ساکارومایسز سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) و کاربرد بالقوه آن در صنعت غذا

جوانه کریمی[۱]

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

سهند سهرابی[۲]

گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

معصومه عرب*[۳]

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

چکیده

اهداف: ساکارومایسز سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) بهترین یوکاریوت مطالعه شده و ابزاری ارزشمند برای اکثر جنبه‌های تحقیقات پایه‌ای بر روی ارگانیسم‌های یوکاریوتی است. این امر به دلیل طبیعت تک سلولی آن است که اغلب مسائل را ساده‌تر می‌کند و این واقعیت را ارائه می‌دهد که تقریباً تمامی عملکردهای زیستی موجود در یوکاریوت‌ها نیز در ساکارومایسز سریویزیه یافت می‌شوند و به خوبی حفظ شده‌اند. علاوه بر این، این ارگانیسم به راحتی قابل دستکاری ژنتیکی است. روش پژوهش: این مطالعه با بررسی و تحلیل مقالات علمی موجود در پایگاه‌های علمی معتبر در مورد ویژگی‌های بیولوژیکی و کاربردهای ساکارومایسز سرویزیه در صنعت غذا و دیگر صنعت‌ها، به تحلیل کاربردهای این مخمر به صورت مستقل یا در تعامل با سایر میکروارگانیسم‌ها می‌پردازد .یافته‌ها: این یوکاریوت برخلاف سایر ارگانیسم‌ها همزمان دارای اهمیت زیادی برای کاربردهای مختلف بیوتکنولوژیکی است. کاربرد بیوتکنولوژیکی ساکارومایسز سریویزیه در ویژگی‌های بیولوژیکی منحصر به فرد آن، یعنی ظرفیت تخمیر، همراه با تولید الکل و CO_2 و مقاومت آن در برابر شرایط نامساعد از جمله فشار اسمزی و pH پایین نهفته است. از جمله برجسته‌ترین کاربردهایی که شامل استفاده از ساکارومایسز سریویزیه می‌شوند، می‌توان به کاربرد آن در صنایع غذایی، نوشیدنی و سوخت‌های زیستی اشاره کرد. نتایج: این مطالعه مروری نشان می‌دهد که استفاده از سویه‌های مخمر ساکارومایسز سریویزیه می‌تواند پتانسیل‌های جدیدی را برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی مختلف و صنعت غذا فراهم کند.

کلمات کلیدی: ساکارومایسز سریویزیه، مخمر نان، تخمیر کاکائو، اتانول زیستی، بیوتکنولوژی

مقدمه ای بر آشنایی با ساکارومایسز سرویزیه

ساکارومایسز سرویزیه یک قارچ تک سلولی است که دارای DNA ژنومی هسته‌ای به اندازه ۱۲۰۶۸ کیلوباز (kb) است که در ۱۶ کروموزوم سازمان‌دهی شده است. ژنوم آن به طور کامل توسط گافیو و همکاران در سال ۱۹۹۶ تعیین توالی شد و مشخص شد که حاوی تقریباً ۶۰۰۰ ژن است که از این تعداد، ۵۵۷۰ ژن به عنوان ژن‌های رمزگذار پروتئین پیش‌بینی شده‌اند. تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی نشان داده‌اند که تعدادی از ژن‌های رمزگذار پروتئین از منشأ خارجی، یعنی نتیجه انتقال افقی ژن، همانطور که دولیتل در سال ۱۹۹۹ تعریف کرده است، هستند (Doolittle, 1999). این ژن‌ها که به صورت افقی وارد ژنوم ساکارومایسز سرویزیه شده‌اند، یا منشأ پروکاریوتی یا یوکاریوتی دارند (Hall et al., 2005). این امر در ابتدا به دلیل سبک تغذیه اوسموتروفیک و حضور دیواره سلولی قوی، غشاهای سلولی و درون‌سلولی توجه‌ها را به خود جلب کرد. هال و همکاران در سال ۲۰۰۵ (Hall et al., 2005) ده ژن با منشأ احتمالی پروکاریوتی را در ژنوم ساکارومایسز سرویزیه شناسایی کردند. به‌عنوان مثال، ژن FSY1 که از یک نوع یوکاریوت به‌دست آمد. ژن FSY1 یک نوع پروتئین ناقل فروکتوز را رمزگذاری می‌کند (Galeote et al., 2010) و احتمالاً از خانواده ساکارومایسز سرویزیه منشا گرفته است. این ژن مهم تلقی می‌شود زیرا محصول آن احتمالاً به سویه میزبان (EC 1118) قابلیت بیشتری را برای استفاده از فروکتوز در شرایطی که غلظت‌های پایین هگزوز در خمیر مایه (یعنی در فاز پایانی تخمیر) وجود دارد فراهم می‌کند. در خصوص ژنومیک عناصر خارج کروموزومی ساکارومایسز سرویزیه، تمامی سویه‌ها به طور طبیعی حاوی مولکول‌های DNA میتوکندریایی (mtDNA) اما اغلب با اندازه‌های مختلف هستند (de Zamaroczy & Bernardi, 1985). بزرگترین نسخه mtDNA دارای طول تقریبی ۸۵۷۸۰ جفت باز (bps) است (Foury et al., 1998). علاوه بر این، بیشتر سویه‌های ساکارومایسز سرویزیه در هسته خود یک عنصر ژنتیکی خارج کروموزومی متمایز به نام حلقه ۲ میکرومتر را دارند (بررسی شده توسط فاچر ۱۹۸۸ (Futcher et al., 1988)). این عنصر DNA دو رشته‌ای با طول معمولی ۶۳۱۸ جفت باز و تعداد نسخه‌های تقریبی ۶۰ نسخه در هر سلول است. این DNA به عنوان 'DNA خودمحور[۱]' در نظر گرفته می‌شود و تقریباً هیچ پیامد فنوتیپی برای میزبان خود، به جز کاهش جزئی در نرخ رشد میزبان ندارد. این عنصر برای کاربردهای صنعتی مفید نیست، اما از سوی دیگر برای کاربردهای مختلف مربوط به دستکاری ژنتیکی میزبان خود بسیار مفید بوده است. سایر عناصر ژنتیکی خارج کروموزومی موجود در سویه‌های مختلف ساکارومایسز سرویزیه شامل مولکول‌های RNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای و رتروویروس‌ها هستند (Wickner, 1996). ساکارومایسز سرویزیه یک ارگانیسم مدل و ابزار ارزشمندی برای تمامی جنبه‌های تحقیقات پایه‌ای است. برخلاف سایر ارگانیسم‌های مدل مانند اشرشیاکلی[۲] یا کرم الگانس[۳]، ساکارومایسز سرویزیه همزمان یک گونه بسیار ارزشمند برای کاربردهای صنعتی متنوع نیز محسوب می‌شود. یکی از دلایل اصلی این ویژگی، یکی از جنبه‌های سبک زندگی آن است که به 'ساخت، انباشت، مصرف[۴]' معروف است [۱۰]. این ویژگی بر اساس اثر Crabtree استوار است که شامل این واقعیت می‌شود که ساکارومایسز سرویزیه حتی در شرایط هوازی از دستگاه تنفسی برای متابولیزه کردن ساکاریدها و ارتقای رشد زیست‌توده استفاده نمی‌کند، بلکه به جای آن، اتانول و سایر ترکیبات دوکربنه را از طریق پیرووات تولید می‌کند (Pronk et al., 1996). نتیجه این امر این است که ساکارومایسز سرویزیه اتانول تولید و انباشته می‌کند که برای اکثر

---

[۱] Selfish-DNA
[۲] Escherichia coil
[۳] Caenorhabditis elegans
[۴] make-accumulate-consume

گونه‌های میکروبی دیگر که توانایی رقابت با آن برای ترکیبات قندی را دارند، سمی یا مهارکننده است و بدین ترتیب رقابت را از بین می‌برد. پس از اینکه ساکارومایسز سرویزیه با تولید اتانول اکثر رقبا را از بین برد، اتانول تولید شده را مصرف کرده و در نتیجه رشد خود را بهبود می‌بخشد. بر اساس تحقیقات هگمن و همکاران در سال ۲۰۱۳ [۱۲]، این استراتژی به تدریج قبل از تکرار کل ژنوم ساکارومایسز سرویزیه و سایر گونه‌های مخمر که حدود ۱۰۰ میلیون سال پیش رخ داده است، تکامل یافته است (Wolfe & Shields, 1997). این تکامل شامل از دست دادن توالی تنظیمی خاص cis-acting (AATTTT) چندین پروموتر ژن‌های درگیر در تنفس بوده است (Ihmels et al., 2005). این توالی در بسیاری از جنس‌های دیگر مخمر مانند کلاورومایسز[۵]، کاندیدا[۶] و سایرین حفظ شده است، در حالی که در مخمر دکلرا[۷] که شامل گونه‌هایی است که به عنوان تولیدکنندگان اتانول کارآمد شناخته می‌شوند، وجود ندارد (Rozpędowska et al., 2011). دو ویژگی دیگر نیز وجود دارد که برای برخی از کاربردهای صنعتی ساکارومایسز سرویزیه بسیار مهم هستند، مقاومت قابل توجه آن به غلظت‌های بالای قند و تولید تعدادی از ترکیبات آروماتیک و فرار است. حضور نادر ساکارومایسز سرویزیه در حبه‌های انگور سالم و حضور بیشتر آن در حبه‌های آسیب‌دیده به نظر متناقض می‌آید، اما این تناقض با این واقعیت توضیح داده می‌شود که این ارگانیسم می‌تواند یک زیستگاه اضافی یعنی حشرات را نیز اشغال کند. ساکارومایسز سرویزیه توسط حشرات منتقل می‌شود و در چندین حشره مختلف مانند زنبورها (Stefanini et al., 2012) و گونه‌های دروزوفیلا[۸] (Buser et al., 2014) که از جمله بر روی حبه‌های آسیب‌دیده انگور تغذیه می‌کنند، شناسایی شده است. استفنینی و همکاران در سال ۲۰۱۲ (Stefanini et al., 2012) میکروبیوم روده زنبورهای اجتماعی را بررسی کرده و حضور سلول‌های ساکارومایسز سرویزیه را هرچند در تعداد کمتری (۴ درصد) نسبت به سایر مخمرها مانند کاندیدا یا پیشیا بودند، شناسایی و تایید کردند. با وجود تعداد کمتر این سلول‌ها، ساکارومایسز سرویزیه حضور پایداری در جامعه زنبورها دارد، زیرا در روده ملکه‌های تشکیل دهنده کلونی باقی می‌ماند و سپس از طریق تغذیه به لاروهای آن‌ها منتقل می‌شود. در رابطه با تعامل دروزوفیلا و ساکارومایسز سرویزیه، بوزر و همکاران در سال ۲۰۱۴ (Buser et al., 2014) در طی مطالعه نظریه ساخت زیستگاه، نشان دادند که دروزوفیلا سیمولانس[۹] به مخمرهایی تمایل دارد که جاذب‌های کارآمدتری تولید می‌کنند. این رابطه یک تعامل متقابل سودمند است، زیرا مگس‌هایی که مخمر را در خود دارند، باروری بیشتری نشان می‌دهند و ساکارومایسز سرویزیه نیز از انتقال به زیستگاه‌های جدید مانند حبه‌های آسیب‌دیده انگور بهره‌مند می‌شود. فراوانی حضور و توسعه ساکارومایسز سرویزیه در محیط همچنان تحت مطالعه است، اما بسیار بیشتر از آنچه که ابتدا پیش‌بینی شده بود، است. وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ (Wang et al., 2012) تعداد ۲۰۶۴ نمونه از زیستگاه‌های طبیعی، نه ساخت دست انسان، در چین جمع‌آوری کردند و با استفاده از رویکرد غنی‌سازی توانستند حضور ساکارومایسز سرویزیه را در ۲۲۶ مورد از آن‌ها (۱۰/۹ درصد) تشخیص دهند. تنوع ژنتیکی نمونه‌های جدا شده ساکارومایسز سرویزیه یافت شده در نمونه‌های مثبت نیز بسیار بیشتر از نمونه‌های ساخت دست انسان یا تحت تأثیر انسان بود. این می‌تواند بسیار مهم باشد، زیرا سویه‌های محیطی و وحشی ممکن است دارای ژنوتیپ‌هایی با ویژگی‌های بسیار جالب برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی باشند. با این حال، استفاده از سویه‌های وحشی برای

---

[۵] Kluyveromyces
[۶] Candida
[۷] Dekkera
[۸] Drosophila
[۹] Drosophila simulans

کاربردهای صنعتی ممکن است یک فرآیند ساده نباشد، زیرا تنوع ژنتیکی همیشه با تنوع فنوتیپی مطابقت ندارد. برای مثال، کاماراسا و همکاران در سال ۲۰۱۱ (Camarasa et al., 2011) کارایی ۷۲ سویه ساکارومایسز سرویزیه با منشأهای مختلف (صنعتی، آزمایشگاهی، محیطی) را تحت شرایط تخمیر خمیر مایه مطالعه کردند و دریافتند که سویه‌هایی که از محیط‌های غنی از قند منشا گرفته‌اند، قادر به اتمام فرآیند تخمیر بودند، اما سویه‌های آزمایشگاهی یا محیطی نتوانستند به طور رضایت‌بخشی عمل کنند. اساس مولکولی تطابق بهتر با شرایط تنش‌زای تخمیر خمیر مایه هنوز ناشناخته است و می‌تواند به دلایل مختلفی از جمله پدیده‌های اپی‌ژنتیکی نسبت داده شود. این بررسی عمدتاً بر جنبه‌های مختلف کاربردهای صنعتی ساکارومایسز سرویزیه متمرکز است.

۱. نقش و کاربردهای ساکارومایسز سرویزیه در صنایع غذایی

۱.۱. ساکارومایسز سرویزیه در تهیه نان

پخت نان یکی از قدیمی‌ترین فرآیندهای بیوشیمی در جهان است. شواهد قوی نشان می‌دهند که مخمرها در حدود ۱۰۰۰۰ سال قبل از میلاد برای تولید نان استفاده می‌شدند، اما قدیمی‌ترین شواهد باستان‌شناسی برای نان‌های ورآمده در هزاره دوم قبل از میلاد در مصر و هزاره اول قبل از میلاد در شمال غربی چین یافت شده‌اند. تا قرون وسطی، نان عمدتاً در خانه تهیه می‌شد، اما در دوران گسترش جمعیت در قرن‌های ۱۱ و ۱۲، آسیاب‌ها و اجاق‌های عمومی ساخته شدند و نانوایان حرفه‌ای به وفور یافت شدند (Heitmann et al., 2018; Money, 2018; Nielsen, 2019). ساکارومایسز سرویزیه به عنوان مخمر نان یا ساده‌تر "مخمر" شناخته می‌شود و رایج‌ترین گونه مخمر در نان و خمیرهای ترش است. این مخمر از قرن ۱۹ به عنوان یک کشت آغازگر مورد استفاده قرار گرفته است، جایی که مخمرهای نانوایی از باقیمانده تولید آبجو به دست می‌آمدند. در سال ۱۷۹۲ در انگلستان، اولین مخمرهای فشرده برای پخت و تولید آبجو ساخته شدند و تا سال ۱۸۰۰ در شمال اروپا در دسترس بودند، در حالی که در ایالات متحده در سال ۱۸۶۸، یک مخمر فشرده از یک سویه بهبود یافته معرفی شد و تولید نان در مقیاس بزرگ را تسهیل کرد (Carbonetto et al., 2018; Duan et al., 2018; Heitmann et al., 2018; Menezes et al., 2015; Money, 2018; Nielsen, 2019). تولید نان نیازمند مخلوط کردن آرد، آب و خمیر ترش است. بسته به فرهنگ و موقعیت جغرافیایی، انواع مختلفی از آردها مانند گندم، جو، چاودار، ذرت یا سورگوم استفاده می‌شدند، در حالی که خمیر ترش مخلوطی از آرد و آب بود که حاوی مخمرهای تخمیر کننده و باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) است (Carbonetto et al., 2018). ساکارومایسز سرویزیه به طور معمول به خمیر نان با غلظت ۲ درصد از کل مواد اضافه می‌شود. اکسیژن موجود در هوا که در حین مخلوط کردن در خمیر به دام می‌افتد، طی چند دقیقه توسط تنفس سلول‌های مخمر مصرف می‌شود و در شرایط بی‌هوازی که تشکیل می‌شود، تکثیر سلول‌های مخمر کند می‌شود و واکنش تخمیر رخ می‌دهد. شرایط بهینه برای تخمیر در خمیر در دمای حدود ۳۴-۳۸ درجه سانتیگراد و در pH ۰/۴-۲/۵، با استفاده از سلول‌های تازه است زیرا سلول‌های قدیمی‌تر به زمان تخمیر بیشتری نیاز دارند. یکی از عوامل احتمالی که تکثیر مخمر را به تأخیر می‌اندازد، اضافه کردن چربی، نمک یا ادویه‌ها است (Hidalgo & Brandolini, 2014). سه دسته قند در خمیر وجود دارد: الف) قندهای طبیعی موجود در آرد (شامل گلوکز، ساکارز، فروکتوز و مالتوز)، ب) قندهای اضافه شده توسط نانواها، و ج) مالتوزی که توسط تجزیه آمیلولایتیک نشاسته آزاد می‌شود. سلول‌های مخمر، گلوکز و فروکتوز حاصل از تجزیه

کربوهیدرات‌های پیچیده‌تر مانند ساکارز، مالتوز و نشاسته را به دی‌اکسید کربن و اتانول تبدیل می‌کنند. مالتوز، دکستروز و ساکارز با کمک آمیلازهای موجود در آرد یا مالت دیستاز شده، به همراه اضافه شدن آمیلازهای قارچی احتمالی توسط نانواها از نشاسته تولید می‌شوند، در حالی که گلوکز و فروکتوز توسط زایمازها به دی‌اکسید کربن و اتانول تبدیل می‌شوند (Carbonetto et al., 2018; GG, 2014; Heitmann et al., 2018; Hidalgo & Brandolini, 2014). به دلیل تخمیر قندها، سلول‌های مخمر به عنوان عامل ورآورنده در محصولات پخته‌شده در نظر گرفته می‌شوند که منجر به افزایش حجم خمیر نان از گازهای حاصل از تخمیر می‌شود. این امر به تغییرات در ساختار محصول و سنتز اسیدهای آلی و محصولات فراری که به طعم و عطر نان کمک می‌کنند، منجر می‌شود (Heitmann et al., 2018; Hidalgo & Brandolini, 2014). وقتی محیط مناسب برای رشد مخمر فراهم می‌شود، تخمیر مخمر گازهایی تولید می‌کند و یک ماتریس گلوتن تشکیل می‌دهد که امکان نگهداری حداکثری گاز را فراهم می‌کند، در نتیجه به دست‌یابی به حجم مطلوب نان منجر می‌شود. حباب‌های گازی که در ماتریس قرار می‌گیرند در طول تخمیر رشد می‌کنند و با دی‌اکسید کربن اشباع می‌شوند که منجر به گسترش خمیر و نازک شدن ماتریس خمیر بین سلول‌های گاز می‌شود. ظرفیت نگهداری گاز خمیر یک ویژگی مهم است که کیفیت نان و مناسب بودن مخمر مورد استفاده را تعیین می‌کند. هرچه تعداد سلول‌های گاز در خمیر بیشتر باشد، توزیع سلول‌های گاز بیشتر است که منجر به مقاومت بیشتر در برابر نیروهایی می‌شود که ممکن است باعث پارگی خمیر شود، همچنین کاهش قابلیت کشش و افزایش حجم ویژه را به همراه دارد. در طول پخت، اتانول موجود در خمیر به همراه مقداری آب تبخیر می‌شود و ماتریس هوادهی‌شده خرده نان را تشکیل می‌دهد (Heitmann et al., 2018). با استفاده از مخمر خشک، سلول‌های غیرفعالی حضور دارند که در پاسخ به تنش، گلوتاتیون آزاد می‌کنند، در حالی که مخمر خشک فعال فوری به کاهش زمان مخلوط کردن خمیر به دلیل تأثیر آن بر توسعه شبکه گلوتن کمک می‌کند. خمیر تحت تأثیر عوامل اکسیدکننده و کاهنده مانند گلوتاتیون قرار می‌گیرد که بر پیوندهای دی‌سولفید در زیرواحدهای گلوتنین و درجه پلیمریزاسیون آن‌ها تأثیر می‌گذارد و در نتیجه به یک شبکه گلوتن ویسکوالاستیک تغییر یافته و پروتئین‌های گلوتن با اندازه کاهش یافته و وزن مولکولی کمتر منجر می‌شود. مخمر همچنین قادر به تولید گلیسرول است که تأثیر مثبتی بر بافت نان، به ویژه در طول انجماد، و اسید پیروویک دارد (Heitmann et al., 2018).

۲.۱. کاربرد ساکارومایسز سرویزیه در خمیر ترش

در خمیر ترش، تخمیر به صورت خودبه‌خودی یا با استفاده از کشت آغازگر توسط باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) و مخمرها که مخلوطی از آرد و آب را تخمیر می‌کنند، انجام می‌شود. تنوع میکروارگانیسم‌ها در سراسر جهان، با بیش از ۳۰ گونه مخمر و ۵۰ گونه LAB شناسایی شده به خوبی توصیف شده است. در یک خمیر ترش معمولاً یک گونه مخمر غالب وجود دارد، که معمولاً ساکارومایسز سرویزیه است، و یک گونه LAB غالب با تنوع کم وجود دارد، در حالی که بین خمیرهای ترش تنوع می‌تواند بالا باشد. سلول‌های LAB معمولاً یک لگاریتم بیشتر از سلول‌های مخمر هستند. فعالیت‌های متابولیکی اصلی شامل اسیدی کردن (LAB)، تشکیل طعم (LAB و مخمرها) و ورآمدن (مخمرها و گونه‌های LAB هتروفرمنتیو) است. گونه‌های مخمر غالب در خمیرهای ترش توانایی تخمیر در شرایط بی‌هوازی و هوازی را دارند، بنابراین به عنوان مخمرهای مثبت به اثر Crabtree در نظر گرفته می‌شوند (Carbonetto et al., 2018; De Vuyst et al., 2016). در حالی که بسیاری از مقالات و بررسی‌ها به باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) در خمیر ترش پرداخته‌اند، تعداد کمی از

بررسی‌ها به مخمرها در خمیر ترش پرداخته‌اند (Carbonetto et al., 2018; De Vuyst et al., 2016). تنوع متابولیکی گونه‌های مخمر و LAB در خمیر ترش، طیف وسیعی از ترکیبات را ارائه می‌دهد که ممکن است ترکیب نهایی و ویژگی‌های نان حاصل از خمیر ترش را تعیین کنند (Carbonetto et al., 2018). در صنعت نان‌پزی، یک روند به سوی تولید نان با تخمیر کوتاه وجود دارد که منجر به توسعه محدود عطر و طعم می‌شود. افزودن کشت‌های آغازگر باکتریایی مختلف می‌تواند با تولید عطر و طعم در طی این تخمیرهای کوتاه جبران کند (Heitmann et al., 2018).

۳.۱. کاربرد ساکارومایسز سرویزیه در صنعت شکلات

دانه‌های گیاه گرمسیری *Theobroma cacao* ماده اولیه اصلی برای تولید شکلات هستند (Aprotosoaie et al., 2016; Schwan & Wheals, 2004). اما این دانه‌های کاکائوی خام غیرقابل خوردن، تلخ و گس هستند و عطر و طعم آن‌ها شبیه شکلات نیست؛ بنابراین، تحت فرآیند تخمیر قرار می‌گیرند تا سطح پلی‌فنول‌ها و آلکالوئیدها که باعث تلخی و گسی می‌شوند، کاهش یابد و طعم‌هایی که ویژگی‌های حسی برتر کاکائو و شکلات را تعیین می‌کنند، توسعه یابند (Aprotosoaie et al., 2016; Schwan & Wheals, 2004). به این منظور، پس از باز شدن غلاف‌های کاکائو، دانه‌های کاکائو که توسط پالپ اسیدی (با غلظت بالای اسید سیتریک) و غنی از قند (۱۰-۱۵٪ قندها) پوشانده شده‌اند، در معرض میکروفلور وحشی موجود در طبیعت قرار می‌گیرند و تخمیر خودبه‌خودی انجام می‌شود (Gutiérrez, 2017; Schwan & Wheals, 2004). میکرو اکوسیستم تخمیر کاکائو پیچیده و پویا است و عمدتاً شامل مخمرها، باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) و باکتری‌های اسید استیک (AAB) می‌باشد (De Vuyst & Weckx, 2016; Meersman et al., 2016; Papalexandratou & De Vuyst, 2011). در آغاز فرآیند تخمیر، مخمرها تحت شرایط بی‌هوازی و pH پایین (۳-۴) شروع به تخمیر قندهای پالپ کرده و اتانول و همچنین متابولیت‌های طعم‌دهنده متعددی تولید می‌کنند که کیفیت محصولات نهایی را تعیین می‌کنند (Gutiérrez, 2017; Meersman et al., 2015; Schwan & Wheals, 2004). علاوه بر این، از طریق عمل آنزیم‌های پکتینولیتیک، آن‌ها به تدریج پالپ بسیار چسبناک کاکائو (حاوی ۱/۵ درصد پکتین) را تجزیه می‌کنند و امکان نفوذ هوا به داخل پالپ را فراهم می‌کنند (Gutiérrez, 2017; Schwan & Wheals, 2004)، همچنین اسید سیتریک را متابولیزه می‌کنند و باعث افزایش pH می‌شوند (Aprotosoaie et al., 2016; Gutiérrez, 2017; Schwan & Wheals, 2004)، شرایطی که رشد LAB و AAB را تسهیل می‌کند (Gutiérrez, 2017; Schwan & Wheals, 2004). LAB با متابولیزه کردن اسید سیتریک pH را بیشتر افزایش می‌دهد و AAB اتانول را به اسید استیک اکسید می‌کند (Gutiérrez, 2017; Schwan & Wheals, 2004). از آنجا که تولید هر دو اتانول و اسید استیک واکنش‌های گرمازا هستند، دما تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد (Aprotosoaie et al., 2016; Schwan & Wheals, 2004). طبق نتایج آزمایشات، فعالیت مخمرها برای تولید شکلات با کیفیت بالا از اهمیت بسیاری برخوردار است. به طور خاص، در تخمیرهای آزمایشی کاکائو که با حضور یا عدم حضور مخمرها انجام شد، هو و همکاران در سال ۲۰۱۴ (Zhao & Fleet, 2014) مشاهده کردند که بدون حضور مخمرها تولید اتانول، الکل‌های بلند زنجیر و استرها در طول تخمیر کاهش یافته و شکلات تولید شده کیفیت کمتری نسبت به شکلات تولید شده با حضور مخمرها داشت. برعکس، همان تیم تحقیقاتی گزارش می‌دهد که LAB و AAB برای تکمیل فرآیند تخمیر کاکائو ضروری نبودند و عدم حضور آن‌ها بر ویژگی‌های ارگانولپتیک شکلات تولید شده تأثیری نداشت (Fleet & Zhao, 2018; Zhao

& Fleet, 2015). طیف گسترده‌ای از مخمرها از تخمیر دانه‌های کاکائو جدا و شناسایی شده‌اند که ساکارومایسز سرویزیه یکی از رایج‌ترین آن‌ها در چندین مطالعه است (Ardhana & Fleet, 2003; Batista et al., 2015; da Veiga Moreira et al., 2013; Daniel et al., 2009; Jespersen et al., 2005; Meersman et al., 2013; Mota-Gutierrez et al., 2018; Papalexandratou & De Vuyst, 2011; Ramos et al., 2014; Schwan, 1998). این واقعیت به ویژگی‌های خاص ساکارومایسز سرویزیه از جمله فعالیت پکتینولیتیک، رشد سریع در pH کمی افزایش یافته و سازگاری بهتر با شرایط تنش‌زا از جمله غلظت‌های بالای اتانول و دماهای بالا نسبت داده می‌شود (De Vuyst & Weckx, 2016; Schwan & Wheals, 2004). برخلاف سایر تخمیرهای صنعتی، تخمیر کاکائو خودبه‌خود انجام می‌شود و بنابراین به‌خوبی کنترل نمی‌شود؛ تلقیح با کشت‌های آغازگر انتخاب‌شده می‌تواند تخمیرهای موفقی با قابلیت تکرار تضمین‌شده را فراهم کند (Schwan & Wheals, 2004). به این منظور، ساکارومایسز سرویزیه توجه زیادی را به خود جلب کرده و چندین مطالعه از سویه‌های این گونه به عنوان کشت آغازگر در طرح‌های تخمیر چند سویه یا تخمیر تک سویه استفاده کرده‌اند (Castro-Alayo et al., 2019; Mota-Gutierrez et al., 2019). با این حال، دینامیک و سهم ساکارومایسز سرویزیه در تخمیر کاکائو به وضوح در شواهد تجربی مطالعاتی که در آن ساکارومایسز سرویزیه به عنوان تنها کشت آغازگر استفاده شده یا در مطالعات مقایسه‌ای که حضور یا عدم حضور آن تنها پارامتر تمایز بود، نمایش داده شده است. به طور خاص، گزارش شده است که فعالیت پکتینولیتیک ساکارومایسز سرویزیه در تخمیرهای تلقیح شده کاکائو، تخلیه پالپ را تا ۱۲۷ درصد بهبود بخشیده است (Buamah et al., 1997). علاوه بر این، میرسمان و همکاران در سال ۲۰۱۷ (Meersman et al., 2017) به منظور ارزیابی نقش اندو پلی‌گالاکتوروناز (EPG)، تخمیرهای پالپ کاکائو را با تلقیح نوع وحشی ساکارومایسز سرویزیه یا سویه‌ای که ژن PGU1، که رمزگذار EPG است، در آن حذف شده بود، انجام دادند. به عنوان نمونه کنترل، تخمیر با پالپ تلقیح‌نشده انجام شد. همانطور که میرسمان و همکاران در سال ۲۰۱۷ (Meersman et al., 2017) گزارش کردند، ویسکوزیته پالپ تلقیح‌شده با این نوع سویه تفاوت معنی‌داری با پالپ تخمیرنشده نداشت، در حالی که این تفاوت ۲۳/۵ درصد بیشتر از پالپ تخمیرشده با سویه نوع وحشی بود (Meersman et al., 2017). این نتایج EPG را به عنوان آنزیم اصلی پکتینولیتیک ساکارومایسز سرویزیه برای تجزیه پالپ نشان می‌دهد.

علاوه بر این، لفبر و همکاران در سال ۲۰۱۲ (Lefeber et al., 2012) و راموس و همکاران در سال ۲۰۱۴ (Ramos et al., 2014) گزارش داده‌اند که تلقیح با سویه‌های ساکارومایسز سرویزیه منجر به مصرف سریع‌تر قندهای پالپ و تولید بیشتر اتانول شده و فرآیند تخمیر را تسریع می‌کند. چندین مطالعه نیز بر تاثیر تلقیح ساکارومایسز سرویزیه بر ویژگی‌های ارگانولپتیک شکلات‌های تولید شده تمرکز کرده‌اند. لفبر و همکاران در سال ۲۰۱۲ (Lefeber et al., 2012) گزارش دادند که شکلات‌های تولید شده در حضور ساکارومایسز سرویزیه در یک کشت آغازگر چند سویه همراه با LAB و AAB به عنوان شکلات میوه‌ای توصیف شدند و توسط یک فرد آموزش‌دیده نسبت به نمونه‌های تولید شده در غیاب آن در کشت آغازگر یا نمونه‌های تولید شده توسط تخمیر خودبه‌خودی دانه‌های کاکائو بیشتر ترجیح داده شدند. ویسینتین و همکاران در سال ۲۰۱۷ (Visintin et al., 2017) به نتیجه مشابهی رسیدند که بوی میوه‌ای بیشتری در شکلات‌های تولید شده در حضور ساکارومایسز سرویزیه و تایروبوتیریکوم دلبروکی[۱۰] نسبت به نمونه‌های تخمیر شده در حضور تنها تایروبوتیریکوم دلبروکی مشاهده کردند. این تاثیر مثبت ساکارومایسز سرویزیه بر ویژگی‌های حسی می‌تواند به توانایی آن در تولید ترکیبات طعم‌دهنده

[۱۰] Thyrobutryricum delbrueckii

مطلوب مانند استرها، الکل‌ها و آلدئیدها که به ترتیب نوت‌های میوه‌ای، گل‌دار، آب‌نباتی، میوه‌ای و کاکائویی می‌دهند، نسبت داده شود (Magalhães da Veiga Moreira et al., 2017; Menezes et al., 2016). به طور خاص، ساکارومایسز سرویزیه با ترکیبات طعمی مهم در دانه‌های کاکائو مانند اتیل اوکتانوآت، ۲-فنیل اتیل استات، اتیل استات، ۲-متیل-بوتانال، ۲-متیل-بوتانول، ۲-فنیل اتانول و ۲-هپتانول مرتبط است (Mota-Gutierrez et al., 2019; Mota-Gutierrez et al., 2018).

آسی کلر و همکاران در سال ۲۰۱۹ (Assi-Clair et al., 2019) مطالعه مقایسه‌ای بر عملکرد دو سویه ساکارومایسز سرویزیه به عنوان کشت آغازگر در تخمیر کاکائو انجام دادند. بر اساس نتایج آن‌ها، دو سویه پروفایل‌های مختلفی در تولید متابولیت‌های طعم‌دهنده ارائه دادند که در ویژگی‌های ارگانولپتیک شکلات‌های تولید شده نیز مشاهده شد،که نشان می‌دهد انتخاب یک کشت آغازگر موفق بیشتر به سویه نسبت به گونه بستگی دارد. پارامتر دیگری که باید در نظر گرفته شود، تنوع کاکائو مورد استفاده است. نتایج آزمایشی راموس و همکاران در سال ۲۰۱۴ (Ramos et al., 2014) و منزس و همکاران در سال ۲۰۱۶ (Menezes et al., 2016) نشان داد که تلقیح انواع مختلف کاکائو با CA11 ساکارومایسز سرویزیه منجر به تولید شکلات‌هایی با پروفایل‌های حسی متفاوت شد. این نتایج نشان می‌دهد که یک کشت آغازگر می‌تواند برای یک نوع خاص کاکائو مناسب باشد، اما برای همه انواع نمی‌تواند مناسب باشد.گام بعدی، پیشنهاد اصلاح سویه‌های ساکارومایسز سرویزیه برای دستیابی به سویه‌های برتر با ترکیبی از ویژگی‌های مطلوب است (Meersman et al., 2015; Meersman et al., 2016). در ابتدا، در سال ۲۰۱۵، تیم میرسامن و همکاران (Meersman et al., 2015) سویه‌های منتخب را پرورش دادند و یک هیبرید تولید کردند که در مقایسه با سویه‌های والد، تحمل دمایی و ظرفیت تخمیر بیشتری داشت و همچنین شکلات با کیفیت برتری تولید می‌کرد. در پی آزمایشات دیگر در سال ۲۰۱۶، همان تیم هیبریدهای بهبودیافته‌تری گزارش کردند که علاوه بر تحمل دما و تخمیر قوی، می‌توانستند غلظت‌های بالایی از استرهای مطلوب تولید کنند که طعم شکلات تولید شده را تعدیل می‌کرد (Meersman et al., 2016). این مطالعات به اهمیت ساکارومایسز سرویزیه در تخمیر کاکائو اشاره دارند و نشان می‌دهند که استفاده از آن به عنوان کشت آغازگر می‌تواند به بهبود کارایی و یکنواختی تخمیر و در نتیجه کیفیت تولید تجاری شکلات کمک کند.

۴.۱. کاربرد ساکارومایسز سرویزیه در تولید اتانول زیستی

ساکارومایسس سرویزیه (مخمرهای تخمیری) به راحتی گلوکز، فروکتوز، مانوز، گالاکتوز، ساکارز و مالتوز را به اتانول و دی‌اکسید کربن تخمیر می‌کند. این مخمر از قندها به عنوان منابع کربن در طی تنفس بی‌هوازی استفاده می‌کند. ساکارومایسس سرویزیه گاهی به عنوان مخمر اتانولوژنیک در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند به راحتی بسترهای حاوی گلوکز را به عنوان منبع کربن تخمیر کرده و به اتانول و دی‌اکسید کربن تبدیل کند. ترتیب مسیر آنزیمی در اینجا شامل گلیکولیز است، یعنی تبدیل گلوکز به اسید پیرووِیک و می‌توان آن را به صورت زیر خلاصه کرد:

$$\text{Glucose} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2\text{Pyruvate} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH}^+ + 2\text{H}^+$$

در طول این مسیر، انرژی به صورت $NADH^+$ برای رشد سلول‌های مخمر یا زیست توده تامین می‌شوند. علاوه بر این، در گلیکولیز، گلوکز ابتدا با استفاده از ATP فسفریله شده و فروکتوز ۱, ۶-بیس فسفات تولید می‌شود که سپس توسط آلدولاز شکسته می‌شود و دو ترکیب تریوز فسفات تشکیل می‌دهد. فسفریلاسیون بیشتر، دو تریوز دی‌فسفات را تشکیل می‌دهد که چهار اتم هیدروژن از آن‌ها توسط دو مولکول NAD^+ پذیرفته می‌شود. در مراحل بعدی گلیکولیز، چهار مولکول ATP تشکیل می‌شود که منجر به تشکیل دو مولکول اسید پیروویک با تولید خالص دو مولکول ATP می‌شود. بنابراین، این تنها منبع انرژی است که توسط ساکارومایسس سرویزیه در طول متابولیسم تخمیری به دست می‌آید. سلول‌های مخمر که تحت تخمیر الکلی قندها در شرایط بی‌هوازی قرار دارند، قادر به تولید مجدد NAD^+ هستند. این تولید مجددNAD^+ برای حفظ تعادل واکنش احیاء در ادامه فرآیندهای گلیکولیز ضروری است (Walker & Stewart, 2016). بنابراین، این تنها منبع انرژی است که توسط ساکارومایسس سرویزیه در طول متابولیسم تخمیری به دست می‌آید. سلول‌های مخمر که تحت شرایط بی‌هوازی به تخمیر الکلی قندها می‌پردازند، نیاز به بازسازی NAD^+ دارند. این بازسازی NAD^+ برای حفظ تعادل اکسیداسیون-احیا و ادامه فرآیند گلیکولیز ضروری است. (Walker & Stewart, 2016). در مرحله اول، پیرووات توسط پیرووات دکربوکسیلاز دکربوکسیله می‌شود و قبل از واکنش احیاء نهایی که توسط الکل دهیدروژناز (ADH) کاتالیز می‌شود به اتانول تبدیل می‌شود:

$$\text{Pyruvate} + 2NADH^+ + 2H^+ \rightarrow 2NAD^+ + 2\text{Ethanol} + 2CO2$$

ترکیب واسطه‌ای که در این واکنش تولید می‌شود، استالدهید است که به عنوان پذیرنده الکترون عمل می‌کند و پس از دکربوکسیلاسیون پیرووات تولید می‌شود (Walker & Stewart, 2016). با وجود اینکه اتانول می‌تواند توسط بسیاری از میکروفلورهای خودبخودی و دیگر مخمرهای غیر ساکارومایسس تولید شود، اما با این حال ساکارومایسس سرویزیه به عنوان پرکاربردترین مخمر برای تولید اتانول در سطح صنعتی برجسته است. بی‌تردید، تولید اتانول زیستی توسط مخمرهای ساکارومایسس تا حد زیادی بزرگترین محصولات سوخت زیستی و اتانولی در بخش بیوتکنولوژی صنعتی است. اتانول‌های زیستی انرژی‌های تجدیدپذیری هستند که در سال‌های اخیر بیشترین توجه تحقیقاتی و صنعتی را به خود جلب کرده‌اند. اتانول زیستی[۱۱]، سوخت زیستی[۱۲]، دیزل زیستی[۱۳] و گاز زیستی[۱۴] از مهم‌ترین انرژی‌های تجدیدپذیر هستند که به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته‌اند(Dai et al., 2007). همچنین، پتانسیل‌های تخمیری مخمرهای ساکارومایسس می‌تواند برای جبران پیامدهای منفی زیست‌محیطی سوخت‌های فسیلی و تاثیرات اجتماعی همراه با آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد. مخمرهای ساکارومایسس به دلیل تخمیر طیف گسترده‌ای از سوبستراها مانند ملاس، سوبستراهای پایه نشاسته، عصاره نیشکر شیرین و دیگر پسماندهای لیگنوسلولزی حاوی قندها و پلیمریزه کردن آن‌ها به سلولز و همی‌سلولز شناخته شده‌اند. این مواد توسط هیدرولیز آزاد شده و به سوخت زیستی تبدیل می‌شوند (Dai et al., 2007).همچنین، مخمرهای ساکارومایسس می‌توانند پسماندهای لیگنوسلولزی شامل بقایای کشاورزی و جنگل‌داری را به اتانول زیستی و سوخت زیستی تبدیل کنند. بنابراین، پتانسیل صنعتی مخمرهای ساکارومایسس بسیار قابل توجه است. اما، تأکید جهان اکنون بر اقتصاد زیستی در مقابل اقتصاد نفت و گاز سال‌های گذشته است.

Bioethanol[۱۱]
Biofuels[۱۲]
Biodiesel[۱۳]
Biogas[۱۴]

۵.۱. پتانسیل پروبیوتیکی ساکارومایسس سرویزیه

سازمان جهانی بهداشت[15] پروبیوتیک‌ها را میکروارگانیسم‌هایی تعریف می کند که می‌توانند در صورت مصرف در مقادیر کافی، تاثیرات مثبتی بر سلامت انسان داشته باشند (Fakruddin et al., 2017; Vieira et al., 2013). ساکارومایسز سرویزیه واریته بولاردی که عموما با نام ساکارومایسز بولاردی شناخته می‌شود، تنها مخمری می‌باشد که به عنوان پروبیوتیک انسانی معرفی شده‌است. این میکروارگانیسم یوکاریوتی برای اولین بار، در یک اپیدمی وبا در سال ۱۹۲۸ از منطقه هندوچین[16] جداسازی شد. اولین بار دانشمند فرانسوی به نام هانری بولارد در حالی که به دنبال یافتن گونه‌های جدید آزمایشگاهی و صنعتی از جنس ساکارومایسز بود، متوجه شد مردم محلی نواحی جنوب شرق آسیا، به واسطه مصرف چای برگرفته از میوه های گرمسیری ترنجین و لیچی[17] نسبت به علائم بیماری ها مقاوم هستند. با آنالیز موست میوه‌های ذکر شده وی متوجه حضور و جداسازی ساکارومایسز سرویزیه واریته بولاردی شد که بعدا خواص پروبیوتیکی آن اثبات گردید (McFarland, 2010). اگر چه ساکارومایسز سرویزیه واریته بولاردی متعلق به همان گونه ساکارومایسز سرویزیه است اما مشخصات ژنتیکی متفاوتی از جمله تریزومی کروموزوم IX و نسخه های ژنی مرتبط با پاسخ استرس دارد. این تفاوت‌های ژنتیکی برخی خصوصیات فیزیولوژیکی متمایز از جمله دمای بهینه رشد ۳۷ درجه سانتی گراد، قابلیت تحمل pH پایین معده، مقاومت به نمک‌های صفراوی و پروتئازهای پانکراس را در هر دو محیط آزمایشگاهی و هم در داخل بدن موجود زنده توجیه می‌کند (Edwards-Ingram et al., 2007; Fietto et al., 2004). علاوه بر ساکارومایسز سرویزیه واریته بولاردی، سایر سویه های ساکارومایسز سرویزیه به عنوان پروبیوتیک‌های دامپزشکی و افزودنی‌های خوراک دام تایید شده است. ثابت شده است که واریته‌های پروبیوتیکی ساکارومایسز سرویزیه منجر به کاهش علائم اسهال و کولیت ناشی از ازدیاد مصرف آنتی بیوتیکی به ویژه مرتبط با کلستریدیوم دیفیسیل می‌شود. همچنین اثرات مثبت آن در بهبود علائم ثانویه گاستریت هلیکوباکتریایی، بیماری‌های التهابی روده از جمله سندرم روده تحریک‌پذیر، اسهال عفونی روتاویروسی و اسهال حاد مسافرتی نیز نشان داده شده است (Palma et al., 2015). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۷ توسط فخرالدین و همکاران (Fakruddin et al., 2017) انجام شد، پتانسیل پروبیوتیکی ساکارومایسز سرویزیه سویه IFST 062013 بیان گردید. این پژوهشگران بیان کردند که این ایزوله به طیف وسیعی از تغییرات دمایی و pH، غلظت بالای نمک‌های صفراوی و NaCl، اسید معده، محیط روده، α-آمیلاز، تریپسین و لیزوزیم مقاوم است. همچنین این سویه می‌تواند اسید آلی تولید کند و در برابر آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین، آمپی سیلین، جنتامایسین، پنی سیلین، پلی میکسین B و نالیدیکسیک اسید مقاومت نشان دهد. این موارد نشان دهنده پتانسیل بالای استفاده از این سویه به عنوان مخمر پروبیوتیک چه در عرصه درمان و چه در ماتریس پیچیده غذایی دارد. البته این محققان بیان کردند که قبل از کاربردهای درمانی و غذایی این ایزوله، باید تحقیقات بیشتری برای حصول اطمینان از ایمنی و کارایی مخمر پروبیوتیک انجام گردد. مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که گونه‌های مختلف مخمر ساکارومایسس دارای سویه‌هایی با پتانسیل پروبیوتیک هستند. علاوه بر این، سویه‌های با پتانسیل چند عملکردی جدا شده در این مطالعات می‌توانند برای تولید محصولات پروبیوتیک (غذاها و داروها) استفاده شوند. این ممکن است راه حلی برای افزایش

[15] WHO
[16] Indochina
[17] Mangosteen and lychee

تقاضا برای این محصولات باشد زیرا تنها مخمری برای محصولات پروبیوتیکی در بازار استفاده می شود، جنس ساکارومایسز است. اگرچه مطالعات بیشتری برای بررسی مزایای سلامتی، مکانیسم‌ها و ایمنی سویه‌های شناسایی شده مورد نیاز می‌باشد (Fernandez-Pacheco et al., 2018).

۶.۱. عصاره مخمر منتج از ساکارومایسز سرویزیه در صنایع غذایی

عصاره مخمر با هیدرولیز و حذف دیواره سلولی مخمر به دست می آید و حاوی اجزای محلول در آب سلول مخمر از جمله پپتیدها، اسیدهای آمینه آزاد، نوکلئوتیدها، مواد معدنی و ویتامین‌ها است. علاوه بر محتوای پروتئین بالای عصاره مخمر، این ترکیب حاوی اسیدهای آمینه ضروری و ویتامین‌های گروه B است که عصاره مخمر را به محصول ارزشمندی تبدیل می کند که هم در رژیم های معمول غذایی و هم در رژیم های مر تبط با گیاه خواری قابل استفاده است (Takalloo et al., 2020). در سال های اخیر، به دلیل گسترش تعصب در جامعه علیه استفاده مونو سدیم گلوتامات[۱۸] به عنوان افزودنی و طعم‌دهنده در موادغذایی، تولیدکنندگان این صنعت را به سمت استفاده از منابع جایگزین سوق داده است. عصاره‌های مخمر به دلیل فرآیند تولیدشان به طور کلی به عنوان "فراورده‌های طبیعی" و GRAS در نظر گرفته می‌شوند و به دلیل خواص تغذیه ای خود و همچنین عطر و طعمی شبیه به MSG بسیار مورد توجه هستند (Demirgül et al., 2022). مطالعات مخلفی اقدام به بررسی ترکیب شیمیایی و پتانسیل کاربرد عصاره مخمر منتج از گونه های مختلف جنس ساکارومایسز کرده اند که در این بین مطالعه دمیرگول و همکاران در سال ۲۰۲۲ برجسته شده است. در این مطالعه، خواص شیمیایی، عملکردی و طعمی پودرهای عصاره مخمر تولید شده از ساکارومایسز سرویزیه سویه TGM10، ساکارومایسز بولاردی سویه S11 و کلورومایسس مارکسیانوس سویه TGM66 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره مخمر منتج از ساکارومایسز سرویزیه سویه TGM10 بیشترین نمونه غنی از پروتئین و اسید های آمینه ضروری بود. علاوه بر این ارزیابی پروفایل اسید آمینه ای نمونه ها نشان می دهد، اسیدهای آمینه افزایش دهنده طعم مانند اسید گلوتامیک، اسید آسپارتیک، آلانین و گلیسین در عصاره مخمر ساکارومایسز سرویزیه سویه TGM10 غالب بودند. ارزیابی حسی عصاره های مخمر نشان داد که امتیازات طعم شوری، طعم اومامی[۱۹] و طعم گوشتی عصاره مخمر از مونو سدیم گلوتامات کمتر بود در حالی که از نظر طعم میوه‌ای، عصاره مخمر بالاترین امتیاز را داشت. این یافته ها نشان دهنده پتانسیل امیدوار کننده سه سویه مخمری مورد مطالعه از جمله ساکارومایسز سرویزیه سویه TGM10 را برای کاربرد به عنوان افزودنی و طعم دهنده طبیعی غذایی می باشد (Demirgül et al., 2022). مطالعات دیگر نیز استفاده از عصاره مخمری بدست آمده از ساکارومایسز سرویزیه را به عنوان جایگزین طبیعی افزودنی شیمیایی MSG تاکید کرده اند (Tomé, 2021). همچنین از این فراورده می توان به عنوان منبع ترکیبات زیست فعال در مواد غذایی فراسودمند و مکمل های غذایی نیز استفاده کرد (Thyab Gddoa Al-sahlany et al., 2020).

[18] MSG
[19] Umami

۷.۱. کاربرد ساکارومایسز سرویزیه به عنوان پوشش های خوراکی زیست تخریب‌پذیر

ساکارومایسس سرویزیه از نظر صنعتی گسترده‌ترین گونه مخمر در جهان است. به دلیل پتانسیل زیست‌تخریب‌پذیری ذاتی و وجود آن در طبیعت، سلول‌های ساکارومایسس سرویزیه برای تولید فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر و مواد تشکیل‌دهنده بیوپلیمرها که به عنوان ماده اولیه برای صنایع ما استفاده می‌شوند، به کار می‌روند. علاوه بر این، زیست‌توده ساکارومایسس سرویزیه حاوی پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها است که می‌توان آن‌ها را به‌منظور استفاده بهینه جدا کرد (Delgado et al., 2016). امروزه این بیوپلیمرهای جداشده از زیست‌توده در جوامع صنعتی و علمی به‌طور فزاینده‌ای مورد توجه قرار گرفته‌اند و برای تحقیق و توسعه مواد زیست‌تخریب‌پذیر برای صنعت غذا به کار می‌روند. نویسندگان، زیست‌توده مخمر را به عنوان یک ماده غذایی طبیعی و کم‌هزینه برای تغذیه انسان توصیف کرده‌اند (Cottet et al., 2020). در سال‌های اخیر، علاقه قابل توجهی به سایر کاربردهای آن به وجود آمده است. برای مثال، به عنوان پروبیوتیک‌ها برای مکمل‌های غذایی انسانی و حیوانی و برای توسعه مواد زیست‌تخریب‌پذیر برای بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شود. کاربردهای دیگر آن شامل موارد زیر است: ۱. زیست‌توده مخمر مصرف‌شده توسط تولیدکنندگان آبجو دارای ارزش غذایی بالایی از نظر ترکیبات زیست‌فعال است. ۲. زیست‌توده مخمر منبع مهمی از پلیمرهای زیستی برای تهیه فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر است.

این پیشرفت‌ها در پاسخ به روند جدید و تقاضای مصرف‌کنندگان برای محصولات طبیعی که آلودگی محیطی کمتری ایجاد می‌کنند، به دست آمده است (Delgado et al., 2016). به عنوان مثال، دلگادو و همکاران (۲۰۱۶) فیلم‌هایی بر پایه زیست‌توده مخمر تهیه کردند. در این پژوهش، نویسندگان نشان دادند که زیست‌توده مخمر (۱۰ درصد وزن ماده خشک) که فیلم از آن تشکیل شده بود، تحت هموژنیزاسیون با فشار بالا پراکنده شد. اما، برای به دست آوردن ترکیبات مخمر، سلول‌ها شکسته می‌شوند تا مواد درون‌سلولی را به محیط اطراف آزاد کنند. علاوه بر این، در مطالعه آن‌ها، از تیمارهای حرارتی مختلفی استفاده شد. فشارهای بالاتر از ۶۰ مگاپاسکال (MPa) موثرتر بودند و فشارهای بالاتر از ۱۲۵ مگاپاسکال بیشترین تاثیر را داشتند (Delgado et al., 2016). در ابتدا از هموژنیزاسیون برای شکستن سلول‌ها استفاده شد و سپس تیمار حرارتی به منظور دناتوره کردن آنزیم‌ها و پروتئین‌های موجود اعمال شد و هموژنیزاسیون دوم برای حذف احتمالی تجمعاتی که در طول تیمار حرارتی شکل گرفته بودند، انجام شد. سپس حلال، یعنی آب در این مورد، از ماتریس فیلم حذف شد (Peltzer et al., 2018). نتایج مشابهی توسط گوئررو و همکاران (۲۰۱۰) در فیلم‌های ساخته شده از ایزوله‌های پروتئین سویا با استفاده از تیمار حرارتی بالای ۱۸۰ درجه سانتیگراد برای تجزیه قابل توجه مواد زیست‌توده به دست آمد (Guerrero et al., 2010). در تحقیقات دیگری با فیلم‌های مخمر، گلیسرول به عنوان نرم‌کننده استفاده شد؛ یعنی گلیسرول در این مورد به عنوان ماده پخش‌کننده به مخمر از پیش تیمارشده اضافه شد تا فیلم‌ها به روش ریخته‌گری تولید شود (Peltzer et al., 2018). فیلم‌های مخمر به طور کامل از نظر بصری، حرارتی و طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) مورد بررسی قرار گرفتند. نرم‌کننده‌ها بهبود یکپارچگی فیلم، انعطاف‌پذیری و ویژگی مکانیکی را نشان دادند، زیرا تمایل دارند فضای مولکولی بین زنجیره‌های پلیمر را افزایش دهند.

۸.۱. کاربرد ساکارومایسز سرویزیه به عنوان ماده کپسوله‌سازی/حامل

کپسولاسیون[۲۰] فرآیندی است که در آن یک ترکیب در ماتریس ترکیب دیگری پنهان می‌شود. ترکیبی که کپسوله می‌شود ممکن است ماده اصلی مورد نیاز باشد و ترکیبی که به عنوان کپسول‌سازی عمل می‌کند، به عنوان ماده پوششی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مورد، سلول‌های مخمر ساکارومایسس برای اهداف کپسوله‌سازی استفاده می‌شوند. همچنین به عنوان زیست‌توده برای کپسوله‌سازی مولکول‌های زیستی مختلف که در بسیاری از بخش‌های صنعتی مورد نیاز هستند، استفاده می‌شود (Paramera et al., 2023). علاوه بر این، امروز در زمینه بیوتکنولوژی، تکنیک‌های مختلفی برای میکروکپسوله‌سازی مورد استفاده قرار می‌گیرند، از جمله خشک‌کردن پاششی، لیوفیلیزاسیون (خشک‌کردن انجمادی)، پوشش‌دهی بستر سیال، اکستروژن، امولسیون‌سازی، کوآسرواسیون (جداسازی محلول پلیمری آبی به دو مایع) و روش‌های الکترواستاتیک (Mokhtari et al., 2017). صنایع مختلفی می‌توانند از هر یک از این فرآیندها در تولیدات خود استفاده کنند. به عنوان مثال، این فرآیند در صنایعی نظیر صنعت غذا، عطرسازی، آفت‌کش‌ها، صنایع شیمیایی، صنایع داروسازی و غیره انجام می‌شود. ساکارومایسس سرویزیه یک میکروارگانیسم ایده‌آل برای استفاده به عنوان مواد کپسوله‌سازی و حامل ترکیبات فعال، به دلیل قابلیت زیست‌تخریب‌پذیری، ارزش غذایی، مقرون‌به‌صرفه بودن و در دسترس بودن آن است. در جهت استفاده از آن به عنوان میکروکپسول، پارامرا و همکاران (۲۰۱۴) فناوری‌های مختلفی را فهرست کردند که عمدتاً شامل پلاسمولیز سلول‌ها برای حذف محتویات سیتوپلاسمی، خشک‌کردن پاششی و خشک‌کردن انجمادی است. علاوه بر این، آن‌ها گزارش دادند که مولکول‌هایی که باید کپسوله شوند به دلیل رفتار آن‌ها به عنوان لیپوزوم می‌توانند هم آب‌گریز و هم آب‌دوست باشند (Paramera et al., 2023; Salari et al., 2013). نیا (۲۰۲۲) یکی از کاربردهای آن را در کپسولاسیون پروبیوتیک‌ها گزارش کرد تا قابلیت زیستی آن‌ها را در محیط‌های مقاوم به حرارت بهینه کند. این مطابق با سایر مطالعات است که نشان می‌دهد سلول‌های مخمر تا دماهای نزدیک به ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد پایدار هستند و بنابراین آن‌ها را به کاندیداهای خوبی برای مواد کپسوله‌سازی برای محافظت از ترکیبات زیرفعال در بدن تبدیل می‌کند(Nya, 2022).

۹.۱. ساکارومایسز سرویزیه به عنوان منبع تولید کاتالیزور های زیستی

آنزیم‌ها کاتالیزورهای زیستی هستند که در بسیاری از فرایندهای غذایی و متابولیکی نقش‌های موثری را ایفا می‌کنند. آنزیم‌های ساکارومایسس سرویزیه به واسطه تنوع زیستی بالا و کاربرد صنعتی به خوبی شناخته شده‌اند. فرآیند تولید آنزیم‌های صنعتی با منشا مخمر ساکارومایسز سرویزیه شامل سنتز از طریق تخمیر، بازیابی از محیط تخمیر و مرحله خالص‌سازی برای حذف آلاینده ها می‌باشد. تولید آنزیم‌های تجاری در بیوراکتورها به طور کلی از طریق دو روش امکان پذیر است، تخمیر غوطه وری[۲۱] و تخمیر حالت جامد[۲۲]. تخمیر در بستر جامد در سال‌های اخیر به دلیل مزایایی همچون بهره‌وری حجمی بالا، غلظت نسبتاً بالاتر محصولات نهایی، تجهیزات ساده تخمیر و تولید پساب کمتر کاربرد بیشتری پیدا کرده‌است (Vieira & Delerue-Matos, 2020). کاربرد آنزیم‌های خالص سازی شده این مخمر در صنایع غذایی و نوشیدنی، از جمله لبنیات، صنایع نانوایی، نوشیدنی‌ها، فرآوری ماهی و هیدرولیز پروتئین، در فرمولاسیون داروها و لوازم آرایشی و بهداشتی جدید و همچنین در صنعت تولید بیواتانول به خوبی ثابت شده‌است. در صنایع لبنی مخمر ساکارومایسز سرویزیه به عنوان

---

[۲۰] Capsulation
[21] Submerged fermentation (SmF)
[22] Solid-state fermentation (SSF)

حامی کشت‌های آغازگر، مهارکننده میکروارگانیسم‌های نامطلوب که باعث کاهش کیفیت استارترها می‌شوند، جلوگیری از وقوع تغییرات بیوشیمیایی نامطلوب همچون تولید ترکیبات معطر عامل بدطعمی و انجام فعالیت‌های لیپولیتیک و پروتئولیتیک مطلوب در محصولات منتخب. به عنوان مثال در نوشیدنی شیر اسیدوفیلوس، از مخمر ساکارومایسز سرویزیه برای افزایش قابلیت زنده ماندن سویه باکتریایی کشت آغازگر و بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی شیر تخمیر شده استفاده می‌شود (Dissanayake et al., 2015; Parrella et al., 2012). زایلیتول، مانیتول، سوربیتول و اریتریتول الکل‌های قندی هستند که خواص شیرینی مشابه یا بهتری از ساکاروز دارند. تلاش‌هایی در راستای تولید صنعتی این ترکیبات از طریق فرایندهای تخمیر توسط ساکارومایسز سرویزیه صورت پذیرفته‌است (Oh et al., 2013; Park et al., 2016).

۱۰.۱. مهندسی ژنتیک و بهبود سویه های ساکارومایسز سرویزیه

در دهه‌های اخیر، علم و فناوری غذایی با سرعتی سریع در معرفی محصولات جدید برای برآوردن نیازهای تغذیه‌ای، اجتماعی-اقتصادی و کیفیت کمک کرده‌اند. با ظهور ژنتیک مولکولی مدرن، اهمیت صنعتی سویه‌های مختلف ساکارومایسس سرویزیه به طور مداوم در حال گسترش است (Schuller & Casal, 2005). دانش گسترده ای در مورد ژنتیک، بیوشیمی، فیزیولوژی و فناوری های تخمیر این میکروارگانیسم یوکاریوت وجود دارد. این مخمر از زمان های قدیم در صنایع تخمیری و نان به طور ایمن استفاده می‌شده‌است. این مخمر توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA) به عنوان به طول کلی ایمن (GRAS) طبقه بندی می‌شود و سموم یا DNA انکوژنیک و ویروسی تولید نمی کند. این ویژگی ها به ساکارومایسز سرویزیه یک استحکام کلی و قابلیت کاربرد بالقوه برای کاربردهای صنعتی می دهد (Le Borgne, 2012). تقاضا برای سویه‌های ساکارومایسز سرویزیه اصلاح شده ژنتیکی مناسب برای تولید سوخت‌های زیستی، استفاده در صنایع نانوایی و نوشیدنی یا برای تولید محصولات بیوتکنولوژیکی (مانند آنزیم‌ها و محصولات دارویی) به طور مداوم در آینده نزدیک افزایش چشم گیر خواهد داشت (Schuller & Casal, 2005). مهندسی ژنتیک با موفقیت در سویه‌های آزمایشگاهی ساکارومایسس سرویزیه برای اهداف مختلف استفاده شده است: از جمله این اهداف، گسترش دامنه تنوع بسترهای مختلف کشت، بهبود بهره‌وری و عملکرد تولید فراورده های نهایی، حذف محصولات جانبی، بهبود عملکرد فرآیند و گسترش دامنه تنوع تولید محصول می‌باشد. پتانسیل مخمرهای دستکاری و اصلاح‌شده ژنتیکی برای تولید انبوه سوخت‌های زیستی (بیواتانول) و سایر محصولات غیرسوختی از منابع تجدیدپذیر مانند زیست توده لیگنوسلولزی شناخته شده است. برای چنین کاربردهایی باید از سویه های صنعتی مقاوم ساکارومایسز سرویزیه استفاده شود که خصوصیات بهبود یافته ای برای تحمل شرایط سخت تخمیر یا کمبود منابع تولید داشته باشند (Le Borgne, 2012). برخلاف روش‌های کلاسیک بهبود سویه‌ها، مهندسی ژنتیک شامل دستکاری هدفمند اطلاعات ژنتیکی سلول برای بهبود تولید متابولیت‌هایی است که به طور طبیعی توسط یک ارگانیسم در غلظت کم تشکیل می‌شوند. تولید ارگانیسمی با توانایی استفاده از بسترهای غیر معمول که امکان گسترش تنوع محیط کشت قابل استفاده به ویژه بسترهای تجدیدپذیر زیست توده لیگنوسلولزی را فراهم کند، یا متابولیت‌هایی را تشکیل دهد که به طور طبیعی تولید نمی‌شوند از مزایا یا ویژگی‌های این ارگانیسم‌های مهندسی شده ژنتیکی می‌باشد (Le Borgne, 2012).

۲. جنبه های ایمنی و مقرراتی استفاده از سویه های اصلاح شده ساکارومایسز سرویزیه

یکی از جنبه های مهم کاربرد مخمر ساکارومایسز سرویزیه در فرایند های صنعتی، استفاده از این میکروارگانیسم در تولید سوخت های زیستی است. گسترش مداوم صنعت سوخت های زیستی با چنین سرعتی باعث رشد قابل توجهی در بیوتکنولوژی مدرن شده است. تا به امروز، بیوتکنولوژی کشاورزی عمدتاً بر روی تولید محصولات تراریخته و میکروارگانیسم‌های تغییر یافته ژنتیکی متمرکز شده است. تولید محصولات تغییر یافته ژنتیکی[۲۳] مزایای اقتصادی فراوانی را با به حداکثر رساندن بازده تولید محصول در قبال استفاده محدود از زمین و آب به سرمایه گذاران ارائه می دهد (Limayem, 2015). در دهه گذشته، ایالات متحده به رهبر جهانی در کشت محصولات اصلاح شده ژنتیکی تبدیل شده است که عمدتاً شامل ذرت و سویا می شود. در سال ۲۰۱۰، کشور برزیل مقام دوم را از نظر سطح زیر کشت دانه سویا در جهان به دست آورد و به مساحت زیر سطح تقریباً ۲۳ میلیون هکتار در کشت این محصول رسید (Cerdeira et al., 2011; Ladisch et al., 2010). در مقابل، در اتحادیه اروپا به واسطه قوانین برچسب زدن اجباری و نگرانی های عمومی مرتبط با اثرات سلامتی این محصولات تا کنون به طور قابل ملاحظه ای سرمایه گذاری ها بر روی تولید و گسترش محصولات تراریخته را محدود کرده است (Carter & Gruere, 2003). جدای از گیاهان تراریخته، تولید سوخت های زیستی از ذرت و مواد اولیه لیگنوسلولزی نیز شامل استفاده از میکروارگانیسم‌های تخمیری تراریخته در بخش‌های مختلف صنایع است. با این حال، با گسترش سرمایه گذاری در بیوتکنولوژی کشاورزی و در صنعت سوخت های زیستی، نگرانی ها در مورد خطرات ناشی از اثرات نامطلوب بهداشتی منتج از حصولات تراریخته ها نیز افزایش یافته است. در دهه گذشته گروه های خواهان حفاظت از اکوسیستم و تنوع زیستی در برابر اثرات محصولات تغییر یافته ژنتیکی تشکیل شده است. محققان نشان می‌دهند که پیامدهای نامطلوب GMOs می‌تواند یک خطر واقعی برای محیط زیست باشد زیرا انتشار غیرقابل برگشت و پیش‌بینی‌نشده این محصولات می تواند در مقاطعی اتفاق بیفتد. اگرچه شواهد واضحی از اثرات نامطلوب مرتبط با سلامتی و محیط زیستی ناشی از کاربرد محصولات تغییر یافته ژنتیکی در حال حاضر وجود ندارد، اتخاذ یک روش علمی معتبر، مانند ارزیابی ریسک[۲۴]، به توسعه اقدامات ایمنی زیستی از طریق یک مدل جامع می انجامد که می‌تواند نگرانی عمومی را کاهش و ایمنی زیست محیطی را تضمین کند. روش‌های سیستمیک، از جمله ارزیابی ریسک در حوزه بیوتکنولوژی،که تخمین کمی و کیفی ریسک و احتمال خطر را برای سرمایه‌گذاران و سیاست‌گذاران این حوزه ارائه می‌کند، در دهه های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. این رویکردها احتمال وقوع و شدت اثر قرار گرفتن در معرض ارگانیسم‌های زنده تراریخته را برای تمامی گروه ها از جمله مصرف کنندگان ارزیابی می‌کنند. این نیاز وجود دارد که بینشی جامع از تمام مراحل عملیاتی در حین تولید و توزیع محصولات تراریخته ایجاد شود تا نقاط بحرانی ایجاد خطر ارزیابی و شناسایی شوند (Flory et al., 2012; Limayem, 2015).

۳. نتیجه‌گیری و چشم اندازهای آینده

اخیرا استفاده از مخمر ساکارومایسز سرویزیه در صنعت‌های مختلف جهت تولید بسیاری از محصولات غذایی مانند نان و محصولات نانوایی، شکلات، اتانول زیستی، بسته‌بندی، کپسولاسیون، ماست، پنیر، و سایر نوشیدنی‌ها به‌دلیل ظرفیت تخمیر آنها و قابلیت تولید ترکیبات زیست فعال و مقاومت بالا در برابر شرایط نامساعد به‌طور بیوتکنولوژیکی مورد توجه قرار گرفته

[۲۳] GMOs
[۲۴] Risk Assessment

است. این ارگانیسم از زیستگاه‌های طبیعی خود نظیر خاک، گیاه، پوست و برگ درختان بلوط، میوه‌های انگور، آناناس، پاپایا، ذرت شیرین، انبه، برنج تخمیر شده و غیره با موفقیت جدا شده و برای فعالیت‌های متابولیکی و تخمیری ارزیابی شده‌اند. با توجه به تحقیقات انجام شده، استفاده از ساکارومایسز سرویزیه می‌تواند به کاهش اثرات زیست‌محیطی و بهبود فرمولاسیون مواد غذایی و فرآیندهای تولید کمک کند. بنابراین، توسعه و بهینه‌سازی سویه‌های مختلف این مخمر، می‌تواند زمینه‌ساز نوآوری‌های بیشتر در صنایع غذایی، سوخت‌های زیستی و مخصوصا بسته‌بندی‌های زیست‌تخریب‌پذیر باشد.

Saccharomyces cerevisiae and Its Potential Applications in the Food Industry

Javaneh Karimi

Department of Food Science and Technology, School of Public Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

j.karimi@stu.ssu.ac.ir

Masoumeh Arab[25]

Department of Food Science and Technology, School of Public Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

arab.sepideh@gmail.com

Sahand Sohrabi

Department of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

sahandsohrabi@sbmu.ac.ir

Abstract

Objectives: *Saccharomyces cerevisiae* is the best-studied eukaryote and a valuable tool for most aspects of basic research on eukaryotic organisms. This is due to its unicellular nature, which often simplifies research, and the fact that nearly all biological functions found in eukaryotes are also present and well-conserved in *S. cerevisiae*. Additionally, this organism is easily amenable to genetic manipulation.

Methods: This study reviews and analyzes existing scientific literature from reputable databases regarding the biological characteristics and applications of *S. cerevisiae* in the food industry and other sectors. It examines the applications of this yeast both independently and in conjunction with other microorganisms.

Findings: Unlike many other organisms, this eukaryote has significant importance for various biotechnological applications. The biotechnological usefulness of *S. cerevisiae* lies in its unique biological characteristics, such as its fermentation capacity, accompanied by the production of alcohol and CO2, and its resilience to adverse conditions, including osmotic pressure and low ph. Among the most prominent applications of *S. cerevisiae* are in the food, beverage, and biofuel industries.

Results: These findings suggest that employing different strains of *Saccharomyces cerevisiae* can unlock new potentials for a variety of biotechnological applications and the food industry.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, baker's yeast, cocoa fermentation, bioethanol, biotechnology

[25] -Corresponding Author

منابع

Aprotosoaie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(1), 73-91.

Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1-2), 87-99.

Assi-Clair, B. J., Koné, M. K., Kouamé, K., Lahon, M.-C., Berthiot, L., Durand, N., Lebrun, M., Julien-Ortiz, A., Maraval, I., & Boulanger, R. (2019). Effect of aroma potential of Saccharomyces cerevisiae fermentation on the volatile profile of raw cocoa and sensory attributes of chocolate produced thereof. *European Food Research and Technology*, *245*, 1459-1471.

Batista, N. N., Ramos, C. L., Ribeiro, D. D., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015). Dynamic behavior of Saccharomyces cerevisiae, Pichia kluyveri and Hanseniaspora uvarum during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT-Food Science and Technology*, *63*(1), 221-227.

Buamah, R., Dzogbefia, V., & Oldham, J. (1997). Pure yeast culture fermentation of cocoa (Theobroma cacao L): effect on yield of sweatings and cocoa bean quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *13*, 457-462.

Buser, C. C., Newcomb, R. D., Gaskett, A. C., & Goddard, M. R. (2014). Niche construction initiates the evolution of mutualistic interactions. *Ecology Letters*, *17*(10), 1257-1264.

Camarasa, C., Sanchez, I., Brial, P., Bigey, F., & Dequin, S. (2011). Phenotypic landscape of Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. *PloS one*, *6*(9), e25147.

Carbonetto, B., Ramsayer, J., Nidelet, T., Legrand, J., & Sicard, D. (2018). Bakery yeasts, a new model for studies in ecology and evolution. *Yeast*, *35*(11), 591-603.

Carter, C., & Gruere, G. (2003). Mandatory Labeling of Genetically Modified Foods: Does It Really Provide Consumer Choice. *AgBioForum*, *6*, 68-70.

Castro-Alayo, E. M., Idrogo-Vásquez, G., Siche, R., & Cardenas-Toro, F. P. (2019). Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon*, *5*(1).

Cerdeira, A. L., Gazziero, D. L., Duke, S. O., & Matallo, M. B. (2011). Agricultural impacts of glyphosate-resistant soybean cultivation in South America. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(11), 5799-5807.

Cottet, C., Ramirez-Tapias, Y. A., Delgado, J. F., de La Osa, O., Salvay, A. G., & Peltzer, M. A. (2020). Biobased materials from microbial biomass and its derivatives. *Materials*, *13*(6), 1263.

da Veiga Moreira, I. M., Miguel, M. G. d. C. P., Duarte, W. F., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (Theobroma cacao L.) hybrids. *Food Research International*, *54*(1), 9-17.

Dai, C.-c., Tao, J., Xie, F., Dai, Y.-j., & Zhao, M. (2007). Biodiesel generation from oleaginous yeast Rhodotorula glutinis with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology*, *6*(18).

Daniel, H.-M., Vrancken, G., Takrama, J. F., Camu, N., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS yeast research*, *9*(5), 774-783.

De Vuyst, L., Harth, H., Van Kerrebroeck, S., & Leroy, F. (2016). Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International Journal of Food Microbiology*, *239*, 26-34.

De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, *121*(1), 5-17.

de Zamaroczy, M., & Bernardi, G. (1985). Sequence organization of the mitochondrial genome of yeast—a review. *Gene*, *37*(1-3), 1-17.

Delgado, J. F., Sceni, P., Peltzer, M. A., Salvay, A. G., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2016). Development of innovative biodegradable films based on biomass of Saccharomyces cerevisiae. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *36*, 83-91.

Demirgül, F., Şimşek, Ö., Bozkurt, F., Dertli, E., & Sağdıç, O. (2022). Production and characterization of yeast extracts produced by Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces boulardii and Kluyveromyces marxianus. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *52*(6), 657-667. https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1983833

Dissanayake, D., Ueda, T., Jayakody, L., Suriyagoda, L., Silva, K., Ando, S., & Vidanarachchi, J. (2015). ACE-inhibitory activity of milk fermented with Saccharomyces cerevisiae K7 and Lactococcus lactis subsp. lactis NBRC 12007. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, *43*, 141-151. https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v43i2.7942

Doolittle, W. F. (1999). Lateral genomics. *Trends in Biochemical Sciences*, *24*(12), M5-M8.

Duan, S.-F., Han, P.-J., Wang, Q.-M., Liu, W.-Q., Shi, J.-Y., Li, K., Zhang, X.-L., & Bai, F.-Y. (2018). The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. *Nature communications*, *9*(1), 2690.

Edwards-Ingram, L., Gitsham, P., Burton, N., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, D., Oliver, S. G., & Stateva, L. (2007). Genotypic and physiological characterization of Saccharomyces boulardii, the probiotic strain of Saccharomyces cerevisiae. *Appl Environ Microbiol*, *73*(8), 2458-2467. https://doi.org/10.1128/aem.02201-06

Fakruddin, M., Hossain, M. N., & Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of Saccharomyces cerevisiae IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*(1), 64. https://doi.org/10.1186/s12906-017-1591-9

Fernandez-Pacheco, P., Arévalo-Villena, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Briones Pérez, A. (2018). Probiotic characteristics in Saccharomyces cerevisiae strains: Properties for application in food industries. *LWT*, *97*, 332-340. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.007

Fietto, J. L., Araújo, R. S., Valadão, F. N., Fietto, L. G., Brandão, R. L., Neves, M. J., Gomes, F. C., Nicoli, J. R., & Castro, I. M. (2004). Molecular and physiological comparisons between Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces boulardii. *Can J Microbiol*, *50*(8), 615-621. https://doi.org/10.1139/w04-050

Fleet, G. H., & Zhao, J. (2018). Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms. *International Journal of Food Microbiology*, *279*, 43-56.

Flory, L., Lorentz, K., Gordon, D., & Sollenberger, L. (2012). Experimental approaches for evaluating the invasion risk of biofuel crops. *Environmental Research Letters*, *7*, 45904-45907. https://doi.org/10.1088/1748-9326/7/4/045904

Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., & Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS letters*, *440*(3), 325-331.

Futcher, B., Reid, E., & Hickey, D. A. (1988). Maintenance of the 2 micron circle plasmid of Saccharomyces cerevisiae by sexual transmission: an example of a selfish DNA. *Genetics*, *118*(3), 411-415.

Galeote, V., Novo, M., Salema-Oom, M., Brion, C., Valério, E., Gonçalves, P., & Dequin, S. (2010). FSY1, a horizontally transferred gene in the Saccharomyces cerevisiae EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H+ symporter. *Microbiology*, *156*(12), 3754-3761.

GG, S. (2014). SACCHAROMYCES | Saccharomyces cerevisiae. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition ed., pp. 309–315). Oxford: Academic Press.

Guerrero, P., Retegi, A., Gabilondo, N., & De la Caba, K. (2010). Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. *Journal of Food Engineering*, *100*(1), 145-151.

Gutiérrez, T. J. (2017). State-of-the-art chocolate manufacture: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(6), 1313-1344.

Hall, C., Brachat, S., & Dietrich, F. S. (2005). Contribution of horizontal gene transfer to the evolution of Saccharomyces cerevisiae. *Eukaryotic cell*, *4*(6), 1102-1115.

Heitmann, M., Zannini, E., & Arendt, E. (2018). Impact of Saccharomyces cerevisiae metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *58*(7), 1152-1164.

Hidalgo, A., & Brandolini, A. (2014). BREAD | Bread from Wheat Flour. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (2 ed., pp. 303–308). Oxford: Academic Press.

Ihmels, J., Bergmann, S., Gerami-Nejad, M., Yanai, I., McClellan, M., Berman, J., & Barkai, N. (2005). Rewiring of the yeast transcriptional network through the evolution of motif usage. *Science*, *309*(5736), 938-940.

Jespersen, L., Nielsen, D. S., Hønholt, S., & Jakobsen, M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS yeast research*, *5*(4-5), 441-453.

Ladisch, M., Mosier, N., Youngmi, K. I. M., Ximenes, E., & Hogsett, D. (2010). Converting cellulose to biofuels. *Chemical Engineering Progress*, *106*, 56-63.

Le Borgne, S. (2012). Genetic Engineering of Industrial Strains of Saccharomyces cerevisiae. In A. Lorence (Ed.), *Recombinant Gene Expression* (pp. 451-465). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_24

Lefeber, T., Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N., & De Vuyst, L. (2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food microbiology*, *30*(2), 379-392.

Limayem, A. (2015). Risk assessment on the use of Genetically Modified Organisms (GMOs) for biofuel production. *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology*, *5*, XX.

Magalhães da Veiga Moreira, I., de Figueiredo Vilela, L., da Cruz Pedroso Miguel, M. G., Santos, C., Lima, N., & Freitas Schwan, R. (2017). Impact of a microbial cocktail used as a starter culture on cocoa fermentation and chocolate flavor. *Molecules*, *22*(5), 766.

McFarland, L. V. (2010). Systematic review and meta-analysis of Saccharomyces boulardii in adult patients. *World J Gastroenterol*, *16*(18), 2202-2222. https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2202

Meersman, E., Steensels, J., Mathawan, M., Wittocx, P.-J., Saels, V., Struyf, N., Bernaert, H., Vrancken, G., & Verstrepen, K. J. (2013). Detailed analysis of the microbial population in Malaysian spontaneous cocoa pulp fermentations reveals a core and variable microbiota. *PloS one*, *8*(12), e81559.

Meersman, E., Steensels, J., Paulus, T., Struyf, N., Saels, V., Mathawan, M., Koffi, J., Vrancken, G., & Verstrepen, K. J. (2015). Breeding strategy to generate robust yeast starter cultures for cocoa pulp fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(18), 6166-6176.

Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vrancken, G., & Verstrepen, K. J. (2016). Tuning chocolate flavor through development of thermotolerant Saccharomyces cerevisiae starter cultures with increased acetate ester production. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(2), 732-746.

Meersman, E., Struyf, N., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh Kermani, Z., Santiago, J. S., Baert, E., Hemdane, S., Vrancken, G., Verstrepen, K. J., & Courtin, C. M. (2017). Characterization and degradation of pectic polysaccharides in cocoa pulp. *Journal of agricultural and food chemistry*, *65*(44), 9726-9734.

Menezes, A. G. T., Batista, N. N., Ramos, C. L., e Silva, A. R. d. A., Efraim, P., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2016). Investigation of chocolate produced from four different Brazilian varieties of cocoa (Theobroma cacao L.) inoculated with Saccharomyces cerevisiae. *Food Research International*, *81*, 83-90.

Menezes, R., Tenreiro, S., Macedo, D., Santos, C. N., & Outeiro, T. F. (2015). From the baker to the bedside: yeast models of Parkinson's disease. *Microbial cell*, *2*(8), 262.

Mokhtari, S., Jafari, S. M., Khomeiri, M., Maghsoudlou, Y., & Ghorbani, M. (2017). The cell wall compound of Saccharomyces cerevisiae as a novel wall material for encapsulation of probiotics. *Food Research International*, *96*, 19-26.

Money, N. P. (2018). *The rise of yeast: how the sugar fungus shaped civilisation*. Oxford University Press.

Mota-Gutierrez, J., Barbosa-Pereira, L., Ferrocino, I., & Cocolin, L. (2019). Traceability of functional volatile compounds generated on inoculated cocoa fermentation and its potential health benefits. *Nutrients*, *11*(4), 884.

Mota-Gutierrez, J., Botta, C., Ferrocino, I., Giordano, M., Bertolino, M., Dolci, P., Cannoni, M., & Cocolin, L. (2018). Dynamics and biodiversity of bacterial and yeast communities during fermentation of cocoa beans. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(19), e01164-01118.

Nielsen, J. (2019). Yeast systems biology: model organism and cell factory. *Biotechnology journal*, *14*(9), 1800421.

Nya, E. (2022). Factors Influencing the Efficacy of Probiotics. In *Probiotics in Aquaculture* (pp. 263-283). Springer.

Oh, E. J., Ha, S. J., Rin Kim, S., Lee, W. H., Galazka, J. M., Cate, J. H., & Jin, Y. S. (2013). Enhanced xylitol production through simultaneous co-utilization of cellobiose and xylose by engineered Saccharomyces cerevisiae. *Metab Eng*, *15*, 226-234. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.09.003

Palma, M. L., Zamith-Miranda, D., Martins, F. S., Bozza, F. A., Nimrichter, L., Montero-Lomeli, M., Marques, E. T. A., & Douradinha, B. (2015). Probiotic Saccharomyces cerevisiae strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(16), 6563-6570. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6776-x

Papalexandratou, Z., & De Vuyst, L. (2011). Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS yeast research*, *11*(7), 564-574.

Paramera, E. I., Karathanos, V. T., & Konteles, S. J. (2023). Yeast cells and yeast-based materials for microencapsulation. In *Microencapsulation in the food industry* (pp. 343-365). Elsevier.

Park, Y. C., Oh, E. J., Jo, J. H., Jin, Y. S., & Seo, J. H. (2016). Recent advances in biological production of sugar alcohols. *Curr Opin Biotechnol*, *37*, 105-113. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.11.006

Parrella, A., Caterino, E., Cangiano, M., Criscuolo, E., Russo, C., Lavorgna, M., & Isidori, M. (2012). Antioxidant properties of different milk fermented with lactic acid bacteria and yeast. *International Journal of Food Science & Technology*, *47*(12), 2493-2502. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03127.x

Peltzer, M., Delgado, J. F., Salvay, A. G., & Wagner, J. R. (2018). β-Glucan, a promising polysaccharide for bio-based films developments for food contact materials and medical applications. *Current Organic Chemistry*, *22*(12), 1249-1254.

Pronk, J. T., Yde Steensma, H., & Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate metabolism in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, *12*(16), 1607-1633.

Ramos, C. L., Dias, D. R., Miguel, M. G. d. C. P., & Schwan, R. F. (2014). Impact of different cocoa hybrids (Theobroma cacao L.) and S. cerevisiae UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, *64*, 908-918.

Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O. P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C., & Piškur, J. (2011). Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in Saccharomyces and Dekkera yeasts. *Nature communications*, *2*(1), 302.

Salari, R., Bazzaz, B. S. F., Rajabi, O., & Khashyarmanesh, Z. (2013). New aspects of Saccharomyces cerevisiae as a novel carrier for berberine. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, *21*, 1-8.

Schuller, D., & Casal, M. (2005). The use of genetically modified Saccharomyces cerevisiae strains in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*(3), 292-304. https://doi.org/10.1007/s00253-005-1994-2

Schwan, R. F. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(4), 1477-1483.

Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, *44*(4), 205-221.

Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J.-L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., & Turillazzi, S. (2012). Role of social wasps in Saccharomyces cerevisiae ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(33), 13398-13403.

Takalloo, Z., Nikkhah, M., Nemati, R., Jalilian, N., & Sajedi, R. H. (2020). Autolysis, plasmolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae): a comparative study. *World J Microbiol Biotechnol*, *36*(5), 68. https://doi.org/10.1007/s11274-020-02840-3

Thyab Gddoa Al-sahlany, S., Altemimi, A. B., Al-Manhel, A. J. A., Niamah, A. K., Lakhssassi, N., & Ibrahim, S. A. (2020). Purification of Bioactive Peptide with Antimicrobial Properties Produced by Saccharomyces cerevisiae. *Foods*, *9*(3), 324. https://www.mdpi.com/2304-8158/9/3/324

Tomé, D. (2021). Yeast Extracts: Nutritional and Flavoring Food Ingredients. *ACS Food Science & Technology*, *1*(4), 487-494. https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.0c00131

Vieira, A. T., Teixeira, M. M., & Martins, F. S. (2013). The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front Immunol*, *4*, 445. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00445

Vieira, E. F., & Delerue-Matos, C. (2020). Exploitation of Saccharomyces cerevisiae Enzymes in Food Processing and Preparation of Nutraceuticals and Pharmaceuticals. In N. K. Arora, J. Mishra, & V. Mishra (Eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries* (pp. 41-62). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_2

Visintin, S., Ramos, L., Batista, N., Dolci, P., Schwan, F., & Cocolin, L. (2017). Impact of Saccharomyces cerevisiae and Torulaspora delbrueckii starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *257*, 31-40.

Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). Saccharomyces cerevisiae in the production of fermented beverages. *Beverages*, *2*(4), 30.

Wang, Q. M., Liu, W. Q., Liti, G., Wang, S. A., & Bai, F. Y. (2012). Surprisingly diverged populations of s accharomyces cerevisiae in natural environments remote from human activity. *Molecular ecology*, *21*(22), 5404-5417.

Wickner, R. B. (1996). Double-stranded RNA viruses of Saccharomyces cerevisiae. *Microbiological reviews*, *60*(1), 250-265.

Wolfe, K. H., & Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, *387*(6634), 708-713.

Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *174*, 72-87.

Zhao, J., & Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *205*, 54-67.