

## تثبیت مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر سرامیک آلومین جهت کاهش

### آفلاتوکسین M<sub>1</sub> در شرایط In Vitro

مرجان فروغی<sup>۱</sup>، محبوبه سرابی جماب<sup>۲\*</sup>، جواد کرامت<sup>۳</sup>، مسعود نجف نجفی<sup>۴</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشگاه علوم و صنایع غذایی، مشهد  
 ۲- استادیار، گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشگاه علوم و صنایع غذایی، مشهد  
 \* نویسنده 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<sub>1</sub> مورد بررسی قرار گرفت. به منظور 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 ( $P < 0.05$ ). سپس محلول آفلاتوکسین M<sub>1</sub> با غلظت ۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه از روی بستر سرامیکی آلومین حاوی مخمر تثبیت شده (به دو روش زنده و غیرزنده) عبور داده شد. نتایج نشان داد میزان باقی مانده آفلاتوکسین M<sub>1</sub> در محلول پس از گذشت زمان ۲۰ دقیقه سیرکولاسیون حداقل بوده و حداکثر مقدار این کاهش در میزان آفلاتوکسین M<sub>1</sub> موجود به ۷۵ درصد رسید. بستر آلومین حاوی مخمر تثبیت شده به صورت زنده در مقایسه با آلومین حاوی مخمر تثبیت شده به صورت غیرزنده، آفلاتوکسین M<sub>1</sub> محلول را به طور معنی داری کاهش داد. نتایج این پژوهش نشان داد سرامیک آلومین می‌تواند به عنوان یک بستر مناسب جهت تثبیت مخمر به منظور حذف آفلاتوکسین مورد استفاده قرار گیرد.

#### مقدمه

ترتیب کاهش سمیت در انواع آنها به صورت  $B_1 > M_1 > G_1 > B_2 > M_2 \neq G_2$  می‌باشد. مایکوتوکسین‌ها سموم قارچی هستند که در حیوانات و انسان خاصیت جهش‌زایی و سرطان‌زایی دارند. شیر و فرآورده‌های آن از جمله مواد غذایی حساس به آلودگی با سموم قارچی هستند. مهم‌ترین نوع آفلاتوکسین که در شیر و فرآورده‌های لبنی وجود دارد M<sub>1</sub> می‌باشد که حاصل تغییر شیمیایی آفلاتوکسین B<sub>1</sub> در بدن گاوهای شیری است (Razzaghi-Abyaneh, 2013). حداکثر

آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها بوده و به عنوان محصول ثانویه توسط قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس<sup>۱</sup>، آسپرژیلوس پارازیتیکوس<sup>۲</sup> و آسپرژیلوس نومیوس<sup>۳</sup> تولید می‌گردند (Moss, 1998). آفلاتوکسین‌ها شامل ۱۸ نوع سم شبیه به هم هستند که ۶ نوع آن از اهمیت بیشتری برخوردار هستند و

<sup>1</sup> *Aspergillus flavus*

<sup>2</sup> *A. parasiticus*

<sup>3</sup> *A. nomius*

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 زنده 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 ترتیب ۹۰ و مدت ۹۲ درصد بود.

میکروارگانیزم‌هایی که به‌منظور کاهش آفلاتوکسین مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توانند به دلیل عملکرد بهتر تحت فرایند تثبیت سلولی<sup>۲</sup> قرار گیرند. تثبیت سلولی به این جهت انجام می‌پذیرد که از حرکت آزادانه میکروارگانیزم‌ها 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 میکروارگانیزم به حامل، محصور شدن در داخل یک ماده جامد و یا تجمع آنها در کنار یکدیگر انجام می‌پذیرد. میکروارگانیزم‌های تثبیت‌شده می‌توانند بر یک حامل یا بستر قرار گرفته و یا مستقیماً به محیط واکنش اضافه گردند. در این زمینه می‌توان از بسترهایی استفاده کرد، که علاوه بر عدم واکنش با ماده غذایی، نسبت به استریلیزاسیون مقاوت دمایی بالایی داشته باشند (Kourkoutas *et al.*, 2004). سرامیک از جمله بسترهایی است که به‌طور گسترده در فرایند تثبیت سلولی به‌ویژه در فرایند تخمیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. سرامیک‌ها می‌توانند دربرگیرنده طیف وسیعی از مواد معدنی باشند. به‌طور کلی به مواد جامدی که بخش عمده تشکیل‌دهنده آنها غیرفلزی و غیرآلی باشد سرامیک گفته می‌شود. در این پژوهش

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 تغذیه 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 از جمله 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. در این رابطه استفاده از روش‌های گوناگون فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی پیشنهاد شده است. در میان این روش‌ها استفاده از روش بیولوژیک به دلیل عدم باقی‌مانده مواد شیمیایی و عدم تأثیر روی ماده غذایی توصیه می‌گردد. ثابت شده است که برخی از میکروارگانیزم‌ها از جمله باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک و مخمرها قادر به جذب آفلاتوکسین می‌باشند، که این ویژگی به دلیل ساختار ویژه دیواره سلولی آنها می‌باشد، از این رو می‌توان از این میکروارگانیزم‌ها حتی در حالت غیرفعال به‌عنوان جاذب برای آفلاتوکسین استفاده کرد (Razzaghi-Abyaneh, 2013; Azab *et al.*, 2005). در سالهای اخیر پژوهش‌های گسترده‌ای در این زمینه انجام شده است. Shetty و همکاران (۲۰۰۶)، جذب سطحی آفلاتوکسین  $B_1$  را به‌وسیله ساکارومایسس سرویزیه<sup>۱</sup> به‌عنوان یک روش حذف آلودگی در غذاهای تخمیری مورد بررسی قرار دادند. Shatin (۲۰۰۷)، توانست ۴۰ گونه باکتری را از ماست و شیر جداسازی کند و از بین باکتری‌های جداسازی‌شده لاکتوکوکوس لاکتیس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس به‌صورت غیرزنده توانستند به ترتیب ۸۶ و ۱۰۰ درصد از آفلاتوکسین  $B_1$  را از محلول آزمایشگاهی آلوده‌شده کاهش دهد. Kabak و Var (۲۰۰۸) توانایی ۴ گونه از

<sup>2</sup> Cell immobilization

<sup>1</sup> *Saccharomyces cerevisiae*

## مواد و روش‌ها

### مواد

مخمر ساکارومایسیس سرویزیه PTCC5052 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران به صورت ویال تهیه شد. محیط کشت YM<sup>۲</sup> broth و YM agar از شرکت Biochem و محلول‌های استاندارد آفلاتوکسین M<sub>1</sub> از شرکت Sigma و محلول‌های بافر فسفات، کلرید باریم، اسیدسولفوریک، متانل، استونیتریل و آب مخصوص کروماتوگرافی، از شرکت Merck خریداری شد. دانه‌های سرامیک آلومین فعال، از شرکت تولیدی مواد اولیه سرامیک اردکان خریداری شد.

### روش ساخت و تهیه ستون

ستون شیشه‌ای با ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر و قطر ۵ سانتی‌متر مجهز به صفحه مشبک شیشه‌ای<sup>۳</sup> (در داخل ستون)، ساخته شد. به منظور ایجاد جریان و سیرکولاسیون مایع در طول ستون، پمپ پرستالتیک با توانایی تنظیم جریان ۵-۱۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه خریداری شد (karimi, 2009).

### آماده‌سازی کشت

گونه مخمر در محیط کشت YM broth در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. با توجه به منحنی رشد مخمر، مخمر رشدیافته در انتهای مرحله لگاریتمی رشد بعد از ۴۴ ساعت جداسازی گردید (webber et al., 2014). بدین صورت که محیط کشت مایع حاوی مخمر با سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه 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 به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر غلظت  $3 \times 10^7$  واحد شمارش کُلی در هر میلی‌لیتر<sup>۴</sup> تعیین شد. سوسپانسیون میکروبی به دو صورت (زنده یا غیرزنده) جهت فرایند تشبیت مورد

به منظور ساخت بستر میکروبی از سرامیک متخلخل بر پایه آلومین استفاده شد. آلومین فعال شده<sup>۱</sup> از اکسید آلومینیوم تشکیل شده و تماس با ماده غذایی با آن واکنش نمی‌دهد و هیچ نوع باقی‌مانده‌ای از خود به جای نمی‌گذارد (Corasin et al., 2012). همچنین عبور مایع از آنها به راحتی انجام شده قابل استریل کردن است و می‌توان آن را تا ۱۰۰۰ درجه 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 تشبیت‌شده بر ذرات متخلخل سرامیک را مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه آنها نشان داد فرایند تولید با مخمر تشبیت‌شده بازده بالاتری را در مقایسه با مخمرهای آزاد دارد. Rahaie و همکاران (۲۰۱۰) از تشبیت مخمر ساکارومایسیس سرویزیه ATCC9763 جهت رفع آلودگی آفلاتوکسین پسته به صورت سطحی استفاده کردند. Pereira و همکاران (۲۰۱۳) تشبیت سلولی ساکارومایسیس سرویزیه را بر آلژینات جهت تولید یک نوع نوشیدنی الکلی از عسل مورد بررسی قرار دادند.

امروزه تشبیت سلول مخمر در زمینه بیوتکنولوژی و علوم زیستی کاربرد دارد ولی تاکنون جهت کاهش سموم با استفاده از مخمر به روش بیولوژیک در بستر ثابت مطالعه‌ای انجام پذیرفته است. از این رو پژوهش حاضر باهدف کاهش بیولوژیکی آفلاتوکسین M<sub>1</sub> در شرایط in vitro با استفاده از مخمر ساکارومایسیس سرویزیه PTCC5052 تشبیت‌شده بر بستر ثابت، انجام شد. جهت افزایش عملکرد، جلوگیری از پراکندگی و تمرکز بیشتر در محیط واکنش، مخمر بر دانه‌های سرامیک آلومین تشبیت و بستر حاوی مخمر تشبیت‌شده در مجاورت محلول آفلاتوکسین مورد آزمایش قرار گرفت.

<sup>۲</sup> Yeast mold broth

<sup>۳</sup> Center Glass

<sup>۴</sup> cfu/ml

<sup>۱</sup> Active Alumin Beads

### آماده‌سازی آلومین حاوی مخمر تثبیت‌شده جهت فرایند جذب آفاتوکسین

مخمر ساکارومایسس سرویزیه یک مخمر فعال‌زیستی است و در تماس با ماده غذایی ممکن است منجر به تخمیر و فساد در ماده غذایی گردد، از این‌رو از مخمر غیرزنده در فرایند سم‌زدایی استفاده شد. به این‌منظور دانه‌های آلومین حاوی مخمر زنده و غیرزنده، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه 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<sup>۱</sup> استفاده گردید. ابتدا دانه‌های سرامیک حاوی مخمر تثبیت‌شده با چسب آلومینیومی بر پایه 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 آفاتوکسین با بستر ثابت سرامیک آلومین

بر اساس استاندارد موجود بالاترین حد مجاز آفاتوکسین M<sub>1</sub> در مواد غذایی مایع مانند شیر ۰/۱ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد. به‌منظور انجام عملیات سم‌زدایی محلول ۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم آفاتوکسین، دو برابر بالاترین غلظت حد مجاز، (۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم آفاتوکسین در محلول آب مخصوص HPLC، استونیتریل، متانل به نسبت ۶:۲:۲) به میزان ۱۵۰ میلی‌لیتر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تهیه شد و در مجاورت ۲۵۰ میلی‌لیتر سرامیک حاوی مخمر ساکارومایسس سرویزیه تثبیت‌شده (به دو شکل

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

آماده‌سازی بستر ثابت سرامیک آلومین (AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) دانه‌های سرامیک از جنس آلومین فعال‌شده ابتدا با آب مقطر شست‌وشو و سپس در آن ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت خشک شد. سپس دانه‌های خشک شده دوباره در ظروف درب بسته استریل شدند (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه) (Janiszyn *et al.*, 2007; Navarro & Durand, 1997).

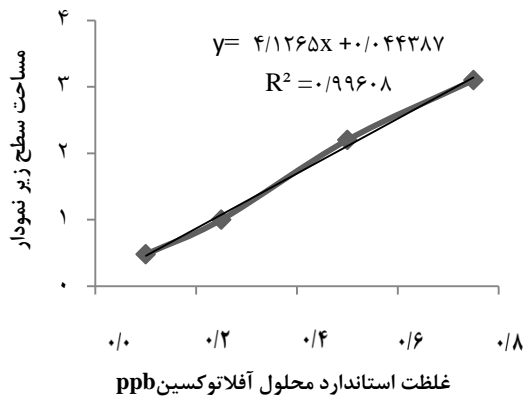
### تثبیت مخمر بر آلومین

به‌منظور تثبیت مخمر بر ذرات سرامیک آلومین متخلخل، سوسپانسیون میکروبی به دو صورت (زنده و غیرزنده) تهیه شد. در این‌روش، 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 گرم‌خانه چرخان به همراه سوسپانسیون سلولی زنده به‌عنوان شاهد، به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در ۲۵ درجه 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

<sup>1</sup> Scanning Electron Microscope (SEM)



شکل ۳ - منحنی کالیبراسیون آفلاتوکسین  $M_1$

### تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی فرایند تثبیت و تحلیل باقی مانده آفلاتوکسین آزمایش‌ها با دو نوع تثبیت (زنده و غیرزنده) در ۳ زمان گوناگون (۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه) به صورت فاکتوریل، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و پس از آنالیز واریانس، میانگین‌های مربوطه با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ( $P < 0.05$ ) مقایسه شدند.

### نتایج و بحث

#### بررسی نتایج فرایند تثبیت

بررسی نتایج شمارش سلول‌های باقی مانده مخمر در محلول عبوری نشان داد در فرایند تثبیت مخمر ساکارومایسیس سرویزیه روی دانه‌های آلومین به دو صورت (زنده و غیرزنده) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، زمان تثبیت به طور معنی‌داری مؤثر بوده و میزان تثبیت مخمر طی زمان ۴۸ ساعت افزایش یافته است ( $P < 0.05$ ) (جدول ۱). میزان باقی مانده تعداد کمتری از سلول‌های مخمر در محلول نشان‌دهنده تثبیت بهتر می‌باشد (شکل ۴) و این نتیجه بیانگر این موضوع می‌باشد که سلول‌های مخمر طی زمان ۴۸ ساعت فرصت بیشتری جهت نفوذ و قرار گرفتن 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 ساکارومایسیس

زنده و غیرزنده) که در داخل ستون شیشه‌ای ثابت ریخته شده بود، قرار گرفت و به مدت ۲۰ دقیقه به صورت سیرکولاسیون محلول از روی سرامیک عبور داده شد. در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه، نمونه برداری 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 باقی مانده آفلاتوکسین در محلول مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۲ - پمپ پرستالتیک و ستون شیشه‌ای حاوی آلومین با مخمر تثبیت شده

#### اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین

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

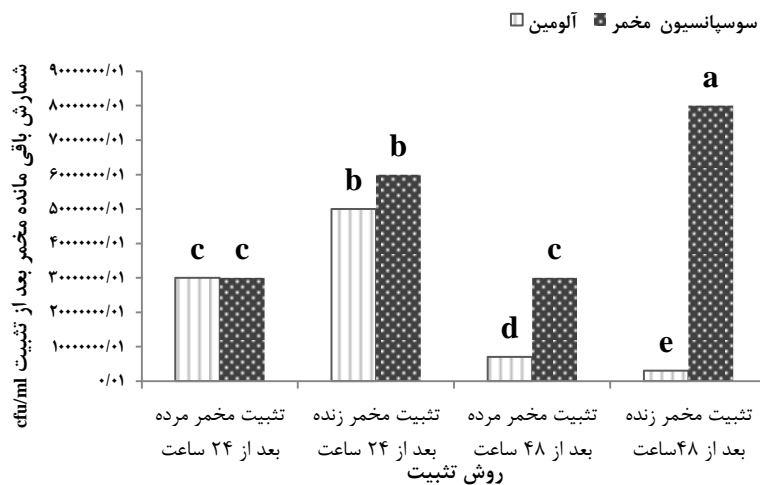
نشان دادند، فرایند تثبیت سلول مخمر بر سرامیک، در حالتی که سلول مخمر زنده است، به خوبی صورت می‌پذیرد. این تثبیت حتی در محیط کشت مخمر نیز انجام می‌گیرد. Hamdy و همکاران (۱۹۹۰)، تولید اتانل به صورت پیوسته و مداوم با استفاده از مخمر تثبیت شده بر ذرات اکسید آلومینیوم را مورد بررسی قرار دادند. با کاربرد این روش پایداری فرایند تولید تضمین شده و تعداد زیادی از سلول‌ها در معرض واکنش‌های تخمیری قرار می‌گیرند.

سروریزه 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 واسطه پیوندهای الکترواستاتیکی و نیروهای کووالانسی 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)

جدول ۱ - میزان مخمر تثبیت شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت (برحسب لگاریتم واحد شمارش کلنی در هر میلی لیتر)

میزان مخمر تثبیت شده	میزان مخمر تثبیت شده	میزان مخمر تثبیت شده	میزان مخمر تثبیت شده
بعد از ۲۴ ساعت	بعد از ۴۸ ساعت	بعد از ۲۴ ساعت	بعد از ۴۸ ساعت
به صورت زنده	به صورت غیرزنده	به صورت غیرزنده	به صورت زنده
۰/۰۸۱±۰/۰۰۲	۰/۶۳۲±۰/۰۰۹	۰	۱/۴۲۶±۰/۰۱۵

ارقام میانگین ۳ عدد ± انحراف معیار است.



شکل ۴ - میانگین باقی مانده مخمر پس از فرایند تثبیت

داد دیواره سلولی مخمر شبکه‌ای از بتا ۱ و ۳ گلوکان با زنجیره‌های جانبی بتا ۱ و ۶ گلوکان است که مانوپروتئین‌ها به وسیله پیوند کوالانسی به لایه داخلی گلوکان متصل شده‌اند و دارای مقدار اندکی کیتین نیز می‌باشند. پروتئین‌ها و گلوکان‌ها در دیواره سلول دارای محل‌های اتصال قابل دسترس می‌باشند و قابلیت برقراری پیوندهای گوناگون از جمله پیوند هیدروژنی، یونی و هیدروفوبیک را دارند. در واقع حتی در گونه‌های خشک شده ساکارومایسس چنین توانایی

#### بررسی نتایج عملیات جذب آفاتوکسین

پس از انتخاب بستر سرامیکی آلومین حاوی مخمر تثبیت شده (زنده و غیرزنده) و عبور محلول آفاتوکسین با غلظت ۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه، نتایج نشان داد (جدول ۲)، میزان باقی مانده آفاتوکسین در محلول پس از گذشت زمان ۲۰ دقیقه سیرکولاسیون دست کم بوده است و آفاتوکسین موجود ۷۵ درصد کاهش یافت. نتایج بررسی Shetty و همکاران (۲۰۰۶) نشان

ساکارومایسیس سرویزیه به عنوان 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 ساکارومایسیس A18 که با حرارت غیرفعال شده بود، به طور معنی داری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ).

دیده شده است. بررسی زمان تماس نیز در مطالعه 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 می باشد و بعد از ۹۶ ساعت تماس در حدود ۷۳-۴/۵ درصد است. Shetty و همکاران (۲۰۰۶)، جذب سطحی آفلاتوکسین B<sub>1</sub> را به وسیله

#### جدول ۲- کاهش آفلاتوکسین در محلول با عبور از آلومین

درصد کاهش آفلاتوکسین	باقی مانده آفلاتوکسین (میکروگرم در کیلوگرم)	مدت زمان عبور محلول آفلاتوکسین از بستر آلومین	غلظت اولیه محلول استاندارد آفلاتوکسین (میکروگرم در کیلوگرم)	روش تثبیت
۶۰	$0.03 \pm 0.08$ <sup>d</sup>	۵ دقیقه	۰/۲	تثبیت به روش مخمر زنده
۷۰	$0.00 \pm 0.06$ <sup>e</sup>	۱۰ دقیقه	۰/۲	تثبیت به روش مخمر زنده
۷۵	$0.01 \pm 0.05$ <sup>f</sup>	۲۰ دقیقه	۰/۲	تثبیت به روش مخمر زنده
۱۵	$0.01 \pm 0.17$ <sup>a</sup>	۵ دقیقه	۰/۲	تثبیت به روش مخمر غیرزنده
۴۰	$0.01 \pm 0.12$ <sup>b</sup>	۱۰ دقیقه	۰/۲	تثبیت به روش مخمر غیرزنده
۴۵	$0.00 \pm 0.11$ <sup>c</sup>	۲۰ دقیقه	۰/۲	تثبیت به روش مخمر غیرزنده

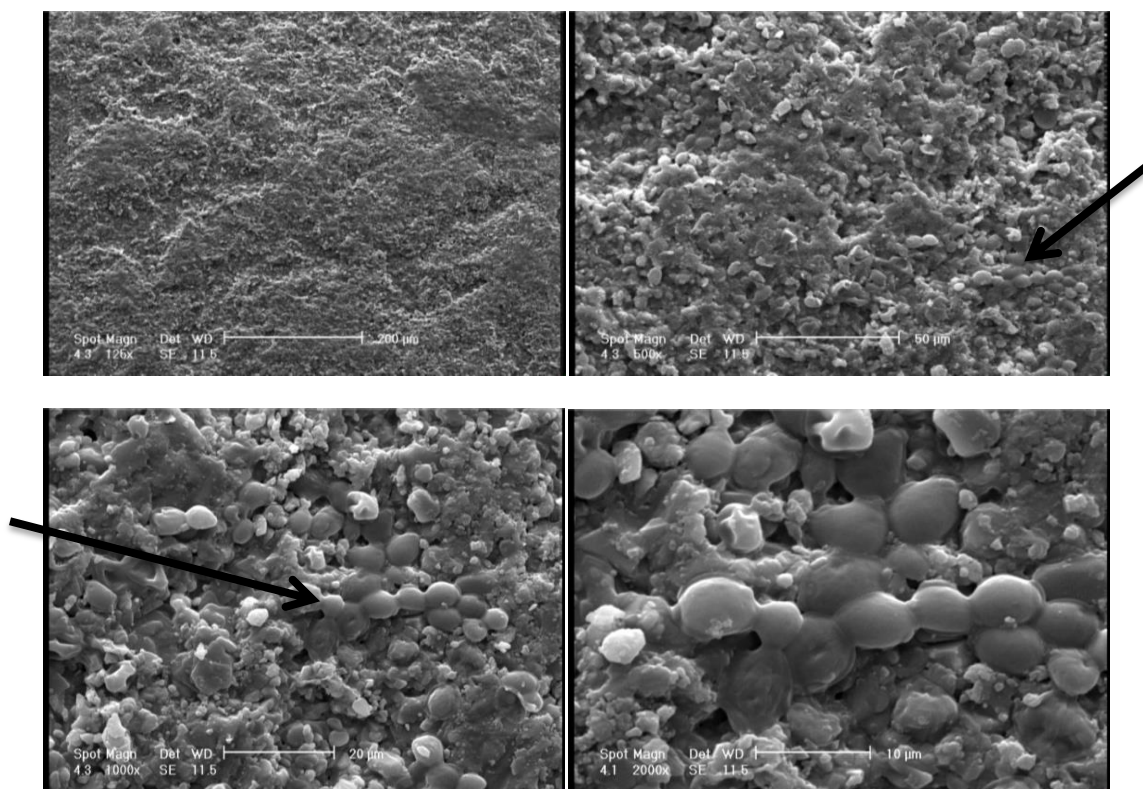
ارقام میانگین ۳ عدد  $\pm$  انحراف معیار است. ستون مقادیر دارای حروف فوقانی متفاوت، اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد با یکدیگر دارند و به ترتیب حروف از بیشترین مقدار به کمترین مقدار می باشد.

آفلاتوکسین یک پدیده فیزیکی بوده که در سطح مخمر یعنی در دیواره سلولی آن اتفاق می افتد. آنها مشاهده کردند که ۷۵ درصد قدرت اتصال مخمر مربوط به مواد استخراج شده از دیواره سلولی بوده و زمانی که الیگوساکارید مانان تغییر یافته از دیواره مخمر مشتق می شود این مقدار به ۹۵ درصد می رسد و نتیجه گرفتند که قسمت پلی ساکاردی دیواره سلولی و همچنین بتا گلوکان در اتصال سطحی آفلاتوکسین در گونه مخمر مؤثر می باشد.

#### ارزیابی ریزساختار

در این پژوهش برای حصول اطمینان از تثبیت مخمر روی دانه های سرامیک آلومین، تصاویر الکترونی در ۴ بزرگنمایی ۱۲۵، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ برابر تهیه شد (شکل ۵). پیکان های مشخص شده روی تصاویر نشان می دهند که مخمرها به خوبی در خلل و فرج آلومین تثبیت شده اند و این می تواند دلیلی بر حضور و توانایی مخمر در اتصال سم آفلاتوکسین موجود در ماده غذایی باشد.

Azab و همکاران (۲۰۰۵) تیمارهای غیرفعال کننده مانند اسید و حرارت را در فرایند جذب آفلاتوکسین توسط باکتری لاکتوباسیلوس مؤثر دانستند. Corasin و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی کفایت و کارآمدی ساکارومایسیس سرویزیه و باکتری های اسیدلاکتیک جهت جذب آفلاتوکسین M<sub>1</sub> در شیر کم چرب فرادما (استریل) پرداختند. نتیجه این مطالعه نشان داد که ساکارومایسیس سرویزیه کشته شده به وسیله حرارت به تنهایی یا به همراه باکتری های اسیدلاکتیک پتانسیل بالایی در حذف آفلاتوکسین M<sub>1</sub> دارد. همچنین بررسی نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد، کاهش آفلاتوکسین در محلول توسط آلومین حاوی مخمر تثبیت شده به صورت زنده در مقایسه با آلومین تثبیت شده به صورت غیرزنده، بیشتر بود که ناشی از تعداد مخمر بیشتر در این روش تثبیت می باشد. تعداد بیشتر مخمر منجر به افزایش جایگاه های اتصال به سم آفلاتوکسین و کاهش سم می گردد. براساس نتایج بررسی های Shetty و همکاران (۲۰۰۶) پدیده اتصال



شکل ۵ - تصویر میکروسکوپ الکترونی تثبیت سلول مخمر ساکارومایسس سرویزیه PTCC5052 بر آلومین در بزرگ‌نمایی‌های گوناگون X ۱۲۵، X ۵۰۰، X ۱۰۰۰ و X ۲۰۰۰

#### نتیجه‌گیری

استفاده از روش‌های گوناگون جلوگیری از آلوده شدن مواد غذایی مصرفی و خوراک دام به مایکوتوکسین‌ها از مبداء تأمین، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و سلامت ماده غذایی تولیدشده را تضمین می‌کند. اما متأسفانه، باتوجه به 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. در حال حاضر در کشور ایران روش عملی جهت کاهش و یا حذف سموم غذایی مانند آفلاتوکسین‌ها وجود ندارد؛ باتوجه به

اینکه استفاده از میکروارگانیسم‌ها 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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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.  $\beta$ -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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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., Boruczowski, T., Chmielewski, 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., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, 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., Razavi, 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 cerevisiae* 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<sub>1</sub> In Vitro

Marjan Foroughi<sup>1</sup>, Mahbobeh Sarabi jamab<sup>2\*</sup>, Javad Keramat<sup>3</sup>,  
Masoud Najaf Najafi<sup>4</sup>

- 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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> in the solution after 20 minutes of circulation was minimal and the highest percentage of AFM<sub>1</sub> reduction was 75. Alumina beads containing live immobilized yeast cells compared non- live yeasts, significantly reduced aflatoxin M<sub>1</sub>. 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<sub>1</sub>.

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