بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد علوم مواد غذایی

استخراج، خالص سازی و شناسایی ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب حاصل از گونه مخمری ***Rhodotorula minuta***

گرد آورنده : پریسا جلالی

اساتید راهنما:

دکتر حمیدرضا صمدلویی

دکتر کامبیز جهان بین

اسفند ۱۳۹۶

شماره: ۱۰۴/ر/ک
تاریخ: ۱۳۹۷/۱/۲۱

باسمه‌تعالی

مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای پریسا جلالی با شماره دانشجویی.....۹۴۰۵۰۷۴..... رشته .....صنایع غذایی..... گرایش ...علوم مواد غذایی..... تحت عنوان استخراج، خالص سازی و شناسایی ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب حاصل از گونه مخمری *Rhodotorula minuta* که در تاریخ ..۹۶/۱۲/۷.. با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: خوب.....) ☑ مردود ☐

نوع تحقیق: نظری ☐ عملی ☑

عضو هیأت داوران	نام ونام خانوادگی	مرتبهٔ علمی	امضاء
۱ـ استادراهنمای اول	دکتر حمیدرضا صمدلویی	استادیار	
۲- استادراهنمای دوم	دکتر کامبیز جهان بین	استادیار	
۳- استاد مشاور			
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر زیبا قسیمی حق	استادیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر احمد رجایی	استادیار	
۶ـ استاد ممتحن دوم	دکتر حجت اله بداقی	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمدرضا عاصریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

۳

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم و دو برادر مهربانم

که در سختی‌ها و دشواری‌های زندگی همواره یاوری دلسوز و فداکار و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده‌اند.

تقدیر و تشکر:

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم. از اساتید فاضل و اندیشمند جناب آقای دکتر حمیدرضا صمدلویی و جناب آقای دکتر کامبیز جهان بین به عنوان اساتید راهنما که همواره نگارنده را مورد لطف و محبت خود قرار داه اند، کمال تشکر را دارم.

تعهدنامه

اینجانب پریسا جلالی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم و مهندسی صنایع غـذایی دانشـکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه استخراج، خالص سازی و شناسـایی سـاختار پلـی سـاکارید غالـب محلـول در آب حاصـل از گونـه مخمـری *Rhodotorula minuta* تحـت راهنمـائی آقایان دکتر حمیدرضا صمدلویی و دکتر کامبیز جهان بین متعهد می شوم..

تحقیقات در این پایـان نامـه توسـط اینجانـب انجـام شـده اسـت و از صـحت و اصـالت برخوردار است .

- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگـری بـرای دریافـت هـیچ نـوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق بـه دانشـگاه صـنعتی شـاهرود مـی باشـد و مقـالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایـان نامـه تأثیرگـذار بـوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنـده (یـا بافتهـای آنهـا) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .

در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسـی یافتـه یـا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامهبدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

در این تحقیق، پلی ساکارید در محیط کشت حاوی عصاره مخمر ۱۸/۷۵ گرم در لیتر، زایلوز ۶/۲۵ گرم در لیتر، آمونیوم سولفات ۲/۵ گرم در لیتر، دی هیدروژن پتاسیم فسفات ۱ گرم در لیتر، سولفات منیزیم ۷ آبه ۰/۵ گرم در لیتر، کلرید سدیم ۰/۱ گرم در لیتر و کلرید کلسیم ۲ آبه ۰/۱ گرم در لیتر از مخمر ردوترولا مینوتا تولید شد. بازده پلی ساکارید خام و خالص شده به ترتیب ۳/۵۱۱ (گرم در لیتر) و ۲/۰۸۱ (گرم در لیتر) بدست آمد. ویژگی های ساختاری پلی ساکارید توسط آنالیز متیلاسیون بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان داد که واحدهای تشکیل دهنده اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص مانوز با اتصالات (۴←۱) و (۳←۱) است که در برخی از نقاط زنجیر اصلی از محل کربن شماره ۶ مانوز شاخه های جانبی حاوی واحدهای گلوکز وجود دارند. ابتدا منابع مختلف کربن (نشاسته، گلوکز، فروکتوز، لاکتوز و سوربیتول) و منابع مختلف نیتروژن (پپتون کازئین، پپتون گوشت، نیترات آمونیوم، پودر سویا، اوره و عصاره مخمر) برای ارزیابی میزان تولید پلی ساکارید بررسی شدند. روش یک فاکتور در یک زمان برای انتخاب ترکیبات کلیدی استفاده شد. سپس به منظور بهینه سازی میزان ترکیبات کلیدی محیط کشت از روش سطح پاسخ استفاده شد. با استفاده از روش یک فاکتور در یک زمان، نشاسته (منبع کربن) و پودر سویا (منبع نیتروژن) به عنوان ترکیبات خوب برای بدست آوردن حداکثر بازده اگزوپلی ساکارید انتخاب شدند. حداکثر بازده اگزوپلی ساکارید (۱۳/۴ گرم در لیتر) در محیط حاوی ۱۵ گرم در لیتر نشاسته و ۳۰ گرم در لیتر پودر سویا با استفاده از روش سطح پاسخ بدست آمد.

کلمات کلیدی: اگزوپلی ساکارید، ردوترولا مینوتا، ساختار، بهینه سازی، روش سطح پاسخ

فهرست مطالب

فصل اول (کلیات)

۱-۱- کربوهیدرات ها ۲

۱-۲- انواع پلی ساکاریدها ۵

۱-۲-۱- پلی ساکاریدهای گیاهی ۶

۱-۲-۱-۱- سلولز ۶

۱-۲-۱-۲- پکتین ۶

۱-۲-۲- پلی ساکاریدهای میکروبی ۷

۱-۲-۲-۱- صمغ زانتان ۷

۱-۲-۲-۲- پولولان ۹

۱-۲-۲-۳- ژلان ۱۰

۱-۲-۲-۴- مالتودکسترین ۱۰

۱-۳- انواع پلی ساکاریدهای میکروبی ۱۱

۱-۳-۱- اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی ۱۲

۱-۴- ساختار و فعالیت زیستی پلی ساکاریدهای قارچی ۱۳

۱-۵- ویژگی های عملکردی اگزوپلی ساکاریدهای مخمری و امکان استفاده آنها ۱۴

۱-۶- نقش پلی ساکاریدهای میکروبی در طبیعت ۱۶

۱-۷- اهمیت مخمرها در تولید ۱۶

۱-۸- استخراج ۱۸

۱-۸-۱- روش های استخراج EPS ۱۹

۱-۹- خالص سازی و حذف ناخالصی ها ۲۰

۱-۱۰- حذف پروتئین ها ۲۱

۱-۱۱- ترسیب ۲۲

۱-۱۲- شناخت و تشخیص ساختمان مولکولی ۲۲

۱-۱۳- متیلاسیون ۲۳

۱-۱۳-۱- واکنش متیلاسیون ۲۴

۱-۱۴- بهینه سازی تولید اگزوپلی ساکارید توسط مخمرها با استفاده از روش سطح پاسخ ۲۷

۱-۱۴-۱- ترکیبات محیط کشت برای تولید اگزوپلی ساکارید ۲۷

۱-۱۴-۲- تغذیه مخمر و نیازهای تغذیه ای آن ۲۸

۱-۱۴-۲-۱- کربن ۲۹

۱-۱۴-۲-۱-۱- نشاسته ۲۹

۱-۱۴-۲-۱-۲- لاکتوز ۳۰

۱-۱۴-۲-۱-۳- گلوکز ۳۰

۱-۱۴-۲-۱-۴- زایلوز ۳۱

۱-۱۴-۲-۲- هیدروژن ۳۱

۱-۱۴-۲-۳- اکسیژن ۳۱

۱-۱۴-۲-۴-نیتروژن ۳۲

۱-۱۴-۲-۵- سولفور ۳۲

۱-۱۴-۲-۶- فسفر ۳۲

۱-۱۴-۲-۷- عناصر معدنی ۳۳

۱-۱۴-۳- روش سطح پاسخ (RSM ۳۳

۱-۱۵- تنوع میکروارگانیسم ها ۳۳

۱-۱۵-۱- مخمرها (معروفترین قارچ ها ۳۵

۱-۱۵-۱-۱- تنوع حیاتی مخمر ۳۶

۱-۱۵-۱-۲- زیستگاه های مخمرهای تولید کننده اگزوپلی ساکارید ۳۶

۱-۱۵-۱-۳- اهمیت مخمرها برای بشر ۳۷

۱-۱۵-۱-۴- استفاده صنعتی مخمرها ۳۹

۱-۱۶- Rhodotorula ۴۰

۱-۱۶-۱- مورفولوژی ردوترولا مینوتا ۴۰

فصل دوم (بررسی منابع)

۲-۱- تولید و استخراج پلی ساکارید ۴۲

۲-۲- شناسایی پلی ساکاریدها ۴۸

۲-۳- بهینه سازی ترکیبات محیط کشت ۵۰

فصل سوم (مواد و روش ها)

۳-۱- مواد اولیه و محلول های شیمیایی و میکروارگانیسم ها ۵۸

۳-۱-۱- تهیه میکروارگانیسم و توسعه تلقیح ۵۸

۳-۱-۲- مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده ۵۸

۳-۱-۳- دستگاه های مورد استفاده ۵۹

۳-۲- روش کار ۵۹

۳-۲-۱- تولید، استخراج و جداسازی پلی ساکارید های محلول در آب تولید شده توسط میکروارگانیسم Rhodotorula minuta ۵۹

۳-۲-۱-۱- تلقیح میکروارگانیسم به محیط تولید محصول ۶۰

۳-۲-۱-۲- استخراج پلی ساکارید محلول تولید شده توسط میکروارگانیسم ۶۰

۳-۲-۱-۳- جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در محیط کشت ۶۰

۳-۲-۲- خالص سازی پلی ساکارید محلول ۶۱

۳-۲-۲-۱- تعیین راندمان پلی ساکارید خالص تولید شده توسط Rhodotorula minuta ۶۱

۳-۲-۳- شناسایی پلی ساکارید محلول در آب ۶۲

۳-۲-۳-۱- متیله کردن پلی ساکارید خالص ۶۲

۳-۳- بهینه سازی محیط کشت به روش RSM ۶۲

۳-۳-۱- میکروارگانیسم و شرایط کشت ۶۲

۳-۳-۲- طراحی تجربی محیط های کشت میکروبی ۶۳

۳-۳-۲-۱- محیط های کشت با منابع کربنی مختلف و تثبیت منبع کربن ۶۳

۳-۳-۲-۲- محیط های کشت با منابع پروتئینی مختلف و تثبیت آن ۶۴

۳-۳-۳- طراحی ترکیبی توسط نرم افزار RSM ۶۵

فصل چهارم (نتایج و بحث)

۴-۱- جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در محیط کشت ۶۸

۴-۲- متیله کردن پلی ساکارید خالص ۶۸

۴-۳- بررسی اثرات ترکیبات محیط کشت بر میزان پلی ساکارید بـه روش آمـاری "one-factor-at-a-time ۷۳

۴-۳-۱- منبع کربن ۷۳

۴-۳-۲- میزان نیتروژن ۷۵

۴-۴- بهینه سازی به روش آماری سطح پاسخ ۷۷

۴-۴-۱- بررسی پذیرش مدل ۸۱

۴-۴-۲- نتایج میزان اگزوپلی ساکارید ۸۲

۴-۴-۳- مقادیر بهینه پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم برای متغییرها ۸۳

۴-۴-۴- ارزیابی مدل رگرسیون تولید اگزوپلی ساکارید ۸۴

فصل پنجم (منابع) ۸۷

۵-۱- منابع ۸۸

فهرست اشکال:

شکل ۱-۱- ساختار عمومی آلدوتریوزها، آلدوتتروزها، آلدوپنتوزها و آلدوهگزوز ۴

شکل ۱-۲- ساختار زانتان ۸

شکل ۱-۳- ساختار پولولان ۹

شکل ۱-۴- متیلاسیون قندها ۲۴

شکل ۱-۵- مراحل واکنش شیمیایی در تجزیه متیلاسیون ۲۶

شکل ۱-۶- طبقه بندی کلی میکروارگانیسم ها ۳۴

شکل ۱-۷- تنوع خروجی های مربوط به بیوتکنولوژی مخمرها ۴۰

شکل ۲-۱- ساختار اگزوپلی ساکارید شناسایی شده توسط دوناس چاسکو و همکاران ۴۹

شکل ۲-۲- ساختار اگزوپلی ساکارید شناسایی شده توسط لیورز و همکاران ۵۰

شکل ۳-۱- رشد مخمر در محیط توسعه تلقیح غنی شده ۵۸

شکل۳-۲- الف: محیط های حاوی قندهای مختلف ب: پلی ساکارید های خام تولید شده توسط مخمر Rhodotorula minuta ۶۴

شکل ۳-۳- محیط های حاوی منابع پروتئینی مختلف ۶۵

شکل ۴-۱- الف- پلی ساکارید خالص ب: پلی ساکارید خام ۶۸

شکل ۴-۲- اثرات منابع کربنی متفاوت (نشاسته، گلوکز، فروکتوز، سوربیتول و لاکتوز به میزان ۶/۲۵ گرم در لیتر) بر تولید اگزوپلی ساکارید ۷۴

شکل ۴-۳- اثرات منابع نیتروژنی متفاوت (پپتون کازئین، پپتون گوشت، نیترات آمونیوم، پودر سویا، اوره و عصاره مخمر) بر تولید اگزوپلی ساکارید ۷۶

شکل ۴-۴- منحنی انطباق RSM برای بازده پیشنهادی پلی ساکارید و مقادیر واقعی بدست آمده ۸۲

شکل ۴-۵- منحنی RSM برای تولید اگزوپلی ساکارید (٪) به وسیله ی مخمر Rhodotorula minuta با متغیرهای نشاسته (A) و پودر سویا (B ۸۳

فهرست جداول:

جدول ۱-۱- مواد شیمیایی صنعتی مفید، تولید شده توسط مخمرها ۱۷

جدول ۱-۲- نقاط عطف در مطالعه و استفاده از مخمرها ۳۸

جدول ۳-۱- نسبت های پیشنهادی توسط نرم افزار ۶۵

جدول ۴-۱- نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی پلی ساکارید خالص متیله شده ۷۰

جدول ۴-۲- میزان واقعی و کد شده متغییرهای غیر وابسته در روش آماری RSM ۷۸

جدول ۴-۳- پارامترهای ANOVA برای مدل اگزوپلی ساکارید (A نشاسته و B پودر سویا ۷۹

جدول ۴-۴: طراحی آزمایش ها و نتایج از دو متغییر اعمال شده بر روی پاسخ در روش RSM ۸۰

مقدمه و هدف

کربوهیدرات ها در تمام گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم ها یافت می شوند که می توانند برای انسان قابل استفاده باشند .کربوهیدرات ها یکی از بیشترین ترکیبات در مواد غذایی می باشند .این ترکیبات نه تنها تامین کننده ۷۰٪ انرژی مورد نیاز بدن انسان می باشند بلکه عامل ایجاد طعم و بافت مطلوب در غذا می باشند. براساس تعداد واحدهای مونوساکارید در ساختار کربوهیدرات ها، به سه دسته ی مونوساکاریدها، الیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها تقسیم می شوند. پلی ساکارید بر اساس منشا تولید به سه دسته ی پلی ساکاریدهای گیاهی، جانوری و میکروبی تقسیم می شوند (Wang, et al., 2012). شناخت میکروارگانیسم ها به عنوان موجوداتی که می توانند به خدمت انسان در آیند، به دو قرن اخیر باز می گردد .لویی پاستور پدر دانش میکروب شناسی و پایه گذار دانش میکروبیولوژی صنعتی نیز می باشد .تکنولوژی تولید پنی سیلین راه را برای تولید مواد شیمیایی و دارویی متعدد هموار کرد در دهه های اخیر اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی جایگزین پلی ساکاریدهای گیاهی شده اند که از خواص زیر برخوردار بوده و به مقدار فراوان و با درجه خلوص بالاتری به دست می آیند .پلی ساکاریدهای میکروبی بسته به موقعیت قرارگیریشان به دو گروه تقسیم می شوند . پلی ساکاریدهای کپسولی که در سطح سلول قرار می گیرند و نقش مهمی در حفاظت میکروب ها در برابر حمله ی فاژها، فاگوسیتوز، ترکیبات سمی و آنتی بیوتیک ها دارند و پلی ساکاریدهای خارج سلولی که به خارج سلول ترشح میشوند .اگزوپلی ساکاریدها خود به دو گروه (متصل شده و رها شده در محیط) تقسیم میشوند (Willard, 2012). هر کدام از اگزوپلی ساکاریدهای متصل شده و رها شده در محیط دارای مزایای منحصر به فردی هستند، به طور مثال اگزوپلی ساکاریدهای رها شده از سلولها در مقابل نیسین و مس محافظت میکنند (Patel and Prajapa, 2013). به علت خواص فیزیکی و شیمیایی، اگزوپلی ساکاریدها به طور گسترده در صنایع غذایی به عنوان عوامل ویسکوزیته کننده، ژله ای کننده و قوام دهنده استفاده می شوند . از اثرات بیولوژیکی آنها میتوان به خواص ضد سرطانی، ضد ویروسی، ضد التهابی، کاهش دهنده کلسترول خون، کاهش دهنده ی قند خون اشاره کرد. هم چنین می توانند

در دستگاه گوارش پایدار مانده و اثر پری بیوتیکی داشته باشند . (مبینی و همکاران، ۱۳۹۱). عموما در اکوسیستم های پیچیده تر، میکروب ها اگزوپلی ساکارید های متفاوتی تولید می کنند (Ravella, et al., 2010). عملکرد فیزیکوشیمیایی پلی ساکاریدهای میکروبی بسیار زیاد می باشد و بستگی به ساختار آن ها دارد (Ozturk, et al., 2010). شناخت ساختار اگزوپلی ساکارید برای فهمیدن نقش فیزیکوشیمیایی و فعالیت بیولوژیکی اگزوپلی ساکارید بسیار مفید می باشد .پلی ساکاریدها در همه ی ارگانیسم ها وجود دارند و ساختارهای بیوشیمیایی متنوع متشکل از ۵۰ -۴۰ مونوساکارید مختلف (هگزوزها و پنتوزها) بر پایه ی باندهای گلیکوزیدی دارند. گروه های استخلافی مختلف برای مثال گروه های آسیل، آمینو اسیدها یا سولفات ها ممکن است در ساختار خطی یا شاخه ای پلی ساکارید وجود داشته باشند (Liu, et al., 2010).

به علت ویژگی های مفید بیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی اگزوپلی ساکاریدها در طیف گسترده ای ازکاربردهای تجاری از جمله صنعت غذا، صنایع شیمیایی، بسته بندی، صنایع آرایشی و دارویی استفاده می شوند (Ates, 2015). پلی ساکاریدها در صنعت بدلیل ویژگی های رئولوژیکی به عنوان غلیظ کننده و عوامل ژل کننده استفاده می شوند امروزه بدلیل فعالیت زیستی متفاوت پلی ساکارید ها از جمله خاصیت ضد باکتری، ضد انعقاد خون، ضد جهش ژنتیک، محافظ امواج رادیویی، ضد اکسیداسیون و ضد سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته اند(Liu, et al., 2017).

تکنولوژی تخمیر به طور وسیعی برای تولید ترکیبات با ارزش اقتصادی بالا مورد استفاده قرار می گیرد که کاربردهای بسیاری در تولید انرژی، صنایع دارویی، شیمیایی و غذایی دارند .مهمترین عامل در تولید محصول تخمیری این است که آن محصول مورد تقاضای بازار باشد .میکروارگانیسم های بسیاری برای تولید متابولیت های اولیه و ثانویه مهم گزارش شده اند اما میزان تولید بسیار کم می باشد .برای داشتن صرفه ی اقتصادی تولید اکثر محصولات میکروبی روش های افزایش بازدهی بسیاری کشف شده است (Rajeswari, et al., 2014).

بهینه سازی محیط کشت یکی از مهمترین کارها می باشد که قبل از تولید در مقیاس زیاد هر متابولیت باید انجام شود. قبل از ۱۹۷۰ بهینه سازی محیط کشت با استفاده از روش های قدیمی انجام می شد که بسیار پرهزینه، زمان بر و نیازمند آزمایشات بسیاری بود .درحال حاظر با پیدایش روش های آماری جدید بهینه سازی محیط کشت بسیار آسان، موثر، به صرفه و مطمئن در گرفتن نتیجه می باشد. برای طراحی یک محیط کشت تولید مناسبترین شرایط تخمیر (pH, دما و دور همزن) و مقدار ترکیبات کلیدی محیط کشت(کربن و نیتروژن) باید تعیین شوند (Wang et al., 2011).

هدف این تحقیق، بررسی میزان تولید پلی ساکارید خارج سلولی از گونه ی مخمری ردوترولا مینوتا و شناسایی ساختار آن و همچنین بهینه سازی محیط کشت میکروبی برای تولید حداکثر بازده تولید اگزو پلی ساکارید می باشد. مخمرها در حضور غلظت های بالای قند و نمک قادر به رشد می باشند و رطوبت کمتری نسبت به باکتری ها نیاز دارند به همین دلیل از میان تولید کنندگان پلی ساکارید یک گونه ی مخمری انتخاب شد. به دلیل اهمیت زیاد پلی ساکاریدها و کاربرد بسیار آنها در صنایع مختلف تولید پلی ساکارید مد نظر قرار گرفت .برای افزایش بازده پلی ساکارید بهینه سازی دو ترکیب کلیدی محیط کشت از جمله منبع کربن و منبع نیتروژن انجام شد.

فصل اول

کلیات

۱-۱- کربوهیدرات ها:

کربوهیدرات ها فراوانترین ترکیبات آلی موجود در طبیعت هستند و $\frac{۳}{۴}$ ماده خشک دنیای گیاهی را تشکیل می دهند. اطلاق نام کربوهیدرات به این دسته از مواد ریشه در دورانی دارد که تصور می شد تمام ترکیبات متعلق به این گروه از نظر فرمولی هیدراتی از کربن هستند و از این جهت فرمول کلی $C_n(H_2O)_n$ نیز برای آنها پیشنهاد گردید. اگر چه بعدها مشخص شد که این فرمول در مورد تمام ترکیبات وابسته به این گروه صادق نمی باشد (مثل پکتین[1] یا همی سلولز) اما از نظر اینکه این ترکیبات دارای خصوصیات مشترک دیگری با مواد با فرمول ذکر شده بودند، واژه کربوهیدرات جایگاه خود را حفظ نموده و همچنان مورد استفاده قرار می گیرد. با توجه به فراوانی و همچنین ارزانی، کربوهیدرات ها تأمین کننده بخش اعظم انرژی در رژیم غذایی اکثر ساکنان زمین می باشند و در تغذیه دام و طیور نیز که خود مورد استفاده انسان قرار می گیرند نقش بسیار مهمی دارند. صرف نظر از نشاسته و گلیکوژن[2]، سایر پلی ساکاریدها (سلولز[3]، همی سلولز و پکتین) تقریبا بدون تغییر از دستگاه گوارش انسان خارج می شوند. این گروه که تحت نام فیبرهای غذایی از آنها نام برده می شود و عمدتا در دیواره سلولهای گیاهی وجود دارند اگرچه به ظاهر فاقد اهمیت تغذیه ای هستند ولی عملا نقش مهمی در تغذیه و سلامت انسان ایفا می کنند. زیرا باعث ایجاد حجم در مواد غذایی مصرف شده می شوند که این وضع به تخلیه مواد از روده کمک موثری می نماید (فاطمی، ۱۳۸۶).

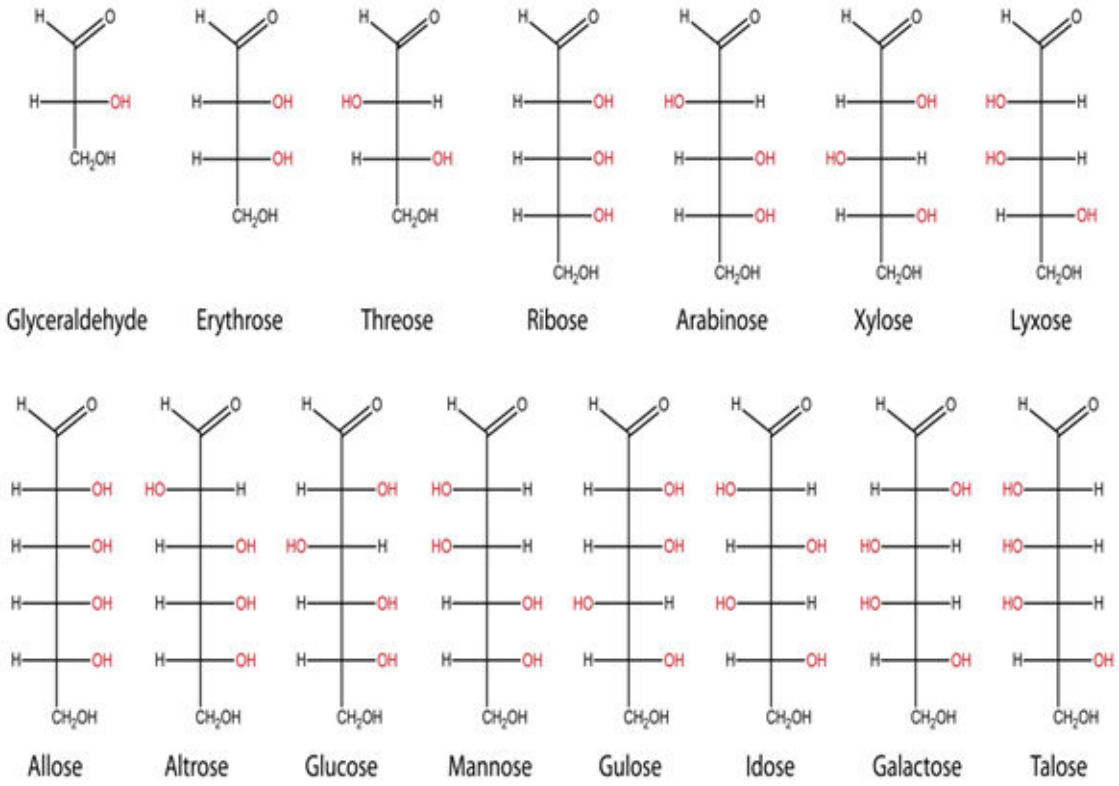
کربوهیدرات ها یکی از مهمترین ترکیبات مواد غذایی می باشند که ممکن است به طور طبیعی در ماده غذایی وجود داشته باشند و یا برای بهبود خواص تغذیه ای و همچنین در بیشتر موارد برای بهبود بافت و افزایش کیفیت محصولات غذایی به آنها افزوده شود. بسیاری از کربوهیدرات ها به عنوان تثبیت کننده و فیبرهای رژیمی به مواد غذایی اضافه می شوند

[1] Pectin
[2] Glycogen
[3] Cellulose

(Yolanda Brummer and Steve W. Cui, 2005). نقش های متنوع و بسیار کربوهیدرات ها به عنوان ترکیبات ساختاری و ذخایر انرژی و دیگر نقش ها آنها را به عنوان مهمترین ترکیبات بیولوژیکی ایجاد کرده است (Zaccheus, 2012)کربوهیدرات ها به سه گروه مونوساکاریدها، الیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها تقسیم می شوند.

مونوساکاریدها بلوک های منفرد ساختمان کربوهیدرات ها هستند. الیگوساکاریدها از ۱۰-۲ مونوساکارید و پلی ساکاریدها از بیش از ۱۰ مونوساکارید تشکیل شده اند. مونوساکاریدها به عنوان آلدوزها[۴] و کتوزها[۵] بر اساس اینکه شامل گروه های آلدوز یا کتوز باشند شناخته می شوند. کربوهیدرات ها را بیش تر بر اساس تعداد اتم کربن موجود در ساختمان آنها دسته بندی می کنند : تریوزها[۶] (۳کربنه ها)، تتروزها[۷] (۴کربنه ها)، پنتوزها[۸] (۵کربنه ها)، هگزوزها[۹] (۶کربنه ها)، هپتوزها[۱۰] (۷کربنه ها) (شکل ۱-۱) (Lundqvist, 2015).

[4] Aldose
[5] Ketose
[6] Triose
[7] Tetrose
[8] Pentose
[9] Hexose
[10] Heptose



شکل ۱-۱ : ساختار عمومی آلدوتریوزها، آلدوتتروزها، آلدوپنتوزها و آلدوهگزوز (Lundqvist, 2015).

ساختمان کلی مونوساکاریدها به عنوان D یا L تعریف می شود و توسط جهت یابی گروه OH کربن بالاترین شماره تعیین می گردد. کربوهیدرات ها به طور وسیعی هم در حیوانات و هم در بافت های گیاهی توزیع شده اند که به عنوان:

- ذخیره انرژی (نشاسته، فروکتان[۱۱]، گلیکوژن، ...)
- مواد ساختاری (سلولز، کیتین[۱۲]، مانان[۱۳]، ...)
- ترکیبات محافظت کننده
- عامل های انتقال اطلاعات (اسیدهای نوکلئیک[۱۴])
- احیا گروه کربونیل[۱۵] برای تولید الکل های قندی

[11] Fructan
[12] Chitin
[13] mannan
[14] Nucleic acid

- اکسیداسیون گروه کربونیل یا هیدروکسیل برای اسیدهای قندی
- جایگزینی یک یا چند هیدروکسیل توسط گروه های مختلف شیمیایی، هیدروژن، برای تولید قندهای داکسی و گروه های آمینو

کربوهیدرات های غذایی شامل طیف گسترده ای از مولکول ها می باشند و بر اساس ساختار شیمیایی به سه گروه اصلی طبقه بندی می شوند:

۱) مولکول ها با وزن مولکولی پایین (مونوساکاریدها و دی ساکاریدها)

۲) الیگوساکاریدها با وزن مولکولی متوسط

۳) پلی ساکاریدها با وزن مولکولی بالا

همانطور که از نام مونوساکاریدها مشخص می باشد در طبیعت به صورت مونومر می باشند که نمی توانند به قندهای ساده تر هیدرولیز شوند (Izydorczyk,et al., 2005).

۱-۲- انواع پلی ساکاریدها:

پلی ساکاریدها از مونوساکاریدها ساخته می شوند که آنها بخشی از کربوهیدرات ها می باشند و ۹۹٪ در گیاهان یافت می شوند. پلی ساکاریدها معمولا خالص نیستند و در تماس با دیگر پلی ساکاریدها، پی فنولیک ها[۱۶] و یا پروتئین ها (که توسط باندهای کوالان یا غیر کوالان) می باشند. معمولا دو نوع پلی ساکارید تجاری استخراج شده با آب و استخراج شده با الکل تولید می شوند که هر دو روشهای بسیار متداولی می باشند. جدا از منشا پلی ساکاریدها اثر ضد توموری پلی ساکاریدها معمولا بخاطر ساختار 3,1-β-glucan و ترکیب پروتئین با β-glucan می باشد (Kawagishi, et al., 1990).

[15] Carbonyl
[16] Polyphenols

۱-۲-۱- پلی ساکاریدهای گیاهی:

۱-۲-۱-۱- سلولز

سلولز فراوانترین کربوهیدرات موجود در طبیعت است. ترکیبات ساختاری گیاهان عمدتا از سلولز تشکیل شده است، مانند چوب که به میزان زیادی از سلولز و لیگنین ساخته شده است. در حالی که کاغذ و نخ شامل سلولز خالص می باشند. سلولز پلیمری است که از واحدهای تقریبا تکراری گلوکز که توسط باندهای β متصل شده اند تشکیل شده است.

سلولز نامحلول در آب می باشد. ۴۰٪ کربن موجود در گیاهان بدلیل حضور سلولز می باشد. سلولز در گیاهان به عنوان ترکیبات فیبری عمل می کند. عمدتا دیواره ی سلول های شامل ۸٪ سلولز و در حالی که ۹۲٪ باقی مانده همی سلولز و پکتین می باشد در صورتیکه دومین دیواره سلول شامل ۹۵٪ سلولز می باشد. طبیعتا فیبرهای سلولز ناخالص می باشند. بعضی از باکتریها سلولز بسیار خالص در مقایسه با جانوران تولید می کنند (Whistler and BeMiller, 1993).

۱-۲-۱-۲- پکتین

پکتین در دیواره های ابتدایی و در بخش های غیر چوبی گیاهان حضور دارد و پکتین از خانواده ی پلی ساکارید های پیچیده می باشد (Khan, et al., 2015). پکتین یکی از بیشترین ترکیبات دیواره سلول های گیاهی می باشد. این ترکیبات به طور معمول در میوه ها و سبزیجات یافت می شوند. پکتین تجاری معمولا محصول ثانویه برخی محصولات در صنایع غذایی می باشد

(Izydorczyk, et al., 2005).

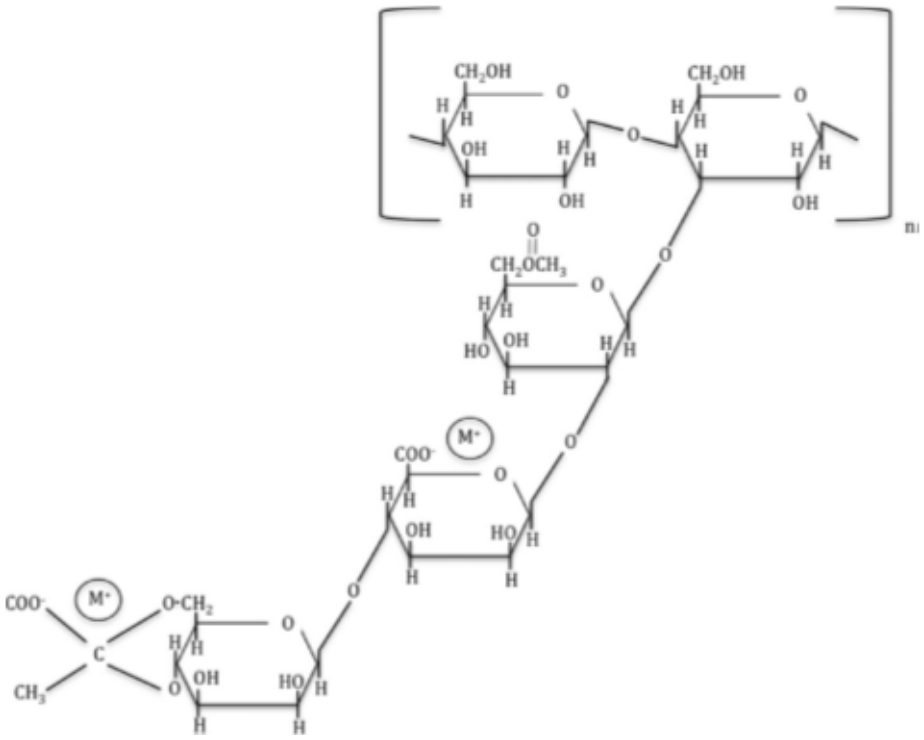
۱-۲-۲- پلی ساکارید های میکروبی:

۱-۲-۲-۱- صمغ زانتان[۱۷]

صمغ زانتان یک پلی ساکارید خارج سلولی می باشد که توسط باکتری زانتاموناس کمپستریس[۱۸] تولید می شود. اولین بار توسط کلکوایل[۱۹] تولید شد و بعد از انجام آزمون های سم شناسی و ایمنی در سال ۱۹۶۹ برای استفاده در غذا در کشور آمریکا مورد تایید FDA قرار گرفت. امروزه زانتان در سرتاسر جهان مورد تایید می باشد و یکی از پلی ساکاریدهایی است که بیشترین مطالعه بر روی آن انجام شده است. مقدار اسید پیرووِیک[۲۰] در صمغ زانتان به طور قابل توجهی به گونه زانتاموناس کمپستریس بستگی دارد. باکتری کمپستریس ایجاد محلول های زانتان با ویسکوزیته های مختلف می کند. صمغ زانتان پلی ساکارید با وزن مولکولی بالا می باشد (۳۰۰۰۰۰ تا ۸۰۰۰۰۰۰ دالتون). مطالعات مدلسازی مولکولی ساختار صمغ زانتان را بصورت مارپیچ با شاخه های جانبی نشان می دهد (Izydorczyk, et al., 2005). همانطور که در شکل ۱-۲ مشخص است زانتان از دو D-گلوکز، دو D-مانوز و یک D-اسید گلوکورونیک تشکیل شده است (Rosalam and England, 2006). صمغ زانتان محلول های بسیار ویسکوز را تشکیل می دهد و در میزان کافی پلیمر، خاصیت ژلاتینی ضعیفی ایجاد می کند. زانتان به طور وسیعی در غذا استفاده می شود به این علت که حلالیت خوبی هم در محلول های سرد و هم در محلول های گرم دارد و حتی ویسکوزیته بالا در غلظت های خیلی پایین صمغ ایجاد می کند و پایداری گرمایی بسیار بالا دارد. صمغ زانتان صمغ غیر ژلی است و به دلیل اینکه رفتار جریان تنش برشی ایده آل و ساختارهای ژل ضعیف دارد. صمغ زانتان در آب سرد هم هیدراته می شود اگرچه حلالیت و آبگیری خوب صمغ بستگی به سایز ذرات، کیفیت حلال، سرعت هم زدن و میزان حرارت مورد استفاده دارد. صمغ زانتان خصوصیات پوششی عالی برای سوسپانسیون های

[17] Xanthan
[18] Xanthomonas campestris
[19] Kelco-AIL
[20] Pyruvic acid

کلوییدی در حالت استراحت ایجاد می کند. همچین کاربرد صمغ زانتـان در محصـولات لبنـی از جملـه بستنی، خامه ترش و خامه استریل زده شـده بـرای بدسـت آوردن ویسـکوزیته مناسـب، دوره پایـداری طولانی، محافظت از شوک حرارتی، کنترل حالت شنی و همچنین خصوصـیات دیگـر در طـول فرآینـد شناخته شده است. صمغ زانتان به ایجاد بافت نرم، هوادهی در بافـت و افـزایش مـدت زمـان نگهـداری محصولات پخت کمک می کند. همچنین صمغ زانتان برای جـذب آب یکنواخـت و بهبـود اخـتلاط بـا مواد خشک کیک مخلوط می شود که این امر برای کیفیت کلی و عمر نگهداری کیکها مهم مـی باشـد (Izydorczyk, et al., 2005)



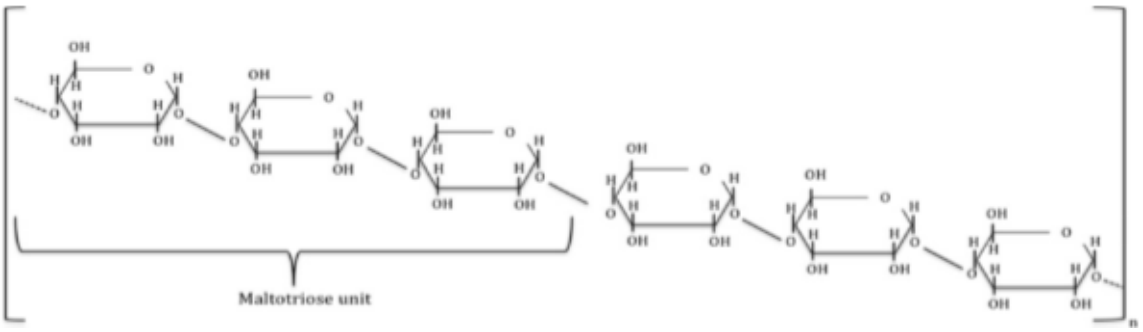
شکل ۱-۲: ساختار زانتان (Donot, et al., 2012).

۱-۲-۲-۲- پولولان

پولولان یک هموپلی ساکارید خارج سلولی گلوکز می باشد که توسط بسیاری از گونه های قارچی ائروبازیدیوم[21] مخصوصا *A. pullulan* تولید می شود. وزن مولکولی پولولان در محدوده ۱۵۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰۰ دالتون می باشد. حضور باند گلیکوزیدی ۶←۱ باعث افزایش انعطاف پذیری شاخه های پولولان و در نتیجه حلالیت خوب آن در آب در مقایسه با دیگر پلی ساکاریدهای خطی شده است (شکل ۱-۳).

پولولان محلول های با غلظت بسیار زیاد ایجاد می کند. پولولان فقط توسط α-آمیلاز بزاق انسان به طور ناقص هیدرولیز می شود. بدلیل پایداری ویسکوزیته ی محلول های حاوی پولولان با pH ثابت کاربردهای پولولان در سس ها و سیستم های غذایی دیگر یافت شده است. پولولان همچنین به عنوان چسب برای کاغذها و محصولات چوبی و فلزها استفاده می شود.

قابلیت هضم کم پولولان آن را به یک ترکیب خوب برای تولید غذاهای کم کالری یا آشامیدنی ها با جایگزینی نشاسته ها تبدیل کرده است. پولولان همچنین یک عامل خوب تشکیل فیلم برای تولید فیلم های خوراکی می باشد. همچنین می توان از آن به عنوان عوامل پوشش دهی برای تولید محصولات با سطح براق و صاف استفاده کرد (Izydorczyk, et al., 2005).



شکل ۱-۳: ساختار پولولان (Donot, et al., 2012).

[21] Aureobasidium

۱-۲-۲-۳- ژلان

صمغ ژلان یک صمغ دی استیل می باشد که یک پلی ساکارید خارج سلولی است و توسط باکتری ائروموناس الوداَ[۲۲] تولید می شود. صمغ ژلان امروزه در بسیاری از کشورها از جمله استرلیا، کانادا، ایالت متحده آمریکا، مکزیک، ژاپن، کره شمالی و فیلیپین به عنوان افزودنی در غذا استفاده می شود. شاخه های پلی ساکارید به محض سرد کردن محلول های حاوی ژلان می تواند مارپیچ های دوتایی تشکیل دهد و ساختار ضعیف ژل را ایجاد می کند. در حضور کاتیون های مناسب (کلسیم یا سدیم) هلیکس های دوتایی با کمک کاتیون ها تشکیل می شود که منجر به تشکیل شبکه های ژلی قوی می شود.

صمغ ژلان به عنوان حامل های ژل کننده استفاده می شود و ویژگی های ژل آن بستگی به درجه ی آسیلاسیون[۲۳] و حضور یون های مخالف دارد. به عنوان مثال صمغ ژلان با میزان گروه آسیل بالا ژل های نرم، الاستیک، شفاف و انعطاف پذیر در غلظت پلیمر بالای ۰/۲٪ تشکیل می دهد. مقاومت ژل صمغ ژلان با میزان آسیل پایین با افزایش غلظت یون افزایش می یابد. ژلان به عنوان عامل های ژل کننده در دسرهای ژلی، محصولات لبنی و صنعت قنادی استفاده می شود

.(Izydorczyk.,et al., 2005)

۱-۲-۲-۴- مالتودکسترین:

مالتودکسترین ها از مهمترین صمغ های مورد استفاده در صنعت مواد غذایی هستند که عموما از هیدرولیز نشاسته به کمک آنزیم های آلفا آمیلاز از انواع گونه های باسیلوس به دست می آیند. مالتودکسترین، پلیمری از ساکاریدهای فاقد طعم شیرین بوده که اکی والان دکستروز آن کمتر از ۲۰ و شامل مخلوطی از ترکیبات با وزن مولکولی بین پلی ساکاریدها و الیگوساکاریدها است که امروزه به صورت پودرهای سفیدرنگ یا شربت های غلیظ در دسترس می باشند. این پلی ساکارید به عنوان یک

[22] *Auromonas elodea*
[23] Acylation

افزودنی غذایی به دلیل ایجاد ژل، قوام، بافت، افزایش ویسکوزیته، مقاومت به دمای بالا، افـزایش میـزان ماده خشک، ممانعت از کریستالیزاسیون و کنترل دمای انجماد اسـتفاده مـی شـوند. مالتودکسـترین هـا در کاهش واکنش های میلارد نیز نقش دارند و در میکروکپسولاسیون ترکیبات غذایی حسـاس، نسـبت به سایر مواد متداول از این نظر مفیدتر هستند(Chronakis, 1998) .

۱-۳- انواع پلی ساکارید های میکروبی:

باکتری ها و قارچ ها انواع مختلفی از پلی ساکاریدها را تولید می کنند. حتی برخی از آنها قادرنـد بـیش از ۵۰٪ وزن خشک خود، پلی ساکارید تولید نمایند. از بین ایـن پلـی سـاکاریدها برخـی دارای خـواص مشابه آگار هستند که بخاطر خصوصیات رئولوژیکی متفاوت، دارای کاربردهای صنعتی ارزشـمند بـوده و به عنوان هیدروکلوئید شناخته می شوند. به طور کلی پلی ساکاریدهای میکروبی بـه دو شـکل مشـاهده می گردند. نوع اول به دیواره سلولی متصل باقی می مانند کـه بـه آنهـا پلـی سـاکاریدهای کپسـولی یـا اندوپلی ساکارید می گویند و نوع دوم که به فضای خارج سلولی، ترشح می شـوند پلـی سـاکارید هـای خارج سلولی یا اگزوپلی ساکارید نامیده می شوند. آنچه در صنعت مورد توجـه قـرار گرفتـه اسـت پلـی ساکارید های خارج سلولی می باشد (Peng, et al., 2003). پلی ساکاریدها بـر اسـاس موقعیـت خـود نسبت به سلول دسته بندی می شوند. برخی از آنها به صورت داخل سلولی سیتوزول[۲۴] قرار گرفته انـد و به عنوان منبع کربن یا انرژی مطرح می باشـند. گـروه دوم بـه عنـوان اجـزای دیـواره سـلولی نظیـر پپتیدوگلیکان[۲۵] و تایکوئیک[۲۶] اسید شناخته می شوند. گروه سوم آنهایی هستند که در خارج از دیـواره ی سلولی واقع می شوند (حاج مصطفی، ۱۳۸۹). این دسته از پلی ساکاریدها آزاد هسـتند و مـی تـوان به راحتی آنها را توسط سانتریفیوژ از سلول های میکروبی جداسازی کرد (Kumar, et al., 2007).

[24] Cytosol
[25] Peptidoglycan
[26] Theichoic acid

۱-۳-۱- اگزو پلی ساکارید[۲۷] های میکروبی:

از نظر تعریف اگزو پلی ساکاریدها، پلی ساکاریدهای بلند زنجیره ای از واحدهای تکرار شونده قندی و غیر قندی هستند که شاخه دار نیز می باشند. واحدهای قندی عمدتا گلوکز، گالاکتوز و رامنوز هستند. به بیان دیگر پلی ساکاریدهای میکروبی ترکیبات برون ریزی هستند که از سلول به بیرون ترشح می شوند و مقدار و ساختمان شیمیایی آنها بستگی به نوع میکروارگانیسم تولید کننده و سوبسترای کربنی دارد که در اختیار آنها قرار می گیرد. در واقع اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی، پلی ساکاریدهای برون سلولی هستند که یا به صورت کپسول[۲۸] با دیواره سلولی ارتباط دارند یا به صورت اسلایم به محیط خارج ترشح می شوند. البته در برخی از موارد هر دو نوع پلی ساکارید (شکل کپسولی و شکل ترشح شونده) توسط یک میکروب تولید می شوند که در چنین حالتی تشخیص نوع پلی ساکارید مشکل است. پلی ساکاریدها بر اساس ارتباط ساختاری خود با دیواره سلولی و اندازه آنها به نام های مختلفی نظیر اسلایم، کپسول و ریز کپسول[۲۹] نام گذاری می شوند. اگزوپلی ساکاریدها، پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا هستند که به عنوان ژله کننده در صنعت غذا مورد استفاده قرار می گیرند. همچنین این ترکیبات می توانند اثرات ثانویه ای به عنوان امولسیفایر، پایدار کننده، تشکیل دهنده سوسپانسیون، کنترل کننده کریستالیزاسیون، مهار آب اندازی، تشکیل فیلم و ریز پوشینه[۳۰] کردن ایفا کنند. پلی ساکاریدهای تولید شده به وسیله ی میکروارگانیسم ها به عنوان محصولات بیوتکنولوژی مدرن پذیرفته شده اند. از این میان تولید زانتان از باکتری زانتوموناس کامپستریس که به علت اثرات منحصر به فرد آن بر روی خواص رئولوژیکی در صنعت غذا استفاده می شود و همچنین هزینه تولید کم آن که تایید شده است، هم اکنون تولید انبوه آن در حال انجام است. میکروارگانیسم

[4] Exopolysaccharide
[28] Capsulla
[29] Microcapsular
[30] Encapsulation

های دیگری نیز پلی ساکارید تولید می کنند. از این میان باکتری های اسید لاکتیک نظیر، پروپیونی باکتری ها[31] و بیفیدوباکتری ها[32] قابل ذکرند (حاج مصطفی، ۱۳۸۹).

اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی شامل هتروپلی ساکاریدها و هموپلی ساکاریدها هستند که نوع اول محتوی دو یا تعداد بیشتری قند بوده و سنتز آن شامل سیستم آنزیمی پیچیده تری می باشد و نوع دوم فقط از یک نوع قند و تحت تاثیر یک سیستم آنزیمی ساده و یا منفرد ساخته می شود (Peng, et al., 2003).

پلی ساکاریدهای خارج سلولی امروزه به دلیل حلالیت در آب سرد و گرم، تغییرات ناچیز ویسکوزیته در دماهای متفاوت، پایداری و حلالیت عالی در سیستم های اسیدی، خصوصیات رئولوژیکی منحصر به فرد، خاصیت پخش شوندگی مناسب، حلالیت در محلول های دارای مقادیر متفاوت املاح، خواص امولسیفایری خوب و پایداری در برابر انجماد و رفع انجماد، مصارف صنعتی گسترده تری یافته اند. همچنین میکروارگانیسم هایی که این اگزوپلی ساکاریدها را تولید می کنند عموما پتانسیل تولید بالایی داشته و فراورده تولیدی آنها به آسانی از طریق تخمیر غوطه وری بازیافت می شوند (شهیدی و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۴- ساختار و فعالیت زیستی پلی ساکاریدهای قارچی:

قارچ ها برخلاف سلولهای جانوری دیواره سلولی و قسمت های پیچیده دارند که اساسا پلی ساکارید را تولید می کنند (Nimrichter, et al., 2005). گلوکان[33]، کیتین و مانان (به ترتیب پلی مرهای شامل واحدهای تکرار شونده گلوکز، N-استیل گلوکز آمین و مانوز) مخصوصا به مقدار زیاد در دیواره ی سلولی قارچ ها وجود دارند. ساختار پلیمری پلی ساکاریدها حداقل از ۱۰ واحد مونوساکاریدی که به طور متوالی توسط باندهای گلیکوزیدی متصل شده اند تشکیل شده است

[31] Propionibacteria
[32] Bifidobacteria
[33] Glucan

.(Bertozzi and Rabuka, 2009)

زمانی که یک مونوساکارید جزء اصلی یک پلی ساکارید باشد و در بیشتر از دو باند گلیکوزیدی وارد شود میتواند ساختارهای خطی یا شاخه ای ایجاد کند. روشهای معمول برای شناسایی ساختار پلی ساکاریدها روشهای کروماتوگرافی همراه با روشهای اسپکتروسکوپی و اسپکترومتری می باشد. این روشها اجازه به شناخت توالی و ترکیب پلی ساکاریدها، ساختار آنومری، نوع پیوندهای گلیکوزیدی و حضور گروه های استخلافی می دهد. ترکیبات ساختار سلولی پلی ساکاریدها در سه دوره زندگی یافت می شوند. مطالعات مختلف نشان می دهد که این پلی ساکاریدها نقشهای بسیار مهمی در تشکیل پوشش سلول دارند. در پاتوژن های میکروبی یوکاریوتی و پروکاریوتی، پلی ساکاریدها ترکیب مهمی در دیواره سلول هستند (Mulloy, et al., 2009).

۱-۵- ویژگی های عملکردی اگزوپلی ساکاریدهای مخمری و امکان استفاده آنها:

پلیمرهای خارج سلولی که توسط میکروارگانیسم ها تولید می شود با عنوان EPS[۳۴] شناخته می شود. این میکروارگانیسم ها در تشکیل و تولید بیوفیلم ها و انجام عملکردهای محافظتی همانند کم آبی و استرس اسمزی نقش دارند (Breierová, et al., 2005).

توانایی ترشح بیوپلیمرها توسط میکروارگانیسم های متعلق به گروه های مختلف ثابت شده است. با توجه به ترکیب، ساختار و ویژگی های فیزیکی می توان کاربرد EPS را در تولید مواد غذایی پیدا کرد. این پلی ساکاریدها شامل زانتان، دکستران، ژلان تولید شده توسط باکتری ها و همچنین پولولان یا اسکلروگلوکان ترشح شده توسط کپک ها هستند. پلی ساکاریدهای خارج سلولی توسط گونه های مختلف مخمر همانند نژادهای بولرا[۳۵]، کاندیدا[۳۶]، کریپتوکوکوس ها[۳۷]، دباریومایسزها[۳۸]، لیپومایسزها[۳۹]،

[34] Extracellular polymeric substances
[35] Bullera
[36] Candida
[37] Cryptococcus
[38] Debaryomyces
[39] Lipomyces

پی شیا[40]، رودوترولا[41] و اسپوروبلومایسزها[42] تولید می شوند. تولید EPS مربوط به متابولیسم ثانویه مخمر می باشد و ساختار و ویژگی های فیزیکی آنها بستگی به فاکتورهای زیادی دارد که شامل ترکیبات محیط کشت و شرایط تخمیر از جمله pH، دما و غلظت اکسیژن است.

(Rusinova Videva, et al., 2010).

متاسفانه بازده پایین بیوسنتز این متابولیت ها مانع از تولید آنها در مقیاس صنعتی می شود و استفاده گسترده آنها را محدود می کند. انتخاب گونه هایی با بازده بالا، بهینه سازی شرایط تولید و همچنین شناخت مکانیزم های مولکولی و مبانی بیوشیمیایی تولید بیش از حد، یکی از وظایف مورد نیاز و ضروری برای کاربرد صنعتی اگزوپلی ساکارید هستند (Gientka, et al., 2015).

کاربردهای اگزوپلی ساکارید های مخمری و امکان استفاده از آنها مدت زمان زیادی است که شناخته شده است برای مثال مخمرها می توانند گالاکتوالیگوساکاریدها را تولید کنند که باعث افزایش تکثیر بیفیدوباکتریها در روده می شود یکی از آنها مخمر اسپوروبلومایسز سینگولاریس[43] می باشد که گالاکتوالیگوساکارید تولید می کند. مخمرهای ردوترولا مینوتا[44] گالاکتوالیگوساکاریدها را در محیط با لاکتوز و گلوکوالیگوساکاریدها را در محیط سلوبیوز[45] تولید می کنند. اگرچه گونه های لیپومایسز، پی شیا، کلوی وروماسیز[46]، کاندیدا، ترولوپسیز[47]، بولرا و بریتانومایسز[48] گالاکتوالیگوساکاریدها را در حاوی لاکتوز تولید می کنند که باعث تحریک رشد بیفیدوباکتریوم ها می شوند. به طور کلی ساختار این بیوپلیمرها $Gal-(Gal)_n-Glc$ می باشد که Gal نماد مولکول گالاکتوز و Glc نماد مولکول گلوکز می باشد و n در محدوده ی بین ۴-۱ می باشد. مانان توسط ردوترولا گلوتینیس[49] تولید شده به

[40] Pichia
[41] Rhodotorula
[42] Sporobolomyces
[43] Sporobolomyces Singularis
[44] Rhodotorula minuta
[45] Cellobios
[46] Kluyveromyces
[47] Torulopsis
[48] Brettanomyces
[49] Rhodotorula glutinis

عنوان آنتی ژن ایمنی فعال در تشخیص سرولوژیک لیپتوسپیروسیس[50] مورد استفاده قرار می گیرد. این بیماری توسط باکتری جنس لپتوسپرا[51] ایجاد می شود (Matsuo, et al., 2000).

۱-۶- نقش پلی ساکاریدهای میکروبی در طبیعت:

میکروارگانیسم های مولد پلی ساکارید های برون سلولی از انواع محیط های مختلف جداسازی شده است. نقش این پلی ساکاریدها متنوع است. پلی ساکاریدهای پوشینه ای، میکروارگانیسم های بیماری زا را در برابر سیستم دفاعی میزبان حفاظت می کند. همچنین این پوشینه ها به عنوان موانع فیزیکی در برابر آلودگی به فاژها عمل می کنند. افزون بر این، پوشینه ها و غلاف ها آب را در خود حفظ نموده و در برخی موارد در پیشگیری از خشک شدن سلول ها نقش مهمی ایفا می کنند. یک نقش مشترک پلی ساکاریدهای برون سلولی سلول های میکروبی آب و خاک، اتصال به سطوح است، نظیر اتصال به ذرات خاک یا سنگ و همچنین اتصال به یکدیگر. به همین ترتیب، تصور می شود که پلی ساکاریدهای برون سلولی برخی از عوامل بیماری زای گیاهی در اتصال این باکتری ها به سطوح گیاهان میزبان نقش دارند (ملک زاده و همکاران، ۱۳۹۵).

۱-۷- اهمیت مخمرها در تولید:

شناخت میکروارگانیسم ها به عنوان موجوداتی که می توانند به خدمت انسان درآیند به دو قرن اخیر باز می گردد (ملک زاده و همکاران، ۱۳۹۵). بیوماس و محصولات حاصل از مخمرها در بخش های زیادی کاربرد خواهند داشت که شامل نوشیدنی های الکلی، غذاها، سوخت های زیستی، مواد شیمیایی صنعتی (جدول ۱-۱)، مواد دارویی و کنترل آلودگی است. به علاوه سلولهای مخمر به عنوان مدل تجربی در تحقیقات زیست پزشکی اهمیت دارند. با این وجود اولین تاثیر تجاری مخمر بر غذا و فرآیندهای تخمیری، جایی که ارتباط میان مخمر و آب جو و نان برای استفاده عمومی کاملا شناخته شده است، بوده و همچنان باقی خواهد ماند. سلامت انسان و همچنین تغذیه انسان، احتمالا نقش

[50] Leptospirosis
[51] Leptospira

شناخته شده ی دیگر مخمر در آینده خواهد بود به ویژه زمانی کـه نقـش روزافـزون مخمرهـا در تولیـد مواد دارویی و تحقیقات سرطان در نظر گرفته شود (شهیدی و همکاران، ۱۳۸۹).

جدول ۱-۱- مواد شیمیایی صنعتی مفید، تولید شده توسط مخمرها (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

ماده شیمیایی	مثال	مخمرها
اسیدهای آلی	سیتریک	یاروویا لیپولیتیکا, کاندیدا گیلرموندی
	ایتاکونیک	گونه های کاندیدا و ردوترولا
	مالیک	کاندیدا یوتیلیس
	D-گلوکورونیک	گونه های ساکارومایکوپسیس, اورئوبازیدیوم
	L-ایزوسیتریک	کاندیدا برومپتی
	آلفا کتوگلوتاریک	کاندیدا هیدروکربوفوماریکا
	براسیلیک	ترولوپسیس, کاندیدا
	سباسیک	ترولوپسیس, کاندیدا
	فوماریک	کاندیدا هیدروکربوفوماریکا
اسیدهای چرب	استئاریک	کریپتوکوکوس کوراتوس
	دی کربوکسیلیک بازنجیره بلند	کاندیداتروپیکالیس
اسیدهای آمینه	لایزین	ساکارومایسیس سروزیه و کاندیدا یوتیلیس
	تریپتوفان	گونه های کاندیدا و هانسنولا
	فنیل آلانین	ردوترولا روبرا
	گلوتامیک اسید	ساکارومایسیس سروزیه
	متیونین	ساکارومایسیس سروزیه

ویتامین ها	ریبوفلاوین	کاندیدا فلاوری, کاندیدا گیلرموندی
	پیریدوکسین	گونه های پی شیا
	D-اریترو-آسکوربیک اسید	کاندیدا, کلایورومیسس, ترولوپسیس
استرول ها	ارگوسترول	ساکارومایسیس سروزیه
	پیش سازهای استروئید	گونه های هانسنولا, پی شیا و پکی سولن
پلی ساکاریدها	پولولن	اورئوبازیدیوم پولولنس
	فسفومانان	گونه های هانسنولا, پی شیا و پکی سولن
	صمغ ها	
	گلیکولیپیدها	یاروویا لیپولیتیکا و تورولوپسیس بومیکولا

۱-۸- استخراج:

یک تحقیق آنالیزی برای ترکیبات طبیعی شامل سه مرحله استخراج، تبخیر و آنالیز می باشد (Chemat, et al., 2015). روشهای شیمیایی و فیزیکی یا ترکیبی از روشهای شیمیایی و فیزیکی برای استخراج استفاده می شود. این روشهای مختلف می تواند بر اساس دو معیار کیفیت و کمیت EPS استخراج شده مقایسه شود. در واقع محصولات استخراج ممکن است با عوامل استخراج شیمیایی یا پروتئین ها به علت تیمارهای استخراج آلوده شود. در حین استخراج EPS، تجزیه سلول در مراحل مختلف استخراج ممکن است اتفاق بیفتد که اندازه گیری اگزوپلی ساکارید را مشکل می کند. با اندازه گیری میزان پروتئین و اسید نوکلئیک یا رهایش ترکیبات داخل سلولی می توان به مقدار دقیق اگزوپلی ساکارید پی برد (D'Abzac, et al., 2010). تغییر در ترکیب و خواص EPS ممکن است با شکسته شدن این ماکرومولکول رخ دهد (Wang, et al., 2010).

۱-۸-۱- روشهای استخراج **EPS** :

تعداد روشها برای استخراج EPS از محیط های کشت میکروبی در حال توسعه می باشد (Sheng, et al., 2011.) روشهای استخراج شیمیایی شامل روشهای رزین مبادله کاتیونی (CER)، فرمالدهید/NAOH EDTA، گلوتارالدئید یا روش قلیایی می باشد. در روش استخراج قلیایی تا ۷۵٪ مواد آلی بدست می آید. معمولا نتایج راندمان استخراج به روش های رزین و فرمالدهید/NAOH یکسان می باشد (Becerra, et al., 2010). روشهای استخراج فیزیکی شامل روشهای التراسونیک، سانتریفوژ تیمار مایکروویو یا حرارت دهی می باشد که اجازه به جدا شدن سلول های میکروبی از EPS تولید شده می دهد. معمولا راندمان روشهای فیزیکی کمتر از روشهای استخراج شیمیایی می باشد (Comte, et al., 2006a). یک روش ساده برای استخراج EPS میکروبی به طور کمی و کیفی وجود ندارد. روش استخراج برای هر مورد باید با توجه به ویژگی های EPS انتخاب شود (Donot, et al., 2012).

جداسازی و حذف سلول ها به آسانی صورت می گیرد و به راحتی مایع روی سلول های ته نشین شده برداشته می شود، ولی اگر سلول ها تجمع پیدا نکنند نیاز به مراحل دیگری می باشد. معمولا برای جداسازی سلول ها از سانتریفیوژهای بزرگ استفاده می شود. عیب عمده سانتریفیوژ کردن تولید خمیره غلیظ است ولی اگر به محصول خشک نیاز باشد به فرآیند بیشتری مانند فیلتر کردن احتیاج می باشد. اصول سانتریفیوژها گردش اشیاء بدور یک نقطه مرکزی که نیرویی به آنها وارد می سازد که این نیرو سرعت رسوب دهی اجزا را افزایش می دهد و سبب شفاف سازی و تصفیه مایع می شود. فیلتر کردن یکی دیگر از کارهایی است که می توان با آن مواد جامد را از مایعات جدا کرد. در فیلتر کردن انتخاب مواد اولیه که برای فیلتر کردن استفاده می شوند بسیار مهم می باشند. هنگامیکه محصول مطلوب به درجه خالص سازی بالایی نیاز داشته باشد (مانند تولید اسید آمینه)، بهترین تدبیر فیلتراسیون غشایی[۵۲] می باشد. فراپالایش[۵۳] بیشتر برای جداسازی مولکولهای بزرگ مانند آنزیمها از

[52] Membrance filtration

مایعات استفاده مـی شـوند. در ایـن روش ترکیبـات بـا وزن مولکـولی کـم از غشـا عبـور مـی کننـد و مولکولهای بزرگ نگه داشته می شوند. روش اسمز معکوس نیز از غشا استفاده مـی شـود امـا انـدازه ی روزنه ها کمتر از روزنه های غشای مورد استفاده در فراپـالایش مـی باشـد. اسـمز معکـوس راه مفیـدی برای تغلیظ محلولهایی با وزن مولکـولی پـایین مـی باشـد. غشـای اسـمز معکـوس مولکولهـایی بـا وزن مولکولی بالاتر از ۱۰۰۰ دالتون را نگه می دارد. خـالص سـازی را مـی تـوان بـا عبـور مـایع ورودی بـه ستونهای تبادلگر یونی انجام داد. برهمکنش های الکترواستاتیکی عامل اتصـال محصـول بـه سـتون مـی باشند و پس از آن محصول را می توان به راحتی جداسازی نمود (حبیبی نجفی و سالاری، ۱۳۹۳).

۱-۹- خالص سازی و حذف ناخالصی ها:

چندین میکروارگانیسم از جمله اسید لاکتیک باکتری ها، قارچ ها، مخمرها و همچنـین گیاهـان توانـایی تولید پلی ساکارید، پلیمرهایی حلال و غیر حلال را دارند (Tieking and Ganzle, 2005). ویسـکوزیته و فعالیت بیولوژیکی پلی ساکارید بستگی بـه سـاختار اولیـه، وزن مولکـولی و ترکیبـات قنـدی آن دارد (Poli, et al., 2010) و میزان پلی ساکارید تولید شده بستگی بـه ترکیبـات محـیط کشـت و شـرایط کشت مورد استفاده برای رشد میکروارگانیسم دارد (Trabelsi, et al., 2015).

پلی ساکارید خارج سلولی حاصل از میکروارگانیسم ها توسط تخمیر از ارگانیسم مورد نظر جـدا شـده و عصاره خام از مخلوط پروتئین، پلی سـاکارید و متابولیـت هـای ثانویـه تشـکیل شـده اسـت. همچنـین تخلیص برای بدسـت آوردن محصـولات مناسـب بـرای مصـرف انسـان و حیـوان یـا بـرای اسـتفاده در داروسازی لازم است(Venugopal 2011)

خالص سازی پلی ساکارید توسط کروماتوگرافی تبادل آنیون[۵۴] اساسا بـر پایـه ویژگـی هـای یـونی پلـی ساکاریدها می باشد. کروماتوگرافی تبادل آنیون، بـه عنـوان مثـال، DEAE-52[۵۵]، Q-سـفاروز[۵۶] جریـان سریع و DADE سفاروز CL-6B که معمولا آب مقطر و توسط محلول کلرید سدیم شسـته مـی شـوند

[53] Ultrafiltration
[54] Anion exchange chromatography
[55] Diethylaminoethyl
[56] Q-Sepharose

(Guo, et al., 2014; Hallack, et al., 2010; Liu, et al., 2009; Singh, et al., 2011). در نتیجه پلی ساکاریدهای خنثی و اسیدی در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون می توانند جداسازی و خالص سازی شوند. برخلاف کروماتوگرافی تبادل آنیون، خالص سازی پلی ساکاریدها در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون برپایه وزن مولکولی پلی ساکاریدها می باشد. سفادکس[57]، سفاکریل[58] و سفاروز معمولا ژل های مورد استفاده برای این منظور هستند

(Guo, et al., 2014; Liu, et al., 2009; Mahapatra & Banerjee, 2016).

۱-۱۰- حذف پروتئین ها:

پروتئین ها یکی از ترکیبات مهم سلولی می باشند که در تنظیم متابولیسم سلولی نقش دارند. سنتز سریع پروتئین در سلولهای میکروبی در حال تقسیم رخ می دهد (شهیدی و همکاران، ۱۳۸۹). پروتئین زدایی یک قدم کلیدی برای خالص سازی اگزوپلی ساکارید می باشد

(Chen, et al., 2013; Dong, et al., 2014; Li, et al., 2012).

انتخاب روشی برای حذف پروتئین ها به ویژگی های فیزیکوشیمیایی پروتئین مانند میزان انحلال، نقطه ایزوالکتریک آن، همچنین کیفیت و کمیت فرآورده های جانبی و نوع کاربرد محصول برای مصارف تغذیه ای یا دارویی بستگی دارد (Komatsuzaki, et al., 2005).

امروزه به طور معمول از روش سواگ[59] برای پروتئین زدایی استفاده می شود. پروتئین زدایی با روش سواگ اغلب باعث کاهش بازده اگزوپلی ساکارید می شود. بعلاوه مواد شیمیایی مورد استفاده در این روش برای طبیعت بی فایده است و همچنین اگر در دارو و مواد غذایی استفاده شود ممکن است برای بدن انسان مضر باشد (Liu, et al., 2010). روش ساده توسعه یافته برای حذف همزمان مواد رنگی و پروتئین روش رزین ماکروپروس[60] می باشد. اخیرا این روش به طور موفقیت آمیزی برای حذف پروتئین و مواد رنگی بکار برده شده است (Cai, et al., 2016).

[57] Sephadex
[58] Sephacryl
[59] Sevag
[60] Macroporous resin

بسیاری از پروتئین ها نیز به طور مناسبی با رسوب دهی خالص می شوند اغلب مطلوب است که رسوب دهی پروتئین ها در مقیاس صنعتی بدون استفاده از حلالهای آلی انجام شود. تغییر pH یا مقدار نمک در یک محلول آبی یا کاهش حلالیت به وسیله تغییرات دما راه حل هایی است که می توانند در این زمینه وجود داشته باشند. سولفات آمونیوم اغلب برای رسوب دهی پروتئینها با نمک استفاده می شود زیرا حلالیت بالایی در آب دارد (حبیبی نجفی و سالاری، ۱۳۹۳).

۱-۱۱- ترسیب:

جداسازی سلول های میکروبی با سانتریفیوژ کردن یا فیلتراسیون انجام می شود که رقیق کردن محیط کشت مایع با آب دیونیزه باعث کاهش ویسکوزیته و تسهیل این عمل می شود (Smol Kina, et al., 2012).

رسوب پلیمر از محیط فاقد سلول میکروبی با افزودن اتانول[۶۱] یا ایزوپروپانول[۶۲] که معمولا با تکرار شستشوی رسوب با اتانول و استون[۶۳] انجام می شود (Freitas, et al., 2011).

۱-۱۲- شناخت و تشخیص ساختمان مولکولی:

ویژگی ساختاری پلی ساکاریدها بر اساس وزن مولکولی، آرایش مونوساکاریدها و ساختمان فضایی آنها، الگو و توالی باندهای گلیکوزیدی، ساختار شاخه و ساختمان حلقه ها و ... تعیین می شود (Nie and Xie, 2011). وزن مولکولی اگزوپلی ساکاریدها معمولا توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۶۴] (HPLC) تعیین می شود (Serrato, et al., 2013). برای آنالیز آرایش مونوساکاریدها، اگزوپلی ساکارید معمولا تحت هیدرولیز اسیدی قرار می گیرد و بر اساس مشتق شدن به آلدیتول استات ها[۶۵] یا مشتق تری متیل سیلیل[۶۶] تعیین می شود. مشتقات بدست آمده می تواند در کروماتوگرافی گازی (GC) با شناساگر طیف سنج جرمی[۶۷] آنالیز شود (Orlandelli, et al., 2016).

[61] Ethanol
[62] Isopropanol
[63] Acetone
[64] High-performance liquid chromatography
[65] Alditol acetates
[66] Trimethylsilyl
[67] Gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS)

ساختار قند را می توان توسط کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با مقایسه زمان نگهداری آنها با ترکیبات استاندارد تعیین کرد (Guo, et al., 2014). روش های آنالیزی دیگر، مانند کروماتوگرافی کاغذی[۶۸] و کروماتوگرافی لایه نازک[۶۹] به ندرت برای آنالیز آرایش مونوساکاریدها مورد استفاده قرار می گیرد (Mahapatra and Banerjee, 2016).

انواع مونوساکارید، باندهای گلیکوزیدی و گروه های عملکردی اگزوپلی ساکارید می تواند توسط FTIR[۷۰] آنالیز شوند. الگوی باندهای گلیکوزیدی اگزوپلی ساکارید معمولا توسط متیلاسیون تمام گروه های هیدروکسیل، بر اساس هیدرولیز پلی ساکارید به مونوساکاریدها، احیاء آلدیتول ها و استیلاسیون[۷۱] برای بدست آمدن آلدیتول استات های متیله شده، که سرانجام توسط GC-MS آنالیز می شوند. اکسیداسیون اسید پریودیک[۷۲] و تجزیه اسمیت[۷۳] می توان به منظور کاهش توالی باندهای گلیکوزیدی اگزوپلی ساکارید استفاده شود(Serrato, et al., 2010).

۱-۱۳- متیلاسیون:

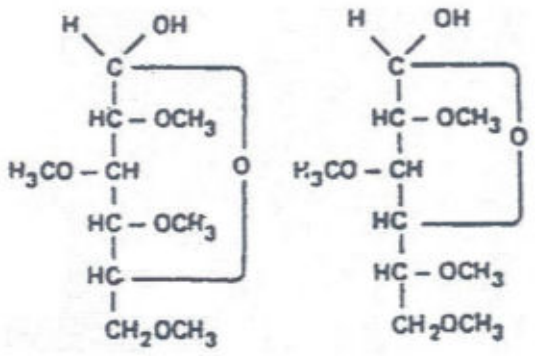
آنالیز متیلاسیون یکی از مهمترین روش ها در شیمی ساختار پلی ساکاریدها می باشد. این روش شامل متیلاسیون تمام گروه های هیدروکسیل در پلی ساکارید، هیدرولیز پلی ساکارید کاملا متیله شده به مخلوطی از قندها و آنالیز کمی و کیفی این مخلوط می باشد. بنابراین این روش اطلاعاتی در مورد تمام واحدهای ساختمان پلی ساکارید ارائه می دهد اما در مورد نحوه آرایش واحدهای قندی و خواص آنومری آن از این روش اطلاعاتی بدست نمی آید (Björndal, et al., 1970).

توسط روش متیلاسیون یعنی استخلاف یک گروه متیل به جای یکی از هیدروکسیل ها می توان، محل اتصال یعنی محل تشکیل حلقه را در قند مشخص کرد. به این صورت که در کربن شماره ۵

[68] Paper chromatography
[69] Thin layer chromatography
[70] Fourier-transform infrared
[71] Acetylation
[72] Periodic acid oxidation
[73] Smith degradation

گلوکز، گروه متیل جایگزین نمی شود (شکل ۱-۴) و بیان گر این است که این کربن درگیر تشکیل حلقه اکسیژنی می باشد (هماپور، ۱۳۹۲).

روش آنالیز متیلاسیون[۷۴] به عنوان روشی برای تعیین ساختار کربوهیدرات ها بیش از یک قرن استفاده می شود و هنوز هم قوی ترین روش در آنالیز ساختار کربوهیدرات می باشد. آنالیز متیلاسیون متشکل از دو مرحله مشتقات شیمیایی و کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC-MS) می باشد (Cui, 2005).



شکل ۱-۴: متیلاسیون قندها (هماپور، ۱۳۹۲).

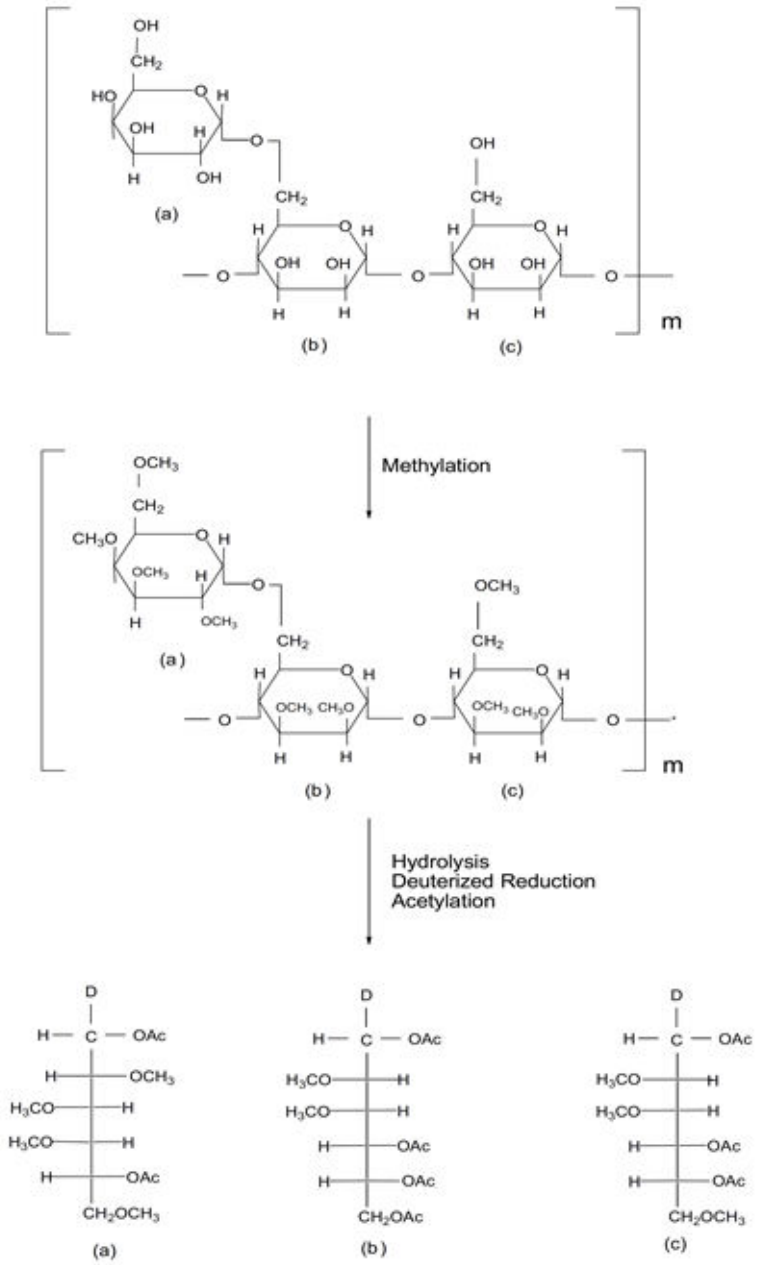
۱-۱۳-۱- واکنش متیلاسیون

مشتقات یک پلی ساکارید برای آنالیز متیلاسیون شامل تبدیل همه ی گروه های هیدروکسیل آزاد به متوکسیل بر اساس هیدرولیز اسیدی می باشد. هیدرولیز اسیدی در پلی متیل اتر[۷۵] حاصل فقط پیوندهای گلیکوزیدی داخلی را می شکند و باندهای متیل اتر سالم را هم می شکند. مونومرهای هیدرولیز شده برای دستیابی به محصولات فرار به عنوان مثال آلدیتول استات متیله شده احیا و استیله می شوند که می توان این ترکیبات را توسط کروماتوگرافی گازی با شناساگر طیف سنج جرمی شناسایی کرد (شکل ۱-۵). الگوی جایگزینی گروه های O-استیل در آلدیتول استات متیله شده، الگوی باندها و سایز حلقه های قندهای مربوطه در پلیمر اصلی را نشان می دهد. اگرچه این روش هیچ اطلاعاتی در مورد توالی آنومریک باندهای گلیکوزیدی نمی دهد. به طور تجربی، واکنش تبدیل

[74] Methylation
[75] Poly-methyl-ethers

گروه های هیدروکسیل به متوکسیل نیازمند یک محیط قلیایی و گروه متیل مـی باشـد. اکسـید نقـره-متیل یدید[۷۶] و سدیم هیدروکسید-متیل سولفات[۷۷] در گذشته استفاده می شدند. سپس ایـن روش هـا توسط سدیم و متیل یدید جایگزین شدند. اخیرا یک روش ساده تـر بـا اسـتفاده از پـودر هیدروکسـید سدیم و متیل یدید ایجاد شده است. این روش با استفاده از سوسپانسـیون هیدروکسـید سـدیم در دی متیل سولفوکسید[۷۸] خشک اصلاح شده است. لازمه ی واکنش متیلاسیون حلالیت کامل پلـی سـاکارید در DMSO می باشد. این حلالیت را می توان با هم زدن ثابت یا تیمار التراسونیک[۷۹] در دماهـای بـالای ۷۰°C بدست آورد. انحلال ناقص در متیلاسیون باعث عدم نتیجه گیری درست در مـورد سـاختار مـی شود. متیلاسیون ناقص معمولا به دلیل عدم حلالیت بخش هـای غیـر محلـول پلیمـر مـی باشـد. پلـی ساکارید متیله شده با بخـش بنـدی بـین آب و متـیلن کلریـد[۸۰] یـا توسـط دیـالیز تـرمیم مـی شـود. هیدرولیزهای بعدی پلی ساکاریدهای متیله شده در اسیدهای معدنی بـه دسـت مـی آیـد. اسـید تـری فلوئورو استیک[۸۱] (TFA) اغلب به دلیل تبخیر سریع مورد استفاده قرار می گیرد. معمـولا پلیمـر متیلـه شده در ۴ مول اسید تری فلوئورو استیک در ۱۰۰°C یا ۱۲۰°C به مدت ۴ تا ۶ ساعت هیـدرولیز مـی شود و سپس اسید تری فلوئورو استیک تحت جریان نیتروژن تبخیر می شود. وجود گاز بـی اثـر ماننـد نیتروژن می تواند از انجام واکنش های مضر مانند اکسیداسیون جلوگیری کند (Cui, 2005b).

[76] Silver oxide–methyl iodide
[77] Sodium hydroxide–methyl sulphate
[78] Dimethyl sulfoxide (DMSO)
[79] Ultrasonic
[80] Methylene chloride
[81] Trifluoroacetic acid



شکل ۱-۵: مراحل واکنش شیمیایی در تجزیه متیلاسیون (Cui, 2005b).

بعد از هیدرولیز، اگر از اسید معدنی به جز اسید تری فلوئورو استیک استفاده شود ترکیبات هیدرولیز شده باید به pH خنثی برسند. برای مثال از کربنات باریم می توان برای خنثی کردن اسید سولفوریک استفاده کرد و رسوب کربنات باریم را می توان توسط سانتریفوژ و فیلتراسیون جداسازی کرد. مونوساکاریدها را می توان با هیدرولیز و تبدیل به آلدیتول ها، احیا کرد و توسط تیمار هیدرولیزات با

برودئوترید تحت شرایط آلکالین بدست آورد. هنگامی که پلی ساکارید حاوی اسیدهای اورونیک شامل رامنوگالاکتوروناز پکتین های گیاهی و پلی ساکاریدهای اسیدی باشد آنالیز متیلاسیون بسیار دشوار می باشد. علاوه بر این اسیدهای اورونیک به طور کلی مقاوم به هیدرولیز اسیدی می باشند در نتیجه اطلاعات پیوند اسید اورونیک و قندهای خنثی که متصل شدند می تواند در طی آنالیز متیلاسیون از بین رود. این مشکل بالقوه را می توان با احیاء گروه کربوکسیل از بین برد.

.(Singthong, et al., 2004)

۱-۱۴- بهینه سازی تولید اگزوپلی ساکارید توسط مخمرها با استفاده از روش سطح پاسخ (**RSM**[۸۲]):

۱-۱۴-۱- ترکیبات محیط کشت برای تولید اگزوپلی ساکارید

تولید اگزوپلی ساکارید توسط میکروارگانیسم ها به شدت تحت تاثیر ترکیبات محیط کشت و شرایط کشت می باشد. اثرات ترکیبات مختلف محیط کشت از جمله منابع کربن، نیتروژن، مواد معدنی و سورفاکتانت ها[۸۳] به روش یک فاکتور مورد آزمایش قرار می گیرد. به طور کلی، منبع کربن مهمترین ماده غذایی و منبع انرژی برای رشد سلول می باشد و منابع مختلف کربن می تواند اثرات متفاوتی بر متابولیسم ثانویه سلول بگذارد(Kim, et al., 2005) . قندها شامل نشاسته، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، ساکارز، لاکتوز و مالتوز از منابع کربنی متداول برای تولید اگزوپلی ساکارید می باشند (Li, et al., 2016). بعضی از محققان معتقدند که میزان تولید اگزوپلی ساکارید بسیار تحت تاثیر غلظت منبع کربنی می باشد (Mahapatra and Banerjee, 2016). افزایش غلظت منبع اولیه کربن در محیط کشت معمولا منجر به افزایش تولید اگزوپلی ساکارید می شود (Liu, et al., 2009).

منبع نیتروژن نیز یکی از فاکتورهای مهم مواد غذایی برای تولید اگزوپلی ساکارید می باشد. منابع نیتروژن می توانند از طریق تامین نیتروژن برای سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک به رشد سلول کمک کنند، و همچنین می توانند به تنظیم تولید آنزیم کمک کنند. منابع نیتروژنی بسیاری از جمله عصاره

[82] Response surface methode
[83] Surfactants

مخمـر، عصـاره گوشـت، پپتـون، اوره، NH_4CL، گلایسـین، NH_4NO_3 و $NaNO_3$ اغلـب بـرای تولیـد اگزوپلی ساکارید استفاده می شود. در مقایسه با منابع نیتروژن آلی، تولیـد اگزوپلـی سـاکارید بـا منـابع غیرآلی نسبتا کمتر می باشد(Li, et al., 2016)ثابت شده اسـت کـه Ca^{2+}و Mg^{2+} و فسـفات محـرک مهمی برای ترشح EPS می باشند. یون های فلزی نه تنها می توانند با افزایش نفوذ پذیری غشـاء باعـث افزایش استخراج شوند همچنین در بیوسنتز EPS با قرار گرفتن به عنوان کوفاکتور آنزیم هـای کلیـدی نقش دارد. علاوه بر این فسفات ممکن است نقش پروتون ATP آز داشـته باشـد کـه حرکـات غشـایی مواد مختلف را کنترل می کند و یا بـرای فسفوریلاسـیون و دفوسفوریلاسـیون آنـزیم هـای مهـم بـرای تولید EPS نقش دارد (Mahapatra and Banerjee, 2016).

بعد از تعیین مناسبترین منبع کربن و نیتروژن برای بهینه کردن شرایط محـیط کشـت اغلـب از روش سطح پاسخ (RSM) استفاده می شود (Liu, et al., 2010).

۱-۱۴-۲- تغذیه مخمر و نیازهای تغذیه ای آن:

تغذیه مخمر اشاره به چگونگی کسب مواد غذایی توسط سلول های مخمـر دارد. بـه صـورت اختصاصـی تر، تغذیه مخمرها به چگونگی انتقال آب و مواد معـدنی و آلـی از محـیط رشـد اطـراف آنهـا، از طریـق دیواره ی سلولی مخمر، در عرض غشاء سلولی و به درون محـیط سـلولی اشـاره دارد. همچنـین تغذیـه مخمر به استفاده از منابع غذایی مهم برای واکنش های آنابولیکی[۸۴] و کاتابولیکی[۸۵] کـه در نهایـت رشـد و بقاء سلول مخمر را تضمین می کنـد اشـاره دارد. درک نیازهـای تغذیـه ای مخمـر و اسـتراتژی هـای کسب مواد غذایی همراه با تنظیم انتقال ماده غذایی، نه تنها برای کشت موفـق مخمرهـا در آزمایشـگاه، بلکـه بـرای بهینـه کـردن فرآینـدهای تخمیـر صـنعتی اهمیـت دارد (پورنیـا و کچـوئی، ۱۳۹۱). سوبستراهایی که میکروارگانیسم ها برای رشد استفاده می کنند، بسیار متنوع اند. تمام میکروارگانیسـم ها برای رشد و نمو به یک منبع انرژی نیاز دارند. همه ی میکروارگانیسم ها به کـربن بـرای اسـتفاده در

[84] Anabolic
[85] Catabolic

سنتز اجزای سلولی نیاز دارند. همه ی موجودات برای بقا به نیتروژن نیازمندند. تمام موجودات زنده به یون های فلزاتی همچون آهن، منیزیوم، کلسیم و پتاسیم برای رشد معمولی خود نیاز دارند. تمام موجودات به اکسیژن، سولفور، فسفر نیز برای سنتز اجزای سلولی خود احتیاج دارند. اکسیژن به صورت گوناگون تامین می گردد. همه ی مواد مغذی بایستی قبل از اینکه وارد سلول شوند به صورت محلول در آب در آیند. همچنین، آب به عنوان یک واکنشگر شیمیایی که در بسیاری از واکنش های هیدرولیتیک دخالت و مشارکت دارد. از آنجایی که میکروارگانیسم ها نیازهای تغذیه ای متفاوت دارند، اختلافاتی در ترکیب شیمیایی محیط های استفاده شده در کشت آزمایشگاهی وجود دارد (Doyle and Beuchat, 2007).

۱-۱۴-۲-۱- کربن:

مخمرها موجودات شیمیوارگانوتروف[۸۶] هستند. این بدان معنی است که آنها برای تهیه ی کربن و انرژی از پیوند آلی و تثبیت شده ترکیبات استفاده می کنند. این ترکیبات بیشتر قندها هستند و در این میان گلوکز به صورت گسترده ای توسط مخمر جذب می شود. هر چند که گلوکز مهمترین قند متابولیز شونده در همه مخمرها نیست. اگر چه گلوکز به صورت معمول به محیط های کشت آزمایشگاهی برای رشد مخمرها اضافه می شود، این قند به صورت آزاد در زیست گاه های طبیعی مخمر در دسترس نیست (در سلولز، نشاسته و دیگر پلی ساکاریدها پلیمریزه شده) یا در بسیاری از سوبستراهای تخمیری صنعتی (جایی که قندهایی مانند مالتوز، سوکروز، فروکتوز، زایلوز و لاکتوز قندهای معمولتر هستند) به صورت آزاد وجود ندارد (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

۱-۱۴-۲-۱-۱- نشاسته:

نشاسته هموپلی ساکاریدی[۸۷] از واحدهای D-گلوکز است که از طریق پیوند گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده اند. نشاسته از دو قسمت آمیلوز و آمیلو پکتین تشکیل شده است. برای موجودات

[86] Chemo-organotroph
[87] Homopolysaccharide

هتروتروف از جمله تمام حیوانات نشاسته معمولترین منبع انرژی است. یکی از تفاوت های اصلی میکروارگانیسم ها، توانایی آنها در استفاده از این پلی ساکارید می باشد. هیدرولیز نشاسته در سسیستم های بیولوژیک توسط آنزیم های مختلفی از جمله آلفا آمیلاز[88]، بتاآمیلاز[89]، فسفریلاز نشاسته، آنزیم های هیدرولیز کننده مانند مالتوز[90] و ... انجام می شود شود (شهیدی و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۱۴-۲-۱-۲- لاکتوز:

لاکتوز[91] دی ساکاریدی است متشکل از دو قند D-گلوکز و D-گالاکتوز که از طریق پیوند دی گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده اند. لاکتوز به طور طبیعی توسط سلول های میکروبی جذب نمی شود. برای انتقال این قند به مکان متابولیسم آن به سیستم حمل ویژه ای نیاز است. پس از حمل لاکتوز و رسیدن به محل متابولیسم این قند دستخوش هیدرولیز شده و به کمک آنزیم بتا گالاکتوزیداز[92] که به لاکتاز یا P-بتا گالاکتوزید گالاکتوهیدرولاز[93] نیز مشهور است به مونوساکاریدهای مربوطه تجزیه می شود (شهیدی و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۱۴-۲-۱-۳- گلوکز:

در همه ی ارگانیسم های زنده تقریبا واکنش های بیوشیمیایی مشابهی صورت می گیرد. در بین قندهای شش کربنه گلوکز قندی است که متابولیسم آن مستقیم و بدون واسطه انجام شده و می تواند از طریق مسیرهای مختلف تخمیر شود. دیگر هگزوزهای مهم همچون گالاکتوز و مانوز در ابتدا و قبل از تخمیر به گلوکز تبدیل می شوند (شهیدی و همکاران، ۱۳۸۹).

[88] α- Amylase
[89] β- Amylase
[90] Maltose
[91] Lactose
[92] β - Galactosidase
[93] P-β Galactoside Galactohydrolase

۱-۱۴-۲-۱-۴- زایلوز:

چندین گروه از میکروارگانیسم ها توانایی رشد بر روی پنتوزها را دارند که از آن جمله می توان به مخمرها، کپک های رشته ای و باکتری های مزوفیل و ترموفیل اشاره کرد. توانایی مصرف قندهای پنج کربنه در میکروارگانیسم های مختلف متفاوت است. در شرایط بی هوازی مخمر قادر به متابولیزه کردن D-زایلوز نمی باشد. در حالی که فرم ایزومری آن یعنی D-زایلولوز توسط بسیاری از گونه های مخمری قابل استفاده است (شهیدی و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۱۴-۲-۲- هیدروژن:

هیدروژن عنصری است که در ماکرومولکول های سلولی مخمر یافت شده و از کربوهیدرات ها و دیگر منابع تهیه می شود. به این دلیل که تغییرات در pH خارج سلولی و داخل سلولی می تواند اثر قابل ملاحضه ای بر رشد و متابولیسم سلول های مخمر داشته باشد، یون های هیدروژن در فیزیولوژی سلول مخمر اهمیت زیادی دارند. توانایی عمومی رشد مخمرها در pH پائین تر نسبت به بیشتر باکتری ها، به آنها در استقرار یافتن در محیط های مختلف اکولوژیکی و غذاهای فاسد شده اسیدی کمک کرده است. اگرچه مخمرها به خوبی در pH قلیایی رشد نمی کنند (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

۱-۱۴-۲-۳- اکسیژن:

مخمرها نمی توانند در محیط عاری از اکسیژن به خوبی رشد کنند. اکسیژن سوبسترای مورد نیاز برای آنزیم های تنفسی در طی رشد هوازی بوده و برای برخی واکنش های هیدروکسیلاسیون[۹۴] حفظ کننده رشد مانند گروهی که در بیوسنتز استرول ها و اسیدهای چرب غیر اشباع دخالت می کنند، مورد نیاز است. مخمرهای مختلف نیازهای متفاوتی برای اکسیژن مولکولی دارند و در فشارهای بالا، اکسیژن خالص می تواند به صورت موثری مانع رشد سلول های مخمر شود. در برخی از فرآیندهای

[94] Hydroxilation

بیوتکنولوژی مخمر، جایی که بهینه کردن رشد تنفسی، اهمیت زیادی دارد اکسیژن کافی باید در بیورآکتورها برای حفظ رشد سریع مخمر در نظر گرفته شود (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

۱-۱۴-۲-۴- نیتروژن:

نیتروژن حدود ۱۰٪ وزن خشک سلول مخمر است. اگرچه مخمرها نمی توانند نیتروژن مولکولی را تثبیت کنند، منابع نیتروژن معدنی ساده مانند نمک های آمونیوم به میزان وسیعی استفاده می شوند. سولفات آمونیوم، به این دلیل که منبع سولفوری قابل جذب نیز است، منبع نیتروژنی مورد استفاده متداول در محیط های رشد مخمر است. بعضی از مخمرها می توانند بر روی محیط نیترات به عنوان منبع نیتروژنی رشد کنند و در این صورت ممکن است از مقادیر کم و پایین تر از غلظت سمی نیتریت نیز استفاده کنند (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

۱-۱۴-۲-۵- سولفور:

اساسا مخمرها به سولفور برای بیوسنتز اسیدهای آمینه سولفوردار نیاز دارند. محتوی سولفور مخمر در حدود ۰/۳٪ وزن خشک سلولی است (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

۱-۱۴-۲-۶- فسفر:

فسفر در اسیدهای نوکلئیک و فسفولیپیدها وجود دارد، پس عنصر مهمی برای همه ی مخمرها است. محتوی فسفات سلول های مخمر در حدود ۳-۵٪ وزن خشک مخمر را شامل می شود. ارتوفسفات[95] (فسفات هیدروژن) و فسفات معدنی متراکم شده، منابع معمول فسفات در محیط های رشد مخمر هستند (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

[95] Ortophosphate

۱-۱۴-۲-۷- عناصر معدنی:

نیاز مخمرها به مواد معدنی شبیه دیگر سلول ها با تامین پتاسیم، منیزیم و تعدادی از عناصر کمیاب که برای رشد مورد نیاز هستند، میسر می شود. پتاسیم و منیزیم به عنوان توده یا درشت مغذی ها که در غلظت های میلی مول برای تثبیت محیط کاتیونیکی در سلول مخمر مورد نیاز هستند، در نظر گرفته می شوند (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

۱-۱۴-۳- RSM:

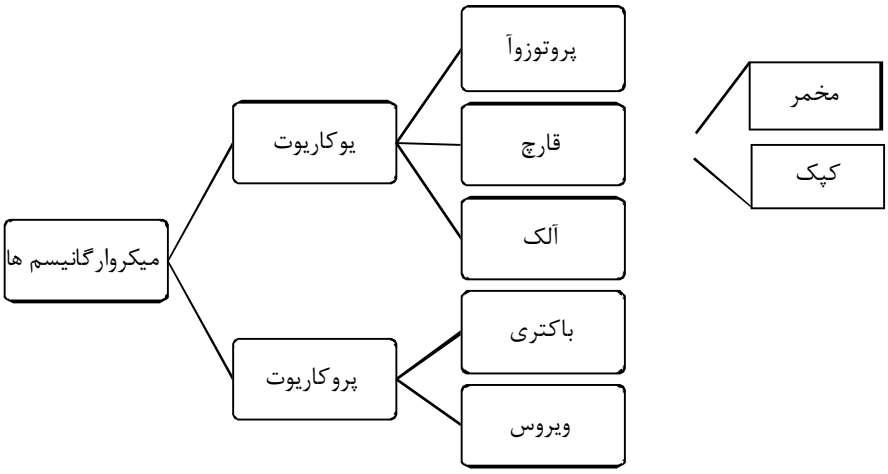
روش سطح پاسخ (RSM)[۹۶] یک روش آماری است که برای داده های کیفی بدست آمده از یک طراحی مناسب آزمایشگاهی به طور همزمان برای اندازه گیری و حل چند متغیر مورد استفاده قرار می گیرد. RSM یک روش آماری برای آزمایش متغیرهای گوناگون می باشد هنگامی که آزمون های آزمایشی کمتری در مقایسه با روش یک فاکتور در یک زمان مورد نیاز است (Liu, et al., 2010). واکنش بین متغیرهای مختلف را می توان توسط این روش تعریف کرد. روش سطح پاسخ برای بهینه سازی محصولات تخمیری و بهینه سازی ترکیبات اصلی محیط کشت و دیگر پارمترهای واکنش های مهم به طور موفقیت آمیزی بکار برده می شود(Gan and Latiff, 2011).

۱-۱۵- تنوع میکروارگانیسم ها:

اکثر میکروارگانیسم ها، تک سلولی هستند و تمام فرآیندهای حیاطی آنها توسط یک سلول منفرد صورت می پذیرد. تمام میکروارگانیسم های تک سلولی متعلق به سلسله ی پروتیستا[۹۷] می باشند. در مراتب عالی تر حیات، ارگانیسم ها از تعداد زیادی سلول تشکیل می شوند که در بافت ها و ارگان ها به منظور انجام عملیات تخصصی آرایش یافته اند. علی رغم پیچیدگی یک ارگانیسم، سلول، واحد ساختاری و پایه زندگی است و همه ی سلول های زنده اساسا مشابه هم هستند. با توجه به شکل ۱-۶

[96] Response surface methode
[97] Protista

میکروارگانیسم ها به دو گـروه بـزرگ پروکـاریوت هـا و یوکـاریوت هـا تقسـیم مـی شـوند (شـهیدی و همکاران، ۱۳۸۹).



شکل ۱-۶: طبقه بندی کلی میکروارگانیسم ها (شهیدی و همکاران، ۱۳۸۹).

سلول های پروکاریوت با مشخصه هایی همچون عدم وجود غشاء هسـته، وجـود DNA دو رشـته ای بـا حلقه بسته به عنوان محلی که اطلاعات ژنتیکی بر روی آن رمزگذاری می شـود. یوکـاریوت هـا، رده ای بسیار بزرگ شامل مخمرها، کپک ها، سلول های گیاهی و جانوری می باشند که بیشتر از یـک مولکـول DNA داشته و این مولکول در یک غشاء احاطه گردیده و هسته را تشکیل می دهـد. یوکـاریوت هـا در مجموع بر اساس سـاختارهای غشـایی خـود تشـخیص داده مـی شـوند. اخیـرا تغییـری در رده بنـدی میکروارگانیسم ها با توجه به اشکال ابتدایی و قدیمی حیـاط ایجـاد شـده اسـت. مخمرهـا کـه یکـی از مهمترین زیر رده های قارچ ها را تشکیل می دهند، معمولا بزرگتـر از بـاکتری هـا هسـتند و بـه گـروه یوکاریوت ها تعلق دارند. این میکروارگانیسم ها اکثرا به شکل سلول های تخم مرغی، طویل، بیضـوی یـا کروی دیده شده و به واسطه تولید جوانه در طی فرآیند تقسیم از اکثـر قـارچ هـا قابـل تشـخیص مـی باشند. سلول های مخمر طولی در حدود ۸ میکرومتر و قطری برابر بـا ۵ میکرومتـر داشـته و در محـیط کشت مناسب هر یک تا سه ساعت تقسیم می گردند. مخمرها در دامنه وسیعی از pH، غلظـت الکـل و قند قادر به رشد می باشند. مخمرهای حقیقـی یـا مخمرهـای مولـد آسکوسـپور از طریـق تولیـد مثـل

جنسی به روش های مختلف لقاح، تکثیر می یابند. مخمرهای حقیقی همچنین قادر به تولید اسپورهای غیر جنسی و کلامیدوسپورها اجزای مقاومی بوده و عموما زمانی تشکیل می شوند که محیط کشت با شرایط نامطلوبی برای رشد مواجه گردد. اکثر مخمرهایی که به صورت صنعتی کاربرد دارند همی اسکومیست ها[98] هستند و اغلب آنها از جنس ساکارومیسس می باشند. مخمرها در تولید برخی نوشیدنی ها نقش موثری دارند. برخی از آنها نیز ممکن است در فساد آشامیدنی ها و سایر مواد خوراکی نقش داشته باشند. مخمرها معمولا بر اساس نقش و فعالیت ویژه خود گروه بندی می شوند (شهیدی و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۱۵-۱- مخمرها (معروفترین قارچ ها):

سالانه صدها هزار تن مخمر پرورش داده می شود. بسیاری از قارچ های تک سلولی در تولید شراب، آب جو و در نانوایی و شیرینی پزی به عنوان منبع آنزیم ها مورد استفاده قرار می گیرند. مخمرهایی که به صورت فرآورده جانبی تخمیر الکلی به دست می آیند به عنوان غذای جانوران مصرف می گردند. مخمرها را بر اساس ظاهر میکروسکپی سلول ها، روش تولید مثل جنسی، برخی صفات فیزیولوژیک (به ویژه توانائی های متابولیکی و نیازمندی های غذایی) و مشخصات بیوشیمیایی (شیمی دیواره سلولی، نوع یوبیکینون موجود در زنجیره ی انتقال الکترونی و تنفس میتوکندریایی) تقسیم بندی می کنند. مشخصات فیزیولوژیک که در متمایز کردن مخمرها به کار می روند عبارتند از:

۱) طیف کربوهیدرات هایی (مونو، دی، تری و پلی ساکاریدها) که به عنوان منبع کربن و انرژی تحت شرایط نیمه هوازی و هوازی مورد استفاده قرار می گیرند.

۲) توانایی نسبی رشد در حضور ۶۰-۵۰ ٪ (حجم/وزن) گلوکز (مقیاسی از تحمل اسمزی)

۳) توانایی نسبی مصرف و هیدرولیز لیپیدها.

مخمرها به خوبی در pH پایین تر از pH بهینه اکثر باکتری ها رشد می نمایند. مخمرهای صنعتی که مورد استفاده قرار دارند مشکلاتی برای سلامت جامعه پدید نمی آورند. با در نظر گرفتن این برتری ها

98 Hemiascomycetes

و ابداع مهندسی ژنتیک، طیف کاربرد مخمرها به سرعت رو به توسعه می باشد (ملک زاده و همکاران، ۱۳۹۵).

۱-۱۵-۱-۱- تنوع حیاتی مخمر:

تا امروز حدود ۷۰۰ گونه مخمر توصیف شده است. اما این فقط نماینده بخشی از تنوع حیاتی مخمر روی این سیاره است. امروزه روش های مولکولی متعددی به شناسایی مخمرها در محیط کمک می کند و این روش ها همراه با داده های بدست آمده از مطالعات فیزیولوژیکی سلول مخمر، راه های حفظ و استفاده کردن از تنوع حیاتی مخمرها را فراهم خواهد کرد (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

۱-۱۵-۱-۲- زیستگاه های مخمرهای تولید کننده اگزوپلی ساکارید:

اگرچه مخمرها مانند باکتری ها در همه جا حضور ندارند، ولی آنها در محیطی طبیعی پراکنده شده اند. سلول های مخمر فاقد کلروفیل و مطلقا شیمیوارگانوتروف هستند، برای رشد به اشکال آلی و تثبیت شده کربن نیاز دارند. مخمرها ممکن است اکسترموفیل[۹۹] باشند، به خصوص برخی از مخمرهای اسموفیل[۱۰۰] که می توانند در محیط های غنی از مواد محلول باقی بمانند. تعدادی از این گونه مخمرها، ارگانیسم های فاسد کننده مواد غذایی هستند. علاوه بر میزبان های طبیعی، بعضی از مخمرها در مکان های ساخته شده به دست انسان یافت می شوند. برای بسیاری از مخمرها، خاک تنها مخزن بقاء طولانی مدت به جای زیستگاه برای رشد آزاد می باشد. خاک های ضعیف (مثل ماسه) زیستگاه مخمرهای بسیار کمی هستند اما خاک های غنی مثل خاک کشاورزی محتوی بسیاری از مخمرها هستند به طوری که در هر گرم از خاک امکان وجود ۴۰۰۰۰ مخمر زنده می باشد. گونه های لیپومایسس[۱۰۱] و شوانیومیسس[۱۰۲] نمونه هایی از گونه های واقعی خاک هستند (منحصرا از خاک جدا شده اند). مخمرها به طور گسترده هم در آب تازه و هم در آب دریا انتشار دارند (گونه های کاندیدا، کریپتوکوکوس، ردوترولا و دباریومایسس). تعدادی از مخمرهای دریایی در دمای $3^{\circ}C$- تا $13^{\circ}C$،

[99] Extremophile
[100] Osmophilic
[101] Lipomyces
[102] Schwanniomyces

نمک حدود ۳۵٪ و در عمق ۴۰۰۰ متری دیده می شوند، اما دیگر مخمرها در این شرایط رشد بسیار محدودی دارند. آب دریا به طور طبیعی محتوی ۱۰ تا ۱۰۰ مخمر در لیتر می باشد اما تعداد محدود می تواند به طور چشمگیری درنواحی سرد افزایش یابد (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱). مخمرهایی که ساکن اکوسیستم های سرد می باشند توجه زیادی را به خود جلب می کنند، نه تنها بخاطر انطباق آنها با شرایط سخت محیطی بلکه بخاطر توانایی آنها در تولید مواد ارزشمندی همانند اگزوپلی ساکاریدهای مخمری، آنزیم ها، لیپیدها و یا کاروتنوئیدها می باشد.

(Rusinova Videva, et al., 2011).

گونه های سایکروفیل[۱۰۳] جدا شده، قادر به تولید مقدار زیادی اگزوپلی ساکارید هستند که شامل گونه های اسپوروبلومایسس، کریپتوکوکوس، دباریومایسس و ردوترولا می باشند. منبع مخمرهای تولید کننده بیوپلیمرهای خارج سلولی با پتانسیل بالا ممکن است خاک باشد (Ghada, et al., 2012) کشت های خالص مخمر Rhodotorula minuta ازآب تازه دریاچه لاگونا[۱۰۴] فیلیپین جداسازی شد (Ramirez, 2016).

۱-۱۵-۱-۳- اهمیت مخمر ها برای بشر :

با توجه به جدول ۱-۲ مخمرها از اهمیت زیاد اقتصادی، اجتماعی و بهداشتی در تمدن بشری برخوردارند. آنها اغلب به عنوان قدیمی ترین ارگانیسم های اهلی شده که برای تولید الکل آشامیدنی و ور آمدن نان به مدت هزاران سال استفاده می شده اند، توصیه می شوند. در حقیقت، تولید الکل اولین فعالیت بیوتکنولوژیکی در جهان است. در جهان مدرن امروز، علاوه بر تخمیرهای غذایی سنتی، نقش های متعدد دیگری برای مخمرها یافت شده است. اکنون مخمرهای دست کاری شده ژنتیکی با هدف تولید بسیاری از عوامل مختلف دارویی برای پیشگیری و درمان بیماری های انسان مورد استفاده قرار می گیرند (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

[103] Psychrophilic
[104] Laguna

جدول ۱-۲- نقاط عطف در مطالعه و استفاده از مخمرها (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

زمان	نقاط عطف
۶۰۰۰- ۲۰۰۰ سال قبل از میلاد	صنعت آب جو سازی (سومر، بابل)، کشت انگور (جورجیا) و آوردن خمیر (مصر)
۱۶۸۰	توصیف شکل میکروسکوپی مخمرها (ون لون هوک)
۱۸۳۰-۱۸۳۹	تخمیر الکل در ارتباط با مخمر جوانه زن (کاگنیرد- لاتور در سال ۱۸۳۵). نام ساکارومیسس سروزیه برای مخمری که در مالت مشاهده شد، به وجود آمد. (می ین در سال ۱۸۳۷). نقش قند به عنوان منبع غذایی برای رشد مخمر (شوان و کوتزینگ در سال ۱۸۳۹).
اواخر قرن نوزدهم	همه تخمیر های حقیقی به پدیده های فیزیولوژیکی وابسته هستند و تخمیرها مرتبط با متابولیسم مخمر می باشند (پاستور در ۱۸۵۷). Etudes sur la biere (Pastur in 1876). واژه آنزیم (در زبان یونانی، درون مخمر) توسط کوهن در سال ۱۸۷۷معرفی شد. جداسازی سلول های مخمری تک و نقش سویه های مخمری خالص برای آب جو (هانسن ۱۸۸۳-۱۸۸۰). تولیدبیو شیمی به عنوان یک رشته علمی جدید.
۱۹۱۵	تولید گلیسرول از طریق تخمیرهای هدایت شده مخمر (نوبرگ)
۱۹۲۰	دانش فیزیولوژی مخمر، جنسیت و سیر تکاملی مخمر مرور شده است (گیلرموند در سال ۱۹۲۰).

۱۹۳۰-۱۹۴۹	مطالعات ژنتیک بر روی مخمر آب جوآغاز شد (وینگ، لوستن، لیندگرن). شرح تکثیر جنسی و سیستم نوع لقاح.
۱۹۳۰-۱۹۶۰	مطالعات طبقه بندی مخمر توسط مدرسه کلوور و دلف
۱۹۷۰-۱۹۷۹	لقاح نادر، سیتوداکشن و پروتوپلاست فیوژن در مخمرهای آب جو. ترانسفورماسیون ابتدایی مخمر در ۱۹۷۸(هینن، هیکس، فینک امریکا و بگز انگلستان).
۱۹۸۰-۱۹۹۹	تولید اولین محصول دارویی تجاری(واکسن هپاتیت B) از مخمر نوترکیب. موافقت رسمی دولت انگلستان برای استفاده از مخمر نانوایی (۱۹۹۰) و مخمر و آب جو (۱۹۹۴) مهندسی شده از نظر ژنیتیکی. تکمیل پروژه ژنوم ساکارومیسس سروزیه (۱۹۹۶).

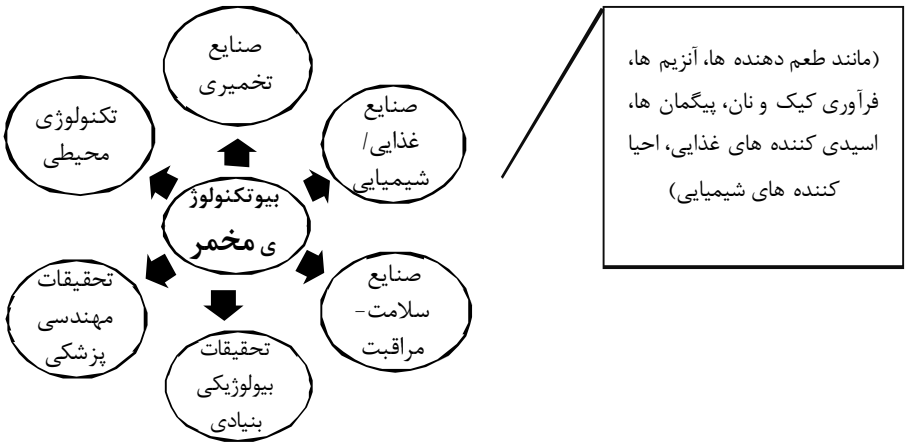
۱-۱۵-۱-۴- استفاده صنعتی مخمرها

در آینده، احتمالا مخمرها اثر قابل ملاحظه ای بر تجدید انرژی، بیوتکنولوژی محیطی مانند کنترل بیولوژیکی و حفظ سلامت به ویژه مطالعه نارسایی های ژنیتیکی انسان و سرطان خواهند داشت (شکل ۱-۷). در خصوص انرژی، متابولیسم مخمر می تواند سوخت اتانولی را از مواد خام تخمیری کربوهیدراتی تجدید پذیر فراهم کند.

هورکر[۱۰۵] در سال ۱۹۷۸ حتی از این فراتر رفته و عنوان کرده که استفاده از مخمر (برای تولید اتانول زیستی به عنوان یک منبع انرژی تجدیدپذیر) امید بزرگی را برای بقاء تمدن بر روی این کره خاکی به وجود آورده است. در حوزه پزشکی، پیشرفت های چشمگیری در تولید پروتئین های درمانی انسانی به وسیله مخمرهای مهندسی شده ژنتیکی صورت گرفته است. ضمنا، استفاده از مخمرها در پزشکی درمانی فقط به دانش فنی DNA نوترکیب مربوط نمی شود. برای مثال، از زمان های اولیه مخمرها

[105] Horker

برای کنترل بیولوژیکی عفونت های باکتریایی انسان استفاده می شده اند. پیشرفت های هیجان انگیز دیگر به آنالیز عملکردی ژنوم مخمر برمی گردد و چنین آنالیزی ممکن است بینش وسیعی در شناخت ساختمان و عملکرد ژن انسانی فراهم کند (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).



شکل ۱-۷: تنوع خروجی های مربوط به بیوتکنولوژی مخمرها (پورنیا و کچوئی، ۱۳۹۱).

۱-۱۶- **Rhodotorula**:

ردوترولا یک مخمر معمول محیطی می باشد که در هوا، خاک، دریاچه ها، آب اقیانوس، شیر و آب میوه ها یافت می شود. جنس ردوترولا شامل هشت گونه می باشد (Larone, 1993). ردوترولا کلونی صورتی تا قرمز و بلاستوکونیدیا[۱۰۶] تولید می کند. آنها فاقد هیف می باشند. محققان ردوترولا را از اکوسیستم های مختلف جداسازی کرده اند (Miceli, et al., 2011). گونه های ردوترولا مخمرهای ساپروفیت هستند که از منابع مختلف محیطی بازیابی می شوند (Pfaller, et al., 2004).

۱-۱۶-۱- مورفولوژی ردوترولا مینوتا:

ردوترولا مینوتا در YM[۱۰۷] آگار بعد از گذشت ۷ روز در دمای ۲۵°C رشد می کند. کشت خطی آن صورتی، صاف و صیقلی می باشد اما برجسته و مخاطی نیست.

ردوترولا در YM براث بعد از گذشت ۳ روز در دمای ۲۵°C رشد می کند. سلول های آن کروی یا کشیده به قطر ۵×۵/۵-۷ µm به طور مجموع یا تنها می باشند (Chang and Wang, 2002).

[106] Blastoconidia
[107] Yeast-Mold

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- تولید و استخراج پلی ساکارید:

گینتکا و همکاران در سال ۲۰۱۶ موفق به اندازه گیری میزان پلی ساکارید تولید شده از گونه ی مخمری کاندیدا[۱۰۸] بر اساس منبع کربنی شدند. تاثیر منبع کربن در بیوسنتز اگزوپلی ساکارید[۱۰۹] توسط گونه ی مخمری کاندیدا که از کفیر جدا شده بود مورد بررسی قرار گرفت. بازده توده زیستی بر اساس منابع کربنی (ساکارز[۱۱۰]، مالتوز[۱۱۱]، لاکتوز[۱۱۲]، گلیسرول[۱۱۳]، سوربیتول[۱۱۴]) به ترتیب در محدوده ی ۴،۱۳-۷،۱۵ اندازه گیری شد. بیشترین میزان بازده تولید اگزوپلی ساکارید مربوط به گونه ی C. guilliermondii ارزیابی شد. منبع کربنی مالتوز موثرترین منبع برای گونه ی مورد نظر شناخته شد (Gientka, et al., 2016).

لیو و همکاران در سال ۲۰۱۷ پی بردند که اندوفیدها[۱۱۵] تولیدکنندگان اگزوپلی ساکاریدها می باشند. مشخص شد که این پلی ساکارید نه تنها نقش تعامل های بافتی گیاه را بازی می کند بلکه چندین عملکرد بیولوژیکی از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی، آنتی توموری، ضدالتهابی، ضد آلرژیک و فعالیت های پری بیوتیکی دارد. تعیین شد برای استفاده اگزوپلی ساکاریدها در مقیاس صنعتی هر دو استراتژی افزایش بازدهی و تولید در سطوح مختلف ضروری می باشد (Liu, et al., 2017).

ثابت شده است که اسید لاکتیک باکتری ها[۱۱۶] که اگزوپلی ساکاریدها را تولید می کنند نقش مهمی در صنایع لبنی بازی می کنند به دلیل تاثیری زیادی که در استحکام و رئولوژی محصولات شیری تخمیر شده دارند. در بررسی انجام شده توسط راوس و همکاران ثابت شد که پلیمرهای اگزوپلی ساکارید می توانند جزء ترکیبات طبیعی معرفی شوند به علت اینکه تولیدکنندگان آنها به عنوان

[۱۰۸] Candida
[۱۰۹] Exopolysaccharide
[۱۱۰] Sucrose
[۱۱۱] Maltose
[۱۱۲] Lactose
[۱۱۳] Glycerol
[۱۱۴] Sorbitol
[۱۱۵] Endophyte
[۱۱۶] Lactic acid bacteria

میکروارگانیسم های ایمن شناخته شده انـد. همچنـین فوایـد بهداشـتی بـرای برخـی از ایـن اگزوپلـی ساکاریدها مخصوصا فعالیت آنتی توموری و ایمن سازی اختصاص داده شد (Ruas, et al., 2002).

جوا و همکاران در سال ۲۰۱۱ پنج گونه ی وحشی زانتاموناس کمپستریس[۱۱۷] تولیـد کننـده زانتـان[۱۱۸] را به منظور تولید پلی ساکارید کشت داده و ایزوله کردنـد. در ایـن مطالعـه، تجزیـه و تحلیـل آنـالیزی اگزوپلی ساکارید جدید (زانتان) و توده زیستی تولیـد شـده توسـط زانتامونـاس کمپسـتریس ارائـه داده شده است و تاثیر منبع کربن و نیتروژن بر تولید اندازه گیـری شـد. تولیـد زانتـان در فـاز اولیـه رشـد افزایش یافت و حداکثر میزان تولید در فاز تاخیر برآورد شد و بعـد از آن میـزان تـوده زیسـتی کـاهش یافت. در این مطالعه محیط کشت تولید محصول با غلظت اولیه حدود ۲۰ گـرم گلـوکز، ۳ گـرم عصـاره مخمر بهترین غلظت برای تولید زانتان بود. و در میان ۵ گونه ی مد نظر زانتامونـاس کمپسـتریس SJR O4 به عنوان بهترین گونه معرفی شد (Jeeva, et al., 2011).

بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده است اگزوپلی ساکاریدها پلیمرهای طبیعـی هسـتند کـه بـه عنوان عوامل ایجاد کننده ویسکوزیته، ژله کننده و قـوام دهنـده بـه طـور گسـترده در صـنایع غـذایی استفاده می شوند. در طی این تحقیق با بررسی بر روی ۱۰ باسیلوس[۱۱۹] جـدا شـده از مرغـداری هـای اراک ۲ گونه بیشترین توانایی تولید اگزوپلی ساکارید را داشتند کـه بیشـینه تولیـد ۴۳ mg/l و کمینـه تولید ۰/۲ mg/l بود. بر اساس نتایج بدست آمده گونه B7 بیشترین میـزان تولیـد اگزوپلـی سـاکارید را داشته است (مبینی و همکاران, ۱۳۹۱).

سـرنینگ و همکـاران در سـال ۱۹۹۱ بـر روی گونـه هـای طنـابی شـکل لاکتوکوکـوس لاکتـیس[۱۲۰]، کرموریس و لاکتوکوکوس کازئی تحقیقاتی انجام دادند کـه در شـیر و مـواد الترافیلتراسـیون رشـد مـی کنند و هتروپلی ساکارید تولید می کنند. در این تحقیـق اگرچـه میـزان کمـی مـانوز، رامنـوز و پنتـوز

[۱۱۷] Xanthomonas campestris
[۱۱۸] Xanthan
[۱۱۹] Bacillus
[۱۲۰] Lactococcos lactis

شناسایی شده است اما میزان پلی ساکارید تولید شده در حدود ۶۰۰-۳۰ میلی گرم در لیتر محیط کشت بدست آمد. میزان تولید پلی ساکارید در دمای ۲۵°C بیشتر از ۳۰°C ارزیابی شده است. همچنین افزودن گلوکز و ساکارز به شیر و ماده باقی مانده از الترافیلتراسیون[۱۲۱] شیر میزان تولید اگزوپلی ساکارید را افزایش داد (Cerning, et al., 1992).

بر اساس تحقیقات انجام شده به منظور استفاده از زیست پلیمرها در صنایع، نیاز به تجاری کردن فرآیند تولید و بهینه کردن آن است. با توجه به مطالعات انجام شده درباره بهینه سازی شرایط تولید زیست پلیمر مشخص شد که افزون بر اثر عوامل تغذیه ای مهم در تولید از قبیل منابع کربن، نیتروژن، فسفر، گوگرد و ... عوامل فیزیکی و غیرتغذیه ای نیز در فرآیند تولید بسیار اثرگذار می باشند. در این مطالعه اثر پارامترهایی نظیر سرعت هوادهی و همزدن، دما و pH بر تولید بهینه ی پلی ساکاریدهای میکروبی که از مهمترین و پرکاربردترین زیست پلیمرها هستند بررسی شده است. با توجه به نتایج بدست آمده در اکثر منابع بررسی شده برای تولید مقدار بهینه از اگزوپلی ساکاریدها شرایط مناسب برای سرعت هوادهی ۳-۰/۵ VVm، همزدن ۸۰۰-۲۰۰ rpm، دما ۳۲-۲۷°C و pH ۸-۵ در نظر گرفته شد (خانی و همکاران، ۱۳۹۵).

رامیرز در سال ۲۰۱۶ با هدف بررسی تولید اگزوپلی ساکارید از مخمر ردوتروولا مینوتا[۱۲۲] مطالعاتی انجام داد. در این مطالعه ارزیابی سمیت اگزوپلی ساکارید به منظور اطمینان از اینکه برای مصارف انسانی امن است مورد بررسی قرار گرفت. اگزوپلی ساکارید مخمر حاوی میزان قند بالا (۵۹/۲۱-۶۲-۴۷٪) و میزان پروتئین کم (۱۷/۱۹ ٪) بود. طیف FTIR گروه های قابل توجهی از جمله هیدروکسیل، کربوکسیل، پیوندهای بتا، گلوکز، مانوز و حلقه های آروماتیک را نشان داد. میکروگراف SEM اگزوپلی ساکارید ساختارهای گرانولی طولانی را نشان داد. بررسی سم شناسی اگزوپلی ساکارید هیچ نشانه ای

[۱۲۱] Oltrafiltration
[۱۲۲] Rhodotorula minuta

از سمیت و مرگ و میر بعد از ۱۴ روز تجویز اگزوپلی ساکارید نشان نداد. آزمون هماتولوژیک[۱۲۳] و هیستوپاتولوژیک[۱۲۴] در کبد هیچ تغییر قابل توجهی بین گروه های تجربی و کنترلی نشان نداد. بر اساس نتایج بدست آمده پتانسیل کاربردی اگزوپلی ساکارید در صنعت به عنوان عامل های پایدار کننده و غلیظ کننده نشان داد (Ramirez, 2016).

خان و همکاران در سال ۲۰۱۴ با مطالعه روی قارچ های خوراکی دریافتند که این قارچ ها از زمان های قدیم به عنوان دارو و غذا در کشورهای آسیایی استفاده می شدند. همچنین مزایای بهداشتی و دارویی قارچ های خوراکی عمدتا بخاطر پلی ساکارید ها می باشد که بخش عمده ای از مواد زیست فعال هستند. مطالعات فیتوشیمیایی و فارماکولوژی ثابت کرد که پلی ساکارید یکی از مواد اصلی فعال در انواع مختلف قارچ خوراکی و دارویی می باشد و همچنین این پلی ساکاریدها فعالیت های بیولوژیکی کافی از جمله فعالیت های ایمنی، آنتی توموری، آنتی اکسیدانی، ضد سرطان و ضد ویروسی را نشان داد(khan, et al., . 2014)

دونات و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مطالعه روی میکروارگانیسم های تولید کننده اگزوپلی ساکارید دریافتند که ۳۰ گونه میکروارگانیسم های یوکاریوتی و پروکاریوتی برای تولید اگزوپلی ساکارید مورد توجه هستند. برخی از میکروارگانیسم ها می توانند در شرایط ساده اما گران قیمت ۴۰ گرم اگزوپلی ساکارید تولید کنند. آنها طی بررسی هایی دریافتند که عملکرد اصلی اگزوپلی ساکاریدها کمک به محافظت از سلول در برابر فشارهای محیطی می باشد. همچنین هتروپلی ساکاریدها و بعضی از هموپلی ساکارید ها در داخل سلول سنتز شده و به محیط خارج سلولی سنتز می شوند (Donot, et al., 2012).

[۱۲۳] Hematologic
[۱۲۴] Histopathologic

لی و همکاران در سال ۲۰۰۸ دو پلی ساکارید محلول در آب PNW1 و PNM1 را از میسیلیوم جدا کردند و در محیط کشت فلینوس نیگریکانس[۱۲۵] با استفاده از تخمیر غوطه وری کشت دادند. نتایج آزمایشات دارویی این پلی ساکاریدها نشان داد که تزریق خوراکی این دو پلی ساکارید رشد تومورها را در موش مهار کرد و تاثیر پلی ساکارید PNW1 نسبت به پلی ساکارید PNM1 بیشتر بود. میانگین وزن مولکولی PNW1 و PNM1 در حدود ۳۳ و ۲۹ کیلو دالتون تعیین شد. هر دو پلی ساکارید شامل گلوکز، گالاکتوز، مانوز، آرابینوز و فوکوز بودند. ویژگی های اصلی ساختار PNW1 و PNM1 با استفاده از هیدرولیز اسیدی ناقص، اکسیداسیون پریودات، تجزیه اسمیت، متیلاسیون، NMR و GC-MS تعیین شد (Li, et al., 2008).

لی و همکاران در سال ۲۰۱۲ پلی ساکارید خام اکارا[۱۲۶] با بازده ۵۶/۸ ٪ را با استفاده از حذف چربی و پروتئین جداسازی کردند و وزن مولکولی کربوهیدرات M ۰/۱ ارزیابی شد. پلی ساکارید اکارا در ۴ فرکشن قابل حل تقسیم شد و قندهای اصلی تشکیل دهنده آن آرابینوز، گالاکتوز، اسید گالاکتورونیک، زایلوز و گلوکز بود(Li, et al., 2012).

یان و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی قارچ خوراکی فلینوس سنسولاتو[۱۲۷] مطالعاتی انجام دادند. این قارچ برای پیشگیری از بیماری هایی از جمله اختلالات گوارشی، اسهال، خونریزی و سرطان در کشورهای شرقی به ویژه چین، ژاپن و کره مورد استفاده قرار گرفت. پلی ساکاریدها یک طبقه وسیعی از مولکول های زیست فعال در فلنیوس را نشان دادند که خواص دارویی و آنتی توموری دارند. این پلی ساکاریدها به طور مستقیم از رشد تومورها و هجوم امراض جلوگیری کرد. مطالعات نشان داد که پلی ساکاریدهای استخراج شده از فلینیوس جایگزین مناسب برای داروهای ضد تومور می باشد (Yan, et al., 2015).

ساختار شیمیایی اگزوپلی ساکارید سنتز شده توسط پی شیا هالستی مورد بررسی قرار گرفت و شرح

[۱۲۵] Phellinus nigricans
[۱۲۶] Okara
[۱۲۷] Phellinus sensu lato

داده شد. زنجیره های جانبی پلیمر که مونوفسفات, پنتا و الیگوساکاریدهای با وزن مولکـولی کـم بودنـد با استفاده از هیدرولیز اسیدی ضعیف حذف شدند. زنجیره ی اصـلی پلیمـر تنهـا ۱۰٪ از کـل پلیمـر را تشکیل می دهد که ثابت می کند اگزوپلی ساکاریدها دارای شاخه های زیـادی مـی باشـند (Ghada, et al., 2012).

مانان های خطی تولید شده توسـط ردوتـرولا روبـرا[۱۲۸] فعالیـت ضـدتوموری در حیوانـات آزمایشـگاهی نشان داد و فرمهای سولفات آنها باعث توسعه آنتی بادی ها و ماکروفاژها شده است. علاوه بـر ایـن پلـی ساکاریدها تاثیر واضحی بر محافظت از سلول ها در برابر اشعه ی UV نشـان دادنـد. پلیمـر تولیـد شـده توسط ردوترولا گلوتینیس که متشکل از گلوکز، مانوز و آرابینوز می باشد فعالیت آنتی اکسیدانی، آنتـی توموری و آنتی ویروسی را نشان می دهد (Ghada, et al., 2012).

ویژگی های فیزیکی اگزوپلی ساکاریدهای مخمری به ویژه توانایی آنها در تشـکیل محلـول هـای متـراکم در محیط های آبی باعث علاقه ی صنعت بـر ایـن محصـولات زیسـتی شـده اسـت. پتانسـیل اگزوپلـی ساکارید در امکان استفاده از آنها به عنوان غلیظ کننده و پایدار کننده در غذا و وسایل آرایشـی آشـکار شده است. بنابراین پارامترهای فیزیکی از جمله ویژگی های رئولوژیکی محلـول هـای اگزوپلـی سـاکارید آبی، پایداری در امولسیون های آب در روغن و توانایی باند کردن آب برای ایـن کاربردهـا ضـروری مـی باشـد. محلـول هـای آبـی اگزوپلـی سـاکارید از مخمـر ردوتـرولا خصوصـیات مایعـات غیـر نیوتـونی سودوپلاستیک را نشان می دهد (Cho, et al., 2001).

گلوکومانان تولید شده توسط سالمونیکالر[۱۲۹] بازده شکل گیری امولسیون هـا و ثبـات در لوسـیون هـا را افزایش می دهد. استفاده از اگزوپلی ساکارید مخمری در ترکیب با دیگر پلـی سـاکارید هـا بـرای مثـال زانتان پارامترهای استحکام و میزان ویسکوزیته ی این محلول ها را افزایش مـی دهـد (Kuncheva, et al., 2007) اگزوپلی ساکارید مخمری ممکن اسـت از اجـزای غـذاهای زیسـت فعـال باشـند. اگزوپلـی

[۱۲۸] Rhodotorula rubra
[۱۲۹] Salmonicolor

ساکارید تولید شده توسط مخمر کریپتوکوکوس لورنتی[۱۳۰] به عنوان افزودنی غذایی برای کاهش غلظت کلسترول و تری گلیسیریدها در سرم خون استفاده می شود (Ananeva, et al., 2002).

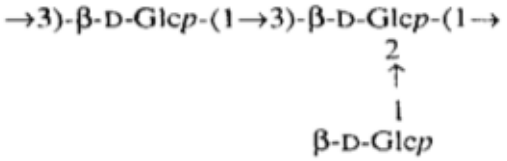
استفاده از اگزوپلیمرهای مخمری برای جذب فلزات سنگین نیز ممکن می باشد. لوتلان (اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط کریپتوکوکوس لوتئوس) بدلیل ظرفیت بالا برای اتصال به عناصر شیمیایی از جمله یون های آهن و مس کاربرد زیادی دارد. لازم به ذکر است که شناخت مکانیسم تولید پلی ساکارید خارج سلولی توسط میکروارگانیسم ها در پزشکی نیز مهم است. اگزوپلی ساکارید یک ساختار ناهمگن سه بعدی برای بیوفیلم ها که چسبندگی گونه های بیماری زا را تسهیل می کند ایجاد می کند (Buchanan and Murphy, 1998).

۲-۲- شناسایی پلی ساکاریدها

متسوزاکی و همکاران در سال ۲۰۱۷ یک اگزوپلی ساکارید که توسط لئوکنستوک مزنتروئیدس[۱۳۱] تولید شده بود جداسازی کردند. آنها در این مطالعه دریافتند که با تزریق داخلی اگزوپلی ساکارید و آنتی ژن آووآلبومین به موش منجر به ترشح آنتی ژن اختصاصی IgA و IgG در مخاط دهان و سرم می شود که نشان می دهد اگزوپلی ساکارید فعالیت معین برای استفاده با تلقیح مخاطی دارد. در این مطالعه آنالیز متیلاسیون همراه با GC-MS و طیف سنجی NMR یک بعدی و دو بعدی نشان داد که ۹۴٪ اگزوپلی ساکارید شامل ۱/۶٪ گلوکان که با شاخه های گلوکز باند شده است. تعیین ساختار ترکیبات جزئی توسط تجزیه آنزیمی گلوکان با دکستراناز انجام شد و با استفاده از طیف سنجی NMR دو بعدی برای شناسایی پلیمر فروکتان که شامل باندهای (۶→۲)-β و (۱→۲)-β می باشد انجام شد (Matsuzaki, et al., 2017).

[۱۳۰] Cryptococcus laurentti
[۱۳۱] Leuconostoc mesenteroiedes

دوناس چاسکو و همکاران در سال ۱۹۹۷ روی اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط گونه ی طنابی پدیوکوکوس دامنوس[۱۳۲] در محیط کشت نیمه تعریف شده تحقیقاتی انجام دادند. این اگزوپلی ساکارید به عنوان یک هموپلیمر تشکیل شده از D-گلوکز معرفی شد. بر اساس تجزیه و تحلیل مونوساکارید، متیلاسیون و انجام آزمایشات NMR یک بعدی و دو بعدی پلی ساکارید، نشان داد که شامل واحد های تکراری با ساختار زیر می باشد (شکل ۲-۱) (Duenas-chasco, et al., 1997).



شکل ۲-۱: ساختار اگزوپلی ساکارید شناسایی شده توسط دوناس چاسکو و همکاران(Duenas-chasco, et al., 1997).

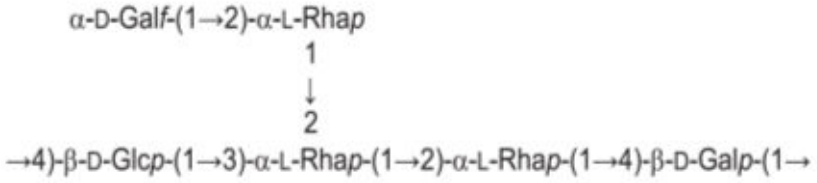
پلی ساکارید خارج سلولی TP1A توسط لی و همکاران در سال ۲۰۱۶ از محیط کشت داده شده ی مایع تری کودرما[۱۳۳] با ترکیب کروماتوگرافی Q سفاروز جریان سریع و سفاکریل S-۳۰۰ خالص سازی شد. وزن مولی TP1A حدودا ۴۰ کیلو دالتون ارزیابی شد. آنالیز متیلاسیون و NMR نشان داد که ساختار احتمالی TP1A [(۶→۴)-D-α-گلوکوپیرانوزیل(۶→۱)-D-β-گالاکتوفورانوزیل(۶→۱)-D-β گالاکتوفورانوزیل(۶,۲→۱)-D-β-گالاکتوفورانوزیل(۶,۲→۱)-D-β-گالاکتوفورانوزیل(۶,۲→۱)-D-β-گالاکتوفورانوزیل(۶,۲→۱)-D-α-مانوپیرانوزیل(۶,۲→۱)-D-α-مانوپیرانو با [D-α-گلوکوپیرانوزیل(→۱] و [D-α-مانوپیرانوزیل(۶→۱)-D-α-گلوکوپیرانوزیل(۶→۱)-D-α-گلوکوپیرانوزیل(۱→] می باشد. مطالعات ضد توموری نشان داد که TP1A توانایی مهار کردن زنده ماندن سلولهای MCF-7 را دارد. همچنین ثابت شد که پلی ساکارید

[۱۳۲] Pediococcus damnosus
[۱۳۳] Trichoderma

TP1A می تواند سلول های هلا را در مرحله ی G2 متوقف کند. این یافته ها نشان داد که پلی ساکاریدهای قارچی می توانند یک منبع بالقوه برای عوامل ضد توموری باشند (Li, et al., 2016).

لیورز و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی تولید اگزوپلی ساکارید از گونه ی صفراوی ایزوله شده به نام بیفیدوباکتریوم انیمالیس[۱۳۴] تحقیقاتی انجام دادند. این گونه زمانی که بر روی آگار و MRS رشد کرد اگزوپلی ساکارید با وزن مولکولی بالا تولید کرد. این اگزوپلی ساکارید شامل L-رامنوپیرانوزیل، D-گلوکوپیرانوزیل، D-گالاکتوپیرانوزیل و D-گالاکتوفورانوزیل در نسبت ۳:۱:۱:۱ بود. در این بررسی آنالیز باندها و طیف سنجی NMR یک بعدی و دو بعدی انجام شد و تیمار این اگزوپلی ساکارید با اسید خالص ملایم برای حذف D-گالاکتوفورانوزیل انتهایی انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده این اگزوپلی ساکارید شامل یک واحد تکراری هگزاساکارید با ساختار زیر بود (شکل ۲-۲)

(Leivers, et al., 2011).



شکل ۲-۲: ساختار اگزوپلی ساکارید شناسایی شده توسط لیورز و همکاران (Leivers, et al., 2011).

۲-۳- بهینه سازی ترکیبات محیط کشت و شرایط کشت

لی و همکاران در سال ۲۰۱۲ مطالعاتی را روی بهینه سازی محیط کشت تولید صمغ ولان[۱۳۵] از میکروارگانیسم آلکالیجنس[۱۳۶] با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند. تاثیر مواد افزودنی بر میزان تولید بررسی شد. توین ۴۰[۱۳۷] بهترین افزودنی برای افزایش تولید تولید صمغ ولان بود و صمغ ولان

[۱۳۴] Bifidobacterium animalis
[۱۳۵] Welan
[۱۳۶] Alcaligenes
[۱۳۷] Tween-40

ویژگی های رئولوژیکی بهتری در مقایسه با زمانی که هیچ افزودنی استفاده نشده بود نشـان داد. شـرایط بهینه برای تولید صمغ ولان بر این اساس تعیـین شـد: غلظـت تـویین ۴۰ (۰/۹۴ g/l)، pH ۶/۹ و دمـا ۲۹/۶°C. غلظت تجربی صمغ ولان ۲۳/۶۲ g/l بود که بـا میـزان پـیش بینـی شـده توسـط نـرم افـزار (۲۳/۴۸ g/l) مطابقت داشت (Li, et al., 2012).

تـری ونـی و همکـاران در سـال ۲۰۰۱ بهینـه سـازی تولیـد اگزوپلـی سـاکارید توسـط آگروبـاکتریوم رادیوباکتر[۱۳۸] و امکان استفاده از آن را مـورد مطالعـه قـرار دادنـد. شـرایط محـیط کشـت بـرای تولیـد اگزوپلی ساکارید توسط آگروبـاکتریوم رادیوبـاکتر بـا روش سـطح پاسـخ بـرای بدسـت آوردن حـداکثر ویسکوزیته محیط کشت و بازده تولید اگزوپلی ساکارید بهینه سازی شد. در این مطالعه غلظـت سـاکارز بین ۰/۵-۵/۵ g/l، حجم تلقیح بین ۱-۱۵٪ و pH بین ۴-۸ تعیین شد. اگزوپلی ساکارید بدسـت آمـده شامل گلوکز، گالاکتوز و رامنوز با نسبت های (۰/۷: ۱۰/۴: ۸۸/۹) بود و اگزوپلی سـاکارید بدسـت آمـده با غلظت ۲٪ ژل الاستیک را تشکیل داد. شرایط بهینـه بدسـت آمـده کـه حـداکثر میـزان ویسـکوزیته ۱۰۵/۶۴mPa و بازده پلی ساکارید ۲/۲۶٪ اندازه گیری شد که میـزان غلظـت سـاکارز ۲/۶۲٪، حجـم تلقیح ۱٪ و pH ۶/۲۴ بود (Triveni, et al., 2001).

لیو و وانگ در سال ۲۰۰۷ تحقیقاتی روی بهینه سازی ترکیبـات بحرانـی محـیط کشـت بـا اسـتفاده از روش سطح پاسخ برای توده زیستی و تولید اگزوپلی ساکارید توسط آگاریکوس بلازئـی[۱۳۹] انجـام دادنـد. طراحی سه سطحی برای اندازه گیری حداکثر میزان توده زیستی و بـازده اگزوپلـی سـاکارید در سـطح بهینه گلوکز، عصاره مخمر و پپتون[۱۴۰] استفاده شد. یک مدل آماری برای نشان دادن تـاثیر هـر کـدام از ترکیبات محیط کشت بر تولید اگزوپلی ساکارید و توده زیستی ایجاد شد. مدل پیش بینـی شـده بـرای حداکثر بازده توده زیستی ۱۰/۸۶ g/l بـود کـه در میـزان گلـوکز g/l۲۶/۳ و میـزان عصـاره مخمـر و پپتون با مقادیر ۲۶/۳ و ۶/۸۴ g/l مشاهده شدند در حالی که حـداکثر بـازده اگزوپلـی سـاکارید ۳۴۸/۴

[۱۳۸] Agrobacterium radiobacter
[۱۳۹] Agaricus blazei
[۱۴۰] Peptone

m/g بود که در میزان گلوکز ۲۸/۴ g/l و عصاره مخمر و پپتون به ترتیب ۴/۹۶ و ۵/۶۰ g/l مشاهده شدند. مقادیر پیش بینی شده با مقادیر تجربی مطابقت داشتند. نتایج تخمیر در بیورآکتور نشان داد که در محیط بهینه شده میکروارگانیسم آگاریکوس بلازئی میزان ۱۳/۹۱ g/l توده زیستی و ۳۶۳ mg/l پلی ساکارید تولید می شود (Liu and Wang, 2007).

شارما و همکاران در سال ۲۰۱۷ مطالعاتی روی بهینه سازی پارامترهای چندگانه برای تولید حداکثر اگزوپلی ساکارید از لاکتوباسیلوس پاراپلنتاروم[۱۴۱] توسط روش سطح پاسخ انجام دادند. طراحی آزمایشات آماری برای بهینه سازی محیط کشت به منظور تولید اگزوپلی ساکارید از لاکتوباسیلوس پاراپلنتاروم بکار برده شد. این طراحی شامل پارامترای مختلف از جمله زمان تلقیح، دما، pH، غلظت منبع کربنی (لاکتوز) و غلظت منبع نیتروژن (آمونیوم سولفات) بود. مقادیر بهینه ی متغیرهای آزمایش شده برای تولید اگزوپلی ساکارید ۲۵٪ w/v لاکتوز، pH ۶/۵ و ۳۲ ساعت زمان کشت بود. بیشترین تغییرات در تولید اگزوپلی ساکارید در محدوده ی بین ۳۴/۶-۰ mg/ml مشاهده شد. هیچ اختلاف معنی داری بین مقادیر پیش بینی شده و مقادیر بدست آمده وجود نداشت (Sharma, et al., 2017).

رامیرز و همکاران در سال ۲۰۱۵ موفق به بهینه سازی سوبسترا برای تولید اگزوپلی ساکارید از مخمر ردوترولا مینوتا با استفاده از طراحی شبکه ای ساده شدند. فرمولاسیون بهینه سازی بر اساس طرح شبکه ای ساده برای بررسی تاثیر سه متغیر وابسته با عناوین مقادیر عصاره مخمر، گلوکز و زایلوز برای بهبود تولید اگزوپلی ساکارید توسط مخمر ردوتولا مینوتا انجام شد. فرمولاسیون بهینه برای تولید اگزوپلی ساکارید با میزان ۱۸/۷۵ g/l عصاره مخمر و ۶/۲۵ g/l زایلوز معرفی شد. گلوکز تاثیری بر تولید اگزوپلی ساکارید نداشت. تحت این شرایط حداکثر بازده پلی ساکارید پیش بینی شده ۲/۱۱ g/l بود. میزان کل قند در اگزوپلی ساکارید ۱/۰۷ g/l بود. بررسی تحقیقات نشان داد که اختلاف معناداری بین مقادیر واقعی و مقادیر پیش بینی شده وجود نداشت (Ramirez, et al., 2015).

[۱۴۱] Lactobacillus paraplantarum

کانیموژی و همکاران در سال ۲۰۱۷ مطالعاتی روی بهینه سازی تولید دکستران از ویسلا سیبباریا[۱۴۲] انجام دادند. تاثیر فاکتورهای مهم برای تولید پلی ساکارید از جمله ساکارز (منبع کربنی)، دما، دی پتاسیم هیدروژن فسفات و عصاره مخمر (منبع نیتروژنی) مورد مطالعه قرار داده شد و بهینه سازی این ترکیبات توسط روش سطح پاسخ انجام شد. حداکثر بازده تولید دکستران در غلظت ۱۵/۷۸٪ ساکارز، ۱/۲۷٪ عصاره مخمر، ۱/۲۵٪ دی پتاسیم هیدروژن فسفات و دمای ۲۶°C بدست آمد. بازده تولید ۵۱٪ بیشتر از شرایط قبل بهینه سازی بود. وزن مولکولی دکستران بدست آمده ۲۰۰۰< کیلو دالتون ارزیابی شد (Kanimozhi, et al., 2017).

رازا و همکاران در سال ۲۰۱۷ موفق به بهینه سازی استخراج اولتراسونیک پلی ساکارید های آنتی اکسیدانی از ساقه تراپا کوادریسپینوسا[۱۴۳] با استفاده از روش سطح پاسخ شدند. حداکثر بازده پلی ساکارید ۲/۷۸٪ تحت شرایط بهینه شده برای استخراج از جمله زمان استخراج ۴۱ دقیقه، نسبت آب به مواد ۳۱/۵ ml/g و دمای استخراج ۵۸°C بدست آمد. همچنین حداکثر ظرفیت آنتی اکسیدانی تحت شرایط بهینه استخراج از جمله زمان استخراج ۳۸ دقیقه، نسبت آب به مواد ۳۲ ml/g و دمای ۵۶°C بدست آمد. این مقادیر، پلی ساکارید (۲/۷۵٪) و ظرفیت آنتی اکسیدانی (۱۸/۷۷ میکرومول) با نتایج پیش بینی شده توسط RSM مطابقت داشتند (Raza, et al., 2017).

لین و همکاران در سال ۲۰۱۷ مطالعاتی روی استخراج، بهینه سازی، ویژگی های فیزیکوشیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط مزونا چاینسیس[۱۴۴] انجام دادند. بهینه سازی شرایط استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ انجام شد و حداکثر بازده پلی ساکارید (۷/۰۵ g) با استفاده از این روش بدست آمد (Lin, et al., 2017).

مالیک و همکاران در سال ۲۰۱۷ مطالعاتی روی تولید، بهینه سازی ترکیبات محیط کشت برای حداکثر بازده اگزوپلی ساکارید از گونه های انتخابی باسیلوس انجام دادند. گونه های انتخابی

[۱۴۲] Weissella cibaria
[۱۴۳] *Trapa quadrispinosa*
[۱۴۴] *Mesona chinensis*

باسیلوس برای تولید اگزوپلی ساکارید در سه محیط کشت متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند. کمترین میزان اگزوپلی ساکارید (۶/۷ g/l) ثبت شده مربوط به گونه ی باسیلوس آمیلولیکیوفاشنز[۱۴۵] بود و وزن مولکولی این اگزوپلی ساکارید ۵> کیلو دالتون ارزیابی شد. بیشترین بازده اگزوپلی ساکارید (۴۸/۵۷ g/l) مربوط به گونه ی باسیلوس لیچنیفورمیس[۱۴۶] بود که وزن مولکولی آن بین ۳۰-۵ کیلو دالتون ثبت شد. تاثیر غلظت عصاره مخمر، سوکسینات سدیم و ساکارز بر تولید اگزوپلی ساکارید از گونه ی باسیلوس لیچنیفورمیس توسط روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین بازده پلی ساکارید با افزایش غلظت سوکسینات سدیم و ساکارز و کاهش غلظت عصاره مخمر بدست آمد

(Malick, et al., 2017).

دیپاک و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطالعاتی روی بهینه سازی تولید اگزوپلی ساکارید ضد سرطان از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس[۱۴۷] با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند. تولید بهینه اگزوپلی ساکارید بعد از گذشت ۲۴ ساعت به میزان ۴۰۰ mg/l بدست آمد. در کشت متناوب بعد از ۲۴ ساعت غلظت اگزوپلی ساکارید به ۵۹۷ mg/l رسید (Deepak, et al., 2016).

گو و همکاران در سال ۲۰۱۷ موفق به بهینه سازی تولید اگزوپلی ساکارید از کوکوریا روزآ[۱۴۸] با استفاده از روش سطح پاسخ شدند. ترکیب بهینه ترکیبات محیط تخمیر برای تولید اگزوپلی ساکارید مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه از مدل آماری طراحی مرکب و روش سطح پاسخ برای بهینه سازی مرکب ترکیبات محیط کشت استفاده شد. محیط بهینه برای تولیداگزوپلی ساکارید شامل ۰/۵٪ کازئین، ۱٪ سیترات سدیم، ۰/۳٪ عصاره مخمر، ۰/۵٪ پتاسیم کلرید، ۰/۵٪ پپتون، ۵/۸٪ سولفات منیزیم و pH=۷ بود. حداکثر بازده پلی ساکارید ۴۸/۰۱ g/l بود که با مقدار پیش بینی شده (۵۰/۳۹ g/l) مطابقت داشت (Gu, et al., 2017).

[۱۴۵] *Bacillus amyloliquefaciens*
[۱۴۶] *Bacillus licheniformis*
[۱۴۷] *Lactobacillus acidophilus*
[۱۴۸] *Kocuria rosea*

بانیک و همکاران در سال ۲۰۰۷ موفق به بهینه سازی ترکیبات مغذی کشت برای تولید صمغ ژلان از اسفینگوموناس پاوسیموبیلیس[۱۴۹] با استفاده از روش سطح پاسخ شدند. از بین ۲۰ متغیر مورد مطالعه، ملاس، تریپتون، کازآمینواسید، دی سدیم هیدروژن ارتوفسفات و کلرید منیزیم بهترین تاثیر را بر تولید صمغ ژلان نشان دادند. مناسبترین ترکیب محیط کشت برای تولید صمغ ژلان شامل ملاس ۱۱۲/۵ g/l، تریپتون ۱ g/l، کازآمینواسید ۱ g/l، دی سدیم هیدروژن ارتوفسفات ۱ g/l، کلرید منیزیوم ۰/۹۴۷ g/l و بازده بهینه تولید صمغ ژلان ۱۳/۸۱۴ g/l بود (Banik, et al., 2007).

گوکسانگور و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطالعاتی روی بهینه سازی تولید پولولان از نشاسته هیدرولیز شده ی سیب زمینی با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند. منابع متفاوت نیتروژن ارگانیک مورد آزمایش قرارگرفت و بیشترین بازده پولولان با منبع عصاره مخمر بدست آمد. روش سطح پاسخ برای پیش بینی تاثیر سه فاکتور (مدت زمان کشت، غلظت سوبسترا اولیه و pH اولیه) در کشت متناوب مورد استفاده قرار گرفت. حداکثر غلظت پولولان (۱۹/۲ g/l) در مقدار بهینه متغیرهای فرآیند (مدت زمان کشت ۱۱۱/۸ ساعت، غلظت اولیه سوبسترا ۷۹/۴ g/l و pH اولیه۷/۲۶) بدست آمد. با استفاده از بهینه سازی ۲۰٪ افزایش بازده در تولید مشاهده شد (Goksungur, et al., 2011).

[۱۴۹] *Sphingomonas paucimobilis*

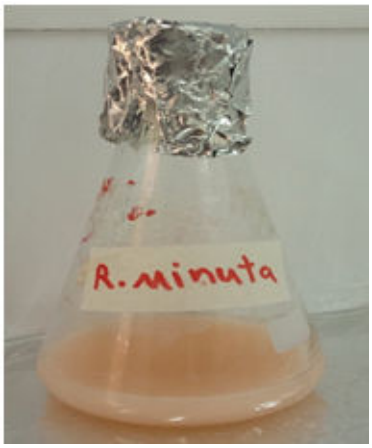
فصل سوم

مواد و روش ها

۳-۱- مواد اولیه و محلول های شیمیایی و میکروارگانیسم

۳-۱-۱- تهیه میکروارگانیسم و توسعه تلقیح

میکروارگانیسم *Rhodotorula minuta* بصورت لیوفیلیزه[۱۵۰] از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران (PTCC) خریداری شد. میکروارگانیسم لیوفیلیزه بعد از انتقال به دانشگاه در محیط کشت PDA[۱۵۱] کشت داده شد و در دمای اتاق نگهداری شد. برای نگهداری طولانی مدت میکروارگانیسم ها توسعه تلقیح در محیط کشتی شامل g/l ۳ عصاره مخمر، g/l ۳۰ گلوکز، g/l ۰/۶ NaCl، g/l ۰/۴ $MgSO_4$ و g/l ۰/۰۶ $CaCl_2$ انجام شد و در دما ۲۲°c و دور rpm ۱۸۰ رشد داده شدند (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱: رشد مخمر در محیط توسعه تلقیح غنی شده

۳-۱-۲- مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده

دی اتیل آمینو اتیل سلولز از شرکت فارماسیا[۱۵۲] (اپسلا[۱۵۳]) سوئد خریداری شد. استاندارد مونوساکاریدهای خالصD-مانوز، D-رامنوز، D-گلوکز، D-گالاکتوز، L-آرابینوز و اسید L-

[۱۵۰] Lyophiled
[۱۵۱] Potato Dexteroz Agar
[۱۵۲] Pharmacia
[۱۵۳] Uppsala

گالاکتورونیک) و DMSO[۱۵۴] از شرکت سیگما[۱۵۵] آمریکا و مرک[۱۵۶] آلمان خریداری شدند. اسید تری فلورواستیک از شرکت فلوکا[۱۵۷] تهیه شد. تمامی مواد مربوط به آزمون های میکروبی از قبیل محیط کشت PDA، منابع کربنی و منابع نیتروژنی از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. پودر سویا طبیعی خشک مارک سبحان استفاده شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از قبیل اسیدها, بازها, سرم آلبومین گاوی و ... از درجه خلوص آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۳-۱-۳- دستگاههای مورد استفاده

سانتریفوژ با ظرفیت حجمی بالا (۱ لیتر) و سرعت ۴۰۰۰ rpm ساخت شرکت اپندورف[۱۵۸] آلمان، تبخیر کننده دورانی همراه با پمپ خلا ساخت شرکت هیدولف[۱۵۹] آلمان, ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم ساخت شرکت ای اند دی ژاپن استفاده شد. از دیگر دستگاه های مورد استفاده می توان به کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی مدل اچ پی ۵۸۹۰[۱۶۰] که ساخت کشور آمریکا بود اشاره کرد.

در قسمت میکروبی از شیکر انکیباتور[۱۶۱] یخچال دار ساخت شرکت پارس آزما ایران استفاده شد. از سایر وسایل و دستگاه های مورد استفاده می توان به ستون های کروماتوگرافی، کیسه دیالیز با Cut off ۲/۵ کیلو دالتون، دسیکاتور و حمام آب گرم اشاره کرد.

۳-۲- روش کار

۳-۲-۱- تولید، استخراج و جداسازی پلی ساکارید های محلول در آب تولید شده توسط میکروارگانیسم ***Rhodotorula minuta***

[۱۵۴] Dimethylsulfoxide
[۱۵۵] Sigma
[۱۵۶] Merk
[۱۵۷] Fluka
[۱۵۸] Eppendorf
[۱۵۹] Heidolph
[۱۶۰] HP 5890
[۱۶۱] Incobator

۳-۲-۱-۱- تلقیح میکروارگانیسم به محیط تولید محصول محیط پایه برای تولید اگزوپلی ساکارید که شامل (g/l) عصاره مخمر ۱۸/۷۵، زایلوز ۶/۲۵، $(NH_4)_2SO_4$ ۲/۵،

KH_2PO_4 ۱، $MgSO4.7H_2O$ ۰/۵، NaCl ۰/۱ و $CaCl_2.2H_2O$ ۰/۱ تهیه شد. pH در ۵/۵ تنظیم شد و محیط کشت در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. تمام مواد شیمیایی که در این مرحله استفاده شد از درجه ی خلوص بالایی برخوردار بود (Ramirez, 2016).

سپس سلول های مخمر به میزان ۵٪ V/V به ارلن (۲۵۰ mL) که شامل ۱۰۰ mL محیط کشت پایه بود تزریق شد و در شیکر انکیباتور با دور ۱۸۰ rpm در دمای اتاق رشد داده شد.

۳-۲-۱-۲- استخراج پلی ساکارید محلول تولید شده توسط میکروارگانیسم

جداسازی پلی ساکارید محلول در محیط کشت که توسط میکروارگانیسم تولید شد بعد از ۴ روز تخمیر محیط تولید محصول انجام شد. برای جداسازی سلول های مخمر از عصاره محیط تولید محصول در دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد.

۳-۲-۱-۳- جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در محیط کشت

عصاره جدا شده از محیط کشت علاوه بر پلی ساکاریدهای تشکیل دهنده حاوی مواد دیگری از جمله پروتئین ها نیز بود. به منظور حذف پروتئین ها و خالص سازی عصاره از روش سواگ استفاده شد. در این روش ۲۰٪ حجم محلول، کلروفرم و ۲۰٪ حجم کلروفرم، بوتانول اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. در ادامه پروتئین های دناتوره شده توسط دستگاه سانتریفوژ به صورت لایه های رسوبی متشکل از کلروفرم، بوتانول، پروتئین و محلول آبی حاوی پلی ساکارید جداسازی شد. پس از این مرحله برای ترسیب پلی ساکاریدهای جدا شده از اتانول ۹۶٪ به میزان ۳/۵ برابر حجم محلول استفاده شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای یخچال قرار گرفت و سپس جداسازی سیال از رسوبات حاصل توسط دستگاه سانتریفیوژ صورت گرفت. رسوبات حاصل به عنوان پلی

ساکاریدهای خام توسط دستگاه خشک کن انجمادی خشک و وزن پودر حاصل بوسیله ی ترازو اندازه گیری شد (Xu, et al., 2011).

۳-۲-۲- خالص سازی پلی ساکارید محلول

به منظور خالص سای پلی ساکارید خام، از ستون کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل-سلولز (۲/۶ سانتی متر x ۵۲ سانتی متر) استفاده شد. جهت آماده سازی ستون و شستشوی مواد سلولزی به ترتیب اسیدکلریدریک ۰/۵ نرمال و سود ۰/۵ نرمال استفاده شد. پس از سه مرتبه شستشوی مواد سلولزی در نهایت دی اتیل آمینو اتیل-سلولز توسط آب مقطر شسته و در دسیکاتور تحت خلا جهت هواگیری به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس مواد یاد شده به دقت درون ستون فشرده شدند. پس از آماده سازی ستون سلولزی، ۰/۵۸ گرم پلی ساکارید خام در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و از ستون کروماتوگرافی مورد نظر عبور داده شد. در نهایت فراکشن های جدا شده توسط روش فنل-اسید سولفوریک کنترل شدند (Qiao, et al., 2009) و پلی ساکارید خالص حاصل توسط دستگاه خشک کن انجمادی به صورت کامل خشک شد. پلی ساکارید خالص سفید رنگ حاصل برای مراحل شناسایی مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۲-۲-۱- تعیین راندمان پلی ساکارید خالص تولید شده توسط ***Rhodotorula minuta***

به منظور تعیین راندمان پلی ساکارید خالص بدست آمده، پس از خشک کردن پلی ساکارید جدا شده از ستون کروماتوگرافی توسط دستگاه خشک کن انجمادی، نسبت به توزین آن اقدام شد و در نهایت با توجه به وزن بدست آمده و با استفاده از فرمول زیر راندمان پلی ساکارید خالص تولید شده توسط مخمر *Rhodotorula minuta* تعیین شد.

$$\text{راندمان بر حسب درصد} = \frac{\text{وزن پلی ساکارید خالص}}{\text{حجم محیط تولید محصول}} \times 100$$

۳-۲-۳- شناسایی پلی ساکارید محلول در آب

۳-۲-۳-۱- متیله کردن پلی ساکارید خالص

در این مرحله ۱۰ میلی گرم پلی ساکارید خالص به طور دقیق توزین شد و در ۱۰ میلی لیتر DMSO حل گردید. محلول بدست آمده توسط دستگاه امواج فرا صوت به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد و پس از یک ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۲۵°C، ۳ میلی لیتر یدید متیل به آن افزوده شد. واکنش در دمای اتاق و محیطی تاریک به مدت ۸ ساعت صورت گرفت. سپس به منظور پایان دادن به واکنش ۳ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. محصولات واکنش توسط ۶ میلی گرم کلروفرم استخراج شدند و بوسیله تبخیر کننده دورانی در فشار پایین خشک گردیدند. تکمیل عمل متیله شدن با عدم مشاهده جذب در طول موج ۳۲۰۰ تا ۳۷۰۰ Cm^{-1} که نشان دهنده عدم وجود گروه های هیدروکسیل بود تایید شد. پلی ساکارید های متیله شده توسط اسید تری فلورواستیک ۲ مولار هیدرولیز شدند و در ۲ میلی لیتر سود ۰/۲٪ به منظور حذف اسیدهای اضافی حل گردیدند. واکنش در دمای۴°C به مدت ۳۰ دقیقه کنترل شد. سپس محصولات حاصل با افزودن ۲ میلی لیتر اینیدرید استیک و ۲ میلی لیتر پیریدین و قرار گرفتن در دمای ۱۰۰°C به مدت ۳ ساعت، استیله شدند (Ciucanu and Kerek, 1984).

۳-۳- بهینه سازی محیط کشت به روش **RSM**[۱۶۲]

۳-۳-۱- میکروارگانیسم و شرایط کشت

در این قسمت از مطالعه از میکروارگانیسم *Rhodotorula minuta* استفاده شد. این میکروارگانیسم از مرکز کلکسیون میکروبی ایران تهیه در محیط PDA کشت داده شد و در دمای نگهداری شد. این میکروارگانیسم در محیط غنی شده توسعه تلقیح شامل g/l ۳ عصاره مخمر, g/l ۳۰ گلوکز, g/l ۰/۶

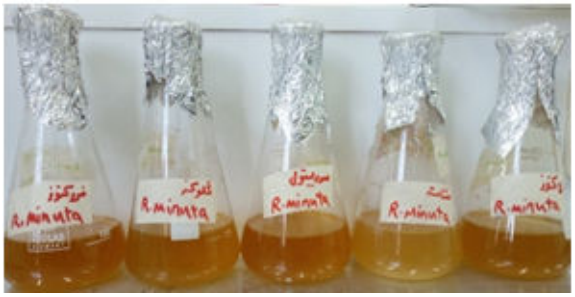
[۱۶۲] Response surface methodology

$NaCl$, ۰/۴ g/l $MgSo_4$ و ۰/۰۶ g/l $CaCl_2$ کشت داده شد و در دمای ۲۲°C و دور ۱۸۰ rpm رشد داده شدند. تمامی محیط ها بعد از تهیه در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد.

۳-۳-۲- طراحی تجربی محیط های کشت میکروبی

۳-۳-۲-۱- محیط های کشت با منابع کربنی مختلف و تثبیت منبع کربن

در این مطالعه از پنج منبع کربنی مختلف استفاده شد. مواد معدنی پایه در این محیط کشت ها (گرم در لیتر) شامل $(NH_4)_2SO_4$ ۲/۵، KH_2Po_4 ۱، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۵، $NaCl$ ۰/۱، $CaCl_2.2H_2O$ ۰/۱ و منبع پروتئینی پایه شامل عصاره مخمر ۱۸/۷۵ استفاده شد. منابع کربنی در محیط اول (گرم در لیتر) شامل ۶/۲۵ نشاسته، محیط دوم (گرم در لیتر) شامل ۶/۲۵ گلوکز، محیط سوم (گرم در لیتر) شامل ۶/۲۵ فروکتوز، محیط چهارم (گرم در لیتر) شامل ۶/۲۵ سوربیتول و محیط پنجم (گرم در لیتر) شامل ۶/۲۵ لاکتوز بود. pH تمامی محیط ها در ۵/۵ تنظیم شد (شکل ۳-۲:الف). سپس تمامی محیط ها در دما ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. به میزان ۵٪ V/V از میکروارگانیسم به ارلن های ۲۵۰ که حاوی cc ۱۰۰ محیط کشت استریل بود تلقیح شد. سپس تمامی محیط ها در شیکر انکیباتور در دمای اتاق به مدت ۴ روز در دور rpm ۱۸۰ قرار داده شدند. بعد از ۴ روز تمامی ارلن ها از دستگاه خارج شد. بعد از سانتریفیوژ کردن محیط ها دو فاز شدند. تمامی سلول های میکروبی رسوب کردند و محلول رویی جداسازی شد. بعد از پروتئین زدایی محلول رویی (به روشی که در قسمت قبل توضیح داده شد) به میزان ۳/۵ برابر حجم مخلوط به آن الکل ۹۶٪ افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای یخچال قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت رسوبات پلی ساکارید از محلول رویی توسط سانتریفیوژ جداسازی شد و توسط دستگاه خشک کن انجمادی خشک شد. پودر حاصل به عنوان پلی ساکارید خام به طور دقیق وزن شد (شکل ۳-۲:ب). سپس منبع قندی که بیشترین راندمان را داشت تثبیت شد(Xu, et al., 2011).

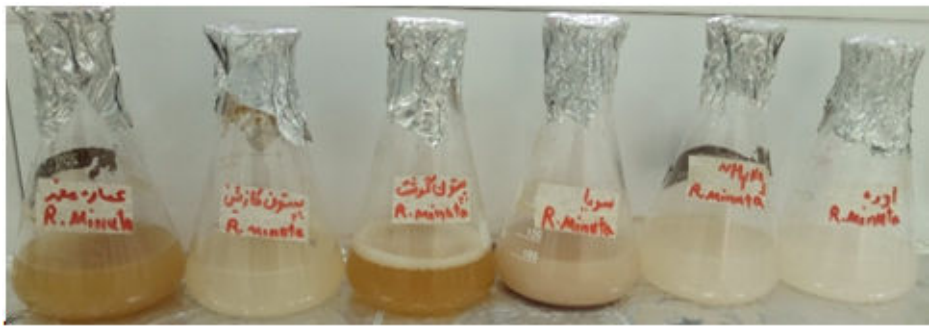


شکل ۳-۲: الف: محیط های حاوی قندهای مختلف (راست). ب: پلی ساکارید های خام تولید شده توسط مخمر Rhodotorula minuta (چپ)

۳-۳-۲-۲- محیط های کشت با منابع پروتئینی مختلف و تثبیت آن

در آزمون قبلی منبع کربنی ثابت شد. در این قسمت از مطالعه هم از شش منبع پروتئینی مختلف برای تشخیص بیشترین راندمان استفاده شد. مواد معدنی پایه که در تمام محیط ها استفاده شد شامل $(NH_4)_2SO_4$ g/l ۲/۵، KH_2Po_4 g/l ۱ ،$MgSO_4.7H_2O$ g/l ۰/۵ NaCl g/l ۰/۱ ، $CaCl_2.2H_2O$ g/l ۰/۱ و منبع کربنی که در قسمت قبل بیشترین راندمان را داشت (نشاسته = ۶/۲۵ g/l) استفاده شد. در این قسمت هم برای تعیین بیشترین بازده، ۶ منبع پروتئینی مختلف مورد آزمایش قرار گرفت. محیط اول شامل ۱۸/۷۵ g/l پپتون کازئین، محیط دوم شامل ۱۸/۷۵ g/l پپتون گوشت، محیط سوم شامل ۱۸/۷۵ g/l NH_4NO_3، محیط چهارم شامل ۱۸/۷۵ g/l سویا، محیط پنجم شامل ۱۸/۷۵ g/l اوره، محیط ششم شامل ۱۸/۷۵ g/l عصاره مخمر بود (شکل ۳-۳). تمامی محیط ها آماده شد. در ادامه در هر ارلن ۲۵۰ به میزان cc ۱۰۰ از محیط کشت قرار گرفت. سپس pH تمامی محیط ها در ۵/۵ تنظیم شد. سپس ۵٪ v/v از سلول های مخمری به محیط ها تزریق شد. شرایط دستگاه شیکر انکیباتور به صورت، دمای اتاق و دور rpm ۱۸۰ تنظیم شد. بعد از چهار روز، ارلن ها از داخل شیکر انکیباتور خارج شدند. محیط ها برای جداسازی سلول های میکروبی از محلول در دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از جداسازی محلولهای رویی از سلول ها پروتئین زدایی محلول ها انجام شد. سپس به تمای محلول ها به میزان ۳/۵ برابر حجم محلول الکل ۹۶٪ اضافه شد و مخلوط

حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای یخچال قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت مخلـوط هـا از یخچـال خـارج شدند. در این قسمت هم برای جداسازی رسوب ایجاد شـده ی پلـی سـاکارید سـانتریفیوژ انجـام شـد. رسوب حاصل در دستگاه خشک کن انجمادی خشک شد و به عنوان پلی ساکارید خام بـه طـور دقیـق وزن شد. سپس بیشترین راندمان تعیین شد (Xu, et al., 2011).



شکل ۳-۳: محیط های حاوی منابع پروتئینی مختلف

۳-۳-۳- طراحی ترکیبی توسط نرم افزار **RSM**

بر اساس نتایج مطالعات غربالگری قبلی منبع کربن و منبع نیتـروژن مشـخص شـد. توسـط نـرم افـزار RSM از این دو متغیر ۹ سطح تهیه شد (جدول ۳-۱). روش RSM یک روش قوی برای آزمـایش یـک متغیر در یک زمان می باشد (Strobel, et al., 1999). مواد معدنی پایه بـه میـزان یکسـان بـا مراحـل قبلی افزوده شد به دلیل اینکه مواد معدنی تاثیر قابل توجهی در افزایش راندمان ندارند.

جدول ۳-۱: نسبت های پیشنهادی توسط نرم افزار RSM

سطح	نشاسته	سویا
X_1	۱۵	۳۰
X_2	۱۰	۱۵
X_3	۱۲/۵۰	۱۱/۸۹
X_4	۱۶/۰۴	۲۲/۵۰
X_5	۱۲/۵۰	۳۳/۱۱
X_6	۱۰	۳۰
X_7	۸/۹۶	۲۲/۵۰
X_8	۱۵	۱۵
X_9	۱۲/۵۰	۲۲/۵۰

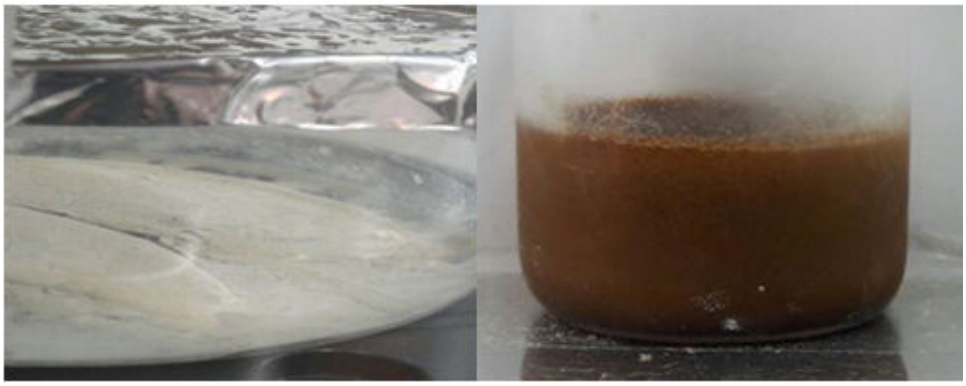
پس از تهیه محیط کشت ها طبق نسبت های مشخص شده همانند مراحل قبل محیط ها در $121^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. ۵٪ v/v از سلول های مخمر به هر محیط تلقیح شد. سپس تمامی محیط ها به شیکر انکیباتور در دمای اتاق و دور rpm۱۸۰ انتقال یافت. بعد از گذشت ۴ روز محیط ها از دستگاه خارج شدند. طبق مراحل قبل، عمل جداسازی سلول های میکروبی و محیط کشت توسط سانتریفیوژ انجام شد. پس از جداسازی محلول رویی، پروتئین زدایی انجام شد. سپس ۳/۵ برابر حجم محلول ها الکل ۹۶٪ افزوده شد. محیط ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای یخچال نگهداری شدند. در ادامه رسوب پلی ساکارید ایجاد شده توسط سانتریفیوژ جدا شد و در دستگاه خشک کن انجمادی خشک شد. توزین پلی ساکارید خشک شده به طور دقیق انجام شد.

فصل چهارم

نتایج و بحث

۴-۱- جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در محیط کشت

محیط های کشت مخمر ردوترولا مینوتا پس از سانتریفوژ و جدا شدن سلول های مخمری، مراحل پروتئین زدایی و ترسیب با اتانول را طی کردند. پلی ساکارید خام توسط دستگاه خشک کن انجمادی خشک گردید. راندمان پلی ساکارید خام ۳/۵ گرم در لیتر بدست آمد. پلی ساکارید خام (شکل ۴-۱:الف) بدست آمده برای تبدیل شدن به پلی ساکارید خالص (شکل ۴-۱:ب) وارد ستون کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل-سلولز شد و توسط آب خالص شستشو داده شد. پلی ساکارید خالص خارج شده از ستون کروماتوگرافی در نهایت تحت خلا تغلیظ شد و سپس در خشک کن انجمادی خشک شد. راندمان پلی ساکارید خالص ۲/۰۸۱ گرم در لیتر بدست آمد. رنگ پلی ساکارید خام قهوه ای بود و پس از خالص سازی، پلی ساکارید سفید رنگ بدست آمد.



شکل۴-۱: الف: پلی ساکارید خام (راست). ب: پلی ساکارید خالص (چپ).

۴-۲- متیله کردن پلی ساکارید خالص

نتایج حاصل از آنالیز کروکاتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی بیانگر وجود ۴ ترکیب متفاوت بود (جدول ۴-۱). این ترکیبات پس از شناسایی با طیف سنج جرمی عبارت بودند از ۲و۴و۶-تری متیل مانوز، ۲و۳و۶-تری متیل مانوز، ۲و۴-دی متیل مانوز و ۲و۳و۴و۶-تترا متیل گلوکز که به ترتیب با نسبت های مولی ۳/۳۵، ۳/۰۷، ۱/۳۰ و ۱/۳۶ در ساختار پلی ساکارید خالص حضور داشتند. نسبت های مولی ذکر شده نشان می هد که مونوساکاریدهای مانوز و گلوکز به ترتیب حدود ۸۵٪ و ۱۵٪ از

کل واحدهای مونومری پلی ساکارید خالص را تشکیل می دهند. با توجه به جدول ۴-۱ می توان استنباط کرد که شاخه های جانبی پلی ساکارید خالص تماما توسط واحدهای مونوساکاریدی گلوکز به انتها می رسد زیرا نسبت مولی مانوز با اتصال (۶و۳→۱) که محل تشکیل شاخه را نشان می دهد تقریبا با نسبت مولی گلوکز با اتصال (→۱) برابر است. مقدار درصد انشعاب با مراجعه به جدول ۴-۱ حدود ۱۴٪ محاسبه شد. عدم مشاهده گروه متیل روی کربن شماره ۵ واحدهای مونومری مانوز و گلوکز بیانگر این مطلب است که واحدهای نامبرده به شکل حلقه های پیرانوزی در ساختار پلی ساکارید غالب حضور دارند. با جمع بندی نتایج فوق می توان عنوان کرد که واحدهای تشکیل دهنده اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص مانوز با اتصالات (۴→۱) و (۳→۱) است که در برخی از نقاط زنجیر اصلی از محل کربن شماره ۶ مانوز شاخه های جانبی حاوی واحدهای گلوکز وجود دارند.

جدول ۴-۱: نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی پلی ساکارید خالص متیله شده

نوع اتصال	(m/z) فراگمنت های جرمی	نسبت مولی	قند متیله شده
→۱)-Man*p*-(۳→	۱۶۱, ۱۲۹, ۱۱۷, ۱۰۱, ۸۷, ۴۵, ۴۳	۳/۳۵	-Me_3-Man۶,۴,۲
→۱)-Man*p*-(۴→	۲۳۳, ۱۶۲, ۱۲۹, ۱۱۸, ۱۱۳, ۱۰۲, ۹۹, ۸۷, ۵۹, ۴۵, ۴۳	۳/۰۷	-Me_3-Man۶,۳,۲
→۱)-Man*p*-(۶, ۳→	۱۸۹,۱۲۹,۱۱۷,۸۷, ۴۳	۱/۳۰	-Me_2-Man۴,۲
→۱Glc*p*-(	۲۰۵, ۱۶۱, ۱۴۵, ۱۲۹, ۱۱۷, ۱۰۱, ۸۷, ۷۱, ۴۵, ۴۳	۱/۳۶	-Me_4-Glc۶,۴,۳,۲

در سال ۱۹۷۴ فوکاگاوا و همکاران پلی ساکارید تولید شده توسط مخمر *Rhodotorula glutinis* را خالص سازی و شناسایی کردند. نتایج بدست آمده از کروماتوگرافی لایه نازک حضور دو ترکیب L-فوکوز و D-گالاکتوز را در پلی ساکارید با نسبت مولی ۱:۱ نشان داد. هیدرولیز جزئی پلی ساکارید حضور گالاکتان را نشان داد (Fukagawa, et al., 1974).

پلی ساکارید بدست آمده از گونه ی *Rhodotorula glutinis* یک هتروپلی ساکارید اسیدی جدید که شامل ۵۸٪ قندهای خنثی و ۱۵٪ اسید اورونیک بود. قندهای خنثی که توسط کروماتوگرافی گازی شناسایی شدند شامل مانوز، فروکتوز، گلوکز و گالاکتوز با نسبت های مولی ۶/۷: ۰/۲: ۰/۱: ۰/۱ بودند (Cho, et al., 2001).

قادا و همکاران روی تولید و شناسایی پلی ساکارید حاصل از *Rhodotorula glutinis* مطالعاتی انجام دادند. این پلی ساکارید در محیط حاوی ۳۰ گرم در لیتر گلوکز و ۳ گرم در لیتر عصاره مخمر تولید شد. شناسایی پلی ساکارید توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شد. پلی ساکارید حاصل شامل قندهای مانوز، گلوکز و آرابینوز با نسبت های مولی ۳/۲: ۱/۰: ۰/۸ بود (Ghada, et al., 2012). علت تفاوت در نوع پلی ساکارید تولیدی در این گزارش و تحقیق انجام شده توسط فوکاگاوا و همکاران در سال ۱۹۷۴ و چو و همکاران در سال ۲۰۰۱ که همه بر روی یک گونه تحقیق کرده اند ممکن است بدلیل منبع کربنی متفاوت و شرایط متفاوت تولید باشد.

ویتوسکایا و الینو در سال ۱۹۷۴ مطالعاتی روی ساختار کلی پلی ساکارید دیواره سلولی گونه های *Rhodotorula glutinis*، *Rhodotorula rubra*، *Rhodotorula lactosa*، *Rhodotorula pallida*، *Rhodotorula marina*، *Rhdotorula minuta var.miuta* و *Rhodotorula minuta var.texensis* انجام دادند. یکی از پلی ساکاریدهای دیواره سلولی گونه های ردوترولا که مورد مطالعه قرار گرفت گلوکومانان محلول در آب بود که واحدهای تشکیل دهنده آن برای تمام گونه ها گلوکز و مانوز با نسبت های مولی ۱: ۲/۵ بودند. میزان مانوز، گلوکز، گروه های فسفر طبیعی و نیتروژن کل به ترتیب

برای گونـه ی *Rh. glutinis* ۶۸٪، ۲۴٪، ۰/۰۵٪ و ۰/۳۰٪، گونـه ی *Rh. rubra* ۷۴٪، ۲۶٪، ۰/۰۰٪ و ۰/۰۰٪، گونه ی *Rh. lactose* ۷۰٪، ۲۹٪، ۰/۰۰٪ و ۰/۰۰٪، گونه ی *Rh. pallida* ۶۹٪، ۲۹٪، ۰/۱۰٪ و ۰/۰۰٪، گونـه ی *Rh. marina* ۷۰٪، ۲۸٪، ۰/۰۰٪ و ۰/۰۰٪، گونـه ی *Rh. minuta var.minuta* ۶۸٪، ۲۷٪، ۰/۰۰٪ و ۰/۰۰٪ و گونـــه ی *Rh. minuta var.texensis* ۶۸٪، ۳۲٪، ۰/۰۰٪ و ۰/۰۰٪ گزارش شد. آنالیز کروماتوگرافی گـازی بـرای دو گونـه ی *Rh. lactose* و *Rh. pallida* انجـام شـد و حضور ۶ ترکیب برای این دو گونه ی میکروبی گزارش شد. میزان ترکیبـات بـرای دو گونـه بـه ترتیـب ۲،۳،۴،۶-تترا-O-متیل-β-D-گلوکوزید ۲٪ و ۱/۷٪، ۲،۳،۴،۶-تتـرا-O-متیـل-α-D-گلوکوزیـد ۱۲/۳٪ و ۱۲/۱٪، ۲،۴،۶-تـری-O-متیـل-β-D-گلوکوزیـد ۱٪ و ۵/۵٪، ۲،۴،۶-تـری-O-متیـل-D-مانوزیـد ۳۷/۸٪ و ۳۹/۴٪، ۲،۳،۶-تری-O-متیل-D-مانوزید ۳۵/۷٪ و ۳۳/۲٪ و دی-O-متیـل مانوزیـد ۱۱/۳٪ و ۸٪ گـزارش شـد. گلوکومانـان گونـه هـای *Rh. glutinis*، *Rh. rubra*، *Rh. lactose* و *Rh. pallida* شامل پلیمرهای β شاخه ای می باشند و زنجیره اصلی که مانـان مـی باشـد دارای اتصـالات (۳→۱) و (۴→۱) واحدهای مانوپیرانوز می باشد و بسیار مشابه مانان های خـارج سـلولی تشـکیل شـده از گونـه های دیگر می باشد (Vitovskaya and Elinov, 1974). در اسکلت اصلی پلـی سـاکارید مـورد مطالعـه در تحقیق فعلی نیز مانوز با اتصالات (۳→۱) و (۴→۱) می باشد.

گورین و همکاران در سال ۱۹۶۵ روی ساختار مانان خارج سلولی تولیـد شـده توسـط *Rhodotorula glutinis* مطالعاتی انجام دادند. حضور اتصالات (۳→۱) و (۴→۱) مانوپیرانوز را در زنجیـره ی اصـلی متشکل از حداقل ۹۰ واحد قندی گزارش کردند (Gorin, et al., 1965). اتصالات در مانان تولید شـده در این تحقیق مشابه تحقیق فعلی می باشد اما با واحدهای تشکیل دهنـده آن متفـاوت مـی باشـد کـه ممکن است بدلیل نوع منبع کربن مصرفی توسط میکروارگانیسم باشد.

رامیرز در سال ۲۰۱۶ موفق به تولید پلی سـاکارید از گونـه ی *Rhodotorula minuta* شـد. حـداکثر بازده پلی ساکارید خام با منبع کربنی زایلوز و منبع نیتروژنی عصاره مخمر ۲/۱ گـرم در لیتـر در دمـای

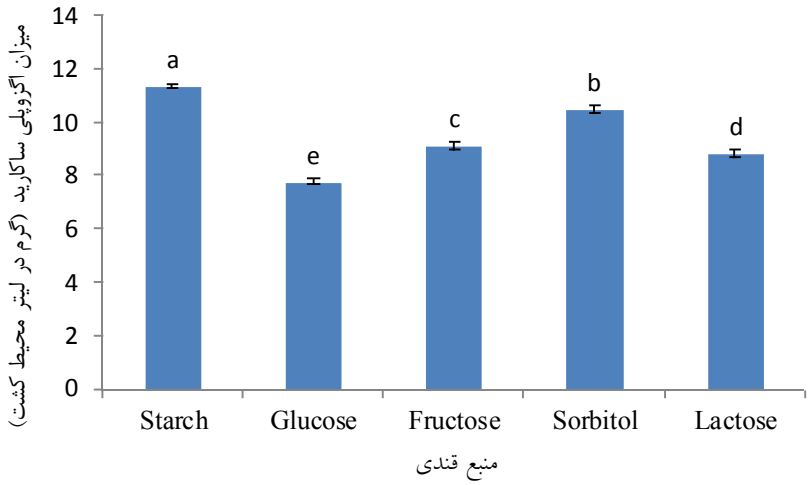
اتاق بدست آمد. شناسایی ساختار توسط آنالیز FTIR انجام شد. نتایج آنالیز حضور گروه های کربوکسیل، هیدروکسیل، پیوندهای β، گلوکز، مانوز و حلقه ی آروماتیک را نشان داد (Ramirez, 2016). نتایج حاصل از تحقیق فعلی نیز حضور مونوساکاریدهای گلوکز و مانوز را نشان داد.

۴-۳- بررسی اثرات ترکیبات محیط کشت بر میزان پلی ساکارید به روش آماری **"one-factor-at-a-time"**

۴-۳-۱- منبع کربن

با مروری بر مقالات (Ramirez, et al., 2015; Ramirez, 2016) در این مرحله از آزمون، دما (۲۱°C)، عصاره مخمر (۱۸/۷۵ گرم در لیتر)، pH (۵/۵)، دور همزن (۱۸۰ rpm) و مواد معدنی، سولفات منیزیم ۷ آبه (۰/۵ گرم در لیتر)، کلرید کلسیم ۲ آبه (۰/۱ گرم در لیتر)، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (۱ گرم بر لیتر)، دی آمونیوم سولفات (۲/۵ گرم در لیتر)، سدیم کلرید (۰/۱ گرم در لیتر) و مدت زمان تخمیر ۴ روز به عنوان ثابت های آزمون در نظر گرفته شد. منابع کربنی (نشاسته، گلوکز، فروکتوز، سوربیتول و لاکتوز به میزان ۶/۲۵ گرم در لیتر) از متغیرهای آزمون می باشند. اثر منبع کربنی در شکل ۴-۲ آورده شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان بازده اگزوپلی ساکارید با منبع قندی نشاسته نسبت به سایر منابع قندی به طور معنی داری افزایش یافته است. افزودن منبع گلوکز به محیط تولید محصول باعث کاهش معنی داری در میزان تولید پلی ساکارید شد. بعد از نشاسته بهترین منبع برای تولید اگزوپلی ساکارید قند سوربیتول می باشد. بین منبع لاکتوز و فروکتوز در تولید محصول اختلاف قابل توجهی وجود نداشت.

در تحقیقات انجام شده توسط بهاتیا و همکاران منبع کربنی نشاسته یکی از بهترین منابع کربنی برای تولید اگزوپلی ساکارید معرفی شد که ارزان و در دسترس می باشد. میزان اگزوپلی ساکارید بدست آمده بعد از ۷۲ ساعت کشت ۳۰/۲ g/l برای میکروارگانیسم اول و g/l۱۴/۵ برای میکروارگانیسم دوم گزارش شده است (Bhatia, et al., 2015).



شکل ۴-۲: اثرات منابع کربنی متفاوت (نشاسته، گلوکز، فروکتوز، سوربیتول و لاکتوز به میزان ۶/۲۵ گرم در لیتر) بر تولید اگزوپلی ساکارید (خطای انحراف معیار)

در تحقیق که توسط Gientka و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شد نشان داد که منبع کربنی تاثیر قابل توجه ای در میزان پلی ساکارید تولیدی از مخمر دارد. در این تحقیق نشان داده شد که منبع کربنی از پروتئین در تولید اگزوپلی ساکارید موثرتر می باشد. در تحقیقاتی که توسط Maalej و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد نشان دادند که منبع کربنی نشاسته منبع مناسبی برای تولید اگزوپلی ساکارید از گونه مخمری *Pseudomonas stutzeri AS22* می باشد.

بسته به گونه میکروبی که اگزوپلی ساکارید تولید می کند منبع کربنی متفاوتی محرک تولید اگزوپلی ساکارید می باشد به عنوان مثال *Zunongwangia profunda* SM-A87 در حضور لاکتوز حداکثر میزان اگزوپلی ساکارید تولید می کند (Liu et al.,2011).

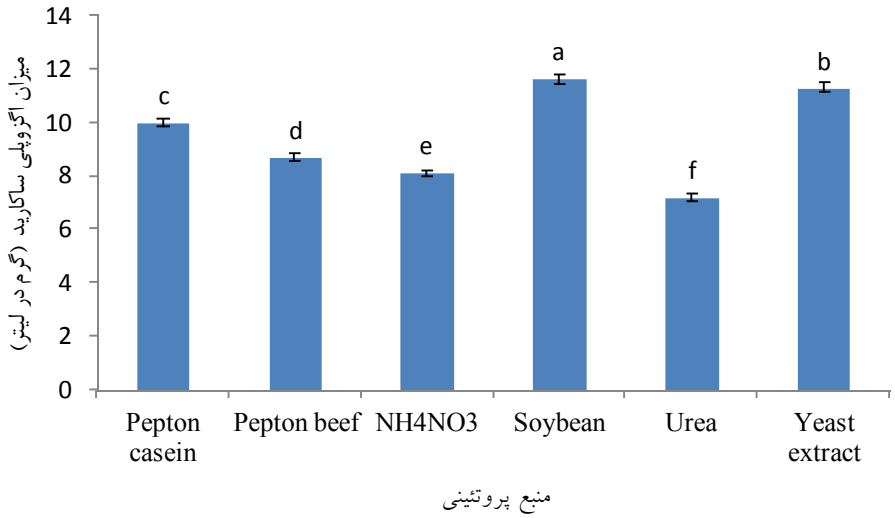
پاولوا و گریگوروا در سال ۱۹۹۹ موفق به تولید پلی ساکارید از گونه ی *Rhodotorula acheniorum* شدند. منبع کربنی مورد استفاده ۵۰ گرم در لیتر ساکارز بود. حداکثر بازده پلی ساکارید ۶/۲ گرم در لیتر بدست آمد که در مقایسه با تحقیق فعلی که میزان منبع کربنی استفاده شده در محیط تولید محصول ۶/۲۵ گرم در لیتر بود بازده بسیار بالایی داشتیم. حداقل بازده ۷/۷۵ گرم در لیتر بود که در

محیط حاوی گلوکز بدست آمد که در مقایسه با میزان منبع کربنی که استفاده کردم بسیار مناسب می باشد (Pavlova and Grigorova, 1999).

منابع زیادی گزارش کرده اند که منبع کربن تاثیر زیادی بر ویژگی های پلی ساکارید تولید شده دارد و به عنوان پیش ماده تولید پلی ساکارید توسط میکروارگانیسم ها می باشد. اکثر تحقیقات در رابطه با تولید پلی ساکارید میکروبی تاثیر منبع کربن و نیتروژن و همچنین غلظت مورد استفاده را مورد مطالعه قرار داده اند (Maura, et al., 1994; Lo, et al., 1997). همانطور که گریگوروا و همکاران گزارش کرده اند با افزایش منبع کربن، ثابت نگه داشتن میزان منبع نیتروژن تحت شرایط ثابت میزان بازده پلی ساکارید هم افزایش یافته است (Grigorova, et al., 1999).

۴-۳-۲- میزان نیتروژن

نتایج اثرات منابع نیتروژنی مختلف بر تولید اگزوپلی ساکارید در شکل ۴-۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمون گذشته منبع کربنی نشاسته به میزان ۶/۲۵ گرم در لیتر و pH (۵/۵)، دور همزن (۱۸۰ rpm)، مواد معدنی، سولفات منیزیم ۷ آبه (۰/۵ گرم در لیتر)، کلرید کلسیم ۲ آبه (۰/۱ گرم در لیتر)، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (۱ گرم بر لیتر)، دی آمونیوم سولفات (۲/۵ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۰/۱ گرم در لیتر) و مدت زمان تخمیر ۴ روز به عنوان ثابت های آزمون در نظر گرفته شد. در این منبع نیتروژنی (پپتون کازئین، پپتون گوشت، نیترات آمونیوم، سویا، اوره و عصاره مخمر) به عنوان متغیر در نظر گرفته شد. از بین این منابع منتخب منبع سویا و عصاره مخمر جزء منابع ارگانیک محسوب می شوند. نتایج نشان داد که منبع سویا در مقایسه با دیگر منابع نیروژنی باعث افزایش معنی داری در تولید اگزوپلی ساکارید شد. انتخاب منبع سویا به دلیل ارزان قیمت بودن و در دسترس بودن بسیار با اهمیت می باشد. اختلاف زیادی در میزان پلی ساکارید تولید شده توسط دو منبع نیترات آمونیوم و پپتون گوشت مشاهده نشد. کمترین میزان تولید مربوط به منبع اوره بود که در مقایسه با بازده پودر سویا اختلاف زیادی مشاهده شد.



شکل ۴-۳: اثرات منابع نیتروژنی متفاوت (پپتون کازئین، پپتون گوشت، نیترات آمونیوم، پودر سویا، اوره و عصاره مخمر) بر تولید اگزوپلی ساکاریدبا توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق این چنین تحلیل می شود که منابع کربنی و نیتروژنی تاثیر قابل توجه ای در میزان پلی ساکاریدهای تولید از گونه مخمری ردوترولا مینوتا دارد. در بین منابع کربنی نشاسته و در بین منابع نیترژنی پودر سویا محرک تولید اگزوپلی ساکارید از گونه مخمری ردوترولا مینوتا می باشد. از این رو در مرحله بعد سطوح مناسب این دو منبع کلیدی با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه شد.

Xiao و همکاران در سال ۲۰۰۴ تحقیقاتی روی تولید اگزوپلی ساکارید انجام دادند. نتایج بدست آمده نشان داد که مخمر *Cordyceps jiangxiensis JXPJ 0109* حداکثر تولید اگزوپلی ساکارید را در حضور عصاره مخمر دارد. در این تحقیق عصاره مخمر از منابع مناسب تولید اگزوپلی ساکارید شناسایی شد (Xiao, et al., 2004).

Shuangzhi و Zhenming گزارشاتی در مورد بهینه سازی محیط تولید پولولان از میکروارگانیسم *Rhodotorula bacarurn* ارائه دادند. منبع بهینه کربنی را گلوکز با میزان ۸۰ گرم در لیتر و منبع بهینه نیتروژن را پودر سویا با میزان ۲۰ گرم در لیتر معرفی کردند. بازده محصول ۵۴ گرم در لیتر گزارش شد (Shuangzhi and Zhenming, 2003).

Liu و همکاران در سال ۲۰۰۷ به طور ترکیبی از دو منبع عصاره مخمر و پپتون گوشت برای تولید پلی ساکارید از گونه ی *Agaricus blaze*i استفاده کردند. بهترین میزان مورد استفاده برای عصاره مخمر ۶/۸۴ گرم در لیتر و برای پپتون گوشت ۶/۶۲ گرم در لیتر گزارش شد. حداکثر بازده ۳/۶۴ گرم در لیتر بدست آمد (Liu., et al, 2007). از نتایج بدست آمده از تحقیق فعلی می توان نتیجه گرفت که عصاره مخمر می تواند منبع مناسبی برای تولید پلی ساکارید باشد.

۴-۴- بهینه سازی به روش آماری سطح پاسخ

آزمایش های بهینه سازی، بدست آوردن یک مدل ریاضی برای پیش بینی رفتار فرایند می باشد. طرح های بهینه سازی از عوامل کمتری نسبت به طرح های معمولی برخوردار بوده ولی این عوامل شدیدا تاثیر گذار می باشند (Strobel, et al., 1999). روش سطح پاسخ یک روش آماری برای طراحی آزمایشات، ارزیابی تاثیر فاکتورهای مختلف و یافتن شرایط اپتیمم برای بازده مطلوب می باشد و به طور وسیعی برای بهینه سازی شرایط کشت و پارامترهای دیگر استفاده می شود (Urkut, et al., 2007). از آنجایی که هدف از این مرحله در تحقیق حاضر افزایش میزان تولید اگزوپلی ساکارید می باشد، بازه ای از دو ترکیب کلیدی منبع کربن (نشاسته) و منبع نیتروژن (پودر سویا) انتخاب گردید (جدول ۴-۲) و میزان این دو ترکیب به منظور افزایش تولید اگزوپلی ساکارید به روش آماری RSM بهینه شد.

جدول ۴-۲: میزان واقعی و کد شده متغییرهای غیر وابسته در روش آماری RSM

عامل		سطح			
	-۱/۴۱۴۲	-۱	۰	۱	۱/۴۱۴۲
نشاسته (گرم در لیتر)	۸/۹۶	۱۰	۱۲/۵	۱۵	۱۶/۰۴
پودر سویا (گرم در لیتر)	۴۵/۸۵	۱۵	۲۲/۵	۳۰	۳۳/۱۱

همانطور که از جدول ۴-۳ مشخص است اثرات خطی پودر سویا و نشاسته در میزان اگزوپلی ساکارید در محیط کشت، معنی‌دار می‌باشند ($P<0.01$). اثرات متقابل نشاسته-پودر سویا برای مقدار اگزوپلی ساکارید در توده زیستی معنی‌دار نمی‌باشند ($P>0.01$). در مورد اثر درجه دوم بر تولید اگزوپلی ساکارید هر دو عامل معنی‌دار می‌باشد ($P<0.01$). معادله ۱ مدل رگرسیون را برای اگزوپلی ساکارید در توده زیستی پس از تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم‌افزار Design expert نشان می‌دهد. مقدار عددی ضریب تعیین (R^2) برای فرمول اگزوپلی ساکارید ۰/۹۹ نشان‌دهنده میزان انطباق داده‌ها در مدل رگرسیون می‌باشد و می‌توان چنین نتیجه گرفت که مدل رگرسیون بخوبی توانسته است رابطه بین شرایط کشت (نشاسته و پودر سویا) و تولید اگزوپلی ساکارید را نشان داده و پیش‌بینی کند. همچنین مدل نهایی دارای عدم تطابق[۱۶۳] غیر معنی‌دار است که نشان دهنده بر ارزش خوب مدل می باشد. جدول ۴-۳ ضریب‌های رگرسیون و مقادیر p را برای مدل رگرسیون نشان می‌دهد.

[۱۶۳] Lack of fit

جدول ۴-۳- پارامترهای ANOVA برای مدل اگزوپلی ساکارید (A نشاسته و B پودر سویا)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربع	F	P
	اگزوپلی ساکارید	اگزوپلی ساکارید	اگزوپلی ساکارید	اگزوپلی ساکارید
مدل	۵	۸/۶۱۹	۲۰۶/۲۳۵۷	<۰/۰۰۰۱
A-نشاسته	۱	۲/۳۱۷	۵۵/۴۴۵	۰/۰۰۱۷
B-پودر سویا	۱	۳۲/۶۴۱	۷۸۱/۰۱۴۶	<۰/۰۰۰۱
AB	۱	۰/۶۷۲	۱۶/۰۸۸۵۱	۰/۰۱۶۰
A^2	۱	۷/۴۶۰	۱۷۸/۵۰۹۷	۰/۰۰۰۲
B^2	۱	۱/۵۲۴	۳۶/۴۷۹۰۹	۰/۰۰۳۸
باقی‌مانده	۴	۰/۰۴۱		
عدم تطابق	۳	۰/۰۵۴	۱۰/۸۱۱۶۸	۰/۲۱۹۱
خطای خالص	۱	۰/۰۰۵		

میزان R^2 برای فرمول رگرسیون مربوط به اگزوپلی ساکارید ۰/۹۹ می باشد.

همانطور که در جدول ۴-۳ مشاهده می شود میزان F پودر سویا از منبع کربنی بالاتر می باشد که نشان دهنده تاثیر قابل توجه این سوبسترای کلیدی در تولید اگزوپلی ساکارید می باشد. از این رو چنین تحلیل می شود که افزایش پودر سویا در تولید پلی ساکارید موثرتر از نشاسته در میزان پلی ساکارید می باشد .طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ به همراه میزان واقعی داده ها در جدول ۴-۳ گزارش شده است. همانطور که در جدول ۴-۳ دیده می شود با افزایش میزان سویا میزان پلی ساکارید افزایش یافته است و همچنین با ثابت نگه داشتن میزان سویا و افزایش میزان نشاسته میزان پلی ساکارید افزایش یافته است. جدول ۴- ۴ نشان می دهد که در سطح پایین نشاسته (۱۰ گرم در

لیتر) افزایش سطح پروتئین پودر سویا از ۱۵ به ۳۰ گرم در لیتر میزان پلی ساکارید از ۸/۲ به ۱۳/۱۴ گرم در لیتر افزایش یافت (نمونه ۶ و ۱۰) در حالیکه در سطوح بالای نشاسته (۱۵ گرم در لیتر) افزایش پودر سویا از ۱۵ به ۳۰ گرم در لیتر بر میزان میزان پلی ساکارید از ۹/۹ به ۱۳/۲ افزایش یافته (نمونه ۴ و ۸) که نشان می دهد در سطوح بالای نشاسته میزان این افزایش کمتر بوده در حالیکه پلی ساکارید بیشتری در سطوح بالاتر تولید شده است. در سطوح ثابت سویا به عنوان منبع نیتروژنی افزایش منبع کربنی (نشاسته) افزایش قابل توجه ای در میزان پلی ساکارید ایجاد نشده است (نمونه ۶ و ۸، نمونه ۴ و ۱۰). چنین تحلیل می شود که افزایش منبع نیتروژنی نسبت به منبع کربنی موثرتر در تولید پلی ساکارید می باشد در واقع منبع نیتروژنی محرک تولید اگزوپلی ساکارید می باشد.

جدول ۴-۴: طراحی آزمایش ها و نتایج از دو متغییر اعمال شده بر روی پاسخ در روش RSM

پلی ساکارید			
پاسخ مشاهده شده	پودر سویا	نشاسته	نمونه
۹/۴	۲۲/۵	۱۲/۵	۱
۷/۸	۱۱/۸۹۳۴	۱۲/۵	۲
۹/۳	۲۲/۵	۱۲/۵	۳
۹/۹	۱۵	۱۵	۴
۱۲/۹	۲۲/۵	۱۶/۰۳۵۵۳	۵
۱۳/۱۴	۳۰	۱۰	۶
۱۱/۱	۲۲/۵	۸/۹۶۴۴۶۶	۷
۱۳/۲	۳۰	۱۵	۸
۱۳/۴	۳۳/۱۰۶۶	۱۲/۵	۹
۸/۲	۱۵	۱۰	۱۰

ضریب مدل چند جمله ای درجه دوم پس از تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار و حذف عبارت‌های غیرمعنی دار توسط روش Forward در نرم افزار بدست آمد و نتیجه حاصل معادله (۱) می باشد.

معادله (۱)

$$P = 31/58416 - 4/40242 \times A + 0/08066 \times B - 0/02187 \times A \times B + A^2 0/04404 \times B^2 0/01026 \times$$

میزان P مربوط به درصد پلی ساکارید می باشد. A و B به ترتیب مربوط به میزان نشاسته و پودرسویا بر حسب گرم در لیتراست.

در مطالعات انجام شده توسط دیپاک و همکاران در سال ۲۰۱۶ برای تعیین حداکثر تولید اگزوپلی ساکارید مقادیر منبع کربنی را از ۱٪ تا ۵٪ و منابع نیتروژنی از ۰/۲۵٪ تا ۱/۵٪ افزایش دادند. حداکثر بازده پلی ساکارید در میزان ۳٪ منبع کربن و ۱٪ منبع نیتروژنی مشاهده شد. با افزایش میزان منبع کربنی بازده اگزوپلی ساکارید افزایش یافت (Deepak, et al., 2016).

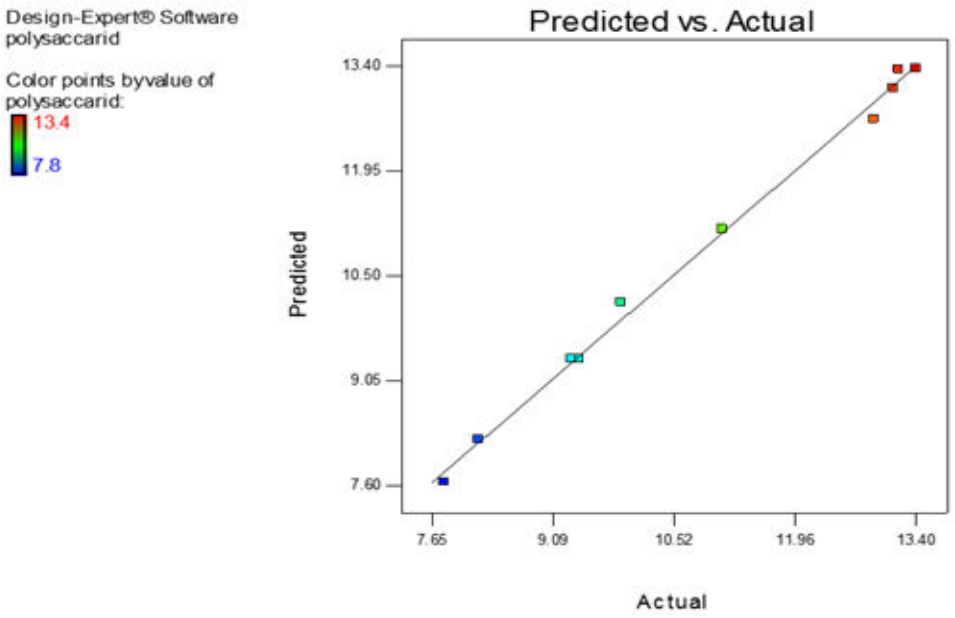
در مطالعات انجام شده توسط عمران و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش کردند که با افزایش منبع کربنی و ثابت نگه داشتن منبع نیتروژنی بازده پلی ساکارید افزایش یافت و همچنین با ثابت نگه داشتن منبع کربنی و افزایش منبع نیتروژنی میزان پلی ساکارید بدست آمده افزایش یافت. تمام داده ها با مقادیر پیش بینی شده توسط نرم افزار مطابقت داشت (Imran, et al., 2016).

در مطالعات انجام شده توسط گکسانگور و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی بهینه سازی میزان اگزوپلی ساکارید دریافتند که در pH و منبع نیتروژنی ثابت با افزایش منبع کربن میان اگزوپلی ساکارید افزایش یافت (Göksungur, et al.,2011).

۴-۴-۱- بررسی پذیرش مدل

بررسی مدل مورد نظر برای اطمینان مناسب بودن مدل بسیار مهم می باشد. منحنی پاسخ سطح برای مقادیر مختلف پلی ساکارید تولیدی رسم شده است (شکل ۴-۴). تمامی مقادیر تقریبا روی منحنی

قرار گرفته اند و خطا بسیار کم می باشد. مدل پیشنهادی بـر اسـاس دو متغیـر (منبـع کربنـی و منبـع نیتروژنی) برای پیش بینی بازده اگزوپلی ساکارید مفید بود.



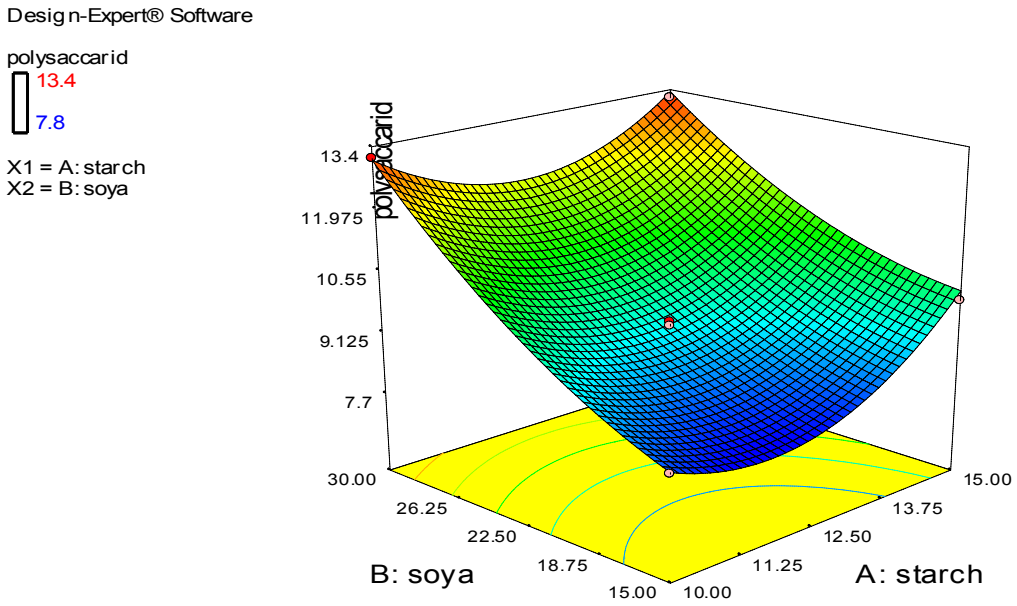
شکل ۴-۴: منحنی انطباق RSM برای بازده پیشنهادی پلی ساکارید و مقادیر واقعی بدست آمده

قرار گرفتن میزان نقاط ارتباطی میزان پلی ساکاریدهای تولید و پیش بینی شـده بـر روی خـط معادلـه چنین نشان می دهد که میزان واقعی و میزان پیش بینی شده معادله نزدیکی قابل توجـه ای داشـته و می تواند تاییدی بر معادله بدست آمده از متغییر های اعمالی بر تولید پلی ساکارید باشد.

۴-۴-۲- نتایج میزان اگزوپلی ساکارید

شکل ۴-۵ تاثیر سطوح مختلف نشاسته و پودر سویا را بر میزان اگزوپلی ساکارید نشان می‌دهـد. سـطح پاسخ نشان می دهد که هرچه میزان پودر سویا افزایش و نشاسته کاهش یابد میـزان اگزوپلـی سـاکارید افزایش می یابد. بیشترین مقدار اگزوپلی سـاکارید در غلظـت نشاسـته (۱۰g/l و۱۵) و پـودر سـویا (g/l ۳۰) بدست می آید.

در تحقیقی که توسط عمران و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شد گزارش کردند که با افزایش منبع کربنی میزان پلی ساکارید افزایش می یابد. آنها دریافتند که با توجه به آنزیم های تولید شده توسط میکروارگانیسم میزان تولید پلی ساکارید متفاوت می باشد (Imran, et al., 2016).



شکل ۴-۵: منحنی RSM برای تولید اگزوپلی ساکارید (./) به وسیله ی مخمر Rhodotorula minuta با متغیرهای نشاسته (A) و پودر سویا (B)

۴-۴-۳- مقادیر بهینه پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم برای متغییرها

مقادیر بهینه پیش بینی شده با استفاده از نرم افزار Design Expert برای متغییر های نشاسته (A) و پودر سویا (B) به منظور تولید حداکثری پلی ساکارید به ترتیب ۱۵ و ۳۰ گرم در لیتر می باشد و میزان محصول تولیدی ۱۳/۳۵ گرم پیش بینی شد. در حالی که مقادیر پیش بینی شده برای تولید حداقلی اگزوپلی ساکارید برای متغیرهای نشاسته (A) و پودر سویا (B) به ترتیب ۱۱/۵۵ و ۱۵/۴۲ گرم در لیتر می باشد.

۴-۴-۴- ارزیابی مدل رگرسیون تولید اگزوپلی ساکارید

به منظور ارزیابی مدل، شرایط پیش بینی شده مدل تولید اگزوپلی ساکارید اعمال گردید. محیط کشت مناسب تولید اگزوپلی ساکارید حاوی ۱۵ و ۳۰ گرم در لیتر نشاسته و پودر سویا بود و pH اولیه ۵/۵ تنظیم شد. پس از ۴ روز تخمیر میزان اگزوپلی ساکارید ۱۳/۴ گرم در لیتر بدست آمد که با نتایج پیش بینی شده از فرمول که میزان پلی ساکارید ۱۳/۳۵ بود نزدیکی قابل توجهی دارد. میزان خطا ۰/۳ درصد می باشد که نشان دهنده انطباق میزان پیش بینی شده نتایج با میزان واقعی می باشد.

نتیجه گیری

در این تحقیق تولید اگزوپلی ساکارید از میکروارگانیسم *Rhodotorula minuta*، شناسایی ساختار و بهینه سازی ترکیبات کلیدی محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. پلی ساکارید خام بعد از پروتئین زدایی به روش سواگ و ترسیب با اتانول در ستون های دی اتیل آمینو – سلولز و سفاکریل S-۴۰۰ خالص سازی شد. میزان راندمان پلی ساکارید خام ۳/۵۱۱ گرم در لیتر بود که بعد از خالص سازی میزان پلی ساکارید خالص ۲/۰۸۱ گرم در لیتر بدست آمد. بررسی ساختار با روش آنالیز متیلاسیون انجام شد. نتایج نشان دهنده ی حضور ۴ ترکیب در ساختار پلی ساکارید بود که شامل ۲و۴و۶-تری متیل مانوز، ۲و۳و۶-تری متیل مانوز، ۲و۴-دی متیل مانوز و ۲و۳و۴و۶-تترا متیل گلوکز بودند و به ترتیب با نسبت های مولی ۳/۳۵، ۳/۰۷، ۱/۳۰ و ۱/۳۶ در ساختار پلی ساکارید خالص حضور داشتند. واحدهای تشکیل دهنده اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص مانوز با اتصالات (۴←۱) و (۳←۱) می باشد که در برخی از نقاط زنجیر اصلی از محل کربن شماره ۶ مانوز شاخه های جانبی حاوی واحدهای گلوکز وجود دارند. همچنین در این پژوهش بهینه سازی دو ترکیب کلیدی محیط کشت تولید پلی ساکارید توسط میکروارگانیسم فوق با استفاده از روش سطح پاسخ و روش یک فاکتور در زمان با موفقیت انجام شد. فرمولاسیون بهینه محیط کشت پایه شامل ۱۵ گرم در لیتر نشاسته (منبع

کربن) و ۳۰ گرم در لیتر پودر سویا (منبع نیتروژن) بـود. تحـت شـرایط بهینـه میـزان تولیـد اگزوپلـی ساکارید افزایش پیدا کرد. حداکثر بازده تولید پلی ساکارید ۱۳/۴ گرم در لیتر بدست آمد. بـا توجـه بـه افزایش بازده پلی ساکارید در محیط جدید بنابراین نشاسته و پـودر سـویا مـی تواننـد منـابع مفیـد، در دسترس و مناسب از لحاظ اقتصادی برای تولید انبوه پلی ساکارید از میکروارگانیسم مورد نظر باشند.

پیشنهادات

کاربرد پلی ساکارید تولید شده در صنعت غذا و صنایع دیگر از جمله صنایع دارویی و شیمیایی بررسـی شود. تخمیر حالت جامد مخمر مورد استفاده بررسی شود. جهت مقرون به صرفه بودن تولیـد ایـن پلـی ساکارید می توان تولید در ضایعات کشاورزی و سوبستراهای ارزان قیمت را مورد بررسی قرار داد.

فصل پنجم

منابع

۵-۱- منابع

پورنیا پ، کچوئی ر، (مترجم) ام ماکر گ (نویسنده) (۱۳۹۱) "مخمر، فیزیولوژی و بیوتکنولوژی" چاپ اول، انتشارات جعفری.

حاج مصطفی م (۱۳۸۹)، پایان نامه کارشناسی ارشد: "بهینه سازی تولید اگزوپلی ساکارید توسط باکتری Lactobacillus rhamnosus با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)" دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

حبیبی نجفی م، سالاری ا، (مترجم) گرین پ (نویسنده) (۱۳۹۳) "مقدمه ای بر بیوتکنولوژی مواد غذایی" چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

خانی م، چگنی آ، بهرامی ا، (۱۳۹۵)، "اثر پارامترهای سرعت هوادهی، دما، سرعت همزن و pH بر تولید پلی ساکاریدهای میکروبی" فصلنامه علمی-ترویجی بسپارش، صفحه ۲۸-۱۶.

ذوقی آ (۱۳۹۵)، پایان نامه کارشناسی ارشد: "مطالعه ساختاری پلی ساکارید غالب محلول در آب از ریشه های گیاه گون نوک خمیده" دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود.

شهیدی ف، طباطبایی یزدی ف، صادقی ع، غلامحسین پور ع، (۱۳۸۹) "زیست فناوری کاربردی در صنایع غذایی" چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

فاطمی ح، (۱۳۸۶) "شیمی مواد غذایی" چاپ ششم، شرکت سهامی انتشار تهران.

مبینی س، تاج آبادی ابراهیمی م، هاشمی م، جعفری پ، (۱۳۹۱) "غربال تولید اگزوپلی ساکاریدهای متصل به سلول و رها شده به محیط در باسیلوس های جدا شده از مرغ داری های اراک" مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی، دوره دوم، شماره هفتم، صفحه ۸۴-۷۷.

ملک زاده ف، صعودی م، ملک زاده ش، (۱۳۹۵) "بیوتکنولوژی میکروبی" چاپ سوم، ناشر دانشگاه تهران.

هماپور م (نویسنده) (۱۳۹۲) "شیمی مواد غذایی" چاپ اول، انتشارات حرکت نو.

Ananeva, E. P., Vitovskaja, G. A., Burakova, M. A. (2002). Russian patent no. 2177695.

Ates, O. (2015). Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *3*.

Banik, R. M., Santhiagu, A., & Upadhyay, S. N. (2007). Optimization of nutrients for gellan gum production by Sphingomonas paucimobilis ATCC-31461 in molasses based medium using response surface methodology. *Bioresource technology*, *98*(4), 792-797.

Becerra, F. Y. G., Acosta, E. J., & Allen, D. G. (2010). Alkaline extraction of wastewater activated sludge biosolids. *Bioresource technology*, *101*(18), 6972-6980.

BeMiller, J. N., Whistler, R. L., Barkalow, D. G., & Chen, C. C. (1993). Aloe, chia, flaxseed, okra, psyllium seed, quince seed, and tamarind gums. *Industrial Gums, Whistler RL, BeMiller JN (eds.), Academic Press, New York*, 227-256.

Bertozzi, C. R., & Rabuka, D. (2009). Structural basis of glycan diversity., Chap 2. In: Varki A, Cummings RD,Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (eds) Essentials of glycobiology, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor*.

Bhatia, S. K., Kumar, N., & Bhatia, R. K. (2015). Stepwise bioprocess for exopolysaccharide production using potato starch as carbon source. *3 Biotech*, *5*(5), 735-739.

Björndal, H., Hellerqvist, C. G., Lindberg, B., & Svensson, S. (1970). Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. *Angewandte Chemie International Edition*, *9*(8), 610-619.

Breierová, E., Hromádková, Z., Stratilová, E., Sasinková, V., & Ebringerová, A. (2005). Effect of salt stress on the production and properties of extracellular polysaccharides produced by Cryptococcus laurentii. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *60*(5-6), 444-450.

Brummer, Y., & Cui, S. W. (2005). Understanding carbohydrate analysis. *Food carbohydrates: chemistry, physical properties and applications*, 1-38.

Buchanan, K. L., & Murphy, J. W. (1998). What makes Cryptococcus neoformans a pathogen?. *Emerging infectious diseases*, *4*(1), 71.

Cai, W., Xu, H., Xie, L., Sun, J., Sun, T., Wu, X., & Fu, Q. (2016). Purification, characterization and in vitro anticoagulant activity of polysaccharides from Gentiana scabra Bunge roots. *Carbohydrate polymers*, *140*, 308-313.

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., & Desmazeaud, M. (1992). Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, *75*(3), 692-699.

Chang, C. W., & Wang, P. H. (2002). Six Rhodotorula species from Taiwan. *Fungal Science*, *17*, 23-26.

Chemat, F., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., Allaf, T., & Vorobiev, E. (2015). Solvent-free extraction of food and natural products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *71*, 157-168.

Chen, Y. T., Yuan, Q., Shan, L. T., Lin, M. A., Cheng, D. Q., & Li, C. Y. (2013). Antitumor activity of bacterial exopolysaccharides from the endophyte Bacillus amyloliquefaciens sp. isolated from Ophiopogon japonicus. *Oncology letters*, *5*(6), 1787-1792.

Cho, D. H., Chae, H. J., & Kim, E. Y. (2001). Synthesis and characterization of a novel extracellular polysaccharide by Rhodotorula glutinis. *Applied biochemistry and biotechnology*, *95*(3), 183-193.

Chronakis, I. S. (1998). On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *38*(7), 599-637.

Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate research*, *131*(2), 209-217.

Comte, S., Guibaud, G., & Baudu, M. (2006a). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology*, *38*(1), 237-245.

Comte, S., Guibaud, G., & Baudu, M. (2006b). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and complexation properties of Pb and Cd with EPS: part II. Consequences of EPS extraction methods on Pb2+ and Cd2+ complexation. *Enzyme and Microbial Technology*, *38*(1), 246-252.

Cui, S. W. (Ed.). (2005a). *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*. CRC press.

Cui, S. W. (2005b). Structural analysis of polysaccharides. *Food carbohydrates: Chemistry, physical properties, and applications*, *1*.

D'Abzac, P., Bordas, F., Van Hullebusch, E., Lens, P. N., & Guibaud, G. (2010). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. *Applied microbiology and biotechnology*, *85*(5), 1589-1599.

Deepak, V., Ram Kumar Pandian, S., Sivasubramaniam, S. D., Nellaiah, H., & Sundar, K. (2016). Optimization of anticancer exopolysaccharide production from probiotic Lactobacillus acidophilus by response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *46*(3), 288-297.

Dong, Q. L., Lin, T. Y., Xing, X. Y., Chen, B., & Han, Y. (2014). Identification of a symbiotic fungus from blue–green alga and its extracellular polysaccharide. *Letters in applied microbiology*, *58*(4), 303-310.

Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, *87*(2), 951-962.

Doyle, M. P., & Beuchat, L. R. (2007). *Food Microbiology*. ASM Press. *Washington DC*, 187-219.

Dueñas-Chasco, M. T., Rodríguez-Carvajal, M. A., Mateo, P. T., Franco-Rodríguez, G., Espartero, J., Irastorza-Iribas, A., & Gil-Serrano, A. M. (1997). Structural analysis of the exopolysaccharide produced by Pediococcus damnosus 2.6. *Carbohydrate Research*, *303*(4), 453-458.

Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in biotechnology*, *29*(8), 388-398.

Fukagawa, K., Yamaguchi, H., Yonezawa, D., & Murao, S. (1974). Isolation and characterization of polysaccharide produced by Rhodotorula glutinis K-24. Agricultural and Biological Chemistry, 38(1), 29-35.

Gan, C. Y., & Latiff, A. A. (2011). Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from Parkia speciosa pod using response surface methodology. *Food Chemistry*, *124*(3), 1277-1283.

Ghada, S. I., Manal, G. H., Mohsen, M. S. A., & Eman, A. G. (2012). Production and biological evaluation of exopolysaccharide from isolated Rhodotorula glutinins. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *6*(3), 401-408.

Ghada, S. I., Manal, G. H., Mohsen, M. S. A., & Eman, A. G. (2012). Production and biological evaluation of exopolysaccharide from isolated Rhodotorula glutinins. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *6*(3), 401-408.

Gientka, I., Błażejak, S., Stasiak-Różańska, L., & Chlebowska-Śmigiel, A. (2015). Exopolysaccharides from yeast: insight into optimal conditions for biosynthesis, chemical composition and functional properties–review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, *14*(4), 283-292.

Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Stasiak-Różańska, L., Bednarska, A. A., & Błażejak, S. (2016). The exopolysaccharides biosynthesis by Candida yeast depends on carbon sources. *Electronic Journal of Biotechnology*, *22*, 31-37.

Göksungur, Y., Uzunoğulları, P., & Dağbağlı, S. (2011). Optimization of pullulan production from hydrolysed potato starch waste by response surface methodology. *Carbohydrate polymers*, *83*(3), 1330-1337.

Gorin, P. A. J., Horitsu, K., & Spencer, J. F. T. (1965). An exocellular mannan, alternately linked 1, 3-β and 1, 4-β from Rhodotorula glutinis. *Canadian Journal of Chemistry*, *43*(4), 950-954.

Grigorova, D., Pavlova, K., & Panchev, I. (1999). Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast Rhodotorula acheniorum MC. *Applied biochemistry and biotechnology*, *81*(3), 181-191.

Gu, D., Jiao, Y., Wu, J., Liu, Z., & Chen, Q. (2017). Optimization of EPS Production and Characterization by a Halophilic Bacterium, Kocuria rosea ZJUQH from Chaka Salt Lake with Response Surface Methodology. *Molecules*, *22*(5), 814.

Guo, S., Mao, W., Yan, M., Zhao, C., Li, N., Shan, J., Lin, C., Liu, X., Guo, T., Guo, Ti., Wang, s. & Wang, S. (2014). Galactomannan with novel structure produced by the coral endophytic fungus Aspergillus ochraceus. *Carbohydrate polymers*, *105*, 325-333.

Hallack, L. F., Passos, D. S., Mattos, K. A., Agrellos, O. A., Jones, C., Mendonça-Previato, L., Previato, J., Todeschini, A. & Todeschini, A. R. (2009). Structural elucidation of the repeat unit in highly branched acidic exopolysaccharides produced by nitrogen fixing Burkholderia. *Glycobiology*, *20*(3), 338-347.

Imran, M. Y. M., Reehana, N., Jayaraj, K. A., Ahamed, A. A. P., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N. & Muralitharan, G. (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by Lactobacillus plantarum NTMI05 and NTMI20. *International journal of biological macromolecules*, *93*, 731-745.

Izydorczyk, M., Cui, S. W., & Wang, Q. (2005). Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications. *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications, edited by Cui S. Boca Raton, FL: Taylor & Francis*, 263-307.

Jeeva, S., Mohan, T. S., Palavesam, A., Lekshmi, N. P., & Brindha, J. R. (2017). Production and optimization study of a Novel Extracellular Polysaccharide by wild-type isolates of Xanthomonas campestris. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, *1*(4), 175-182.

Kanimozhi, J., Moorthy, I. G., Sivashankar, R., & Sivasubramanian, V. (2017). Optimization of dextran production by Weissella cibaria NITCSK4 using Response Surface Methodology-Genetic Algorithm based technology. *Carbohydrate polymers*, *174*, 103-110.

Kawagishi, H., Kanao, T., Inagaki, R., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T., Nakamura, T. & Nakamura, T. (1990). Formolysis of a potent antitumor (1→ 6)-β-d-glucan-protein complex from Agaricus blazei fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydrate Polymers*, *12*(4), 393-403.

Khan, M. S., Zhang, X., You, L., Fu, X., & Abbasi, A. M. (2015). Structure and bioactivities of fungal polysaccharides. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, 1851-1866.

Kim, H. O., Lim, J. M., Joo, J. H., Kim, S. W., Hwang, H. J., Choi, J. W., & Yun, J. W. (2005). Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by Agrocybe cylindracea. *Bioresource Technology*, *96*(10), 1175-1182.

Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., & Kimura, T. (2005). Production of γ-aminobutyric acid (GABA) by Lactobacillus paracasei isolated from traditional fermented foods. *Food microbiology*, *22*(6), 497-504.

Kumar, A. S., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides – A perception. Journal of Basic Microbiology, 47, 103–117.

Kuncheva, M., Pavlova, K., Panchev, I., & Dobreva, S. (2007). Emulsifying power of mannan and glucomannan produced by yeasts. *International journal of cosmetic science*, *29*(5), 377-384.

Larone, D. H. (1993). *Medically important fungi: a guide to identification* (No. Ed. 2). American Society for Microbiology.

Leivers, S., Hidalgo-Cantabrana, C., Robinson, G., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P., & Laws, A. P. (2011). Structure of the high molecular weight exopolysaccharide produced by Bifidobacterium animalis subsp. lactis IPLA-R1 and sequence analysis of its putative eps cluster. *Carbohydrate research*, *346*(17), 2710-2717.

Li, B., Lu, F., Nan, H., & Liu, Y. (2012). Isolation and structural characterisation of okara polysaccharides. *Molecules*, *17*(1), 753-761.

Li, H., Xu, H., Li, S., Feng, X., & Ouyang, P. (2012). Optimization of exopolysaccharide welan gum production by Alcaligenes sp. CGMCC2428 with Tween-40 using response surface methodology. *Carbohydrate polymers*, *87*(2), 1363-1368.

Li, H., Yu, H., & Zhu, H. (2017). Structure Studies of the Extracellular Polysaccharide from Trichoderma sp. KK19L1 and Its Antitumor Effect via Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Applied biochemistry and biotechnology*, *182*(1), 128-141.

Li, P., Luo, C., Luo, R., Mou, Y., Sun, W., & Zhou, L. (2013). Effects of polysaccharides and oligosaccharides from endophytic fungus Berkleasmium sp. Dzf12 on diosgenin accumulation in Dioscorea zingiberensis cell and seedling cultures. *African Journal of Microbiology Research*, *7*(24), 3049-3055.

Li, P., Xu, L., Mou, Y., Shan, T., Mao, Z., Lu, S., Peng, Y. & Zhou, L. (2012). Medium optimization for exopolysaccharide production in liquid culture of endophytic fungus Berkleasmium sp. Dzf12. *International journal of molecular sciences*, *13*(9), 11411-11426.

Li, X., Jiao, L., Zhang, X., Tian, W., Chen, S., & Zhang, L. (2008). Structure of polysaccharides from mycelium and culture medium of Phellinus nigricans using submerged fermentation. *Science in China Series C: Life Sciences*, *51*(6), 513-519.

Li, Y., Guo, S., & Zhu, H. (2016). Statistical optimization of culture medium for production of exopolysaccharide from endophytic fungus Bionectria ochroleuca and its antitumor effect in vitro. *EXCLI journal*, *15*, 211.

Lin, L., Xie, J., Liu, S., Shen, M., Tang, W., & Xie, M. (2017). Polysaccharide from Mesona chinensis: Extraction optimization, physicochemical characterizations and antioxidant activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *99*, 665-673.

Liu, G. Q., & Wang, X. L. (2007). Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by Agaricus blazei. *Applied microbiology and biotechnology*, *74*(1), 78-83.

Liu, J., Luo, J., Sun, Y., Ye, H., Lu, Z., & Zeng, X. (2010). A simple method for the simultaneous decoloration and deproteinization of crude levan extract from Paenibacillus polymyxa EJS-3 by macroporous resin. *Bioresource technology*, *101*(15), 6077-6083.

Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., & Zeng, X. (2009). Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium Paenibacillus polymyxa EJS-3. *Carbohydrate polymers*, *78*(2), 275-281.

Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., & Zeng, X. (2010). In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium Paenibacillus polymyxa EJS-3. *Carbohydrate Polymers*, *82*(4), 1278-1283.

Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., & Zeng, X. (2010). Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium Paenibacillus polymyxa EJS-3. *Carbohydrate Polymers*, *79*(1), 206-213.

Liu, J., Wang, X., Pu, H., Liu, S., Kan, J., & Jin, C. (2017). Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity. *Carbohydrate polymers*, *157*, 1113-1124.

Liu, J., Wang, X., Pu, H., Liu, S., Kan, J., & Jin, C. (2017). Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity. *Carbohydrate polymers*, *157*, 1113-1124.

Liu, S. B., Qiao, L. P., He, H. L., Zhang, Q., Chen, X. L., Zhou, W. Z., Zho, B . C. & Zhang, Y. Z. (2011). Optimization of fermentation conditions and rheological properties of exopolysaccharide produced by deep-sea bacterium Zunongwangia profunda SM-A87. *Plos one*, *6*(11), e26825.

Lo, Y. M., Yang, S. T., & Min, D. B. (1997). Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of Xanthomonas campestris. *Applied microbiology and biotechnology*, *47*(6), 689-694.

Lundqvist, L. (2015). *Structural and interaction studies of polysaccharides by NMR spectroscopy* (Vol. 2015, No. 17).

Maalej, H., Hmidet, N., Boisset, C., Buon, L., Heyraud, A., & Nasri, M. (2015). Optimization of exopolysaccharide production from Pseudomonas stutzeri AS22 and examination of its metal-binding abilities. *Journal of applied microbiology*, *118*(2), 356-367.

Mahapatra, S., & Banerjee, D. (2016). Production and structural elucidation of exopolysaccharide from endophytic Pestalotiopsis sp. BC55. *International journal of biological macromolecules*, *82*, 182-191.

Malick, A., Khodaei, N., Benkerroum, N., & Karboune, S. (2017). Production of exopolysaccharides by selected Bacillus strains: Optimization of media composition to maximize the yield and structural characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *102*, 539-549.

Matsuo, K., Isogai, E., & Araki, Y. (2000). Utilization of exocellular mannan from Rhodotorula glutinis as an immunoreactive antigen in diagnosis of leptospirosis. *Journal of clinical microbiology*, *38*(10), 3750-3754.

Matsuzaki, H., Matsushita, M., Fujisaki, T., Furutani, M., Uesugi, T., Yasui, K., & Matsunaga, T. (2017). *U.S. Patent No. 9,665,040*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Maura, J. M., Tanenbaum, S. W., & Nakas, J. P. (1994). Optimization of novel extracellular i)] ysaeeharide production by an enterobaeter sp, on wood hydrolysates. *Appl Environ Mierobiol*, *60*(4), 1367-1369.

Miceli, M. H., Díaz, J. A., & Lee, S. A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet infectious diseases*, *11*(2), 142-151.

Mulloy B, HartGW& Stanley P (2009) Structural analysis of glycans, Chap 47. In: EdsVarki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (eds) Essential of glycobiology, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor*.

Nie, S. P., & Xie, M. Y. (2011). A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities. *Food Hydrocolloids*, *25*(2), 144-149.

Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Rodrigues, E. G., & Travassos, L. R. (2005). The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes and infection*, *7*(4), 789-798.

Orlandelli, R. C., Vasconcelos, A. F. D., Azevedo, J. L., da Silva, M. D. L. C., & Pamphile, J. A. (2016). Screening of endophytic sources of exopolysaccharides: Preliminary characterization of crude exopolysaccharide produced by submerged culture of Diaporthe sp. JF766998 under different cultivation time. *Biochimie Open*, *2*, 33-40.

Ozturk, S., Aslim, B., & Suludere, Z. (2010). Cadmium (II) sequestration characteristics by two isolates of Synechocystis sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresource technology*, *101*(24), 9742-9748.

Patel, A., & Prajapat, J. B. (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, 1-8.

Pavlova, K., & Grigorova, D. (1999). Production and properties of exopolysaccharide by Rhodotorula acheniorum MC. *Food research international*, *32*(7), 473-477.

Peng, Y., Zhang, L., Zeng, F., & Xu, Y. (2003). Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium. *Carbohydrate Polymers*, *54*(3), 297-303.

Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond Candida albicans and Aspergillus fumigatus. *Journal of clinical microbiology*, *42*(10), 4419-4431.

Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine drugs*, *8*(6), 1779-1802.

Qiao, D., Hu, B., Gan, D., Sun, Y., Ye, H., & Zeng, X. (2009). Extraction optimized by using response surface methodology, purification and preliminary characterization of polysaccharides from Hyriopsis cumingii. *Carbohydrate Polymers*, *76*(3), 422-429.

Rajeswari, P., Jose, P. A., Amiya, R., & Jebakumar, S. R. D. (2015). Characterization of saltern based Streptomyces sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. *Frontiers in microbiology*, *5*, 753.

Ramirez, M. A. J. (2016). Characterization and Safety Evaluation of Exopolysaccharide Produced by Rhodotorula minuta BIOTECH 2178. *International Journal of Food Engineering*, *2*(1), 31-35.

Ramirez, M. A. J. R., Dizon, E. I., & Mercado, S. M. (2015). Substrate Optimization for Exopolysaccharide Production by Rhodotorula minuta BIOTECH 2178 using Simplex-Lattice Design. *Journal of Society and Technology*, *5*(1), 34-41.

Ravella, S. R., Quiñones, T. S., Retter, A., Heiermann, M., Amon, T., & Hobbs, P. J. (2010). Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus Aureobasidium pullulans. *Carbohydrate Polymers*, *82*(3), 728-732.

Raza, A., Li, F., Xu, X., & Tang, J. (2017). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant polysaccharides from the stem of Trapa quadrispinosa using response surface methodology. *International journal of biological macromolecules*, *94*, 335-344.

Rosalam, S., & England, R. (2006). Review of xanthan gum production from unmodified starches by Xanthomonas comprestris sp. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(2), 197-207.

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, *12*(2), 163-171.

Rusinova-Videva, S., Pavlova, K., & Georgieva, K. (2011). Effect of different carbon sources on biosynthesis of exopolysaccharide from Antarctic strain Cryptococcus laurentii AL62. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *25*(sup1), 80-84.

Rusinova-Videva, S., Pavlova, K., Panchev, I., Georgieva, K., & Kuncheva, M. (2010). Effect of different factors on biosynthesis of exopolysaccharide from Antarctic yeast. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *24*(sup1), 507-511.

Serrato, R. V., Meneses, C. H., Vidal, M. S., Santana-Filho, A. P., Iacomini, M., Sassaki, G. L., & Baldani, J. I. (2013). Structural studies of an exopolysaccharide produced by Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5. *Carbohydrate polymers*, *98*(1), 1153-1159.

Serrato, R. V., Sassaki, G. L., Cruz, L. M., Carlson, R. W., Muszyński, A., Monteiro, R. A., Pedrosa, F.O., Souza, E.M. & Iacomini, M. (2010). Chemical composition of lipopolysaccharides isolated from various endophytic nitrogen-fixing bacteria of the genus Herbaspirillum. *Canadian journal of microbiology*, *56*(4), 342-347.

Sharma, K., Sharma, N., & Sharma, R. (2017). Multiple Parameter Optimization for Maximization of Exopolysaccharide Production from Lactobacillus paraplantarum KM1 by Response Surface Methodology. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*, *11*(2).

Sheng, Z. H., Shao, L., Chen, J. J., Bao, W. J., Wang, F. B., & Xia, X. H. (2011). Catalyst-free synthesis of nitrogen-doped graphene via thermal annealing graphite oxide with melamine and its excellent electrocatalysis. *ACS nano*, *5*(6), 4350-4358.

Shuangzhi, Z., & Zhenming, C. (2003). A new pullulan-producing yeast and medium optimization for its exopolysaccharide production. *Journal of Ocean University of Qingdao*, *2*(1), 53-57.

Singh, R. P., Shukla, M. K., Mishra, A., Kumari, P., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2011). Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria Bacillus licheniformis. *Carbohydrate polymers*, *84*(3), 1019-1026.

Singthong, J., Cui, S. W., Ningsanond, S., & Goff, H. D. (2004). Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (Cissampelos pareira) pectin. *Carbohydrate Polymers*, *58*(4), 391-400.

Smol'Kina, O. N., Shishonkova, N. S., Yurasov, N. A., & Ignatov, V. V. (2012). Capsular and extracellular polysaccharides of the diazotrophic rhizobacterium Herbaspirillum seropedicae Z78. *Microbiology*, *81*(3), 317-323.

Ströbel, R., Jörissen, L., Schliermann, T., Trapp, V., Schütz, W., Bohmhammel, K., Bohmhammele, K., Wolfe, G., & Garche, J. (1999). Hydrogen adsorption on carbon materials. *Journal of Power Sources*, *84*(2), 221-224.

Suresh Kumar, A., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides–a perception. *Journal of basic microbiology*, *47*(2), 103-117.

Tieking, M., & Gänzle, M. G. (2005). Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends in Food Science & Technology*, *16*(1), 79-84.

Trabelsi, I., Slima, S. B., Chaabane, H., & Riadh, B. S. (2015). Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by Lactobacillus sp. Ca 6. *International journal of biological macromolecules*, *74*, 541-546.

Triveni, R., Shamala, T. R., & Rastogi, N. K. (2001). Optimised production and utilisation of exopolysaccharide from Agrobacterium radiobacter. *Process Biochemistry*, *36*(8), 787-795.

Urkut, Z., Dağbağlı, S., & Göksungur, Y. (2007). Optimization of pullulan production using Ca-alginate-immobilized Aureobasidium pullulans by response surface methodology. *Journal of chemical technology and biotechnology*, *82*(9), 837-846.

Venugopal, V. (2011). Crustacean polysaccharides: chitin and chitosan. *Marine Polysaccharides: Food Applications*, 61-88.

Vitovskaya, G. A., & Elinov, N. P. (1974). Structural-metabolic polysaccharides of Rhodotorula. *Chemistry of Natural Compounds*, *10*(3), 297-299.

Wang, D., Bao, Y., Zha, J. W., Zhao, J., Dang, Z. M., & Hu, G. H. (2012). Improved dielectric properties of nanocomposites based on poly (vinylidene fluoride) and poly (vinyl alcohol)-functionalized graphene. *ACS applied materials & interfaces*, *4*(11), 6273-6279.

Wang, Y., Fang, X., An, F., Wang, G., & Zhang, X. (2011). Improvement of antibiotic activity of Xenorhabdus bovienii by medium optimization using response surface methodology. *Microbial cell factories*, *10*(1), 98.

Wang, Z. M., Cheung, Y. C., Leung, P. H., & Wu, J. Y. (2010). Ultrasonic treatment for improved solution properties of a high-molecular weight exopolysaccharide produced by a medicinal fungus. *Bioresource technology*, *101*(14), 5517-5522.

Whistler RL & BeMiller JN. (1993). *Industrial gums: polysaccharides and their derivatives*, 3rd edn. Academic, New York.

Willard, K. (2012). *Investigation of exopolysaccharide producing bacteria isolated* (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).

Xiao, J. H., Chen, D. X., Liu, J. W., Liu, Z. L., Wan, W. H., Fang, N., Xiao, Y., Qi, Y. & Liang, Z. Q. (2004). Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial growth and exopolysaccharide by Cordyceps jiangxiensis JXPJ 0109. *Journal of applied microbiology*, *96*(5), 1105-1116.

Xu, R. H., Shen, Q., Ding, X. L., Gao, W. G., & Li, P. L. (2011). Chemicalcharacterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide fractionisolated from Bifidobacterium animalis RH. European Food Research andTechnology, 232, 231–241.

Yan, J. K., Pei, J. J., Ma, H. L., Wang, Z. B., & Liu, Y. S. (2017). Advances in antitumor polysaccharides from Phellinus sensu lato: Production, isolation, structure, antitumor activity, and mechanisms. *Critical reviews in food science and nutrition*, *57*(6), 1256-1269.

Zaccheus, M. (2012). *Structural and Conformational Studies of Oligo-and Polysaccharides* (Doctoral dissertation, Department of Organic Chemistry, Stockholm University).

Abstract

In this study, exopolysaccharide (EPS) was produced by *Rhodotorula minuta* in a medium contained (g/l) yeast extract, 18.75; xylose, 6.25; $(NH_4)_2SO_4$, 2.5; KH_2PO_4, 1; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5; NaCl, 0.1 and $CaCl_2.2H_2O$, 0.1. The yield of crude and purified EPS were obtained 3/511 g/l and 2/081 g/l respectively. The structural characterization was investigated by methylation analysis. The results revealed that backbone of the pure EPS is mannose unit with (1→3) and (1→4) linkage, which in some of the main chain points at C-6 of mannose there are side branches with repeating unit of glucose. At the first step, various carbon (starch, glucose, fructose, lactose, sorbitol) and nitrogen sources (peptone casein, peptone beef, NH_4NO_3, soybean, urea, yeast extract) were investigated to evaluated the polysaccharide content. One factor at time method was applied to select key substrates and subsequently Response Surface Methodology (RSM) was used to optimize the level of key substrates. By using the one factor at time method, starch (carbon source) and soybean (nitrogen source) were chosen as good substrates for EPS production. The maximum EPS yield (13/4 g/l) was obtained that had 15 g/L starch and 30 g/L soybean via Response Surface Methodology.

Key words: Exopolysaccharide, Rhodotorula minuta, Structure, Optimization, RSM

Shahrood university of technology

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Food Science

Extraction, purification and structural elucidation of a main water-soluble polysaccharide from *Rhodotorula minuta*

By: Parisa Jalali

Supervisors:

Dr. Hamidreza Samadlui

Dr. Kambiz Jahanbin

February 2018