ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمر منتخب جدا شده از برنج سیاه تخمیر شده

فاطمه جعفری کوشکقاضی[1]، علیرضا صادقی[2*]، مهران اعلمی[2]، هدی شهیری طبرستانی[2]، دل آسا رحیمی گلوگاهی[2]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
***نویسنده مسئول:** *sadeghi.gau@gmail.com*

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۹/۰۸ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۱۲/۱۳

چکیده

تاکنون خصوصیات پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمرهای جدا شده از بسترهای تخمیری شبه غلات، کمتر مطالعه شده است. در این پژوهش، پس از جداسازی مخمرهای عمده از برنج سیاه تخمیر شده، مخمر دارای بیشترین زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش برای مطالعات بعدی انتخاب شد. سپس جدایه مذکور به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) شناسایی گردید و در ادامه، سایر خصوصیات پروبیوتیکی آن شامل اثرات ضدباکتریایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقاومت در برابر ترکیبات ضدقارچ، قابلیت اتصال، آبگریزی و همولیز خون بررسی شد. خاصیت ضدقارچی جدایه منتخب نیز در برابر برخی از شاخص‌های قارچی منتقله از غذا مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی *Rhodotorula mucilaginosa* به عنوان جدایه مخمری منتخب گردید. جدایه مذکور در تیمار متوالی اسید و صفرا، ۸۴/۳۹ درصد زنده‌مانی خود را حفظ نمود. همچنین تاثیر بازدارندگی جدایه مخمری بر روی *Salmonella enterica* به شکل معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) از سایر عوامل باکتریایی منتقله از غذا بیشتر بود. جدایه مخمری قابلیت تجمعی و آبگریزی مناسبی داشت و در برابر آنتی-بیوتیک‌های مورد ارزیابی مقاوم بود. علاوه بر این، بیشترین بازدارندگی از رشد جدایه مخمری مورد بررسی در حضور کتوکونازول مشاهده شد در حالیکه مخمر منتخب در برابر پروپیونات، سوربات، ایتروکونازول و فلوکونازول مقاوم بود. جدایه مخمری مورد مطالعه فاقد فعالیت همولیزی بود. همچنین اثر ضدقارچی *R. mucilaginosa* در برابر *Aspergillus flavus* تایید شد. بر اساس این نتایج، جدایه مخمری منتخب از قابلیت مناسبی جهت استفاده به عنوان کشت پروبیوتیک و یا محافظت کننده در فرآوری محصولات تخمیری برخوردار است.

کلید واژه‌ها: مخمر پروبیوتیک، برنج سیاه تخمیر شده، اثر ضدقارچی.

مقدمه

بر اساس تعریف سازمان بهداشت جهانی، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و فعالی هستند که در صورت استفاده در مقادیر کافی دارای اثرات سلامتی‌بخش در بدن میزبان باشند (FAO/WHO, 2002). خصوصیات پروبیوتیک‌های مورد استفاده در صنعت غذا شامل مقاومت در برابر اسید و صفرا، اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده، تولید ترکیبات ضدمیکروبی و توانایی تشکیل کلنی در دستگاه گوارش انسان می‌باشد. اتصال میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به دیواره روده یکی از قابلیت‌های مهم پروبیوتیک‌ها بوده که در تشکیل کلنی در دستگاه گوارش انسان و کمک به از بین رفتن میکروارگانیسم‌های بیماری-زا موثر است (Collado, et al., 2008). تاکنون مطالعاتی در خصوص بررسی خصوصیات پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از فرآورده‌های تخمیری صورت گرفته است. به عنوان

مثال، طی مطالعه تنوع میکروبی مخمرهای جدا شده از خمیرترش فورا (Fura) مشخص شد که *Candida norvegensis*، *Candida kruesi*، *Candida rugosa*، *Kluyveromyces marxianus*، *Candida fabianii*، *Candida tropicalis* و *Trichosporon asahii* دارای خواص پروبیوتیکی نظیر مقاومت در برابر اسید و صفرا و قابلیت اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده بودند (Pedersen, et al., 2012). همچنین طی بررسی ویژگی‌های فناوری و پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از خمیرترش آلتامورا (Altamura) گزارش شد که مخمر-های *Saccharomyces cerevisiae* و *Candida humilis* علاوه بر ویژگی‌های فناوری از ویژگی‌های پروبیوتیکی نظیر مقاومت در برابر اسید و صفرا، آبگریزی، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک و توانایی تشکیل فیلم زیستی برخوردار بودند (Perricone, et al., 2014). محققینی نیز با بررسی موادغذایی تخمیری مختلف اقدام به جداسازی و شناسایی مخمرها نموده و ویژگی‌های پروبیوتیکی آن‌ها را مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس نتایج پژوهش مذکور، مشخص شد که مخمرهای جدا شده دارای قابلیت زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش بوده و همچنین دارای قابلیت خوداتصالی بالا برابر با ۹۰ درصد بودند (Hsiung, et al., 2021). تاکنون مطالعات بسیار محدودی در خصوص مخمرهای جدا شده از برنج سیاه تخمیرشده صورت گرفته است و از طرفی به دلیل تفاوت این اکوسیستم تخمیری به لحاظ ترکیبات یا نحوه فرآوری، امکان مواجهه با فلور میکروبی منحصر به فرد در آن نامحتمل نیست. هدف از این مطالعه، بررسی خواص پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمر منتخب جدا شده از برنج سیاه تخمیر شده بود.

مواد و روش کار

تخمیر تصادفی برنج سیاه

پس از تهیه آرد برنج سیاه، ویژگی‌های آن (محتوای پروتئین، چربی، خاکستر، رطوبت و کربوهیدرات) بر اساس روش‌های استاندارد تعیین گردید (AACC, 2010). پس از ترکیب آب و آرد برنج سیاه با بازده خمیر ۲۰۰ بر اساس معادله ۱۰۰ × نسبت خمیر به آرد = بازده خمیر، مخلوط مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تخمیر گردید (Vogelmann, et al., 2009).

آزمون‌های شیمیایی خمیرترش

برای تعیین مقدار pH و اسیدیته قابل تیتر خمیرترش از روش استاندارد استفاده شد (Arici, et al., 2018; Rizzello, et al., 2016). مخمرهای غالب خمیرترش برنج سیاه با تهیه رقت‌های متوالی و کشت سطحی در محیط‌کشت Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) agar جدا و برای رسیدن به تک پرگنه خالص از آن‌ها کشت خطی تهیه گردید. در ادامه مخمرهای غالب جدا شده با استفاده از روش رنگ آمیزی و مشاهده میکروسکوپی بررسی شدند. محیط‌های کشت میکروبی و مواد شیمیایی مصرفی نیز از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردیدند.

غربالگری جدایه‌های مخمری بر اساس مقاومت به اسید و صفرا

ابتدا جمعیت جدایه مخمری به 10^8 CFU/mL تنظیم گردید. سپس pH محیط کشت Brain Heart Infusion broth (BHI) حاوی جمعیت مخمری مذکور با استفاده از اسیدکلریدریک یک نرمال به حدود دو رسانده شد. در ادامه، غلظت ۰/۳ درصد از آنزیم پپسین به سوسپانسیون مخمری افزوده شد و به مدت یک ساعت و نیم در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید. سپس این سوسپانسیون میکروبی به مدت یک ساعت و نیم در مجاورت غلظت ۰/۳ درصد نمک صفراوی و pH معادل هشت قرار داده شد. در پایان زمان گرمخانه‌گذاری، رقت های متوالی از سوسپانسیون مذکور در رینگر استریل، تهیه و به صورت سطحی بر روی محیط کشت YGC agar کشت داده شد. نهایتا تعداد مخمر زنده پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در مقایسه با نمونه شاهد (بدون تیمار اسید و صفرا) تعیین گردید (Rolim, et al., 2015).

شناسایی جدایه مخمری منتخب

DNA مخمر منتخب با کیت استخراج (شرکت بیونیر، کره جنوبی) و توسط PCR با پرایمرهای ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) و ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) تکثیر (۳۵ چرخه حرارتی اصلی، شرایط بهینه دمای اتصال پرایمر ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه) در ترموسایکلر (کوربت، استرالیا) انجام شد (White, et al., 1990). برای تایید اولیه تکثیر، محصولات PCR به ژل آگارز یک و نیم درصد واجد رنگ SYBR safe منتقل و در بافر Tris, Borate, EDTA(TBE)، الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ و زمان ۴۰ دقیقه انجام شد. در ادامه به منظور شناسایی جدایه مخمری، محصولات PCR پس از توالی‌یابی (بیونیر، کره جنوبی) با استفاده از ابزار جستجوی همردیفی ناحیه‌ای (BLAST) با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری ایالات متحده (NCBI) همردیف گردیدند.

اثرات ضدباکتریایی جدایه مخمری

برای ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی جدایه مخمری در برابر *Escherichia coli* PTCC 1399، *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *Salmonella enterica* PTCC 1709 از روش کشت دو لایه استفاده شد. پنج میکرولیتر از کشت مخمری ۲۴ ساعته فعال (10^8 CFU/mL) در وسط پلیت حاوی محیط کشت YGC لکه‌گذاری شد. پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باکتری‌های فعال (10^6 CFU/mL) به محیط کشت BHI agar افزوده شده و به صورت لایه دوم در پلیت حاوی جدایه مخمری کشت داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. سرانجام قطر هاله عدم رشد به کمک نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد (Perricone, et al., 2014).

قابلیت خوداتصالی و آبگریزی جدایه مخمری

برای ارزیابی قابلیت خوداتصالی، کشت ۲۴ ساعته فعال جدایه مخمری توسط سانتریفوژ یخچال‌دار (سیگما، آلمان) با سرعت ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه جدا و طی دو مرحله با بافر فسفات (pH برابر ۷/۲) شستشو داده شد. سپس رسوبات حاصل در بافر فسفات، حل گردید به نحوی که سوسپانسیون به دست آمده در طول موج ۶۰۰ نانومتر جذبی معادل با هفت دهم داشته باشد. در ادامه، این سوسپانسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. در پایان زمان مذکور، جذب سوسپانسیون جدایه مخمری در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و مطابق با رابطه ذیل، میزان خوداتصالی محاسبه گردید. در این رابطه A_F مقدار جذب ۲۴ ساعته و A_0 مقدار جذب اولیه است (Tuo, et al., 2013).

$$[1- (A_F / A_0)] \times 100$$

برای ارزیابی قابلیت آبگریزی نیز پس از سانتریفوژ کشت ۲۴ ساعته فعال با سرعت ۱۰۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه، تنظیم جمعیت جدایه مخمری (10^8 CFU/mL) با بافر فسفات انجام شد و سپس سوسپانسیون مخمری به زایلن افزوده شد. سپس در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از دو ساعت گرمخانه‌گذاری مجددا جذب‌خوانی (طول موج ۶۰۰ نانومتر) انجام گرفت و میزان قابلیت آبگریزی طبق رابطه زیر محاسبه گردید. در این رابطه A_F مقدار جذب دو ساعت پس از گرمخانه‌گذاری و A_0 مقدار جذب اولیه است (Bautista-Gallego, et al., 2013).

$$[1- (A_F / A_0)] \times 100$$

مقاومت جدایه مخمری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم و ترکیبات ضدقارچ

مقاومت جدایه مخمری در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج نیز با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، ایران) بررسی گردید. مقاومت جدایه مخمری در برابر ترکیبات ضدقارچ نیز با استفاده از دیسک‌های استریل کاغذی حاوی ترکیبات مذکور انجام شد و بررسی هاله عدم رشد در اطراف این دیسک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت

(Fadda, et al., 2017; Fernandez-Pacheco, et al., 2018).

قابلیت همولیز خون توسط جدایه مخمری

برای این منظور، جدایه مخمری بر روی سطح محیط کشت Blood agar حاوی 5 درصد خون گوسفندی، کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ایجاد هاله و تغییر رنگ در محیط کشت بررسی گردید (Romero-Luna, et al., 2019).

اثر ضدقارچی جدایه مخمری

برای این منظور از روش کشت دو لایه در برابر *Aspergillus flavus* PTCC 5006 و *Aspergillus niger* PTCC 5012 استفاده گردید. ابتدا پنج میکرولیتر از کشت فعال جدایه مخمری منتخب (10^8CFU/mL) در مرکز پلیت‌های YGC agar لکه‌گذاری شد. سپس این پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. اسپورهای قارچ پس از جمع‌آوری و شمارش با لام هموسایتومتر تا 10^5 عدد در هر میلی‌لیتر رقیق گردیدند. سپس مخلوط حاوی یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ با نه میلی‌لیتر محیط کشت Potato Dextrose agar (PDA) به عنوان لایه دوم روی محیط حاوی کشت مخمری ریخته شد و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تا زمانی که نمونه شاهد (فاقد کشت مخمر) تمام سطح پلیت را پوشاند گرمخانه‌گذاری گردیدند. در انتها قطر هاله عدم رشد قارچ با نرم‌افزار Image J تعیین شد (Ruggirello, et al., 2019).

آنالیز آماری نتایج

نتایج حاصل از این پژوهش بر اساس طرح کاملا تصادفی در سه تکرار و با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۰) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح $p<۰/۰۵$ انجام گرفت. از نرم افزار Microsoft Office Excel 2016 نیز برای ترسیم نمودارها استفاده شد.

نتایج

آرد برنج سیاه مورد استفاده در این پژوهش، دارای ۷/۸۳ درصد پروتئین، ۱/۰۹ درصد چربی، ۱۲/۶۵ درصد رطوبت، ۰/۵۹ درصد خاکستر و ۷۷/۹۲ درصد کربوهیدرات کل بود. مقادیر pH و اسیدیته قابل تیتر خمیرترش برنج سیاه نیز به ترتیب، قبل از عمل تخمیر برابر ۰/۰۲ ± ۵/۸۲ و ۰/۰۵ ± ۱/۵۵ و پس از عمل تخمیر برابر ۰/۰۵ ± ۵/۴۶ و ۰/۰۵ ± ۱/۷۵ بود. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود جدایه JBR-4 نسبت به سایر جدایه‌ها به شکل معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) از زنده‌مانی بیشتری در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش برخوردار بود. همچنین زنده‌مانی جدایه JBR-3 به شکل معنی‌داری از سایر جدایه‌ها کمتر بود و تفاوت معنی‌داری بین زنده‌مانی دو جدایه دیگر مشاهده نشد.

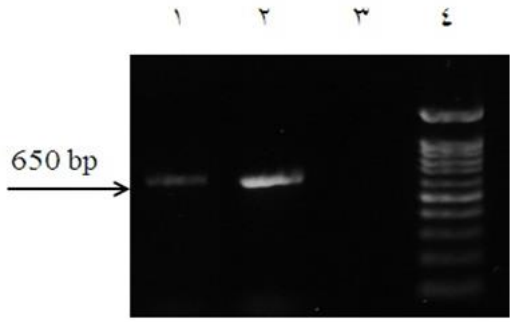
جدول۱- مقایسه درصد زنده‌مانی جدایه‌های مخمری در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

جدایه مخمری	درصد زنده‌مانی
JBR-1	b۲۰/۱۶ ± ۲/۴۱
JBR-2	b۲۴/۵۸ ± ۴/۵۸
JBR-3	c ۸/۳۳ ± ۰
JBR-4	a۸۴/۳۹ ± ۰/۶۱

حروف متفاوت، مبین تفاوت معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ است. JBR: برنج سیاه.

ژل الکتروفورز محصولات PCR منجر به تایید تکثیر اختصاصی توالی هدف ۶۵۰ جفت بازی در DNA ژنومی جدایه مخمری منتخب در مقایسه با نمونه کنترل منفی (فاقد DNA) و کنترل مثبت (DNA استخراج شده از سویه کلکسیونی) شد (شکل۱). سرانجام بر اساس نتایج توالی‌یابی محصولات PCR و همردیفی آن‌ها با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI جدایه مخمری، *Rhodotorula mucilaginosa* (۹۵ درصد تشابه)

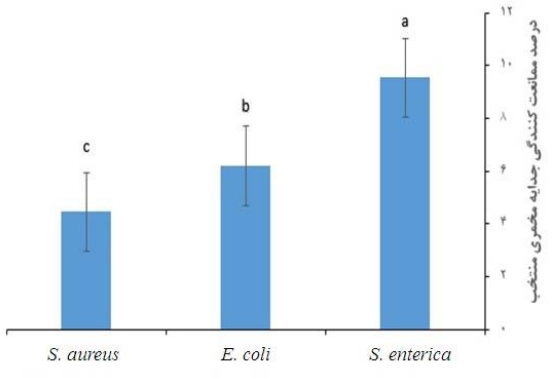
شناسایی گردید. توالی مذکور برای ثبت در بانک جهانی ژن ارسال گردید.



شکل۱- ژل الکتروفورز محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی. لاین۱: DNA استخراج شده از جدایه مخمری منتخب، لاین۲: کنترل مثبت حاوی DNA سویه کلکسیونی، لاین۳: کنترل منفی، لاین۴: لدر.

نتایج حاصل از ارزیابی اثرات ضدباکتریایی به روش کشت دولایه نشان داد که جدایه مخمری منتخب از خاصیت ضدباکتریایی در برابر شاخص‌های مورد مطالعه برخوردار بود (شکل۲). همانطور که مشاهده می‌گردد مخمر منتخب، بیشترین تاثیر ممانعت‌کنندگی را در برابر *S. enterica* و بعد از آن *E. coli* داشت و کمترین میزان بازدارندگی آن در برابر *S. aureus* مشاهده شد.

علاوه بر این، اثر بازدارنگی جدایه منتخب در برابر سه باکتری بیماری‌زا به شکل معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) متفاوت بود.



شکل۲- مقایسه تاثیر بازدارندگی جدایه مخمری منتخب به روش کشت دو لایه در برابر *Salmonella enterica*، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*. حروف متفاوت، مبین اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ هستند.

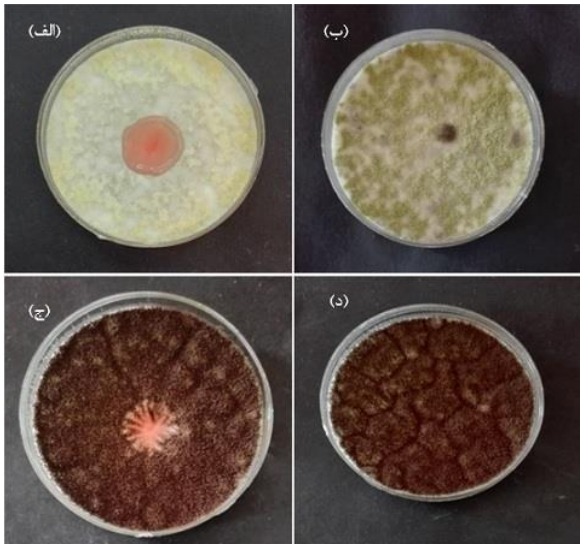
قابلیت تجمعی و آبگریزی جدایه مخمری منتخب به ترتیب، معادل ۳/۶۵ ± ۷۹/۲۹ و ۰/۳۶ ± ۷۸/۱۱ درصد محاسبه شد. نتایج حاصل از مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که جدایه مخمری منتخب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین، سیپروفلاکساسین، جنتامایسین، سفتراکسین، آمپی‌سیلین، سفازولین، نالیدیکسیک اسید، ونکومایسین، کانامایسین، پنیسیلین، نووبیوسین، ایمیپنم و استرپتومایسین مقاوم بود. علاوه بر این، بر اساس جدول شماره (۲) بیشترین بازدارندگی از رشد جدایه مخمری مورد بررسی در حضور کتوکونازول مشاهده شد در حالیکه مخمر منتخب در برابر پروپیونات، سوربات، ایتروکونازول و فلوکونازول مقاوم بود. همچنین درصد بازدارندگی رشد مخمر منتخب در حضور کتوکونازول به شکل معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) از سایر ترکیبات ضدقارچ بیشتر بود.

جدول ۲- مقاومت جدایه مخمری در حضور ترکیبات ضدقارچ

ترکیبات ضدقارچ (غلظت)	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	میزان حساسیت
کتوکونازول (۲۰۰ میلی‌گرم)	a۳۸/۱۷ ± ۰/۵۰	حساس
ناتامایسین (۵۰ میلی‌گرم)	b۱۶/۰۱ ± ۰/۰۸	حساسیت نسبی
پروپیونات (۶۰ میلی‌گرم)	c۱۲/۸۱ ± ۰/۱۶	مقاوم
سوربات (۶۰ میلی‌گرم)	d۹/۸۷ ± ۰/۱۲	مقاوم
ایتروکونازول (۱۰۰ میلی‌گرم)	e۰	مقاوم
فلوکونازول (۱۵۰ میلی‌گرم)	e۰	مقاوم

حروف متفاوت، مبین تفاوت معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ هستند.

جدایه مخمری مورد مطالعه، فاقد فعالیت همولیزی بود. همچنین تاثیر بازدارندگی جدایه مخمری منتخب بر *A. flavus* و *A. niger* در روز چهارم در مقایسه با نمونه شاهد (فاقد جدایه مخمری و حاوی اسپور قارچ) در شکل (۳) آمده است. همانطور که در این تصاویر مشاهده می-شود قطر هاله عدم رشد برای جدایه مخمری منتخب در حضور *A. flavus* معادل ۰/۷۱ ± ۱۷/۹۸ میلی‌متر بود. در حالیکه این جدایه نتوانست با ایجاد هاله عدم رشد از رشد *A. niger* ممانعت کند. علاوه بر این، مخمر مذکور مانع از تغییر رنگ کامل *A. flavus* به رنگ سبز پسته‌ای شد اما نتوانست مانع از تغییر رنگ *A. niger* گردد.



شکل۳- مقایسه تاثیر بازدارندگی جدایه مخمری منتخب به روش کشت دو لایه در برابر *Aspergillus flavus* (الف) و *Aspergillus niger* (ج) در مقایسه با نمونه‌های شاهد آن‌ها (ب و د).

بحث

محققینی ضمن بررسی بهبود آسیب معده توسط مخمر *S. cerevisiae* جدا شده از هاریا (نوعی نوشیدنی تخمیری از برنج)، چارپی (نوعی پنیر) و خمبیر (نوعی نان بر پایه خمیر گندم) دریافتند که قابلیت زنده‌مانی این مخمر در pHهای دو، دو و نیم، سه و پنج به ترتیب، برابر ۸۲/۴۴، ۹۵/۷۷، ۹۷/۸۸ و ۹۸/۴۴ درصد در مدت زمان پنج ساعت بود. همچنین مقاومت مخمر مذکور در برابر صفرا در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، یک و دو درصد به ترتیب ۹۷/۸۸، ۹۷/۱۱، ۹۳/۶۶ و ۹۲/۲۲ گزارش شد (Banik, et al., 2019). پژوهشگران دیگری طی پژوهشی زنده‌مانی مخمر *Wickerhamomyces anomalus* جدا شده از خمیرترش گندم در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش با هدف ارزیابی خواص پروبیوتیکی آن را بررسی کردند. زنده‌مانی این مخمر در pHهای دو، دو و نیم، سه و ۷/۴ معادل ۹۵ تا ۱۰۰ درصد و در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ درصد صفرا معادل ۹۷/۸۰ تا ۹۹/۶۰ درصد گزارش شد (Sakandar, et al., 2018). پروبیوتیک‌ها دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند که یکی از مهم‌ترین مشخصه های آن‌ها زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش است چراکه اولین پیش‌نیاز برای انتخاب مناسب-ترین جدایه، توانایی تحمل pH پایین و نمک صفراوی می باشد (Kourelis, et al., 2010). بعضی از مخمرها از زنده‌مانی مناسبی در pH متغیر دستگاه گوارش برخوردار هستند. در واقع حفظ تعادل pH داخل سلول یک عامل مهم در حفظ و بقای سلول‌های مخمر در دستگاه گوارش و انجام فعالیت‌های آنزیمی می‌باشد. طی گزارشی کاهش pH در مخمر *S. cerevisiae* موجب اختلال در فعالیت آنزیم ATPase و اختلال در انتقال الکترون در سلول و در نتیجه مرگ سلول شد. در حالیکه مخمر *K. marxianus*توانست با حفظ یکپارچگی سلول، شرایط اسیدی را تحمل کند (Motey, et al., 2020). صفرا

دارای خاصیت ضدمیکروبی است و مقدار آن بعد از مصرف غذا افزایش می‌یابد ولی مخمرها عموما از طریق تجزیه صفرا از خود در مقابل اثر ضدمیکروبی آن محافظت می‌کنند (Fadda, et al., 2017).

محققینی با هدف شناسایی مولکولی مخمرهای موجود در برنج سیاه و سفید مطالعاتی انجام دادند. طی این مطالعه حضور مخمرهای *Pichia fabianii*، *R. mucilaginosa*، *Ogataea polymorpha*، *Saccharomyces fibuligera* و *W. anomalus* در برنج سیاه و سفید تایید شد (Soka and Irene, 2013). پژوهشگران دیگری نیز تنوع زیستی مخمرهای خمیرترش سنتی در ناحیه غربی چین را بررسی کردند. طی این مطالعه، مخمرهای *R. mucilaginosa* و *Pichia farinosa* شناسایی شدند (Zhang, et al., 2011). *Rhodotorula* متعلق به شاخه بازیدیومیست‌ها به شکل کروی تا بیضوی دارای هیف‌های ابتدایی و هاگدان‌های کوچک می‌باشد. این مخمر به طور گسترده‌ای در محیط پراکنده است. علاوه بر این، در فلور طبیعی دستگاه گوارش، دستگاه تنفسی و سطح پوست نیز گسترده می‌باشد (Ioannou, et al., 2019).

پژوهشگرانی طی مطالعه ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از خمیرهای ایدلی و جالبی گزارش کردند که بیست جدایه مخمری بررسی شده دارای اثرات بازدارندگی بر روی باکتری‌های *S. enterica*، *E. coli*، *S. aureus* و *Vibrio cholerae* بودند. در مطالعه مذکور، عمل بازدارندگی مخمر در برابر عوامل بیماری‌زا به روش کشت دو لایه بررسی شد و نتیجه به صورت ایجاد هاله روشن اطراف جدایه مخمری با قطر ۱۶-۳۶ میلی‌متر تایید گردید (Syal and Vohra, 2013). طی مطالعه دیگری مخمر *S. cerevisiae* واریته بولاردی دارای اثر بازدارندگی در برابر عوامل بیماری‌زای انسانی شامل *E. coli*، *Enterococcus faecalis*، *Listeria monocytogenes*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Salmonella typhimurium*، *Campylobacter jejuni* و *S. aureus* بود (Rajkowska and Kunicka-Styczyńska, 2012). یکی از ویژگی‌های مطلوب مخمرهای پروبیوتیک، فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها در مقابل عوامل بیماری‌زای انسانی می‌باشد (Fakruddin, et al., 2017). مخمرها از طریق رقابت برای مواد غذایی، تغییر pH از طریق تولید اسیدهای آلی یا تغییرات یونی، تولید مقادیر زیاد اتانول و تولید ترکیبات ضدمیکروبی دیگر می‌توانند مانع از رشد عوامل بیماری‌زا شوند (Golubev, 2006).

محققینی میزان قابلیت خود اتصالی *S. cerevisiae* (c41) و *Saccharomyces boulardii* و همچنین درصد آبگریزی این مخمرها را با استفاده از کلروفرم و هگزادکان مورد ارزیابی قرار دادند. این محققین، میزان خوداتصالی در مخمرهای مذکور پس از دو ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس را به ترتیب ۵۲/۹۵ و ۵۵/۱۵ درصد و پس از ۲۴ ساعت ۹۶/۹۰ درصد گزارش کردند. همچنین درصد آبگریزی مخمرهای *S. cerevisiae* و *S. boulardii* با استفاده از کلروفرم ۸۴/۳۶، ۳۷/۷۲ و با استفاده از هگزادکان ۶۶/۱۵ و ۲۴/۰۶ درصد گزارش شد (Romero-Luna, et al., 2019). آبگریزی سطح سلول و قابلیت تجمعی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی هستند که در اتصال سلول‌ها به سطوح غیرزنده و زنده کمک می‌کنند. احتمالا مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده در این زمینه، خصوصیات چسبندگی سطحی سلول‌ها است که در پروبیوتیک‌ها به عنوان یک عامل انتخابی نیز مطرح می‌باشد (Van der Aa Kühle, et al., 2005). اتصال پروبیوتیک‌ها به سلول‌های اپی‌تلیال روده و لانه‌گزینی آن‌ها در حفاظت از دستگاه گوارش و جلوگیری از حذف سریع آن‌ها موثر می‌باشد. قابلیت آبگریزی همچنین یک نوع تعامل غیراختصاصی بین میکروارگانیسم و سلول‌های روده است که به واسطه پروتئین‌ها و اجزای دیگر سلول انجام می‌شود (Kos, et al., 2003).

براساس نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پژوهشی ضمن بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از آناناس مشخص شد که همه مخمرها در برابر آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین، تتراسایکلین، اریترومایسین، کلرامفنیکول، پنیسیلین و آمپی‌سیلین مقاوم بودند (Amorim, et al., 2018). همچنین در مطالعه دیگری مخمر *S. cerevisiae* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی-سیلین، نئومایسین، نوروفلوکساسین، پنیسیلین، جنتامایسین، سولفونامید و تری‌متوپریم مقاوم بود (Poloni, et al., 2017). مخمرها به صورت ذاتی عموما نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ضدباکتریایی مقاوم هستند. عدم انتقال مواد ژنتیکی بین باکتری‌ها و مخمرها سبب شده که مخمرها برای استفاده در طول درمان با آنتی بیوتیک انتخاب گردند. ترکیبات ضدقارچ به شکل منحصر به فردی، ارگوسترول موجود در دیواره سلولی قارچها را هدف قرار داده و از این طریق اثر ضدقارچی خود را اعمال می‌کنند. کتوکونازول و فلوکونازول، دو ترکیب مهم از گروه آزول‌ها بوده که به صورت دارو مصرف می‌شوند و اثر ضد-قارچی خود را از طریق مهار آنزیم سیتوکروم p450 اعمال می‌کنند (Malayeri, et al., 2018).

در پژوهشی اثرات ضدقارچی مایکوسین‌های خالص شده حاصل از مخمر *Pichia membranifaciens* مورد بررسی قرار گرفت. این ترکیبات، پروتئین‌هایی با وزن مولکولی KDal ۱۸ بوده که از طریق اتصال به دیواره سلولی و ایجاد اختلال در شیب غلظت یونی غشای پلاسمایی، سبب مرگ سلول هدف می‌شوند (Santos, et al., 2009). در مطالعه دیگری فعالیت ضدقارچی ۳۸۴ مخمر جدا شده از دانه کاکائوی تخمیرشده در برابر قارچ-های *Aspergillus*، *Penicillium* و *Gibberella* در شرایط آزمایشگاهی و موجود زنده مورد بررسی قرار گرفت که از این میان، *Hanseniaspora opuntiae* و *S. cerevisiae* (H290) دارای بالاترین اثرات بازدارندگی بودند. بر اساس نتایج گزارش مذکور، مشخص شد که مخمرهای مورد بررسی با تولید اتانول از گلوکز و فروکتوز از رشد قارچها جلوگیری می‌کنند. اثر ضدقارچی میکروارگانیسم‌ها به ممانعت از رشد قارچها خلاصه نمی-شود و ممانعت از تغییر رنگ قارچها به واسطه ارتباط آن با اسپورزایی قارچها از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد (Romanens, et al., 2019). در طول فرایند تخمیر، رشد قارچهای رشته‌ای تحت تاثیر الکل، اسیدلاکتیک و اسیداستیک تولید شده توسط مخمرها و باکتری‌های اسید لاکتیک قرار می‌گیرد (Ruggirello, et al., 2019). مخمرها نیز در طی فرایند تخمیر از طریق رقابت برای جذب موادغذایی و تولید متابولیت‌های ضدقارچی، رشد قارچها را محدود می‌کنند (Corsetti, et al., 2015). همچنین متابولیت‌های دیگری مانند دی‌اکسیدکربن، اتانول، پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین و ترکیب این عوامل، دارای اثرات ضدقارچی می‌باشند (Bianchini and Bullerman, 2009).

در پژوهشی فعالیت همولیزی مخمر *S. cerevisiae* جدا شده از تیبیکوس (نوعی نوشیدنی تخمیری از کفیر) مورد مطالعه قرار گرفت و منفی گزارش شد (Romero Luna, et al., 2019). همچنین در مطالعه دیگری *Kluyveromyces* جدا شده از پنیر نیز فاقد فعالیت همولیزی بود (Fadda, et al., 2017). فقدان فعالیت همولیزی در تایید ایمنی مخمرها به عنوان یکی از نخستین آزمون‌های آزمایشگاهی جایگاه ویژه‌ای دارد.

نتیجه‌گیری کلی

هدف از این مطالعه، ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد قارچی مخمر منتخب جدا شده از برنج سیاه تخمیر شده بود. در این پژوهش پس از غربالگری جدایه‌های مخمری غالب خمیرترش برنج سیاه بر اساس زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش، قابلیت‌های پروبیوتیکی جدایه منتخب نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. خصوصیات پروبیوتیکی *R. mucilaginosa* جدا شده از برنج سیاه تخمیر شده، شامل اثر بازدارندگی آن بر عوامل باکتریایی منتقله از غذا، مقاومت در برابر ترکیبات ضدقارچ، قابلیت تجمعی و آبگریزی و همچنین عدم قابلیت همولیز خون

توسط جدایه مذکور بود. اثر ضدقارچی در جدایه مخمری مذکور به صورت ممانعت از تغییر رنگ قارچ *A. flavus* نیز مشاهده شد. با توجه به قابلیت‌های پروبیوتیکی و ضد-قارچی مخمر جدا شده از برنج سیاه می‌توان از این مخمر به عنوان کشت پروبیوتیک یا کشت محافظت‌کننده در صنایع تخمیری استفاده کرد.

منابع

1. AACC International methods. 2010. Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed.
2. Amorim J.C., Piccoli R.H. and Duarte W.F. 2018. Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. Food Res. Int. 107:518-527.
3. Arici M., Ozulku G., Yildirim R.M., Sagdic O. and Durak MZ. 2018. Biodiversity and technological properties of yeasts from Turkish sourdough. Food Sci. Biotechnol. 27(2):499-508.
4. Banik A., Mondal J., Rakshit S., Ghosh K., Sha S.P., Halder S.K. and Mondal K.C. 2019. Amelioration of cold-induced gastric injury by a yeast probiotic isolated from traditional fermented foods. J. Funct. Foods. 59:164-173.
5. Bautista-Gallego J., Arroyo-López F.N., Rantsiou K., Jiménez-Díaz R., Garrido-Fernández A. and Cocolin L. 2013. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. Food Res. Int. 50(1):135-142.
6. Bianchini A. and Bullerman L.B. 2009. Biological control of molds and mycotoxins in foods. In "Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture", ACS Publications, pp. 1-16.
7. Collado M.C., Meriluoto J. and Salminen S. 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. Eur. Food Res. Technol. 226(5):1065-1073.
8. Corsetti A., Perpetuini G. and Tofalo R. 2015. Biopreservation effects in fermented foods. In "Advances in Fermented Foods and Beverages". Woodhead Publishing, pp. 311-332.
9. 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 Sci. Technol. 75:100-106.
10. Fakruddin M.D., Hossain M.N. and Ahmed M.M. 2017. Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. BMC Complement. Altern. *Med*. 17(1):1-11.
11. FAO/WHO 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in foods. Food and agriculture organization of the united nations and world health organization expert consultation report.
12. Fernandez-Pacheco P., Arévalo-Villena M., Bevilacqua A., Corbo M.R. and Pérez A.B. 2018. Probiotic characteristics in *Saccharomyces cerevisiae* strains: Properties for application in food industries. LWT Food Sci. Technol. 97:332-340.
13. Golubev W.I. 2006. Antagonistic interactions among yeasts. In "Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts". Springer, pp.197-219.
14. Hsiung R.T., Fang W.T., LePage B.A., Hsu S.A., Hsu C.H. and Chou J.Y. 2021. In vitro properties of potential probiotic indigenous yeasts originating from fermented food and beverages in Taiwan. Probiotics Antimicrob. Proteins. 13:113-124.
15. Ioannou P., Vamvoukaki R. and Samonis G. 2019. Rhodotorula species infections in humans: A systematic review. Mycoses. 62(2):90-100.
16. Kos B.V.Z.E., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J. and Matošić S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. J. Appl. Microbiol. 94(6):981-987.
17. Kourelis A., Kotzamanidis C., Litopoulou-Tzanetaki E., Scouras Z.G., Tzanetakis N. and Yiangou M. 2010. Preliminary probiotic selection of dairy and human yeast strains. J. Biol. Res. 13:93.

Malayeri A.F., Rezaei A. and Raiesi O. 2018. Antifungal agents: Polyene, azole, antimetabolite, other and future agents. J. Bas. Res. Med. Sci. 5(2):48-55.

19. Motey G.A., Johansen P.G., Owusu Kwarteng J., Ofori L.A., Obiri Danso K., Siegumfeldt H. and Jespersen L. 2020. Probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* isolated from West African spontaneously fermented cereal and milk products. Yeast. 37(9-10):403-412.
20. Pedersen L.L., Owusu-Kwarteng J., Thorsen L. and Jespersen L. 2012. Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously fermented cereal. Int. J. Food Microbiol. 159(2):144-151.
21. Perricone M., Bevilacqua A., Corbo M.R. 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 Microbiol. 38:26-35.
22. Poloni V., Salvato L., Pereyra C., Oliveira A., Rosa C., Cavaglieri L. and Keller K.M. 2017. Bakery by-products based feeds borne-*Saccharomyces cerevisiae* strains with probiotic and antimycotoxin effects plus antibiotic resistance properties for use in animal production. Food Chem. Toxico. 107:630-636.
23. Rajkowska K. and Kunicka-Styczyńska A. 2012. Probiotic activity of *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* against human pathogens. Food Technol. Biotechnol. 50(2):230-236.
24. Rizzello C.G., Lorusso A., Montemurro M. and Gobbetti M. 2016. Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. Food Microbiol. 56:1-13.
25. Rolim F.R.L., dos Santos K.M.O., de Barcelos S.C., do Egito A.S., Ribeiro T.S., da Conceicao M.L. and do Egypto R.D.C.R. 2015. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. LWT Food Sci. Technol. 63(2):807-813.
26. Romanens E., Leischtfeld S.F., Volland A., Stevens M.J., Krähenmann U., Isele D. and Schwenninger S.M. 2019. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. Int. J. Food Microbiol. 290:262-272.
27. Romero-Luna H.E., Hernández-Sánchez H., Ribas-Aparicio R.M., Cauich-Sánchez P.I. and Dávila-Ortiz G. 2019. Evaluation of the probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* strain (C41) isolated from Tibicos by in vitro studies. Probiotics Antimicrob. Proteins. 11(3):794-800.
28. Ruggirello M., Nucera D., Cannoni M., Peraino A., Rosso F., Fontana M. and Dolci P. 2019. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. Food Res. Int. 115:519-525.
29. Sakandar H.A., Usman K. and Imran M. 2018. Isolation and characterization of gluten-degrading *Enterococcus mundtii* and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough (Khamir). LWT Food Sci. Technol. 91:271-277.
30. Santos A., San Mauro M., Bravo E. and Marquina D. 2009. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens* and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. Microbiol. 155(2):624-634.
31. Soka S. and Irene M. 2013. Molecular analysis of yeasts from Indonesian cassava and glutinous rice tapé. Food Sci. Biotechnol. 22(4):993-997.
32. Syal P. and Vohra A. 2013. Probiotic potential of yeasts isolated from traditional Indian fermented foods. Int. J. Microbiol. *Res*. 5(2):390.
33. Tuo Y., Yu H., Ai L., Wu Z., Guo B. and Chen W. 2013. Aggregation and adhesion properties of 22 Lactobacillus strains. J. Dairy Sci. 96(7):4252-4257.

34. Van der Aa Kühle A., Skovgaard K. and Jespersen L. 2005. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. Int. J. Food Microbiol. 101(1):29-39.
35. Vogelmann S.A., Seitter M., Singer U., Brandt M.J. and Hertel C. 2009. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. Int. J. Food Microbiol. 130(3):205-212.
36. 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.
37. Zhang J., Liu W., Sun Z., Bao Q., Wang F., Yu J. and Zhang H. 2011. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China. Food Control. 22(5):767-774.

Evaluation of probiotic and antifungal properties of the selected yeast isolated from fermented black rice

Jafari koshkghazi F[1], Sadeghi A[2*], Aalami M[2], Shahiri Tabarestani H[2], Rahimi Galoogahi D[3]

1. Former MSc student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. PhD Student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received: 29 November 2021 Accepted:04 March 2022

***Corresponding Author:** *sadeghi.gau@gmail.com*

Abstract

Probiotic and antifungal properties of the yeasts isolated from fermented pseudo cereals have been rarely studied, yet. In the present study, after isolation of predominant yeasts isolated from fermented black rice, the yeast with the highest survival in simulated gastrointestinal conditions was selected for further studies. Then, the selected isolate was identified by PCR, and subsequently, its probiotic properties including antibacterial effects, antibiotic and antimycotic susceptibilities, aggregation, hydrophobicity and hemolytic potentials were also studied. Antifungal activity of the selected yeast was investigated against some of the foodborne fungi. Sequencing of the PCR products led to the identification of *Rhodotorula mucilaginosa* as the selected yeast isolate. The isolate maintained 84.39% of its survival in continues acid and bile treatment. Also, the inhibitory effect of the yeast isolate on *Salmonella enterica* was significantly (p<0.05) higher than the other foodborne bacteria. Yeast isolate had proper aggregation and hydrophobicity capabilities, and it was resistant to the antibiotics tested. Furthermore, the most inhibition of the yeast growth was observed in the presence of ketoconazole, while the selected yeast was resistant to propionate, sorbate, itroconazole and fluconazole. The studied yeast isolate had no hemolytic activity. The antifungal effect of the yeast isolate against *Aspergillus flavus* was also verified. In accordance with these results, the selected yeast isolate has a proper potential to use as a probiotic or protective culture in production of fermented foods.

Keywords: Probiotic yeast, Fermented black rice, Antifungal effect.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.