Food Hygiene, Vol. 11, No. 43, Autumn 2021

"Review article" **DOI: 10.30495/JFH.2022.1949270.1341**

Evaluation of some probiotic properties of yeast *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from fermented buckwheat

Shahryari, S.[1], Sadeghi, A.[2*], Ebrahimi, M.[3], Sadeghi Mahoonak, A.[4], Moayedi, A.[5]

1. M.Sc. student of Food Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Associate professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Assistant professor, Health Research Center of Food, Drug and Natural Products, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran
4. Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
5. Assistant professor, Department of food science and technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

[*]Corresponding author: Sadeghi.gau@gmail.com
(Received: 2022/1/7 Accepted: 2022/3/10)

Abstract

The study of the yeasts isolated from the least studied fermented sources may have the potential to deal with the unique isolates. In this study, one of the predominant yeasts was isolated from fermented buckwheat. The isolate was identified by amplifying the target sequence of 650 bp of its *ITS* gene and sequencing PCR products. Afterward, some potential probiotic features of the isolates, including survival in simulated gastrointestinal conditions, antibacterial effect, auto-aggregation, antibiotic resistance, antimycotic and hemolysis ability, as well as antifungal activity against *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* were studied. Based on sequencing results of the PCR products, *Rhodotorula mucilaginosa* was identified as the yeast isolate. The isolate had 85.07% viability in simulated gastrointestinal conditions. The inhibitory effect of the isolate on *Escherichia coli* was significantly ($P<0.05$) higher than the other foodborne bacteria. The yeast isolate had 84.60% auto-aggregation and 60.10% hydrophobicity capabilities. However, no hemolytic activity was observed. The yeast isolate was resistant to all of the studied antibiotics, and it was sensitive towards Ketoconazole among the common antifungal agents. In conclusion, the yeast isolate had appropriate potential to be used as a probiotic culture to produce fermented food products.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Yeast isolate, probiotic properties, fermented buckwheat

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2022.1949270.1341

بررسی برخی از ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمر *رودوتورولا موسیلاژینوزا* جدا شده از باکویت تخمیر شده

سارا شهریاری[۱]، علیرضا صادقی[۲*]، مریم ابراهیمی[۳]، علیرضا صادقی ماهونک[٤]، علی مؤیدی[٥]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌فناوری مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳. استادیار مرکز تحقیقات سلامت فراورده‌های غذایی، دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
٤. استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
٥. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
*مسئول مکاتبات: Sadeghi.gau@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱٤۰۰/۱۰/۱۷ پذیرش نهایی: ۱٤۰۰/۱۲/۱۹)

چکیده

ارزیابی ویژگی‌های مخمرهای جدا شده از بسترهای تخمیری که کمتر مورد مطالعه قرارگرفته‌اند، همواره احتمال مواجهه با جدایه‌های منحصر به‌فرد را در پی دارد. در این پژوهش، یکی از مخمرهای غالب خمیرترش باکویت جداسازی شد و جدایه با تکثیر توالی هدف ٦٥٠ جفت بازی از ژن *ITS* آن و توالی‌یابی محصولات PCR شناسایی گردید. در ادامه، برخی از ویژگی‌های پروبیوتیکی جدایه مخمری شامل زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش، اثر ضدباکتریایی، خوداتصالی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و قابلیت همولیز خون مورد مطالعه قرار گرفت. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی *رودوتورولا موسیلاژینوزا* گردید. جدایه مخمری ۸۵/۰۷ درصد زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش برخوردار بود. همچنین تأثیر بازدارنده جدایه مذکور روی *اشریشیا کولای* به شکل معنی‌داری ($P<0/05$) از سایر عوامل باکتریایی غذازاد بیشتر بود. علاوه بر این، جدایه مخمری، ۸٤/٦۰ درصد قابلیت خود اتصالی و ٦۰/۱۰ آب‌گریزی داشتند اما فاقد فعالیت همولیزی بودند. جدایه مخمری نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومت نشان دادند. اما در برابر کتوکونازول نسبت به سایر عوامل ضدقارچ مورد مطالعه حساسیت داشتند. همچنین اثر بازدارنده جدایه *ردوتورولا موسیلاژینوزا* بر *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* تأیید گردید. بر این اساس، جدایه *رودوتورولا موسیلاژینوزا* از قابلیت مناسبی برای استفاده به‌عنوان کشت پروبیوتیک به‌منظور تولید محصولات غذایی تخمیری برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: جدایه مخمری، ویژگی‌های پروبیوتیکی، باکویت تخمیر شده

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و فعالی هستند که اگر به تعداد کافی مورد مصرف قرار گیرند، می‌توانند به توازن میکروبی دستگاه گوارش، کمک کرده و سبب بهبود عملکرد آن شوند. پروبیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها و نگه‌دارنده‌های سنتزی در پیشگیری و درمان عوارض بسیاری از عوامل عفونی و بیماری‌زای دستگاه گوارش استفاده می‌شوند (Saarela *et al*., 2000; Saad *et al*., 2013). میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، شامل باکتری‌های اسیدلاکتیک و مخمرها هستند و به‌رغم وجود گزارش‌های متعدد در خصوص قابلیت‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک، ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرها کمتر گزارش شده است. مخمرهای پروبیوتیک، ارگانیسم‌هایی با مقاومت بالا به ترکیبات ضدباکتریایی و مؤثر در برابر عوامل بیماری‌زا هستند که قادر به افزایش جمعیت سریع خود در دستگاه گوارش می‌باشند (Fernandez-Pacheco *et al*., 2018). این مخمرها از ویژگی‌هایی نظیر خاصیت ضدمیکروبی، مقاومت به اسید و صفرا، اتصال به سطوح مخاطی روده، بازدارندگی در مقابل عوامل بیماری‌زا و عدم انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک برخوردارند (Bajaj *et al*., 2021; Andrabi *et al*., 2016). به‌علاوه، برخی از سویه‌های مخمری قادر به کاهش محتوای مایکوتوکسین در مواد غذایی و دستگاه گوارش هستند (Czerucka *et al*., 2007).

باکویت عضوی از شبه غلات از جنس فاگوپیروم از خانواده پلی‌گوناسه است و دو نژاد اصلی با ویژگی‌های کشاورزی مناسب از آن، *فاگوپیروم تاتاریکوم* و *فاگوپیروم اسکولنتوم* هستند. ویژگی‌های ساختمانی دانه باکویت شباهت زیادی به غلات دارند و هر دو دارای اندوسپرم نشاسته‌ای هستند و کاربردهای فناورانه در صنعت برای آن‌ها تعریف شده است (Cai *et al*., 2004).

تاکنون گزارش‌هایی در مورد ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمرهای جدا شده از محصولات غذایی ارائه گردیده است. مثلاً بررسی جمعیت میکروبی باکتری-های اسیدلاکتیک و مخمرها در تخمیر تصادفی باکویت نشان داد که طیف وسیعی از باکتری‌های اسیدلاکتیک در خمیرترش باکویت وجود دارند اما تنها مخمر *کازاچستانیا بارنتی* (*Kazachstania barnetti*) از آن جدا گردید (Moroni *et al*., 2011). پژوهشگرانی ضمن ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی بالقوه سویه‌های مخمری شیر خام برای کاهش کلسترول خون دریافتند که جدایه‌های مخمری قادر به رشد در محلول نمک‌های صفراوی هستند و بیشتر آن‌ها pH اسیدی را تحمل کرده و در شرایط دستگاه گوارش زنده ماندند. از بین سویه‌های مورد آزمون، سویه‌ای از *ژئوتریکوم* (*Geotrichum*) و *پیچیا کادریازوی* (*Pichia kudriavzevii*) بیشترین قدرت اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه گوارش را داشتند. علاوه بر این، مخمرهای *پیچیا فرمنتاس* (*Pichia fermentas*)، *پیچیا کادریازوی* و *یاراویا لیپولیتیکا* (*Yarrowia lipolytica*) از قابلیت پروبیوتیکی مناسب‌تری به‌منظور جذب کلسترول سرمی خون برخوردار بودند (Chen *et al*., 2010). پژوهشگران دیگری پس از جداسازی و ارزیابی قابلیت تجزیه گلوتن و آزمون‌های پروبیوتیک سویه‌های جدا شده از تخمیر خمیرترش دریافتند که از این سویه‌ها، *ویکرومایسس آنومالوس* (*Wickerhamomyces anomalus*) قادر به تحمل pH پایین و نمک صفراوی و دارای ویژگی‌های

آب‌گریزی در مقایسه با سایر سویه‌های تجزیه‌کننده گلوتن بود (Sakandar *et al*., 2018). محققین دیگری ضمن مطالعه مخمرهای خمیرترش توسکان به‌عنوان کشت آغازگر جهت تولید نوشیدنی‌های مبتنی بر غلات، چندین سویه را به‌طور تصادفی انتخاب کرده و مورد ارزیابی قراردادند. محققین مذکور، دریافتند که مخمرهای *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) و *کازاچستانیا هومیلیس* (*Kazachstania humilis*) به ترتیب غالب بودند و پس از تخمیر آرد گندم نیز *ساکارومایسس سرویزیه* قادر به افزایش حجم خمیر و *کازاچستانیا هومیلیس*، تنها گونه قادر به افزایش غلظت اسیدهای آمینه آزاد بود و هر دو سویه فعالیت فیتازی داشتند (Palla *et al*., 2018).

بر اساس بررسی منابع صورت گرفته، تاکنون مطالعه‌ای در خصوص ارزیابی قابلیت‌های پروبیوتیکی مخمرهای جداشده از باکویت تخمیر شده ارائه نشده است. در پژوهش حاضر، پس از جداسازی یکی از مخمرهای غالب باکویت تخمیر شده، برخی از ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

- مواد اولیه و آزمون‌های آرد

میکروارگانیسم‌های غذازاد مورد استفاده در این پژوهش شامل *اشریشیا کولای* (*Escherichia coli* PTCC 1399)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes* PTCC 1298) و *سالمونلا انتریکا* (*Salmonella enterica* PTCC 1709)، *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger* PTCC 5012) و *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus* PTCC 5006) از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. فعال‌سازی میکروارگانیسم‌های مذکور در محیط‌های کشت اختصاصی صورت گرفت و به‌منظور نگهداری آن‌ها از کشت اسلنت استفاده شد. همچنین محیط‌های کشت میکروبی و مواد شیمیایی مصرفی از شرکت‌های تجاری معتبر (Merck Germany، CHROMagar France، Sigma Aldrich USA) خریداری گردیدند. به‌منظور تهیه آرد کامل باکویت (کیان فود- ایران) از دستگاه آسیاب (آسان توس شرق، ایران) و سپس از الک با مش۵۰ استفاده شد. ویژگی‌های آرد باکویت شامل رطوبت، پروتئین، خاکستر، چربی و کربوهیدرات تام نیز بر اساس روش‌های مدون (AACC, 2010) تعیین گردید.

- تخمیر تصادفی باکویت

به‌منظور تخمیر تصادفی باکویت، مخلوط آب و آرد با بازده خمیر ۲۰۰ یعنی مخلوط ۱۰۰ گرم آرد باکویت و۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در ظروف استریل تهیه گردید. سپس مخلوط مذکور به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد (Moroni *et al*., 2011).

- جداسازی و شناسایی جدایه مخمری

۱۰ گرم از خمیرترش باکویت به ۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر انتقال یافت. سپس در لوله‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر محلول رینگر استریل به‌صورت متوالی، رقت‌سازی تهیه و از رقت‌های مذکور در محیط کشت YGC agar (Yeast extract Glucose Chloroamphenicol) به‌صورت سطحی کشت داده شد و پلیت‌ها به‌مدت ٤٨

ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. در مرحله بعد، از هر پلیت بر اساس تفاوت در ویژگی‌های ظاهری پرگنه‌ها (رنگ، شکل، تحدب و تعقر، عمقی یا سطحی بودن) چند پرگنه، انتخاب و جهت خالص‌سازی و تکثیر بر روی محیط کشت YGC agar، کشت خطی داده شد. در ادامه DNA جدایه مخمری غالب (دارای بیشترین جمعیت)، توسط کیت تجاری (Bioneer, AccuPrep K-3032, South Korea) استخراج شد و توسط PCR با پرایمرهای *ITS* (Internal transcribed spacer) شامل ITS1 (5′- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) و ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) تکثیر گردید. واکنش PCR در شرایط پیشنهاد شده در مطالعه قبلی (White *et al*., 1990) انجام شد. به‌منظور تأیید اولیه تکثیر، محصولات PCR به ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد رنگ SYBR safe منتقل و در بافر TBE (Tris, Borate, EDTA)، الکتروفورز انجام شد. برای شناسایی جدایه مخمری غالب، محصولات PCR پس از توالی‌یابی (Bioneer, South Korea) با استفاده از رویه BLAST (Basic local alignment search tool) با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National center for biotechnology information) هم‌ردیف گردیدند.

- زنده‌مانی جدایه مخمری در شرایط شبیه‌سازی شده لوله گوارش

ابتدا سوسپانسون حاوی مخمر با جمعیت CFU/mL 10^5 در محلول بافر فسفات حاوی اسید کلریدریک یک نرمال با pH معادل ۲ حل شد. سپس مقدار ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنزیم پپسین به آن اضافه گردید و به‌مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. در مرحله بعد با استفاده از هیدروکسید سدیم یک نرمال، pH این سوسپانسیون به ۷/۵ تنظیم گردید و مقدار ۰/۳ درصد نمک صفراوی به آن افزوده شد. سپس مجدداً به‌مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. در پایان زمان گرمخانه‌گذاری، رقت‌های متوالی سوسپانسون مذکور به‌صورت سطحی در محیط کشت YGC agar کشت داده شد و پس از گرمخانه‌گذاری به‌مدت ۲٤ ساعت، شمارش مخمرهای مقاوم به شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش در مقایسه با نمونه شاهد (بدون تیمار اسید و صفرا) تعیین گردید (Rolim *et al*., 2015).

- اثرات ضدباکتریایی جدایه مخمری در برابر برخی از عوامل غذازاد

ابتدا جمعیت CFU/mL 10^6 از کشت‌های تازه (۲٤ ساعته) مخمر جدا شده و باکتری‌های شاخص غذازاد (*اشریشیا کولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریکا*) تهیه شد. سپس حجم‌های یکسان از سوسپانسیون هر عامل بیماری‌زا و مخمر مذکور مخلوط شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت در محیط کشت BHI broth گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از گرمخانه‌گذاری، رقت‌های متوالی از هر نمونه تهیه شده و از آن در محیط کشت کروموژنیک اختصاصی هر باکتری شاخص، کشت سطحی تهیه گردید و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. همچنین اثر ضدباکتریایی روماند فاقد سلول مخمر پس از سانتریفیوژ (دمای ٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰) کشت فعال و عبور روماند آن از میکروفیلتر ۰/۲

میکرونی، مورد ارزیابی قرار گرفت (Maia Danielski *et al*., 2017).

- ارزیابی قابلیت خود اتصالی (Auto-aggregation)

به‌منظور ارزیابی قابلیت خود اتصالی جدایه مخمری، سلول‌های حاصل از کشت ۲٤ ساعته جدایه مخمری توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (Sigma, Germany) با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه جدا و در دو مرحله با بافر فسفات (pH =۲/۷)، شستشو داده شدند. در مرحله بعد، رسوبات حاصل در بافر فسفات دوباره مخلوط شد به‌نحوی که جمعیت سوسپانسیون جدایه مخمری به 10^5 CFU/mL رسید. در ادامه، سوسپانسیون مذکور به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. در پایان زمان مذکور، جذب سوسپانسیون جدایه مخمری در طول موج ٦۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PGI, England) خوانده شد و مطابق رابطه ذیل، میزان خود اتصالی محاسبه گردید. در این رابطه، A_f و A_0 به‌ترتیب، میزان جذب سوسپانسیون در ابتدا و انتهای زمان گرمخانه‌گذاری هستند (Gil-Rodriguez *et al*., 2015).

درصد خود اتصالی = $[1-(A_f/A_0)] \times 100$

- ارزیابی قابلیت آب‌گریزی (Hydrophobicity)

ابتدا کشت فعال ۲٤ ساعته آن به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ گردید و پس از جداسازی سوپرناتانت، سلول‌ها به بافر فسفات استریل، منتقل‌شده و جمعیت آن به 10^5 CFU/mL تنظیم گردید. سپس ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسون مخمری با یک میلی‌لیتر زایلن مخلوط شده و به‌مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و به‌مدت ٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. در انتها جذب نهایی جدایه در طول‌موج ٦۰۰ نانومتر خوانش گردید و میزان آب‌گریزی مطابق با رابطه ذیل محاسبه شد. در این رابطه، OD_0 و OD به‌ترتیب، میزان جذب سوسپانسیون در ابتدا و انتهای زمان گرمخانه‌گذاری هستند (Fadda *et al*., 2017).

$[(OD_0 - OD)/OD_0] - 100$

- بررسی مقاومت جدایه مخمری به ترکیبات ضدقارچی و برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج

بدین منظور، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از کشت فعال ۲٤ ساعته مخمر روی محیط کشت YGC agar کشت داده شد. در ادامه، دیسک‌های کاغذی حاوی آنتی‌بیوتیک و ترکیبات ضدقارچ روی سطح هر پلیت قرار گرفت. پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، با توجه به قطر هاله عدم رشد کمتر یا مساوی ۱٤ میلی‌متر (مقاوم)، ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر (حساسیت نسبی) و بیشتر از ۲۰ میلی‌متر (حساس)، مقاومت مخمر به پنی‌سیلین، جنتامایسین، نوبیوسین، ونکومایسین، سفازولین، سفالوتین، ایمی‌پنم، سفتریاکسون، آمپی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین، نالیدیکسیک‌اسید، استرپتومایسین و ترکیبات ضدقارچی ایتراکونازول، کتوکونازول، فلوکونازول، ناتامایسین، پتاسیم سوربات و کلسیم پروپیونات (جدول ۱) تعیین گردید (Rojo-Bezares *et al*., 2006; Banik *et al*., 2019).

- تعیین اثر ضدقارچی

به‌منظور بررسی اثر ضدقارچی جدایه مخمری از روش کشت دولایه استفاده شد. ابتدا کشت فعال ۲٤ ساعته جدایه مخمری در محیط YGC agar کشت داده

شد و سپس سوسپانسون اسپور قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* (۱۰^{۳} اسپور در هر میلی‌لیتر) به‌صورت لایه دوم به همراه محیط کشت Potato dextrose agar (PDA) بر روی آن‌ها ریخته شد و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله عدم رشد قارچ و همچنین تغییر رنگ قارچ (به‌عنوان یکی از معیارهای اثر ضدقارچی) در اطراف مخمرهای کشت داده شد به‌صورت روزانه تا زمانی که نمونه کنترل (فاقد کشت مخمری) تمام سطح پلیت را پوشاند، مقایسه گردید. قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف خطوط کشت مخمر با نرم‌افزار Image J (نسخه 1.42e) تعیین گردید (Magnusson *et al.*, 2003).

- ارزیابی قابلیت همولیز خون

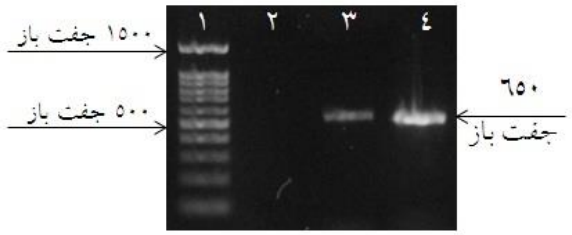
جهت ارزیابی فعالیت همولیزی به‌عنوان آزمون ایمنی جدایه مخمری، ابتدا کشت فعال ٢٤ ساعته مخمر در محیط کشت Blood agar حاوی ۵ درصد خون تازه گوسفندی، کشت داده شد و به‌مدت ٤٨-٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. نتایج بر اساس نوع و رنگ هاله رشد جدایه مورد بررسی قرار گرفت (Bonatsou *et al.*, 2018).

- تجزیه و تحلیل

نتایج حاصل از این پژوهش بر اساس طرح کاملاً تصادفی با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در سه تکرار و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰) مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح $P<۰/۰۵$ انجام شد و از نرم‌افزار Microsoft office Excel 2013 نیز برای ترسیم نمودارها استفاده گردید.

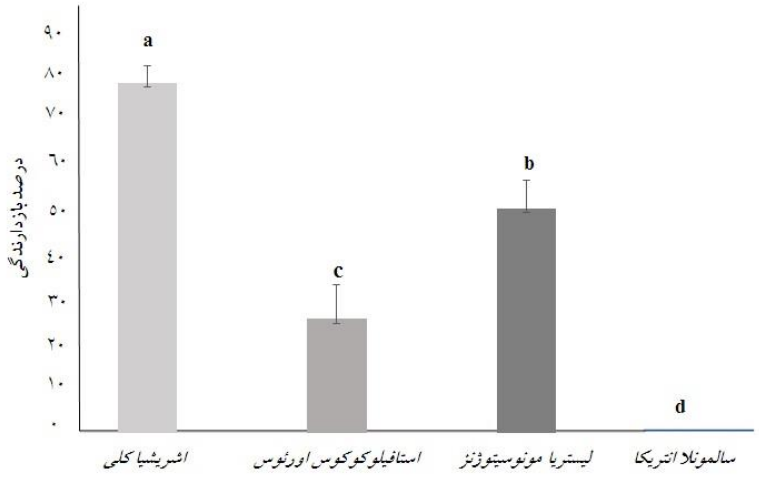
یافته‌ها

آرد باکویت مورد استفاده حاوی ٤/١٣ درصد چربی، ١٢/٠٢ درصد پروتئین و ٢/٠٩ درصد خاکستر، ١٢/٦٠ درصد رطوبت و ٦٩/١٦ درصد کربوهیدرات کل بود. تکثیر توالی ٦٥٠ جفت بازی جدایه مخمری توسط PCR مبتنی بر پرایمر اختصاصی از ناحیه *ITS* آن بر اساس نتایج حاصل از ژل الکتروفورز محصولات PCR مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱). به‌علاوه، توالی‌یابی محصولات PCR در مقایسه با داده‌های موجود در بانک جهانی ژن، منجر به شناسایی *رودوتوروولا موسیلاژینوزا* (*Rhodotorula mucilaginosa*) با ٩٦ درصد تشابه به‌عنوان جدایه مخمری شد.



شکل (۱)- ژل الکتروفورز محصولات PCR. ۱: لدر (مارکر صد تا هزار و پانصد جفت بازی)، ۲: کنترل منفی (*شریشیا کلی*)، ۳: جدایه مخمری، ٤: کنترل مثبت (*ساکارومایسس سرویزیه*).

زنده‌مانی جدایه مخمری در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش (۸/۲۸ Log CFU/mL) در مقایسه با نمونه کنترل (۸/۳٦ Log CFU/mL) معادل ٦/۳۳ ± ۸۵/۰۷ درصد بود. نتایج حاصل از آزمون ضدباکتریایی جدایه مخمری در شکل (۲) نشان داده شده است. اثر بازدارندگی جدایه مخمری روی تمامی چهار باکتری شاخص مورد مطالعه به‌شکل معنی‌داری (p<۰/۰۵) اختلاف داشت. این اثر به‌ترتیب روی *اشریشیا کولای*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* کاهش یافت و روی *سالمونلا انتریکا* هیچ‌گونه اثر بازدارندگی مشاهده نشد. علاوه بر این، روماند فاقد سلول مخمر فاقد اثر بازدارنده روی باکتری‌های مذکور بود.



شکل (۲)- درصد بازدارندگی جدایه مخمری بر عوامل باکتریایی غذازاد؛ **a, b, c, d**: حروف ناهمسان، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد.

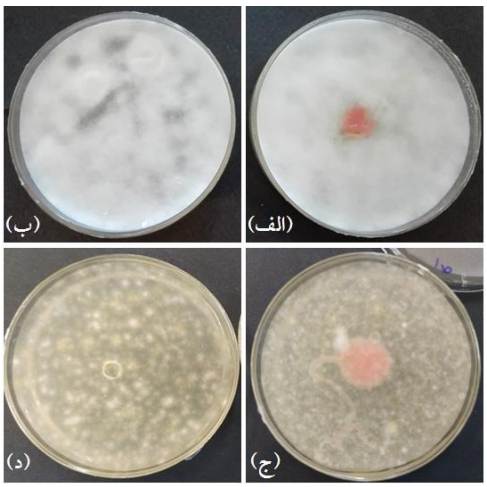
بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، میزان خود اتصالی و آب‌گریزی جدایه مخمری به ترتیب ۰/۱٤ ± ۸٤/٦۰ و ۰/۰۱ ± ٦۰/۱۰ درصد بود. همچنین جدایه مخمری در برابر تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد ارزیابی، مقاوم بود (البته در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، جنتامایسین، نالیدسیک اسید و ایتراکونازول هاله عدم رشد مخمر مشاهده شد). علاوه بر این، در مقابل نگه‌دارنده‌های سوربات پتاسیم و پروپیونات کلسیم نیز از خود مقاومت نشان داد. جدایه مذکور در برابر ترکیبات آنتی‌مایکوتیک رایج مانند فلوکونازول، ایتراکونازول و ناتامایسین نیز مقاوم و در برابر کتوکونازول، حساس بود (جدول ۱).

جدول (۱)- مقاومت جدایه مخمری در برابر برخی از ترکیبات آنتی‌بیوتیک و آنتی‌مایکوتیک رایج

آنتی‌بیوتیک (µg)	قطر هاله مهاری (mm)	مقاومت
کانامایسین (۳۰)	۸/٦۱ ± ۰/۳۰^{c}	مقاوم
سیپروفلوکساسین (۵)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
جنتامایسین (۱۰)	۸/۸٤ ± ۰/۰۱^{c}	مقاوم
استرپتومایسین (۱۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
ونکومایسین (۳۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
نالیدیکسیک اسید (۳۰)	۸/۲٦ ± ۰/۰۰^{c}	مقاوم
ایمیپنم (۱۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
سفتریاکسون (۳۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
سفالوسین (۳۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
آمپی‌سیلین (۱۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
کلیندامایسین (۲)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
سفازولین (۳۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
پنی‌سیلین (۱۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
نووبیوسین (۵)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
آنتی‌مایکوتیک (µg)	**قطر هاله مهاری (mm)**	**مقاومت**
ایتراکونازول (۱۰)	۷/٤۱ ± ۰/٤٦^{d}	مقاوم
فلوکونازول (۱۵)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
کتوکونازول (۲۰)	۳۳/٦٦ ± ۱/۱٦^{a}	حساس
سوربات پتاسیم (٦۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
پروپیونات کلسیم (٦۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰^{e}	مقاوم
ناتامایسین (۳۰)	۱۲/۲۲ ± ۰/۳۰^{b}	مقاوم

a, b, c, d, e: حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ می‌باشد.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، جدایه مخمری مورد مطالعه، فاقد هرگونه فعالیت همولیزی بود. مطابق شکل (۳) جدایه *رودوتوروولا موسیلاژینوزا* دارای اثر ضدقارچی ۱/٤۰ ± ۳/۷۱ درصد در مقابل *آسپرژیلوس نایجر* و ۱/۵۵ ± ۵/٤۳ درصد در برابر *آسپرژیلوس فلاووس* بود.



شکل (۳) اثر ضدقارچی *رودوتورولا موسیلاژینوزا* به روش کشت دولایه روی *آسپرژیلوس نایجر* (الف) و *آسپرژیلوس فلاووس* (ج)، به‌ترتیب در مقایسه با نمونه کنترل (ب) و (د) هر یک از کپک‌های مزبور.

بحث و نتیجه‌گیری

جدایه *رودوتورولا موسیلاژینوزا* در پژوهش حاضر دارای ۸۵/۰۷ درصد زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش بود. نتایج مطالعات سایر محققین نشان داد که همه سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* و *کازاچستانیا هومیلیس* مقاومت بالایی نسبت به شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش داشتند و زنده‌مانی آن‌ها در این شرایط تنها ۱/۵ سیکل لگاریتمی کاهش یافت (Palla *et al.*, 2018). پژوهشگران دیگری پس از قرار دادن ۱۳۰ جدایه مخمری در شرایط مذکور دریافتند که ۵۹ سویه قادر به رشد بودند درحالی‌که تنها سه سویه *ساکارومایسس اگزیگوس* (*Saccharomyces exiguus*)، *ساکارومایسس سرویزیه* و *کلایورومایسس والتی* (*Kluyveromyces waltii*) هیچ‌گونه رشدی نداشتند. یکی از مهم‌ترین شاخصه‌ها برای غربالگری و انتخاب پروبیوتیک‌ها، حفظ، بقاء و فعالیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش است. مقاومت بالای برخی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک نسبت به شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش می‌تواند ناشی از تولید بیوفیلم، اصلاح فعالیت پمپ پروتون و هیدرولیز نمک‌های صفراوی باشد. آنزیم‌های هیدرولاز نمک‌های صفراوی و اسید دهیدراتاز صفراوی از جمله آنزیم‌های اساسی میکروبی هستند که با فعالیت خود سبب هیدرولیز نمک صفراوی شده و متعاقباً باعث کاهش اثرات جانبی نمک صفراوی بر پروبیوتیک‌ها می‌گردند. کاهش pH سبب ممانعت از متابولیسم و کاهش میزان رشد و زنده‌مانی اغلب میکروارگانیسم‌ها می‌شود. در حالی‌که مقاومت برخی از پروبیوتیک‌ها به کاهش pH می‌تواند ناشی از قابلیت خنثی‌سازی اسید توسط آن‌ها باشد (Montville and Matthews, 2012).

در پژوهش حاضر، اثر ضدباکتریایی *رودوتورولا موسیلاژینوزا* در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس*،

سالمونلا انتریکا، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کولای* با استفاده از محیط کشت کروموژنیک تأیید گردید. در تحقیقی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* نشان داد که مخمر مذکور در برابر عوامل بیماری‌زای گرم منفی اثر بهتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دارد و از رشد *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جلوگیری نمود (Fakruddin *et al*., 2017). نتایج مطالعات دیگر نشان داد که مخمر *کاندیدا اینترمدیا* (*Candida intermedia*) قادر به کاهش زنده‌مانی *لیستریا مونوسیتوژنز* تا چهار سیکل لگاریتمی بود. در حالی‌که سه سویه *کاندیدا اینترمدیا* و یک‌سویه *کلایوورومایسس مارکسیانوس* (*Kluyveromyces marxianus*) تا سه سیکل لگاریتمی جمعیت *لیستریا* را کاهش دادند (Goerges *et al*., 2006). جدایه‌های مخمری پروبیوتیک با تولید ترکیبات ضدمیکروبی نظیر گلیکولیپیدهای خارج سلولی با نام سوفوروزیدها، پپتیدهای آب‌گریز و پپتیدهای مقاوم به حرارت، باعث بروز اثر ضدمیکروبی می‌شوند (Cavalero and Cooper, 2003; Hatoum *et al*., 2013). از سایر مکانیسم‌های ضدمیکروبی مخمرها می‌توان به رقابت بر سر دسترسی به مواد مغذی، تبادل یونی و یا تولید اسیدهای آلی، تولید مقادیر بالای اتانول و همچنین ترشح ترکیباتی مانند توکسین‌های کشنده با نام مایکوسین‌ها اشاره کرد. مایکوسین‌ها نوعی پروتئین یا گلیکوپروتئین خارج سلولی هستند که در عملکرد غشاء سلولی تداخل ایجاد می‌کنند (Rima *et al*., 2012).

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، *رودوتورولا موسیلاژینوزا* دارای ۸٤/٦۰ درصد قابلیت خود اتصالی بود. محققین مختلفی نتایج مشابهی پیرامون این موضوع گزارش کردند. به‌عنوان مثال، گزارش شده است که میزان خود اتصالی جدایه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* در حین گرمخانه‌گذاری به ۸۸/۰۱ درصد رسید (Fernandez-Pacheco *et al*., 2018). مطالعه دیگر نشان داد که مخمرها در مقایسه با باکتری‌ها، میزان خود اتصالی بیشتری دارند و سویه‌های *ویکرومایسس آنومالوس*، ٦٤/٣٤ -٦۰/٨٥ درصد خود اتصالی داشتند. قابلیت اتصال در باکتری‌ها و مخمرها به دو صورت خود اتصالی و دگر اتصالی بررسی می‌گردد (Sakandar *et al*., 2018). نتایج حاصل از پژوهش این محققین، حاکی از قدرت بالای مخمرها در اتصال با عوامل هم‌نوع بود. اتصال سویه‌های هم‌نوع، سبب مسدود شدن جایگاه اتصال عوامل بیماری‌زا شده و عموماً موجب بهبود اتصال پروبیوتیک‌ها به سلول‌های اپیتلیال روده، لانه‌گزینی و محافظت از دستگاه گوارش می‌شود (Janković *et al*., 2012).

طی پژوهش حاضر مشخص گردید که *رودوتورولا موسیلاژینوزا* دارای ۰/۰۱±٦۰/۱۰ درصد آب‌گریزی بود. برخی از محققین، میزان آب‌گریزی متفاوتی برای جدایه‌های مختلف مخمری گزارش کردند. نتایج مطالعه‌ای نشان داد که میزان آب‌گریزی سویه‌های مختلف *کلایوورومایسس* در محدوده ۷۹/٤۰–۳۹/۹۰ درصد متفاوت بود (Fadda *et al*., 2017). علاوه بر این، محققین دیگری دریافتند که دو جدایه مخمری خمیرترش آلتامورا به‌ترتیب ۹٦/۹٦ و ٦۰/۰۰ درصد آب‌گریزی داشتند (Perricone *et al*., 2014). همچنین مشخص گردید که جمعیت قابل‌توجهی از مخمرهای جدا شده از روغن زیتون، مانند مخمرهای *کاندیدا آدریاتیکا* (*Candida adriatica*) و یا *یامادازیما ترونتینا* (*Yamadazyma terventina*) به ترتیب ۵۵/۵۰ – ٤۵/۵۰ درصد

آب‌گریزی داشتند (Zullo and Ciafardini, 2019). یکی دیگر از خصوصیات مهم پروبیوتیک‌ها، توانایی آب‌گریزی آن‌هاست که می‌تواند به‌عنوان یک ابزار غیرمستقیم برای ارزیابی قابلیت اتصال ذاتی به موکوس دستگاه گوارش استفاده شود. بسیاری از محققین معتقدند که آب‌گریزی حدود ۴۰-۳۰ درصد می‌تواند بیانگر قدرت پروبیوتیک‌ها برای واکنش به موکوس و ایجاد حداقل یک اتصال کوتاه و ناپایدار باشد (Abdulla *et al*., 2014; Ilavenil *et al*., 2016).

نتایج آزمون مقاومت آنتی‌بیوتیکی *رودوتورولا موسیلاژینوزا* در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج، مقاومت آن را نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها تأیید کرد. امروزه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ضدقارچی (در مورد مخمرها) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مطرح می‌باشد. عموماً مخمرها برخلاف باکتری‌ها، به‌طور طبیعی دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی (واجد ژن‌های مقاومت کروموزومی) هستند و فقدان ماده ژنتیکی به‌منظور انتقال بین باکتری و مخمر، آن‌ها را به‌عنوان انتخاب مناسبی برای کاربردهای پروبیوتیکی مطرح نموده است (Perricone *et al*., 2014). در تحقیقی ضمن بررسی مقاومت سویه‌ای از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی مشاهده شد. در مقابل این مخمر در برابر عوامل ضدقارچی مانند فلوکونازول و کلوتریمازول دارای حساسیت گزارش گردید (Banik *et al*., 2019). در پژوهش دیگری مشخص شد *کلایورومایسس مارکسیانوس* نسبت به چهارترکیب ضدقارچ رایج وریکونازول، کتوکونازول، فلوکتوزین و ایتراکونازول حساسیت متوسط دارد. در حالی‌که *کلایورومایسس لاکتیس* (*Kluyveromyces lactis*) و *کلایورومایسس استوری* (*Kluyveromyces story*) در مقابل فلوکتوزین و آمفوتریسین مقاوم بودند (Fekri *et al*., 2020). در خصوص نحوه واکنش مخمرها در برابر ترکیبات ضدقارچ می‌توان به تغییر یا اصلاح نفوذپذیری غشاء سلول، بازدارندگی سنتز پروتئین‌های میتوکندریایی، جهش و کاهش فعالیت‌های تجزیه ATP اشاره کرد. مقاومت در برابر ترکیبات ضدقارچ ممکن است ناشی از بازدارندگی سنتز RNA و DNA سلولی، تغییر جایگاه هدف ترکیب ضدقارچ، ممانعت از سنتز استرول‌ها و صدمات مستقیم غشایی، تحریک سیستم پمپ پروتونی در غشاء سلول، فعالیت پمپ افلاکس (جزئی از متابولیسم حذف ترکیبات ضدقارچ که نیازمند صرف انرژی است) و تداخل در بیان ژن باشد (Kanafani and Perfect, 2008; Goretti *et al*., 2009; Cernicka *et al*., 2007).

جدایه مخمری در این پژوهش، فاقد هرگونه فعالیت همولیزی بود. طی پژوهش مشابهی نتیجه همولیز خون توسط همه جدایه‌های مخمری، منفی گزارش شد (Fadda *et al*., 2017). در مطالعه دیگری نیز هیچ‌کدام از جدایه‌های مخمری شامل *پیچیا بارکری* (*Pichia barkeri*)، *یاراویا لیپولیتیکا*، *ساکارومایسس سرویزیه* و *ویکرومایسس آنومالوس* فعالیت همولیزی نداشتند (Suvarna *et al*., 2018). به‌طور کلی مخمرها به‌علت فقدان ژن‌های انتروتوکسین‌زای همولیتیک، عدم تولید توکسین‌های تجزیه‌کننده خون و عدم آسیب به غشاء سیتوپلاسمی سلول‌های قرمز خون، اغلب فعالیت همولیزی ندارند.

همچنین جدایه *رودوتورولا موسیلاژینوزا* در پژوهش حاضر دارای اثر ضدقارچی اندکی بر *آسپرژیلوس نایجر*

و *آسپرژیلوس فلاووس* بود. بر اساس نتایج پژوهشی که روی سویه‌ای از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* انجام گرفت، مشخص گردید که مخمر مذکور دارای فعالیت ضدقارچی روی *آسپرژیلوس آستوس* (*Aspergillus astus*)، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اوکراسوس* (*Aspergillus ocrasus*)، *پیچیا کریزوژنوم* (*Pichia cryzogenum*) و *رایزوپوس اوریزا* (*Rhizzopus oryzae*) بود. بیشترین اثر بازدارنده آن روی *آسپرژیلوس نایجر* و کمترین اثر بر *آسپرژیلوس آستوس* مشاهده شد (Fakruddin *et al*., 2017). در پژوهش دیگری اثرات ضدقارچی پنج مخمر جدا شده از محصولات تخمیری برای تعیین اثر مهاری بر *آسپرژیلوس کربوناریوس* (*Aspergillus carbonarius*) و اُکراتوکسینآ مطالعه شد و مشخص گردید که *هانسنیاسپورا* (*Hanseniaspora*)، *کلایوروومایسس*، *پیچیا فرمنتانس* (*Pichia fermentans*)، *زیگوساکارومایسس بیلی* (*Zygosaccharomyces bailii*)، *کازاچستانیا هلنیکا* (*Kazachstania hellenica*) و *ساکارومایسس سرویزیه* در فعالیت آبی ۰/۹۵ و جمعیت قارچ $۱۰^{۲}$ اسپور در میلی‌لیتر و جمعیت مخمری $۱۰^{۵}$ کلنی در میلی‌لیتر دارای ۹۳-۶۱ درصد اثر ضدقارچی بودند. در واقع، تولید متابولیت‌هایی مانند دی‌اکسید کربن، اتانول، ترکیبات پروتئینی یا پپتیدهای با وزن مولکولی پایین و ترکیب این عوامل در اثر ضدقارچی گونه‌های مخمری مؤثر است (Kapetanakou *et al*., 2012; Ruggirello *et al*., 2019).

در پژوهش حاضر، ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمر جدا شده از باکویت تخمیر شده، به‌عنوان منبع جدیدی برای جداسازی مخمر، مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج، *رودوتورولا موسیلاژینوزا* از توانایی زنده‌مانی مناسبی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش برخوردار بود و دارای قابلیت‌های آب‌گریزی و خود اتصالی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و اثرات ضدمیکروبی قابل‌توجهی بود. بنابراین، جدایه مذکور از قابلیت مناسبی برای استفاده به‌عنوان کشت همراه و پروبیوتیک در صنایع تخمیری برخوردار است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که تأمین بخشی از هزینه‌های اجرای این پژوهش را تأمین نمودند صمیمانه قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- AACC International. (2010). Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. The St. Paul.
- Abdulla, A.A., Abed, T.A. and Saeed, A.M. (2014). Adhesion, auto-aggregation and hydrophobicity of six *Lactobacillus* strains. British Microbiology Research Journal, 4(4): 381-391.
- Andrabi, S.T., Bhat, B., Gupta, M. and Bajaj, BK. (2016). Phytase-producing potential and other functional attributes of lactic acid bacteria isolates for prospective probiotic applications. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 8(3):121-129.

- Angmo, K., Kumari, A. and Bhalla, TC. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. LWT-Food Science and Technology, 66: 428-435.
- Bajaj, B.K., Claes, I.J. and Lebeer, S. (2021). Functional mechanisms of probiotics. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2021: 321-327.
- Banik, A., Mondal, J., Rakshit, S., Ghosh, K., Sha, S.P., Kumar Halder, S., *et al.* (2019). Amelioration of cold-induced gastric injury by a yeast probiotic isolated from traditional fermented foods. Journal of Functional Foods, 59: 164-173.
- Bonatsou, S., Karamouza, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Kletsas, D. and Papadimitriou, K. (2018). Evaluating the probiotic potential and technological characteristics of yeasts implicated in cv. Kalamata natural black olive fermentation. International Journal of Food Microbiology, 271: 48-59.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences, 74(17): 2157-2184.
- Cavalero, D.A. and Cooper, D.G. (2003). The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC22214. Journal of Biotechnology, 103(1): 31–41.
- Cernicka, J., Kozovska, Z., Hnatova, M., Valachovic, m., Hapala, I., Riedl, Z., *et al.* (2007). Chemosensitisation of drug-resistant and drug-sensitive yeast cells to antifungals. International Journal of Antimicrobial Agents, 29(2): 170-178.
- Chen, L.S., Ma, Y., Maubois, J.L., He, S.H., Chen, L.J. and Li, H.M. (2010). Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. Dairy Science & Technology, 90(5): 537-548.
- Czerucka, D., Piche, T. and Rampal, P. (2007). Review article: Yeast as probiotics: *Saccharomyces boulardii*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 26(6): 767-778.
- Fadda, M.E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M.B. and Cosentino, S. (2017). In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. LWT-Food Science and Technology, 75: 100-106.
- Fakruddin, M.D., Hossain, M.N. and Ahmed, M.M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. BMC Complementary and Alternative Medicine, 17(1): 1-11.
- Fekri, A., Torbati, M.A., Yari Khosrowshahi, A., Bagherpour Shamlood, H. and Azadmard-Damirchi, S. (2020). Functional effects of phytate-degrading, probiotic lactic acid bacteria and yeast strains isolated from Iranian traditional sourdough on the technological and nutritional properties of whole wheat bread. Food Chemistry, 306: 125620.
- Fernandez-Pacheco, P., Arevalo-Villena, M., Bevilacqua, A., Corbo, M., and Beriones Perez, A. (2018). Probiotic characterization in *Saccharomyces cerevisiae* strains: application in food industries. LWT- Food Science and Technology, 97: 332-340.
- Gil-Rodriguez, A.M., Carrascosa, A.V., and Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: In vitro characterization of probiotic traits. LWT- Food Science and Technology, 64: 1156-1162.
- Goerges, S., Aigner, U., Silakowski, B. and Scherer, S. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by foodborne yeasts. Applied and Environmental Microbiology, 72 (1): 313–318.
- Goretti, M., Turchetti, B., Buratta, M., Branda, E., Corazzi, l., Vaughan-Martini, *et al.* (2009). In vitro antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. International Journal of Food Microbiology, 131(2-3): 178-182.
- Hatoum, R., Labrie, S. and Fliss, I. (2013). Identification and partial characterization of antilisterial compounds produced by dairy yeasts. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 5(1): 8-17.

- Ilavenil, S., Vijayakumar, M., Kim, D.H., Arasu, M., Park, H.S. and Ravikumar, S. (2016). Assessment of probiotic, antifungal and cholesterol lowering properties of *Pediococcus pentosaceus* KCC-23 isolated from Italian Ryegrass. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(2): 593–601.
- Janković, T., Frece, J., Abram, M. and Gobin, I. (2012). Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. International Journal of Sanitary Engineering Research, 6(1): 19-24.
- Kanafani, Z.A. and Perfect, J.R. (2008). Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clinical Infectious Diseases, 46(1): 120-128.
- Kapetanakou, A.E., Kollias, J.N., Drosinos, E.H. and Skandamis, P.N. (2012). Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. International Journal of Food Microbiology, 152(3): 91-99.
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. and Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 219(1): 129-135.
- Maia Danielski, G., Didimo Imazaki, P.H., Daube, G., Ernlund Freitas de Macedo, R. and Clinquart, A. (2017). In vitro evaluation of the competing effect of *Carnobacterium maltaromaticum* isolated from vacuum packed meat against food pathogens. BAMST Symposium: Meet the Belgian meat researchers, Melle 7th.
- Montville, T.J. and Matthews, K.R. (2012). Physiology, growth, and inhibition of microbes in foods. Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers, 1-18
- Moroni, A.V., Arendt, E.K. and Dal Bello, F. (2011). Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. Food Microbiology, 28(3): 497-502.
- Palla, M., Agnolucci, M., Calzone, A., Giovannetti, M., Di Cagno, R., Gobbetti, M., *et al.* (2018). Exploitation of autochthonous Tuscan sourdough yeasts as potential starters. International Journal of Food Microbiology, 302: 59-68.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. and Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. Food Microbiology, 38: 26-35.
- Rima, H., Steve, L. and Ismail, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. Frontiers in Microbiology, 3: 421.
- Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. (2006). Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. International Journal of Food Microbiology, 111(3): 234-240.
- Rolim, F.R.L., dos Santos, K.M.O., de Barcelos, S.C., do Egito, A.S., Ribeiro, T.S. and da Conceição, M.L. (2015). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. LWT-Food science and Technology, 63(2): 807-813.
- Ruggirello, M., Nucera, D., Cannoni, M., Peraino, A., Rosso, F., Fontana, M., *et al.* (2019). Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. Food Research International, 115: 519-525.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M. and Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. LWT- Food Science and Technology, 50(1): 1-16.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 84(3): 197-215.

- Sakandar, H.A., Usman, K. and Imran, M. (2018). Isolation and characterization of gluten-degrading and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough *Enterococcus mundtii* (Khamir). LWT- Food Science and Technology, 91: 271-277.
- Suvarna, S., Dsouza, J., Ragavan, M. L. and Das, N. (2018). Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. Food Science and Biotechnology, 27(3): 745-753.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1): 315-322.
- Zullo, B.A. and Ciafardini, G. (2019). Evaluation of physiological properties of yeasts strains isolated from olive oil and their in vitro probiotic trait. Food Microbiology, 78: 179-187.