ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مخمر غالب جدا شده از خمیرترش جو

سارا شهریاری[۱]، فهیمه حاجی‌نیا[۱]، حسین پورعبدالله[۱]، مریم ابراهیمی[۲]، علیرضا صادقی[۱*]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲-مرکز تحقیقات سلامت غذا- دارو و ترکیبات طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
مسئول مکاتبات: Sadeghi.gau@gmail.com*

چکیده

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مخمرهای جدا شده از غلات تخمیر شده به منظور تهیه کشت‌های آغازگر، پروبیوتیک و یا سلامتی‌بخش از اهمیت زیادی برخوردار است. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مخمر غالب جدا شده از خمیرترش جو به اجرا در آمد. بدین منظور، مخمر دارای بیشترین زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش از بین مخمرهای غالب جدا شده از خمیرترش جو با استفاده از تکنیک PCR شناسایی گردید. سپس سایر ویژگی‌های پروبیوتیکی و همچنین اثرات ضد میکروبی جدایه مخمری مذکور مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی *Cyberlindnera fabianii* به عنوان مخمر منتخب شد. همچنین قابلیت زنده‌مانی جدایه مذکور پس از قرارگیری در معرض تیمار متوالی اسید و صفرا در مقایسه با نمونه شاهد ۶۰ درصد بود. علاوه بر این، مخمر مذکور قادر به کاهش ۵ سیکل لگاریتمی از جمعیت باکتری بیماری‌زای *Escherichia coli* بود که نسبت به سایر عوامل غذازاد مورد مطالعه به شکل معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر بود. جدایه مذکور همچنین توانست رشد *Listeria monocytogenes* و *Salmonella enterica* را تا ۴ سیکل لگاریتمی کاهش دهد اما اثر بازدارنده مشهودی بر *Staphylococcus aureus* نداشت. قابلیت خوداتصالی جدایه مذکور نیز معادل ۴۰ درصد تعیین گردید. این جدایه مخمری نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی نیز مقاوم و در برابر آنتی‌مایکوتیک‌های کتوکونازول و فلوکونازول دارای حساسیت نسبی بود. جدایه مذکور، فاقد هرگونه فعالیت همولیتیکی بود و اثر ضد قارچی آن در برابر *Aspergillus niger* نیز مورد تأیید قرار گرفت. بر این اساس، جدایه مخمری مورد مطالعه از قابلیت مطلوبی جهت استفاده به عنوان کشت پروبیوتیک و محافظت‌کننده در صنایع تخمیری برخوردار می‌باشد.

کلمات کلیدی: مخمر پروبیوتیک، خمیرترش جو، اثر ضد میکروبی، کشت محافظت‌کننده.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی، می‌توانند منجر به بروز اثرات سلامتی‌بخش شوند. امروزه تقاضا برای محصولات غذایی تخمیری حاوی کشت‌های پروبیوتیک رو به افزایش است. اگرچه اغلب، باکتری‌های اسید لاکتیک و بیفیدوباکتری‌ها به‌عنوان عوامل پروبیوتیک در صنایع غذایی انتخاب می‌شوند ولی بررسی فلور میکروبی غلات تخمیر شده و حبوبات، منجر به شناسایی مخمرهایی با خصوصیات عملکردی مناسب شده است. پژوهش‌های بسیاری نیز بر روی قابلیت پروبیوتیکی مخمرها در محصولات تخمیری و نوشیدنی‌ها، پنیر، کفیر، زیتون و شراب انجام شده است. اغلب جنس‌های مخمری در این محصولات نیز به غیر از *Saccharomyces*، شامل *Debaryomyces*، *Issatchenkia*، *Galactomyces*، *Kluyveromyces*، *Pichia* و *Yarrowia* بوده است. تحمل شرایط نامساعد دستگاه گوارش توسط این میکروارگانیسم‌ها باعث حفظ فلور میکروبی روده در حالت طبیعی، محافظت در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای معده‌ای-روده‌ای و ارتقاء سیستم ایمنی می‌شود (Saarela *et al*., 2000; Saad *et al*., 2013).

مخمرها میکروارگانیسم‌های یوکاریوت با اندازه غیر یکنواخت، مقاوم به تنش و دارای مقاومت آنتی-بیوتیکی، عموماً غیر بیماری‌زا، غیر سمی و غیر حساسیت‌زا هستند. علاوه بر این، تولید ترکیبات زیست‌فعال گوناگون در انتخاب آنها به عنوان کشت پروبیوتیک تأثیر بسزایی دارد (Ogunremi *et al*., 2020). این میکروارگانیسم‌ها در تولید فراورده‌های تجاری نظیر غذاها و نوشیدنی‌ها، ترکیبات غذا-دارویی و همچنین آنزیم‌های صنعتی نیز حائز اهمیت هستند (Moslehi Jenabian *et al*., 2010). مخمرهای پروبیوتیک دارای فعالیت بازدارندگی روی میکروارگانیسم‌های عامل فساد و همچنین قادر به تحمل pH پایین و غلظت بالای نمک، تولید آرومای مطلوب و بهبود رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند. همچنین زنده‌مانی آن‌ها طی عبور از دستگاه گوارش با تولید برخی از ویتامین‌ها، ترکیبات آنتی-اکسیدان و تجزیه ترکیبات ضد تغذیه‌ای مانند فیتات، جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زا، کاهش سطح کلسترول و اتصال به سطح سلول‌های روده‌ای، سبب بهبود سلامت مصرف‌کنندگان می‌شوند (Tadesse *et al*., 2021). این میکروارگانیسم‌ها به عنوان کشت-های آغازگر برای تخمیر فراورده‌های غذایی مختلف نیز مورد استفاده قرار گرفته و سبب بهبود ویژگی‌های حسی محصولات تخمیری می‌شوند. این اثرات ناشی از فعالیت‌های متابولیکی آنزیم‌هایی مانند استرازها و لیپازها هستند که از مخمرها منشأ می‌گیرند (Bevilacqua *et al*., 2012; Arroyo López *et al*., 2012).

تا کنون گزارش‌هایی در خصوص ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد قارچی مخمرهای جدا شده از غلات و شبه غلات تخمیر شده ارائه گردیده است. به‌عنوان مثال، Mogmenga و همکاران (۲۰۲۳) نیز ۱۴ گونه از مخمر *Saccharomyces*، دو گونه از مخمر *Pichia* و *Rhodotorula mucilaginosa* را پس از بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از نوعی محصول تخمیری سنتی شناسایی کردند. به جز مخمر *R. mucilaginosa*، تمامی این مخمرها قادر به رشد در دمای بدن انسان بودند و بیشترین مقاومت را نسبت به شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش داشتند. علاوه بر این، قابلیت خوداتصالی جدایه‌های مذکور در محدوده ۷۰/۲۰ تا ۹۱/۸۲ درصد متفاوت بود و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* از رشد عوامل بیماری‌زای غذازاد ممانعت کرد. همچنین Shahryari و همکاران (۲۰۲۲) ضمن بررسی قابلیت‌های پروبیوتیکی مخمر جدا شده از باکویت تخمیرشده دریافتند که مخمر *Pichia kudriavzevii* جدا شده دارای ۷۹/۲۶ درصد زنده-مانی بود. علاوه بر این، مخمر مذکور از قابلیت خوداتصالی به میزان ۶۷/۴۰ درصد برخوردار بود. Greppi و همکاران (۲۰۱۷) ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمر *P. kudriavzevii* را مورد آزمون قرار دادند که نتایج این پژوهش حاکی از زنده‌مانی این مخمر در محدوده ۱۱ تا ۴۵ درصد پس از تیمار در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان بود. همچنین میزان خوداتصالی آن بین ۱۲ تا ۴۰ درصد گزارش گردید. Palla و همکاران (۲۰۱۹) نیز پس از مطالعه مخمرهای بومی خمیرترش توسکان، ۷۸ مخمر را به صورت تصادفی انتخاب و شناسایی نمودند. محققین مذکور، گزارش کردند که مخمرهای *S. cerevisiae* و *Kazachstania humilis* به ترتیب در این خمیرترش غالب بودند. همچنین پس از تخمیر آرد گندم مشخص شد که هر دو جدایه مذکور دارای فعالیت فیتازی بوده و مخمر *S. cerevisiae* قادر به افزایش حجم خمیر و مخمر *K. humilis* تنها گونه قادر به افزایش غلظت اسیدهای آمینه آزاد بود. بر اساس پژوهش Motey و همکاران (۲۰۲۰) که قابلیت‌های پروبیوتیکی مخمرهای *S. cerevisiae* و *Kluyveromyces marxianus* جدا شده از غلات تخمیر شده آفریقا و برخی از محصولات لبنی را بررسی نمودند، مشخص گردید که تمامی جدایه‌های مخمری مورد آزمون، قادر به رشد در حضور نمک صفراوی بودند. علاوه بر این، میزان خود اتصالی این جدایه‌ها یک خصوصیت وابسته به نژاد، عنوان گردید که در محدوده ۸/۰۰ تا ۳۶/۲ درصد متغیر بود. بر این اساس، جدایه‌های *K. marxianus* و *S. cerevisiae* از قابلیت‌های پروبیوتیکی مناسب‌تری برخوردار بودند. Cheliah و همکاران (۲۰۲۱) ضمن ارزیابی قابلیت ضد میکروبی مخمر *Saccharomyces boulardii*

دریافتند که یک زیرگونه از مخمر *S. boulardii* بیشترین اثر ضد باکتریایی را در برابر ۱۳ عامل بیماری‌زای مختلف داشت. Sadeghi Ardestani و Kachuei (۲۰۲۲) نیز گزارش نمودند که مخمر پروبیوتیک *S. boulardii* قادر به کاهش عفونت‌زایی *Candida albicans* بود. هدف از اجرای مطالعه حاضر، بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی و قابلیت‌های ضد میکروبی مخمر غالب جدا شده از خمیرترش جو بود.

مواد و روش کار

مواد خام، محیط‌های کشت میکروبی و مواد شیمیایی

خصوصیات آرد جو مصرفی، مطابق با روش‌های استاندارد ارزیابی گردید (AACC, 2010). مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مصرفی نیز از شرکت مرک آلمان و کشت‌های لیوفیلیزه باکتری‌ها و قارچ‌های غذازاد شامل *Escherichia coli* PTCC 1399، *Salmonella enterica* PTCC 1709، *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *Listeria monocytogenes* PTCC 1298 و *Aspergillus niger* PTCC 5012 از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهیه و سپس براساس دستورالعمل‌های مرجع، فعال‌سازی شدند.

تهیه خمیرترش جو و جداسازی مخمرهای غالب

تخمیر تصادفی آرد جو از مخلوط ۱۰۰ گرم آرد و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل با بازده خمیر (نسبت خمیر به آرد ×۱۰۰) معادل ۲۰۰ در ظروف استریل صورت گرفت. سپس مخلوط مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس مقادیر pH و اسیدیته قابل تیتر آن تعیین شد. بدین منظور ۱۰ گرم نمونه با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر، رقیق شده و به کمک سود ۰/۱ نرمال تا pH معادل ۸/۵ تیتر گردید که مقدار حجم سود مصرفی بیانگر میزان اسیدیته قابل تیتر خمیرترش بود. همچنین عملیات مایه‌گیری (Back-slopping) که به معنی افزودن مقدار مشخص از خمیرترش روز قبل به خمیرترش جدید است، تا رسیدن به مقادیر pH و اسیدیته قابل تیتر ثابت ادامه یافت (Moroni *et al*., 2011; Angelov *et al*., 2005). به منظور جداسازی مخمرهای غالب خمیرترش جو پس از تکرار فرایند مایه‌گیری که سبب حفظ جمعیت غالب آن می‌شود از محیط کشت Yeast extract Glucose Chloramphenicol (YGC) و کشت سطحی سوسپانسیون خمیرترش پس از رقت‌سازی متوالی ده‌دهی بر روی این محیط کشت استفاده شد. پلیت‌های مذکور نیز به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از رنگ آمیزی کلنی‌های حاصل، مورفولوژی آنها برای تمایز اولیه مورد بررسی قرار گرفت و برای آزمون‌های بعدی کشت ذخیره

مخمرهای جدا شده جهت نگهداری در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس تهیه گردید.

بررسی قابلیت همولیز خون توسط جدایه‌های مخمری غالب

بدین منظور، جدایه‌های مخمری بر روی محیط کشت Blood agar حاوی ۵ درصد خون گوسفند، کشت داده شده و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، تغییر رنگ و ایجاد هاله در محیط کشت بررسی گردید (Fernández-Pacheco *et al*., 2021).

ارزیابی زنده‌مانی جدایه‌های مخمری در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

در این مرحله، ابتدا مخمرهای جدا شده با جمعیت 10^8 CFU/mL تحت شرایط اسیدی در محلول رینگر با pH =۲ و پپسین (۳ mg/mL) به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفته و در ادامه، نمک صفراوی با غلظت ۰/۳ درصد و پانکراتین (۱ mg/mL) در pH =۸ به آن اضافه گردید و مجدداً به مدت ۲/۵ ساعت در همان دما گرمخانه‌گذاری شد. سپس رقت‌های متوالی هر یک از سوسپانسیون‌های مذکور به صورت سطحی در محیط YGC، کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌ها شمارش شده و نرخ زنده‌مانی نسبت به نمونه شاهد (تیمار نشده) محاسبه گردید (Rolim et al., 2015).

شناسایی مولکولی جدایه غالب مخمری

DNA جدایه غالب به کمک کیت تجاری ژن‌ال (GeneAll، کره جنوبی) استخراج و توسط PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) و ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)، تکثیر شده و سپس محصولات PCR (باند ۶۵۰ جفت بازی) توسط شرکت پیشگام (ایران) توالی‌یابی گردید. پس از آماده‌سازی مقادیر واکنشگرهای تکثیر و چرخه‌های حرارتی، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنشگرهای آماده مصرف PCR (Ampliqon، دانمارک)، ۱/۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۰/۵ پیکومولار، ۲ میکرولیتر DNA با غلظت تقریبی ۱۰۰ نانوگرم و ۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه در دستگاه ترموسایکلر (Corbett، استرالیا) انجام شد. پس از ژل الکتروفورز (۴۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰) محصولات PCR در آگارز ۱/۵ درصد در بافر Tris boric acid (TBE) EDTA، به منظور شناسایی جدایه مخمری، نتایج توالی‌یابی محصولات PCR با استفاده از رویه Blast با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI همردیف گردیدند (White *et al*., 1990).

مقاومت جدایه مخمری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات آنتی‌مایکوتیک رایج

بدین منظور، مقاومت جدایه مخمری در مقابل آنتی-بیوتیک‌های رایج شامل استرپتومایسین،

سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، ونکومایسین، سفازولین، سفتریاکسون، سفالوتین، آمپی‌سیلین، ایمی‌پنم و پنی‌سیلین با استفاده از دیسک‌های آنتی-بیوتیک (پادتن طب، ایران) ارزیابی گردید. سپس مقاومت این مخمر نسبت به برخی از ترکیبات آنتی-مایکوتیک شامل ایتراکونازول، کتوکونازول، فلوکونازول و برخی نگهدارنده‌ها از جمله ناتامایسین، سوربات پتاسیم و پروپیونات کلسیم (Merck، آلمان) نیز بررسی شد. بدین منظور، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته جدایه مخمری (۱۰^۸ CFU/mL) به ۴ میلی‌لیتر محیط کشت YGC یک درصد آگار (دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد) افزوده و سپس بر روی پلیت‌های حاوی محیط ۱/۵YGC agar درصد منتقل شد. در ادامه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تجاری بر روی سطح این پلیت‌ها قرار گرفته و پلیت‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و نتیجه آزمایش به صورت مقاوم (قطر کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر)، حساسیت نسبی (قطر ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر) و حساس (قطر بیشتر از ۲۰ میلی‌متر) گزارش گردید (Rojo-Bezares *et al*., 2006; Fekri *et al*., 2020).

بررسی قابلیت خود اتصالی جدایه مخمری غالب

جهت بررسی قابلیت خود اتصالی جدایه مخمری، مقدار مشخصی از کشت فعال ۲۴ ساعته به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (یونیورسال، ایران) گردید و طی دو مرحله با بافر فسفات استریل، شستشو داده شد. سپس سوسپانسیون مذکور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، گرمخانه‌گذاری و جذب نوری این سوسپانسیون در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Instruments، انگلیس) خوانش و درصد قابلیت خوداتصالی بر اساس رابطه ذیل محاسبه گردید. در این رابطه A_t مقدار جذب ۲۴ ساعته و A_0 مقدار جذب در ساعت صفر است (Zhang *et al*., 2011).

$$[1-(A_t/A_0)]\times100$$

ارزیابی اثر ضد باکتریایی جدایه مخمری

بدین منظور، جدایه مخمری روی *L. monocytogenes*، *E. coli*، *S. enterica* و *S. aureus* با روش کشت توام بر روی محیط‌های کروموژنیک اختصاصی برای هر باکتری (CHROMagar، فرانسه) کشت داده شد. پس از تهیه کشت تازه ۲۴ ساعته از مخمر غالب و تنظیم جمعیت آن، نسبت مشخصی از مخمر (۱۰^۸ CFU/mL) مذکور با هر یک از باکتری‌های غذازاد با جمعیت یکسان (۱۰^۸ CFU/mL)، در محیط کشت Brain heart infusion (BHI) براث مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس رقت‌های متوالی از این سوسپانسیون تهیه و در محیط کشت کروموژنیک، کشت سطحی داده شده و به مدت

۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. در انتها، تعداد کلنی‌ها شمارش و با تعداد کلنی‌های نمونه شاهد که فقط حاوی باکتری بیماری‌زا بود، مقایسه گردید (Zarali *et al*., 2023).

ارزیابی اثر ضد قارچی جدایه مخمری

بدین منظور از روش کشت دو لایه استفاده شد. جدایه مخمری در محیط YGC agar با روش اسپات (لکه‌گذاری) کشت داده شد و در ادامه، سوسپانسیون اسپور قارچ غذازاد *A. niger* با جمعیت 10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر به صورت لایه دوم به همراه PDA (Potato Dextrose Agar) بر روی آنها ریخته شده و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز گرمخانه‌گذاری شدند. سپس درصد بازدارندگی از رشد قارچ به کمک نرم‌افزار *Image J* (نسخه 1.42e) تعیین شد. برای محاسبه درصد بازدارندگی از رشد قارچ، سطح رشد قارچ در پلیت کنترل (نمونه شاهد)، معادل صد در صد در نظر گرفته شد و سپس درصد رشد قارچ در پلیت حاوی مخمر در مقایسه با آن تعیین گردید. در انتها تفاوت مقادیر مذکور به عنوان درصد بازدارندگی گزارش گردید (Magnusson *et al*., 2003).

آنالیز آماری نتایج

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار، انجام شده و نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) با مقایسات زوجی حداقل اختلاف معنی‌داری LSD (Least significant difference) در سطح معنی‌داری $P<0/05$ تجزیه و تحلیل گردید. برای آنالیز آماری و ترسیم نمودارها نیز به ترتیب، نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۰ و Excel نسخه ۲۰۱۶ مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج

خصوصیات آرد و جداسازی مخمر

آرد جو مورد استفاده در این پژوهش، حاوی ۱۲/۷ درصد رطوبت، ۲/۶ درصد ساکارز، ۰/۲۵ درصد خاکستر و pH آن معادل ۳/۶ بود. پس از مایه‌گیری متوالی خمیرترش جو، میزان pH معادل با ۰/۰۰ ± ۴/۱۹ و اسیدیته قابل تیتر در روز دهم با رسیدن به ثبات، معادل ۰/۴۹ ± ۲۴/۴۵ بود. همچنین بر اساس مشاهدات مورفولوژی، ۵ مخمر متفاوت جداسازی شد که جدایه منتخب به صورت کلنی‌های بیضوی تا کشیده بود.

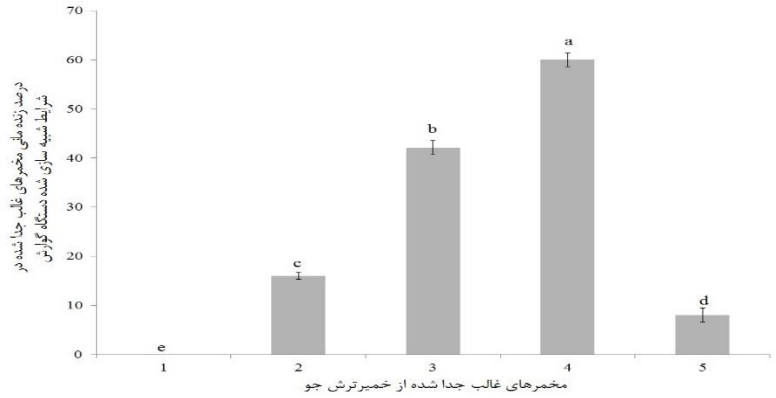
قابلیت همولیز خون توسط جدایه‌های مخمری

فعالیت همولیزی جدایه‌های مخمری در پژوهش حاضر از نوع گاما (فاقد فعالیت همولیزی) بود.

غربالگری مخمرهای جدا شده

میزان زنده‌مانی ۵ سویه مخمری جداشده از خمیرترش جو در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش در بازه ۰ تا ۶۰ درصد متغیر بود (شکل۱). زنده‌مانی مخمر منتخب جدا شده از این بستره تخمیری (جدایه شماره ۴) نیز معادل ۱/۱۴ ± ۶۰/۰۰ درصد تعیین گردید که به شکل

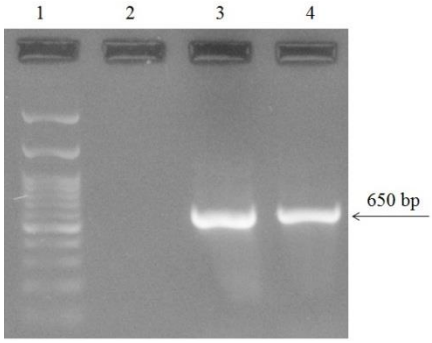
معنـی‌داری ($P<۰/۰۵$) از بیشـترین میـزان زنـده‌مـانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش در مقایسه با سایر مخمرهای جداشده برخوردار بود.



شکل۱- درصد زنده‌مانی مخمرهای غالب جدا شده از خمیرترش جو در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش. حروف متفاوت، نشان-دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P<۰/۰۵$ هستند.

شناسایی مولکولی جدایه مخمری منتخب

ژل الکتروفورز محصـولات PCR منجـر بـه تأییـد تکثیـر اختصاصی توالی هدف ۶۵۰ جفت‌بازی جدایه مخمـری در مقایسـه بـا نمونـه کنتـرل منفـی و کنتـرل مثبـت شـد (شکل۲). سرانجام بر اساس نتـایج تـوالی‌یـابی محصـولات PCR و همردیفـی آن‌هـا بـا داده‌هـای موجـود در پایگـاه اطلاعـاتی NCBI جدایـه مخمـری، *Cyberlindnera fabianii*(۹۹ درصد همپوشانی) شناسایی گردید.



شکل۲- ژل الکتروفورز محصولات PCR جهت شناسایی جدایه مخمری غالب. لاین۱: لدر۱۰۰ جفت بازی ، لاین۲: نمونه کنترل منفی، لاین۳: نمونه کنترل مثبت، لاین۴: محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن *ITS* با طول ۶۵۰ جفت باز از DNA مخمر منتخب جدا شده از خمیرترش جو.

مقاومت جدایه مخمری منتخـب نسـبت بـه آنتـی بیوتیک‌ها و آنتی‌مایکوتیک‌های رایج

جدایه مخمری منتخب در برابر تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، مقاوم بود. نتایج مقاومت آنتی‌مایکوتیکی

جدایه مخمری نیز در جدول۱ آمده است. بر این اساس، جدایه مذکور در برابر آنتی‌مایکوتیک‌های رایج مانند کتوکونازول و فلوکونازول، نیمه‌حساس و در برابر ایتراکونازول و ناتامایسین، سوربات پتاسیم و پروپیونات کلسیم، مقاوم بود.

جدول۱- مقاومت جدایه مخمری در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک و آنتی‌مایکوتیک‌های رایج بر اساس آزمون انتشار در دیسک

آنتی بیوتیک و آنتی‌مایکوتیک (میکروگرم)	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	مقاومت نسبی
پنی‌سیلین (۱۰)	۰/۰۰±۰/۰۰ ^{e}	مقاوم
سفازولین (۳۰)	۰ /۰۰ ± ۰/۰۰ ^{e}	مقاوم
سفالوتین (۳۰)	۰ /۰۰ ± ۰/۰۰ ^{e}	مقاوم
سفتریاکسون (۳۰)	۰ /۰۰ ± ۰/۰۰ ^{e}	مقاوم
ایمی‌پنم (۱۰)	۰ /۰۰ ± ۰/۰۰ ^{e}	مقاوم
استرپتومایسین (۱۰)	۰ /۰۰ ± ۰/۰۰ ^{e}	مقاوم
اسید نالیدیکسیک (۳۰)	۰ /۰۰ ± ۰/۰۰ ^{e}	مقاوم
جنتامایسین (۱۰)	۰ /۰۰ ± ۰/۰۰ ^{e}	مقاوم
ونکومایسین (۳۰)	۰ /۰۰ ± ۰/۰۰ ^{e}	مقاوم
ایتراکونازول (۱۰)	۵/۸۰ ± ۰/۲۸ ^{d}	مقاوم
فلوکونازول (۱۵)	۱۷/۰۰ ± ۲/۵۳ ^{a}	حساسیت نسبی
کتوکونازول (۲۰)	۱۴/۵۷ ± ۶/۱۸ ^{b}	حساسیت نسبی
سوربات پتاسیم (۶۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{e}	مقاوم
پروپیونات کلسیم (۶۰)	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{e}	مقاوم
ناتامایسین (۳۰)	۸/۷۵ ± ۰/۹۱ ^{c}	مقاوم

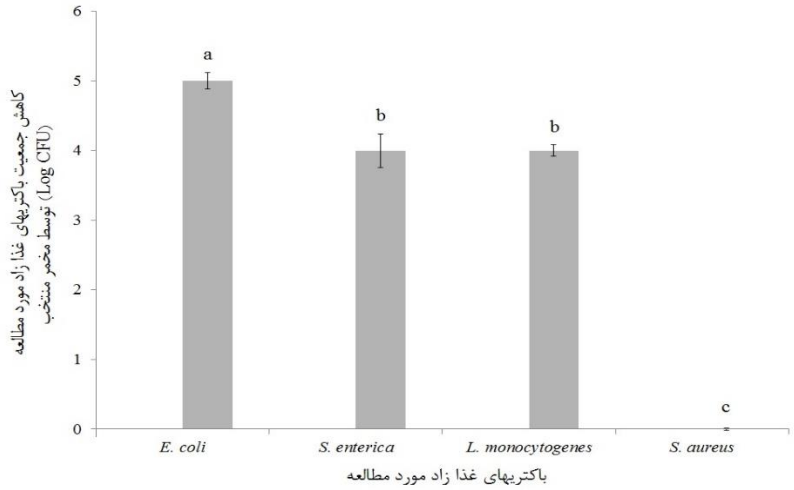
حروف متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P<۰/۰۵$ هستند.

قابلیت خود اتصالی جدایه مخمری منتخب

میزان قابلیت خود اتصالی جدایه منتخب معادل ۱/۴۱ ±۰۰/۴۰ درصد بود.

قابلیت ضد باکتریایی جدایه مخمری منتخب

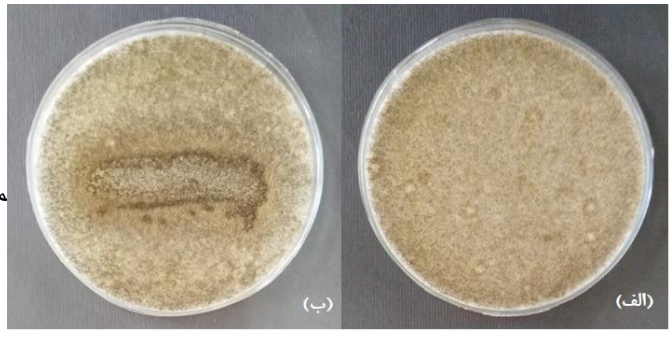
جدایه مخمری منتخب قادر به کاهش ۵ سیکل لگاریتمی از جمعیت باکتری *E. coli* در مقایسه با نمونه شاهد بود. علاوه بر این، جدایه منتخب توانست رشد باکتری‌های بیماری‌زای *S. enterica* و *L. monocytogenes* را نیز تا ۴ سیکل لگاریتمی کاهش دهد درصورتی‌که تأثیر معنی-داری بر باکتری *S. aureus* نداشت (شکل۳). بر این اساس، بازدارندگی مخمر منتخب روی *E. coli* به شکل معنی‌داری ($P<0/05$) از سایر باکتری‌های مورد مطالعه بیشتر بود.



شکل۳- اثر بازدارنده مخمر منتخب جدا شده از خمیرترش جو روی برخی از باکتری‌های غذازاد. حروف متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0/05$ هستند.

اثر ضد قارچی جدایه مخمری منتخب

اثر ضد قارچی جدایه مخمری روی *A. niger* بر اساس نتایج آزمون کشت دو لایه (شکل۴) نشان داد که میزان بازدارندگی از رشد این قارچ در مقایسه با نمونه شاهد ۰/۷۷ ± ۲۸/۶۷ درصد بود.



شکل۴- اثر ضد قارچی جدایه مخمری پس از پنج روز گرمخانه‌گذاری در آزمون کشت دو لایه روی *A. niger* (ب) در مقایسه با نمونه شاهد (الف).

بحث

بر اساس نتایج حاصل از توالی‌یابی، *C. fabianii* به عنوان مخمر منتخب خمیرترش جو شناسایی شد. Johansson و همکاران (۲۰۲۱) نیز با هدف جداسازی مخمر از خمیرترش‌های مختلف، ۵۶ مخمر از ۱۰ گونه را شناسایی نمودند. در پژوهش مذکور، مخمر *C. fabianii* از خمیرترش چاودار جداسازی شد. جدایه‌های غالب خمیرترش معمولاً به واسطه رقابت‌پذیری و تطابق‌پذیری بالا در شرایط تنش‌زای موجود در این اکوسیستم تخمیری از قابلیت‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مناسبی برخوردار هستند (Sadeghi *et al.*, 2023).

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون زنده‌مانی، میزان زنده‌مانی جدایه مخمری منتخب معادل با ۱/۱۴ ± ۶۰/۰۰ درصد ارزیابی گردید که بالاترین میزان زنده‌مانی را در مقایسه با سایر مخمرهای جدا شده داشت. تا کنون، مطالعاتی در رابطه با بررسی میزان زنده‌مانی مخمرهای عمده جدا شده از غلات و شبه غلات تخمیر شده در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش صورت گرفته است. به عنوان مثال، Gebre و همکاران (۲۰۲۳) ضمن بررسی میزان زنده-مانی مخمرهای موجود در نوعی بستره تخمیری با نام بورده (Borde) گزارش کردند که ۱۳ جدایه مخمری از مقاومت بالایی در شرایط اسیدی معده برخوردار بودند. بیشترین زنده‌مانی در شرایط اسیدی مربوط به مخمر AM18 با ۹۵/۷۷ درصد بود. در ادامه، مقاومت مخمرها نسبت به آنزیم پپسین، نمک‌های صفراوی و پانکراتین نیز مورد آزمون قرار گرفت که تمامی مخمرهای مورد آزمون ۸۹/۴۵-۸۷/۱۴ درصد زنده-مانی داشتند. مقاومت عوامل پروبیوتیک در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش به دلیل مصرف خوراکی آنها، حائز اهمیت می‌باشد. بنابر این، مقاومت به شرایط اسیدی معده یکی از عوامل اساسی در انتخاب پروبیوتیک‌ها می‌باشد. Cheliah و همکاران (۲۰۲۱) به منظور ارزیابی قابلیت زنده‌مانی ۶ زیرگونه از مخمر *S. boulardii* در pH=1 گزارش نمودند که هیچ‌گونه زنده‌مانی مشاهده نشد. درحالی‌که در pH=2 تا pH=7 تمامی مخمرها زنده باقی ماندند. به دلیل مقاومت مناسب سویه‌های مخمری نسبت به pH دستگاه گوارش از آنها در تولید داروها استفاده می‌شود. علاوه بر این، در شرایطی که هدف، تولید محصول غذایی خاصی با pH های قلیایی یا اسیدی

باشد نیز می‌توان از جدایه‌های مخمری استفاده نمود. بیان ژن‌های مربوط به سنتز پروتئین‌ها و پاسخ به تنش می‌تواند موجب زنده‌مانی بیشتر مخمر *S. boulardii* در pH اسیدی شوند. از جمله آنزیم‌های اساسی میکروبی مؤثر در زنده‌مانی مناسب مخمرهای پروبیوتیک می‌توان به هیدرولاز نمک صفراوی و اسید دهیدراتاز صفراوی اشاره نمود که با فعالیت خود سبب هیدرولیز نمک صفراوی و در ادامه باعث کاهش اثرات بازدارنده نمک صفراوی می‌گردند. علاوه بر این، برخی از پروبیوتیک‌ها به واسطه خنثی‌سازی اسید موجب کاهش pH می‌شوند و بدین طریق با شرایط اسیدی معده مقابله می‌کنند (Montville and Matthews, 2012). همچنین Ogunremi و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که مخمر *P. kudriavzevii* زنده‌مانی مناسبی در نوعی مخلوط غلات تخمیری داشت و pH را از ۶/۰۱ به ۵/۰۸ کاهش داد. دلایل گوناگونی در رابطه با زنده‌مانی مخمرهای پروبیوتیک در محصولات غذایی عملگرا بر پایه غلات وجود دارد. به عنوان مثال، پایداری در طول تغییرات فرآیند تولید ماده غذایی از جمله غلظت‌های مختلف نمک، فعالیت اکسیژن و pH که در ادامه می‌تواند اثرات مثبتی بر خصوصیات حسی محصول نیز داشته باشد.

هیچ‌یک از جدایه‌های مخمری در پژوهش حاضر فعالیت همولیتیک نداشتند. بر اساس استانداردهای FAO و WHO نیز یکی از اصول اساسی برای ارزیابی قابلیت‌های پروبیوتیکی، عدم همولیز خون و ایمنی جدایه‌هاست (Gebre *et al*., 2023). Fernández-Pacheco و همکاران (۲۰۲۱) گزارش نمودند که هیچ کدام از ۲۰ مخمر مورد آزمون، دارای فعالیت همولیتیکی در محیط خون‌دار پس از ۴۸ ساعت نبودند. در مخمرها فاکتور همولیتیک به‌عنوان یک عامل حدت احتمالی شناخته شده است که سبب بیماری‌زایی در گونه *Candida* می‌شود.

مطابق با نتایج حاصل از تعیین اثر ضد میکروبی، جدایه مخمری منتخب موجب کاهش ۵ سیکل لگاریتمی از جمعیت باکتری *E. coli* نسبت به نمونه شاهد گردید. همچنین جدایه مذکور، قادر به کاهش جمعیت باکتری‌های بیماری‌زای *S. enterica* و *L. monocytogenes* تا ۴ سیکل لگاریتمی نیز بود در صورتی که تأثیر معنی‌داری بر باکتری *S. aureus* نداشت. فعالیت ضد میکروبی ناشی از تولید پپتیدها و اسیدهای آلی در مخمرها نقش کلیدی در خصوصیات پروبیوتیکی آن‌ها دارد. اثر بازدارندگی بر باکتری‌ها توسط مخمرها بستگی به رقابت بر سر مواد مغذی، تولید اتانول و اسیدهای آلی و یا آزاد شدن محتوای ضد میکروبی مانند مایکوسین‌ها دارد (Sadeghi et al., 2022). Alkay و همکاران (۲۰۲۱) ضمن بررسی اثر ضد میکروبی مخمرهای جدا شده از نوعی بستره تخمیری گزارش نمودند که هیچ‌کدام از مخمرها فعالیت مهارکنندگی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا نداشتند. بر این اساس، اثر پروبیوتیکی مخمرها علیه

عوامل بیماری‌زا ممکن است با مکانیسم‌های مربوط به حذف فیزیکی باکتری‌های بیماری‌زا مرتبط باشد. علاوه براین، Cheliah و همکاران (۲۰۲۱) گزارش نمودند که *S. boulardii* نسبت به ۹ عامل بیماری‌زای *Enterococcus faecalis*، *Salmonella typhi*، *Shigella dysenteriae*، *Vibrio cholerae*، *Shigella flexneri* حساس بوده در حالی‌که رومانند فاقد سلول این مخمر حساسیت کمتری نسبت به تمامی عوامل بیماری‌زا داشت. *S. boulardii* با دو مکانیسم اصلی تولید عواملی که خنثی‌کننده سموم باکتریایی هستند و تحریک مسیرهای مرتبط با کوئوروم سنسینگ سلول میزبان در پاسخ‌های پیش‌التهابی در طول عفونت‌های باکتریایی عمل می‌کند. همچنین Alkalbani و همکاران (۲۰۲۲) گزارش نمودند که مخمر *P. kudriavzevii* با تولید نوعی توکسین کشنده از رشد عوامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کند. در مطالعه مذکور جنس‌های مختلف مخمری، سطوح بازدارندگی متفاوتی در برابر *Salmonella typhimurium*، *E. coli*، *S. aureus* و *L. monocytogenes* داشتند.

مطالعات صورت گرفته در رابطه با میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و آنتی‌مایکوتیکی جدایه‌های مخمری حاکی از مقاومت کامل آنها در مقابل هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها و سطوح متفاوت حساسیت در برابر عوامل آنتی‌مایکوتیک است. براساس پژوهش Gebre و همکاران (۲۰۲۳) جدایه‌های مخمری مورد آزمون نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های رایج، مقاوم بودند. بنابر این، می‌توانند درمان‌های آنتی‌بیوتیکی طی بیماری را تحمل کنند. همچنین استفاده از مخمرها در درمان‌های آنتی‌بیوتیکی، ایمن تلقی می‌شود زیرا آن‌ها توانایی انتقال مواد ژنتیکی بین مخمرها و باکتری‌ها را ندارند. بنابر این، هنگام انتخاب یک پروبیوتیک، حساسیت آن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک عامل کلیدی است. Cheliah و همکاران (۲۰۲۱) نیز ضمن ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۶ مخمر مورد بررسی در برابر ۳۰ آنتی‌بیوتیک رایج دریافتند که هر کدام از مخمرها ضمن داشتن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمون از نحوه عمل متفاوتی برخوردار بودند. از جمله مکانیسم‌های مؤثر در مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توان به بازدارندگی سنتز دیواره سلولی، پروتئین و اسید نوکلئیک اشاره کرد. Fernández-Pacheco و همکاران (۲۰۲۱) نیز پس از بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مخمرهای جداشده از نوعی بستره تخمیری در مقابل چند آنتی‌بیوتیک رایج دریافتند که مخمرهای مذکور، نسبت‌به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند درحالی‌که جنس‌های غیر *Saccharomyces* در برابر عوامل آنتی‌مایکوتیکی، نیستاتین و سیکلوپیروکس اولامین بیشترین مقاومت و کوچکترین هاله بازدارندگی را داشته اما سویه‌های *Saccharomyces* بیشترین مقاومت را نسبت به فلوکونازول و کلوتریمازول داشتند. Goktas و

همکاران (۲۰۲۱) گزارش نمودند که میزان حساسیت مخمرها نسبت به عوامل ضد قارچی متفاوت می‌باشد و مخمرهای جدا شده توسط پژوهشگران مذکور، بیشترین حساسیت را نسبت به فلوکونازول و کتوکونازول داشتند. همچنین از بین مخمرهای جدا شده در پژوهش مذکور، بیشترین مقاومت دارویی نسبت به آمفوتریسین B وجود داشت. از جمله مکانیسم‌های مخمرها برای مقاومت در برابر آنتی-بیوتیک‌ها می‌توان به تغییر یا اصلاح نفوذپذیری غشاء سلول، بازدارندگی سنتز پروتئین‌های میتوکندریایی، جهش و کاهش فعالیت‌های تجزیه ATP اشاره کرد. مقاومت در برابر آنتی‌مایکوتیک‌ها نیز ممکن است ناشی از ممانعت از سنتز استرول‌ها و صدمات مستقیم غشایی، بازدارندگی سنتز RNA و DNA سلولی، فعالیت پمپ افلاکس (سیستم انتشار یون‌ها و یا نحوه انتقال آنها)، تغییر جایگاه هدف ترکیب آنتی-مایکوتیک، تحریک سیستم پمپ پروتونی در غشاء سلول و یا تداخل در فرایند بیان ژن باشد (Kanafani and Perfect, 2014; Goretti *et al*., 2009).

نتایج به دست آمده از آزمون خوداتصالی نیز بیانگر قابلیت خوداتصالی ۱/۴۱ ± ۴۰/۰۰ درصد جدایه مخمری منتخب بود. قابلیت خوداتصالی در مخمرها نیز توسط محققین مختلفی مورد بررسی قرار گرفته - است. به عنوان مثال، Gebre و همکاران (۲۰۲۳) گزارش نمودند که پدیده خوداتصالی جدایه‌های مخمری به دلیل برهمکنش و تعامل آنها با ترکیبات مختلف سطح سلول‌های روده مانند پروتئین‌ها می-باشد که از طریق ارزیابی قابلیت خوداتصالی تعیین می‌گردد. نتایج این پژوهشگران بیانگر میزان ۶۹/۳۶ تا ۸۹/۳۹ درصد خوداتصالی برای جدایه‌های مخمری مورد آزمون پس از ۲۴ ساعت بود. ویژگی خوداتصالی کاملاً وابسته به طول زمان گرمخانه‌گذاری می‌باشد و در طول زمان‌های مختلف، تغییرات مشخصی دارد که به‌دلیل خوشه‌ای شدن و اتصال سلول‌ها از طریق برهمکنش‌های سلول به سلول می‌باشد. همچنین Cheliah و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که یک زیرگونه از مخمر *S. boulardii* با کد KT000032 بیشترین میزان خوداتصالی تا ۹۳/۱۴ درصد را پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری داشت. علاوه بر این، قابلیت خود اتصالی تمامی ۱۲ سویه مخمری در پژوهش Alkalbani و همکاران (۲۰۲۲) نیز پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد از ۵۰/۷۰ تا ۸۵/۸۰ درصد گزارش شد. قابلیت اتصال در پروبیوتیک‌ها به دو صورت خود اتصالی (اتصال سویه‌های میکروارگانیسم‌های هم نوع) و دگر اتصالی (اتصال میکروارگانیسم‌های متفاوت) مورد بررسی قرار می‌گیرد. به طور کلی، اتصال پروبیوتیک‌های هم نوع، سبب مسدود شدن جایگاه اتصال عوامل بیماری‌زا شده و عموماً موجب بهبود اتصال آنها به سلول‌های

اپی‌تلیال روده، لانه‌گزینی و محافظت از دستگاه گوارش می‌شود (Janković *et al*., 2012; Sadeghi *et al*., 2022). خوداتصالی در مخمرها به دنبال کاهش کربوهیدرات‌ها در طی فاز سکون یا تأخیر رشد آنها رخ می‌دهد. اندازه سلول‌های مخمری از باکتری‌ها بزرگ‌تر و سنگین‌تر بوده و بنابر این، نقش پررنگ‌تری در لانه‌گزینی دارند. اگرچه این خصوصیت کاملاً وابسته به جنس، گونه و نژاد آنها بوده و به برخی عوامل مانند خصوصیات فیزیکوشیمیایی و درشت-مولکول‌های سطح سلول، ترکیبات مختلف دیواره سلولی، حضور Ca^{2+} و مانوز در محیط نیز بستگی دارد (Gil-Rodriguez *et al*., 2015).

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، اثر بازدارنده جدایه مخمری بر *A. niger* مورد تأیید قرار گرفت. بر اساس پژوهش‌های موجود، مخمر *S. boulardii* کاهنده تجمع قارچی مانند *C. albicans* در دستگاه گوارش محسوب می‌شود. مخمر پروبیوتیک *S. boulardii* از عفونت‌های حاصل از *C. albicans* در کبد، کلیه، خون و سلول‌های لنفاوی جلوگیری می‌کند. امروزه، داروهای ضد قارچی شامل نیستاتین، آمفوتریسین B، فلوکونازول، ایتراکونازول و وریکونازول به شکل مرسوم جهت درمان کاندیداسیس استفاده می‌شوند. با این وجود، اثرات نامطلوب این داروها و ظهور نژادهای مقاوم به دارو، نیاز به توسعه درمان‌های جایگزین را برجسته‌تر می‌کند. در این رابطه، استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد درمانی جایگزین مطلوب در نظر گرفته شود (Sadeghi Ardestani and Kachuei, 2022). Goktas و همکاران (۲۰۲۱) ضمن ارزیابی اثر ضد قارچی مخمرهای جدا شده از یک بستره تخمیری در برابر *Aspergillus flavus*، *A. niger*، *Penicillium expansum*، *Penicillium carneum* و *Penicillium roqueforti* مشخص نمودند که مخمرها اثرات ضد قارچی گوناگونی در برابر کپک‌های مختلف دارند. به طوری‌که بیشترین و کمترین اثر ضد قارچی در برابر *Penicillium rubens* و *P. roqueforti* از ۴/۰۳ تا۷۷/۰۳ درصد گزارش شد. بر اساس نتایج پژوهش Fakruddin و همکاران (۲۰۱۷) مشخص گردید که مخمر *S. cerevisiae* فعالیت ضد قارچی مناسبی در برابر *Aspergillus astus*، *A. niger* و *Aspergillus ocrasus*، *Pichia cryzogenum* و *Rhizzopus oryzae* داشت که بیشترین اثر بازدارنده آن بر روی *A. niger* و کمترین اثر بر *A. astus* مشاهده شد. از جمله ساز و کارهای دخیل در قابلیت ضد قارچی مخمرها می‌توان به تولید متابولیت‌هایی مانند دی‌اکسید کربن، اتانول، ترکیبات پروتئینی یا پپتیدهای با وزن مولکولی پایین اشاره نمود (Ruggirello *et al*., 2019; Kapetanakou *et al*., 2012).

نتیجه‌گیری

بررسی فلور میکروبی غلات و شبه‌غلات تخمیر شده به دلیل وجود نژادهای مخمری با قابلیت‌های مطلوب،

همواره جالب‌توجه بوده است. لذا جداسازی فلور میکروبی جدید از چنین زیست‌بوم‌هایی توجه محققین را به‌خود معطوف نموده است. در مطالعه حاضر، مخمر *C. fabianii* با میزان زنده‌مانی مطلوب در تیمار شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش، عدم همولیز خون و قابلیت خوداتصالی مناسب انتخاب گردید. مخمر مذکور، اثر ضد باکتریایی قابل توجهی در برابر سه عامل بیماری‌زای غذازاد داشته و از فعالیت ضد قارچی مناسبی در برابر *A. niger* نیز برخوردار بود. با تأیید ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرها امکان استفاده از آنها در تولید محصولات تخمیری غذایی و غیر غذایی سلامتی‌بخش فراهم می‌گردد. بر اساس این نتایج، می‌توان از مخمر مذکور به عنوان کشت پروبیوتیک و یا محافظت کننده در صنایع غذایی نیز استفاده نمود.

منابع

AACC International. 2010. Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. The St. Paul.

Alkalbani N. S., Osaili T. M., Al-Nabulsi A. A., Obaid R. S., Olaimat A. N., Liu S. Q., Ayyash M. M. 2022. *In vitro* characterization and identification of potential probiotic yeasts isolated from fermented dairy and non-dairy food products. J Fungi. 8(5): 544.

Alkay Z., Dertli E., Durak M. Z. 2021. Investigation of probiotic potential of yeasts isolated from sourdoughs from different regions of Turkey. Acta Aliment. 50(4): 610-619.

Angelov A., Gotcheva V., Hristozova T., Gargova S. 2005. Application of pure and mixed probiotic lactic acid bacteria and yeast cultures for oat fermentation. J Sci Food Agr. 85(12): 2134–2141.

Arroyo López F. N., Romero Gil V., Bautista Gallego J., Rodriguez Gomez F., Jimenez Diaz R., García García P., Garrido Fernandez A. 2012. Potential benefits of the application of yeast starters in table olive processing. Front Microbiol. 3: 161.

Bevilacqua A., Corbo M. R., Sinigaglia M. 2012. Selection of yeasts as starter cultures for table olives: a step-by-step procedure. Front Microbiol. 3: 1-9.

Chelliah R., Kim E. J., Daliri E. B. M., Antony U., Oh D. H. 2021. *In vitro* probiotic evaluation of *Saccharomyces boulardii* with antimicrobial spectrum in a *Caenorhabditis elegans* model. Foods. 10(6): 1428.

Fakruddin M. D., Nur Hossain M. D., Ahmed M. M. 2017. Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic, BMC Complement Altern Med. 17(1): 1-11.

Fekri A., Torbati M. A., Yari Khosrowshahi A., Bagherpour Shamlood H., 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 Chem. 306: 125620.

Fernández-Pacheco P., Ramos Monge I. M., Fernández-González M., Poveda Colado J. M., Arévalo Villena M. 2021. Safety evaluation of yeasts with probiotic potential. Frontiers Nutr. 8: 659328.

Gebre T. S., Emire S. A., Chelliah R., Aloo S. O., Oh D. H. 2023. Isolation, functional activity, and safety of probiotics from Ethiopian traditional cereal-based fermented beverage,"Borde". LWT-Food Sci Technol. 184:115076.

Gil-Rodriguez A. M., Carrascosa A. V., Requena T. 2015. Yeasts in foods and beverages: *In vitro* characterisation of probiotic traits. LWT-Food Sci Technol. 64(2): 1156-1162.

Goktas H., Dikmen H., Demirbas F., Sagdic O., Dertli E. 2021. Characterisation of probiotic properties of yeast strains isolated from kefir samples. Int J Dairy Technol. 74(4): 715-722.

Goretti M., Turchetti B., Buratta M., Branda E., Corazzi l., Vaughan-Martini A., Buzzini P. 2009. *In vitro* antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts. Int J Food Microbiol. 131(2-3): 178–182.

Greppi A., Saubade F., Botta C., Humblot C., Guyot J.P., Cocolin L. 2017. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. Food Microbiol. 62: 169-177.

Janković T., Frece J., Abram M., Gobin I. 2012. Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Int J Sanitary Eng Res. 6(1): 19-24.

Johansson L., Nikulin J., Juvonen R., Krogerus K., Magalhães F., Mikkelson A., ... Gibson, B. 2021. Sourdough cultures as reservoirs of maltose-negative yeasts for low-alcohol beer brewing. Food Microbiol. 94:103629.

Kanafani Z. A., Perfect j. R. 2014. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. Clini Infect Dis. 46(1): 120-128.

Kapetanakou A. E., Kollias J. N., Drosinos E. H., 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. Int J Food Microbiol. 152(3): 91–99.

Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J., Schnürer J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett. 219(1): 129-135.

Mogmenga I., Somda M. K., Ouattara C. A. T., Keita I., Dabiré Y., Diguță C. F., ... Matei F. 2023. Promising probiotic properties of the yeasts isolated from Rabilé, a traditionally fermented beer produced in Burkina Faso. Microorganisms. 11(3): 802.

Montville T. J., Matthews K. R. 2012. Physiology, growth, and inhibition of microbes in foods. Food Microbiol. Fundamentals and Frontiers: pp. 1-18.

Moroni A., Arendt E., Dal Bello F. 2011. Biodiversity of lactic acid bacteria and yeast in spontaneously fermented buckwheat and teff sourdough. Food Microbiol. 28(3): 497-502.

Moslehi Jenabian S., Lindegaard L., Jespersen L. 2010. Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. Nutrient. 2(4): 449-473.

Motey G. A., Johansen P. G., Owusu-Kwarteng J., Ofori L. A., Obiri-Danso K., Siegumfeldt H., ... 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): 403-12.

Ogunremi O. R., Agrawal R., Sanni A. 2020. Production and characterization of volatile compounds and phytase from potentially probiotic yeasts isolated from traditional fermented cereal foods in Nigeria. J Genet Eng Biotechnol. 18: 1-8.

Ogunremi O. R., Sanni A. I., Agrawal, R. 2015. Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal based Nigerian traditional fermented food products. J Appl Microbiol. 119(3): 97-808.

Palla M., Agnolucci M., Calzone A., Giovannetti M., Di Cagno R., Gobbetti M., Rizzello C. G., Pontonio E. 2019. Exploitation of autochthonous Tuscan sourdough yeasts as potential starters. Int J Food Microbiol. 302: 59-68.

Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Poeta P., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. 2006. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. Int J Food Microbiol. 111(3): 234-240.

Rolim F. R. L., dos Santos K. M. O., de Barcelos S. C., do Egito A. S., Ribeiro T. S., 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 Sci Technol.63(2): 807-813.

Ruggirello M., Nucera D., Cannoni M., Peraino A., Rosso F., Fontana M., Cocolin L., Dolc P. 2019. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. Food Res Int. 115: 519-525.

Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J. M., Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. LWT-Food Sci Technol. 50(1): 1-16.

Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol. 84(3):197-215.

Sadeghi A., Ebrahimi M., Hajinia F., Kharazmi M. S., Jafari S. M. 2023. FoodOmics as a promising strategy to study the effects of sourdough on human health and nutrition, as well as product quality and safety; Back to the future. Trends Food Sci Tech. 136(11): 24-47.

Sadeghi A., Ebrahimi M., Shahryari S., Kharazmi M. S., Jafari S. M. 2022. Food applications of probiotic yeasts; focusing on their techno-functional, postbiotic and protective capabilities. Trends Food Sci Tech. 128: 278-295.

Sadeghi Ardestani Z., Kachuei R. 2022. Assessment of antifungal activity of Saccharomyces *boulardii* against *Candida albicans* biofilm. Infect Epidemiol Microbiol. 8(3): 243-249.

Shahryari S., Sadeghi A., Ebrahimi M., Sadeghi Mahoonak A., Moayedi A. 2022. Evaluation of probiotic and antifungal properties of the yeast isolated from buckwheat sourdough. Iranian Food Sci Technol Res J. 18(5): 575-588.

Tadesse T., Yimer D., Tibebu T., Workie M., Kebede B., Abera S., ... Abena T. 2021. Evaluating the probiotic potential of yeasts isolated from Ethiopian traditionally fermented foods and dairy products. Int J Sci Res Updat. 1(1):1-10.

White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. T., 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.

Zarali M., Sadeghi A., Jafari S. M., Ebrahimi M., Mahoonak A. S. 2023. Enhanced viability and improved *in situ* antibacterial activity of the probiotic LAB microencapsulated layer-by-layer in alginate beads coated with nisin. Food Bioscience. 53: 102593.

Zhang Y., Zhang L., Du M., Yi H., Guo C., Tuo Y. 2011. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild *lactobacilli* from fermented food. Microbiol Res. 167(1): 27-31.

Evaluation of probiotic and antimicrobial properties of the predominant yeast isolated from barley sourdough

Shahryari, S.[1], Hajinia, F.[1], Purabdolah, H.[1], Ebrahimi, M.[2], Sadeghi, A.[1]*

1. Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Food, Drug & Natural Products Health Research Center, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran
*Corresponding author: Sadeghi.gau@gmail.com

Abstract
It is very important to evaluate the probiotic and antimicrobial properties of yeasts isolated from fermented cereals in order to prepare starter, probiotic or functional cultures. Therefore, the present study was conducted with the aim of investigating the probiotic and antimicrobial properties of the predominant yeast isolated from barley sourdough. For this purpose, the yeast with the highest survival in the simulated conditions of the gastrointestinal tract among the predominant yeasts isolated from barley sourdough was identified using PCR technique. Then, other probiotic properties and antimicrobial effects of the selected yeast isolate were investigated. Sequencing results of the PCR products led to the identification of *Cyberlindnera fabianii* as the selected yeast isolate. Furthermore, the survival rate of the yeast isolate after continuous acid and bile treatment was equal to 60% compared to the control sample. In addition, the yeast isolate was able to reduce 5 Log of *Escherichia coli* population, which was significantly (p<0.05) higher than those of the other studied foodborne bacteria. The isolate was also able to reduce the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* up to 4 Log, but it did not have an obvious inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*. The auto-aggregation ability of the isolate was about 40%. The isolated yeast was also resistant to all of the investigated antibiotics and relatively sensitive to ketoconazole and fluconazole antimycotic agents. The isolate had no hemolytic activity, and its antifungal activity against *Aspergillus niger* was also verified. In conclusion, the selected isolated yeast (*C. fabianii*) has a potential to be used as a probiotic and protective culture in fermentation industries.

Keywords: Probiotic yeasts, Barley sourdough, Antimicrobial effect, Protective culture.

Conflict of interest: None declared