ارزیابی بقاء و خاصیت آنتی‌اکسیدانی زایگوساکارومایسس بیسپوریس (Zygosaccharomyces bisporus KEK 11) و پیکیا اوکسیدنتالیس(Pichia occidentalis KEK 10) جدا شده از کامبوجا

سمیرا عیسی زاده رازلیقی[۱]، مرتضی خمیری*[۲]، سید محمد هادی رضوی نیکو[۳]، علی مویدی[۲]، عبدالله اردبیلی ، محمد قربانی[۲]، اسماعیل محمودی[٤]

چکیده

برخی از مخمرها مانند زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس هنوز برای تعیین ویژگی‌های کاربردی و نحوه استفاده در صنایع غذایی و دارویی نیازمند مطالعه بیشتر هستند. هدف از این مطالعه بررسی خواص کاربردی و آنتی‌اکسیدانی زایگوساکارومایسس بیسپوریس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس جداشده از کامبوجا می‌باشد. مواد و روش: برای این منظور ظرفیت آنتی اکسیدانی توسط روش رادیکال ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و خواص کاربردی (زنده مانی تحت شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش، آبگریزی، تجمع خود به خودی و خواص ضد میکروبی در برابر باکترهای پاتوژن غذا زاد مانند استافیلوکوکوس اورئوس(Staphylococcus aureus)، یرسینیا اینتروکولیتیکا (Yersiniaenterocolitica)، باسیلوس سرئوس (Bacillus cereus) و اشریشیا اکلای (E.coli)) به روش لکه گزاری) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاص از این پژوهش نشان می‌دهد که زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس به ترتیب دارای فعالیت آنتی اسیدانی در سطح عالی در حدود ٦٧/٦٧ و ٦٩/١٨ درصد، ظرفیت تجمع خود به خود حدود ٩٢/٤٤ و ٨٧/٣٠ درصد پس از ٢٤ ساعت و فعالیت آبگریزی بالایی نسبت به زایلین در حدود ٨٧/٥١ و ٨٦/١٢٧ درصد می‌باشد. همچنین درصد زنده‌مانی این جدایه‌ها تحت شرایط مشابه معده به ترتیب حدود ٨٧/٥٤ و ٨٨/٨٧ درصد و تحت شرایط مشابه پانکراتیک ٩٧/٠٩ و ٩٤/٤٠ درصد بوده است. زایگوساکارومایسس بیسپوریس مورد مطالعه در این آزمون در برابر یرسینیا اینتروکولیتیکا دارای فعالیت ضد میکروبی بوده اما هیچ فعالیتی علیه مابقی میکروارگانیسم‌های مورد آزمون نشان نداده است. با توجه به نتایج نشان داد از این سویه‌های مخمری که دارای پتانسیل لازم جهت استفاده به عنوان منبع طبیعی آنتی اکسیدان و مکمل پروبیوتیکی هستند که می‌توان پس از انجام آزمون‌های تکمیلی در تولید محصولات غذایی و دارویی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: مخمر های کامبوجا، زایگوساکارومایسس بیسپوریس، پیکیا اوکسیدنتالیس، فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی

تاریخ دریافت: ١٣٩٩/٤/١٦ تاریخ پذیرش: ١٣٩٩/٧/٢٠

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای با پتانسیل زنده-مانی تحت شرایط اسید معده و صفرا (حتی دارای قابلیت رشد در شرایط صفراوی) هستند و همچنین در صورت مصرف در مقادیر کافی دارای تاثیرات مفیدی بر سلامت مصرف کننده می‌باشند و باعث توازن میکروبیوتای روده می‌شوند (۱)، در دهه‌های اخیر با توجه به افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها و صدمات جبران ناپذیر مصرف بی‌رویه آن‌ها، مطالعات بر روی پروبیوتیک‌ها و متابولیت‌هایشان رو به افزایش است (۲)- اثرات درمانی و مفید پروبیوتیک‌ها در انسان و حیوانات مربوط به مکانیسم‌های گوناگون برای مثال تولید ترکیبات ضد میکروبی، پرکردن جایگاه‌های اتصال روده و تقویت سیستم ایمنی است (۳).

در مطالعات و طراحی محصولات پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک و بیفیدوباکتریوم‌ها، مخمرها و باسیلوس‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (٤). مخمرها از میکروارگانیسم‌های غالب در محصولات تخمیری هستند

۱- دانشجوی دکتری ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده صنایع غذایی، گروه میکروبیولوژی مواد غذایی

*۲- عضو هیات علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده صنایع غذایی، گروه میکروبیولوژی مواد غذایی khomeiri@gau.ac.ir

۳- عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گروه میکروبیولوژی

٤- عضو هیات علمی دانشگاه آزاد خوراسگان اصفهان، بیماری شناسی گیاهی

که برای تولید نان، انواع زیادی از محصولات صنعتی و نوشیدنی‌های الکلی، عصاره مالت،در دامپروری بع عنوان خوراک دام و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین مخمرها با توجه به سرعت رشد بالا، تولید زیست توده فراوان، سهولت دستکاری متابولیسم سلولی با استفاده از تکنیک‌های ژنتیکی، سهولت جدا کردن و مقاومت به آنتی-بیوتیک‌ها و عدم انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک به سایر میکروارگانیسم‌ها در بین میکروارگانیسم‌های صنعتی کاربرد زیادی دارد (۵).

امروزه مطالعات متعددی به منظور درک اثرات مفید و مکانیسم های اثر مخمرها منتشر شده است (۵). اما خواص پروبیوتیکی مخمرها به طور محدودی مورد مطالعه قرار گرفته است و در بیشتر مطالعات انجام شده ساکارومایسس سرویزیه مورد برسی قرار گرفته است (٦). ساکارومایسس بولاردی از لحاظ ژنتیکی نزدیک به ساکارومایسس سرویزیه ولی از لحاظ متابولیکی متفاوت با آن است و تنها مخمر پروبیوتیکی است که برای درمان بیماری‌های گوارشی در فرمولاسیون‌های تجاری به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷). علاوه بر ساکارومایسس سرویزیه مخمرهای کلیورومایسس، دباریو مایسس، پیکیا و کاندیدا خواص پروبیوتیکی نشان داده‌اند. تلاش برای تعیین مخمرهای با پتانسیل پروبیوتیک برای کاربرد در صنایع غذایی نیز یک حوزه تحقیقاتی در حال افزایش است. زایگوساکارومایسس و پیکیا جزء مخمرهای غالب جداسازی شده از کامبوجا می‌باشند (۸ و ۹). که قادر به تولید ترکیبات آروماتیک می‌باشند. بررسی خواص عملکردی و پروبیوتیکی و بررسی خواص آنتی اکسیدانی این گونه‌ها که برای اولین بار در این مطالعه مورد برسسی قرار می‌گیرد می‌تواند به شناخت عوامل موثر در خواص مفید کامبوجا کمک و استفاده از پتانسیل این مخمر در تولید غذاهای کاربردی کمک نماید.

مواد و روش‌کار

این پژوهش با کد اخلاق IR.GOUMS.REC.1398.303 انجام شده است.

فراهم سازی سویه مخمر

در این مطالعه خواص پروبیوتیکی سویه *زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس* مورد بررسی قرار گرفته است. این سویه در مطالعه قبلی ازکامبوجا (نوشیدنی تخمیری چای شیرین) جداسازی و با استفاده از آغازگرهای (50-NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) NL-4 (50-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) شناسایی شده است.

بررسی تحمل به شرایط دستگاه گوارش

به منظورتعیین میزان بقا تحت شرایط شبیه سازی شده معده از روش توضیح داده شده توسط بائوتیستا گالئگو وهمکاران (۲۰۱۳) با اندکی تغییرات انجام شد(۱۰). بدین منظور ابتدا کشت تازه از جدایه¬ها در محیط کشت YM براث سانتریفیوژ شده است و محلول رویی حذف و پلت دو بار با بافر فسفات سالین شستشو داده شد. سپس در محلول شبیه سازی شده معده (۰/۲ گرم بر لیترکلرید پتاسیم،۸ گرم بر لیتر کلرید سدیم،۱/٤٤ گرم بر لیتر فسفات سدیم هیدراته،۰/۲٤ گرم بر لیتر فسفات پتاسیم هیدراته،۰/۱۰ گرم بر لیتر لیزوزیم، ۳ میلی گرم بر میلی لیتر پپسین) pH 2 افزوده شد. سوسپانسون میکروبی حاصل بلافاصله در دمای ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری شده و پس از ۳ ساعت توسط رقت سازی سریال بر روی محیط YM آگار کشت شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری و در نهایت شمارش گردیده است.

برای بررسی تحمل به شرایط شبیه‌سازی شده روده سوسپانسون مرحله قبل سانتریفیوژ گردیده و دو بار با بافر

فسفات شستشو ودر محلول شبیه سازی شده پانکراس (۰/۲ گرم بر لیترکلرید پتاسیم،۸ گرم بر لیتر کلرید سدیم،۱/٤٤ گرم بر لیتر فسفات سدیم هیدراته،۰/۲٤ گرم بر لیتر فسفات پتاسیم هیدراته، ۰/۳ درصد نمک صفرا و ۰/۱ درصد پانکراتین) با pH ۷/۵ معلق گردیده است. پس از آن در ۳۷ درجه سانتی گراد برای ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و در نهایت توسط رقت سازی سریال بر روی محیط YM آگار کشت شده و در تعداد کلنی‌های رشد یافته شمارش گردیده است.

بررسی خواص همولیتیکی

جهت بررسی فعالیت همولیتیکی، جدایه‌های زیگو ساکرومایسس بیسپوریس و *پیکیا اوکسیدنتالیس* روی سطح محیط کشت آگاردار حاوی ۵ درصد خون گوسفند، کشت داده شدند و پس از ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۰ درجه سانتیگراد، ایجاد هاله و تغییر رنگ در محیط کشت بررسی شده است (۱۱).

بررسی خواص تجمع خود به خودی

توانایی تجمع خود به خودی جدایه‌ها براساس روش توصیف شده توسط میرا و همکاران (۲۰۱٤)انجام شد(۱۲). ، سلول‌های رسوب شدهمخمر با سانتریفیوژ (۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه) جمع آوری و شسته شدند. و در بافر فسفات سالین (pH ۷) مجدداً معلق شده است. سوسپانسیون سلولی مخمر (۲ میلی لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده است و مقادیر جذب نوری روماند در فواصل زمانی مختلف (٤،۰ و ۲٤ ساعت) در ٦۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. درصد تجمع (A%) طبق رابطه زیر محاسبه شده است:

$$[1 - (At/A0)] \times 100$$

A0: جذب اولیه نمونه

At: جذب نمونه در زمان‌های مختلف

بررسی خواص آب گریزی

سنجش آب گریزی با توجه به روش توصیف شده توسط برنس و همکاران(۲۰۰۸) با اندکی تغییرات بررسی شد(۱۳). کشت تازه مخمرها سانتریفیوژ (۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه) شده ، سپس با استفاده از بافر فسفات سالین(۷ pH) دو بار شسته و مجدداً در این بافر معلق شدند و جذب نوری آن در ٥٦۰ نانومتر اندازه گیری شد (A0). سپس ۳ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون‌ها به ۰/٦ میلی‌لیتر زایلن اضافه شد و سپس به مدت ۱۲۰ ثانیه ورتکس شده است. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. جذب نوری فاز مایع در ٥٦۰ نانومتر اندازه گیری شده است(AF). درصد آبگریزی سطح سلول با استفاده از فرمول زیر محاسبه شده است:

$$[1 - (AF/A0)] \times 100$$

بررسی فعالیت ضد میکروبی

به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی از روش دولایه استفاده شده است. بدین منظور ابتدا باکترهای پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس، *یرسینیا اینتروکولیتیکا*، *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا کلای* در محیط LB براث به مدت ۲٤ ساعت در شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس سویه‌های مخمر روی محیط YM آگار در وسط پلیت به صورت نقطه ای کشت داده شد. نمونه‌ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شدند. باکتری‌های پاتوژن غلظت سلولی حدود ۷ لگاریتم بر میلی‌لیتر در محیط کشت نرم ۰,۷ درصد آگار و به آرامی برروی محیط کشت‌های حاوی مخمر رشد یافته ریخته شد. به منظور تسریع نفوذ مواد تولید شده توسط محیط ها به مدت۲ ساعت در یخچال نگهداری شدند. در نهایت پلیت‌ها ۲٤ ساعت در دماهای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شدند. توانایی فعالیت ضد میکروبی و درصد بازدارندگی براساس قطر هاله عدم

رشد باکتری‌های پاتوژن برحسب میلی مترتعیین گردیده است (١٤).

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی

برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی، نرخ درصد کاهش رادیکال ١،١-دی فنیل-٢-پیکریل هیدرازیل (DPPH) همانطور که توسط گیل-رودریگز و همکاران (٢٠١٥) توصیف شد با تغییرات جزئی انجام شد(١٥). به طور خلاصه، کشت جدایه‌های مخمر در YM براث سانتریفیوژ (٥٠٠٠g به مدت ١٠ دقیقه) شدند، سپس دو بار با محلول استریل PBS شسته شد و رسوب حاصل در همان محلول مجدداً معلق شد. ٨٠٠ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به یک لوله جدید منتقل شد، جایی که حاوی ١ میلی لیتر محلول DPPH (٠/٢ مول در لیتر در متانول) است. مخلوط ورتکس شد و سپس به مدت ٣٠ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی گرمخانه‌گذاری شد. لوله‌های واکنش سانتریفیوژ شدند (٥٠٠٠ g به مدت ٥ دقیقه) و سپس جذب نوری آن در ٥١٧ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه گیری شد. درصد کاهش DPPH بر اساس رابطه ١ محاسبه شد:

{(Absi – (Abss- Absb))/ Absi}*100

که در آن Absi جذب اولیه (محلول متانولی + DPPH)، Abss جذب مخلوط (DPPH + نمونه) و Absb مقدار جذب نمونه خالی است. نتایج مطابق با طبقه بندی گیل رودریگز و همکاران (٢٠١٥) ارائه شده است.: فعالیت کم (بین ٢٠ تا ٣٠٪)، فعالیت خوب (بین ٣٠ تا ٤٠٪)، فعالیت بسیار خوب (بین ٤٠ تا ٥٠٪). و فعالیت عالی (درصد کاهش DPPH بالاتر از ٥٠٪).

نتایج

تحمل به شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش

درصد زنده مانی *زایگوساکارومایسس بیسپوریس* و *پیکیا اوکسیدنتالیس* در جدول ١ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که درصد زنده‌مانی این جدایه‌ها حت شرایط مشابه معده به ترتیب حدود ٨٧/٥٤٪ و ٨٨/٨٧ بود. و درصد زنده‌مانی این جدایه‌ها تحت شرایط مشابه روده به ترتیب ٩٧/٠٩ و ٩٤/٤٠ درصد بود، بنابراین زنده‌مانی این جدایه‌ها تحت شرایط روده بیشتر از شرایط مشابه معده بود. به طور کل میزان زنده مانی به ترتیب حدود ٨٤/٨٦ و٨٣/٨٦ درصد می باشد.

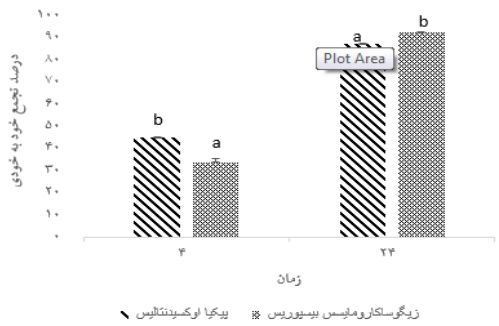
جدول ١-درصد زنده‌مانی مخمرهای *زایگوساکارومایسس بیسپوریس* و *پیکیا اوکسیدنتالیس* تحت شرایط مشابه معده و روده

نوع مخمر	درصد زنده مانی		
	کل	تحت شرایط روده	تحت شرایط معده
زایگوساکارومایسس بیسپوریس	٨٦±٠/٣٧[a] ٨٤	٠٩±٠/٢٩[a] ٩٧	٨٧/٥٤±٠/٤[a]
پیکیا اوکسیدنتالیس	٨٦±٠/٣٩[b] ٨٣	٤٠±٠/٤٣[b] ٩٤	٨٧±٠/٤٥[b] ٨٨

حروف کوچک ناهمسان در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح p< ٠/٠٥

خواص تجمع خود به خودی

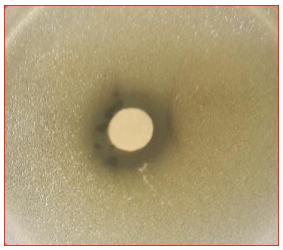
نتایج حاصل از این آزمون در نمودار ١ نشان داده شده است. ظرفیت تجمعی خود به خودی از *زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس* پس از ٤ ساعت انکوباسیون در دمای ٣٧ درجه سانتیگراد به ترتیب حدود ٣٣/٩٩ و ٤٤/٩٩ درصد و همچنین پس از ٢٤ ساعت به ترتیب حدود ٩٢/٤٤ و ٨٧/٣٠ درصد بوده است.



نمودار ۱- درصد ظرفیت تجمع خود به خودی از مخمرهای *زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس*

فعالیت ضد میکروبی

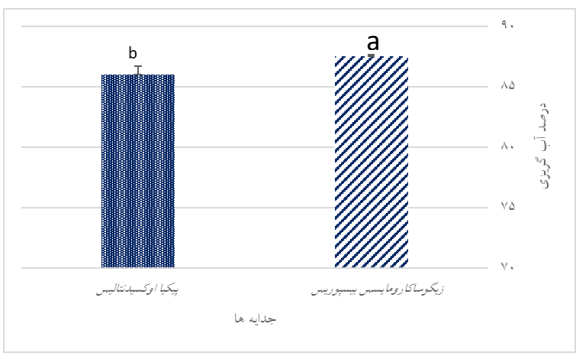
فعالیت آنتاگونیستی زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس در این مطالعه بررسی شد. نتایج نشان داد *پیکیا اوکسیدنتالیس* فاقد فعالیت آنتا گونیستی در برابر باکتری‌های پاتوژن مورد آزمون می‌باشد. *اما* جدایه *زایگوساکارومایسس بیسپوریس* در برابر *یرسینیا اینتروکولیتیکا* دارای فعالیت ضد میکروبی بوده است. اما هیچ فعالیتی علیه مابقی میکروارگانیسم‌های مورد آزمون نشان نداده است.



نگاره ۱- فعالیت ضد میکروبی *زایگوساکارومایسس بیسپوریس* در برابر *یرسینیا اینتروکولیتیکا*

بررسی خواص آب گریزی

زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس از نظر خاصیت آبگریزی سطح سلولی ارزیابی شده‌اند. نتایج نشان داد که فعالیت آبگریزی *زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس* به ترتیب در حدود ۸۷/۵۱ ٪ و ۸۶/۰۱۲۷ ٪ می‌باشد.



نمودار۲) درصد فعالیت آبگریزی از مخمرهای *زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس*

فعالیت آنتی اکسیدانی

توانایی کاهش DPPH *توسط زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس* مورد برررسی قرا گرفت و نتایج حاصل از آن در جدول۲ نشان داده شده است. نرخ در صد احیای DPPH توسط جدایه‌های مورد آزمون به ترتیب حدود ٦٧/٦٧ و ٦٩/١٨ درصد است.

جدول ۲) درصد نرخ احیا DPPH توسط *زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس*

نوع مخمر	درصد نرخ احیا DPPH
زیگوساکارومایسس بیسپوریس	٦٧/٦٧±٠/٢٥[a]
پیکیا اوکسیدنتالیس	٦٩/١٨±٠/٢٦[a]

حروف کوچک ناهمسان در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح p< ٠/٠٥

بحث

در انتخاب میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک فاکتورهای متعددی مانند تحمل شرایط اسیدی معده و نمک صفرا، توانایی چسبندگی به سلول‌های روده (که تجمع خود به خودی از ویژگی‌های مرتبط به این فاکتور هست)، عدم همولیز خون و رقابت با عوامل بیماریزا مهم می-باشند(١٦). *زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا* اوکسیدنتالیس مورد استفاده در این مطالعه، هاله در اطراف کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفند ایجاد نکردند. بنابراین این مخمرها فاقد خواص فعالیت بتاهمولیتیکی می‌باشند. با توجه به نتایج بدست آمده ایمنی این مخمرها جای نگرانی نیست.

مخمرهای پروبیوتیکی باید بتوانند در حین عبور از دستگاه گوارش انسان زنده بمانند زیرا زنده ماندن نقش

مهمی در برخی از خواص مفید آن‌ها دارد. باتوجه به نتایج بقا *زایگوساکارومایسس بیسپوریس* و *پیکیا اوکسیدنتالیس* تحت شرایط مشابه معده و روده، این جدایه‌ها مقاومت بالایی به شرایط مشابه دستگاه گوارش از خود نشان داده-اند. نتایج حاکی از آن است که درصد زنده‌مانی طی تحت شرایط روده کوچک بیشتر از شرایط مشابه معده بود. این واقعیت که *زایگوساکارومایسس* و *پیکیا اوکسیدنتالیس* از محیط با شرایط اسیدی جدا شده‌اند و این احتمال می‌رود که این ویژگی در تحمل به شرایط اسیدی سویه‌ای موثر باشد(۱۲). توانایی تحمل به شرایط اسیدی و صفراوی به تولید گلیسرول توسط سویه‌های مخمر تحت شرایط تنش‌زا نسبت داده می‌شود (۱۷). نتایج مطالعه ما با مطالعات زیوکویچ و همکاران (۲۰۱٤) مطابقت دارد که نشان داده‌اند اکثر مخمرهای جدا شده از پنیر سنتی سربیا دارای قابلیت زنده مانی حدود ۸۱– ۹۷ درصد تحت شرایط مشابه معده و حدود ۸۱– ۱۰۹ درصد تحت شرایط مشابه روده بوده اند(۱۸). سیموئس و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کرده‌اند که مخمرهای جداسازی شده از زیتون تخمیری مقاومت بالایی در برابر شرایط مشابه سازی شده معده از خود نشان داده‌اند(۱۹).

ظرفیت تجمع خود به خود توسط توانایی میکروارگانیسم-ها برای پیوستن به یکدیگر و تشکیل توده‌های سلولی منعکس می‌شود و در نتیجه به کلونیزاسیون در دستگاه گوارش کمک می‌کند (۲۰). ظرفیت تجمع خود به خود مخمر *زایگوساکارومایسس بیسپوریس* و *پیکیا اوکسیدنتالیس* در زمان‌های مختلف (٤ و ٢٤ ساعت) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمون نشان داده که ظرفیت تجمعی خود به خود از *زایگوساکارومایسس بیسپوریس و پیکیا اوکسیدنتالیس* پس از ٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده شده و همچنین پس از ٢٤ ساعت به طور قابل ملاحظه افزایش یافته است. همچنین هر دو جدایه مطابق نتایج حاصل از این آزمون ظرفیت تجمع خود به خودی عالی از خود نشان داده‌اند. در اکثر مطالعات ظرفیت تجمع خود به خودی بالایی برای مخمرها گزارش شده است که با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۱). این خاصیت از مخمرها به حضور برخی ترکیبات مانند لکتین در دیواره سلولی نسبت داده می‌شود(۲۲). این توانایی یک پیش نیاز مهم برای کلونیزاسیون سویه‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش است (۲۰).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که *زایگوساکارومایسس بیسپوریس* و *پیکیا اوکسیدنتالیس* در برابر باکتری‌های بیماری‌زا (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *یرسینیا اینتروکولیتیکا*، *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیا اکلای*) فعالیت آنتاگونیستی نشان نداند به استثنای *زایگوساکارومایسس بیسپوریس* که در برابر *یرسینیا اینتروکولیتیکا* فعالیت ضد میکروبی داشت. بینتی و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت ضد میکروبی مخمرهای جداشده از پنیر اتوکتونال علیه اشریشیا اکلای، سالمونلا انتریتیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس ارزیابی و گزارش کرده‌اند که هیچ کدام از مخمرها قادر به مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نبودند(۲۳). فادا و همکاران (۲۰۱۷)تاثیر ضد میکروبی مخمرهای جدا شده ا پنیر را بررسی و نشان داده‌اند که دارای تاثیر مهارکنندگی علیه استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند. به طور کل در اکثر مطالعات مخمرهای محدودی با خواص ضد میکروبی گزارش شده‌اند که با مطالعه ما مطابقت دارد (٢٤).

خواص آب گریزی از عوامل مهم در چسبندگی و تکثیر میکروارگانیسم‌ها بر روی سلول‌های اپیتلیال روده محسوب می شود. با توجه به نتایج، فعالیت آبگریزی *زیگوساکارومایسس بیسپوریس* و *پیکیا اوکسیدنتالیس* مورد آزمون فعالیت آبگریزی بالایی نسبت به زایلین از

خود نشان داده است. دلیما و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کرده‌اند که حدود ٦٧ درصد سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* جدا شده فعالیت اب گریزی حدود ۹۰ ٪ از خود شان داده‌اند که با مطالعه ما مطابقت دارد (۲۵). سویه‌های مخمر جدا شده از غذاهای هندی حدود ٦٧ درصد فعالیت آب گریزی با زایلین از خود نشان داده اند (۲۰) که مخمرهای مورد آزمون در این مطالعه خاصیت آبگریزی بالاتری از خود نشان داده است که می‌تواندناشی از نوع گونه‌ها و شرایط آزمایشگاهی باشد.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بیماری‌هایی مانند آرتریت، بیماری‌های قلبی عروقی و برخی از تومورها در نتیجه آسیب ناشی از گونه های فعال اکسیژن (ROS) هستند، و به حداقل رساندن آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد می تواند از این شرایط جلوگیری کند (۲٦) بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌ها اهمیتی ویژه‌ای دارد.. با توجه به نتایج ارائه شده مخمرهای مورد آزمون فعالیت آنتی اکسیدانی در سطح عالی (درصد احیا DPPH بالای ۵۰) از خود نشان داده است. دلیما و همکاران (۲۰۱۷) فعالیت آنتی‌اکسیدانی سویه‌های *ساکارومایسس سرویزیه* جداشده از شیر تخمیر شده با دانه‌های کفیررا ارزیابی کرده‌اند و گزارش داده‌اند که حدود ٤٢/٨٥ درصد از جدایه‌ها حدود ۹۰ درصد احیا در DPPH (فعالیت آنتی اکسیدانی در سطح عالی)را از خود نشان داده‌اند(۲۵). رومرنو لونا و همکاران در سال (۲۰۱۸)گزارش کرده اند که *ساکارومایسس سرویزیه* و *ساکارومایسس بولاردی* قادر به کاهش DPPH در حدود ٦٣/٠٣ و ٤٣/٦٠ درصد بوده-اند(۲۷). که نتایج ما با این مطالعات مطابقت دارد. پروبیوتیک‌ها دارای اجزای سلولی با فعالیت آنتی اکسیدانی هستند که می توانند مکمل آنتی اکسیدان های بدست آمده در رژیم غذایی و آنتی اکسیدان های درون زا در بدن باشند (۲۸). نویسندگان متعددی اشاره کرده اند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی مخمرها با محتوای بالای (۱⟵۳)-β-D گلوکان در دیواره سلولی و سایر اجزای سلولی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و غیره مرتبط است (۲۹). با توجه به قابلیت بالای بقا تحت شرایط شبیه سازی شده گوارش *زایگوساکارومایسس بیسپوریس* جدا شده از کامبوجا و خواص ضد میکروبی آن در برابر *یرسینیا انتروکولیتیکا*، همچنین خواص آنتی اکسیدانی بالایی از این جدایه می توان پیشنهاد کرد که به عنوان منبع طبیعی از آنتی اکسیدان، مواد مغذی ارزشمند با فواید سلامتی بخش به صورت گسترده در صنایع غذایی و دارویی استفاده گردد. که برای دستیابی به این منظور نیازمند مطالعه در مورد اثرات مفید آن بر سلامت انسان و تأثیر مثبت یا منفی آن بر ماتریس‌های غذایی می‌باشد.

فهرست منابع

1. FAO/WHO, Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001.
2. Kasra-Kermanshahi R, Rezai P. Probiotics And Prebiotics In Medicine And Dentistry. Iranian J Medical Microbiology 2015; 9(3): 1-13.
3. Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions–a review. International journal of medical microbiology. 2010 Jan 1;300(1):57-62.
4. Fleet G, Balia R. The public health and probiotic significance of yeasts in foods and beverages. InYeasts in food and beverages 2006 (pp. 381-397). Springer, Berlin, Heidelberg.
5. Czerucka D, Piche T, Rampal P. yeast as probiotics–Saccharomyces boulardii. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2007 Sep;26(6):767-78.
6. Martins FS, Silva AA, Vieira AT, Barbosa FH, Arantes RM, Teixeira MM, Nicoli JR. Comparative. J. vet. 563

7. Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei and Saccharomyces boulardii probiotic properties. Archives of Microbiology. 2009 Aug;191(8):623-30.
8. Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, Bressollier P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. LWT-Food Science and Technology. 2013 Jan 1;50(1):1-6.
9. Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. International journal of food microbiology. 2016 Mar 2;220:63-72.
10. Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. Comprehensive reviews in food science and food safety. 2014 Jul;13(4):538-50.
11. Bautista-Gallego J, Arroyo-López FN, Rantsiou K, Jiménez-Díaz R, Garrido-Fernández A, Cocolin L. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. Food Research International. 2013 Jan 1;50(1):135-42.
12. Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z. and Tassou, C.C., 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. Food microbiology, 33(2), pp.282-291.
13. Mira NP, Münsterkötter MA, Dias-Valada F, Santos J, Palma M, Roque FC, Guerreiro JF, Rodrigues F, Sousa MJ, Leao C, Güldener UL. The genome sequence of the highly acetic acid-tolerant Zygosaccharomyces bailii-derived interspecies hybrid strain ISA1307, isolated from a sparkling wine plant. DNA Research. 2014 Jun 1;21(3):299-313.
14. Burns P, Vinderola G, Binetti A, Quiberoni A, de Los Reyes-Gavilan CG, Reinheimer J. Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. International Dairy Journal. 2008 Apr 1;18(4):377-85.
15. Schillinger U. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. Applied and environmental microbiology. 1989 Aug;55(8):1901-6.
16. A.M. Gil-Rodríguez, A.V. Carrascosa, T. Requena, Yeasts in foods and beverages: In 448 vitro characterization of probiotic traits, LWT-Food Sci. Technol. 64 (2015) 1156-1162.
17. de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Júnior AI, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. Biotechnology advances. 2018 Dec 1;36(8):2060-76.
18. Påhlman AK, Granath K, Ansell R, Hohmann S, Adler L. The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. Journal of Biological Chemistry. 2001 Feb 2;276(5):3555-63.
19. Živković M, Čadež N, Uroić K, Miljković M, Tolinački M, Doušova P, Kos B, Šušković J, Raspor P, Topisirović L, Golić N. Evaluation of probiotic potential of yeasts isolated from traditional cheeses manufactured in Serbia and Croatia. Journal of Intercultural Ethnopharmacology. 2015 Jan;4(1):12.
20. Simões LA, Cristina de Souza A, Ferreira I, Melo DS, Lopes LA, Magnani M, Schwan RF, Dias DR. Probiotic properties of yeasts isolated from Brazilian fermented table olives. Journal of Applied Microbiology. 2021 Oct;131(4):1983-97.
21. Syal P, Vohra A. Probiotic potential of yeasts isolated from traditional Indian fermented foods. International Journal of Microbiology Research. 2013 Jan 1;5(2):390.
22. Bonatsou, S., Karamouza, M., Zoumpopoulou, G., Mavrogonatou, E., Kletsas, D., Papadimitriou, K., ... &

Panagou, E. Z. (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.

23. Singleton, D.R., Fidel, P.L. Jr, Wozniak, K.L. and Hazen, K.C. (2005) Contribution of cell surface hydrophobicity protein 1 (Csh1p) to virulence of hydrophobic Candida albicans serotype A cells. FEMS Microbiol Lett 244, 373–377.
24. Binetti A, Carrasco M, Reinheimer J, Suárez V. Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. Journal of Applied Microbiology. 2013 Aug;115(2):434-44.
25. Fadda ME, Mossa V, Deplano M, Pisano MB, Cosentino S. In vitro screening of Kluyveromyces strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. LWT. 2017 Jan 1;75:100-6
26. de Lima MD, de Souza KM, Albuquerque WW, Teixeira JA, Cavalcanti MT, Porto AL. Saccharomyces cerevisiae from Brazilian kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties. Microbial pathogenesis. 2017 Sep 1;110:670-7.
27. Halliwell B. Free radicals and antioxidants–quo vadis?. Trends in pharmacological sciences. 2011 Mar 1;32(3):125-30.
28. Romero-Luna HE, Hernández-Sánchez H, Ribas-Aparicio RM, Cauich-Sánchez PI, Dávila-Ortiz G. Evaluation of the probiotic potential of Saccharomyces cerevisiae Strain (C41) isolated from Tibicos by in vitro studies. Probiotics and antimicrobial proteins. 2019 Sep;11(3):794-800.
29. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food chemistry. 2012 Feb 15;130(4):1036-43.
30. Jaehrig SC, Rohn S, Kroh LW, Fleischer LG, Kurz T. In vitro potential antioxidant activity of (1→ 3),(1→ 6)-β-d-glucan and protein fractions from Saccharomyces cerevisiae cell walls. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007 Jun 13;55(12):4710-6.