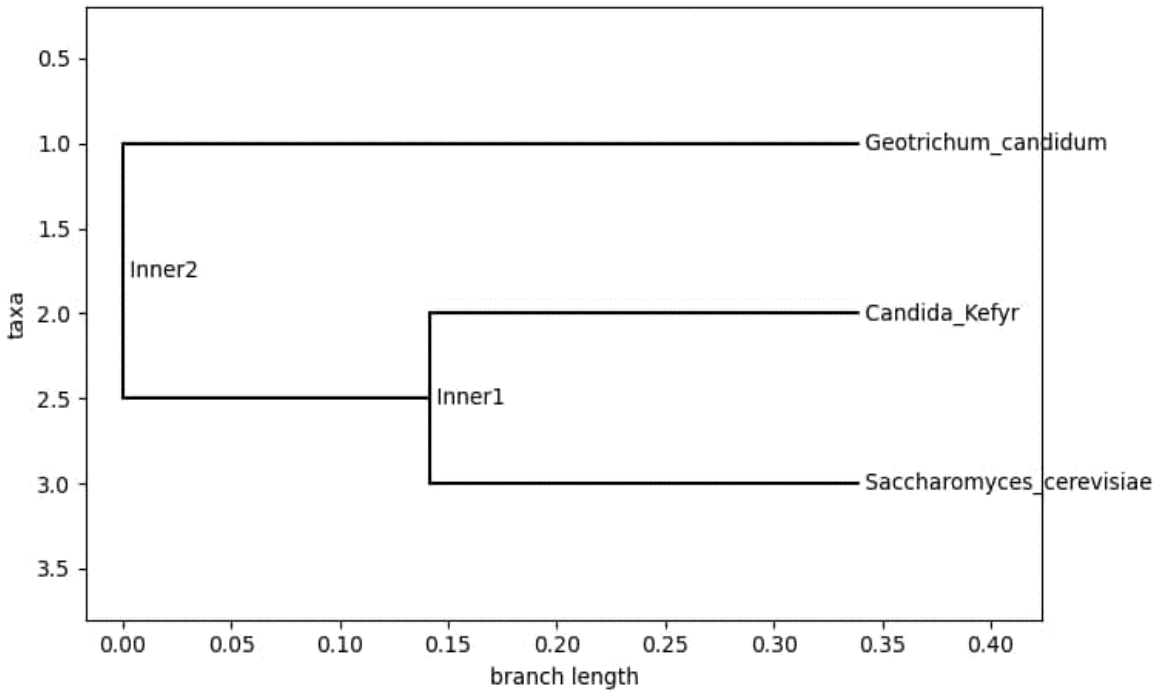

Figure 8 - Phylogeny tree of the three identified strains

شکل ۸ – درخت فیلوژنی سه سویه شناسایی شده

بحث

پلی‌ساکاریدهای پری‌بیوتیک، به عنوان ترکیبات غیرقابل هضمی، نقش مهمی در بهبود سلامت میزبان ایفا می‌کنند (Matteuzzi *et al*,.2004). آن‌ها با تحریک انتخابی رشد یا تغییر فعالیت میکروب‌های موجود در روده بزرگ، اثرات مثبتی بر سلامتی دارند. این پلی‌ساکاریدها به دلیل ساختار متخلخل خود، قابلیت جذب آب و چربی را دارند که می‌تواند بر پایداری و اصلاح بافت‌های غذایی و دارویی تأثیرگذار باشد (Figuerola *et al.*,2005). ویژگی‌های این چنینی به لحاظ فیزیولوژی بسیار حائز اهمیت هستند، زیرا می‌توانند در بهبود وضعیت چربی خون و کنترل چاقی مؤثر باشند (Carvalho *et al* ., 2009; Elleuch *et al*

2011.,). هدف از بکارگیری پری‌بیوتیک‌ها تحریک فعالیت کشت‌های پروبیوتیکی و افزایش اثرات مفید آن‌ها می‌باشد. برای دستیابی به تحریک مطلوب و تکثیر میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، پری بیوتیک‌ها بایستی مورد استفاده (برای مثال تخمیر) آن‌ها قرار گیرند، اما خود را از هضم آنزیمی توسط دستگاه گوارش میزبان رها سازند و سرانجام شرایط مطلوب را در انتهای دستگاه گوارش میزبان برای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک فراهم آورند (Obayomi *et al.*,2024). پلی‌ساکاریدهای زیست فعال از منابع جدید یکی از موضوعات روز دانشمندان در حال افزایش است بر اساس آمارهای سازمان بهداشت جهانی شیوع بیماری‌های نظیر پوکی استخوان بیماری‌های قلبی و عروقی سرطان‌ها و بیماری‌های دهان و دندان به دلیل تغییرات سبک زندگی و الگوهای تغذیه‌ای در حال افزایش می‌باشد بسیاری از ترکیبات زیست فعال موثر بر سلامتی معمولا در برخی مواد غذایی و منابع گیاهی وجود دارد با این حال مشکلاتی مانند عدم سهولت مصرف مناسب بودن طعم غذا و شرایط محدود و ذائقه و منطقه و فصل مصرف عمومی منابع را محدود می‌کند بنابراین جداسازی ترکیبات زیست فعال از منابع جدید و شناسایی و ارزیابی خصوصیات آنها می‌تواند به افزایش استفاده از اثرات سلامتی آنها کمک کند یک پری بیوتیک باید مقدار جزئی در جیره غذایی قرار بگیرد تا فضای زیادی را اشغال نکند و مقادیر انرژی و پروتئین جیره را تحت تاثیر قرار ندهد اگر پروبیوتیک‌ها به صورت آشامیدنی ارائه شوند باید به قدری محلول باشد که از ایجاد در مسیر عبور آب جلوگیری نکند(Álvarez-Mercado *et al.*,2022).

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهند که پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از سه گونه مخمر *Saccharomyces cerevisiae*، *Geotrichum candidum* و *Candida kefyr* که از پساب صنایع غذایی جداسازی شده‌اند، پتانسیل بالایی برای استفاده به‌عنوان ترکیبات پری‌بیوتیکی دارند. زیرا این پلی‌ساکاریدها نه‌تنها در برابر هیدرولیز آنزیمی مقاومت بالایی از خود نشان داده بلکه ویژگی‌هایی که برای عبور مؤثر از مجاری فوقانی دستگاه گوارش ضروری است نیز در مقایسه با پری‌بیوتیک‌های گیاهی رایج نظیر اینولین، عملکردی مناسب و حتی برتر را نشان داد.

تکنیک طیف‌سنجی مادون قرمز روشی سریع، کارآمد و بدون نیاز به مواد واکنش‌گر است که برای شناسایی انواع میکروارگانیسم‌ها قابل استفاده بوده و تنها به مقدار ناچیزی از توده سلولی نیاز دارد. با این حال، شناسایی مخمرها با استفاده از روش‌های رایج فنوتیپی (ریخت‌شناسی) دشوار است و در برخی موارد امکان‌پذیر نیست (Haag *et al.*, 1996; Timmins *et al.*, 1998). عملکرد تکنیک طیف‌سنجی مادون قرمز (FT-IR) ممکن است تحت تأثیر عواملی نظیر دمای رشد، روش کشت و حتی شیوه خشک کردن نمونه‌های میکروارگانیسمی قرار گیرد. به همین دلیل، آماده‌سازی مناسب نمونه‌ها اهمیت بالایی پیدا می‌کند (Erukhimovitch *et al.*, 2005). علاوه بر این، استفاده از این تکنیک به وجود یک کتابخانه جامع از طیف‌های مرجع وابسته است که می‌تواند محدودیتی برای آن محسوب شود (Toubas *et al.*, 2007). نتایج آزمون‌های FTIR در تحقیق حاظر این ادعا را تأیید می‌کنند؛ به‌طوری‌که بیش از ۸۵٪ از ساختار پلی‌ساکاریدها در برابر تخریب آنزیمی پایدار باقی ماندند. چنین پایداری در ساختار، پیش‌نیاز تغذیه مؤثر میکروارگانیسم‌های مفید روده‌ی بزرگ است. این نتایج تایید کننده نتایج بررسی یافته‌های Wang و همکاران (۲۰۲۴) می‌باشد، که در پژوهش خود به افزایش رشد سویه‌های پروبیوتیکی همچون *Lactobacillus plantarum* و *Bifidobacterium longum* در حضور پلی‌ساکاریدهای مخمری اشاره کرده‌اند (Wang *et al.*, 2024).

در محصولات غذایی حاوی پروبیوتیک، ترکیبات پری‌بیوتیکی موجب افزایش رشد و بقای میکروارگانیسم‌های مفید می‌شوند و نقش حمایتی ایفا می‌کنند (Martínez-Villaluenga., 2007). در محیط‌های حاوی قند ساده رشد میکروب‌ها ممکن است به دلیل ایجاد پدیده مهار فعالیت‌های کاتابولیکی محدود شود. ضمن آن که با توجه کاهش بسیار شدید اسیدیته در محیط حاوی گلوکز وجمعیت بالای میکروب‌های پروبیوتیک در محیط‌های حاوی اینولین و پلی‌ساکاریدهای مخمر نشان‌دهنده احتمال وجود مسیرهای متابولیکی متفاوت توسط میکروارگانیسم‌ها در سه محیط مورد بررسی است. قابلیت پری‌بیوتیکی پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از مخمرهادر تحقیق حاظرنیز نشان‌دهنده توانایی آن‌ها در

تحمل شرایط اسیدی است. این موضوع به‌ویژه از آن جهت اهمیت دارد که در تعریف‌های اخیر پری‌بیوتیک‌ها، تأکید بیشتری بر تفاوت در فعالیت میکروبی یا نوع متابولیت‌های تولیدشده توسط پروبیوتیک‌ها در حضور پری‌بیوتیک‌ها شده است (Azmi *et al*., 2012; Norajit *et al*., 2010).

در مورد خواص عملکردی در تحقیق حاضر باید متذکر شد کهنمونه‌های مورد بررسی ظرفیت بالایی در نگهداری آب و جذب چربی داشتند که آن‌ها را به گزینه‌ای جذاب برای کاربرد در صنایع غذایی و دارویی تبدیل می‌کند. مطالعه Dong همکاران (۲۰۲۴) نیز به ساختار متخلخل‌تر پلی‌ساکاریدهای مخمری نسبت به اینولین اشاره کرده که این ویژگی مستقیماً بر توانایی جذب آب و چربی تأثیرگذار است و می‌تواند در بهبود بافت محصولات عملکردی نقش داشته باشد (Dong *et al*., 2024).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات نیز در تحقیق حاضرقابل‌توجه بود و در برخی موارد عملکرد بهتری نسبت به اینولین نشان دادند. داده‌های Wu و همکاران (۲۰۲۰) در این زمینه مؤید آن است که پلی‌ساکاریدهای مخمری قادر به کاهش مؤثر در زمینه رادیکال‌های آزاد هستند و از اکسیداسیون در شرایط بیولوژیکی جلوگیری می‌کنند.عاملی که به افزایش پایداری و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط سخت دستگاه گوارش کمک می‌کند. (Wichienchot *et al*., 2010).

مقایسه با دیگر منابع پلی‌ساکاریدی نظیر جلبک‌ها یا گیاه بامبو نیز نکات قابل‌توجهی را نشان می‌دهد. پژوهش‌هایی مانند مطالعه Ramnani و همکاران (۲۰۱۴) و Firdous و همکاران (۲۰۱۲) بیان می‌کنند که منشأ استخراج پلی‌ساکارید دارای تأثیر قابل‌توجهی بر پایداری عملکرد پری‌بیوتیکی آن دارد. پلی‌ساکاریدهای استخراج‌شده از بامبو، در مقایسه با نمونه‌های جلبکی، دوام عملکردی بیشتری داشته‌اند موضوعی که در این تحقیق نیز در بررسی حاظردر مورد پلی‌ساکاریدهای مخمری تأیید شد (Griffiths *et al*.,1998; Ramnani *et al*., 2014).

در تحقیق حاضراز نظر تحمل محیط و شرایط اسیدی، پلی‌ساکاریدهای مخمری عملکرد بهتری نسبت به منابع گیاهی مانند اینولین از خود نشان دادند. نتایج پژوهش Azmi و همکاران (۲۰۱۲) نیز گویای این نکته است که ساختار مقاوم‌تر پلی‌ساکاریدهای غیرگیاهی، درعبور از محیط اسیدی معده را به خوبی عمل کرده و موجب افزایش زنده‌مانی باکتری‌های مفید در بخش‌های انتهایی دستگاه گوارش می‌شود (Azmi *et al*., 2012) با در نظر گرفتن چالش‌هایی مانند طعم خاص، محدودیت‌ها در تولید فصلی و هزینه‌های بالای استخراج پری‌بیوتیک‌های گیاهی، و آسیب‌های محیط زیستی پلی‌ساکاریدهای مخمری به‌عنوان منابع زیستی نوظهور با قابلیت استخراج مقرون‌به‌صرفه تر و عملکرد فیزیولوژیکی قابل‌توجه، گزینه‌ای عملی برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی به‌شمار می‌آیند. این پژوهش، همسو با مستندات علمی اخیر، نشان می‌دهد که پلی‌ساکاریدهای مخمری می‌توانند به‌عنوان جایگزین یا مکمل مؤثری برای پری‌بیوتیک‌های سنتی گیاهی، به‌ویژه اینولین، مطرح شوند و کاربردهای گسترده تری در توسعه محصولات متنوع مورد نیاز داشته باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از مخمر قابلیت پری‌بیوتیکی دارند که قابل مقایسه با اینولین بوده و حتی ممکن است از پلی‌ساکارید گیاهی اینولین (به‌عنوان یک پری‌بیوتیک تجاری) بهتر باشند. همچنین، ویژگی‌های عملکردی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از سه نوع مخمر مورد بررسی نشان داد که ظرفیت نگهداری آب و جذب چربی این پلی‌ساکاریدها به‌طور قابل توجهی بالا بوده و حتی بسیار بیشتر از اینولین است، به‌گونه‌ای که می‌توان آن را با فیبرهای رژیمی مقایسه کرد. علاوه بر این، فعالیت آنتی‌اکسیدانی این پلی‌ساکاریدها نیز نسبتاً مطلوب و بیشتر از اینولین ارزیابی شد.

سپاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و همچنین از همه اساتیدی که در غنای مطالب حاضر یاری رسان بودند، نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

Adt, I., Toubas, D., Pinon, J. M., Manfait, M. & Sockalingum, G. D. (2006). FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. *Archives of Microbiology*, *185*(4), 277–285. https://doi.org/10.1007/s00203-006-0094-8

Álvarez-Mercado, A. I. & Plaza-Díaz, J. (2022). Dietary polysaccharides as modulators of the gut microbiota ecosystem: An update on their impact on health. *Nutrients*, *14*(19), 4116. https://doi.org/10.3390/nu14194116

Azmi, A. F., Mustafa, S., Hashim, D. M. & Manap, Y. A. (2012). Prebiotic activity of polysaccharides extracted from *Gigantochloa levis* (Buluh beting) shoots. *Molecules*, *17*(2), 1635–1651. https://doi.org/10.3390/molecules17021635

Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P. & Chang, C. M. (2022). Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, *27*(4), 1326. https://doi.org/10.3390/molecules27041326

Carvalho, A. F., Portela, M. C., Sousa, M. B., Martins, F. S., Rocha, F. C., Farias, D. F. & Feitosa, J. P. (2009). Physiological and physico-chemical characterization of dietary fibre from the green seaweed *Ulva fasciata Delile*. *Brazilian Journal of Biology*, *69*, 969–977. https://doi.org/10.1590/s1519-69842009000400028

Curk, M. C., Peladan, F. & Hubert, J. C. (1994). Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, *123*, 241–248. https://doi.org/10.1016/0378-1097(94)90204-6

Cutfield, S., Cutfield, J. & Mace, P. (2007). Bone Morphogenetic Protein Type II Receptor Structure in Two Crystal Forms. *Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances*, *63*, S127–S127. https://doi.org/10.1107/s0108767307097218

De Vrese, M. & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. In *Food Biotechnology* (pp. 1–66). https://doi.org/10.1007/10_2008_097

Dong, W., Li, Y., Xue, S., Wen, F., Meng, D., Zhang, Y. & Yang, R. (2024). Yeast polysaccharides: The environmentally friendly polysaccharides with broad application potentials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *23*(5), e70003. https://doi.org/10.1111/1541-4337.70003

Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C. & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, *124*(2), 411–421. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.077

Erukhimovitch, V., Pavlov, V., Talyshinsky, M., Souprun, Y. & Huleihel, M. (2005). FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *37*, 1105–1108. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.08.035

Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I. & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, *91*(3), 395–401. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.036

Fuller, R. & Gibson, G. R. (1997). Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *32*(Suppl 222), 28–31. https://doi.org/10.1080/00365521.1997.11720714

Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R. & Gelbart, W.M. (2002). An Introduction to Genetic Analysis. *Biologia Plantarum*. https://doi.org/10.1023/a:1015187026471

Haag, H., Gremlich, H. G., Bergmann, R. & Sanglier, J. J. (1996). Characterization and identification of actinomycetes by FT-IR spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, *27*, 157–163. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(96)00943-8

Hesham, A. E.-L., Wambui, V., Ogola, J. O. H. & Maina, J. M. (2014). Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2014.01.001

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(2), 365s–373s. https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s

Kurtzman, C. P. & Fell, J. W. (1998). *The Yeasts: A Taxonomic Study* (4th ed.). Elsevier Science B.V. https://doi.org/10.1016/b978-044481312-1/50000-9

Larypoor Mohaddeseh, K., Kargar Faragheh, A. & Mohadi, M. (2023). Isolation and screening of facultative halophilic fungi producing industrial enzymes from forest parks in Tehran. *Knowledge of Microbiology*, *2*(1), 68. (In Persian). https://sanad.iau.ir/Journal/jknm/Article/783940/FullText

Liu, Y., Tran, D. Q. & Rhoads, J. M. (2018). Probiotics in disease prevention and treatment. *The Journal of Clinical Pharmacology*, *58*(Suppl 10), S164–S179. https://doi.org/10.1002/jcph.1121

Lourens-Hattingh, A. & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, *11*(1–2), 1–17. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00036-X

Markowiak, P. & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, *9*(9), 1021. https://doi.org/10.3390/nu9091021

Martínez-Villaluenga, C. & Gómez, R. (2007). Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of

oligosaccharides from lupin as prebiotic. *International Dairy Journal, 17*(2), 116–122. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.006

Matteuzzi, D., Swennen, E., Rossi, M., Hartman, T. & Lebet, V. (2004). Prebiotic effects of a wheat germ preparation in human healthy subjects. *Food Microbiology, 21*(1), 119–124. https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00063-2

Mohammadi Afshar, M., Larypoor, M. & Hosseini, F. (2024). Isolation, identification and microencapsulation of microbes isolated from the wastewater of dairy factories by alginate and polysaccharides of *Lentinula edodes*. *Microbial Biology, 13*(51), 97–128 [In Persian]. https://doi.org/10.22108/bjm.2024.141002.1590

Molan, A. L., Flanagan, J., Wei, W. & Moughan, P. J. (2009). Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. *Food Chemistry, 114*(3), 829–835.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.028

Morshed, M., Omrani, M. D., & Fazeli, S. (2017). Molecular identification of yeast isolates by ITS sequencing and phylogenetic analysis. *Journal of Mycology Research, 11*(3), 157–165. https://doi.org/10.1016/j.mycol.2017.01.005

Nasiri Poroj, S., Larypoor, M., Fazeli, M. R. & Shariatmadari, F. (2022). Study of probiotic potential of yeasts isolated from dairy products, sourdough, and fruit peel. *Journal of Applied Microbiology in Food Industry*, *7*(4), 69–87. https://sid.ir/paper/984938/en

Naumann, A., Navarro-Gonzalez, M., Peddireddi, S., Kues, U. & Polle, A. (2005). Fourier transform infrared microscopy and imaging: detection of fungi in wood. *Fungal Genetics and Biology, 42*, 829–835. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.06.002

Norajit, K., Kim, K. M. & Ryu, G. H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering, 98*(3), 377–384. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.015

Obayomi, O. V., Olaniran, A. F. & Owa, S. O. (2024). Unveiling the role of functional foods with emphasis on prebiotics and probiotics in human health: A review. *Journal of Functional Foods*. https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106337

Partyka, A. (2012). Enzymes antioxidant and peroxidation lipid activity in avian semen. *Animal Reproduction Science, 134*(3–4), 184–190. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.07.007

Ramnani, C. P., Martínez-Villaluenga, C., Chitarraria, R., Tuohya, K. & Grant, J. (2007). Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. *International Dairy Journal, 17*(2), 116–122. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.02.003

Sohail, M., Barzkar, N., Michaud, P., Tamadoni Jahromi, S., Babich, O., Sukhikh, S., Das, R. & Nahavandi, R. (2022). Cellulolytic and xylanolytic enzymes from yeasts: Properties and industrial applications. *Molecules, 27*(12), 3783. https://doi.org/10.3390/molecules2712378

Timmins, E. M., Quain, D. E. & Goodacre, R. (1998). Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Yeast, 14*, 885–893. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<885::AID-YEA286>3.0.CO;2-G

Toubas, D., Essendoubi, M., Adt, I., Pinon, J. M., Manfait, M. & Sockalingum, G. D. (2007). FTIR spectroscopy in medical mycology: Applications to the differentiation and typing of *Candida*. *Analytical Bioanalytical Chemistry, 387*, 1729–1737. https://doi.org/10.1007/s00216-006-1005-1

Wang, X., Li, X., Zhang, L., An, L., Guo, L., Huang, L. & Gao, W. (2024). Recent progress in plant-derived polysaccharides with prebiotic potential for intestinal health by targeting gut microbiota: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 64*(33), 12242–12271. https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2248631

Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. & Rastall, R. A. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry, 120*(3), 850–857. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.026

Investigation of the Prebiotic Properties of Polysaccharides from Yeasts Isolated from Food Industry Wastewater

M. Larypoor [*a], M. Golgharan [b], Gh. Fotouhi [c], A. Akhavan Sepahi [d], R. Samsami [e]

[a] Associate Professor of the Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[b] M.Sc. of the Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[c] Ph.D. Candidate in Microbiology, Faculty of Department of Biological Sciences, Kish International Branch, Islamic Azad University, Kish Island, Iran.
[d] M.Sc. of the Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[e] Associate Professor of Chemistry, Dezful Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

Received: 8 March 2025 Accepted: 10 May 2025

Abstract

Introduction: The increasing prevalence of intestinal and stomach problems has increased attention to the use of dietary supplements and probiotics. The aim of this study was to evaluate the probiotic properties of polysaccharides obtained from yeasts isolated from food industry wastewater.

Materials and Methods: Sampling and purification of yeast was carried out from the wastewater of the food factory. The yeasts were identified by morphological, biochemical and microscopic methods. The prebiotic properties of yeast polysaccharide were compared with inulin. Structural analysis was performed using Infrared Fourier Transform and its resistance to acid and enzymatic digestion, effectiveness in the growth of probiotic bacteria, technological and antioxidant properties were evaluated and the best prebiotic producing strain was identified by molecular PCR method.

Results: Polysaccharides extracted from *Saccharomyces cerevisiae, Candida kefyr, Geotrichum candidum* showed resistance to digestion comparable and even better than inulin. The ability of oil absorption and water binding capacity for polysaccharides isolated from *Saccharomyces cerevisiae* (4.64±0.03, 1.81±0.03), *Candida kefyr* (4.58±0.03, 1.87±0.03), *Geotrichum candidum* (4.52±0.03, 1.92±0.03) were comparable with inulin and even higher than it. The antioxidant activity of *Saccharomyces cerevisiae* was higher than the two strains of *Candida kefyr* and *Geotrichum candidum* and about 40% in the studied concentrations. Also a direct relationship between polysaccharide concentration and increased antioxidant activity was observed.

Conclusion: The results indicated that the polysaccharides isolated from yeast have a better prebiotic ability than inulin. Therefore, yeast wall might be a good substitute for inulin with plant source and help to preserve plants.

Keywords: *Inulin, Probiotic, Prebiotic, Polysaccharide, Yeast.*

* Corresponding Author: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir