Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 5, Dec- Jan 2022, p. 575-588

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۱ ص.۵۸۸-۵۷۵

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Full Research Paper

Evaluation of probiotic and antifungal properties of the yeast isolated from buckwheat sourdough

Sara Shahryari[1], Alireza Sadeghi[1*], Maryam Ebrahimi[2], Alireza Sadeghi Mahoonak[1], Ali Moayedi[1]

Received: 2021.12.04
Revised: 2022.01.03
Accepted: 2022.01.16
Available Online: 2022.01.16

How to cite this article:
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 Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 575-588.

Abstract

Introduction: Evaluation of antimicrobial and probiotic properties of the microbiota isolated from fermented pseudo-cereals is important in order to prepare adjunct and starter cultures. Probiotics are live and active microorganisms that, if used in sufficient numbers, help the microbial balance of the gastrointestinal tract and improve its function. Probiotics are also used as a substitute for antibiotics and synthetic preservatives in the prevention and treatment of complications of many infectious and pathogenic gastrointestinal pathogens. Probiotic microorganisms include lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, and despite numerous reports on the probiotic properties of LAB, the probiotic properties of yeasts are less reported. Probiotic yeasts are organisms resistant to antibacterial compounds and effective against pathogens, which can rapidly increase their population in the gastrointestinal tract. These yeasts have several properties such as antimicrobial effects, resistance to acid and bile, binding to mucosal surfaces, inhibitory activity against pathogens and also the inability to transmit antibiotic resistance genes. In the present study, after isolation of the predominant yeast from buckwheat sourdough, the probiotic and antifungal properties of the isolate were investigated. Based on the literature review, no study has been presented to evaluate the probiotic and antifungal capabilities of yeasts isolated from buckwheat sourdough.

Materials and Methods: In the present study, predominant yeast was isolated from buckwheat sourdough, and then it was identified using PCR. Subsequently, probiotic properties of the isolate including survival in present of low pH and bile salt, antibacterial effect, antibiotic susceptibility assay, aggregation, hydrophobicity, haemolytic activity as well as its antifungal activity against *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* were studied. After spontaneous fermentation of buckwheat, predominant yeast was isolated using ten-fold dilution of the sourdough sample and its spread plating. The predominant isolate was identified through PCR amplification of a 650 bp target sequence from its ribosomal gene and sequencing of the PCR product. Then, survival of the yeast was determined at pH=2 and 0.3% bile salt as simulated gastrointestinal conditions. Subsequently, simultaneous culture of the yeast with some food-borne indicator bacteria in chromogenic media was used to investigate the inhibitory activity of the isolate against the studied bacteria. After that, resistance of the yeast isolate against the common antibiotics and some antimycotic agents was evaluated using disc method. Co-aggregation ability and hydrophobicity capability of the isolate were also determined based on the absorbance tests. In vitro safety of the yeast isolate was checked through its cultivation on blood agar containing sheep blood. Next stage, overlay bioassay was conducted to investigate antifungal effect of the yeast on the selected fungi. Finally, one way analysis of variance (ANOVA) with the least significant differences (LSD) post hock at $p<0.05$ was used for statistical analysis of the data.

Results and Discussions: Sequencing results of the PCR products led to the identification of *Pichia kudriavzevii* as predominant yeast isolated from buckwheat sourdough. Survival rate of the isolate after treatment in simulated

1. Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gonrgan, Iran.
2. Health Research Center of Food, Drug and Natural Products, Golestan University of Medical Science, Gonrgan, Iran.
(*Corresponding Author Email: Sadeghi.gau@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74006.1119

gastrointestinal conditions was 79.26% in comparison with the control. Antibacterial effect of the isolate on *Escherichia coli* was also significantly (P<0.05) higher than the other studied food-borne agents. Meanwhile, the growth of *Listeria monocytogenes* was decreased 19.50% in the present of the isolate. Whereas, the yeast isolate had no inhibitory effect on *Salmonella enterica*. Hydrophobicity and auto-aggregation capabilities of the isolate were also 64.07 and 67.40%, respectively. Furthermore, the isolate showed resistance towards all of the antibiotics tested, while it was resistant against ketoconazole and fluconazole, and the yeast was semi-sensitive towards itraconazole as antimycotic agents. The yeast isolate had no hemolytic activity, and its antifungal activity against *A. niger* and *A. flavus* was also verified. Accordingly, it is concluded that *P. kudriavzevii* isolate exhibits proper potential to be used as probiotic or protective culture in fermentation industries.

In accordance with the results, probiotic characteristics of *P. kudriavzevii* (as the predominant yeast isolated from buckwheat sourdough) were approved. Accordingly, the isolate can be used as a potential probiotic culture in food industries.

Keywords: Yeast isolate, Buck wheat sourdough, Probiotic properties, Antifungal effect.

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۱ ص.۵۸۸-۵۷۵

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 5, Dec- Jan 2022, p. 575-588

مقاله علمی-پژوهشی

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمر جدا شده از خمیرترش باکویت

سارا شهریاری[۱]- علیرضا صادقی[۱*]- مریم ابراهیمی[۲]- علیرضا صادقی ماهونک[۱]- علی مویدی[۱]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶

چکیده

ارزیابی خصوصیات ضدمیکروبی و پروبیوتیکی فلورمیکروبی جدا شده از شبه غلات تخمیرشده جهت تامین کشت‌های میکروبی همراه و آغازگر از اهمیت به سزایی برخوردار است. در این پژوهش، مخمر غالب از خمیرترش باکویت، جداسازی و با استفاده از PCR شناسایی گردید. سپس ویژگی‌های پروبیوتیکی و همچنین اثر ضدقارچی این جدایه مخمری بر روی *Aspergillus niger* و*Aspergillus flavus* مورد مطالعه قرارگرفت. توالی‌یابی محصولات PCR منجر به شناسایی مخمر *Pichia kudriavzevii* به‌عنوان جدایه مخمری خمیرترش باکویت شد. نرخ زنده‌مانی جدایه مذکور پس از تیمار متوالی اسید و صفرا در مقایسه با نمونه شاهد ۷۹/۲۶ درصد بود. همچنین اثر ضدباکتریایی آن در برابر *Escherichia coli* نسبت به سایر عوامل غذازاد مورد مطالعه به شکل معنی داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر بود. با این حال، رشد *Listeria monocytogenes* در حضور جدایه مخمری ۱۹/۵۰ درصد کاهش یافت اما این جدایه، اثر بازدارنده‌ای بر *Salmonella entrica* نداشت. قابلیت‌های آبگریزی و خوداتصالی جدایه مذکور نیز به‌ترتیب، ۶۴/۰۷ و ۶۷/۴۰ درصد تعیین گردید. علاوه بر این، جدایه مخمری نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، مقاومت نشان داد اما در برابر آنتی‌مایکوتیک‌های کتوکونازول و فلوکونازول، مقاوم و همچنین نسبت به ایتراکونازول دارای حساسیت نسبی بود. این جدایه مخمری، فاقد فعالیت همولیتیکی بود و اثر ضدقارچی آن در برابر *A. niger* و *A. flavus* نیز مورد تایید قرار گرفت. بر این اساس، جدایه *P. kudriavzevii* از قابلیت مناسبی برای استفاده به‌عنوان کشت پروبیوتیک و یا محافظت کننده در صنایع تخمیری برخوردار می باشد.

واژه‌های کلیدی: جدایه مخمری، خمیرترش باکویت، ویژگی‌های پروبیوتیکی، اثر ضدقارچی.

مقدمه

مخمرها گروه بزرگ و غیریکنواختی از میکروارگانیسم‌های یوکاریوتی متعلق به رده آسکومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها هستند که به نحو گسترده‌ای در فراورده‌های غذایی تخمیری و زیستگاه‌های طبیعی وجود دارند (Rima et García-Hernández et al., 2012 ; al., 2012). مخمرها تاریخچه طولانی از ایمنی و کاربردهای فناورانه در صنایع غذایی داشته و در تولید فراورده‌های تجاری نظیر غذاها و نوشیدنی‌ها، ترکیبات غذا- دارویی و همچنین آنزیم‌های صنعتی حائز اهمیت هستند (Moslehi Jenabian et al., 2010). این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به‌عنوان کشت‌های آغازگر برای تخمیر غذاهای مختلف مورد استفاده قرار گرفته و سبب بهبود ویژگی‌های حسی محصولات تخمیری نظیر طعم و بوی آنها گردند. این اثرات ناشی از فعالیت‌های متابولیکی آنزیم‌هایی مانند استرازها و لیپازها هستند که از مخمرها منشا می‌گیرند (Bevilacqua et al., 2012 ; Arroyo López et al., 2012). پروبیوتیک به میکروارگانیسم زنده و فعالی اطلاق می‌شود که در صورت استفاده به تعداد کافی به توازن میکروبی دستگاه گوارش، کمک کرده و سبب بهبود عملکرد آن می شود. پروبیوتیک‌ها همچنین به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های سنتزی در پیشگیری و درمان عوارض بسیاری از عوامل عفونی و بیماری‌زای دستگاه گوارش مورد استفاده قرار می گیرند (Saad et al., 2013, Saarela et al., 2000). میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، شامل باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها هستند و علیرغم وجود گزارش‌های متعدد در خصوص قابلیت‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک، ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمرها کمتر گزارش شده است. مخمرهای پروبیوتیک، ارگانیسم‌های مقاوم به ترکیبات ضدباکتریایی و موثر در برابر عوامل

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- مرکز تحقیقات سلامت فراورده‌های غذایی، دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: Sadeghi.gau@gmail.com
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74006.1119

بیماری‌زا هستند که می‌توانند به‌سرعت جمعیت خود را در دستگاه گوارش افزایش دهند (Fernandez-Pacheco et al., 2018). این مخمرها از ویژگی‌های متعددی نظیر خاصیت ضدمیکروبی، مقاومت به اسید و صفرا، اتصال به سطوح مخاطی، فعالیت بازدارنده علیه عوامل بیماری‌زا و همچنین عدم قابلیت انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک برخوردارند (Andrabi et al., Bajaj et al., 2021 ;2016). البته Czerucka و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که برخی از سویه‌های مخمری قادر به کاهش محتوای مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی و در دستگاه گوارش هم هستند (Czerucka et al., 2007).

باکویت متعلق به جنس فاگوپیروم و خانواده پلی‌گوناسه، یکی از شبه‌غلات است که حاوی طیف وسیعی از ترکیبات مغذی و زیست فعال نظیر پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و مواد معدنی می‌باشد (Zhu, 2016). تاکنون گزارش‌هایی در خصوص ویژگی‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمرهای جدا شده از غلات و شبه غلات تخمیر شده ارائه گردیده است. به‌عنوان مثال، Moroni و همکاران (۲۰۱۱) طی بررسی جمعیت میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها در تخمیر تصادفی باکویت، نشان دادند که مخمر *Kazachstania barnetti* تنها مخمر جدا شده از باکویت تخمیر شده بود. محققین مذکور از این مخمر به‌عنوان کشت آغازگر جهت تولید نان‌های فاقد گلوتن استفاده نمودند (Moroni et al., 2011). Perricone و همکاران (۲۰۱۴) پس از ارزیابی خصوصیات فناوری مخمرهای جدا شده از خمیرترش آلتامورا دریافتند که ۱۸ جدایه دارای فعالیت آنزیمی مناسبی بوده و به‌همین منظور جهت تعیین خصوصیات پروبیوتیکی مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج نشان داد که دو سویه از *Saccharomyces cerevisiae* دارای بیشترین زنده‌مانی در pH=۲/۵ و حضور نمک‌های صفراوی بودند. همچنین جدایه‌های مذکور از مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فعالیت ضدمیکروبی مناسبی در مقابل عوامل بیماری‌زای غذازاد برخوردار بودند و به‌عنوان کشت آغازگر در فرآوری محصولات بر پایه غلات انتخاب گردیدند (Perricone et al., 2014).

Greppi و همکاران (۲۰۱۷) خصوصیات پروبیوتیکی مخمر *P. kudriavzevii* را مورد آزمون قرار دادند که بهترین نتایج را در pH=۲ و نمک صفراوی ۰/۳ درصد از خود نشان داد. نرخ زنده‌مانی مخمر مذکور پس از تیمار در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان در محدوده ۱۱ الی ۴۵ درصد بود درحالی‌که میزان خود اتصالی (Auto-aggregation) آن بین ۱۲ الی ۴۰ درصد گزارش گردید. همچنین سویه‌های مخمری مورد آزمون قادر به تولید فولات بودند و اثرات مثبت تغذیه‌ای و پروبیوتیکی بر مصرف‌کننده داشتند (Greppi et al., 2017). Chelliah و همکاران (۲۰۱۴) ضمن شناسایی و ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی مخمر *P. kudriavzevii* توسط تکنیک PCR به کمک پرایمرهای *18S rRNA* گزارش کردند که مخمر مذکور در برابر غلظت‌های فیزیولوژیک نمک‌های صفراوی، پپسین و آنزیم پانکراتین از خود مقاومت نشان داد و از قابلیت‌های خوداتصالی و دگراتصالی مناسبی نیز برخوردار بود. همچنین مخمر مورد آزمون حدود ۷۵ درصد آبگریزی در تولوئن و ۵۹ درصد آبگریزی در زایلن داشت و از رشد ۱۳ عامل بیماری‌زا ممانعت نمود و در برابر ۳۰ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی نیز مقاومت نشان داد. این مخمر و متابولیت‌های آن دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۲ ساعت تحمل کرد و لذا به‌عنوان کشت بالقوه آغازگر یا همراه پروبیوتیک در محصولات تخمیری و فراورده‌های غذایی گرمادیده معرفی شد. سویه‌های مخمری همچنین قادر به بهبود فلور میکروبی روده، اصلاح متابولیسم و عملکرد سیستم ایمنی بدن بوده و دارای اثرات ضدالتهابی و ضد تکثیر سلول‌های سرطانی بودند. سویه‌های مخمری *P. kudriavzevii* متابولیت‌هایی ترشح می‌کنند که فعالیت ضدسرطانی در روده بزرگ انسان داشته و این اثر را از طریق القا آپوپتوز به‌عنوان مکانیسم اصلی از خود بروز می‌دهند (Chelliah et al., 2016).

Sakandar و همکاران (۲۰۱۸) ضمن جداسازی و ارزیابی قابلیت تجزیه گلوتن توسط *Wickerhamomyces anomalus* و همچنین بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی مخمر جدا شده از تخمیر تصادفی خمیرترش نتیجه گرفتند که مخمر مذکور، قادر به تحمل pH پایین و نمک صفراوی و همچنین دارای ویژگی‌های آبگریزی در مقایسه با سایر سویه‌های تجزیه کننده گلوتن بود و لذا از آن به‌عنوان سویه پروبیوتیک برای تخمیر خمیرترش استفاده شد (Sakandar et al., 2018). Palla و همکاران (۲۰۱۹) پس از مطالعه مخمرهای ذاتی خمیرترش توسکان به‌عنوان کشت آغازگر برای تولید نوشیدنی‌های عملگرا بر پایه غلات، ۷۸ سویه را به‌صورت تصادفی انتخاب کرده و مورد ارزیابی مولکولی قرار دادند. محققین مذکور، گزارش کردند که مخمرهای *S. cerevisiae* و *Kazachstania humilis* به‌ترتیب در این خمیرترش غالب بودند. همچنین پس از تخمیر آرد گندم تحت شرایط استاندارد، مشخص شد که هر دو سویه مذکور دارای فعالیت فیتازی بودند و مخمر *S. cerevisiae* قادر به افزایش حجم خمیر بود در حالی‌که مخمر *K. humilis* تنها گونه‌ای بود که توانست غلظت اسیدهای آمینه آزاد را افزایش دهد (Palla et al., 2019). Greppi و همکاران (۲۰۱۵) ضمن مطالعه قابلیت پروبیوتیکی سویه‌های مخمر *Pichia* و ارزیابی توانایی افزایش محتوای فولات در غذاهای تخمیری آفریقایی بر پایه غلات دریافتند که از بین ۹۳ سویه مخمری جدا شده فقط سویه منتخب *P. kudriavzevii* دارای قابلیت‌های

پروبیوتیک مناسب بود و لذا از آن در تخمیر ارزن مرواریدی به همراه *Lactobacillus fermentum* با هدف بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای استفاده شد (Greppi et al., 2015). علاوه بر این، Pedersen و همکاران (۲۰۱۲) پس از بررسی جمعیت میکروبی و قابلیت‌های پروبیوتیکی مخمرهای جدا شده از فورا (محصول تخمیر تصادفی ارزن مرواریدی)، مشخص گردید که مخمرهای *Candida krusei*، *Kluyveromyces marxianus*، *Candida tropicalis*، *Candida fabianii* و *Trichosporon asahii* غالب بودند. همچنین سویه های مذکور به دلیل دارا بودن قابلیت‌های ذاتی پروبیوتیکی، به‌عنوان کشت‌های آغازگر مورد استفاده قرار گرفتند (Pedersen et al., 2012).

در پژوهش حاضر، پس از جداسازی مخمر غالب خمیرترش باکویت، خصوصیات پروبیوتیکی و ضدقارچی جدایه مذکور مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس بررسی منابع صورت گرفته، تاکنون مطالعه‌ای در خصوص ارزیابی قابلیت‌های پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمرهای جدا شده از خمیرترش باکویت ارائه نشده است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌های غذازاد مورد استفاده در این مطالعه شامل *E. coli* PTCC 1399، *Staphylococcus aureus* PTCC 1112، *L. monocytogenes* PTCC 1298، *S. enterica* PTCC 1709، *A. niger* PTCC 5012 و *A. flavus* PTCC 5018 از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. محیط‌های کشت میکروبی و مواد شیمیایی مصرفی نیز از شرکت Merck (آلمان)، خریداری گردیدند. برای تهیه آرد کامل باکویت (کیان فود–ایران) از دستگاه آسیاب (آسان توس شرق، ایران) و سپس الک با مش۵۰ استفاده شد. پس از تهیه آرد باکویت، ویژگی های آن شامل محتوای چربی، پروتئین، رطوبت، خاکستر و کربوهیدرات کل بر اساس روش‌های استاندارد تعیین گردید (AACC, 2010).

تخمیر تصادفی باکویت

تخمیر تصادفی باکویت (بدون افزودن کشت آغازگر) از مخلوط ۱۰۰ گرم آرد باکویت و۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل با بازده خمیر (نسبت خمیر به آرد ×۱۰۰) معادل ۲۰۰ در ظروف استریل تهیه شد. سپس مخلوط مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس مقادیر pH و اسیدیته قابل تیتر آن تعیین شد. بدین منظور ۱۰ گرم نمونه با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شده و به کمک سود ۰/۱ نرمال تا pH معادل ۸/۵ تیتر گردید و سرانجام مقدار حجم سود مصرفی حاکی از میزان اسیدیته قابل تیتر بر حسب اسید لاکتیک بود (Angelov et al., 2005; Moroni et al., 2011).

جداسازی و شناسایی جدایه مخمری

برای جداسازی مخمر غالب خمیرترش باکویت از رقت‌سازی متوالی و کشت سطحی خمیرترش حاصل از تخمیر تصادفی در محیط کشت اختصاصی Yeast Glucose Chloroamphenicle agar (YGC) استفاده شد. سپس از پرگنه‌های مذکور، کشت خطی تهیه گردید و پرگنه‌های خالص به‌دست آمده بر اساس خصوصیات فنوتیپی بررسی شدند. در ادامه DNA جدایه مخمری، با استفاده از کیت تجاری (Geneall، کره جنوبی) استخراج شد و توسط PCR دارای پرایمرهای ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) و ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)، تکثیر و متعاقبا محصولات PCR (توالی ۶۵۰ جفت بازی)، توسط شرکت پیشگام (ایران) توالی‌یابی گردید. پس از بهینه‌یابی 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 (Biorad، آمریکا) صورت گرفت. در مرحله اول تکثیر توالی هدف، واسرشت DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، آغاز گشته و طی ۳۰ چرخه با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه ادامه یافت. سرانجام، مرحله تکثیر انتهایی نیز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه پیدا کرد. پس از ژل الکتروفورز محصولات PCR در آگارز ۱/۵ درصد در بافر Tris boric acid EDTA (TBE)، به‌منظور شناسایی جدایه مخمری، محصولات PCR پس از توالی‌یابی با استفاده از رویه Blast با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI همردیف گردیدند (White et al., 1990).

زنده‌مانی جدایه مخمری پس از تیمار متوالی اسید و صفرا

ابتدا جمعیت جدایه مخمری به 10^8 واحد تشکیل دهنده پرگنه بر میلی‌لیتر (CFU/mL) تنظیم گردید (برای تنظیم جمعیت مخمر از روش کدورت‌سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر در مقایسه با منحنی استاندارد با تعیین ضریب تصحیح حاصل از کشت سطحی استفاده گردید). سپس pH محیط کشت حاوی این جدایه با استفاده از اسید

کلریدریک ۱ نرمال به حدود ۲ رسانده شد. در ادامه، سوسپانسیون مخمری به مدت ۱/۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس سوسپانسیون مذکور به مدت ۱/۵ ساعت در مجاورت نمک صفراوی با غلظت ۰/۳ درصد و pH معادل ۸ قرار داده شد. در مرحله بعد، رقت‌های متوالی از محلول مذکور در رینگر استریل، تهیه و به صورت سطحی بر روی محیط کشت YGC agar کشت داده شد. نهایتاً تعداد مخمر زنده پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با نمونه شاهد (بدون تیمار اسید و صفرا) مشخص گردید (Rolim et al., 2015).

اثرات ضدباکتریایی جدایه مخمری با استفاده از محیط‌های کشت کروموژنیک

برای بررسی اثر ضد باکتریایی جدایه مخمری در برابر *L. monocytogenes*، *E. coli*، *S. enterica* و *S. aureus* از کشت توام آن‌ها بر روی محیط‌های کشت کروموژنیک استفاده شد. بدین منظور، پس از تهیه کشت تازه ۲۴ ساعته از میکروارگانیسم‌های مذکور و تنظیم جمعیت آن‌ها، مخمر منتخب با نسبت و جمعیت یکسان با هر یک از باکتری‌های غذازاد، مخلوط گردیده و سپس مخلوط مذکور به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. در ادامه با تهیه رقت‌های متوالی از این سوسپانسیون در محیط کشت کروموژنیک، کشت سطحی داده شد و به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. پس از طی زمان مذکور، تعداد کلنی‌ها شمارش و با تعداد کلنی‌های نمونه شاهد که فقط حاوی عامل بیماری‌زا بود، مقایسه گردید (Danielski et al., 2017).

قابلیت خود اتصالی

برای ارزیابی قابلیت خود اتصالی جدایه مخمری، سلول‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته آن توسط سانتریفوژ یخچال‌دار (یونیورسال، ایران) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و برای ۵ دقیقه جدا و طی دو مرحله با بافر فسفات استریل، شستشو داده شد. سپس ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمر (حاوی جمعیت 10^5 CFU/mL) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در مرحله بعد، جذب نوری سوسپانسیون در زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر (Cecil، انگلستان) تعیین شد و نهایتا میزان قابلیت خود اتصالی بر اساس رابطه ۱ محاسبه گردید. در این رابطه A_t مقدار جذب پس از ۲۴ ساعت و A_0 مقدار جذب در زمان صفر است (Gil-Rodriguez et al., 2015).

$$[1-(A_t/A_0)] \times 100 \quad (۱)$$

تعیین میزان آبگریزی جدایه مخمری

به‌منظور ارزیابی قابلیت آبگریزی جدایه مخمری، ابتدا سلول‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته جدایه مذکور توسط سانتریفوژ یخچال‌دار (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و برای ۵ دقیقه) جدا گردید. پس از تنظیم جمعیت جدایه مخمری به 10^5 CFU/mL، سه میلی‌لیتر از سوسپانسون مخمری با یک میلی‌لیتر زایلن مخلوط شده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و به‌مدت ۳- ۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس جذب روماند مخلوط مذکور در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانش شده و بر اساس رابطه ذیل، میزان آبگریزی جدایه محاسبه گردید. در این رابطه، OD_0 مقدار جذب در زمان صفر و OD مقدار جذب پس از سه ساعت است (Zullo and Ciafardini, 2019)

$$[(OD_0-OD)/OD_0]-100 \quad (۲)$$

مقاومت آنتی‌بیوتیکی و آنتی‌مایکوتیکی

مقاومت جدایه مخمری در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج شامل استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، ونکومایسین، سفازولین، سفتریاکسون، سفالوتین، آمپی‌سیلین، ایمی‌پنم و پنی‌سیلین با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین مقاومت این مخمر نسبت به برخی از ترکیبات آنتی‌مایکوتیک شامل ایتراکونازول، کتوکونازول، فلوکونازول، ناتامایسین، سوربات پتاسیم و پروپیونات کلسیم نیز بررسی شد. بدین منظور ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته جدایه مخمری به ۴ میلی‌لیتر محیط کشت YGC یک درصد آگار (دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد) افزوده شد و سپس بر روی پلیت‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط YGC agar ۱/۵ درصد منتقل گردید. در ادامه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی سطح این پلیت‌ها قرار گرفتند و پلیت‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. نهایتاً قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک ها 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).

قابلیت همولیز خون

برای این منظور، جدایه مخمری بر روی سطح محیط کشت Blood agar حاوی ۵ درصد خون گوسفندی، کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ایجاد هاله

و تغییر رنگ در محیط کشت بررسی گردید (Suvarna et al., 2018).

اثر ضدقارچی

بدین منظور، ابتدا جدایه مخمری در محیط YGC agar با روش اسپات (لکه‌گذاری) کشت داده شد و سپس سوسپانسیون اسپور قارچ‌های غذازاد *A. niger* و *A. flavus* (10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر) به صورت لایه دوم به همراه Potato Dextrose Agar (PDA) بر روی آنها ریخته شده و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. در انتها قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف مخمر کشت داده شده اندازه‌گیری شد (Magnusson et al., 2003).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نتایج حاصل از این پژوهش به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شده و برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰) و برای ترسیم نمودارها از Microsoft Office Excel 2016 استفاده گردید. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح $p<0/05$ انجام گرفت و نتایج به صورت "میانگین ± انحراف معیار" گزارش شدند.

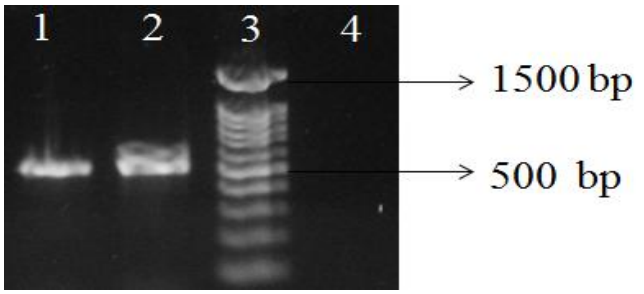
نتایج و بحث

آرد باکویت مورد استفاده در این پژوهش، دارای ۴/۱۳ درصد چربی، ۱۲/۰۲ درصد پروتئین، ۲/۰۹ درصد خاکستر، ۱۲/۶۰ درصد رطوبت و ۶۹/۱۶ درصد کربوهیدرات کل بود. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تخمیر خمیرترش باکویت، اسیدیته قابل تیتر خمیرترش به ۲/۳ رسید. پس از رقت‌سازی و کشت خمیرترش باکویت، یک مخمر بیضوی کشیده با حالت خامه‌ای به‌عنوان مخمر غالب از خمیرترش باکویت جدا شد. تکثیر توالی هدف ۶۵۰ جفت بازی از ژنوم جدایه مخمری مذکور توسط ژل الکتروفورز محصولات PCR مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱). توالی‌یابی محصولات PCR در مقایسه با داده های موجود در بانک جهانی ژن نیز منجر به شناسایی *P. kudriavzevii* SB01 (۹۸ درصد تشابه) به‌عنوان جدایه مخمری غالب خمیرترش باکویت شد.

بعد از تنظیم جمعیت جدایه مخمری (10^8 CFU/mL)، میزان زنده‌مانی آن پس از تیمار متوالی اسید و صفرا، معادل ۵/۱۷ ± ۷۹/۲۶ درصد بود. نتایج آزمون ضدباکتریایی جدایه مخمری در شکل ۲ نشان داده شده است. اثر بازدارندگی جدایه مخمری بر روی هر چهار شاخص باکتریایی مورد مطالعه به شکل معنی‌داری ($p<0/05$) متفاوت بود. این اثر به‌ترتیب بر روی *E. coli*، *L. monocytogenes* و *S. aureus* کاهش یافت و بر روی *S. enterica* هیچ‌گونه اثر بازدارندگی مشاهده نشد.

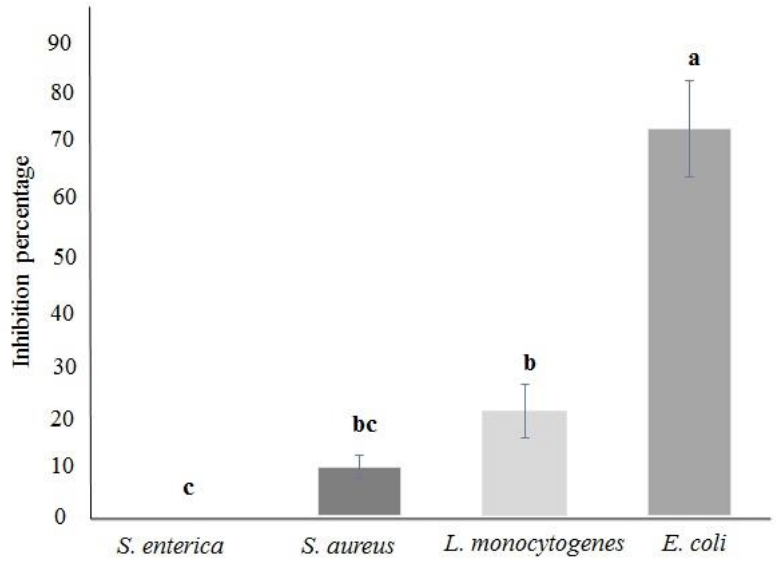
بر اساس نتایج به‌دست آمده، میزان قابلیت خود اتصالی جدایه مخمری ۲/۹۶ ± ۶۷/۴۰ درصد و میزان آبگریزی آن ۰/۰۲ ± ۶۴/۰۷ درصد بود. همچنین جدایه مخمری در برابر تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، مقاوم بود. نتایج مقاومت آنتی‌مایکوتیکی جدایه مخمری نیز در جدول ۱ آمده است. بر این اساس، جدایه مذکور در برابر آنتی مایکوتیک‌های رایج مانند کتوکونازول و فلوکونازول، مقاوم و در برابر ایتراکونازول و ناتامایسین، نیمه حساس و در مقابل سوربات پتاسیم و پروپیونات کلسیم، مقاوم بود.

نتایج پژوهش حاضر همچنین نشان داد که جدایه مخمری مورد مطالعه، فاقد هر گونه فعالیت همولیزی بود. اثر ضدقارچی جدایه مخمری بر روی *A. niger* نیز بعد از پنج روز گرمخانه‌گذاری در مقایسه با نمونه کنترل (شکل ۳)، مشهود بود به نحوی که این جدایه ۷/۵۳ ± ۲۸/۹۳ درصد از رشد قارچ مذکور جلوگیری کرد. همچنین اثر ضدقارچی جدایه مخمری بر روی *A. flavus* نیز منجر به ۱۰/۸۳ ± ۳۳/۸۸ درصد کاهش رشد آن شد.



شکل ۱- ژل الکتروفورز محصولات PCR. لاین ۱: جدایه مخمری، لاین۲: کنترل مثبت، لاین ۳: لدر، لاین ٤: کنترل منفی.

Fig. 1. Gel electrophoresis of PCR products. Line 1: yeast isolate, line 2: positive control, line 3: DNA ladder, line 4: negative control.



شکل ۲- قطر هاله عدم رشد عوامل باکتریایی غذازاد در حضور مخمر *Pichia kudriavzevii* جدا شده از خمیرترش باکویت.
حروف ناهمسان، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد.

Fig. 2. The diameter of inhibition zone against foodborne bacteria in the presence of Pichia kudriavzevii isolated from buckwheat sourdough. Different letters indicate significant difference at P<0.05.

جدول ۱- مقاومت مخمر *Pichia kudriavzevii* جدا شده از خمیرترش باکویت در برابر برخی از ترکیبات آنتی‌مایکوتیک
Table 1- Resistance of *Pichia kudriavzevii* isolated from buckwheat sourdough against some anti-mycotic compounds

قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) Diameter of inhibition zone (mm)	میزان حساسیت Susceptibility	آنتی‌مایکوتیک (میکروگرم ماده موثره) antimycotic agents (microgram per disc)
14.188± 2.766[ab]	حساسیت نسبی intermediate	ایتراکونازول (10) Itraconazole
12.847± 0.050[b]	مقاوم resistant	فلوکونازول (15) Fluconazole
11.098± 0.176[c]	مقاوم resistant	کتوکونازول (20) Ketoconazole
0	مقاوم resistant	سوربات پتاسیم (60) Potassium Sorbate
0	مقاوم resistant	پروپیونات کلسیم (60) Calcium Propionate
15.068± 2.052[a]	حساسیت نسبی intermediate	ناتامایسین (30) Natamycin

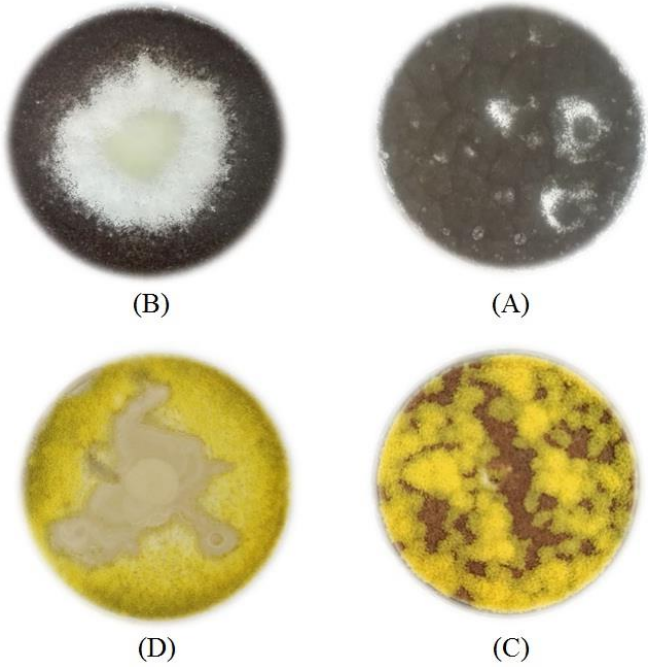
*حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد.
*Different letters indicate significant difference at P<0.05.

استفاده از باکویت تخمیر شده، یعنی باکویتی که با بازده خمیر معین، تحت شرایط تخمیر قرار می‌گیرد (Zielinski et al., 2019; Ahmed et al., 2014) به‌عنوان سوبسترای تخمیر به‌منظور جداسازی کشت‌های میکروبی مناسب (ضدمیکروب و پروبیوتیک) کمتر گزارش شده است. در این پژوهش، *P. kudriavzevii* جدا شده به‌عنوان جدایه مخمری غالب خمیرترش باکویت دارای قابلیت‌هایی نظیر اثرات ضدمیکروبی، توانایی زنده‌مانی پس از تیمار متوالی اسید و صفرا و الگوی مقاومت آنتی‌مایکوتیکی مشخصی بود. طی مطالعات

اخیر، گونه غالب خمیرترش باکویت پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، *K. barnetti* گزارش گردید (Moroni et al., 2011). در پژوهش دیگری نیز خمیرترش باکویت با بازده خمیر ۲۷۵ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تخمیر گردید اما از آن هیچ گونه مخمری جدا نشد (Moroni et al., 2011). بنابراین، سوبسترا و شرایط تخمیر بر تفاوت مخمرهای غالب جدا شده موثر هستند. البته تنوع فلور میکروبی بومی دانه غلات و آرد آنها، تحت تاثیر شرایط کشت و نگهداری نیز قرار می‌گیرد (De Vuyst and Neysens, 2005). همچنین نوع غله به‌واسطه مقدار و کیفیت کربوهیدرات‌ها به عنوان سوبسترای اولیه تخمیر، منبع تامین نیتروژن و عوامل رشد، یکی دیگر از مهم‌ترین عوامل موثر بر تخمیر است (Hammes et al., 2005). علاوه بر مقدار کربوهیدرات قابل تخمیر در آرد، ظرفیت بافری، pH و حضور ترکیبات مهارکننده نیز می‌تواند بر ظرفیت اسیدی شدن و رشد میکروارگانیسم‌ها تاثیر بگذارند (Banu et al., 2011). *P. kudriavzevii* مورد مطالعه در این پژوهش، دارای ۷۹/۲۶ درصد قابلیت زنده‌مانی پس از تیمار متوالی اسید و صفرا (مشابه pH پایین معده و حضور نمک صفراوی روده) بود. نتایج مطالعات Perricone و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که مخمر جدا شده از خمیرترش آلتامورا پس از ۳ ساعت نگهداری در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش، تغییرچندانی نکرده و زنده‌مانی قابل قبولی داشت (Perricone et al., 2014). همچنین Palla و همکاران (۲۰۱۹) دریافتند که همه سویه‌های *S. cerevisiae* و *K. humilis* مقاومت بالایی نسبت به شرایط مشابه دستگاه گوارش داشتند در حالی که جمعیت سایر سویه‌ها در این شرایط ۱/۵ سیکل لگاریتمی کاهش یافت (Palla et al., 2019). این میکروارگانیسم‌ها قادر به تحمل pH پایین و نمک‌های صفراوی بوده و فعالیت ضدمیکروبی در مقابل عوامل بیماری‌زا و مولد فساد را از خود نشان دادند. همچنین برخی از گونه‌های مخمری توانایی زنده‌مانی و لانه‌گزینی در دستگاه گوارش را داشته و لذا از قابلیت پروبیوتیکی مناسبی برخوردارند (Pedersen et al., 2012 ; Moslehi Jenabian et al., 2010). از مهم‌ترین عوامل موثر بر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش می‌توان به قابلیت تحمل pH پایین، تولید بیوفیلم، اصلاح فعالیت پمپ پروتونی و هیدرولیز نمک‌های صفراوی اشاره نمود. با قرارگیری باکتری‌ها در معرض نمک‌های صفراوی، اختلالات سلولی رخ می‌دهد که با تجزیه غشای لیپیدی و پروتئین‌های غشای سلولی سبب نشت محتویات سیتوپلاسمی و نهایتاً مرگ سلول می شود. هیدرولاز نمک صفراوی و اسید دهیدراتاز صفراوی از جمله آنزیم‌های اساسی میکروبی هستند که با فعالیت خود سبب هیدرولیز نمک صفراوی شده و متعاقبا باعث کاهش سمیت و اثرات جانبی نمک صفراوی در پروبیوتیک‌ها می‌گردند. همچنین کاهش pH سبب ممانعت از متابولیسم و کاهش میزان رشد و زنده‌مانی میکروارگانیسم ها می‌شود درحالی‌که مقاومت برخی از پروبیوتیک‌ها به کاهش pH به واسطه خنثی‌سازی اسید است (Montville and Matthews, 2012).

در بخش دیگری از نتایج پژوهش حاضر، اثر ضد باکتریایی مخمر *P. kudriavzevii* علیه *L. monocytogenes*، *S. aureus* و *E. coli* به روش کشت توام به اثبات رسید. Fakruddin و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که یک زیرگونه از مخمر *S. cerevisiae* اثر بازدارندگی بیشتری بر باکتری‌های گرم منفی مانند *E. coli* نسبت به باکتری‌های گرم مثبت داشت که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد ولی بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی آن بر *Vibrio cholera* و *Bacillus polymyxa* مشاهده شد (Fakruddin et al., 2017). همچنین زیرگونه دیگری از همین مخمر، ممانعت‌کنندگی مناسبی در برابر *S. aureus* و *E. coli* داشت که اثر مذکور به تولید متابولیت های فلاونوئیدی (شامل نارینجینین، هموجنتیسیک اسید، پلرتیک اسید و فنیل لاکتالدهید) توسط این مخمر نسبت داده شد (Ng et al., 2019). پژوهشگران دیگری نشان دادند که بسیاری از مخمرهای جنس *Saccharomyces*، *Candida*، *Cryptococcus*، *Debaryomyces*، *Kluyveromyces*، *Pichia* و *Zygosaccharomyces* قادر به تولید مایکوسین هستند. بعدها سایر محققین دریافتند که عمل بازدارنده مخمرها با تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه نظیر توکسین‌های کشنده به‌نام مایکوسین‌ها مرتبط است. مایکوسین‌ها نوعی پروتئین یا گلیکوپروتئین خارج‌سلولی بوده که به‌عنوان سموم کشنده بر عوامل ناخواسته اثر بازدارنده دارند (Rima et al., 2012). پژوهشگران دیگری نیز از روش کشت توام در محیط کشت کروموژنیک به هدف تعیین اثر بازدارندگی *Carnobacterium maltaromaticum* علیه *E. coli*، *L. monocytogenes* و *Salmonella Typhimurium* استفاده کردند (Danielski et al., 2017). پروبیوتیک‌ها با مکانیسم‌های متعددی مانند ترشح مواد ضدمیکروبی، رقابت برای مواد غذایی، تولید اتانول، تولید پپتیدهای آبگریز و تصاحب جایگاه اتصال سلول‌ها در اپی‌تلیال روده، کاهش لانه‌گزینی عوامل بیماری‌زا و ممانعت از ایجاد عفونت می‌توانند از اثر باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند (Janković et al., 2012). به‌طور خلاصه، اثر ضدمیکروبی مخمرهای حاضر در محصولات غذایی تخمیری و نوشیدنی‌ها، به واسطه فعالیت اسیدهای آلی، اسیدهای فرار، پراکسید هیدوژن و سایر پیش‌ماده‌های ضدمیکروبی تولیدی است (Viljoen., Marquina et al., 2002 ; 2006).

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، جدایه مخمری دارای ۶۷/۴ درصد قابلیت خود اتصالی بود که در مقایسه با پروبیوتیک‌های تجاری به نسبت قابل توجه می‌باشد. نتایج حاصل از پژوهش Fernandez-Pacheco و همکاران (۲۰۱۸) افزایش میزان خود اتصالی جدایه‌های مخمری را بین ۸۸/۰۱- ۲۵/۹۳ درصد در حین گرمخانه‌گذاری نشان داد (Fernandez-Pacheco et al., 2018). Sakandar و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که مخمرها نسبت به باکتری‌ها، میزان خوداتصالی بیشتری دارند و سویه‌های *W. anomalus* ۶۴/۳۴- ۶۰/۸۵ درصد خوداتصالی داشتند (Sakandar et al., 2018). Fadda و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی سویه‌های مختلف *Kluyveromyces* در مقایسه با نمونه شاهد که *Saccharomyces boulardii* با ۸۱/۵ درصد خود اتصالی بود، دریافتند که *Kluyveromyces lactis* با حدود ۵۹/۲ درصد نسبت به *K. marxianus* با ۴۴/۵ درصد، میزان خود اتصالی بالاتری داشت (Fadda et al., 2017). قابلیت اتصال در میکروارگانیسم‌ها به دو صورت خود اتصالی (اتصال سویه‌های هم نوع) و دگر اتصالی (اتصال سویه‌های متفاوت) بررسی می‌گردد. اتصال سویه‌های هم نوع، سبب مسدود شدن جایگاه اتصال عوامل بیماری‌زا شده و عموما موجب بهبود اتصال آنها به سلول‌های اپی‌تلیال روده، لانه‌گزینی و محافظت از دستگاه گوارش می‌شود (Janković et al., 2012). به خود اتصالی در مخمرها اغلب فلوکولاسیون گفته می‌شود که در پی کاهش کربوهیدرات‌ها در طول فاز سکون یا تاخیر رشد آنها رخ می‌دهد. سلول‌های مخمری از باکتری‌ها بزرگ‌تر و سنگین‌تر بوده و درنتیجه، نقش پررنگ‌تر و عمل سریع‌تری در لانه گزینی دارند. البته این عملکرد به جنس، گونه و نژاد آنها وابسته بوده و به برخی عوامل مانند خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ماکرومولکول‌های سطح سلول، ترکیبات مختلف دیواره سلولی، حضور Ca^{2+} و مانوز در محیط نیز بستگی دارد (Gil-Rodriguez et al., 2015).



شکل ۳- اثر ضد قارچی مخمر *Pichia kudriavzevii* جدا شده از خمیرترش باکویت به روش کشت دو لایه: الف) نمونه کنترل حاوی *A. niger* ب) اثر ضد قارچی جدایه مخمری در برابر *A. niger* ج) نمونه کنترل حاوی *A. flavus* د) اثر ضد قارچی جدایه مخمری در برابر *A. flavus*

Fig. 3. Antifungal activity of *Pichia kudriavzevii* isolated from buckwheat sourdough in overlay bioassay: A: control sample containing *A. niger*, B: antifungal activity of the yeast isolate against *A. niger*, C: control sample containing *A. flavus*, D: antifungal activity of the yeast isolate against *A. flavus*.

همچنین در پژوهش حاضر مشخص گردید که جدایه مخمری، ۶۴/۰۷ درصد آبگریزی داشت. نتایج پژوهش Fadda و همکاران (۲۰۱۷) مشخص نمود که میزان آبگریزی سویه‌های مختلف *Kluyveromyces* در محدوده ۷۹/۴- ۳۹/۹ درصد متفاوت بود (Fadda et al., 2017). Perricone و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که دو جدایه مخمری از خمیرترش آلتامورا، ۹۶/۹۶ و ۶۰ درصد آبگریزی داشتند (Perricone et al., 2014). بر اساس نتایج بررسی Zullo و Ciafardini (۲۰۱۹) میزان آبگریزی مخمرهای *Candida adriatica* و *Yamadazyma terventina* به‌ترتیب ۵۵/۵۰ و ۴۵/۵ درصد بود (Zullo and Ciafardini, 2019). Ilavenil و همکاران

(۲۰۱۶) گزارش کردند که آبگریزی حدود ۴۰- ۳۰ درصد می‌تواند بیانگر قدرت پروبیوتیک‌ها برای واکنش با موکوس و ایجاد حداقل یک اتصال کوتاه و ناپایدار باشد (Ilavenil et al., 2016).

طی پژوهش حاضر مشخص گردید که جدایه مخمری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، مقاوم و نسبت به آنتی‌مایکوتیک‌های ایتراکونازول و ناتامایسین، نیمه حساس و در برابر فلوکونازول و کتوکونازول، مقاوم بود. از جمله سازوکارهای مخمرها برای مقاومت در برابر ترکیبات ضدقارچ خانواده آزول می‌توان به تغییر یا اصلاح نفوذپذیری غشاء سلول و تغییر جایگاه هدف اشاره کرد (Kanafani and Perfect., 2008). Perricone و همکاران (۲۰۱۴) پس از ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مخمری نوعی خمیرترش شامل *S. cerevisiae* و *Candida humilis* دریافتند که گونه های *Candida* نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده مقاوم بودند. مخمرها به‌طور طبیعی دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بوده و فقدان ماده ژنتیکی به‌منظور انتقال بین باکتری و مخمر، آن‌ها را به انتخاب مناسبی برای کاربردهای پروبیوتیکی تبدیل نموده است (Fadda et al., 2017 ;Perricone et al., 2014). بر اساس گزارش Banik و همکاران (۲۰۱۹)، سویه‌ای از مخمر *S. cerevisiae* نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های رایج، مقاوم بوده و هیچ هاله حساسیتی ایجاد نکرد اما در مقابل عوامل ضدقارچی مانند فلوکونازول و کلوتریمازول به‌ترتیب، هاله حساسیت ۲۳ و ۲۰ میلی متری ایجاد نمود (Banik et al., 2019). در پژوهش Fekri و همکاران (۲۰۲۰) مشخص گردید که از بین جدایه‌های مخمری مورد مطالعه، *K. marxianus* نسبت به چهار ترکیب آنتی‌مایکوتیک وریکونازول، کتوکونازول، فلوکتوزین و ایتراکونازول، حساسیت متوسط نشان داد درحالی‌که *K. lactis* و *Kluyveromyces aestuarii* در مقابل فلوکتوزین و آمفوتریسین مقاوم بودند (Fekri et al., 2020). در رابطه با سازوکارهای مخمرها برای مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها 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 بازدارندگی سنتز RNA و DNA سلولی، تغییر جایگاه هدف ترکیب آنتی‌مایکوتیک، ممانعت از سنتز استرول‌ها و صدمات مستقیم غشایی، تحریک سیستم پمپ پروتونی در غشاء سلول، فعالیت پمپ افلاکس (سیستم انتشار یون‌ها و یا نحوه انتقال آنها) و یا تداخل در فرایند بیان ژن باشد (Goretti et al., Kanafani and Perfect., 2014, 2009).

جدایه مخمری مورد مطالعه در پژوهش حاضر، فاقد هر گونه فعالیت همولیزی بود. طی پژوهش مشابهی نتیجه همولیز خون توسط همه جدایه‌های مخمری، منفی گزارش شد (Fadda et al., 2017). در مطالعه Suvarna و همکاران (۲۰۱۸) نیز هیچ‌کدام از جدایه‌های مخمری شامل *Pichia barkeri*، *Yarrowia lipolytica*، *S. cerevisiae* و *W. anomalus* فعالیت همولیزی نداشتند (Suvarna et al., 2018). به‌طور کلی سه نوع فعالیت همولیزی آلفا، بتا و گاما شناخته شده است. مشاهده هاله سبز رنگ در محیط کشت خوندار، نشانگر فعالیت همولیزی آلفا بوده و هاله زرد رنگ، همولیز نوع بتا را نشان می‌دهد. اما طی همولیز نوع گاما هیچ‌گونه تغییر رنگی در محیط کشت مشاهده نمی‌شود. مخمرها به‌علت فقدان ژن‌های انتروتوکسین‌زای همولیتیک، عدم تولید توکسین‌های تجزیه‌کننده خون و عدم آسیب به غشاء سیتوپلاسمی سلول‌های قرمز خون، اغلب فعالیت همولیزی ندارند (Angmo et al., 2016).

جدایه مخمری مورد مطالعه در پژوهش حاضر، دارای اثر ضدقارچی بر روی *A. niger* و *A. flavus* بود. بر اساس نتایج پژوهش Fakruddin و همکاران (۲۰۱۷) که بر روی سویه‌ای از مخمر *S. cerevisiae* انجام گرفت، مشخص گردید که مخمر مذکور، فعالیت ضدقارچی در برابر *Aspergillus astus*، *A. niger* و *Aspergillus ocrasus*، *Pichia cryzogenum* و *Rhizzopus oryzae* داشت که البته بیشترین اثر بازدارنده آن بر روی *A. niger* و کمترین اثر ضدقارچی آن بر *A. astus* مشاهده شد (Fakruddin et al., 2017). همچنین La Penna و همکاران (۲۰۰۴) ضمن ارزیابی فعالیت بازدارندگی *Kluyveromyces*های جدا شده بر سویه‌های *Aspergillus flavi* نشان‌دادند که مخمرهای مذکور بر روی سویه های *Aspergillus* فعالیت بازدارندگی بین ۱۰۰- ۷۵ درصد داشته و در فعالیت‌های آبی مختلف، اثرات بازدارندگی متفاوتی از خود نشان دادند (La Penna et al., 2004). در پژوهش Ruggirello و همکاران (۲۰۱۹) نیز اثرات ضدقارچی پنج مخمر جدا شده از محصولات تخمیری برای تعیین توانایی بازدارندگی *Aspergillus carbonarius* و اُکراتوکسین A مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که مخمرهای *Hanseniaspora*، *Kluyveromyces*، *Pichia fermentas*، *Kazachstania hellenica* و *S. cerevisiae* در فعالیت آبی ۰/۹۵ و جمعیت قارچ $۱۰^{۲}$ اسپور در میلی‌لیتر و جمعیت مخمری $۱۰^{۵}$ کلنی در میلی‌لیتر دارای ۹۳-۶۱ درصد اثر ضدقارچی بودند. در واقع، تولید متابولیت‌هایی مانند دی‌اکسید کربن، اتانول، ترکیبات پروتئینی یا پپتیدهای با وزن مولکولی پایین و ترکیب این عوامل در اثرات ضد قارچی گونه‌های مخمری موثر هستند (Kapetanakou *et al.*, 2012; Ruggirello et al., 2019). از سایر مکانیسم‌های موثر در خاصیت ضدقارچی مخمرها می‌توان به تولید نوعی توکسین کشنده مانند آنتی‌بادی در

بدن انسان، در مجاورت قارچها اشاره کرد که با گیرنده‌های دیواره سلولی واکنش داده و به‌طور ویژه بر سلول‌های حساس که از جنس گلوکان هستند اثر می‌گذارند. به‌عنوان مثال، می‌توان به تولید توکسین KT از سویه‌های منتخب *Pichia anomala* و زیگوسین حاصل از مخمر *Zygosaccharomyces bailii* به‌عنوان ممانعت کننده کامل از رشد *Fusarium oxysporum* و *Colletotrichum graminicola* اشاره کرد (Magliani et Banik et al., 2019 ; al., 2005).

در پژوهش حاضر، خصوصیات پروبیوتیکی و ضدقارچی مخمر جدا شده از خمیرترش باکویت مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج این پژوهش، جدایه *P. kudriavzevii* توانایی زنده‌مانی پس از تیمار متوالی اسید و صفرا را داشت. همچنین جدایه مذکور، دارای قابلیت های خود اتصالی و آبگریزی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و آنتی‌مایکوتیکی مناسب و اثرات ضدباکتریایی و همچنین فعالیت ضدقارچی جالب توجهی بود. بنابراین، جدایه *P. kudriavzevii* از قابلیت مناسبی برای استفاده به‌عنوان کشت پروبیوتیک و یا محافظت کننده در صنایع تخمیری برخوردار می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

1. AACC, International. (2010). Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. The St. Paul.
2. Ahmed, A., Khalid, N., Ahmad, A., Abbasi, N. A., Latif, M. S. Z., Randhava, M. A. (2014). Phytochemicals and biofunctional properties of buckwheat. a review. *The Journal of Agricultural Science*, 152 (3), 349–369. https://doi.org/10.1017/S0021859613000166
3. Andrabi, S. T., Bhat, B., Gupta, M., Bajaj, B. K. (2016). Phytase-producing potential and other functional attributes of lactic acid bacteria isolates for prospective probiotic applications. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(3), 121-129. https://doi.org/10.1007/s12602-016-9220-3
4. Angelov, A., Gotcheva, V., Hristozova, T., Gargova, S. (2005). Application of pure and mixed probiotic lactic acid bacteria and yeast cultures for oat fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (12), 2134–2141. https://doi.org/10.1002/jsfa.2223
5. Angmo, K., Kumari, A., Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 428-435. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.057
6. 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. *Frontiers in Microbiology*, 3, 161. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00161
7. Bajaj, B. K., Claes, I. J., Lebeer, S. (2021). Functional mechanisms of probiotics. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 321-327.
8. Banik, A., Mondal, J., Rakshit, S., Ghosh, K., Sha, S. P., Kumar, Halder, S., Ghosh, C., Mondal, K. C. (2019). Amelioration of cold-induced gastric injury by a yeast probiotic isolated from traditional fermented foods. *Journal of Functional Foods*, 59, 164–173. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.039
9. Banu, I., Vasilean, I., Aprodu, I. (2011). Effect of select parameters of the sourdough rye fermentation on the activity of some mixed starter cultures. *Food Biotechnology*, 25(4), 275-291. https://doi.org/10.1080/08905436.2011.617251
10. Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M. (2012). Selection of yeasts as starter cultures for table olives: a step-by-step procedure. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00194
11. Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Prabhu, P. R., Antony, U. (2016). Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*, 33(8), 385-401. https://doi.org/10.1002/yea.3181
12. Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. (2007). Review article: Yeast as probiotics: *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(6), 767-778. https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x
13. De Vuyst, L., Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 43-56. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012
14. 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. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.020

15. Fakruddin, M. D., Nur Hossain, M. D., Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae IFST062013*, a potential probiotic, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1-11. https://doi.org/10.1186/s12906-017-1591-9
16. 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 Chemistry*, 306, 125620. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125620
17. Fernandez-Pacheco, P., Arevalo-Villena, M., Bevilacqua, A., Corbo, M., Beriones Perez, A. (2018). Probiotic characterization in *Saccharomyces cerevisiae* strains: application in food industries. *LWT-Food Science and Technology*, 97, 332-340. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.007
18. García-Hernández, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L. R., Rosa, C. A., Nicoli, J. R., Iglesias, A. E., Pérez-Sanchez, T., Salabarría, R. B., Halaihel, N. (2012). Identification and *in vitro* screening of avian yeasts for use as probiotic. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 798-802. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.09.005
19. Gil-Rodriguez, A. M., Carrascosa, A. V., Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: *In vitro* characterisation of probiotic traits. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1156-1162. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.042
20. 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), 178–182. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.013
21. Greppi, A., Krych, L., Costantini, A., Rantsiou, K., Hounhouigan, D. J., Arneborg, N. (2015). Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPk gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 81–89. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.011
22. 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 Microbiology*, 62, 169-177. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.016
23. Hammes, W. P., Brandt, M. J., Francis, K. L., Rosenheim, J., Seitter M. F., Vogelmann, S. A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 4-11. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.010
24. Ilavenil, S., Vijayakumar, M., Kim, D. H., Valan Arasu, M., Park, H. S., Ravikumar, S., Choi, K. C. (2016). Assessment of probiotic, antifungal and cholesterol lowering properties of *Pediococcus pentosaceus* KCC-23 isolated from Italian ryegrass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(2), 593-601. https://doi.org/10.1002/jsfa.7128
25. Janković, T., Frece, J., Abram, M., Gobin, I. (2012). Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research*, 6(1), 19-24.
26. Kanafani, Z. A., Perfect, j. R. (2014). Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases*, 46(1), 120-128. https://doi.org/10.1086/524071
27. 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. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 91–99. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.010
28. La Penna, M., Nesci, A., Etcheverry, M. (2004). *In vitro* studies on the potential for biological control on *Aspergillus section Flavi* by *Kluyveromyces* spp. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 257–264. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2003.01467.x
29. Magliani, W., Conti, S., Frazzi, R., Ravanetti, L., Maffei, D. L., Polonelli, L. (2005). Protective antifungal yeast killer toxin-like antibodies. *Current Molecular Medicine*, 5(4), 443-452. https://doi.org/10.2174/1566524054022558
30. Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 129-135. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01207-7
31. Maia Danielski, G., Didimo Imazaki, P. H., Daube, G., Ernlund Freitas de Macedo, R., Clinquart, A. (2017). In vitro evaluation of the competing effect of *Carnobacterium maltaromaticum* isolated from vacuum packed meat against food pathogens. BAMST Symposium: Meet the Belgian Meat Researchers, Melle 7th.
32. Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. M. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology*, 5(2), 65-71. https://doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z
33. Montville, T. J., Matthews, K. R. (2012). Physiology, growth, and inhibition of microbes in foods. *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, 1-18. https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch1

34. Moroni, A., Arendt, E., Dal Bello, F. (2011). Biodiversity of lactic acid bacteria and yeast in spontaneously fermented buckwheat and teff sourdough. *Food Microbiology*, 28(3), 497-502. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.016
35. Moroni, A.V., Zannini, E., Sensidoni, G., Arendt, E. K. (2012). Exploitation of buckwheat sourdough for the production of wheat bread. *European Food Research and Technology*, 235(4), 659-668. https://doi.org/10.1007/s00217-012-1790-z
36. Moslehi Jenabian, S., Lindegaard, L., Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2(4), 449-473. https://doi.org/10.3390/nu2040449
37. Ng, K. R., Lyu, X., Mark, R., Chen, W. N. (2019). Antimicrobial and antioxidant activities of phenolic metabolites from flavonoid-producing yeast: Potential as natural food preservatives. *Food Chemistry*, 270, 123-129. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.077
38. 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. *International Journal of Food Microbiology*, 302, 59-68. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.004
39. Pedersen, L., Owusu-Kwarteng, J., Thorsen, L., Jespersen, L. (2012). Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously fermented cereal. *International Journal of Food Microbiology*, 159(2), 144-151. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.016
40. Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M., Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiology*, 38, 26-35. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.006
41. Rima, H., Steve, L., Ismail, F. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3, 421. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421
42. 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. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.007
43. 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 Science and Technology*, 63(2), 807-813. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.004
44. 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 Research International*, 115, 519-525. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.002
45. 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 Science and Technology*, 50(1), 1-16. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014
46. Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8
47. Sakandar, H. A., Usman, K., Imran, M. (2018). Isolation and characterization of gluten-*degrading Enterococcus mundtii* and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough (Khamir). *LWT-Food Science and Technology*, 91, 271-277. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.023
48. 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(3), 745-753. https://doi.org/10.1007/s10068-018-0310-8
49. Viljoen, B. C. (2006). Yeast ecological interactions. Yeast'Yeast, Yeast'Bacteria, Yeast'Fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. In *Yeasts in food and beverages* (pp. 83-110). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_4
50. 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.
51. Zhu, F., (2016). Chemical composition and health effects of Tartary buckwheat. *Food Chemistry*, 20, 231-245. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.050
52. Zielinski, H., Szawara-Nowak, D., Baczek, N., Wronkowska, M. (2019). Effect of liquid-state fermentation on the antioxidant and functional properties of raw and roasted buckwheat flours. *Food Chemistry*, 271, 291-297. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.182
53. Zullo, B.A., Ciafardini, G. (2019). Evaluation of physiological properties of yeasts strains isolated from olive oil and their *in vitro* probiotic trait. *Food Microbiology*, 78, 179-187. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.016