

## تولید، خالص سازی و تعیین ویژگی های فیزیکوشیمیایی اگزوپلی ساکارید حاصل از سویه لاکتوباسیلوس پنتوسوس

یگانه سرحدی<sup>۱</sup>، محمود توکلی<sup>۲</sup>، محمدعلی نجفی<sup>۳</sup>، صدیقه سلیمانی فرد<sup>۴</sup>، سمیه نیک نیا<sup>۴</sup>

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، علوم و صنایع غذایی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. پست الکترونیک: mtavakoli@uoz.ac.ir

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۰

### چکیده

**سابقه و هدف:** اگزوپلی ساکارید (EPS) به تمام انواع پلی ساکاریدهایی اطلاق می شود که در دیواره خارجی سلول باکتری یافت می گردد. هدف از این پژوهش بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط لاکتوباسیلوس پنتوسوس است.

**مواد و روش ها:** ابتدا اگزوپلی ساکارید از سویه لاکتوباسیلوس پنتوسوس تحت شرایط بهینه (گلوکز: w/v ۴/۱۱، ساکارز: w/v ۳/۴۷، عصاره مخمر: w/v ۳، پپتون: w/v ۳، زمان: ۳۰/۹۲ h، دما: ۴۰°C، سایز تلقیح: v/v ۳/۱۶ و pH: ۷) تولید شد. سپس نمونه ها خالص سازی و توسط خشک کن انجمادی خشک شد. در مرحله بعد برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی از قبیل آزمون NMR، ظرفیت نگهداری آب، شاخص حلالیت آبی، فعالیت ضد بیوفیلم، آزمون رئولوژیکی و مهار فعالیت رادیکالی DPPH آزمون شد.

**یافته ها:** مقدار اگزوپلی ساکارید و توده سلولی حاصل از سویه لاکتوباسیلوس پنتوسوس ۰/۲۲۵ mg/ml و مقدار بیومس آن ۰/۴۰۵ mg/ml بدست آمد. نتایج حاصل از طیف NMR اگزوپلی ساکارید به طور کلی نشان دهنده ی حضور پروتون آنومریک، پروتون های حلقوی و آلکیل ها بود. شاخص حلالیت آبی و ظرفیت نگهداری آب EPS به ترتیب برای لاکتوباسیلوس پنتوسوس ۲۷/۱۴٪ و ۱۷۰٪ بدست آمد. بالاترین میزان مهار ضد بیوفیلم EPS بر علیه سویه سودوموناس اثرورژنزا مشاهده شد. بررسی آزمون رئولوژیکی تغییر فرکانس EPS نیز نشان داد که EPS تولید شده رفتار سیال غیرنیوتنی سودوپلاستیک را دارد. EPS تولید شده فعالیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال DPPH متوسط نشان داد.

**نتیجه گیری:** EPS حاصل از سویه لاکتوباسیلوس پنتوسوس پتانسیل یک ماده طبیعی برای کاربردهای صنایع غذایی و سایر بخش های مرتبط را دارا است.

**واژگان کلیدی:** اگزوپلی ساکارید، فعالیت آنتی اکسیدان، رزونانس مغناطیس هسته ای، رئولوژی

### • مقدمه

ضد میکروبی از قبیل اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، باکتریوسین ها و اگزوپلی ساکاریدها را ترشح می کند (۱، ۲). پلی ساکاریدها مولکول هایی با وزن مولکولی بالا هستند که از واحدهای قندی کوچک تری به نام مونوساکاریدها تشکیل و از طریق پیوند گلیکوزیدی بهم متصل می شوند (۳). میزان فعالیت زیستی پلی ساکاریدها به ویژگی های مولکولی، از جمله ترکیب مونوساکارید، نوع پیوند، جایگزین های غیراسیدی و

باکتری های اسید لاکتیک در صنایع غذایی جهت جلوگیری از فساد مواد غذایی، تولید محصولات تخمیر شده با اثرات ضد باکتریایی، به عنوان مواد نگهدارنده برای افزایش مدت زمان نگهداری و حفظ خصوصیات مواد مغذی و ایمنی بخشی مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرند. لذا باکتری های اسید لاکتیک توجه زیادی در بخش بیوتکنولوژی مواد غذایی را به خود جلب کرده اند. باکترهای اسید لاکتیک مواد مختلف

Ca6 ممکن است به عنوان یک عامل بهبود زخم در پزشکی مدرن مفید باشد (۱۳). در پژوهش دیگری Maalej و همکاران (۲۰۱۷) خصوصیات اثر EPS تولید شده توسط *Sudomonas* استئوزری (*Pseudomonas stutzeri*) AS22 بر روی فعالیت ضد باکتریایی فساد مواد بر سی کردند و نتایج نشان داد که اثر EPS در کاهش رشد باکتری‌های گرم منفی خوب بوده و روند متفاوتی در باکتری‌های گرم مثبت داشت (۴).

در مطالعه ای که تو سطر Raisi و همکاران در سال ۲۰۱۹ صورت گرفت. فاکتورهای زمان، دما و عوامل مؤثر بر تولید EPS برای سویه *L. فرمنتوم* MT. ZH893 و *L. پنتوسوس* MT. ZH693 به روش سطح پاسخ مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۴). مطالعه حاضر در ادامه تحقیقات Raisi و همکاران می‌باشد.

طبق مطالعات انجام شده اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی به علت دارا بودن ویژگی‌های فیزیکی و رئولوژیکی در بخش‌های مختلفی نظیر مواد غذایی و دارویی به کار برده می‌شوند. در صنایع غذایی به عنوان یک ماده دارای ویسکوزیته، پایدار کننده، عامل تشکیل ژل و یا عامل امولسیون‌ی کاربرد دارد (۹) و در صنعت دارویی به عنوان فلوکولانت‌های زیستی، جذب کننده‌های زیستی، عامل حذف فلزات سنگین و عامل دارویی شناخته شده و به دلیل فعالیت ضد توموری، ضد ویروسی، ضد التهابی و تحریک کننده سیستم ایمنی بسیار مورد توجه هستند (۸) لذا در این پژوهش برای اولین بار آزمون‌های رزونانس مغناطیس هسته‌ای، ظرفیت نگهداری آب، شاخص حلالیت آبی، فعالیت ضد بیوفیلم، رئولوژی و مهار فعالیت آنتی‌اکسیدانی اگزوپلی ساکارید حاصل از سویه بومی *L. پنتوسوس* انجام شد.

#### • مواد و روش‌ها

**تهیه سویه باکتری و محیط کشت:** سویه باکتری *L. پنتوسوس* MT.ZH693 توسط توکلی و همکاران در سال ۲۰۱۷ از پنیر محلی مازندران جداسازی و به صورت پودر خشک نگهداری شدند (۱۵). قبل از انجام هر آزمون باکتری در محیط کشت MRS broth دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شرایط بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت فعال سازی گردید. برای تشخیص خالص بودن سویه مورد نظر، کشت خطی نمونه‌ها در محیط کشت MRS-Agar با استفاده از روش Nambiar و همکاران ۲۰۱۸ انجام شد (۱۶). محیط کشت در نقاط بهینه به دست آمده در شرایط یکسان تحقیق، طبق نتایج Raisi و همکاران ۲۰۱۹ (گلوکز: ۴٪/۱۱ w/v، ساکارز: ۳٪/۴۷ w/v، عصاره مخمر: ۳٪ w/v، پیتون: ۳٪ w/v، زمان: ۳۰/۹۲ h، دما:

همچنین وزن مولکولی و درجه پلیمریزاسیون پلی ساکارید به سستی دارد (۴). ترکیبات پلی ساکاریدی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها مانند زانتان (Xanthan)، ژلان (Gellan)، آلژینات (Alginate)، کوردلان (Curdlan)، پلوان (Pullulan) و دکستران (Dextran) میکروبی، در مقایسه با پلی ساکاریدهای جدا شده از منابع گیاهی به دلیل داشتن ویژگی‌هایی چون پایداری شیمیایی، تولید زیاد در مقیاس صنعتی و در دسترس بودن منابع دارای مزایای بهتری هستند (۵، ۶).

پلی ساکاریدهای میکروبی به دو شکل پلی ساکاریدهای کپسولی و اگزوپلی ساکاریدها (EPS) تولید و نقش مهمی در حفاظت میکروب‌ها در برابر حمله‌ی فاگوسیتوز، ترکیبات سمی و آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (۷). اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی پلیمرهای محلول و نامحلول هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها به محیط اطراف ترشح می‌شوند (۸) و شامل دو گروه مهم هتروپلی ساکارید و هموپلی ساکارید هستند (۹). هتروپلی ساکاریدها در ساختمان خود بیش از یک نوع قند مونومری دارند در حالی که هموپلی ساکاریدها از یک قند مونومری تشکیل شده‌اند (۱۰).

Sonmez و همکاران ۲۰۱۸ نشان دادند گونه‌های پروبیوتیک از جمله *L. رامنوسوس*، *L. فرمنتوم* (*L. fermentum*) و *L. برویس* (*L. brevis*) قادر به تولید EPS هستند (۱۱). در حال حاضر توجه زیادی به بهبود بافت مواد غذایی توسط سویه‌های تولید کننده EPS صورت گرفته است در پژوهشی Bomfim و همکاران (۲۰۲۰) EPS‌های تولید شده توسط سه سویه *L. رامنوسوس* (*L. rhamnosus*) EM1107، *L. موکازئی* (*L. mucasei*) CNPC007 و *L. پلانتاروم* (*L. plantarum*) CNPC003 بررسی و بر اساس نتایج بالاترین مقدار تولید EPS مربوط به سویه CNPC003 بود. همچنین در این پژوهش پس از جداسازی و تخلیص EPS از هر سویه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن در غلظت‌های مختلف (۵/۰، ۲ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) در شرایط *in vitro* توسط DPPH ارزیابی و اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد EPS‌های جدا شده دارای توانایی آنتی‌اکسیدانی (Antioxidant) قابل توجهی هستند بطوری که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میانگین ABTS  $0/8 \pm 90/88$  مربوط به غلظت ۸ mg/mL بود (۱۲).

در مطالعه‌ای Trabelsi و همکاران، ۲۰۱۷ فعالیت‌های ضد باکتری و آنتی‌اکسیدانی اگزوپلی ساکارید (EPS-Ca6) تولید شده از سویه لاکتوباسیلوس Ca6 بررسی و اظهار کردند که EPS-Ca6 دارای فعالیت آنتی‌اکسیدان بالقوه است و EPS-

ترتیب در فرکانس های ۴۰۰ و ۶۰۰ مگاهرتز انجام شد. در این روش ۳۰ میلی گرم اگزوپولی ساکارید در ۱ میلی لیتر محلول DMSO ۹۹/۶٪ حل شده و توسط دستگاه طیف سنج 500 NMR MHZ Bruker (آزمایشگاه گروه شیمی- دانشگاه صنعتی شریف) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت (۱۷).

تجزیه طیف  $^1\text{H}$  و  $^{13}\text{C}$  NMR توسط دستگاه طیف سنج 500 NMR MHZ Bruker (آزمایشگاه گروه شیمی- دانشگاه صنعتی شریف) به ترتیب در فرکانس های ۴۰۰ و ۶۰۰ مگاهرتز انجام شد. در این روش ۳۰ میلی گرم اگزوپولی ساکارید در ۱ میلی لیتر محلول DMSO ۹۹/۶٪ حل شده و توسط دستگاه طیف سنج 500 NMR MHZ Bruker (آزمایشگاه گروه شیمی- دانشگاه صنعتی شریف) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت (۱۷).

**ظرفیت نگهداری آب EPS:** ظرفیت نگهداری آب اگزوپولی ساکارید (Water holding capacity) WHC به روش Ahmed و همکاران ۲۰۱۳ صورت گرفت (۱۸). ۰/۰۲ گرم نمونه در ۱ میلی لیتر آب دیونیزه حل کرده و بر روی میکسر قرار داده شد تا خوب مخلوط شود. مواد حاصل با سرعت ۱۶۰۰۰ دور و به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد. آبی که توسط نمونه جذب نشده بود، دور ریخته شد و EPS باقی مانده بر روی کاغذ صافی برای زهکشی کامل آب قرار گرفت. وزن نمونه باقی مانده اندازه گیری و درصد WHC از طریق بیان زیر محاسبه شد:

(۱)

$$\text{WHC} (\%) = \frac{\text{وزن خشک نمونه} / \text{وزن کل نمونه پس از جذب آب}}{\text{}} \times 100$$

**شاخص حلالیت آبی (WSI):** این آزمون به روش Saravanan و Shetty ۲۰۱۶ صورت گرفت (۱۹). بر این اساس ۰/۰۴ گرم نمونه را در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با (۵۰۰۰×g) سانتریفوژ شد. و مایع رویی را در پلیتی که قبلاً توزین شده بود ریخته و نمونه در آن با دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت خشک شد. شاخص حلالیت آبی از رابطه ی زیر به دست می آید.

(۲)

$$\text{WSI} = \frac{\text{وزن مواد خشک در مایع رویی}}{\text{وزن ماده خشک اولیه}}$$

۴۰°C، ساینز تلقیح: v/v ۳/۱۶ و pH (۷) و تنظیم pH به وسیله ۱ M HCL ۱ مولار و NaOH ۰/۱ نرمال انجام شد (۱۴).

**تولید، جداسازی و خالص سازی EPS:** ابتدا از کشت ۲۴ ساعته ل. پنتوسوس به میزان ۱٪ به محیط MRS مایع تلقیح و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شد. سپس محیط های کشت در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (5810 Eppendorf-Germany) (۱۲۰۰۰×g) شدند. مایع رویی برای جدا سازی اگزوپولی ساکارید رها شده در محیط کشت استفاده شد. اگزوپولی ساکارید استخراج شده در مایع رویی به میزان حجمی برابر با اتانول سرد ۹۶٪ رسوب داده شد. سپس رسوب حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه (۱۲۰۰۰ × g) سانتریفوژ گردید و رسوب با آب دیونیزه شستشو شد. به منظور حذف سلول های باکتریایی و همچنین پروتئین، ۵۰ درصد (وزنی/ حجمی) تری کلرواستیک اسید به نمونه اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در دما ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ × g) شد. نمونه ها درون کیسه دیالیز (12,000-14,000 MW cut off) ریخته و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته درون آب دیونیزه با چهار بار تعویض آب در روز قرار داده شد. سپس رسوب حاصل در کیسه های دیالیز در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ × g) شد. نمونه ها (شکل ۱) توسط خشک کن انجمادی (۷۲ ساعت در دستگاه DFR-02- دانشکده دارو سازی دانشگاه علوم پزشکی زابل) خشک شد (۱۶).



شکل ۱. اگزوپولی ساکارید تولید شده از سویه ل.

پنتوسوس MT.ZH693

**رزونانس مغناطیس هسته ای (NMR):** تجزیه طیف  $^1\text{H}$  و  $^{13}\text{C}$  NMR توسط دستگاه طیف سنج 500 NMR MHZ Bruker (آزمایشگاه گروه شیمی- دانشگاه صنعتی شریف) به

محدوده فرکانس زاویه‌ای ۰/۰۰۱ تا ۱۰ هرتز در ناحیه ویسکوالاستیک خطی صورت گرفت.

**اندازه گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان به روش DPPH:** اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان به روش Zhang و همکاران ۲۰۱۶ انجام گردید (۲۲). بطور خلاصه، ۰/۵ میلی لیتر از بخش های آبی (۲/۵، ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰) با محلول ۳/۵ میلی لیتر محلول DPPH (۰/۲ میلی مولار، حل شده در اتانول ۹۵٪) مخلوط شد. پس از انکوبه شدن در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک قرار گرفت، جذب در ۵۱۷ nm تعیین شد. فعالیت رادیکال DPPH (SR) به صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$SR (\%) = [1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}] \times 100 \quad (4)$$

که در اینجا  $A_i$  جذب در حضور نمونه است و  $A_j$  جذب در غیاب محلول DPPH است و  $A_0$  جذب در غیاب نمونه و از اسید اسکوربیک به عنوان نمونه کنترل استفاده شده است.

**تجزیه داده ها:** از آزمون ANOVA یکطرفه (Duncan) توسط نرم افزار SPSS و نسخه 18 برای مقایسه میانگین‌ها در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده شد. داده ها میانگین ۳ تکرار می‌باشند.

## • یافته‌ها

**آنالیز NMR اگزوپلی ساکارید حاصل از سویه لاکتوبا سیلوس پنتوسوس:** در این روش می‌توان از طریق میزان احساس میدان به وسیله هسته یک اتم، شکافتگی‌های حاصل از اتم‌های مجاور در طیف را دریافت. این شکافتگی‌ها نشان دهنده الگو ساختاری پیچیده‌ای هستند که می‌توان از طریق آن به چینش اتم‌ها در یک مولکول پی برد. طیف NMR اگزوپلی ساکاریدها (شکل ۲) به طور کلی شامل: منطقه آنومریک ( $\delta$  H ۴/۵-۵/۵)، منطقه پروتون های حلقوی (۴/۵-۳/۱  $\delta$  H) و منطقه ی آلکیل‌ها (۱/۲-۲/۳  $\delta$  H) می‌باشد. بر این اساس طیف H-NMR معمولاً برای بررسی پیکربندی گلیکوزیدی پلی ساکاریدها استفاده می‌شود یا به عبارتی نوع ترکیب پلی ساکارید، خلوص و بررسی بقایای موجود در کربوهیدرات را توصیف می‌کند (۲۳). در هر دو طیف H-NMR/پنتوسوس MTZH643 سیگنال‌های بین ۵/۳ و ۴/۵ ppm مربوط به پروتون های آنومریک EPS است این سیگنال‌ها اغلب به عنوان علامت‌های ساختار های کربوهیدرات متمایز

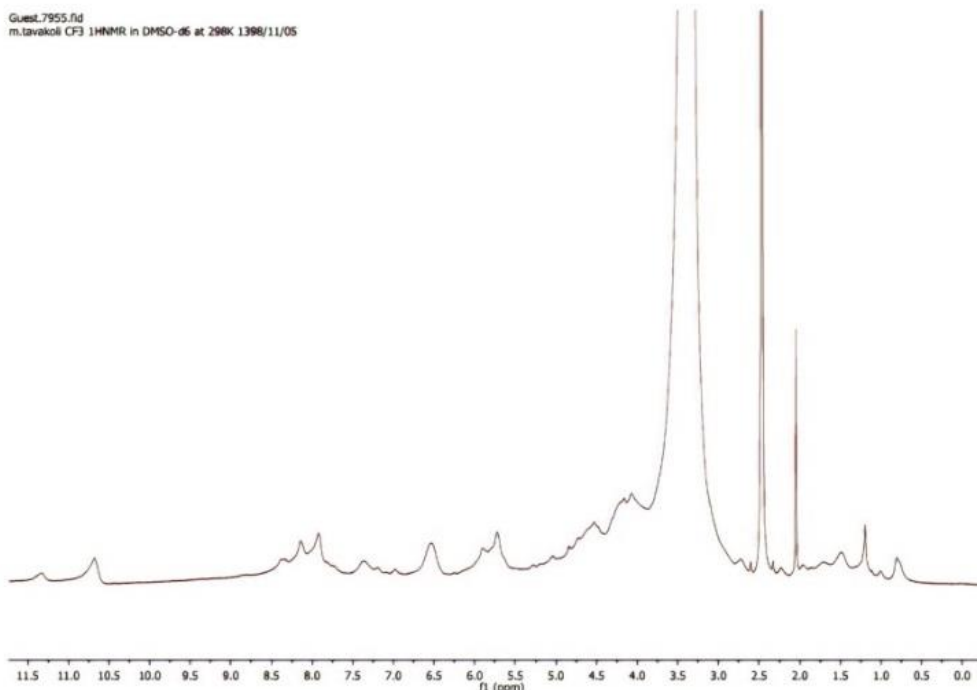
**فعالیت ضد بیوفیلیم:** تست مهار تولید بیوفیلیم طبق روش Liu و همکاران ۲۰۱۷ انجام شد (۲۰). در این روش ابتدا میکروارگانیسم‌های فعال سازی شده سودوموناس *Aeruginosa* (CMCC10104)، *Escherichia coli* (O157:H7)، *Salmonella typhimurium* (ATCC1331)، استافیلوکوکوس *aureus* (CMC26003) در محیط کشت ال. بی برات (Luria Bertani Broth) تا رقت (۱:۱۰۰) رقیق شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. این محیط‌های کشت بعد از انکوبه سیون به پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند. برای به دست آوردن میزان مهار EPS مقادیر مختلفی از این ماده (۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲) در آب مقطر حل شده با استفاده از یک فیلتر غشای ۰/۲۲ میکرولیتر استریل شده و به پلیت ۹۶ خانه اضافه می‌شود. چاهک‌های حاوی محیط کشت به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته می‌شود. پس از ۲۴ ساعت انکوبه‌سیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، محتویات پلیت‌ها دور ریخته شده و خانه‌های پلیت با آب مقطر استریل شسته و در دمای اتاق خشک شدند. سپس در هر خانه ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۹۵٪ ریخته و پس از ۱۵ دقیقه متانول را خارج کردیم. پلیت به مدت ۵ دقیقه با کریستال ویواله ۲ (w/v) رنگ آمیزی می‌شوند. سپس ۴ بار با آب مقطر استریل شستشو داده بعد از اینکه پلیت در هوای آزاد خشک شد به پلیت ۰/۱۶ میلی لیتر اسید استیک (۷/۷) ۳۳٪ اضافه می‌شود. برای تعیین توده بیوفیلیم مقادیر ۱۲۵ میکرولیتر رنگ از هر خانه به یک پلیت ۹۶ خانه ی جدید منتقل شد. توسط دستگاه الایزا ریدر جذب در ۵۴۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌گردد. توانایی آنتی‌بیوفیلیم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$(\%) = [1 - (\text{OD}_{\text{نمونه}} / \text{OD}_{\text{کنترل}})] \times 100 \quad (3)$$

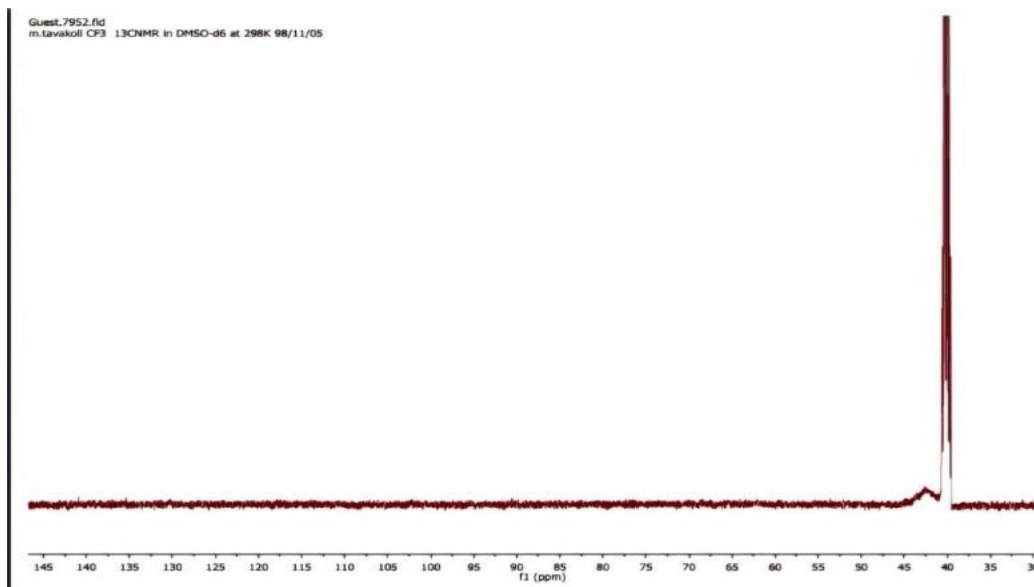
**آزمون فرکانس متغیر:** این آزمون به روش Rütering و همکاران (۲۰۱۸) انجام گرفت (۲۱). این آزمون توسط دستگاه Rheometer MCR300 –Anton paar-Austria (آزمایشگاه سیمین سپهر مهر اندیش اصفهان) در دمای ثابت ۲۵ °C تحت کرنش ثابت انجام و ویژگی‌های ویسکوالاستیک مانند مدول ذخیره (Storage modulus) و مدول افت (modulus loss) تعیین شد. در ابتدا روی نمونه آزمون کرنش متغیر برای تعیین ناحیه خطی انجام شد. آزمون فرکانس متغیر در

طیف C-NMR شامل منطقه کربن های آنومر یک (۹۵-۱۱۰ ppm) و منطقه کربن های حلقوی (۵۰-۸۵ ppm) می باشد (شکل ۳) (۲۵). وقتی که یک اتم هیدروژن در موقعیت  $\beta$  یا در موقعیت  $\gamma$  نسبت به اتم کربن تشدید شده باشد. تغییر ایزوتوپ ثانویه در طیف CNMR مشاهده می شود. بنابراین، طیف CNMR تغییرات شیمیایی متفاوتی را به خاطر تبادل اتم های هیدروژنی هیدروکسیل نشان می دهد. تغییر ایزوتوپ ناشی از دوتریوم استفاده کردند. تغییر ایزوتوپ وابسته برای ارزیابی مجدد علائم قبلی پیک های C مونو و دی ساکارید می باشد در واقع، توزیع هیدروکسیل روی حلقه های ساکارید، سیگنال شروع دایمر (DIS) متفاوتی را به دلیل سهم متفاوت اثر  $\beta$  و  $\gamma$  ایجاد کرد. از آنجا که هر نوع پیوند گلیکوزیدی (۲-۱)، (۳-۱)، (۴-۱)، (۶-۱) الگوی خاصی از مقادیر را ارائه می دهد این تکنیک برای کمک به تخصیص طیف های C و شناسایی ساختار پلی ساکاریدهای ناشناخته بسیار مفید است. لازم به ذکر است که واگذاری برخی از زوج ها می تواند معکوسی باشد زیرا آن ها دارای تغییرات شیمیایی بسیار مشابه و مقادیر DIS هستند (۲۶).

می باشد. تغییرات شیمیایی در  $\delta$  ۵/۳۰۸ مربوط به پروتون آنومر یک (۳-۱) پیوندهای گلیکوزیدی می باشد. تغییرات شیمیایی در  $\delta$  ۵/۱۳ مربوط به باقی مانده هگزاپیرانوزیل و تغییرات در  $\delta$  ۴/۵۴ و  $\delta$  ۴/۲۳ مربوط به حلقه ی پیرانوز در ساختار آنومر یک هستند و طیف، سیگنال های بین ۴/۵ و ۳/۱ ppm که بلندترین پیک را شامل می شود مربوط به پروتون های متصل به C2-C6 می باشد. این پیک نشان دهنده حضور احتمالی استر RCOO-H در EPS حاصل از لاکتوبا سیلوس ها می باشد که به طور کلی نشان دهنده حضور مشتقات کربوهیدرات ها و الکل ها است (H-C-OH) و پیک هایی در محدوده ۰/۶-۱/۸ نشان دهنده حضور آلکان هایی همچون  $\text{CH}_2$  و  $\text{CH}_3$  می باشد (۲۴، ۲۳). از طرفی تغییرات شیمیایی در ۳/۴۸ تا ۴/۱۴ (۴/۱۶) به پرتون های H-۲ و H-۶ به اختصاص دارد. اگرچه سیکل های منطقه پروتون حلقوی به طور جدی با یکدیگر همپوشانی داشتند اما به طور کامل به آن ها اختصاص داده نشده است (۲۵).



شکل ۲. آنالیز  $^1\text{H}$ NMR اگزوپلی ساکارید استخراجی از ل. پنتوسوس MT.ZH693

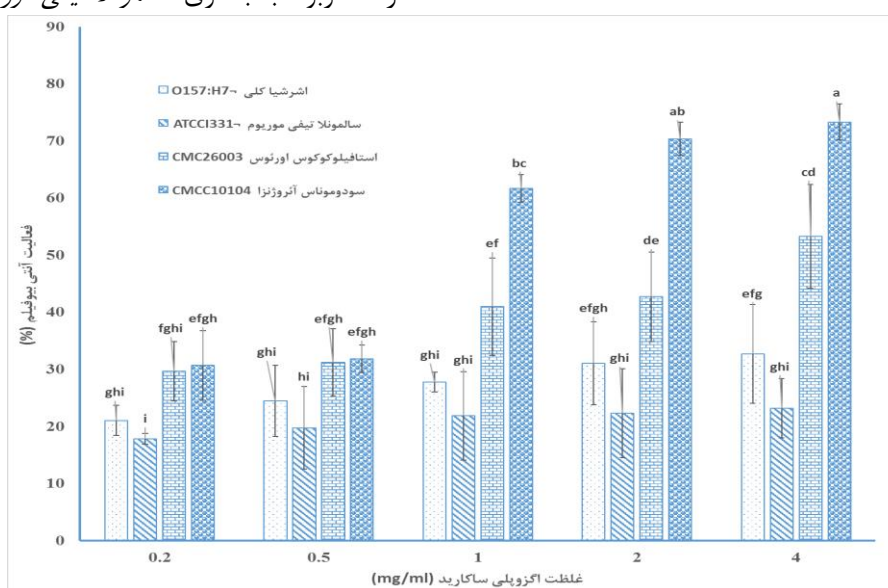


شکل ۳. آنالیز CNMR اگزوپلی ساکارید استخراجی از *MT.ZH693* پنتوسوس

اورئوس CMC26003 با افزایش غلظت EPS میزان فعالیت ضد میکروبی افزایش یافته است به طوری که در بین غلظت‌های مورد استفاده، به ترتیب غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مؤثرترین و غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کم‌اثرترین بود. همچنین نتایج نشان داد که در بین سویه‌های مورد بررسی بیشترین ( $p < 0/05$ ) میزان فعالیت ضد بیوفیلم مربوط به به باکتری سودوموناس آئروژنزا بود که با افزودن غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به میزان ۷۳/۲۸ درصد حاصل شد و کمترین ( $p < 0/05$ ) میزان فعالیت ضد بیوفیلم هم با افزون غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به میزان ۱۷/۷۸ درصد مربوط به باکتری سالمونلا تیفی موریوم بود (شکل ۴).

شاخص حلالیت آب و ظرفیت نگهداری آب: برای بررسی قابلیت کاربرد تکنولوژیکی EPS های تولیدی، در بافت‌های مختلف و اثر آن بر پایداری بافت شاخص حلالیت آب (WSI) و ظرفیت نگهداری آب (WHC) اندازه‌گیری شد که بر این اساس میزان WSI و WHC اگزوپلی ساکاریدها حاصله به ترتیب برابر با  $27/14 \pm 3/45$ ٪ و  $17/0 \pm 7$ ٪ بود.

**فعالیت ضد بیوفیلم:** نتایج نشان داد که اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف EPS، بر میزان مهار باکتری‌های سودوموناس آئروژنزا CMCC10104، شرشیا کلی O157:H7، سالمونلا تیفی موریوم ATCC1331 و استافیلوکوکوس



شکل ۴. اثر ضد بیوفیلم EPS حاصل از *MT.ZH693* پنتوسوس بر روی سویه‌ها سودوموناس آئروژنزا CMCC10104، شرشیا کلی O157:H7،

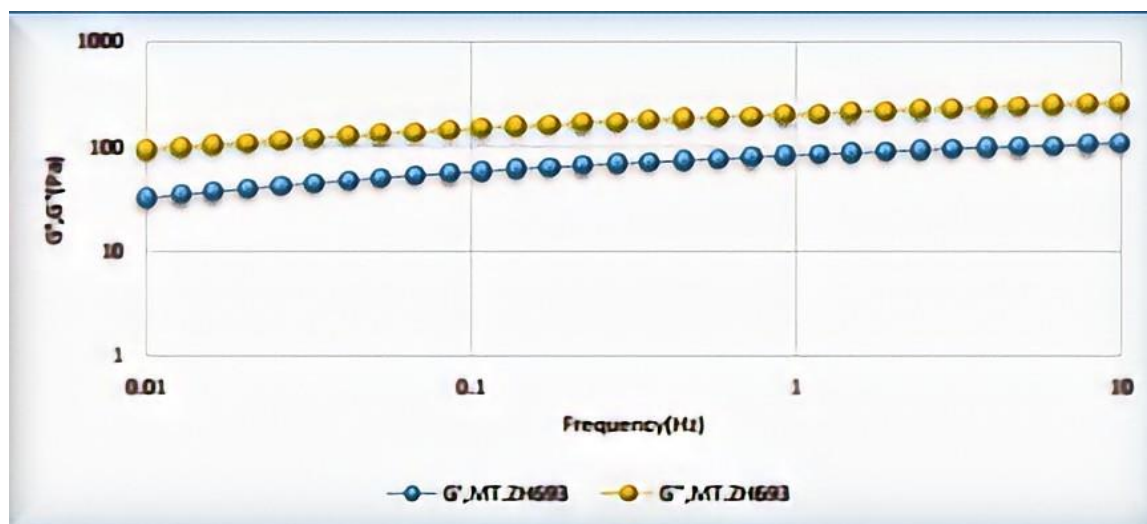
سالمونلا تیفی موریوم ATCC1331، استافیلوکوکوس اورئوس CMC26003.

حروف لاتین کوچک غیرمشابه در شکل نشان‌دهنده اختلاف معنی دار میانگین‌ها در بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ می‌باشد ( $P < 0/05$ )

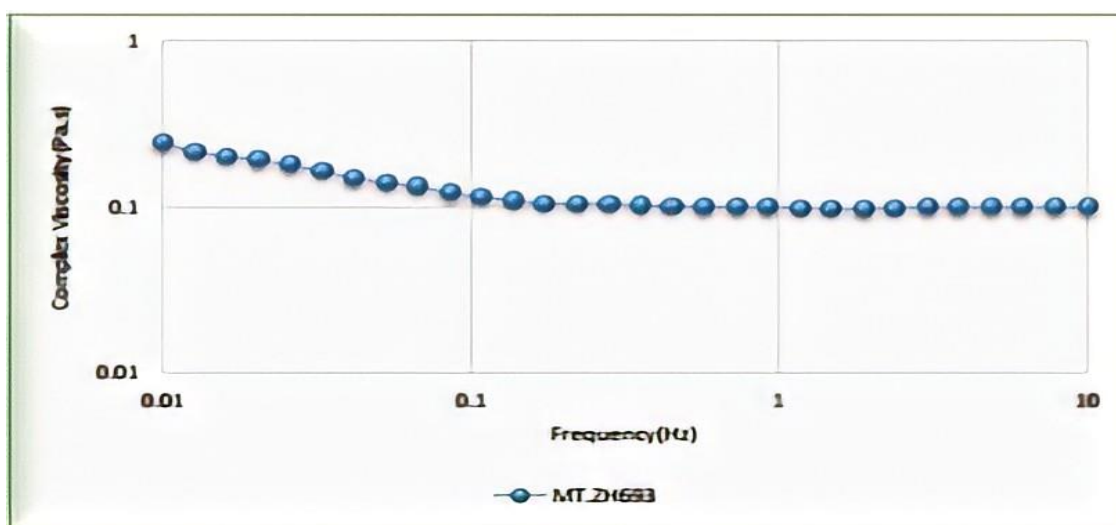
(شکل ۶). مدول الاستیک مقدار انرژی ذخیره شده در مواد طی هر سیکل تغییر شکل و مدول ویسکوز مقدار انرژی از دست رفته در هر سیکل تغییر شکل را نشان می‌دهد که بر این اساس بالاتر بودن  $G'$  نسبت به  $G''$  نشان دهنده رفتار شبه سیال محلول‌های اگزوپلی ساکارید استخراجی است.

**مهار فعالیت رادیکالی DPPH:** نتایج حاصل نشان داد که با افزایش غلظت EPS میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد به طوری که در بین غلظت‌های مختلف EPS، مؤثرترین غلظت، غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. همچنین مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی EPS و اسید آسکوربیک نشان داد که فعالیت مهاری EPS در تمامی غلظت‌ها در مقایسه با اسید آسکوربیک کمتر ( $p < 0.05$ ) می‌باشد (شکل ۷).

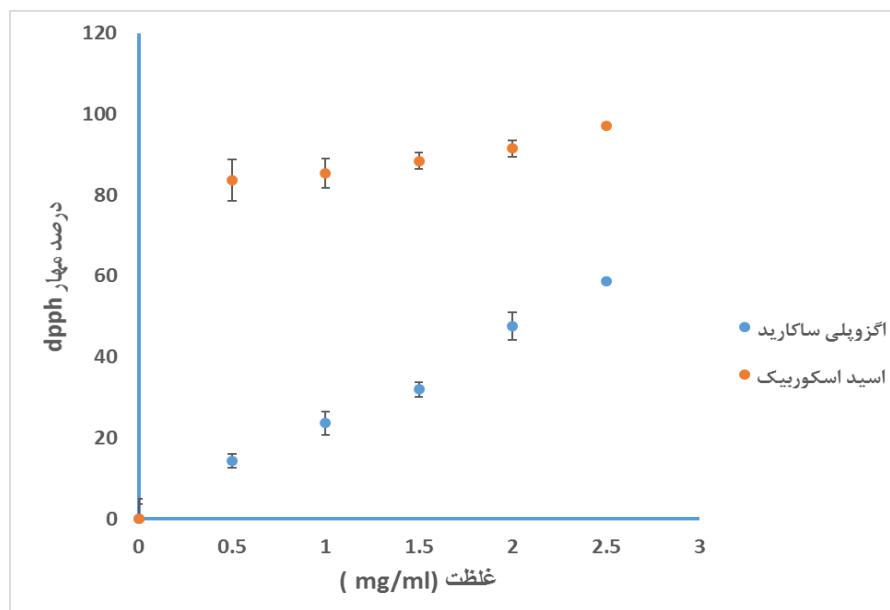
**آزمون فرکانس متغیر:** آزمون فرکانس متغیر جهت تعیین طیف مکانیکی و ویژگی‌های ویسکوالاستیک محلول‌های اگزوپلی ساکاریدی صورت می‌گیرد. در (شکل ۵) تغییرات مدول‌های الاستیک ( $G'$ ) و ویسکوز ( $G''$ ) اگزوپلی ساکارید استخراجی سویه *ل. پنتوسوس* MTZH693 به عنوان تابعی از فرکانسی در غلظت و دمای ۲۵ نشان داده شده است. آزمون فرکانس متغیر رفتار الاستیک ( $G'$ ) و ویسکوز ( $G''$ ) را با تغییر فرکانس مشخص می‌کند نتایج ارائه شده نشان می‌دهند که در اگزوپلی ساکارید استخراجی  $G''$  بالاتر از  $G'$  است. همچنین تأثیر فرکانس بر ویسکوزیته کمپلکس محلول‌های اگزوپلی ساکارید استخراج شده از *ل. پنتوسوس* MTZH693 نشان داد که ویسکوزیته کمپلکس در ابتدا با افزایش فرکانس کاهش می‌یابد ولی در فرکانس‌های بالاتر وابستگی به فرکانس ندارد



شکل ۵. تأثیر فرکانس مدول‌های الاستیک ( $G'$ ) و ویسکوز ( $G''$ ) محلول‌های اگزوپلی ساکارید استخراجی از *ل. پنتوسوس* MT.ZH693



شکل ۶. تأثیر فرکانس بر ویسکوزیته کمپلکس محلول‌های اگزوپلی ساکارید استخراجی از *ل. پنتوسوس*



شکل ۷. مقایسه درصد مهار dpph توسط EPSهای حاصل از سویه ل. پنتوسوس MT.ZH693 و اسید آسکوربیک

## • بحث

تغییرات در  $\delta 4/23$  و  $\delta 4/54$  مربوط به حلقه‌ی پیرانوز در ساختار  $\beta$ -آنومریک هستند. نتایج حاصل از طیف NMR تقریباً مشابه EPS حاصل از ویسلا سیاریا JAG8، و بیریو MO245 می‌باشد (۲۷،۲۸). همچنین طیف‌های به دست آمده از نتایج NMR EPSهای حاصل از ل. سیدوفیلوس ۲۰۰۷۹ ل. هلویتیکوس ۱-۲ MB و EPSهای تولید شده از ل. پلانشاروم ۷۰۸۱۰ به نتایج ما نزدیک هستند. برخی مطالعات تاکید بر این امر دارند که ساختار EPS نقش بسیار مهمی در فعالیت‌های فیزیکی و بیوشیمیایی آن دارد. به عنوان مثال پیوندهای  $\beta$ -گلیکوزیدی اثرات ضد سرطان را افزایش می‌دهند. همچنین پیوندهای  $\beta$ - $(1 \rightarrow 4)$  در مقایسه با پیوندهای  $\alpha$ - $(1 \rightarrow 4)$  باعث سخت تر شدن زنجیره و ایجاد حالت ویسکوز طبیعی در محلول EPS می‌شوند (۲۹).

WHC به توانایی شبکه پلی ساکاریدی برای جذب و حفظ آب بر می‌گردد. این موضوع هم به لحاظ تکنولوژیکی و هم از نظر فیزیولوژیکی بسیار حائز اهمیت است. از لحاظ تکنولوژیکی ترکیباتی که توانایی حفظ و جذب آب دارند می‌توانند به افزایش ویسکوزیته، پایداری بافت و جلوگیری از پس دادن آب کمک کنند (۳۰).

شاخص حلالیت آبی و ظرفیت نگهداری آب EPS به ترتیب ۲۷/۱۴٪ و ۱۷۰٪ بود که خواص فیزیکوشیمیایی حاصل نشان می‌دهد که EPS می‌تواند در صنایع غذایی به عنوان افزودنی، تثبیت کننده طبیعی، ویسکوز کننده و عامل نگهداری آب به خوبی مورد استفاده قرار گیرد. ظرفیت نگهداری و حلالیت آب یکی از ویژگی‌های عملکردی پلی

در این تحقیق نتایج حاصل از بهینه سازی شرایط تولید، از پژوهش Raisi و همکاران ۲۰۱۹ با کمی اصلاح برای تولید اگزوپلی ساکارید استفاده شد. در مطالعه Raisi و همکاران نتایج طرح آزمایش پلاکت برمن برای ارزیابی شرایط و ترکیب محیط کشت جهت تولید اگزوپلی ساکارید توسط سویه ل. پنتوسوس MT. ZH693 استفاده شد. ۸ متغیر مقدار گلوکز، ساکارز، عصاره مخمر، پپتون، زمان، دما، pH و مقدار مایه تلقیح در دو سطح مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد برای سویه ل. پنتوسوس MT. ZH693 متغیرهای عصاره مخمر و پپتون ( $p < 0/01$ ) و دما ( $p < 0/05$ ) اثر معنی دار روی تولید اگزوپلی ساکارید دارد. نتایج تجزیه شیمیایی نشان داد اگزوپلی ساکارید حاصل از ل. پنتوسوس MT. ZH693 از نوع هتروپلی ساکارید است و از قندهای رامنوز، آرابینوز، مانوز، گلوکز و گالاکتوز تشکیل شده و است (۱۴).

مقدار اگزوپلی ساکارید تولید شده طبق این روش mg/ml ۰/۲۲۵ و مقدار بیومس mg/ml ۰/۴۰۵ به دست آمد. در این مرحله اگزوپلی ساکارید حاصل تحت آزمون NMR، ظرفیت نگهداری آب، شاخص حلالیت آبی، فعالیت ضد بیوفیلم، آزمون رتولوژیکی و مهار فعالیت رادیکالی (DPPH) قرار گرفت.

نتایج NMR، نشان داد سویه ل. پنتوسوس MT.ZH693 دارای پروتون‌های آنومریک  $\alpha$ - $(1-3)$  پیوندهای گلیکوزیدی می‌باشد و همچنین این طیف شامل سیگنال‌هایی مربوط به پروتون‌های متصل به C2-C6 است. تغییرات شیمیایی در سیگنال‌های  $\delta 5/13$  مربوط به باقی مانده  $\alpha$ -هگزاپیرانوزیل و

(سالمونلا تیفی موریوم / شرشیا کلی 98082) و قارچ‌های *Aspergillus flavus*، *Aspergillus niger* (گونه پنی سیلیوم (*Penicillium*) و *Candida albicans*) بررسی و گزارش شد که در تمامی غلظت‌های بکار رفته EPSها دارای فعالیت ضد میکروبی بودند به طوری که با افزایش غلظت EPSها، فعالیت ضد میکروبی و قطر هاله عدم رشد آن‌ها افزایش یافت اما هیچ اثر ضد قارچی نداشتند (۳۶). در مطالعه‌ی دیگری Wang و همکاران (۲۰۱۵) اثر میکروبی غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر EPSهای تولید شده توسط سویه *YW32* بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* AC1/شرشیا کلی O157، *شیگلا فلکسنری* (CMCC (B) *Shigella flexneri*) و *سالمونلا تیفی موریوم* S50333 بررسی و بیان کردند که فعالیت ضد میکروبی EPSها وابسته به غلظت است به طوری که بیشترین درصد مهار تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های *استافیلوکوکوس* (۴۵/۱۳٪)، *شیگلا* (۴۴/۶۷٪)، *سالمونلا* (۴۴/۰۴٪) و *شرشیا کلی* (۱۲/۷۱٪) طی غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حاصل شد (۳۵).

مطالعات یاد شده بیانگر این امر است که EPSها میزان مهار بسیاری بر سویه *سودوموناس ائروژنزا* دارند و نتایج حاصل تقریباً همسو با مطالعات یاد شده می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط Li و همکاران صورت گرفت، متوجه شدند که اضافه کردن اگزوپلی ساکارید ترشح شده (EPS - Released) به طور قابل توجهی تشکیل بیوفیلم را با تأثیر بر ژن‌های مربوط به تولید کرلی (Curli) و کموتاکسی (Chemotaxis) در تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم (Transcriptome) سرکوب می‌کند. EPS - اتصال اولیه و تجمع خودکار سلول‌های باکتریایی را از طریق تضعیف سطح سلول یا با کاهش تعامل سلول به سطح سلول مهار می‌کند. آنتاگونیست‌های جدید با پتانسیل حذف بیوفیلم‌های بالغ مورد نیاز هستند، اما، تا کنون، تعداد کمی از گزارش‌ها بر استفاده از EPS تولید کننده پروبیوتیک برای مهار تشکیل بیوفیلم متمرکز شده‌اند (۳۴). اثر ضد باکتریایی اگزوپلی ساکاریدها ممکن است به دلیل تأثیر EPSها بر اصلاح سطوح سلول باکتریایی، جلوگیری از اتصال اولیه سلول‌های باکتریایی به سطح (۳۵) یا به عنوان مولکول‌های نشانگر برای تنظیم بیان ژن درگیر در تشکیل بیوفیلم باشد (۳۶، ۳۳).

نتایج ارائه شده در آزمون تنش متغیر نشان می‌دهند که در اگزوپلی ساکارید استخراجی "G بالاتر از 'G است. که این نشان دهنده رفتار شبه سیال است و تأثیر فرکانس بر

ساکاریدها است که به شدت تحت تأثیر عوامل مانند منشا بیولوژیک، ساختار مولکول، وزن مولکول، اندازه ذرات، اشکال یون و یا ترکیب پلی ساکاریدها قرار دارد (۳۱).

در مطالعه‌ای که توسط Ahmed و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد مقادیر WSI و WHC اگزوپلی ساکارید استخراجی به ترتیب ۱۴/۲٪ و ۴۹۶٪ گزارش شد (۱۸). در پژوهشی که در سال ۲۰۲۰ توسط Sharma و همکاران بر روی گونه *ل. پارا پلانتاروم* (*paraplantarum L.*) KM1 انجام شد مقادیر شاخص‌های WSI و WHC را به ترتیب ۱۳/۳٪ و ۴۰۰٪ بیان کردند (۳۲). بالا بودن میزان شاخص‌های (۲۷/۱۴٪) WSI و WHC (۱۷۰٪) اگزوپلی ساکاریدها در تحقیق حاضر و سایر مطالعات ارائه شده را می‌توان به حضور ساختارهای آبدوست در مولکول اگزوپلی ساکارید و ساختار نفوذپذیر و جاذب زنجیره‌های پلیمری پلی ساکاریدها نسبت داد (۳۳). که می‌تواند مقادیر زیادی آب را از طریق پیوندهای هیدروژنی خود نگه دارد (۳۲، ۱۹).

نتایج ضد بیوفیلم حاصل از آن است که بیشترین میزان مهار در غلظت ۴ برای EPS حاصل از *ل. پنتوسوس* MT.ZH693 بر روی سویه *سودوموناس ائروژنزا* از سایر سویه‌ها بسیار بیشتر و کمترین میزان مهار در غلظت ۰/۲ مربوط به سویه *سالمونلا* برای EPSهای حاصل از *ل. پنتوسوس* ۴MT.ZH693 درصد می‌باشد. بنابراین، EPS حاصل در این مطالعه ممکن است در آینده پتانسیلی برای استفاده در صنایع غذایی مختلف داشته باشد، و به عنوان مکمل‌های غذایی برای کنترل بیوفیلم میکروبی مورد استفاده قرار گیرد. تأثیر مثبت و فعالیت ضد بیوفیلم EPSهای تولید شده توسط گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس پیش از این در مطالعه محققانی از جمله Li و همکاران (۲۰۱۴)، Wang و همکاران (۲۰۱۵)، Sonmez و همکاران (۲۰۱۷) و Trabelsi و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است (۳۵، ۳۴، ۱۳، ۱۱).

مطابق تحقیقی که توسط Li و همکاران در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت میزان مهار بیوفیلم توسط EPS حاصل از *ل. هلوتیکوس* MB2-1 بر روی سویه *سودوموناس ائروژنزا* POA1 (۴۳/۵۸٪)، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC6538 (۶۵/۸۲٪) و *شرشیا کلی* K12 (۳۳/۴۱٪) بود (۳۴). در مطالعه‌ای Saif و همکاران (۲۰۲۰) اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف EPSهای تولید شده توسط سویه *ل. پنتوسوس* 14 FE (*pentosus*) بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*Bacillus subtilis*)، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (91161) و گرم منفی

جریان برای شرح برش اعمال شده و محدوده های فرکانس رخ دادند. تفاوت‌ها در ویسکوزیته و خواص ویسکوالاستیک بین EPS ممکن است ناشی از تغییرات در Mw، انواع پیوند گلیکوزیدی، ترکیب منوساکاریدی، گروه های عملکردی و جانشین‌ها باشد (۴۰، ۳۸).

نتایج حاصل از DPPH نشانگر این است که با افزایش غلظت اگزوپلی ساکارید میزان فعالیت مهاري نیز افزایش می‌یابد. بیشترین میزان مهار EPS حاصل از سویه / پنتوسوس MT.ZH693 ۵۸/۸۳٪ می‌باشد. بر اساس مطالعات Li (۲۰۱۴) و Lu (۲۰۱۸) (۴۱، ۳۴) تست DPPH برای ارزیابی توانایی به دام اندازی رادیکال آزاد در نمونه های گوناگون استفاده می‌شود و می‌تواند رادیکال‌های الکترون یا هیدروژن را به یک مولکول پایدار تبدیل کند. توانایی به دام اندازی رادیکال‌های آزاد و خواص آنتی‌اکسیدانی EPS‌ها توسط لاکتوباسیلوس‌ها پیش از این توسط محققینی چون Mahdhi و همکاران (۲۰۱۷) و Xu و همکاران (۲۰۱۹) ثابت شده است (۴۲، ۲۵). نتایج این مطالعه نشان داد که EPS های جدا شده از سویه / پنتوسوس MT.ZH693 دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند اما میزان این خواص در غلظت‌های مختلف متفاوت است به طوری که با افزایش غلظت EPS میزان فعالیت آنها افزایش می‌یابد به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میانگین مربوط به غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر بود. این نتایج با یافته‌های مطالعه Amiri و همکاران (۲۰۱۹)، Xu و همکاران (۲۰۱۹) و Bomfim و همکاران (۲۰۲۰) همخوانی دارد (۲۵، ۲۳، ۱۲). این محققین بیان کردند که با افزایش غلظت EPS ها میزان به دام اندازی رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها افزایش می‌یابد. Saif و همکاران (۲۰۲۰) فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف (۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) EPS های جدا شده از دو سویه / پنتوسوس 68FE و / پنتوسوس 14 FE بررسی و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اگزوپلی ساکاریدها میزان فعالیت مهاري نیز افزایش می‌یابد همچنین بیان کردند که نوع اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط گونه های مختلف باکتریایی میزان فعالیت مهاري متفاوتی را از خود نشان می‌دهند (۳۶). در پژوهشی Rajoka و همکاران (۲۰۲۰) با بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف اگزوپلی ساکارید جدا شده از باکتری / برویس نشان دادند که با افزایش غلظت اگزوپلی ساکارید میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها افزایش می‌یابد (۴۳). بر اساس نظر Wang و همکاران ۲۰۱۵ فعالیت ضد آنتی‌اکسیدانی اگزوپلی ساکاریدها

ویسکوزیته کمپلکس محلول‌های اگزوپلی ساکارید استخراجی از / پنتوسوس MT.ZH693 بیانگر این است که ویسکوزیته کمپلکس در ابتدا با افزایش فرکانس کاهش می‌یابد ولی در فرکانس‌های بالاتر وابستگی به فرکانس ندارد. از نظر رئولوژیکی در مطالعه ای که توسط Xu و همکاران (۲۰۱۸) و Ayyash و همکاران (۲۰۲۰) صورت گرفت در کل محدوده فرکانس‌های بررسی شده از ۱۰-۰/۱ هرتز، یک رفتار مایع مانند با  $G' > G''$  مشاهده می‌شود که این امر نشان دهنده غالب بودن خاصیت ویسکوز است که سبب می‌شود ساختارهای ژل مانند در محلول تشکیل نشود (۳۸، ۳۷) در حالی که Abedfar و همکاران (۲۰۲۰) در نتایج خود بیان کردند اگر  $G' > G''$  در منطقه فرکانس ۱۰-۰/۱ هرتز بالاتر از  $G''$  باشد، خاصیت الاستیک غالب خواهد بود و ممکن است ساختارهای ژل مانند در محلول تشکیل شود. همچنین نتایج آنها نشان داد که با افزایش فرکانس مقادیر  $G'$  و  $G''$  افزایش می‌یابد و در همه نمونه‌ها در کل محدوده فرکانس‌های بررسی شده، یک رفتار پلاستیک مانند با  $G' > G''$  مشاهده شد که بیانگر گسترش خواص الاستیک نسبت به ویسکوز بود (۳۹). اما در مطالعه‌ی دیگری Alves و همکاران (۲۰۰۹) وابستگی فرکانس زاویه‌ای ذخیره سازی ( $G'$ ) و مدول اتلاف ( $G''$ ) نمونه‌های مایع گرفته شده در روزهای ۴، ۵/۲، ۶/۲ و ۷ بررسی و نتایج نشان داد در فرکانس‌های پایین (ناحیه ترمینال)، مقادیر  $G''$  بسیار بیشتر از مقادیر  $G'$  بودند و این امر نشان می‌دهد که رفتار مایع مانند بر تمام نمونه‌ها غالب است. با این حال، در فرکانس‌های بالاتر و برای نمونه‌های مایع ۵/۲، ۶/۲ و ۷ روزه، یک سطح متقاطع شناسایی شد که فراتر از آن سهم الاستیک غالب بود (۴۰). در اندازه گیری ویسکوزیته و ویسکوالاستیسیته محلول‌های پلیمری معمولی، وابستگی فرکانس زاویه‌ای ویسکوزیته کمپلکس به وابستگی سرعت برشی ویسکوزیته ظاهری، معروف به مدال کاکس-مرز به خوبی اعمال می‌شود در این مطالعه، همبستگی بین ویسکوزیته ظاهری و پیچیده با استفاده از سویه انتروباکتر در زمان‌های کشت متفاوت است. نمودار ویسکوزیته کمپلکس در برابر فرکانس زاویه‌ای کاملاً بر روی منحنی ویسکوزیته ظاهری در برابر سرعت برش برای همه نمونه‌ها قرار دارد. این حقیقت به این معنی است که اگر چه محیط کشت مایع یک سیستم پیچیده است که نه تنها توسط یک پلی ساکارید با وزن مولکولی بالا، بلکه توسط اجرای دیگر مانند نمک، گلیسرول و سلول‌ها تشکیل شده است اما هنوز هم دارای خواص رئولوژیکی ساده می‌باشد. با پیشرفت فرآیند کشت، انواع مشابهی از بازآرایی مولکولی در دو الگوی

مناسبی برای بهبود کیفیت مواد غذایی و اثرات سلامتی بخش در این دسته از مواد غذایی فراسودمند باشند و همچنین به عنوان مکمل های غذایی برای کنترل بیوفیلم میکروبی مورد استفاده قرار گیرد.

### سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت مالی تحت پژوهانه به شماره UOZ-GR-9618-131 توسط دانشگاه زابل اجرا شده است. از دانشگاه زابل بابت حمایت مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نماییم.

ممکن است تحت تأثیر ترکیب‌های مونوساکاریدها، وزن مولکولی یا روش‌های خالص‌سازی آن‌ها باشد (۳۵).

نتایج این مطالعه نشان داد که لاکتوباسیل جدا شده از پنیر محلی، دارای توانایی تولید اگزوپلی ساکارید به صورت آزاد می‌باشند؛ که این امر امکان استفاده از این باکتری به عنوان استارتر و یا کشت همراه جهت بهبود خواص رئولوژیکی فرآورده‌های غذایی را فراهم می‌کند و همچنین اگزوپلی ساکاریدهای جدا شده از این لاکتوباسیل به دلیل دارا بودن خصوصیات تکنولوژیکی و زیست فعالی مطلوب و در واقع با داشتن چند خصوصیت مطلوب هم زمان می‌توانند گزینه

## • References

- Özogul F, Hamed I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2018 Jul 3;58(10):1660-70.
- Ikeda S, Kondoh D, Aryantini NP, Urashima T, Fukuda K. Purification, rheological characterization, and visualization of viscous, neutral, hetero-exopolysaccharide produced by lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria 2019* (pp. 55-65). Humana Press, New York, NY.
- Hussain A, Zia KM, Tabasum S, Noreen A, Ali M, Iqbal R, Zuber M. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *International journal of biological macromolecules*. 2017 Jan 1;94:10-27.
- Maalej H, Boisset C, Hmidet N, Colin-Morel P, Buon L, Nasri M. Depolymerization of *Pseudomonas stutzeri* exopolysaccharide upon fermentation as a promising production process of antibacterial compounds. *Food chemistry*. 2017 Jul 15;227:22-32.
- Reshetnikov SV, Tan KK. Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2001;3(4).
- Karimi L, Taran M, Mehdi Z. Exopolysaccharide Production by *Bacillus Pasteuri* and the Study of its Antibacterial and Antioxidant Properties. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2018 Jul 10;8(31):20-8. [In persian]
- Mobini S, Tajabadi Ebrahim M, Hashemi M, Jafari P. Isolation of Exopolysaccharides (the cell-bound EPS and the released EPS) Produced by *Bacillus* spp. Isolated from Arak Agricultures. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2012 Sep 10;2(7):75-82.
- Górska S, Hermanova P, Ciekot J, Schwarzer M, Srutkova D, Brzozowska E, Kozakova H, Gamian A. Chemical characterization and immunomodulatory properties of polysaccharides isolated from probiotic *Lactobacillus casei* LOCK 0919. *Glycobiology*. 2016 Sep 1;26(9):1014-24.
- Jiang Y, Yang Z. A functional and genetic overview of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*. 2018 Aug 1;47:229-40.
- Zaporozhets T, Besednova N. Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system. *Pharmaceutical biology*. 2016 Dec.1;54(12):3126-35.
- Sönmez Ş, Önal Darilmaz D, Beyatli Y. Determination of the relationship between oxalate degradation and exopolysaccharide production by different *Lactobacillus* probiotic strains. *International Journal of Dairy Technology*. 2018 Aug;71(3):741-52.
- Bomfim VB, Neto JH, Leite KS, de Andrade Vieira É, Iacomini M, Silva CM, dos Santos KM, Cardarelli HR. Partial characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* CNPC003. *LWT*. 2020 Jun 1;127:109349.
- Trabelsi I, Ktari N, Slima SB, Triki M, Bardaa S, Mnif H, Salah RB. Evaluation of dermal wound healing activity and in vitro antibacterial and antioxidant activities of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *International journal of biological macromolecules*. 2017 Oct1;103:194-201.
- Raisi F, Tavakoli M, Haghayegh GH, Keikhasaber M, Ahmadi M. Production, purification, physicochemical properties and optimization of Exopolysaccharide production of Iranian local *Lactobacillus*. *Zabol: University of Zabol, M.C. Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology*;2019 [in Persian]
- Tavakoli M, Hamidi-Esfahani Z, Hejazi MA, Azizi MH, Abbasi S. Characterization of probiotic abilities of *Lactobacilli* isolated from Iranian Koozeh traditional cheese. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2017;67(1).
- Nambiar RB, Sellamuthu PS, Perumal AB, Sadiku ER, Phiri G, Jayaramudu J. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HM47 isolated from human breast milk. *Process Biochemistry*. 2018 Oct 1;73:15-22.
- Sasikumar K, Vaikkath DK, Devendra L, Nampoothiri KM. An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource technology*. 2017 Oct 1;241:1152-6.

18. Ahmed Z, Wang Y, Anjum N, Ahmad A, Khan ST. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir-Part II. *Food Hydrocolloids*. 2013 Jan 1;30(1):343-50.
19. Saravanan C, Shetty PK. Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolated from idli batter. *International journal of biological macromolecules*. 2016 Sep 1;90:100-6.
20. Liu Q, Cao X, Zhuang X, Han W, Guo W, Xiong J, Zhang X. Rice bran polysaccharides and oligosaccharides modified by *Grifola frondosa* fermentation: Antioxidant activities and effects on the production of NO. *Food chemistry*. 2017 May 15;223:49-53.
21. Rütering M, Schmid J, Gansbiller M, Braun A, Kleinen J, Schilling M, Sieber V. Rheological characterization of the exopolysaccharide Paenan in surfactant systems. *Carbohydrate polymers*. 2018 Feb 1;181:719-26.
22. Zhang Z, Liu Z, Tao X, Wei H. Characterization and sulfated modification of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its biological activities. *Carbohydrate polymers*. 2016 Nov 20;153:25-33.
23. Amiri S, Mokarram RR, Khiabani MS, Bari MR, Khaledabad MA. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12: optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. *International journal of biological macromolecules*. 2019 Feb 15;123:752-65. [In persian]
24. Dilna SV, Surya H, Aswathy RG, Varsha KK, Sakthikumar DN, Pandey A, Nampoothiri KM. Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT-Food Science and Technology*. 2015 Dec.1;64(2):1179-86.
25. Xu Y, Coda R, Holopainen-Mantila U, Laitila A, Katina K, Tenkanen M. Impact of in situ produced exopolysaccharides on rheology and texture of fava bean protein concentrate. *Food Research International*. 2019 Jan 1;115:191-9.
26. Navarini L, Abatangelo A, Bertocchi C, Conti E, Bosco M, Picotti F. Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* SFi20. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2001 Mar 13;28(3):219-26
27. Mohan Rao TJ, Goyal A. Purification, optimization of assay, and stability studies of dextranucrase isolated from *Weissella cibaria* JAG8. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2013 Mar 11;43(4):329-41.
28. Martin-Pastor M, Ferreira AS, Moppert X, Nunes C, Coimbra MA, Reis RL, Guezennec J, Novoa-Carballal R. Structure, rheology, and copper-complexation of a hyaluronan-like exopolysaccharide from *Vibrio*. *Carbohydrate polymers*. 2019 Oct 15; 222:114999.
29. Xu Y, Cui Y, Wang X, Yue F, Shan Y, Liu B, Zhou Y, Yi Y, Lü X. Purification, characterization and bioactivity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* KX041. *International journal of biological macromolecules*. 2019 May 1; 128:480-92.
30. Elleuch M, Bedigian D, Roiseux O, Besbes S, Blecker C, Attia H. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food chemistry*. 2011 Jan 15;124(2):411-21.
31. Insulkar P, Kerkar S, Lele SS. Purification and structural-functional characterization of an exopolysaccharide from *Bacillus licheniformis* PASS26 with in-vitro antitumor and wound healing activities. *International journal of biological macromolecules*. 2018 Dec 1;120:1441-50.
32. Sharma K, Sharma N, Handa S, Pathania S. Purification and characterization of novel exopolysaccharides produced from *Lactobacillus paraplantarum* KM1 isolated from human milk and its cytotoxicity. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2020 Dec;18(1):1-0.
33. Goma M, Yousef N. Optimization of production and intrinsic viscosity of an exopolysaccharide from a high yielding *Virgibacillus salarius* BM02: study of its potential antioxidant, emulsifying properties and application in the mixotrophic cultivation of *Spirulina platensis*. *International journal of biological macromolecules*. 2020 Apr 15;149:552-61.
34. Li S, Huang R, Shah NP, Tao X, Xiong Y, Wei H. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. *Journal of Dairy Science*. 2014 Dec 1;97(12):7334-43.
35. Wang J, Zhao X, Yang Y, Zhao A, Yang Z. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International journal of biological macromolecules*. 2015 Mar 1;74:119-26.
36. Saif FA, Sakr EA. Characterization and bioactivities of exopolysaccharide produced from probiotic *Lactobacillus plantarum* 47FE and *Lactobacillus pentosus* 68FE. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 2020 Oct 1;24:100231.
37. Xu Z, Guo Q, Zhang H, Wu Y, Hang X, Ai L. Exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S-3: molecular, partial structural and rheological properties. *Carbohydrate polymers*. 2018 Aug 15;194:132-8.
38. Ayyash M, Abu-Jdayil B, Itsaranuwat P, Galiwango E, Tamiello-Rosa C, Abdullah H, Esposito G, Hunashal Y, Obaid RS, Hamed F. Characterization, bioactivities, and rheological properties of exopolysaccharide produced by novel probiotic *Lactobacillus plantarum* C70 isolated from camel milk. *International journal of biological macromolecules*. 2020 Feb 1;144:938-46.
39. Abedfar A, Hosseini-zhad M, Rafe A. Effect of microbial exopolysaccharide on wheat bran sourdough: Rheological, thermal and microstructural characteristics. *International journal of biological macromolecules*. 2020 Jul 1;154:371-9.
40. Alves VD, Freitas F, Torres CA, Cruz M, Marques R, Grandfils C, Gonçalves MP, Oliveira R, Reis MA. Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by *Enterobacter* sp. *Carbohydrate Polymers*. 2009 Sep 15.

41. Lu C, Li C, Chen B, Shen Y. Composition and antioxidant, antibacterial, and anti-HepG2 cell activities of polyphenols from seed coat of *Amygdalus pedunculata* Pall. *Food chemistry*. 2018 Nov 1;265:111-9
42. Mahdhi A, Leban N, Chakroun I, Chaouch MA, Hafsa J, Fdhila K, et al. Extracellular polysaccharide derived from potential probiotic strain with antioxidant and antibacterial activities as a prebiotic agent to control pathogenic bacterial biofilm formation. *Microbial pathogenesis*. 2017 Aug 1;109:214-20.
43. Rajoka MS, Jin M, Haobin Z, Li Q, Shao D, Jiang C, Huang Q, Yang H, Shi J, Hussain N. Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *Lwt*. 2018 Mar 1;89:638-47.

## Production, Purification and Physicochemical Characterization of Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus*

Sarhadi Y<sup>1</sup>, Tavakoli M<sup>\*2</sup>, Najafi MA<sup>3</sup>, Soleimanifard S<sup>4</sup>, Niknia S<sup>4</sup>

1- MSC of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

2- \*Corresponding author: Assistant Professor of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: mtavakoli@uoz.ac.ir

3- Associate Professor of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

4- Assistant Professor of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

Received 31 May, 2021

Accepted 26 Aug, 2021

**Background and Objectives:** Exopolysaccharides are linked to all form of polysaccharides found outside of the microbial cell wall. The aim of the current study was to investigate physicochemical characteristics of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus pentosus*.

**Materials & Methods:** First, the exopolysaccharide was isolated under optimal conditions (glucose, 4.11% w/v; sucrose, 3.47% w/v; yeast extract, 3% w/v; peptone, 3% w/v; time, 30.92 h, temperature, 40 °C; inoculation size, 3.16% v/v; pH 7). Then, exopolysaccharide was purified and dried using freeze dryer. Physicochemical characteristics of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* were assessed. Assessments included NMR test, water holding capacity, aqueous solubility index, antibiofilm activity, rheological test and inhibition of DPPH radical activity.

**Results:** Total quantities of the exopolysaccharide and biomass produced by *Lactobacillus pentose* included 0.225 and 0.405 mg/ml, respectively. Results of the NMR of exopolysaccharide generally showed presence of anomeric protons, cyclic protons and alkyls. Water solubility index and water holding capacity of the exopolysaccharide included 27.14 and 170%, respectively. The highest antibiofilm effects of the exopolysaccharide were demonstrated against *Pseudomonas aeruginosa*. The exopolysaccharide frequency-change rheological test showed typical pseudo-plastic non-Newtonian fluid behaviors. The DPPH radical scavenging activity demonstrated moderate antioxidant characteristics of the exopolysaccharide.

**Conclusion:** Results suggest that exopolysaccharide from *Lactobacillus pentosus* includes potentials to be used as a natural agent in foods.

**Keywords:** Exopolysaccharide, Antioxidant activity, Nuclear magnetic resonance, Rheology