مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد قارچی مخمر غالب جدا شده از عسل

فاطمه طاهری[۱]، علیرضا صادقی[۱]*، سید مهدی جعفری[۱،۲]، سارا شهریاری[۱]، مریم زارعلی[۱]

۱-گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲-مرکز تحقیقات حلال، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت و آموزش پزشکی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/٤/۱٦

تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/٦/۳۰

کلمات کلیدی:

عسل طبیعی،

مخمر پروبیوتیک،

قابلیت اتصال،

اثر ضد باکتریایی،

فعالیت ضد قارچی

DOI:10.22034/FSCT.22.158.185.

* مسئول مکاتبات:

sadeghi.gau@gmail.com

چکیده

همواره ارزیابی قابلیت‌های پروبیوتیکی میکروارگانیسم‌های جدا شده از بسترهای تحت تنش حائز اهمیت بوده است. از بین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، مخمرها نسبت به باکتری‌های اسید لاکتیک به واسطه اندازه بزرگ‌تر، قابلیت‌های اتصال مناسب‌تر و همچنین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بدون امکان انتقال ژن‌های مقاومت متمایز می‌شوند. در پژوهش حاضر، ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد قارچی مخمر غالب جدا شده از عسل طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی *Saccharomyces cerevisiae* به عنوان مخمر غالب جدا شده از عسل گردید. همچنین جدایه مذکور، فاقد فعالیت همولیزی بود و از بین ترکیبات ضد قارچ مورد مطالعه، بیشترین حساسیت را نسبت به ناتامایسن نشان داد. علاوه بر این، اگر چه جدایه مخمری مذکور دارای زنده‌مانی مناسبی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش نبود اما از قابلیت‌های خود اتصالی (۹۳/۸٦٪) و آبگریزی سطحی (۷٦/۳٦٪) نسبتا بالایی برخوردار بود. بیشترین قابلیت دگر اتصالی جدایه مذکور نیز با باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* مشاهده شد و بازدارندگی جدایه مذکور در برابر *B. cereus* به شکل معنی‌داری (p <۰/۰۵) از سایر باکتری‌های غذازاد مورد مطالعه بیشتر بود. جدایه مذکور همچنین ۳۲/۱۸٪ اثر ضد قارچی بر علیه *Aspergillus flavus* از خود نشان داد. بر این اساس، مخمر غالب جدا شده از عسل، از قابلیت‌های مناسبی جهت استفاده به عنوان کشت محافظت کننده در صنایع تخمیری برخوردار است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

۱-مقدمه

قابلیت‌های پروبیوتیکی فلور میکروبی جدا شده از بسترهای تحت تنش، بررسی شده و مورد تایید قرار گرفته است. بنابراین، بسترهای تحت تنش می‌تواند منبع مناسبی برای جداسازی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک باشد [۱ و ۲]. از مهم‌ترین ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌توان به اثرات ضد میکروبی، مزایای تغذیه‌ای و همچنین قابلیت حفظ تعادل فلور میکروبی بدن به منظور پیشگیری از مشکلات دستگاه گوارش و اختلالات سیستم ایمنی اشاره نمود [۳]. زنده‌مانی در شرایط نامتعارف دستگاه گوارش (حضور آنزیم‌ها، نمک‌های صفراوی، pH معده و روده)، ایمنی، قابلیت اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده[1]، مقاومت به عوامل بازدارنده مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین عدم انتقال ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک از سایر ویژگی‌های حائز اهمیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشند [٤ و ٥].

تاکنون اکثر مطالعات پروبیوتیکی بر روی باکتری‌های اسید لاکتیک انجام شده و به سایر میکروارگانیسم‌ها با ویژگی‌های کاربردی، مانند برخی از مخمرها کمتر توجه شده است [٦]. یکی از ویژگی‌های جالب توجه مخمرها اندازه بزرگ‌تر آن‌ها نسبت به باکتری‌ها است که می‌تواند سبب اتصال بهتر آنها به دستگاه گوارش و محدود کردن رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا گردد. از سایر ویژگی‌های مخمرها می‌توان به مقاومت ذاتی آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، قابلیت تحمل شرایط نامساعد دستگاه گوارش و اثرات مثبت سلامتی‌بخش آنها اشاره نمود [۷].

مطالعه میکروارگانیسم‌های جدا شده از بسترهای ویژه مانند عسل، احتمال مواجهه با نژادهای دارای قابلیت‌های جالب توجه را در پی دارد و تاکنون مطالعاتی در خصوص جداسازی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرهای جداشده از عسل یا زیستگاه‌های مشابه آن انجام شده است. به عنوان مثال، بر اساس پژوهش‌های انجام شده بر روی ۱۰٤ نژاد مخمری جدا شده از نمونه‌های مختلف عسل، مشخص شد که ۵۸ جدایه قابلیت رشد در pH اسیدی، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور نمک‌های صفراوی را داشتند. همچنین تمامی جدایه‌ها قابلیت خود اتصالی بالایی (۱۰۰-۷۰٪) از خود نشان دادند [۵ و ۸]. علاوه بر این، Tauber و همکاران (۲۰۱۹) مخمر *Wickerhamomyces anomalus* CBS 262 را از روده زنبور عسل، جداسازی کرده و مشاهده نمودند که این مخمر توانست با اسیدی کردن محیط، شرایط را به نفع باکتری‌های لاکتوباسیلوس تغیر دهد و موجب کاهش رشد قارچ *Nosema ceranae* گردد [۹]. طبق گزارش Khalafalla و همکاران (۲۰۱۹) مخمرهای *Zygosaccharomyces mellis* MK005880، MK000703 *Lachancea thermotolerans* و MH997572 *W. anomalus* جدا شده از روده زنبور عسل، علاوه بر قابلیت تحمل pH اسیدی و غلظت ۳٪ نمک‌های صفراوی، فاقد فعالیت همولیتیک[2] بوده و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی نیز از خود نشان دادند [۱۰]. بر اساس نتایج مطالعه Chelucci و همکاران در سال ۲۰۲۳، مخمرهای CBS 9710 *Candida magnolia*، CBS 2677 *Starmerella bombicola*، W1171 *Pichia guilliermondii*، *Aureobasidium* sp.، *Rhodotorula* sp.، *Curvibasidium* sp. و *Metschnikowia* sp. جدا شده از گرده زنبور عسل[3] فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی مناسبی از خود نشان دادند و از این جهت دارای قابلیت بالقوه برای استفاده به عنوان پروبیوتیک بودند [۱۱].

طبق بررسی‌های انجام شده، تاکنون مطالعات محدودی در خصوص ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از عسل طبیعی در کشور انجام شده است. بنابر این،

1 -Intestinal epithelial cells

2 -Hemolytic activity

3- Bee pollen

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

هدف از مطالعه حاضر، بررسی قابلیت‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مخمر غالب جدا شده از عسل طبیعی بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی مخمرهای عمده از عسل

ابتدا عسل طبیعی از جنگل‌های هیرکانی تهیه گردید و سپس با هدف غنی‌سازی اولیه، ۱۰ گرم از آن در ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت BHI broth[4] (مرک، آلمان) حل و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. در مرحله بعد، از این سوسپانسیون، رقت‌های متوالی 10^{-1} تا 10^{-6} در محلول رینگر (مرک، آلمان) استریل تهیه و سپس تمامی رقت‌ها بر روی محیط کشت YGC agar[5] (مرک، آلمان) کشت سطحی داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در ادامه از پرگنه‌ها گسترش تهیه شد و پس از رنگ آمیزی و مشاهده توسط میکروسکوپ نوری (زنیس، آلمان)، جدایه‌های متفاوت برای ادامه پژوهش انتخاب شدند [۱۲].

۲-۲- شناسایی جدایه مخمری غالب

بدین منظور ابتدا DNA جدایه غالب (دارای بیشترین جمعیت از بین جدایه‌های مخمری) به کمک کیت (ژن آل، کره جنوبی) استخراج و سپس توسط PCR[4] با پرایمرهای *ITS*1[5] (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) و *ITS*4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) در ترموسایکلر (کوربت، استرالیا) طی ۳۵ چرخه حرارتی و با دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد تکثیر انجام گردید. به منظور تایید اولیه تکثیر، محصولات PCR به ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی رنگ سایبر سیف[6] (اینوایتروژن، آمریکا) انتقال یافته و سپس الکتروفورز در بافر TBE[7] با ولتاژ ۹۰ ولت و به مدت ۴۰ دقیقه انجام گردید. در نهایت با هدف شناسایی مخمر منتخب، محصولات PCR پس از توالی‌یابی (پیشگام، ایران) با استفاده از رویه BLAST[8] با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI[9] مطابقت داده شد [۱۳].

۲-۳- بررسی زنده‌مانی جدایه منتخب در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

ابتدا جمعیتی معادل 10^8 CFU/ml از جدایه منتخب در محیط کشت BHI broth تهیه شده و سپس pH آن به کمک محلول اسیدکلریدریک یک نرمال (مرک، آلمان) به حدود دو رسانده شد. در مرحله بعد، به این سوسپانسیون به میزان ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم پپسین[6] (سیگما، آمریکا) افزوده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در ادامه پس از افزودن سدیم هیدروکسید یک نرمال (مرک، آلمان) و رساندن pH به حدود ۷/۵، سوسپانسیون مذکور در مجاورت نمک صفراوی (سیگما، آمریکا) ۰/۳٪ وزنی/حجمی و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پانکراتین[7] (سیگما، آمریکا) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت پس از رقت‌سازی و کشت سطحی بر روی محیط کشت YGC agar تعداد مخمرهای زنده در مقایسه با نمونه شاهد محاسبه گردید [۱۴].

۲-۴- بررسی قابلیت دگر اتصالی جدایه مخمری منتخب

بدین منظور ابتدا سوسپانسیون‌هایی با حجم و جمعیت یکسان از کشت فعال مخمر منتخب (جذب نوری حدود ۰/۶) و باکتری‌های غذازاد مورد مطالعه شامل *Bacillus cereus* PTCC 1015، *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *Listeria monocytogenes* PTCC 1298، *Salmonella enterica* PTCC 1709 و *Escherichia coli* PTCC 1399 (جذب نوری حدود ۰/۰۵) تهیه شد. سپس جذب این سوسپانسیون‌ها پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری

4 -Polymerase chain reaction

5 -Internal transcribed spacer

6 -SYBR safe

7 -Tris-borate-EDTA

8 -Basic Local Alignment Search Tool

9 -National Center for Biotechnology Information

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

در دمای ۳۷ سانتی‌گراد به‌صورت مجزا و مخلوط و در طول موج ٦۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (پی‌جی‌آی اینسترومنتز، انگلستان) خوانش گردید. درصد دگر اتصالی نیز طبق معادله زیر محاسبه شد [۱۵] که در آن A_{yeast}، $A_{bacteria}$ و A_{mix} به ترتیب، جذب نوری مخمر، باکتری غذازاد و مخلوط آنها می‌باشد.

$$[(A_{yeast}+A_{bacteria})/2 - (A_{mix})]/[(A_{yeast}+A_{bacteria})/2] \times 100$$

۲-۵- بررسی قابلیت خوداتصالی و آبگریزی جدایه مخمری منتخب

به منظور بررسی قابلیت خوداتصالی، جمعیت مخمر فعال در محیط کشت BHI به گونه‌ای تنظیم شد که جذب آن در طول موج
٦۰۰ نانومتر معادل ۰/٦ باشد (A_0). سپس سوسپانسیون مخمر به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و
جذب آن مجددا خوانش شد (A_1). در نهایت درصد خوداتصالی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید [١٦].

$$[1-(A_1/A_0)] \times 100$$

برای بررسی قابلیت آبگریزی جدایه مخمری نیز سوسپانسیونی از این مخمر با جذب معادل ۰/٦ (A_0) در محیط کشت BHI تهیه و سپس سه میلی‌لیتر از این سوسپانسیون با یک میلی‌لیتر زایلن (مرک، آلمان) مخلوط گردید. سپس این مخلوط در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت گرمخانه‌گذاری و در ادامه، جذب فاز تحتانی در طول موج ٦۰۰ نانومتر خوانش شد (A_F). میزان آبگریزی نیز از طریق رابطه زیر محاسبه گردید [۱۷].

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

۲-٦- بررسی قابلیت ضدباکتریایی جدایه منتخب

ابتدا از مخمر منتخب و باکتری‌های غذازاد شامل *E. coli*، *L. monocytogenes*، *S. aureus*، *S. enterica* و *B. cereus* کشت فعال تهیه شد و سپس مخمر منتخب با جمعیت (10^8 CFU/ml) و نسبت حجمی یکسان با هر یک از باکتری‌های مذکور به شکل جداگانه مخلوط و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس از این سوسپانسیون، رقت‌های متوالی تهیه و پس از کشت بر روی محیط کشت کروموژنیک (کروم‌آگار، فرانسه)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در نهایت تعداد کلنی‌ها شمارش و با تعداد کلنی‌های نمونه شاهد (باکتری بدون افزودن مخمر) مقایسه گردید [۱۸].

۲-۷- بررسی مقاومت جدایه مخمری به ترکیبات ضدقارچ

برای این منظور، ابتدا کشت فعال ۲٤ ساعته از جدایه مخمری تهیه و روی محیط YGC agar کشت داده شد. سپس دیسک‌های استریل کاغذی آغشته به ترکیبات ضدقارچ شامل کتوکونازول، ایتراکونازول، فلوکونازول، پتاسیم سوربات، ناتامایسین و کلسیم پروپیونات بر روی آن قرار داده شد و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها به کمک نرم‌افزار Image J (نسخه 1.42e) اندازه‌گیری شد [۱۹ و ۲۰].

۲-۸- بررسی قابلیت همولیز خون توسط جدایه مخمری منتخب

جهت ارزیابی قابلیت همولیز خون، جدایه مخمری بر روی محیط کشت آگار خوندار (مرک، آلمان) حاوی ۵٪ خون تازه گوسفندی کشت داده شد و سپس نوع و رنگ هاله (هاله سبز: همولیز آلفا، هاله سفید یا شفاف: همولیز بتا، عدم تشکیل هاله: همولیز گاما) بررسی گردید [۲۱].

۲-۹- بررسی اثر ضد قارچی جدایه منتخب

بدین منظور از روش کشت دولایه در برابر قارچ‌های *Aspergillus flavus* PTCC 5006 و *Aspergillus niger* PTTC 5012 استفاده شد. بدین منظور ابتدا جدایه مخمری فعال بر روی محیط YGC به صورت خطوط موازی با فاصله متناظر از یکدیگر کشت داده شده و سپس سوسپانسیونی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

حاوی 10^5 spores/ml از هر قارچ در محیط کشت PDA[10] agar(مرک، آلمان) تهیه و بر روی لایه اول ریخته شد. سپس پلیت‌ها تا پوشانده شدن تمام سطح پلیت شاهد (فاقد مخمر) با قارچ‌های مذکور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف مخمر به کمک نرم‌افزار Image J تعیین گردید [۲۲].

۱۰-۲- آنالیز آماری نتایج

تمامی آزمون‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شده و داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۷) و با روش آنالیز واریانس یک طرفه، تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین‌ها نیز از حداقل اختلاف معنی‌داری در سطح $p<$ ۰/۰۵ استفاده شد. ترسیم نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Microsoft office excel 2019 صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی مخمرهای عمده از عسل

پس از جداسازی مخمرهای غالب از عسل، سه جدایه با کدهای THY1، THY2 و THY3 که از لحاظ شکل کلنی و تصویر میکروسکوپی با هم متفاوت بودند پیش‌غربال و از نظر زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهدات انجام شده نشان داد که جدایه THY3 با زنده‌مانی ۲/۱۶ ± ۱۴/۹۹٪ به شکل معنی‌داری ($p<$ ۰/۰۵) بیشترین زنده‌مانی را در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش داشت و دو جدایه دیگر فاقد زنده‌مانی در این شرایط بودند.

بر اساس پژوهش انجام شده توسط Binetti و همکاران (۲۰۱۳) بر روی مخمرهای جدا شده از مواد غذایی مشخص شد که قابلیت زنده‌مانی برخی از نژادهای مخمری در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش تا حدود دو سیکل لگاریتمی کاهش داشت و طبق گزارش این محققین، قابلیت مذکور کاملاً به نژاد مخمری وابسته بود [۲۳]. بررسی‌های انجام شده توسط Suvarna و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی زنده‌مانی چهار مخمر *Pichia barkeri* VIT-SJSN01، *Yarrowia lipolytica* VIT-ASN04، *W. anomalus* VIT-ASN01 و *Saccharomyces cerevisiae* VIT-ASN03 در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش نشان داد که این مخمرها زنده‌مانی حدود ۵۹-۴۸٪ داشتند [۲۴]. در پژوهش دیگری که توسط Hébrard و همکاران (۲۰۱۰) انجام گردید مخمر *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745® از نظر زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش و در طی زمان رسیدن به کلون مورد بررسی قرار گرفت و زنده‌مانی آن در حدود ۱۰٪ گزارش شد [۲۵]. طبق گزارشی از Alkalbani و همکاران (۲۰۲۲) نیز مشخص شد که نژادهای مخمری جدا شده از محصولات غذایی تحت شرایط نامساعد دستگاه گوارش، زنده‌مانی متفاوتی در محدوده ۷/۶ تا ۹۶/۴٪ از خود نشان دادند [۲۶]. همچنین در پژوهش Khalafalla و همکاران (۲۰۱۹) نیز مشخص شد که تمامی مخمرهای جدا شده از دستگاه گوارش زنبور عسل از قابلیت تحمل شرایط مشابه روده برخوردار بودند [۱۰]. زنده‌مانی در شرایط نامساعد دستگاه گوارش یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های یک میکروارگانیسم پروبیوتیک است چرا که به‌طور مستقیم با کارایی آن در ارتباط است. مخمرهای پروبیوتیک از مکانیسم‌های مختلفی نظیر خنثی کردن pH، تغییر بیان ژن و تنظیم ترکیب لیپیدی غشا برای زنده ماندن در این شرایط استفاده می‌کنند. همچنین از دلایل مقاومت میکروارگانیسم‌ها به شرایط نامساعد روده می‌توان به هیدرولیز و مصرف صفرا اشاره کرد [۲۷ و ۲۸]. در شرایطی که میکروارگانیسم در قسمت فوقانی دستگاه گوارش زنده‌مانی مناسبی نداشته باشد اما از قابلیت‌های پروبیوتیکی مناسب دیگری برخوردار باشد استفاده از روش‌هایی نظیر ریزپوشانی به‌عنوان یک راهکار کارآمد برای بهبود زنده‌مانی آن در دستگاه گوارش پیشنهاد شده است [۲۴].

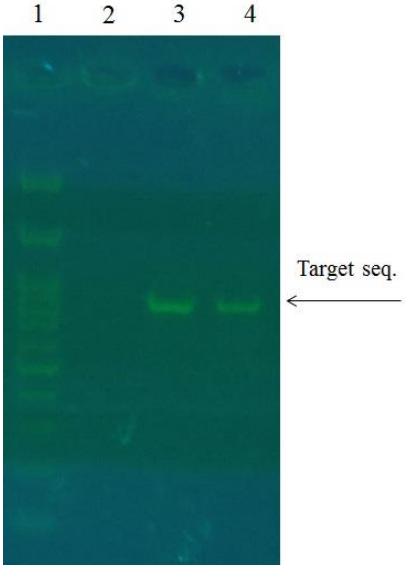
۳-۲- شناسایی جدایه مخمری منتخب

10- Potato Dextrose Agar

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

براساس نتایج ژل الکتروفورز محصولات PCR و همانطور که در شکل ۱ نیز مشخص است تکثیر توالی هدف در جدایه مخمری منتخب، مورد تایید قرار گرفت و نتایج توالی‌یابی منجر به شناسایی مخمر *S. cerevisiae* با ٪۹٦ شباهت شد. Saksinchai و همکاران در سال ۲۰۱۲ توانستند ۱۸٦ نژاد مخمری را از ۳۷ نمونه عسل مربوط به ۱۲ گونه مختلف زنبور جداسازی کنند که پس از مطالعات مورفولوژی و فیزیولوژی، موفق به شناسایی یک مخمر آسکومیست به نام *Zygosaccharomyces siamensis* شدند [۲۹]. همچنین طی بررسی‌هایی که توسط Silva و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی جدایه‌های میکروبی عسل طبیعی انجام شد، مشخص گردید که ۵۵ جدایه مربوط به مخمرهای *Papiliotrema flavescents DMKU-CE139*، *Rhodotorula mucilaginosa* SM6-1، *Starmerella meliponinorum* CBS 9117 و *S. cerevisiae* sp. بودند و از میان این جدایه‌ها نژادهایی از *S. cerevisiae* توانایی تولید اتانول و گلیسرول را داشتند [۳۰]. بر اساس پژوهش دیگری که در سال ۲۰۲۱ توسط Echeverrigaray و همکاران بر روی عسل‌های ۱۷ گونه مختلف زنبور انجام شد مشخص گردید که جمعیت مخمری در نمونه‌های عسل با فعالیت آبی بالاتر از بیشترین تنوع برخوردار بود. جنس‌های غالب مخمری مربوط به *Zygosaccharomyces* و *Starmerella* بود و همچنین برای نخستین بار وجود مخمر *Wickerhamomyces sydowiorum* در عسل گزارش شد [۳۱]. علاوه بر این، طی بررسی‌های انجام شده توسط Ziuzia و همکاران بر روی مخمرهای جدا شده از نمونه عسل لیمو در سال ۲۰۲۳ در لهستان، مشخص گردید که ۱۵ جدایه منتخب مربوط به گونه‌های *Y. lipolytica*، *C. magnolia* و *Starmerella magnoliae* بودند. طبق غربالگری‌های انجام شده بهترین تولیدکنندگان ترکیبات سودمند نژادهایی از مخمر *Y. lipolytica* معرفی شدند که توانایی تولید مقادیر فراوانی از اریتریتول و اسید سیتریک را داشتند [۳۲]. عسل به واسطه برخورداری از ویژگی‌های منحصر به فرد مانند فشار اسمزی بالا، محتوای آبی اندک، pH حدود ٤ و وجود برخی از ترکیبات بازدارنده، موجب مهار رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها می‌شود [۳۳ و ۳٤]. از این رو، اغلب میکروارگانیسم‌های موجود در عسل، جزء فلور ذاتی و منشاء گرفته از روده زنبور عسل، گرده گل یا محیط اطراف می‌باشد و لذا احتمال مواجهه با میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت‌های پروبیوتیکی در بین آنها زیاد است [۸].



[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

شکل ۱. نتایج ژل الکتروفورز محصولات PCR به دست آمده از DNA استخراج شده از مخمر منتخب جدا شده از عسل طبیعی. لاین ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، لاین ۲: کنترل منفی، لاین ۳: کنترل مثبت (تکثیر DNA استخراج شده از مخمر نانوایی)، لاین ٤: تکثیر DNA استخراج شده از جدایه مخمری منتخب.

Fig. 1. Gel electrophoresis of the PCR products obtained from amplification of DNA extracted from selected yeast isolated from natural honey. Lane1: 100 bp DNA ladder, lane 2: negative control, lane 3: positive control (amplified DNA extracted from baker's yeast) and lane 4: amplified DNA extracted from selected yeast isolate.

۳-۳- بررسی قابلیت دگر اتصالی و ضدباکتریایی جدایه مخمری منتخب

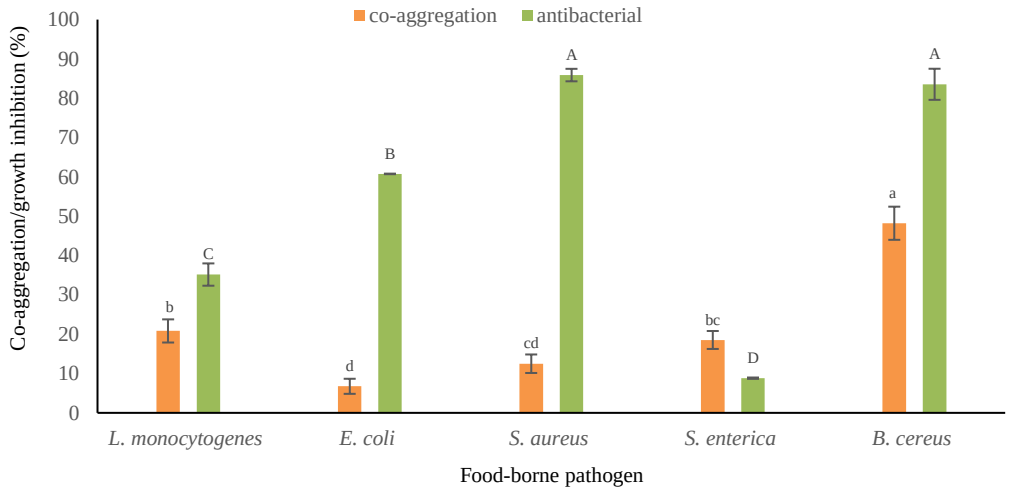
نتایج آزمون قابلیت دگر اتصالی و اثر ضد باکتریایی جدایه منتخب در شکل ۲ مشاهده می‌شود. نتایج نشان داد که جدایه مخمری *S. cerevisiae* به شکل معنی‌داری (p <۰/۰۵) بیشترین دگر اتصالی را با باکتری‌های گرم مثبت *B. cereus* و *S. aureus* و کمترین دگر اتصالی را با باکتری گرم منفی *E. coli* داشت. علاوه بر این، بازدارندگی جدایه مذکور در برابر باکتری گرم مثبت *B. cereus* به شکل معنی‌داری بیشتر از سایر باکتری‌های مورد مطالعه بود و کمترین اثر ممانعت‌کنندگی این مخمر نیز بر روی باکتری گرم منفی *S. enterica* مشاهده شد. همچنین بین قابلیت دگر اتصالی این جدایه و بازدارندگی رشد باکتری *B. cereus* رابطه مستقیمی وجود داشت.

طبق پژوهش Kanpiengjai و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی قابلیت دگر اتصالی مخمر *Sporidiobolus ruineniae* A45.2 با باکتری‌های غذازاد مشخص شد که بیشترین درصد اتصال این مخمر با باکتری‌های *Salmonella Thyphimurium*، *S. aureus*، *L. monocytogenes* و *B. cereus* با مقادیر دگر اتصالی ٤٥/٨٪، ٤٤٪، ٣٧/٨٪ و ٣٦/٢٪ مشاهده شد که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت [۳۵]. در بررسی انجام شده توسط Ragavan و همکاران (۲۰۱۹) بر روی مخمر پروبیوتیک *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 مشخص شد که برخلاف پژوهش حاضر، بیشترین درصد دگر اتصالی این مخمر با باکتری‌های گرم منفی مشاهده شد [١٦]. اتصال میکروارگانیسم‌های متفاوت به یکدیگر دگر اتصالی نام دارد که در مخمرها دیواره سلولی نقش اساسی را در این اتصال ایفا می‌کند. دگر اتصالی می‌تواند به واسطه اتصال پیلی باکتری‌های گرم مثبت و مانان دیواره سلولی مخمر و همچنین اتصالات هیدروفوبیک و الکترواستاتیک غیراختصاصی رخ دهد [٣٦ و ٣٧]. در سال ۲۰۲۱ دو مخمر *Kluyveromyces lactis* B10 و *Torulaspora delbrueckii* B14 جدا شده از مواد غذایی که درصد بالایی از خوداتصالی را در برابر باکتری *S. enterica* از خود نشان دادند پس از خورانده شدن به موش‌های مبتلا به سالمونلوز موجب کاهش ۹۰٪ مرگ و میر این حیوانات شدند [۳۸]. Menezes و همکاران در سال ۲۰۲۰ نژادهایی از *S. cerevisiae* و *Pichia kluyveri* جدا شده از مواد غذایی را از نظر قابلیت‌های اتصالی و ضد میکروبی مورد بررسی قرار دادند. پژوهشگران مذکور مشاهده کردند که این دو مخمر از قابلیت دگر اتصالی مناسبی با باکتری‌های غذازاد *E. coli*، *L. monocytogenes* و *Salmonella enteritidis* برخوردار بودند. همچنین این مخمرها هیچگونه متابولیت ضد میکروبی تولید نکردند و لذا اثر ضد میکروبی آن‌ها در برابر باکتری‌های غذازاد ناشی از رقابت بر سر مواد غذایی و جایگاه‌های اتصال عنوان شد [۳۹]. در مطالعه دیگری بر روی مخمرهای *S. cerevisiae* UFMGCB 11120 و *R. mucilaginosa* UFMGCB 18377 مشاهده شد که هر دو مخمر، قابلیت دگر اتصالی بالایی با باکتری غذازاد *S. Typhimurium* داشتند. همچنین پس از خوراندن این دو مخمر به موش‌های آلوده شده به سالمونلا مشاهده شد مخمر *R. mucilaginosa* UFMGCB 18377 از موش‌ها در برابر آلودگی توسط سالمونلا محافظت کرد و از کاهش وزن آن‌ها نیز جلوگیری نمود [٤٠]. در پژوهش دیگری ۱۸ نژاد مخمری جدا شده از مواد غذایی از نظر قابلیت‌های پروبیوتیکی از جمله قابلیت دگر اتصالی و ضد میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفتند و مشخص گردید که مقادیر دگر

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

اتصالی این جدایه‌ها در برابر باکتری غذازاد *S. enteritidis* بین ۱۹ تا ۲۵٪ بود. همچنین این جدایه‌ها اثر ضد میکروبی مناسبی بر روی این باکتری غذازاد داشته و اتصال آنرا به سلول‌های اپیتلیال روده محدود کردند [٤١]. اتصال به عوامل بیماری‌زا، اصلاح ساختار و عملکرد سلول‌های اپیتلیال روده و همچنین تولید برخی از متابولیت‌های بازدارنده از مکانیسم‌های اصلی بروز اثرات ضد میکروبی در مخمرهای پروبیوتیک محسوب می‌شوند. برخی از این متابولیت‌ها که توسط نژادهای مختلف مخمری تولید می‌شوند شامل ترکیبات فنولی، اتانول، اسیدهای آلی، دی‌اکسید کربن، پراکسید هیدروژن و مایکوسین‌ها می‌باشند [٤٢ و ٤٣]. اتصال میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به عوامل بیماری‌زا نیز می‌تواند مانع دسترسی این میکروارگانیسم‌ها به مواد غذایی، جلوگیری از اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده و همچنین تسهیل خروج آنها از دستگاه گوارش توسط حرکات روده شود [٤٤].



شکل۲. قابلیت دگر اتصالی مخمر غالب جدا شده از عسل طبیعی و اثر بازدارنده آن بر رشد باکتری‌های غذازاد مورد مطالعه. حروف کوچک متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار (p <۰/۰۵) بین مقادیر دگر اتصالی و همچنین حروف بزرگ متفاوت نیز مبیّن تفاوت معنی‌دار بین مقادیر اثر ضد باکتریایی جدایه مخمری می‌باشد.

Fig. 2. Co-aggregation and antibacterial capabilities of predominant yeast isolated from natural honey against studied food-borne bacteria. The different lowercase and uppercase letters indicate significant differences among co-aggregation and antibacterial activities of the selected yeast isolate, respectively.

٤-۳- بررسی قابلیت خوداتصالی و آبگریزی جدایه مخمری منتخب

در پژوهش حاضر، مقادیر خوداتصالی و آبگریزی مخمر *S. cerevisiae* به ترتیب برابر با ۰/۰٦ ± ۹۳/۸٦٪ و ۰/۱٦ ± ۷٦٪/۳٦ بود.

قابلیت خوداتصالی، توانایی یک میکروارگانیسم برای اتصال به نژادهای همنوع تعریف می‌شود که یکی از قابلیت‌های حائز اهمیت در میکرورگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشد [٤٥]. طبق نتایج پژوهشی که توسط Binetti و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی نژادهایی از مخمرهای *Kluyveromyces marxianus*، *S. cerevisiae*، *Clavispora lusitaniae* و *K. lactis* و *Galactomyces geotrichum* انجام گردید مشخص شد که قابلیت خوداتصالی جدایه‌های مذکور در حدود ۷۰-۱٦٪ متغیر بود [۲۳]. همچنین بر اساس پژوهش دیگری که توسط Díaz-Vergara و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شد نژادهایی از مخمر *K. marxianus* از مواد غذایی جدا شدند. این مخمرها قابلیت خود اتصالی حدود ۳۳/۰۲ تا ٤۱/٦٥٪ از خود نشان دادند که از قابلیت خوداتصالی جدایه‌های پژوهش حاضر کمتر بود [٤٦]. خوداتصالی در مخمرها پدیده پیچیده ای است که در فاز نمایی یا سکون رخ می‌دهد و تحت تاثیر

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

تفاوت در ترکیب دیواره سلولی و پروتئین‌های سطحی سلول قرار می‌گیرد و می‌تواند موجب بهبود اتصال میکروارگانیسم به سلول‌های اپیتلیال روده و بهبود لانه‌گزینی، تشکیل بیوفیلم و محافظت از دستگاه گوارش و همچنین ممانعت از اتصال میکروارگانیسم‌های نامطلوب به دستگاه گوارش شود [۴۷ و ۴۵].

بر اساس بررسی‌های انجام شده توسط Suvarna و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی چهار نژاد مخمری، مشخص شد بیشترین مقادیر آبگریزی مربوط به مخمرهای *Y. lipolytica* VIT-ASN04 و *P. barkeri* VIT-SJSN01 در برابر دی اتیل اتر و با مقادیر ۹۶٪ و ۷۴٪ بود [۲۴]. بر اساس نتایج پژوهش دیگری که توسط Diguță و همکاران در سال ۲۰۲۲ انجام شد مشخص گردید نژادهای مخمری جدا شده از مواد غذایی، آبگریزی متفاوتی از خود در برابر هگزان و زایلن نشان دادند که این مقدار بین ۵/۹۳٪ تا ۵۵/۴۳٪ متغیر بود [۴۸]. قابلیت آبگریزی میکروارگانیسم‌ها با قابلیت اتصال به سلول‌های اپیتلیال و لانه‌گزینی آن‌ها در دستگاه گوارش مرتبط است و می‌تواند موجب بهبود اثرات سلامتی بخش آن‌ها، طولانی‌تر شدن زمان اثرگذاری بر ایمنی دستگاه گوارش و همچنین ایجاد یک مانع در برابر لانه‌گزینی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا شود. همچنین قابلیت آبگریزی میکرورگانیسم‌ها ارتباط مستقیمی با سایر توانایی‌های اتصالی آنها مانند قابلیت خوداتصالی دارد و می‌تواند به عنوان مبنایی برای پی بردن به ظرفیت اتصالی میکروارگانسم‌های پروبیوتیک استفاده شود [۴۹ و ۵۰].

۵-۳- بررسی مقاومت به ترکیبات ضدقارچ و قابلیت همولیز خون

همانطور که در جدول۱ نیز مشخص است مطالعه مقاومت آنتی‌مایکوتیکی نشان داد که مخمر *S. cerevisiae* به‌شکل معنی‌داری (p <۰/۰۵) بیشترین حساسیت را نسبت به ناتامایسین از خود نشان داد. اگرچه این جدایه در برابر کتوکونازول نیز هاله عدم رشد تشکیل داد اما قطر هاله ایجاد شده کمتر از ۱۴ میلی‌متر بود و جدایه مذکور در برابر این ترکیب و سایر ترکیبات ضد قارچ مورد مطالعه شامل پروپیونات کلسیم، سوربات پتاسیم، ایتروکونازول و فلوکونازول مقاوم تلقی شد. همچنین این جدایه هیچ گونه فعالیت همولیزی نداشت.

جدول۱. مقاومت مخمر غالب جدا شده از عسل در برابر ترکیبات ضد قارچ. قطر هاله عدم رشد کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر: مقاوم، ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر: حساسیت نسبی و بیشتر از ۲۰ میلی‌متر: حساس. حروف متفاوت، نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح p <۰/۰۵ می‌باشد.

Table 1. Antimycotic susceptibility of the predominant yeast isolated from natural honey. Diameter of inhibition zone equal to 14, 15-17 and higher than 20 mm, respectively show resistance, intermediate and sensitive. The different letters indicate significant difference at p<0.05.

Antifungal compounds (concentration)	Inhibition zone diameter (mm)	Sensitivity
Ketoconazole (200 mg)	9.95 ± 0.21^{b}	Resistant
Natamycin (50 mg)	20.10 ± 0.42^{a}	Sensitive
Calcium propionate (60 mg)	0.00^{c}	Resistant
Potassium sorbate (60 mg)	0.00^{c}	Resistant
Itraconazole (100 mg)	0.00^{c}	Resistant
Fluconazole (150 mg)	0.00^{c}	Resistant

یکی از ویژگی‌های مهم مخمرهای پروبیوتیک، مقاومت آن‌ها به عوامل ضد قارچ است. این قابلیت به لحاظ کاربردی بودن مخمر پروبیوتیک در صنعت مواد غذایی همراه با نگهدارنده‌ها و همچنین در هنگام درمان با داروهای ضد قارچی حائز اهمیت است. Fernández-Pacheco و همکاران در سال ۲۰۲۱ مخمرهایی با قابلیت‌های پروبیوتیکی را از نظر حساسیت به عوامل ضد قارچ مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران مشاهده کردند که ترکیبات ضد قارچ

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

فلوکونازول و نیستاتین به ترتیب، کمترین و بیشترین تاثیر را بر مخمرهای مورد مطالعه داشتند [۵۱]. Qasim نیز در سال ۲۰۲۲ گونه‌هایی از مخمر *Rhodotorula* را از نظر حساسیت به ناتامایسین مورد بررسی قرار داد. نتایج این پژوهش نشان داد که هاله عدم رشد ایجاد شده توسط ناتامایسین در حدود ۳۰ میلی‌متر بوده و از اینرو مخمر *Rhodotorula* نسبت به این ترکیب کاملا حساس بود [۵۲]. از مکانیسم‌های رایج مخمرها برای مقاومت در برابر عوامل ضدقارچی می‌توان به اصلاح و یا تغییر نفوذپذیری غشا، جلوگیری از سنتز DNA و RNA و همچنین تغییر در بیان ژن اشاره نمود [۵۳-۵۵]. Oliveira Coelho و همکاران در سال ۲۰۱۹ ضمن جداسازی مخمر *S. cerevisiae* LPBF3 از نوشیدنی کفیر بر پایه عسل مشاهده نمودند که این مخمر فاقد فعالیت همولیزی بود [۵۶]. همچنین در پژوهش دیگری که بر روی فعالیت همولیزی مخمرهای جدا شده از مواد غذایی انجام گرفت مشخص شد که از میان نژادهای مورد مطالعه تنها مخمر *Candida metapsilosis* قادر به همولیز سلول‌های خونی بود [۵۷]. فعالیت همولیزی یکی از فاکتورهای مهم بیماری‌زایی در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بوده که می‌تواند سبب تسهیل دسترسی میکروارگانیسم به آهن و ایجاد کم‌خونی در میزبان شود. لذا بررسی این ویژگی در میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، ضروری و یکی از نخستین آزمون‌ها جهت تایید ایمنی آن‌ها می‌باشد [۵۸ و ۵۹].

۶-۳- بررسی اثر ضد قارچی جدایه منتخب

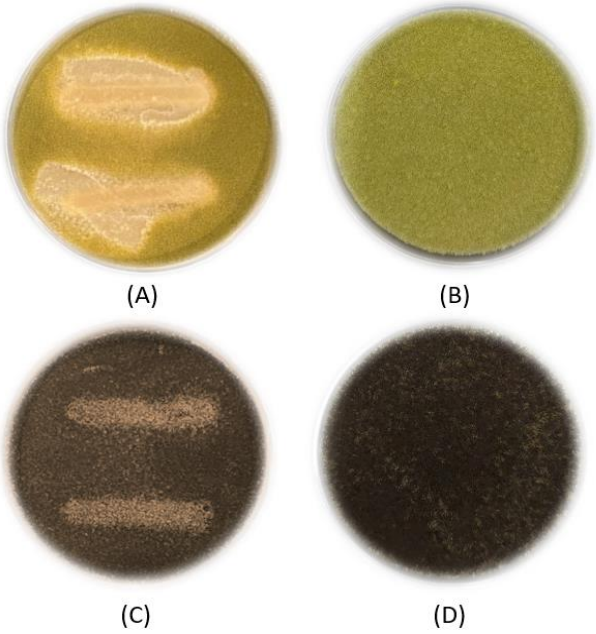
در شکل۳ اثر بازدارندگی مخمر *S. cerevisiae* بر روی قارچ‌های *A. flavus* و *A. niger* در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده می‌شود. همانطور که در این شکل مشهود است جدایه مخمری با ایجاد هاله شفاف در کشت دو لایه از قابلیت بازدارندگی مناسبی در برابر رشد *A. flavus* برخوردار بود و توانست موجب بازدارندگی ۱/۳۲ ± ۳۲/۱۸٪ رشد این قارچ شود. اگرچه این جدایه قابلیت ایجاد هاله عدم رشد در برابر قارچ *A. niger* را نداشت اما توانست مانع تغییر رنگ کامل قارچ مذکور به سیاه شود.

Ruggirello و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹ نژادهایی از مخمر *Saccharomyces* و *Candida* را از مواد غذایی جدا کرده و اثر ضد قارچی این مخمرها را بر قارچ‌های *Aspergillus* و *Penicillium* مورد بررسی قرار دادند. این محققین مشاهده کردند که مخمرهای مذکور، قابلیت ضد قارچی مناسبی از خود نشان داده و به طور میانگین موجب کاهش ۵۶/۱٪ رشد این قارچ‌ها شدند. همچنین این پژوهشگران، فعالیت ضد قارچی مخمرهای مذکور را به تولید متابولیت‌های پروتئینی مانند مایکوسین توسط آن‌ها مرتبط دانستند [۶۰]. da Cunha و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸ نژادهایی از مخمر *Candida stellimalicola* را به منظور مهار رشد قارچ *Penicilium italicum* در مرکبات مورد استفاده قرار دادند. محققین مذکور قابلیت ضد قارچی این مخمرها را به تولید آنزیم کیتیناز و همچنین ممانعت از جوانه‌زنی کنیدی‌های قارچ مرتبط دانستند [۶۱]. Kunyeit و همکاران (۲۰۱۹) قابلیت استفاده از دو مخمر پروبیوتیک *S. cerevisiae* KTPو ApC *Issatchenkia occidentalis* را به عنوان راهکاری برای مقابله با عفونت‌های قارچی شایع تایید نمودند. بر اساس نتیجه مطالعه این پژوهشگران، هر دو نژاد مخمری مذکور توانایی مهار اتصال به سلول‌های اپیتلیال کلون، تولید بیوفیلم و تشکیل هیف چهار نژاد *Candida* شامل *Candida tropicalis* MYA 3404، *Candida krusei*، *Candida glabrata* و *Candida parapsilosis* CDC317 را داشته و به این ترتیب موجب سرکوب بیماری‌زایی آن‌ها شدند [۶۲].Dikmetas و همکاران در سال ۲۰۲۳ گونه‌هایی از مخمرهای *Moesziomyces*، *Meyerozyma* و *Metschnikowia* را به منظور بررسی اثر ضد قارچی آن‌ها بر روی قارچ *A. flavus* مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران گزارش کردند که ترکیبات آلی فرار تولیدی توسط برخی از این مخمرها توانست موجب کاهش رشد میسلیوم و اسپورزایی قارچ مذکور تا حدود ۹۱٪ شود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

همچنین ترکیبات فرار تولید شده توسط مخمر *Metschnikowia fructicola* 1-UDM نیز تا حد زیادی قابلیت کاهش آفلاتوکسین تولیدی توسط قارچ مذکور را داشت [٦٣]. قارچ‌ها از تولید کنندگان اصلی سموم مهلک در مواد غذایی بوده که می‌توانند سبب ایجاد سرطان، نارسایی‌های کبدی و ناهنجاری‌های ژنتیکی برای انسان شوند و از اینرو کنترل آن‌ها در مواد غذایی از اهمیت بسزایی برخوردار است. امروزه با توجه به عوارض نامطلوب قارچ‌کش‌های صنعتی، تمایل به کنترل زیستی قارچ‌ها افزایش پیدا کرده است. مخمرها به دلیل غیرسمی بودن و داشتن ویژگی‌های کاربردی به عنوان عوامل کنترل زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. این میکروارگانیسم‌ها با مکانیسم‌هایی همانند تولید متابولیت‌های ضدقارچی، آنزیم‌هایی مثل کیتیناز، مایکوسین‌ها و همچنین رقابت بر سر مواد مغذی، قادر به کنترل زیستی قارچ‌ها می‌باشند [٦٦-٦٤].



شکل۳. اثر ضد قارچی مخمر جدا شده از عسل طبیعی به روش کشت دولایه در برابر *A. flavus* (A) و *A.niger* (C) در مقایسه با نمونه‌های کنترل (B and D).

Fig. 3. Antifungal effect of predominant yeast isolated from natural honey on *A. flavus* (A) and *A. niger* (C) compared to their corresponding controls (B and D) in overlay bioassay.

٤- جمع‌بندی

با توجه به اهمیت قابلیت‌های ضد میکروبی و پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از مواد غذایی، بررسی ویژگی‌های بالقوه این میکروارگانیسم‌ها برای استفاده در صنعت غذا اهمیت دو چندانی یافته است. از طرفی با در نظر گرفتن قابلیت‌های اتصال مناسب و مقاومت ذاتی مخمرهای پروبیوتیک نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، این میکروارگانیسم‌های مفید نیز از جایگاه ویژه‌ای در زیست فناوری مواد غذایی برخوردار شده‌اند. با در نظر گرفتن مخاطرات و محدودیت‌های مرتبط با استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی در صنعت غذا، معرفی جایگزین‌های زیستی مناسب نظیر مخمرهای پروبیوتیک نیز جالب توجه قرار گرفته است. در پژوهش حاضر، ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضد میکروبی مخمر غالب جدا شده از عسل مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، قابلیت‌های خود اتصالی، آبگریزی سطحی، دگر اتصالی و ضد باکتریایی مناسب این مخمر تایید شد. علاوه بر این، جدایه مذکور از اثرات ضد قارچی مناسبی نیز برخوردار بود. البته هنگام استفاده از این جدایه پروبیوتیک در مواد غذایی تخمیری باید جنبه‌های ایمنی و اثر مقابل آن با فلور میکروبی موجود در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

اکوسیستم غذایی نیز مد نظر قرار گیرد. بر این اساس می‌توان از جدایه مخمری مذکور به عنوان کشت محافظت کننده (کشت میکروبی با اثر بازدارنده بر عوامل مخاطره‌ساز میکروبی در ماده غذایی) و یا کشت همراه (کشت میکروبی غیر آغازگر که دارای قابلیت‌های متمایزی نسبت به کشت آغازگر بوده و لذا می‌تواند قابلیت‌های متفاوتی به محصول تولیدی اعطا نماید) در صنایع تخمیری استفاده نمود.

۵-منابع

[1] Zarali, M., Sadeghi, A., Jafari, S. M., & Sadeghi Mahoonak, A. (2022). Evaluation of antimicrobial and probiotic properties of the predominant LAB isolated from fermented germinated clover seed. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, *19*(123), 299-315.

[2] Kiadaliri, F., Sadeghi, A., Khomeiri, M., Kashaninejad, M., & Aalami, M. (2018). Evaluating the antimicrobial properties of *Lactobacillus brevis* isolated from whole barley sourdough. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, *15*(2), 247-57.

[3] Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Yeast as probiotics–*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & Therapeutics*, *26*(6), 767-778.

[4] Pașca, C., Mărghitaș, L. A., Matei, I. A., Bonta, V., Mărgăoan, R., Copaciu, F., Bobiș, O., Campos, M.G. & Dezmirean, D. S. (2021). Screening of some Romanian raw honeys and their probiotic potential evaluation. *Applied Sciences*, *11*(13), 5816.

[5] Zahoor, F., Sooklim, C., Songdech, P., Duangpakdee, O., & Soontorngun, N. (2021). Selection of potential yeast probiotics and a cell factory for xylitol or acid production from honeybee samples. *Metabolites*, *11*(5), 312.

[6] Sen, S., & Mansell, T. J. (2020). Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genetics and Biology*, *137*, 103333.

[7] Arévalo-Villena, M., Fernandez-Pacheco, P., Castillo, N., Bevilacqua, A., & Pérez, A. B. (2018). Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method. *LWT-Food Science and Technology*, *89*, 657-665.

[8] Begum, S. B., Roobia, R. R., Karthikeyan, M., & Murugappan, R. M. (2015). Validation of nutraceutical properties of honey and probiotic potential of its innate microflora. *LWT-Food Science and Technology*, *60*(2), 743-750.

[9] Tauber, J. P., Nguyen, V., Lopez, D., & Evans, J. D. (2019). Effects of a resident yeast from the honeybee gut on immunity, microbiota, and Nosema disease. *Insects*, *10*(9), 296.

[10] Khalafalla, G. M., Sadik, M. W., Ali, M. A., & Mohamed, R. S. (2019). Novel potential probiotics from gut microbiota of honeybees (*Apis mellifera*) in clover feeding season in Egypt. *Plant Archives (09725210)*, *19*(2).

[11] Chelucci, E., Chiellini, C., Cavallero, A., & Gabriele, M. (2023). Bio-functional activities of Tuscan bee pollen. *Antioxidants*, *12*(1), 115.

[12] Ebrahimi, M., A. Sadeghi, D. Rahimi, H. Purabdolah, and S. Shahryari (2021). Postbiotic and anti- aflatoxigenic capabilities of *Lactobacillus kunkeei* as the potential probiotic LAB isolated from the natural honey. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *13*(2): 343-355.

[13] Srinivas, B., Rani, G. S., Kumar, B. K., Chandrasekhar, B., Krishna, K. V., Devi, T. A., & Bhima, B. (2017). Evaluating the probiotic and therapeutic potentials of *Saccharomyces cerevisiae* strain (OBS2) isolated from fermented nectar of toddy palm. *Applied Microbiology and Technology*, *7*(1), 1-14.

[14] Jooyandeh, H., & Namazi, P. (2024). Evaluation of probiotic, antibacterial and safety properties of *Lacticaseibacillus rhamnosus* JCM 1136. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, *21*(149), 223-240.

[15] Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, *226*, 1065-1073.

[16] Ragavan, M. L., & Das, N. (2019). Optimization of exopolysaccharide production by probiotic yeast *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 using response surface methodology and its applications. *Annals of Microbiology*, *69*(5), 515-530.

[17] Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B., & Cosentino, S. (2017). *In vitro* screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. *LWT-Food Science and Technology*, *75*, 100-106.

[18] Danielski, G. M., Imazaki, P. H., de Andrade Cavalari, C. M., Daube, G., Clinquart, A., & de Macedo, R. E. F. (2020). *Carnobacterium maltaromaticum* as bioprotective culture *in vitro* and in cooked ham. *Meat Science*, *162*, 108035.

[19] Bauer, A. W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single diffusion method. *American Journal of Clinical Pathology*, *45*, 493-496.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

[20] 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. *International Journal of Food Microbiology*, *111*(3), 234-240.
[21] Romero-Luna, H. E., Hernández-Sánchez, H., Ribas-Aparicio, R. M., Cauich-Sánchez, P. I., & Dávila-Ortiz, G. (2019). Evaluation of the probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* Strain (C41) isolated from Tibicos by *in vitro* studies. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*, 794-800.
[22] Tayel, A. A., El-Tras, W. F., Moussa, S. H., & El-Agamy, M. A. (2013). Antifungal action of *Pichia anomala* against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and its application as a feed supplement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(13), 3259-3263.
[23] Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., & Suárez, V. (2013). Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, *115*(2), 434-444.
[24] Suvarna, S., Dsouza, J., Ragavan, M. L., & Das, N. (2018). Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Food Science and Biotechnology*, *27*, 745-753.
[25] Hébrard, G., Hoffart, V., Beyssac, E., Cardot, J. M., Alric, M., & Subirade, M. (2010). Coated whey protein/alginate microparticles as oral controlled delivery systems for probiotic yeast. *Journal of Microencapsulation*, *27*(4), 292-302.
[26] Alkalbani, N. S., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Olaimat, A. N., Liu, S. Q., Shah, N. P., ... & Ayyash, M. M. (2022). Assessment of yeasts as potential probiotics: A review of gastrointestinal tract conditions and investigation methods. *Journal of Fungi*, *8*(4), 365.
[27] Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 421.
[28] Shruthi, B., Deepa, N., Somashekaraiah, R., Adithi, G., Divyashree, S., & Sreenivasa, M. Y. (2022). Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. *Biotechnology Reports*, *34*, e00716.
[29] Saksinchai, S., Suzuki, M., Chantawannakul, P., Ohkuma, M., & Lumyong, S. (2012). A novel ascosporogenous yeast species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts associated with raw honey collected in Thailand. *Fungal Diversity*, *52*, 123-139.
[30] Silva, M. S., Arruda, L. M., Xavier, P. L., Ramírez, M. X. D., da Silveira, F. A., Santana, W. C., ... & Eller, M. R. (2020). Selection of yeasts from bee products for alcoholic beverage production. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*, 323-334.
[31] Echeverrigaray, S., Scariot, F. J., Foresti, L., Schwarz, L. V., Rocha, R. K. M., da Silva, G. P., ... & Delamare, A. P. L. (2021). Yeast biodiversity in honey produced by stingless bees raised in the highlands of southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, *347*, 109200.
[32] Ziuzia, P., Janiec, Z., Wróbel-Kwiatkowska, M., Lazar, Z., & Rakicka-Pustułka, M. (2023). Honey's yeast—new source of valuable species for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(9), 7889.
[33] Kahraman, T., Buyukunal, S. K., Vural, A., & Altunatmaz, S. S. (2010). Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. *Food Chemistry*, *123*(1), 41-44.
[34] Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Skoufos, I. & Bezirtzoglou, E. (2011). Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe*, *17*(6), 375-379.
[35] Kanpiengjai, A., Khanongnuch, C., Lumyong, S., Kummasook, A., & Kittibunchakul, S. (2020). Characterization of *Sporidiobolus ruineniae* A45. 2 cultivated in tannin substrate for use as a potential multifunctional probiotic yeast in aquaculture. *Journal of Fungi*, *6*(4), 378.
[36] Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, *58*, 56-66.
[37] Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., & Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(1), 130-180.
[38] Andrade, G. C., Andrade, R. P., Oliveira, D. R., Quintanilha, M. F., Martins, F. S., & Duarte, W. F. (2021). *Kluyveromyces lactis* and *Torulaspora delbrueckii*: Probiotic characterization, anti-*Salmonella* effect, and impact on cheese quality. *LWT-Food Science and Technology*, *151*, 112240.
[39] Menezes, A. G. T., de Sousa Melo, D., Ramos, C. L., Moreira, S. I., Alves, E., & Schwan, R. F. (2020). Yeasts isolated from Brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. *Microbial Pathogenesis*, *140*, 103969.
[40] Coutinho, J. O., Peixoto, T. S., de Menezes, G. C., Carvalho, C. R., Ogaki, M. B., Gomes, E. C., Rosa, C.A., Rosa, L.H., Arantes, R.M., Nicoli, J.R., Tiago, F.C., & Martins, F. S. (2021). *In vitro* and *in vivo* evaluation of the probiotic potential of Antarctic yeasts. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *13*(5), 1338-1354.
[41] Simões, L. A., Cristina de Souza, A., Ferreira, I., Melo, D. S., Lopes, L. A. A., Magnani, M., Schwan, R.F., & Dias, D. R. (2021). Probiotic properties of yeasts isolated from Brazilian fermented table olives. *Journal of Applied Microbiology*, *131*(4), 1983-1997.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

[42] Nascimento, B. L., Delabeneta, M. F., Rosseto, L. R. B., Junges, D. S., Paris, A. P., Persel, C., & Gandra, R. F. (2020). Yeast mycocins: a great potential for application in health. *FEMS Yeast Research*, *20*(3), foaa016.
[43] Menezes, A. G. T., Ramos, C. L., Cenzi, G., Melo, D. S., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2020). Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *12*, 280-288.
[44] Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, *226*, 1065-1073.
[45] Saito, K., Tomita, S., & Nakamura, T. (2019). Aggregation of *Lactobacillus brevis* associated with decrease in pH by glucose fermentation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *83*(8), 1523-1529.
[46] Díaz-Vergara, L., Pereyra, C. M., Montenegro, M., Pena, G. A., Aminahuel, C. A., & Cavaglieri, L. R. (2017). Encapsulated whey–native yeast *Kluyveromyces marxianus* as a feed additive for animal production. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *34*(5), 750-759.
[47] Stewart, G. G. (2018). Yeast flocculation—sedimentation and flotation. *Fermentation*, *4*(2), 28.
[48] Diguță, C. F., Mihai, C., Toma, R. C., Cîmpeanu, C., & Matei, F. (2022). *In vitro* assessment of yeasts strains with probiotic attributes for aquaculture use. *Foods*, *12*(1), 124.
[49] Wang, X., Li, W., Mahsa, G. C., Zhang, C., Ma, K., Rui, X., & Li, W. (2023). Co-cultivation effects of *Lactobacillus helveticus* SNA12 and *Kluveromyces marxiensis* GY1 on the probiotic properties, flavor, and digestion in fermented milk. *Food Research International*, *169*, 112843.
[50] Falah, F., Vasiee, A., Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Moradi, S., Mortazavi, S. A., & Roshanak, S. (2019). Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. *Microbial Pathogenesis*, *131*, 246-253.
[51] 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 in Nutrition*, *8*, 659328.
[52] Qasim, Z. S. (2022). The Antimycotic activity of Rosuvastatin. *Iraqi Journal of Pharmacy*, *19*(2), 84-92.
[53] Kanafani, Z. A., & Perfect, J. R. 2008. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, *46*(1), pp. 120-128
[54] 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. *International Journal of Food Microbiology*, *131*(2-3), pp. 178-182.
[55] Cernicka, j., Kozovska, Z., Hnatova, M., Valachovic, m., Hapala, I., Riedl, Z., Hajos, G., Subik, J. 2007. Chemosensitisation of drug-resistant and drug-sensitive yeast cells to antifungals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *29*(2), pp. 170-178.
[56] de Oliveira Coelho, B., Fiorda-Mello, F., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., de Carvalho, J. C., & Soccol, C. R. (2019). *In vitro* probiotic properties and DNA protection activity of yeast and lactic acid bacteria isolated from a honey-based kefir beverage. *Foods*, *8*(10), 485.
[57] Hsiung, R. T., Fang, W. T., LePage, B. A., Hsu, S. A., Hsu, C. H., & Chou, J. Y. (2021). *In vitro* properties of potential probiotic indigenous yeasts originating from fermented food and beverages in Taiwan. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *13*, 113-124.
[58] Vesterlund, S., Vankerckhoven, V., Saxelin, M., Goossens, H., Salminen, S., & Ouwehand, A. C. (2007). Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *International Journal of Food Microbiology*, *116*(3), 325–331.
[59] Kia, S., Sadeghi, A., Kashaninejad, M., Khomeiri, M., & Zarali, M. (2023). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus brevis* as the predominant LAB isolated from fermented amaranth. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, *19*(132), 65-76.
[60] Ruggirello, M., Nucera, D., Cannoni, M., Peraino, A., Rosso, F., Fontana, M., Cocolin, L., & Dolci, P. (2019). Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*, *115*, 519-525.
[61] da Cunha, T., Ferraz, L. P., Wehr, P. P., & Kupper, K. C. (2018). Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, *276*, 20-27.
[62] Kunyeit, L., Kurrey, N. K., Anu-Appaiah, K. A., & Rao, R. P. (2019). Probiotic yeasts inhibit virulence of non-*albicans Candida* species. *Molecular Biology & Microbiology*, *10*(5), e02307-19.
[63] Dikmetas, D. N., Özer, H., & Karbancıoglu-Guler, F. (2023). Biocontrol potential of antagonistic yeasts on *In Vitro* and *In Vivo Aspergillus* Growth and Its AFB_1 Production. *Toxins*, *15*(6), 402.
[64] Gil-Rodríguez, A. M., & Garcia-Gutierrez, E. (2021). Antimicrobial mechanisms and applications of yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, *114*, 37–72.
[65] Purabdolah, H., Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Kashaninejad, M., & Mohamadzadeh, J. (2022). Evaluation of probiotic and antifungal properties of

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

the predominant LAB isolated from fermented acorn (*Quercus persica*). *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, *19*(124), 171-183.
[66] Rahimi, D., Sadeghi, A., Kashaninejad, M., & Ebrahimi, M. (2024). Postbiotic characterization of a potential probiotic yeast isolate, and its microencapsulation in alginate beads coated layer-by-layer with chitosan. *Heliyon*, *10*(7).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of probiotic and antifungal properties of predominant yeast isolated from honey

Fatemeh Taheri[1], Alireza Sadeghi[1]*, Seid Mahdi Jafari[1,2], Sara Shahryari[1], Maryam Zarali[1]

1-Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2-Halal Research Center of IRI, Iran Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received:2024/6/5

Accepted:2024/9/20

Keywords:

Natural honey,
probiotic yeast,
adhesion capacity,
antibacterial effect,
antifungal activity.

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185.

*Corresponding Author E-

sadeghi.gau@gmail.com

ABSTRACT

Evaluation of probiotic properties of microorganisms isolated from stressful substrates has received considerable attention. Among probiotic microorganisms, yeasts are distinguished from lactic acid bacteria due to their bigger size, better adhesion ability, and resistance to antibiotics without the possibility of transferring resistance genes. In the present study, probiotic and antifungal properties of the predominant yeast isolated from natural honey were investigated. Sequencing results of the PCR products led to the identification of *Saccharomyces cerevisiae* as the predominant yeast isolated from honey. Moreover, the isolate had no hemolytic activity and showed the highest sensitivity towards natamycin among the studied antimycotic agents. In addition, although the yeast isolate had no proper survival under simulated gastrointestinal conditions, it had relatively high auto-aggregation (93.86%) and cell-surface hydrophobicity (76.36%). The highest co-aggregation ability of the isolate was also observed with Gram-positive bacteria *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, and the inhibition activity of the isolate against *B. cereus* was significantly (p<0.05) higher than those of the other studied food-borne bacteria. The yeast isolate also showed 32.18% antifungal effect on *Aspergillus flavus*. Accordingly, the predominant yeast isolated from honey has suitable capabilities for application as a protective culture in fermentation industries.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-24]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.185]