

## بررسی اثر مخمر ساکارومایسس سرویزیه زنده و تیمار شده با حرارت و اسید بر میزان سیتترینین و رنگدانه‌های موناسکوس پورپورئوس

هدیه داودی مقدم<sup>۱</sup>، فخری شهیدی<sup>۲\*</sup>، فریده طباطبایی یزدی<sup>۲</sup>، محبوبه سرابی جماب<sup>۳</sup>، زرین اسحاقی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

\* نویسنده مسئول (fshahidi@um.ac.ir)

۳- دانشیار، گروه زیست فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۴- استاد، گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، مشهد، ایران

### چکیده

کپک موناسکوس پورپورئوس به دلیل تولید دامنه گسترده‌ای از رنگدانه‌های طبیعی، توجه بسیاری از تولیدکنندگان مواد غذایی را به عنوان جایگزینی برای رنگ‌های سنتزی جلب کرده است. رنگدانه‌های موناسکوس معمولاً آلوده به سیتترینین هستند که همین امر کاربرد گسترده آنها را در مواد غذایی محدود می‌کند. استفاده از مخمر ساکارومایسس سرویزیه یک روش بیولوژیکی مناسب برای حذف توکسین شناخته می‌شود. در این پژوهش اثر مخمر ساکارومایسس سرویزیه در دو حالت غیرفعال شده (تیمار حرارتی در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و تیمار اسیدی در اسید هیدروکلریک دو مولار) و زنده در سه غلظت مختلف (۱۰<sup>۳</sup>، ۱۰<sup>۴</sup> و ۱۰<sup>۵</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر) بر میزان سیتترینین و رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز تولیدشده توسط کپک موناسکوس پورپورئوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که مخمر زنده و تیمار شده با حرارت و اسید به طور قابل توجهی باعث کاهش سیتترینین در محیط شد، به طوری که میزان سیتترینین از ۴/۴۳ میلی‌گرم بر لیتر در نمونه کنترل فاقد مخمر به ترتیب به ۰/۹، ۰/۱ و ۰/۰۷ میلی‌گرم بر لیتر (در غلظت ۱۰<sup>۵</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمری) کاهش یافت. حداکثر مقدار رنگدانه‌های خارج سلولی و داخل سلولی زرد، نارنجی و قرمز اندازه‌گیری شده متعلق به نمونه‌های حاوی مخمر زنده بود، در حالی که مقدار این رنگدانه‌ها در نمونه‌های حاوی مخمر تیمار شده با حرارت و اسید به ترتیب کاهش داشتند. از بین تیمارها، استفاده از مخمر زنده در غلظت ۱۰<sup>۴</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بهترین شرایط را برای رسیدن به هدف مورد نظر فراهم کرد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۳۱

### واژه‌های کلیدی

تیمار اسیدی

تیمار حرارتی

رنگدانه

ساکارومایسس سرویزیه سیتترینین

موناسکوس پورپورئوس

### مقدمه

رنگ‌های خوراکی گروهی از افزودنی‌هایی هستند که به صورت طبیعی یا مصنوعی تهیه می‌شوند و نقش مهمی در ایجاد تنوع، افزایش جذابیت و بازارپسندی مواد غذایی دارند (Kongruang, 2011; Malik, Tokkas, & Goyal, )

2012؛ عوض‌پور، سیفی‌پور، عبدی، نبوی و زمانیان‌عضدی، ۱۳۹۲)؛ همچنین، افزودنی‌های رنگی به منظور جبران رنگ از دست‌رفته ماده غذایی در طول فرایند اهمیت پیدا کرده‌اند (Manan, Mohamad, & Ariff, 2017). از دیدگاه صنایع غذایی، استفاده از رنگ‌های مجاز خوراکی به منظور

تولید می‌کنند که باعث ایجاد آسیب‌های کبدی و کلیوی می‌شود؛ همین امر باعث منع استفاده از آن در بسیاری از کشورها و محدود شدن کاربرد گسترده آن در محصولات شده است ( Duraklı-Velioğlu, Boyacı, Şimşek, & Gümüş, 2013; Wang, H., Zhang, Lin, & Zheng, 2017). حد مجاز سیتیرینین در مواد غذایی در کشورهای مختلف متفاوت است. حد مجاز قابل قبول در کشورهای تایوان، کره جنوبی، ژاپن و اتحادیه اروپا به ترتیب ۵۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد (Karazhiyan, Mehraban Sangatash, Karazhyan, & Mehrzad, 2016; Patakova, 2013).

تحقیق‌های زیادی برای غلبه بر مشکل تولید سیتیرینین توسط کپک موناسکوس انجام شده است که از جمله آنها می‌توان به تیمارهای فیزیکی، شیمیایی و ایجاد جهش در کپک اشاره کرد. حذف سیتیرینین به روش جهش به دلیل ناپایداری بودن فراورده‌های ناشی از جهش و زمان بر بودن کاربرد زیادی ندارد (Jia, Xu, Zhou, & Sung, 2010); همچنین برخی روش‌های فیزیکی مانند استفاده از دمای بالا، باعث تولید سیتیرینین  $H_1$  شده که ۱۰ مرتبه سمی‌تر از سیتیرینین است. از معایب روش‌های شیمیایی می‌توان به حذف برخی از ترکیبات زیست‌فعال اشاره کرد (Suharna, 2015). روش‌های بیولوژیکی به دلیل راندمان بالا، قیمت کم و سازگاری با محیط زیست، امروزه توجه زیادی را به خود جلب کرده است. از بین میکروارگانیسم‌های مختلف که قادر به حذف توکسین هستند، گونه‌های مخمر ساکارومایسس سروریزیه<sup>۳</sup> به دلیل ویژگی‌های تکنولوژیکی متعدد و همچنین به دلیل داشتن درجه خوراکی<sup>۴</sup>، گزینه مناسبی برای این منظور محسوب می‌شوند (Armando et al., 2012; Shetty & Jespersen, 2006).

تاکنون تحقیق‌های متعددی در زمینه افزایش تولید رنگدانه‌های موناسکوس پوپورئوس<sup>۵</sup> انجام شده است؛ اما اطلاعات کافی در زمینه کاهش سیتیرینین تولیدشده از محیط در دسترس نیست. با توجه به اینکه خطر مصرف سیتیرینین بالاست و همچنین به دلیل محدودیتی که برای کاربرد گسترده رنگدانه‌های طبیعی موناسکوس ایجاد کرده است، لازم است مطالعه‌های بیشتری در زمینه حذف یا کاهش آن انجام شود.

تولید فراورده جدید یا بهبود رنگ آن امری ضروری است. رنگ‌های سنتزی به دلیل پایداری زیاد و قیمت پایین کاربرد گسترده‌ای برای بهبود رنگ مواد غذایی در صنعت غذا دارند؛ اما امروزه مصرف آنها به دلیل مشخص شدن اثرات منفی بر سلامت انسان از جمله سرطان زابودن و ایجاد جهش کاهش یافته است، همین امر باعث افزایش تقاضای استفاده از رنگ‌های طبیعی به عنوان جایگزین رنگ‌های سنتزی شده است (Kobylewski & Jacobson, 2012; Kurniawati & Zubaidah, 2014; Mu, Huang, Ding, & Zhao, 2015). امروزه منابع طبیعی زیادی از جمله گیاهان (میوه، برگ، گل و ریشه)، حشرات، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها شناسایی شده‌اند که قادر به تولید رنگدانه هستند؛ اما فقط تعداد محدودی از آنها شرایط مناسب برای استخراج و استفاده در سطح وسیع را دارند (Nadzri, 2012).

رنگ‌های طبیعی به دست آمده از منابع میکروبی یکی از مهم‌ترین منابع طبیعی برای تولید رنگدانه محسوب می‌شوند. از جمله مزایای تولید رنگ‌های طبیعی توسط گونه‌های میکروبی می‌توان به رشد سریع و آسان در محیط ارزان قیمت، تولید انبوه رنگ و وابسته نبودن به شرایط اقلیمی اشاره کرد (Manan et al., 2017; Seyedin, 2015; Hatamian-Zarmi, Rasekh, & Mirderikvand, 2015).

گونه‌های مختلف جنس موناسکوس به دلیل تولید رنگدانه‌های متنوع از زرد تا قرمز با پایداری شیمیایی بالا در pHهای مختلف توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Lin, 2013; Yakushijin, Büchi, & Demain, 1992; Satapa, 2013). موناسکوس متعلق به خانواده موناسکاسه<sup>۱</sup> و شاخه آسکومایکوتا<sup>۲</sup> می‌باشد و جزء کپک‌های واقعی محسوب می‌گردد. رنگدانه‌های تولیدشده توسط گونه‌های کپکی موناسکوس از زمان‌های گذشته تا به امروز به طور گسترده‌ای در چین و کشورهای آسیای شرقی به عنوان رنگ‌دهنده طبیعی و نگهدارنده مواد غذایی تخمیری مانند ماهی ترش (ماهی تخمیری)، پنیر چینی، کچاپ، نوشیدنی‌ها از جمله شراب قرمز، فراورده‌های گوشتی مانند سوسیس و همبرگر (Nadzri, 2012; Suh & Shin, 2000a) و همچنین مصارف دارویی (Li et al., 2010) استفاده می‌شدند. بسیاری از گونه‌های کپک موناسکوس همراه با رنگدانه، مقادیر قابل توجهی مایکوتوکسین به نام سیتیرینین

<sup>3</sup> *Saccharomyces cerevisiae*

<sup>4</sup> Generally Regarded as Safe (GRAS)

<sup>5</sup> *Monascus purpureus*

<sup>1</sup> Monascaceae

<sup>2</sup> Ascomycotina

حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت پتیتو دکستروز برات<sup>۴</sup> منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا تعداد سلول مخمر به حد مطلوب برسد (Kurniawati & Zubaidah, 2014). به‌منظور جداکردن سلول‌های مخمر از محیط‌کشت، از سانتریفیوژ (Sigma 3-30K, Centrifuge، ساخت آلمان) با سرعت چرخش ۷۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. سلول‌های جدا شده ۲ مرتبه با محلول نمک بافری فسفات (Sigma- Phosphate Buffered Saline (PBS)، ساخت Aldrich، ساخت آمریکا)، (۶، pH) استریل شسته شد و در هر مرحله مجدد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت چرخش ۷۲۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد (Karazhiyan *et al.*, 2007; Shetty, Hald, & Jespersen, 2016). سرانجام سلول‌های مخمر با حجم مشخصی از نمک بافری فسفات<sup>۵</sup> استریل مخلوط و کدورت آن براساس استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تنظیم شد سپس از این سوسپانسیون، رقت‌های ۱۰<sup>۶</sup>، ۱۰<sup>۵</sup>، ۱×۱۰<sup>۴</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر تهیه شد (NCCLS, 2002).

#### تیمار اسیدی و حرارتی مخمر ساکارومایسس سرویزیه

به‌منظور انجام تیمار حرارتی، سوسپانسیون سلول‌های مخمری با غلظت‌های تنظیم شده (۱۰<sup>۶</sup>، ۱۰<sup>۵</sup>، ۱×۱۰<sup>۴</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر) به‌طور جداگانه به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (Hirayama، ساخت ژاپن) با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد (Karazhiyan *et al.*, 2016; Rahaie, Emam-Djomeh, Razavi, & Mazaheri, 2010; Shetty *et al.*, 2007).

در تیمار اسیدی، ۱۰ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک دو مولار به سلول‌های مخمر جدا شده افزوده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد همراه با تکان ملایم نگهداری شد؛ سپس سلول‌ها دو مرتبه با نمک بافری فسفات<sup>۵</sup> استریل شسته و هر مرتبه با سرعت چرخش ۷۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سلول‌های تیمار شده با حجم مشخصی از نمک بافری فسفات<sup>۵</sup> استریل مخلوط و براساس استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند سوسپانسیون اصلی تهیه و از آن سوسپانسیون با رقت‌های مورد نیاز آماده شد (Karazhiyan *et al.*, 2016; Rahaie *et al.*, 2010; Shetty *et al.*, 2007).

هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف سوسپانسیون مخمری در حالت زنده و غیرفعال شده با اسید و حرارت در جذب سیتینین و رنگدانه تولید شده توسط کپک موناسکوس پورپورئوس بود.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد شیمیایی

سیتینین خالص تجاری به‌عنوان ماده استاندارد در HPLC از شرکت سیگما آلدریج (ساخت اسرائیل) تهیه شد که خلوص آن بیش از ۹۸ درصد بود.

##### میکروارگانیس‌ها، محیط‌های کشت و آماده‌سازی اولیه آنها

کپک موناسکوس پورپورئوس (PTCC 5303) و مخمر ساکارومایسس سرویزیه (PTCC 5052) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران واقع در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. محیط‌کشت‌های مورد استفاده در این پژوهش از شرکت کیولب (ساخت انگلستان) تهیه شد.

کپک موناسکوس پورپورئوس روی محیط‌کشت جامد پودر مخمر و نشاسته<sup>۱</sup> (عصاره مخمر ۴ گرم در لیتر، نشاسته محلول ۱۵ گرم در لیتر، دی‌پتاسیم فسفات ۱ گرم در لیتر، منیزیم سولفات ۷ آبه ۰/۵ گرم در لیتر، آگار ۱۵ گرم در لیتر) کشت و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد؛ سپس تا زمان مصرف در یخچال نگهداری و هر ۲ هفته یکبار از آن کشت مجدد تهیه شد. کشت اصلی و تخمیر ۱۴ روزه موناسکوس در محیط‌کشت مایع حاوی عصاره مخمر و ساکارز<sup>۲</sup> (عصاره مخمر ۴۰ گرم در لیتر و ساکارز ۱۶۰ گرم در لیتر) انجام شد. مخمر ساکارومایسس سرویزیه روی محیط‌کشت پتیتو دکستروز آگار<sup>۳</sup> به‌صورت خطی کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد سپس تا زمان مصرف در یخچال نگهداری و هر ماه یکبار از آن کشت مجدد تهیه شد (Dikshit & Tallapragada, 2011; Kurniawati & Zubaidah, 2014; Seyedin *et al.*, 2015).

##### آماده‌سازی سوسپانسیون مخمری

مقداری از کشت اولیه (کشت مادر) مخمر به لوله آزمایش

<sup>1</sup> Yeast Powder Soluble Starch agar (YPSS)

<sup>2</sup> Yeast Extract Sucrose (YES)

<sup>3</sup> Potato Dextrose Agar (PDA)

<sup>4</sup> Potato Dextrose Broth (PDB)

انگلستان) در طول موج‌های ۴۰۰، ۴۶۰ و ۵۰۰ نانومتر که به ترتیب بیانگر رنگدانه‌های زرد، نارنجی و قرمز هستند، اندازه‌گیری شد (Chen, Shi, Song, Quan, & Wu, 2015; Seyedin et al., 2015).

#### رنگدانه داخل سلولی

میسلیوم باقی‌مانده روی کاغذ صافی از مرحله قبل، دو مرتبه با آب مقطر شست‌وشو و سپس به قطعه‌های کوچک برش داده شد و به آن ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد (حجمی/حجمی) (pH، ۲) افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در شیکر با سرعت چرخش ۱۲۰ دور بر دقیقه قرار گرفت. محلول اتانولی حاوی رنگدانه داخل سلولی به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت چرخش ۸۸۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد تا میسلیوم ته‌نشین شود. محلول رویی از سطح جمع‌آوری و جذب نوری آن به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش مرئی در طول موج‌های ۴۰۰، ۴۶۰ و ۵۰۰ نانومتر که به ترتیب بیانگر رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز هستند، اندازه‌گیری شد (Chen, et al., 2015; Xiong, Zhang, Wu, & Wang, 2014; Zhou, Zhu, Wang, Wu, & Liang, 2009).

#### اندازه‌گیری سیتیرینین باقی‌مانده در محیط کشت

به‌منظور سنجش میزان سیتیرینین باقی‌مانده در محیط کشت از روش HPLC استفاده شد. محلول حاوی رنگدانه یک‌بار دیگر به کمک صافی (Millipore، ساخت آمریکا) با اندازه قطر ذرات ۰/۴۵ میکرومتر صاف شد تا ذرات بسیار ریز آن نیز گرفته شود. ۲۰ میکرولیتر از نمونه صاف‌شده، به دستگاه HPLC (High Performance liquid chromatography) (HPLC، ساخت آمریکا) دارای ستون فاز معکوس C18 با قطر ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر و اندازه ذره ۵ میکرومتر، پمپ و کنترل‌کننده جریان تزریق شد. فاز متحرک حاوی استونیتریل/آب (۳۵:۶۵ حجمی/حجمی) بود. pH نمونه توسط اسید فسفریک به ۲/۵ رسانده شد. سرعت حرکت فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد. سنجش مقدار سیتیرینین توسط دتکتور فلورسانس با طول موج برانگیختگی ۳۳۱ نانومتر و طول موج نشر ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Chen, Xue, Chen, Li, & Wang, 2016; Chen, et al., 2015; Wang, Zhang, Lu, Huang, & Xu, 2013).

#### کشت کپک موناسکوس پورپورئوس

تخمیر در محیط کشت مایع براساس روش Ju, Wang, & Zhou (۲۰۰۵) به همراه تغییراتی در آن انجام شد. موناسکوس پورپورئوس روی محیط کشت جامد حاوی پودر مخمر و نشاسته کشت شد و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. اسپوره‌های تولیدشده به کمک نمک بافری فسفات استریل از سطح محیط کشت شسته شد. ۴۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپوری با غلظت تنظیم‌شده (۱×۱۰<sup>۶</sup>) واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر) به فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی ساکارز منتقل و به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۶۰ دور بر دقیقه در محیط تاریک نگهداری شد (Sarrani & El-Naggar, 2006; Blanc, Loret, & Goma, 1995; Wang et al., 2005). pH اولیه محیط کشت روی ۵/۵ تنظیم شد (Orozco & Kilikian, 2008; Zhang, Li, Dai, Zhang, & Yuan, 2013).

#### افزودن مخمر به کشت موناسکوس

۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی سلول‌های مخمر زنده و یا تیمار شده با حرارت و اسید با غلظت‌های اولیه معین (۱۰<sup>۶</sup>، ۱۰<sup>۵</sup>، ۱×۱۰<sup>۴</sup>) واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر) در روز ۱۳ از کشت کپک به آن افزوده شد. غلظت نهایی مخمر در کشت اصلی به ۱۰<sup>۵</sup>، ۱۰<sup>۴</sup>، ۱×۱۰<sup>۳</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر رسید. فرایند تخمیر در روز ۱۴ به اتمام رسید (Kurniawati & Zubaidah, 2014; Wang, Zhao, Mu, Sun, & Chen, 2014).

#### اندازه‌گیری رنگدانه‌ها

##### رنگدانه خارج سلولی

برای اندازه‌گیری رنگدانه خارج سلولی تمام محتویات محیط کشت به کمک کاغذ صافی واتمن<sup>۱</sup> صاف شد تا میسلیوم‌ها از محیط مایع جدا شوند (Dikshit & Tallapragada, 2011). سپس محیط کشت صاف‌شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت چرخش ۸۸۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد تا ذرات ریزی که از صافی عبور کرده‌اند، ته‌نشین شود. جذب نوری محلول صاف‌شده به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش مرئی (Spectrophotometer، WPA S2000UV/VIS، ساخت

<sup>۱</sup> Whatmann No. 42, 125 mm

## آنالیز آماری

در این تحقیق تأثیر مخمر ساکارومایسس سرویزیه به صورت زنده و تیمار شده با اسید و حرارت در سه غلظت نهایی مختلف در جذب سیتترینین و رنگدانه تولید شده توسط مونسکوس پورپورئوس بررسی گردید. آزمایش‌ها بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. هر تیمار ۳ مرتبه تکرار و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شد. داده‌ها به روش بونفرونی<sup>۱</sup> ( $P < 0.05$ ) مقایسه شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار مینی‌تب نسخه ۱۶ در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

## نتایج و بحث

### مقایسه تأثیر مخمر زنده و تیمار شده با اسید و حرارت در کاهش سیتترینین

در این تحقیق به بررسی و مقایسه تیمار اسیدی با اسید هیدروکلریک دو مولار و تیمار حرارتی در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو در حذف سیتترینین پرداخته شده است. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد (جدول ۱) که هر دو تیمار به طور قابل توجهی توانستند، میزان سیتترینین در محیط را کاهش دهند، به طوری که میزان سیتترینین از ۴/۴۳ میلی‌گرم بر لیتر در نمونه کنترل (بدون افزودن مخمر) به ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار حرارتی و ۰/۰۷ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار اسیدی در غلظت ۱۰<sup>۵</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمری کاهش یافت. نتایج به دست آمده از بررسی تأثیر مخمر زنده در کاهش سیتترینین تولید شده توسط کپک مونسکوس نشان داد، مخمر زنده به طور معنی‌داری قادر به حذف سیتترینین بود، اما تأثیر آن بسیار کمتر از حالت تیمار شده بود، به طوری که قابلیت جذب سیتترینین آن در بیشترین غلظت سوسپانسیون مخمری (۱۰<sup>۵</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر) ۰/۸ واحد جذب (AU)<sup>۲</sup> از تیمار حرارتی و ۰/۸۳ واحد جذب از تیمار اسیدی کمتر بود.

نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج Shetty و همکاران (۲۰۰۷) در زمینه جذب آفلاتوکسین B<sub>1</sub> توسط گونه‌های مختلف ساکارومایسس سرویزیه که توسط اسید و حرارت تیمار شدند، مطابقت دارد. آنها نشان دادند که تیمار حرارتی سلول مخمر در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین تیمار سلول مخمر در اسید

هیدروکلریک دو مولار باعث افزایش جذب دو برابری آفلاتوکسین در مقایسه با سلول زنده می‌شود. به طور مشابه Rahaie و همکاران (۲۰۱۰) نیز با بررسی توانایی اتصال آفلاتوکسین به دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه تثبیت شده به منظور کاهش آفلاتوکسین نمونه‌های آلوده پسته به این نتیجه رسیدند که تیمار اسیدی مخمر ساکارومایسس سرویزیه در غلظت ۲×۱۰<sup>۱۰</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر توانایی جذب را برای دو غلظت متفاوت آفلاتوکسین (۱۰ و ۲۰ میکروگرم در لیتر) به ترتیب تا حدود ۶۰ و ۷۳ درصد و تیمار حرارتی جذب سطحی را به ترتیب ۵۵ و ۷۵ درصد افزایش داد (Rahaie et al., 2010; Mathieu, Bejaoui, et al., 2010). Lebrihi (۲۰۰۴) به نقش مؤثر تیمار حرارتی و اسیدی مخمر ساکارومایسس سرویزیه در حذف اکراتوکسین پرداختند، نتایج نشان داد که هر دو تیمار مخمر قادر به حذف توکسین تا ۴۵ درصد بودند (Bejaoui et al., 2004).

بر اساس مطالعه‌های انجام شده مشخص شده است که حذف مایکوتوکسین از طریق اتصال به دیواره سلولی است، به همین دلیل مرگ سلول مخمر نه تنها قابلیت توانایی آن در جذب توکسین را کاهش نمی‌دهد (Shetty & Jespersen, 2006)، بلکه تیمارهای اسیدی و حرارتی باعث افزایش جذب مایکوتوکسین‌ها توسط این مخمر می‌شود. شرایط اسیدی با تأثیر روی پلی‌ساکاریدها و تبدیل آنها به مونومر و همچنین از طریق شکستن پیوندهای گلیکوزیدی آنها و تبدیل شدن به آلدئیدها عمل می‌کند. این ترکیبات آزاد شده باعث افزایش جایگاه‌های جذب توکسین در سطح سلول مخمر می‌شود. بر اساس پژوهش‌های پیشین، احتمال می‌رود که در شرایط اسیدی مقداری از اتصالات بین توکسین و مخمر، درون سلولی باشد (Karazhiyan et al., 2007; Rahaie et al., 2010; Shetty et al., 2016)؛ که همین امر باعث شده تا میزان جذب در مخمر تیمار شده با اسید بیشتر از تیمارهای دیگر باشد. حرارت‌دهی ممکن است باعث دناتوره شدن پروتئین‌ها یا تشکیل محصولات واکنش میلارد در دیواره سلولی شده و یا با انحلال بعضی از مانوپروتئین‌های موجود در دیواره سلولی، نفوذپذیری دیواره افزایش پیدا کند که منجر به افزایش دسترسی مکان‌های اتصال مخفی دیواره می‌شود (Karazhiyan et al., 2016; Rahaie et al., 2010; Shetty et al., 2007).

<sup>1</sup> Bonferroni

<sup>2</sup> Absorbance Unit (AU)

جدول ۱- مقایسه تأثیر مخمر ساکارومایسس سرویزیه زنده و تیمار شده با حرارت و اسید در سه غلظت متفاوت در کاهش سیتترین تولید شده توسط کپک موناسکوس پورپورئوس

غلظت سوسپانسیون		سیتترین (میلی گرم بر لیتر)	
۱۰ <sup>۳</sup>	۱۰ <sup>۴</sup>	۱۰ <sup>۴</sup>	۱۰ <sup>۵</sup>
(واحد تشکیل کلنی در میلی لیتر)	(واحد تشکیل کلنی در میلی لیتر)	(واحد تشکیل کلنی در میلی لیتر)	(واحد تشکیل کلنی در میلی لیتر)
۰/۱۷±۰/۰۴ <sup>Ca</sup>	۰/۱۴±۰/۰۲ <sup>CaB</sup>	۰/۱۰±۰/۰۳ <sup>Cb</sup>	۰/۱۰±۰/۰۳ <sup>Cb</sup>
۰/۱۲±۰/۰۱ <sup>Ca</sup>	۰/۱۰±۰/۰۱ <sup>Da</sup>	۰/۰۷±۰/۰۱ <sup>Cb</sup>	۰/۰۷±۰/۰۱ <sup>Cb</sup>
۲/۳۵±۰/۱۲ <sup>Ba</sup>	۱/۵۰±۰/۱۰ <sup>Bb</sup>	۰/۹۰±۰/۱۰ <sup>Bc</sup>	۰/۹۰±۰/۱۰ <sup>Bc</sup>
۴/۴۳±۰/۵۴ <sup>A</sup>	۴/۴۳±۰/۵۴ <sup>A</sup>	۴/۴۳±۰/۵۴ <sup>A</sup>	۴/۴۳±۰/۵۴ <sup>A</sup>

تفاوت حروف بزرگ (ستون) و حروف کوچک (ردیف) بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد است. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده اند.

محیط بیشتر می شود ( Bueno, Casale, Pizzolitto, (Salvano, & Oliver, 2007).

#### مقایسه تأثیر مخمر زنده و تیمار شده با اسید و حرارت بر رنگدانه ها

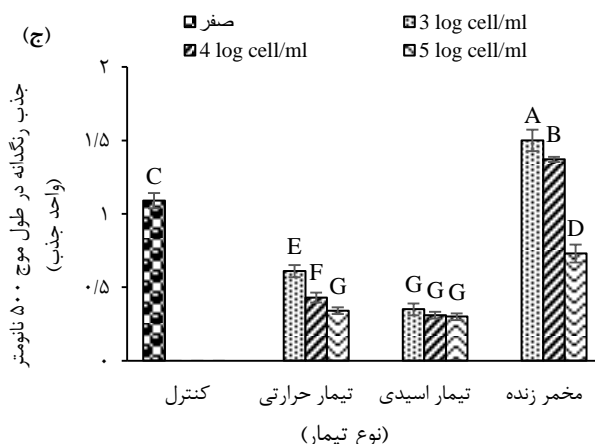
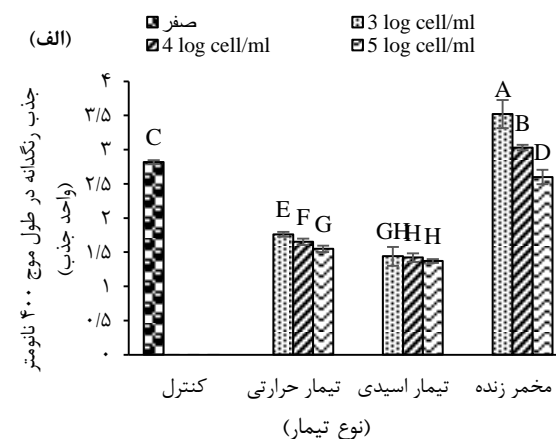
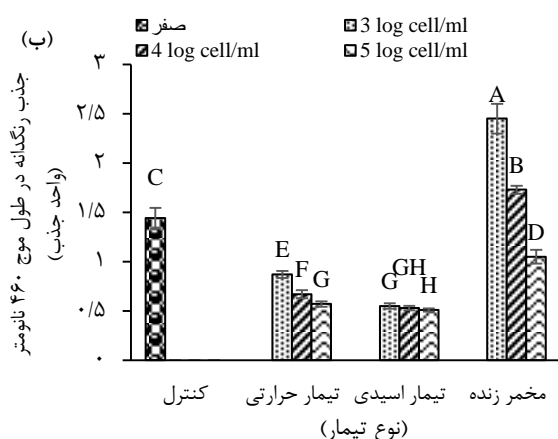
نتایج تأثیر مخمر زنده و مخمر تیمار شده با اسید و حرارت در غلظت های مختلف مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر رنگدانه های خارج سلولی و داخل سلولی در طول موج های ۴۰۰، ۴۶۰ و ۵۰۰ نانومتر به ترتیب در شکل (۱) و (۲)، نشان داده شده است.

با مقایسه شکل های (۱-الف)، (۱-ب)، (۱-ج)، (۲-الف)، (۲-ب) و (۲-ج)، می توان دریافت که مقدار تولید رنگدانه زرد داخل سلولی و خارج سلولی هم برای کنترل و هم نمونه های زنده و تیمار شده بیشتر از رنگدانه نارنجی و قرمز است. نوع رنگ تولید شده توسط کپک موناسکوس بستگی به pH محیط کشت دارد به طوری که در محیط اسیدی تمایل کپک برای تولید رنگدانه زرد بیشتر است و به تدریج با افزایش pH تمایل برای تولید رنگدانه نارنجی بیشتر می شود تا جایی که در pH قلیایی، رنگدانه قرمز غالب است (Said, 2010). باتوجه به اینکه رشد کپک موناسکوس در محیط اسیدی بیشتر از محیط قلیایی است و محققان زیادی pH، ۵/۵ را بهترین شرایط برای رشد کپک موناسکوس پورپورئوس و تولید رنگدانه توسط آن دانسته اند (Orozco & Kilikian, 2008; Said, 2010; Zhang et al., 2013). به منظور افزایش بازدهی، در این تحقیق از محیط کشت با اسیدیته متوسط (pH ۵/۵) استفاده شد، که در نتیجه تولید رنگدانه زرد بیشتر از دو رنگدانه دیگر بود.

غلظت سوسپانسیون مخمر نیز از دیگر عوامل مؤثر در جذب توکسین توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه است. جدول (۱)، قابلیت کاهش سیتترین در سه غلظت متفاوت از سوسپانسیون مخمر ساکارومایسس سرویزیه در حالت زنده و تیمار شده با اسید و حرارت را نشان می دهد. مطابق جدول (۱)، با افزایش غلظت سوسپانسیون مخمری، میزان سیتترین کاهش یافته است. میزان سیتترین باقی مانده در محیط برای تیمار اسیدی مخمر در غلظت ۱۰<sup>۴</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی لیتر کمتر از غلظت ۱۰<sup>۳</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی لیتر بود، ولی اختلاف معنی داری به لحاظ آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد نشان نداد اما در غلظت ۱۰<sup>۵</sup> واحد تشکیل کلنی در میلی لیتر این اختلاف با دو سطح غلظتی دیگر معنی دار بود (جدول ۱). به طور مشابه، نتایج گزارش شده توسط Piotrowska (2011) نشان داد که با افزایش تعداد سلول مخمر ساکارومایسس سرویزیه از ۱، ۵ و ۵۰ میلی گرم وزن خشک بیومس بر میلی لیتر میزان اکراتوکسین به ترتیب ۲۰، ۲۹ و ۷۵ درصد کاهش یافت (Piotrowska, 2011). دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه از سه جزء اصلی تشکیل شده است که عبارتند از β-۱، ۳ و β-۱، ۶، گلوکان، مانوپروتئین و مقدار کمی کیتین. مشخص شده است که مانان و گلوکان موجود در دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه عامل اصلی جذب توکسین می باشد به طوری که قادر است به طیف وسیعی از مایکوتوکسین ها متصل شود (Armando et al., 2012; Shetty & Jespersen, 2006). با افزایش غلظت سوسپانسیون مخمر، تعداد سلول ها و جایگاه های گیرنده توکسین بیشتر شده و در نتیجه قابلیت جذب توکسین از

زنده با تولید متابولیت‌های مفید باعث تحریک تولید رنگدانه توسط کپک موناسکوس می‌شود اگرچه مقداری از رنگدانه خارج سلولی جذب دیواره سلولی مخمر می‌شود با این وجود مقدار نهایی رنگدانه خارج سلولی آن بیشتر از مخمر تیمارشده با حرارت و اسید می‌باشد. قطبیت رنگدانه نیز از جمله عواملی است که در جذب رنگدانه خارج سلولی تأثیرگذار است (Morata, Loira, & Suárez Lepe, 2016). نتایج به دست آمده از مقایسه دو تیمار حرارتی و اسیدی مخمر نشان داد که میزان کاهش رنگدانه خارج سلولی زرد، نارنجی و قرمز برای تیمار اسیدی بیشتر از تیمار حرارتی بود (شکل ۱) که علت آن حذف بیشتر عوامل محافظتی از جایگاه‌های گیرنده در سطح سلول مخمر در تیمار اسیدی نسبت به تیمار حرارتی است (Bejaoui et al., 2004; Shetty et al., 2007).

شکل (۱)، نشان می‌دهد که مقدار رنگدانه‌های خارج سلولی زرد، نارنجی و قرمز در تیمار اسیدی و حرارتی کمتر از نمونه کنترل (بدون مخمر) است که همین امر نشان می‌دهد که تیمار کردن سلول‌های مخمر علاوه بر جذب سیترونین، مقداری از رنگدانه‌های خارج سلولی که در محیط آزاد شده‌اند را نیز جذب می‌کند؛ همچنین با افزایش غلظت سوسپانسیون مخمری در تیمارهای اسیدی و حرارتی، مقدار رنگدانه خارج سلولی کمتر می‌شود که علت این امر افزایش تعداد سلول مخمر و افزایش جایگاه‌های گیرنده در سطح سلول و همچنین حذف عوامل محافظتی از جایگاه‌های گیرنده در تیمارهای اسیدی و حرارتی می‌باشد که باعث افزایش جذب رنگدانه‌های خارج سلولی می‌شود (Bueno et al., 2007; Rahaie et al., 2010; Shetty et al., 2007)؛ این موضوع برای مخمر زنده نیز صادق است اما به دلیل اینکه مخمر



شکل ۱- مقایسه تأثیر مخمر ساکارومایسس سرویزیه زنده و تیمارشده با حرارت و اسید بر رنگدانه خارج سلولی تولیدشده توسط کپک موناسکوس پورپورئوس، (الف) رنگدانه زرد، (ب) رنگدانه نارنجی، (ج) رنگدانه قرمز  
حروف یکسان در این نمودار بیانگر عدم تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

مخمر تیمار شده با اسید و حرارت در غلظت‌های  $10^4$  و  $10^5$  واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بیشتر از نمونه کنترل بود، در حالی که در غلظت  $10^3$  واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری با کنترل مشاهده نشد.

بررسی و مقایسه نمونه‌ها نشان داد، مقدار تولید رنگدانه‌های داخل سلولی در هر سه غلظت مخمر زنده و همچنین رنگدانه‌های خارج سلولی در دو غلظت مخمر زنده  $10^4$  و  $10^3$  واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بیشتر از نمونه‌های تیمار شده با حرارت، اسید و نمونه کنترل فاقد مخمر بود (شکل ۱ و ۲). مقدار تولید رنگدانه زرد خارج سلولی در غلظت  $10^3$  واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر سوسپانسیون مخمر زنده،  $3/52$  واحد جذب بود که در مقایسه با مقدار رنگدانه در تیمارهای حرارتی، اسیدی و کنترل بدون مخمر به ترتیب  $1/76$ ،  $2/08$  و  $0/7$  واحد بیشتر بود. این افزایش برای رنگدانه‌های نارنجی و قرمز خارج سلولی نیز صدق می‌کرد. افزایش تولید رنگدانه در نمونه حاوی مخمر زنده، علاوه بر رنگدانه‌های خارج سلولی، برای رنگدانه‌های داخل سلولی هم صادق بود به طوری که مقدار رنگدانه‌های زرد، نارنجی و قرمز داخل سلولی در این حالت بیشتر از سه مورد دیگر بود (شکل ۲).

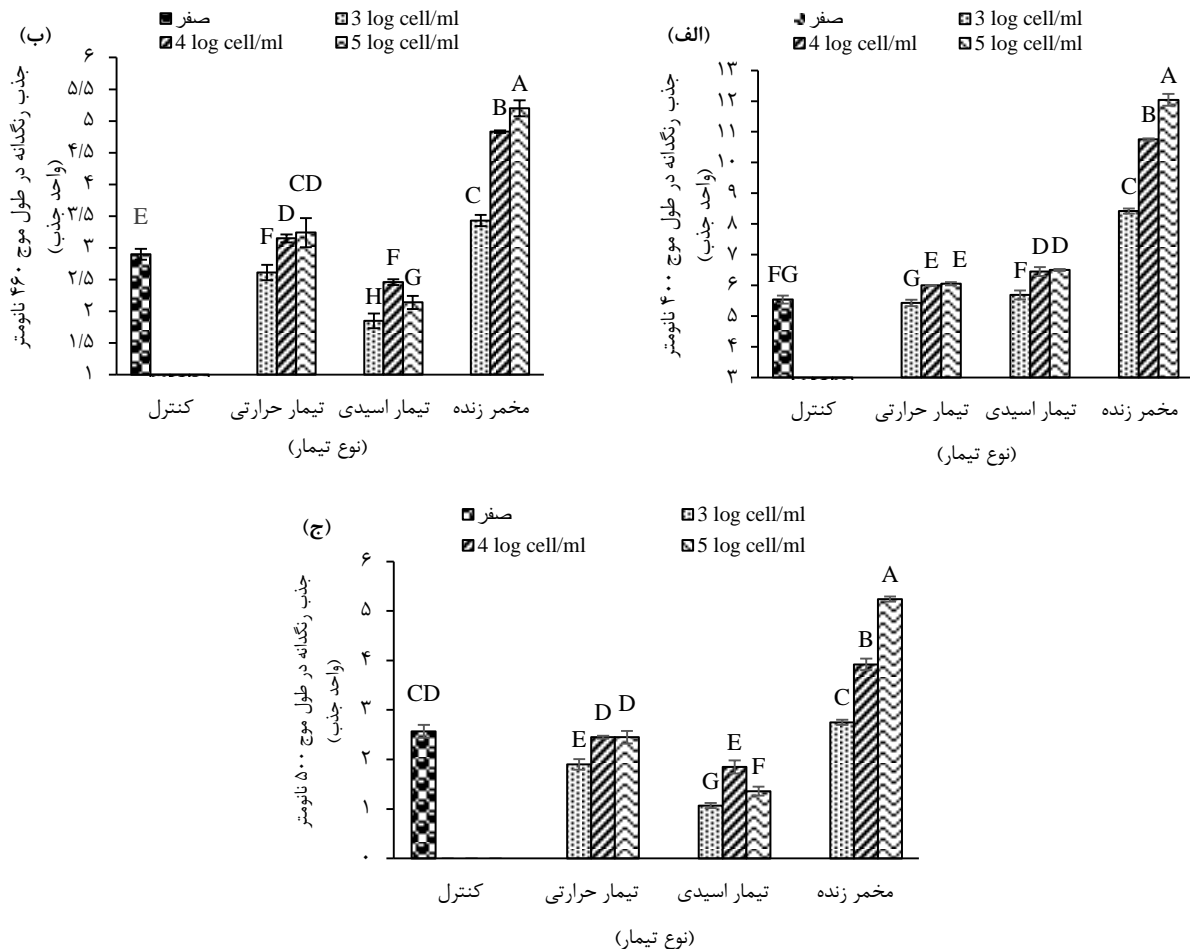
متابولیت‌هایی که مخمر ساکارومایسس سرویزیه در طول رشد خود با کپک موناسکوس تولید می‌کند با ایجاد تغییر در شکل مورفولوژیکی کپک، می‌تواند در فرایند رشد آن و تولید رنگدانه تأثیرگذار باشد (Shin, Kim, Kim, & Ju, 1998; Suh & Shin, 2000b). تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه مانند آمیلاز و کیتیناز با ایجاد شکستگی جزئی در دیواره سلولی کپک موناسکوس باعث ایجاد تغییرات ساختاری کپک و در نتیجه افزایش تولید رنگدانه می‌شود (Shin et al., 1998; Suh & Shin, 2000a). همچنین تولید برخی ترکیبات مانند اتانول در طول تخمیر از جمله عوامل مؤثر دیگر برای تحریک بیشتر تولید رنگدانه است (Hamdi, Blanc, Loret, & Goma, 1997; Kurniawati & Zubaidah, 2014).

در میان نمونه‌های تیمار شده با اسید و حرارت، بیشترین مقدار رنگدانه خارج سلولی زرد با جذب نوری  $1/76$  واحد جذب مربوط به تیمار حرارتی مخمر در غلظت  $10^3$  واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بود؛ در حالی که این مقدار جذب برای رنگدانه زرد خارج سلولی در نمونه کنترل (بدون مخمر)  $2/82$  واحد جذب به دست آمد. رنگدانه قرمز تولید شده توسط موناسکوس که تحت تیمار اسیدی مخمر با غلظت  $10^5$  واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر قرار گرفته بود با حداکثر جذب نوری  $0/3$  واحد جذب کمترین مقدار رنگدانه خارج سلولی در این تحقیق بود که در مقایسه با نمونه کنترل ( $1/09$  واحد جذب)  $0/79$  واحد کاهش داشت. جذب نوری رنگدانه خارج سلولی نارنجی که تحت تیمار حرارتی مخمر در غلظت‌های  $10^4$ ،  $10^3$  و  $10^5$  واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بود به ترتیب  $0/57$ ،  $0/67$  و  $0/87$  واحد جذب به دست آمد که در مقایسه با جذب نوری این رنگدانه که تحت تیمار اسیدی قرار گرفته بود به ترتیب  $0/06$ ،  $0/14$  و  $0/32$  واحد کاهش داشت.

نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج انجام شده توسط Suh و Shin (۲۰۰۰a) در زمینه کشت هم‌زمان مخمر ساکارومایسس سرویزیه با کپک موناسکوس پورپورئوس مطابقت دارد. آنها گزارش کردند که مقدار رنگدانه خارج سلولی اندازه‌گیری شده کمتر از نمونه کنترل بود که بیانگر جذب این رنگدانه توسط مخمر است. به طور مشابه Kurniawati و Zubaidah (۲۰۱۴) با مقایسه سه غلظت مختلف مخمر ساکارومایسس سرویزیه نشان دادند میزان کاهش رنگدانه در غلظت  $10^6$  واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بیشتر از دو غلظت دیگر  $10^5$  و  $10^4$  واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر به دست آمد (Kurniawati & Zubaidah, 2014).

حذف رنگدانه‌های خارج سلولی در تیمارهای مختلف بیشتر از رنگدانه‌های داخل سلولی بود (شکل ۱ و ۲). به دلیل اینکه رنگدانه‌های داخل سلولی در داخل سلول‌های کپک موناسکوس تولید می‌شوند، از دسترس سلول‌های مخمر دور هستند و بنابراین مخمر قادر به جذب آنها نیست. عدد جذب رنگدانه زرد داخل سلولی





شکل ۲- مقایسه تأثیر مخمر ساکاروما یسیس سرویزیه زنده و تیمارشده با حرارت و اسید بر رنگدانه داخل سلولی تولیدشده توسط کپک موناسکوس پورپورئوس؛ (الف) رنگدانه زرد، (ب) رنگدانه نارنجی و (ج) رنگدانه قرمز حروف یکسان در این نمودار بیانگر عدم تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

### نتیجه‌گیری

امروزه به دلیل توجه روزافزون ارگان‌های نظارتی در جهت کاهش یا حذف افزودنی‌های سنتزی و شیمیایی در مواد غذایی از جمله رنگدانه‌های سنتزی که اثرات سرطان‌زایی آنها به اثبات رسیده است و همچنین تمایل مصرف‌کنندگان به غذاهای طبیعی و فاقد مواد شیمیایی و سنتزی، صاحبان صنایع به سمت استفاده از منابع طبیعی از جمله منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی به‌عنوان رنگ‌دهنده طبیعی مواد غذایی گرایش پیدا کرده‌اند. در سال‌های اخیر رنگدانه به‌دست‌آمده از کپک موناسکوس پورپورئوس به دلیل قابلیت حجم بالای تولید، تنوع رنگ رنگدانه‌ها، پایداری نسبتاً بالای رنگدانه‌ها نسبت به حرارت و pHهای مختلف جایگاه خاصی به‌عنوان رنگدانه طبیعی به‌دست‌آورده است؛ اما تولید مایکوتوکسین سیتترینین همراه با تولید رنگدانه توسط این کپک، باعث منع استفاده

از آن در بسیاری از کشورها و محدود شدن کاربرد گسترده آن در فراورده‌های غذایی شده است. حذف بیولوژیکی سیتترینین توسط مخمر تیمارشده یکی از روش‌های مؤثر برای حذف توکسین از رنگدانه موناسکوس می‌باشد. در این تحقیق به بررسی و مقایسه اثر مخمر زنده و غیرفعال‌شده با دو تیمار مؤثر شناخته‌شده اسیدی و حرارتی برای حذف توکسین توسط مخمر ساکاروما یسیس سرویزیه در غلظت‌های مختلف پرداخته شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد مخمر در تمام حالت‌های مورد بررسی در این پژوهش باعث کاهش سیتترینین و رنگدانه خارج سلولی از محیط گردید. قابلیت جذب کاهش سیتترینین در مخمر تیمارشده با اسید و حرارت بیشتر از مخمر زنده بود، به طوری که با افزایش غلظت سوسپانسیون قابلیت جذب نیز بیشتر شد. همچنین بررسی نتایج به‌دست‌آمده نشان داد استفاده از مخمر زنده

کنترل است، مقدار سیتترین باقی مانده در محیط نیز به کمتر از حد مجاز استاندارد اروپا رسیده است. همچنین استفاده هم‌زمان از مخمر زنده و تیمارشده تأثیر بیشتری در افزایش تولید رنگدانه و کاهش سیتترین خواهد داشت که در این زمینه بررسی‌های بیشتری لازم است.

در کشت کپک موناسکوس باعث تحریک تولید رنگدانه و افزایش تولید رنگدانه داخل سلولی و خارج سلولی می‌شود. باتوجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت استفاده از مخمر زنده در غلظت  $10^4$  واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بهترین تیمار است، زیرا علاوه بر اینکه مقدار رنگدانه‌های داخل سلولی و خارج سلولی بیشتر از نمونه

## منابع

- عوض پور، م، سیفی پور، ف، عبدی، ج، نبوی، ط، و زمانیان عضدی، م. (۱۳۹۲). جداسازی رنگ‌های خوراکی از فرآورده‌های قنادی به روش کروماتوگرافی با لایه نازک. *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*، ۸(۳)، ۷۳-۷۸.
- Al-Sarrani, A. Q. M., & El-Naggar, M. Y. M. (2006). Application of Plackett-Burman factorial design to improve citrinin production in *Monascus* rubber batch cultures. *Botanical Studies*, 47, 167-174.
- Armando, M., Pizzolitto, R., Dogi, C., Cristofolini, A., Merkis, C., Poloni, V., . . . Cavaglieri, L. (2012). Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of applied microbiology*, 113(2), 256-264. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05331.x>
- Avazpour, M., Seifipour, F., Abdi, J., Nabavi, T., & Zamanian-Azodi, M. (2013). Detection of dyes in confectionery products using thin-layer chromatography. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(3), 73-78. (in Persian)
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., & Lebrhi, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of applied microbiology*, 97(5), 1038-1044.
- Blanc, P., Loret, M., & Goma, G. (1995). Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnology Letters*, 17(3), 291-294. doi:<https://doi.org/10.1007/BF01190639>
- Bueno, D. J., Casale, C. H., Pizzolitto, R. P., Salvano, M. A., & Oliver, G. (2007). Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *Journal of food protection*, 70(9), 2148-2154. doi:<https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2148>
- Chen, D., Xue, Y., Chen, M., Li, Z., & Wang, C. (2016). Optimization of submerged fermentation medium for citrinin-free monascin production by *Monascus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(8), 772-779. doi:<https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1135461>
- Chen, G., Shi, K., Song, D., Quan, L., & Wu, Z. (2015). The pigment characteristics and productivity shifting in high cell density culture of *Monascus anka* mycelia. *BMC biotechnology*, 15(1), 1-9. doi:<https://doi.org/10.1186/s12896-015-0183-3>
- Dikshit, R., & Tallapragada, P. (2011). *Monascus purpureus*: A potential source for natural pigment production. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4), 164-174.
- Duraklı-Velioğlu, S., Boyacı, İ. H., Şimşek, O., & Gümüş, T. (2013). Optimizing a submerged *Monascus* cultivation for production of red pigment with bug damaged wheat using artificial neural networks. *Food Science and Biotechnology*, 22(6), 1639-1648. doi:<https://doi.org/10.1007/s10068-013-0261-z>

- Hamdi, M., Blanc, P., Loret, M., & Goma, G. (1997). A new process for red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus*. *Bioprocess Engineering*, 17(2), 75-79. doi:<https://doi.org/10.1007/PL00008958>
- Jia, X. Q., Xu, Z. N., Zhou, L. P., & Sung, C. K. (2010). Elimination of the mycotoxin citrinin production in the industrial important strain *Monascus purpureus* SM001. *Metabolic engineering*, 12(1), 1-7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.08.003>
- Karazhiyan, H., Mehraban Sangatash, M., Karazhyan, R., Mehrzad, A., & Haghighi, E. (2016). Ability of different treatments of *Saccharomyces cerevisiae* to surface bind aflatoxin M1 in yoghurt. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(6), 1489-1498 .
- Kobylewski, S., & Jacobson, M. F. (2012). Toxicology of food dyes. *International journal of occupational and environmental health*, 18(3), 220-246. doi:<https://doi.org/10.1179/1077352512Z.00000000034>
- Kongruang, S. (2011). Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(1), 93-99. doi:<https://doi.org/10.1007/s10295-010-0834-2>
- Kurniawati, S., & Zubaidah, E. (2014). Enhanced Production of Red Pigment and Lovastatin by Co-Culture with *Saccharomyces cerevisiae* in Angkak Rice-Mung Bean. *International Journal of Technical Research and Application*, 2(5), 64-67 .
- Li, J.-J., Shang, X.-Y., Li, L.-L., Liu, M.-T., Zheng, J.-Q., & Jin, Z.-L. (2010). New cytotoxic azaphilones from *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice). *Molecules*, 15(3), 1958-1966. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules15031958>
- Lin, T., Yakushijin, K., Büchi, G., & Demain, A. (1992). Formation of water-soluble *Monascus* red pigments by biological and semi-synthetic processes. *Journal of Industrial Microbiology*, 9(3-4), 173-179. doi:<https://doi.org/10.1007/BF01569621>
- Malik ,K., Tokkas, J., & Goyal, S. (2012). Microbial pigments: a review. *International Journal of Microbial Resource Technology*, 1(4), 361-365 .
- Manan, M., Mohamad, R., & Ariff, A. (2017). *Monascus* spp.: A source of Natural Microbial Color through Fungal Biofermentation. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 5(3), 00148. doi:<https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00148>
- Morata, A., Loira, I., & Suárez Lepe, J. (2016). Influence of yeasts in wine colour. *Grape and Wine Biotechnology*; Morata, A., Loira, I., Eds. 285-305
- Mu, H., Huang, L., Ding, X., & Zhao, S. (2015). Influence of different substrates on the production of pigments and citrinin by *Monascus* FJ46. In *Advances in Applied Biotechnology* (pp. 257-264): Springer, Berlin, Heidelberg.
- Nadzri, N. S. (2012). *The optimization of red pigment by Monascus purpureus* FTC 5356 in solid state fermentation. (Doctoral dissertation), Universiti Malaysia Pahang, Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/The-optimization-of-red-pigment-by-monascus-FTC-in-Shazwani/8cd6570e4f56849847ae042ba09693b3c4eaf0f1?p2df>
- NCCLS, N. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. In (Second ed.): NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, NCCLS Wayne, PA, USA.
- Orozco, S. F. B., & Kilikian, B. V. (2008). Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT3802. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(2), 263-268. doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-007-9465-9>
- Patakova, P. (2013). *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 40(2), 169-181. doi:<https://doi.org/10.1007/s10295-012-1216-8>

- Piotrowska, M. (2011). Adsorption of ochratoxin A by *Saccharomyces cerevisiae* living and non-living cells. *Acta alimentaria*, 41(1), 1-7. doi:<https://doi.org/10.1556/aalim.2011.0006>
- Rahaie, S., Emam-Djomeh, Z., Razavi, S., & Mazaheri, M. (2010). Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* as a potential aflatoxin decontaminating agent in pistachio nuts. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 82-90 .
- Said, F. (2010). *Monascus ruber* ICMP 15220 Fermentation for the Production of Pigment. (Doctoral dissertation), Massey University, New Zealand, Retrieved from [https://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/2654/02\\_whole.pdf](https://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/2654/02_whole.pdf)
- Satapa, N. A. A. (2013). *Optimization of Yellow Pigment Production by Monascus Purpureus from Banana Peel*. (Doctoral dissertation), Universiti Malaysia Pahang, Retrieved from [http://umpir.ump.edu.my/id/eprint/7220/1/Optimization\\_of\\_yellow\\_pigment\\_production.pdf](http://umpir.ump.edu.my/id/eprint/7220/1/Optimization_of_yellow_pigment_production.pdf)
- Seyedin, A., Hatamian-Zarmi, A., Rasekh, B., & Mirderikvand, M. (2015). Natural Pigment Production by *Monascus purpureus*: Bioreactor Yield Improvement through Statistical Analysis. *Applied Food Biotechnology*, 2(2), 23-30. doi:<https://doi.org/10.22037/afb.v2i2.7457>
- Shetty, P. H., Hald, B., & Jespersen, L. (2007). Surface binding of aflatoxin B 1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International journal of food microbiology*, 113(1), 41-46. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.013>
- Shetty, P. H., & Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), 48-55. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.004>
- Shin, C. S., Kim, H. J., Kim, M. J., & Ju, J. Y. (1998). Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when cocultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and bioengineering*, 59(5), 576-581. doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980905\)59:5<576::AID-BIT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980905)59:5<576::AID-BIT7>3.0.CO;2-7)
- Suh, J.-H., & Shin, C. S. (2000a). Analysis of the morphologic changes of *Monascus* sp. J101 cells cocultured with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 193(1), 143-147. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09416.x>
- Suh, J.-H., & Shin, C. S. (2000b). Physiological analysis on novel coculture of *Monascus* sp. J101 with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 190(2), 241-245. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09293.x>
- Suharna, N. (2015). Production of Non Citrinin Chinese Red Yeast Rice by Using *Monascus purpureus* Skw2 Co-cultured with *Bacillus megaterium*. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 2(2), 72-78. doi:<https://doi.org/10.5072/RIN/SDWT8R>
- Wang, H., Zhang, S., Lin, T., & Zheng, D. (2017). Introduction and safety evaluation of citrinin in foods. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 5(5), 179-183. doi:<https://doi.org/10.11648/j.jfns.20170505.13>
- Wang, S., Zhao, S., Mu, H., Sun, F., & Chen, P. (2014). *Effect of Lactococcus lactis subsp. on Production of Pigment and Citrinin by Monascus*. Paper presented at the Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012).
- Wang, Y.-Z., Ju, X.-L., & Zhou, Y.-G. (2005). The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. *Food Microbiology*, 22(1), 145-148. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.006>
- Wang, Y., Zhang, B., Lu, L., Huang, Y., & Xu, G. (2013). Enhanced production of pigments by addition of surfactants in submerged fermentation of *Monascus purpureus* H1102. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3339-3344. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.6182>
- Xiong, X., Zhang, X., Wu, Z., & Wang, Z. (2014). Optimal selection of agricultural products to inhibit citrinin production during submerged culture of *Monascus anka*. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 19(6), 1005-1013. doi:<https://doi.org/10.1007/s12257-014-0419-4>

- Zhang, L., Li, Z., Dai, B., Zhang, W., & Yuan, Y. (2013). Effect of submerged and solid-state fermentation on pigment and citrinin production by *Monascus purpureus*. *Acta Biologica Hungarica*, 64(3), 385-394. doi:<https://doi.org/10.1556/abiol.64.2013.3.11>
- Zhou, B., Zhu, M.-J., Wang, J.-F., Wu, Z.-Q., & Liang, S.-Z. (2009). Effect of Ammonium Salts on *Monascus* Yellow and Red Pigments and Citrinin Production. *Journal of Chongqing Institute of Technology (Natural Science)*, 1, 010 .

## Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Live Cell and Treated with Heat and Acid on Citrinin and Pigments of *Monascus purpureus*

Hediyeh Davoudi Moghadam<sup>1</sup>, Fakhri Shahidi<sup>2\*</sup>, Farideh Tabatabaei Yazdi<sup>2</sup>, Mahboobe Sarabi-Jamab<sup>3</sup>, Zarrin Es'haghi<sup>4</sup>

- 1- PhD. Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
- 2- Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
- \* Corresponding author (fshahidi@um.ac.ir)
- 3- Associated Professor, Department of Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
- 4- Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University, Mashhad, Iran

### Abstract

*Monascus purpureus* can produce a wide range of natural pigments so attract the attention of food producers as substitute of synthetic colors. *Monascus* pigments usually accompanied with citrinin contamination which limits their wide application in foods. The usage of *Saccharomyces cerevisiae* is known as a useful biological way for citrinin elimination. In this study, the effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells in two modes of treatment (heat treatment at 121 °C and acid treatment in 2M HCL) and live at three different concentrations ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  CFU/mL) were investigated on the amount of citrinin and yellow, orange and red pigments produced by *Monascus purpureus*. The results showed that live yeast cell and yeast cells treated by heat and acid significantly decreased the citrinin in culture, so that citrinin content decreased from 4.43 mg/L in control sample to 0.9, 0.10 and 0.07 mg/L (at  $10^5$  CFU/mL yeast suspension) respectively. The maximum amount of yellow, orange and red extracellular and intracellular measured pigments belong to the samples with live yeast, while the amount of this pigments in the samples containing yeast treated with heat and acid reduced respectively. Among the treatments, the use of live yeast at concentration of  $10^4$  CFU/mL per milliliter provided the best conditions to achieve the desired goal.

**Keywords:** Acid treatment, Heat treatment, Pigment, *Saccharomyces cerevisiae* Citrinin, *Monascus purpureus*