www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۵، جلد ۵، شماره ۳، صفحات ۳۲۴-۳۱۵

JRIFST

تثبیت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر سرامیک آلومین جهت کاهش آفلاتوکسین M_1 در شرایط In Vitro

مرجان فروغی[۱]، محبوبه سرابی‌جماب[۲*]، جواد کرامت[۳]، مسعود نجف نجفی[۴]

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی،گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد
۲- استادیار، گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد
* نویسندهٔ مسئول (m.sarabi@rifst.ac.ir)
۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۴- استادیار، مرکز آموزش عالی جهاد کشاورزی خراسان رضوی، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۹

واژه‌های کلیدی
آفلاتوکسین
آلومین
تثبیت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*

چکیده

در این پژوهش، توانایی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC5052 در جذب آفلاتوکسین M_1 مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور افزایش عملکرد مخمر در محیط واکنش، مخمر تحت فرایند تثبیت سلولی برحامل سرامیکی از جنس آلومین قرار گرفت و فرایند تثبیت مخمر روی آلومین بررسی شد. نتایج نشان داد، تثبیت مخمر زنده روی سرامیک آلومین بهتر صورت پذیرفت (P<۰/۰۵). سپس محلول آفلاتوکسین M_1 با غلظت ۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم در زمان‌های ۵، ۱۰و ۲۰ دقیقه از روی بستر سرامیکی آلومین حاوی مخمر تثبیت‌شده (به دو روش زنده و غیرزنده) عبور داده شد. نتایج نشان داد میزان باقی‌مانده آفلاتوکسین M_1 در محلول پس از گذشت زمان ۲۰ دقیقه سیرکولاسیون حداقل بوده و حداکثر مقدار این کاهش در میزان آفلاتوکسین M_1 موجود به ۷۵ درصد رسید. بستر آلومین حاوی مخمر تثبیت‌شده به‌صورت زنده درمقایسه با آلومین حاوی مخمر تثبیت‌شده به‌صورت غیرزنده، آفلاتوکسین M_1 محلول را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. نتایج این پژوهش نشان داد سرامیک آلومین می‌تواند به‌عنوان یک بستر مناسب جهت تثبیت مخمر به‌منظور حذف آفلاتوکسین مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها بوده و به‌عنوان محصول ثانویه توسط قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس*[۱]، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*[۲] و *آسپرژیلوس نومیوس*[۳] تولید می‌گردند (Moss, 1998). آفلاتوکسین‌ها شامل ۱۸ نوع سم شبیه به هم هستند که ۶ نوع آن از اهمیت بیشتری برخوردار هستند و ترتیب کاهش سمیت در انواع آنها به‌صورت $B_1>M_1>G_1>B_2>M_2\neq G_2$ می‌باشد. مایکوتوکسین‌ها سموم قارچی هستند که در حیوانات و انسان خاصیت جهش‌زایی و سرطان‌زایی دارند. شیر و فراورده‌های آن ازجمله مواد غذایی حساس به آلودگی با سموم قارچی هستند. مهم‌ترین نوع آفلاتوکسین که در شیر و فراورده‌های لبنی وجود دارد M_1 می‌باشد که حاصل تغییر شیمیایی آفلاتوکسین B_1 در بدن گاوهای شیری است (Razzaghi-Abyaneh, 2013). حداکثر

[1] *Aspergillus flavus*
[2] *A. parasiicus*
[3] *A. nomius*

مقدار مجاز آفلاتوکسین‌ها در غذای دام و طیور، ۲۰ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر مقدار مجاز آن در شیرخام و پاستوریزه، ۰/۱ میکروگرم در کیلوگرم و جهت شیرخشک مخصوص تغذیهٔ اطفال ۰/۰۲۵ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۸). پژوهش‌های انجام‌شده در ایران نشان می‌دهد میزان آفلاتوکسین در بسیاری از نمونه‌های مواد غذایی ازجمله شیر و فراورده‌های لبنی چه بسا بیش از حد مجاز بوده (Fallah *et al.*, 2009) که علاوه بر خطر بروز مسمومیت‌ها و سرطان‌ها و به خطر افتادن سلامت جامعه، منجر به کاهش بازارهای صادراتی این فراورده‌ها می‌گردد (Oveisi *et al.*, 2007).

پژوهشگران سالهاست که حذف آفلاتوکسین‌ها را از مواد غذایی گوناگون مورد مطالعه قرار داده‌اند. دراین‌رابطه استفاده از روش‌های گوناگون فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی پیشنهاد شده است. در میان این روش‌ها استفاده از روش بیولوژیک به دلیل عدم باقی‌ماندهٔ مواد شیمیایی و عدم تأثیر روی مادهٔ غذایی توصیه می‌گردد. ثابت شده است که برخی از میکروارگانیسم‌ها ازجمله باکتری‌های تولیدکنندهٔ اسیدلاکتیک و مخمرها قادر به جذب آفلاتوکسین می‌باشند، که این ویژگی به دلیل ساختار ویژهٔ دیوارهٔ سلولی آنها می‌باشد، ازاین‌رو می‌توان از این میکروارگانیسم‌ها حتی در حالت غیرفعال به‌عنوان جاذب برای آفلاتوکسین استفاده کرد (Razzaghi-Abyaneh, 2013; Azab *et al.*, 2005). در سالهای اخیر پژوهش‌های گسترده‌ای دراین‌زمینه انجام شده است. Shetty و همکاران (۲۰۰۶)، جذب سطحی آفلاتوکسین B_1 را به‌وسیلهٔ *ساکارومایسس سرویزیه*[1] به‌عنوان یک روش حذف آلودگی در غذاهای تخمیری مورد بررسی قرار دادند. Shahin (۲۰۰۷)، توانست ۴۰ گونهٔ باکتری را از ماست و شیر جداسازی کند و از بین باکتری‌های جداسازی‌شده *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* به‌صورت غیرزنده توانستند به ترتیب ۸۶ و۱۰۰ درصد از آفلاتوکسین B_1 را از محلول آزمایشگاهی آلوده‌شده کاهش دهد. Kabak و Var (۲۰۰۸) توانایی ۴ گونه از لاکتوباسیلوس‌ها و ۲ گونه از بیفیدوباکتریوم را جهت حذف آفلاتوکسین M_1 در بافر نمکی فسفات مورد بررسی قرار دادند و در این بررسی سلول‌های زندهٔ باکتری توانستند ۲۱-۱۰ درصد از آفلاتوکسین M_1 را در محلول حذف کنند. Corassin و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی کفایت و کارآمدی *ساکارومایسس سرویزیه* و باکتری‌های اسیدلاکتیک جهت جذب آفلاتوکسین M_1 در شیر کم‌چرب فرادما (استریل) پرداختند. نتایج بررسی آنها نشان داد مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در مقایسه با باکتری‌های اسیدلاکتیک ظرفیت بالاتری را در جذب آفلاتوکسین M_1 داشت که این جذب در مدت زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب۹۰ و مدت ۹۲ درصد بود.

میکروارگانیسم‌هایی که به‌منظور کاهش آفلاتوکسین مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توانند به دلیل عملکرد بهتر تحت فرایند تثبیت سلولی[2] قرار گیرند. تثبیت سلولی به این جهت انجام می‌پذیرد که از حرکت آزادانهٔ میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه در شرایطی که در مجاورت با فاز مایع قرار می‌گیرند، جلوگیری شود. همچنین جهت افزایش عملکرد از پراکندگی آنها جلوگیری شده و متمرکزتر در محیط واکنش قرار می‌گیرند. روش‌های تثبیت سلولی به‌صورت کلی بر مبنای اتصال میکروارگانیسم به حامل، محصور شدن در داخل یک مادهٔ جامد و یا تجمع آنها در کنار یکدیگر انجام می‌پذیرد. میکروارگانیسم‌های تثبیت‌شده می‌توانند بر یک حامل یا بستر قرار گرفته و یا مستقیماً به محیط واکنش اضافه گردند. دراین‌زمینه می‌توان از بسترهایی استفاده کرد، که علاوه بر عدم واکنش با مادهٔ غذایی، نسبت به استریلیزاسیون مقاوت دمایی بالایی داشته باشند (Kourkoutas *et al.*, 2004). سرامیک ازجمله بسترهایی است که به‌طور گسترده در فرایند تثبیت سلولی به‌ویژه در فرایند تخمیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. سرامیک‌ها می‌توانند دربرگیرندهٔ طیف وسیعی از مواد معدنی باشند. به‌طورکلی به مواد جامدی که بخش عمدهٔ تشکیل‌دهندهٔ آنها غیرفلزی و غیرآلی باشد سرامیک گفته می‌شود. در این پژوهش

[1] *Saccharomyces cerevisiae*

[2] Cell immobilization

به‌منظور ساخت بستر میکروبی از سرامیک متخلخل بر پایهٔ آلومین استفاده شد. آلومین فعال‌شده[1] از اکسید آلومینیوم تشکیل شده و تماس با مادهٔ غذایی با آن واکنش نمی‌دهد و هیچ نوع باقی‌مانده‌ای از خود به‌جای نمی‌گذارد (Corasin *et al*., 2012). همچنین عبور مایع از آنها به‌راحتی انجام شده قابل استریل‌کردن است و می‌توان آن را تا ۱۰۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد حرارت داد. بررسی ساختار میکروسکوپی این ماده نشان می‌دهد که دارای خلل و فرج بالایی بوده و سطح تماس زیادی را به خود اختصاص داده است (یک متر مکعب از آن حدود ۴۲۰ متر مربع سطح دارد).

Janiszyn و همکاران (۲۰۰۷) تولید اتانل با مخمر تثبیت‌شده بر ذرات متخلخل سرامیک را مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعهٔ آنها نشان داد فرایند تولید با مخمر تثبیت‌شده بازده بالاتری را در مقایسه با مخمرهای آزاد دارد. Rahaie و همکاران (۲۰۱۰) از تثبیت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* ATCC9763 جهت رفع آلودگی آفلاتوکسین پسته به‌صورت سطحی استفاده کردند. Pereira و همکاران (۲۰۱۳) تثبیت سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* را بر آلژینات جهت تولید یک نوع نوشیدنی الکلی از عسل مورد بررسی قرار دادند.

امروزه تثبیت سلول مخمر درزمینهٔ بیوتکنولوژی و علوم‌زیستی کاربرد دارد ولی تاکنون جهت کاهش سموم با استفاده از مخمر به روش بیولوژیک در بستر ثابت مطالعه‌ای انجام نپذیرفته است. ازاین‌رو پژوهش حاضر باهدف کاهش بیولوژیکی آفلاتوکسین M_1 در شرایط in vitro با استفاده از مخمر *ساکارومایسس سرویزیهٔ* PTCC5052 تثبیت‌شده بر بستر ثابت، انجام شد. جهت افزایش عملکرد، جلوگیری از پراکندگی و تمرکز بیشتر در محیط واکنش، مخمر بر دانه‌های سرامیک آلومین تثبیت و بستر حاوی مخمر تثبیت‌شده در مجاورت محلول آفلاتوکسین مورد آزمایش قرار گرفت.

[1] Active Alumin Beads

مواد و روش‌ها

مواد

مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC5052 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران به‌صورت ویال تهیه شد. محیط کشت YM[2] broth و YM agar از شرکت Biochem و محلول‌های استاندارد آفلاتوکسین M_1 از شرکت Sigma و محلول‌های بافر فسفاته، کلرید باریم، اسیدسولفوریک، متانل، استونیتریل و آب مخصوص کروماتوگرافی، از شرکت Merck خریداری شد. دانه‌های سرامیک آلومین فعال، از شرکت تولیدی مواد اولیهٔ سرامیک اردکان خریداری شد.

روش ساخت و تهیهٔ ستون

ستون شیشه‌ای با ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر و قطر ۵ سانتی‌متر مجهز به صفحهٔ مشبک شیشه‌ای[3] (در داخل ستون)، ساخته شد. به‌منظور ایجاد جریان و سیرکولاسیون مایع در طول ستون، پمپ پریستالتیک با توانایی تنظیم جریان ۱۰۰-۵ میلی‌لیتر در دقیقه خریداری شد (karimi, 2009).

آماده‌سازی کشت

گونهٔ مخمر در محیط کشت YM broth در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد کشت داده شد. باتوجه‌به منحنی رشد مخمر، مخمر رشدیافته در انتهای مرحلهٔ لگاریتمی رشد بعد از ۴۴ ساعت جداسازی گردید (webber *et al*., 2014). بدین‌صورت‌که محیط کشت مایع حاوی مخمر با سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و با ۷۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ، سپس محیط کشت از آن جدا شد و بار دیگر با محلول بافر فسفات pH=۶/۸ شست‌وشو و سانتریفیوژ گردید. محلول بافر فسفات رویی جدا و دوباره با محلول بافر فسفات رقیق شد، آنگاه به‌وسیلهٔ اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر غلظت ۳×۱۰^{۷} واحد شمارش کُلنی در هر میلی‌لیتر[4] تعیین شد. سوسپانسیون میکروبی به دو صورت (زنده یا غیرزنده) جهت فرایند تثبیت مورد

[2] Yeast mold broth
[3] Center Glass
[4] cfu/ml

استفاده قرار گرفت. جهت غیرفعال کردن مخمر نیز قسمتی از سوسپانسیون سلولی مخمر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت (Beshay *et al*., 2011; Navarro & Durand, 1997).

آماده‌سازی بستر ثابت سرامیک آلومین (AL_2O_3)

دانه‌های سرامیک از جنس آلومین فعال‌شده ابتدا با آب مقطر شست‌وشو و سپس در آون ۱۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت خشک شد. سپس دانه‌های خشک شده دوباره در ظروف درب بسته استریل شدند (۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه) (Janiszyn *et al*., 2007; Navarro & Durand 1997).

تثبیت مخمر بر آلومین

به‌منظور تثبیت مخمر بر ذرات سرامیک آلومین متخلخل، سوسپانسیون میکروبی به دو صورت (زنده و غیرزنده) تهیه شد. دراین‌روش، به میزان ۲۵۰ میلی‌لیتر به‌صورت حجمی از دانه‌های سرامیک، ۱۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی به هر دو شکل اضافه گردید. سپس جهت انجام فرایند تثبیت سرامیک با سوسپانسیون سلولی در گرم‌خانهٔ چرخان به همراه سوسپانسیون سلولی زنده به‌عنوان شاهد، به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند (شکل ۱). سوسپانسیون از ذرات سرامیک جداسازی و سرامیک با آب مقطر شست‌وشو داده شد. جهت تعیین کفایت فرایند تثبیت، تعداد سلول‌های مخمر در محلول باقی مانده با لام هموسایتومتر شمارش شد (Beshay *et al*., 2011; Navarro & Durand, 1997).

شکل ۱ - سوسپانسیون میکروبی سمت چپ تصویر و آلومین با سوسپانسیون سلولی سمت راست تصویر

آماده‌سازی آلومین حاوی مخمر تثبیت‌شده جهت فرایند جذب آفلاتوکسین

مخمر*ساکارومایسس سرویزیه* یک مخمر فعال‌زیستی است و در تماس با مادهٔ غذایی ممکن است منجر به تخمیر و فساد در مادهٔ غذایی گردد، ازاین‌رو از مخمر غیرزنده در فرایند سم‌زدایی استفاده شد. به‌این‌منظور دانه‌های آلومین حاوی مخمر زنده و غیرزنده، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد استریل و مخمر موجود به‌صورت کامل غیرفعال گشت (Janiszyn *et al*., 2007; Navarro & Durand, 1997).

ارزیابی ریزساختار

جهت انجام مطالعه‌های سلول‌های تثبیت‌شده مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر سرامیک آلومین از میکروسکوپ الکترونی روبشی[1] استفاده گردید. ابتدا دانه‌های سرامیک حاوی مخمر تثبیت‌شده با چسب آلومینیومی بر پایهٔ مورد نظر به‌صورت ثابت قرار گرفتن سپس جهت رسانایی بیشتر روی آنها روکشی از جنس طلا به قطر ۱۰ نانومتر کشیده شد و با بزرگ‌نمایی ۱۲۵، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ از آنها تصویر الکترونی گرفته شد. میکروسکوپ الکترونی مورد استفاده در پژوهش حاضر مدل XL30 ساخت شرکت فیلیپس از کشور هلند بود (Rahaie *et al*., 2010).

عملیات سم‌زدایی محلول آفلاتوکسین با بستر ثابت سرامیک آلومین

براساس استاندارد موجود بالاترین حد مجاز آفلاتوکسین M_1 در مواد غذایی مایع مانند شیر ۰/۱ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد. به‌منظور انجام عملیات سم‌زدایی محلول ۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم آفلاتوکسین، دو برابر بالاترین غلظت حد مجاز، (۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم آفلاتوکسین در محلول آب مخصوص HPLC، استونیتریل، متانل به نسبت ۶:۲:۲) به میزان ۱۵۰ میلی‌لیتر در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد تهیه شد و در مجاورت ۲۵۰ میلی‌لیتر سرامیک حاوی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* تثبیت‌شده (به دو شکل

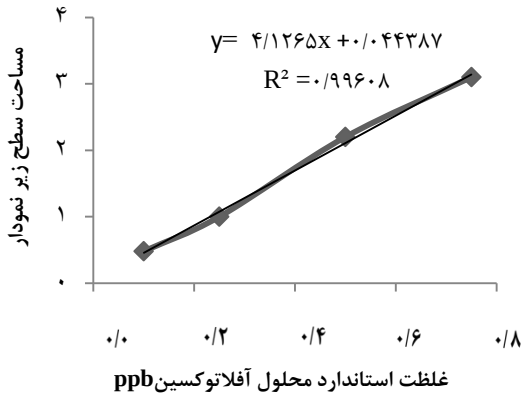
[1] Scanning Electron Microscope (SEM)

زنده و غیرزنده) که در داخل ستون شیشه‌ای ثابت ریخته شده بود، قرار گرفت و به مدت ۲۰ دقیقه به‌صورت سیرکولاسیون محلول از روی سرامیک عبور داده شد. در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه، نمونه‌برداری بدون توقف جریان انجام شد (حداقل زمان یک سیرکولاسیون کامل و عبور تمامی محلول از روی بستر سرامیک بین ۵-۳ دقیقه بود) و میزان باقی‌ماندهٔ آفلاتوکسین در محلول مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (شکل ۲).

شکل ۲ - پمپ پریستالتیک و ستون شیشه‌ای حاوی آلومین با مخمر تثبیت‌شده

اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین

جهت اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، دستگاه Agilent ساخت کشور آمریکا مدل ۱۱۰۰، ستون فاز معکوس ODS با ستون C18 و از آشکارساز مدل Multi and fluroscence detector استفاده شد. ابتدا با تزریق ۴ رقت محلول استاندارد آفلاتوکسین M_1 منحنی کالیبراسیون به‌دست آمد و معادلهٔ خط مربوط به آن رسم شد (شکل ۳). سپس محلول مورد نظر از فیلتر سرسرنگی ۴۶ میکرومتر عبور داده شد و به‌میزان ۲۰۰ میکرولیتر محلول به HPLC تزریق شد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۹۰).



شکل ۳ - منحنی کالیبراسیون آفلاتوکسین M_1

تجزیه‌وتحلیل آماری

به‌منظور بررسی فرایند تثبیت و تحلیل باقی‌ماندهٔ آفلاتوکسین آزمایش‌ها با دو نوع تثبیت (زنده و غیرزنده) در ۳ زمان گوناگون (۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه) به‌صورت فاکتوریل، در قالب طرح پایهٔ کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفته و پس از آنالیز واریانس، میانگین‌های مربوطه با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ($P<۰/۰۵$) مقایسه شدند .

نتایج و بحث

بررسی نتایج فرایند تثبیت

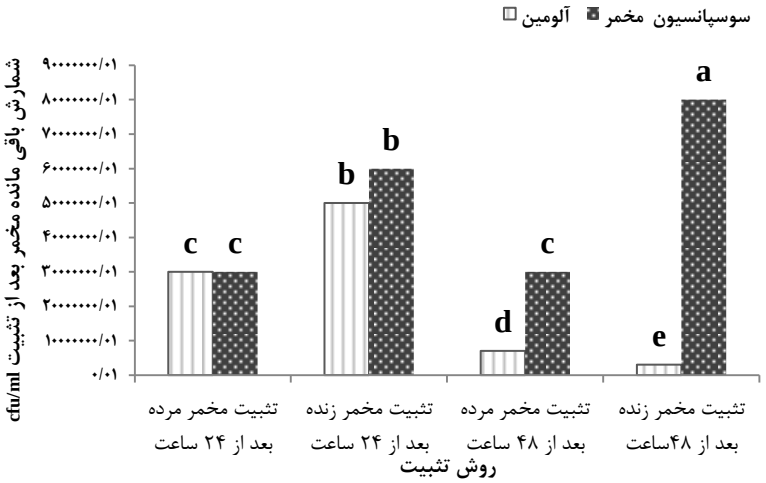
بررسی نتایج شمارش سلول‌های باقی‌ماندهٔ مخمر در محلول عبوری نشان داد در فرایند تثبیت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* روی دانه‌های آلومین به دو صورت (زنده و غیرزنده) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، زمان تثبیت به‌طور معنی‌داری مؤثر بوده و میزان تثبیت مخمر طی زمان ۴۸ ساعت افزایش یافته است ($P<۰/۰۵$) (جدول ۱). میزان باقی‌ماندهٔ تعداد کمتری از سلول‌های مخمر در محلول نشان‌دهندهٔ تثبیت بهتر می‌باشد (شکل ۴) و این نتیجه بیانگر این موضوع می‌باشد که سلول‌های مخمر طی زمان ۴۸ ساعت فرصت بیشتری جهت نفوذ و قرارگرفتن در بافت متخلخل سرامیک را داشته و همچنین فرایند تثبیت مخمر زنده در مقایسه با مخمر غیرزنده روی سرامیک به دلیل اتصال قوی‌تر مخمر به شکل زنده، از میزان بالاتری برخوردار بود. janiszyn و همکاران (۲۰۰۷) طی بررسی مشابه نیز مخمر *ساکارومایسس*

سرویزیه را روی سرامیک اکسید آلومینیوم به شکل زنده تثبیت کردند. بررسی‌های Kourkoutas و همکاران (۲۰۰۴) نشان داد، جذب میکروارگانیسم بر یک حامل جامد می‌تواند به واسطهٔ پیوندهای الکترواستاتیکی و نیروهای کووالانی بین سلول و حامل (جامد) ایجاد شود. براساس آزمایش‌های Navarro و Durand (۱۹۹۷) تثبیت مخمر روی بستر شیشه‌ای متخلخل در زمانی که مخمر فعال و زنده است صورت می‌پذیرد. همچنین نتایج آزمایش‌های Rapoport و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند، فرایند تثبیت سلول مخمر بر سرامیک، در حالتی که سلول مخمر زنده است، به‌خوبی صورت می‌پذیرد. این تثبیت حتی در محیط کشت مخمر نیز انجام می‌گیرد. Hamdy و همکاران (۱۹۹۰)، تولید اتانل به‌صورت پیوسته و مداوم با استفاده از مخمر تثبیت‌شده بر ذرات اکسید آلومینیوم را مورد بررسی قرار دادند. با کاربرد این روش پایداری فرایند تولید تضمین شده و تعداد زیادی از سلول‌ها در معرض واکنش‌های تخمیری قرار می‌گیرند.

جدول ۱ - میزان مخمر تثبیت‌شده پس از ۲۴ و۴۸ ساعت (برحسب لگاریتم واحد شمارش کلنی در هر میلی‌لیتر)

	میزان مخمر تثبیت‌شده بعد از ۲۴ ساعت به‌صورت زنده	میزان مخمر تثبیت‌شده بعد از ۲۴ ساعت به‌صورت غیرزنده	میزان مخمر تثبیت‌شده بعد از ۴۸ ساعت به‌صورت غیرزنده	میزان مخمر تثبیت‌شده بعد از ۴۸ ساعت به‌صورت زنده
آلومین	۰/۰۸۱±۰/۰۰۲	۰	۰/۶۳۲±۰/۰۰۹	۱/۴۲۶±۰/۰۱۵

ارقام میانگین ۳ عدد ± انحراف معیار است.



شکل ۴ - میانگین باقی‌ماندهٔ مخمر پس از فرایند تثبیت

بررسی نتایج عملیات جذب آفلاتوکسین

پس از انتخاب بستر سرامیکی آلومین حاوی مخمر تثبیت‌شده (زنده و غیرزنده) و عبور محلول آفلاتوکسین با غلظت ۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه، نتایج نشان داد (جدول۲)، میزان باقی‌ماندهٔ آفلاتوکسین در محلول پس از گذشت زمان ۲۰ دقیقه سیرکولاسیون دست‌کم بوده است و آفلاتوکسین موجود ۷۵ درصد کاهش یافت. نتایج بررسی Shetty و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد دیوارهٔ سلولی مخمر شبکه‌ای از بتا ۱ و ۳ گلوکان با زنجیره‌های جانبی بتا ۱ و ۶ گلوکان است که مانوپروتئین‌ها به‌وسیلهٔ پیوند کوالانسی به لایهٔ داخلی گلوکان متصل شده‌اند و دارای مقدار اندکی کیتین نیز می‌باشند. پروتئین‌ها و گلوکان‌ها در دیوارهٔ سلول دارای محل‌های اتصال قابل دسترس می‌باشند و قابلیت برقراری پیوندهای گوناگون ازجمله پیوند هیدروژنی، یونی و هیدروفوبیک را دارند. در واقع حتی در گونه‌های خشک شده ساکارومایسس چنین توانایی

دیده شده است. بررسی زمان تماس نیز در مطالعهٔ Elgerbi و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که برای گونه های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم سرعت حذف توکسین در حدود ۱۴-۰ درصد بعد از ۲۴ ساعت تماس می‌باشد و بعد از ۹۶ ساعت تماس در حدود ۷۳-۴/۵ درصد است. Shetty و همکاران (۲۰۰۶)، جذب سطحی آفلاتوکسین B_1 را به‌وسیلهٔ *ساکارومایسس سرویزیه* به‌عنوان یک روش حذف آلودگی در غذاهای تخمیری مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نیز نشان داد بعد از گذشت ۲۰ دقیقه میزان آفلاتوکسین توسط مخمر ساکارومایسس *A18* که با حرارت غیرفعال شده بود، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲- کاهش آفلاتوکسین در محلول با عبور از آلومین

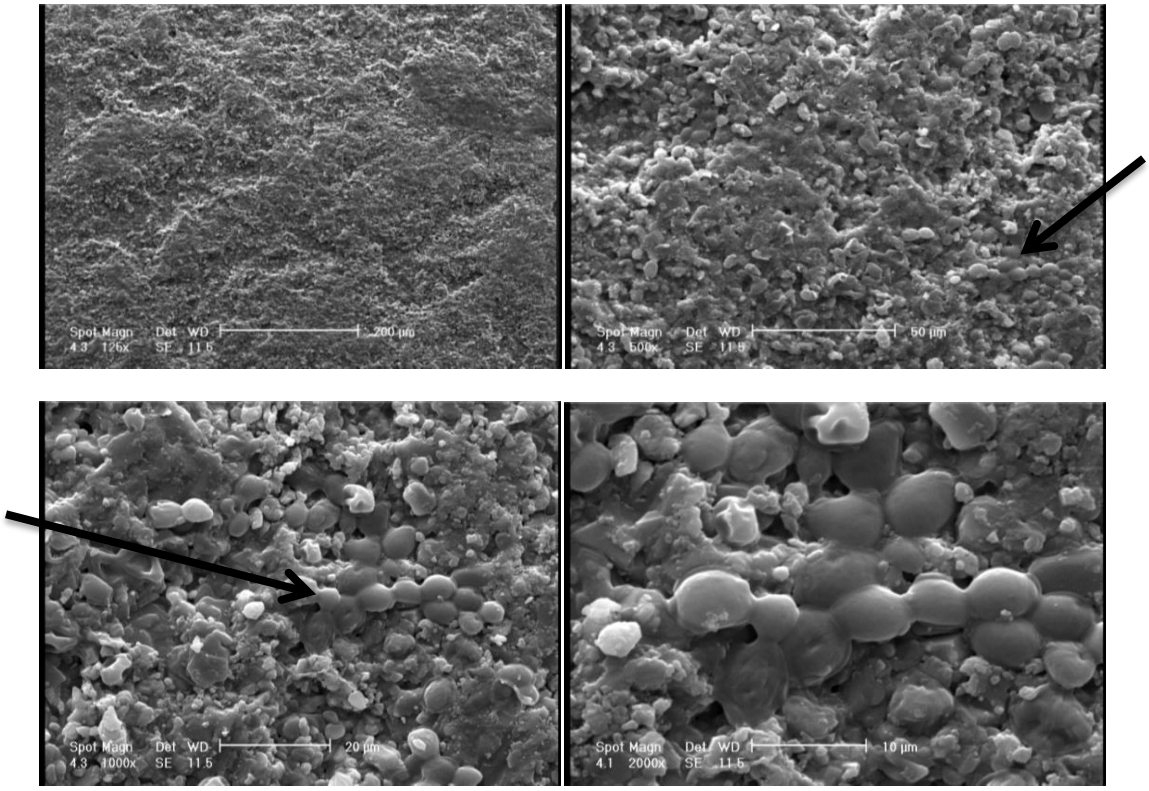
روش تثبیت	غلظت اولیه محلول استاندارد آفلاتوکسین (میکروگرم در کیلوگرم)	مدت زمان عبور محلول آفلاتوکسین از بستر آلومین	باقی مانده آفلاتوکسین (میکروگرم در کیلوگرم)	درصد کاهش آفلاتوکسین
تثبیت به روش مخمر زنده	۰/۲	۵ دقیقه	۰/۰۸± ۰/۰۰۳ d	۶۰
تثبیت به روش مخمر زنده	۰/۲	۱۰ دقیقه	۰/۰۶ ± ۰/۰۰۰ e	۷۰
تثبیت به روش مخمر زنده	۰/۲	۲۰ دقیقه	۰/۰۵ ±۰/۰۰۱ f	۷۵
تثبیت به روش مخمر غیرزنده	۰/۲	۵ دقیقه	۰/۱۷ ±۰/۰۰۱ a	۱۵
تثبیت به روش مخمر غیرزنده	۰/۲	۱۰ دقیقه	۰/۱۲ ±۰/۰۰۱ b	۴۰
تثبیت به روش مخمر غیرزنده	۰/۲	۲۰ دقیقه	۰/۱۱ c ± ۰/۰۰ c	۴۵

ارقام میانگین ۳ عدد ± انحراف معیار است. ستون مقادیر دارای حروف فوقانی متفاوت، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰۵/ درصد با یکدیگر دارند و به ترتیب حروف از بیشترین مقدار به کمترین مقدار می‌باشد.

Azab و همکاران (۲۰۰۵) تیمارهای غیرفعال‌کننده مانند اسید و حرارت را در فرایند جذب آفلاتوکسین توسط باکتری لاکتوباسیلوس مؤثر دانستند. Corasin و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی کفایت و کارآمدی *ساکارومایسس سرویزیه* و باکتری‌های اسیدلاکتیک جهت جذب آفلاتوکسین M_1 در شیر کم‌چرب فرادما (استریل) پرداختند. نتیجهٔ این مطالعه نشان داد که *ساکارومایسس سرویزیه* کشته‌شده به‌وسیلهٔ حرارت به‌تنهایی یا به همراه باکتری‌های اسیدلاکتیک پتانسیل بالایی در حذف آفلاتوکسین M_1 دارد. همچنین بررسی نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر نشان داد، کاهش آفلاتوکسین در محلول توسط آلومین حاوی مخمر تثبیت‌شده به‌صورت زنده در مقایسه با آلومین تثبیت‌شده به‌صورت غیرزنده، بیشتر بود که ناشی از تعداد مخمر بیشتر دراین‌روش تثبیت می‌باشد. تعداد بیشتر مخمر منجر به افزایش جایگاه‌های اتصال به سم آفلاتوکسین و کاهش سم می‌گردد. براساس نتایج بررسی‌های Shetty و همکاران (۲۰۰۶) پدیدهٔ اتصال آفلاتوکسین یک پدیدهٔ فیزیکی بوده که در سطح مخمر یعنی در دیوارهٔ سلولی آن اتفاق می‌افتد. آنها مشاهده کردند که ۷۵ درصد قدرت اتصال مخمر مربوط به مواد استخراج‌شده از دیوارهٔ سلولی بوده و زمانی که الیگوساکارید مانان تغییریافته از دیوارهٔ مخمر مشتق می‌شود این مقدار به ۹۵ درصد می‌رسد و نتیجه گرفتند که قسمت پلی‌ساکاریدی دیوارهٔ سلولی و همچنین بتا گلوکان در اتصال سطحی آفلاتوکسین در گونهٔ مخمر مؤثر می‌باشد.

ارزیابی ریزساختار

در این پژوهش برای حصول اطمینان از تثبیت مخمر روی دانه‌های سرامیک آلومین، تصاویر الکترونی در ۴ بزرگ‌نمایی ۱۲۵، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ برابر تهیه شد (شکل ۵). پیکان‌های مشخص‌شده روی تصاویر نشان می‌دهند که مخمرها به‌خوبی در خلل و فرج آلومین تثبیت شده‌اند و این می‌تواند دلیلی بر حضور و توانایی مخمر در اتصال سم آفلاتوکسین موجود در مادهٔ غذایی باشد.



شکل ۵ - تصویر میکروسکوپ الکترونی تثبیت سلول مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC5052 بر آلومین در بزرگ‌نمایی‌های گوناگون X ۱۲۵، X۵۰۰، X۱۰۰۰ و X۲۰۰۰

نتیجه‌گیری

استفاده از روش‌های گوناگون جلوگیری از آلوده شدن مواد غذایی مصرفی و خوراک دام به مایکوتوکسین‌ها از مبدأ تأمین، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و سلامت مادهٔ غذایی تولیدشده را تضمین می‌کند. اما متأسفانه، باتوجه‌به پژوهش‌های انجام‌شده مشخص گردیده است که میزان آفلاتوکسین در نمونه‌های بسیاری از مواد غذایی و فراورده‌های لبنی بیش از حد مجاز می‌باشد. این مسأله باعث شده است که علاوه بر خطر بروز مسمومیت‌ها و سرطان‌ها و به خطر افتادن سلامت جامعه، فراورده‌ها در بازارهای صادراتی تحت کنترل شدیدتری قرار گیرند. درحال‌حاضر در کشور ایران روش عملی جهت کاهش و یا حذف سموم غذایی مانند آفلاتوکسین‌ها وجود ندارد؛ باتوجه‌به اینکه استفاده از میکروارگانیسم ها به‌عنوان یک روش بیولوژیک جهت کاهش آفلاتوکسین به‌کار می‌رود، به‌این‌منظور می‌توان از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* به دلیل پتانسیل بالا در حذف آفلاتوکسین، استفاده کرد. نتایج پژوهش فوق نیز این ادعا را ثابت کرده است. جهت تمرکز بیشتر، میکروارگانیسم در محیط‌های واکنش معمولاً تحت فرایند تثبیت قرار می‌گیرند. فرایند تثبیت امروزه به‌عنوان دانش جدیدی مطرح می‌گردد. در این مطالعه بهترین روش تثبیت روی سرامیک آلومین ارائه شد. پیشنهاد می‌گردد در پژوهش‌ها و مطالعه‌های درپیش رو طراحی و ساخت بیوفیلترها جهت رفع آلودگی مواد غذایی به‌ویژه مواد غذایی مایع، مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

۱- سازمان ملی استاندارد ایران. ۱۳۸۸. خوراک انسان دام، بیشینه رواداری مایکوتوکسین‌ها ، استاندارد ملی ایران، شماره ۵۹۲۵، اصلاحیه.

۲- سازمان ملی استاندارد ایران. ۱۳۹۰. شیر و فراورده‌های آن، اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1 به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، استاندارد ملی ایران، شماره ۷۱۳۳، تجدیدنظر اول.

3- Azab, R.M., Tawakkol, W.M., Hamad, A.R.M., Abou-Elmagd, M.K., El -Agrab, H.M., & Refai, M.K. 2005. Detection and estimation of aflatoxin B_1 in feeds and its biodegradation by bacteria and fungi. Egypt Journal of Natural Toxins, 2:20-39.

4- Beshay, U., Hesham, E., Ismail, I., & Moavad, H. 2011. β-glucanase by a recombinant strain of *Escherichia coli* immobilized in different matrices. Polish Journal of Microbiology, 2:133–138.

5- Corassin, C., Bovo, F., Rosim, H., & Oliveira, R. E. 2012. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M_1 in UHT skim milk. Food Control, 31:80-83.

6- Elgerbi, A.M., Aidoo, K.E., Candlish, A.A.G., & Williams. A. G. 2006. Effects of lactic acid bacteria and *bifidobacteria* on levels of aflatoxin M_1 in milk and phosphate buffer. Milch wissenschaft, 61(2):197-199.

7- Fallah, a., jafari, T., Fallah, A., & Rahnama, M., 2009. Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. Food and Chemical Toxicology, 47 (8):1872-1873.

8- Hamdy, M., Kim, K.K., & Rudtke, C.A. 1990. Continuous ethanol production by yeast immobilized on to channeled Alumina beads .journal of Biomass, 21:189-206.

9- Janiszyn,z ., Dziuba, E., Boruczkowski, T., Chmielewsk, J., Kawa-Rygielska, J., & Rosiek, G. 2007. Ethanol fermentation with yeast cell immobilized on grains of porous ceramic sinter. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 57:245-250.

10- Kabak, B., & Var, I. 2008. Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by Lactobacillus and Bifidobacterium strains. Journal of Environmental Science and Health B. 43 (7):-617-624.

11- karimi, A. 2009. Decolorization of Maxilon-Red by Kissiris Immobilized *Phanerochaete Chrysosporium* in a Trickle-Bed Bioreactor-Involvement of Ligninolytic Enzymes

12- Kourkoutas,Y., Bekatoroua, A., Banat, I.M., Marchantb, R., & Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. Food Microbiology, 21:377–39.

13- Moss, M. O. 1998. Economic importance of mycotoxins. J. Appl. Microbiol, 84:62–76.

14- Navarro, j.m., & Durand, G. 1997. Modification of Yeast Metabolism by Immobilization on to Porous Glass. European Journal of Applied Microbiology, 4:243-254.

15- Oveisi, M.R., Janat, B., sadeghi,N., Hajimahmoodi, & M., Nikzad,a., 2007. Presence of aflatoxin M1 in milk and infant milk products in Tehran, Iran. Food Control, 18 (10):1216–1218.

16- Pereira, A.P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J.M., Estevinho, L.M., & Mendes, A. 2013. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilization on mead Production. Journal of Food Science and Technology, 56:21-30.

17- Rapoport, A,. Borovikova, D., Kokina, A., Patmalnieks, A., Polyak, N., Pavlovska, L., Mezinskis, G., & Dekhtyar, Y., 2011. Immobilization of yeast cells on the surface of hydroxyapatite ceramics Process Biochemistry, 46:665–670.

18- Razzaghi-Abyaneh, M. 2013. Aflatoxins , Recent Advances and Future Prospects, Iva Simcic, http://dx.doi.org/10.57772/2500.

19- Rahaie, S., Emam-jomeh, Z.S., Razavi1, H., & Mazaheri, M. 2010. Immobilized *Saccharomyces Cerevisiae* as a potential Aflatoxin decontamination agent in Pistachio nuts. Brazilian Journal of Microbiology, 41:82-90.

20- Shahin, A.A.M. 2007. Removal of aflatoxin B1 from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria. International Journal of Agriculture and Biology, 9(1):71-75.

21- Shetty, P.H. & Jespersen, L. 2006. *Saccharomyces cervisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. Trends in Food Science and Technology, 17:48-55.

22- Webber, A., Hettiarachchy, N.S., webber, D., Sivarooban, T., & Horax, R. 2014. Heat-Stabilized Defatted Rice Bran (HDRB) as an Alternative Growth Medium for *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Food and Nutrition, 1:1-6.

Immobilization of *Saccharomyces Cerevisiae* on Alumina Ceramic Beads In Order to Reduce Aflatoxin M_1 In Vitro

Marjan Foroughi[1], Mahbobeh Sarabi jamab[2*], Javad Keramat[3], Masoud Najaf Najafi[4]

1- PhD. Student, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
2- Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.
* Corresponding author (m.sarabi@rifst.ac.ir)
3- Associated Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agricultural, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Institute of Scientific-Applied Higher Education Jihad-e-Agriculture, Mashhad, Iran

Abstract

In this study the ability of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052 to adsorption of aflatoxin M_1 was assessed. In order to improve operational efficiency, Alumina ceramic was analyzed as a potential support for immobilization of yeast cells. In immobilization process, results indicated that the binding abilities of AFM_1 by live cells of *Saccharomyces cerevisiae* were higher than non-live immobilized cells on alumina ceramic within 48 hours ($P<0.05$). Then, the aflatoxin M_1 solution (0.2 ppb) was passed through a ceramic substrate containing immobilized *saccharomyces cerevisiae* (both of live and non-live immobilized cells) in 5, 10 and 20 minutes. The results showed that the residual aflatoxin M_1 in the solution after 20 minutes of circulation was minimal and the highest percentage of AFM_1 reduction was 75. Alumina beads containing live immobilized yeast cells compared non- live yeasts, significantly reduced aflatoxin M_1. The results of this study showed that the alumina ceramic can be used as a suitable bed for immobilization of *saccharomyces cerevisiae* to remove aflatoxin M_1.

Keywords: Aflatoxin, Alumina, Immobilization, *Saccharomyces cerevisiae*