



بررسی مدل سینتیکی جذب آفاتوکسین B₁ توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه تیمار شده با اسید و اولتراسونیک در خمیر نان سنگک

مهران صیادی^۱، کیانا پورمحمدی^{۲*}، شهرزاد مالکی^۳، الهه عابدی^۲

۱- استادیار بخش بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران.

۲- دانشیار بخش مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فسا، فسا، ایران.

۳- استادیار گروه مهندسی عمران، دانشکده مهندسی، دانشگاه فسا، فسا، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۰	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۷	
کلمات کلیدی:	
ساکارومایسس سرویزیه (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
آفاتوکسین B ₁	
جذب سطحی، خمیر نان سنگک، مدل سینتیکی.	
DOI: 10.52547/fsct.19.124.19	
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.124.20.7	
* مسئول مکاتبات: kpourmohammadi@yahoo.com	

۱- مقدمه

آفاتوکسین‌ها گروهی از مایکوتوکسین‌ها با خصوصیات جهش‌زایی، سرطان‌زایی و متوقف‌کنندگی سیستم ایمنی هستند که عمدتاً به عنوان متابولیت‌های ثانویه گونه‌های *Aspergillus Aspergillus flavus parasiticus nomius* ساخته می‌شوند. آفاتوکسین B₁ سم بسیار قوی و کشنده‌ای است که عمدتاً غلات (ذرت و گندم)، دانه‌های روغنی، آجیل‌ها و محصولات لبنی به این سم آلوده می‌شوند [۱ و ۲]. تلاش برای حذف مایکوتوکسین‌ها از فراورده‌های غذایی همواره مورد توجه بوده است. راهکارهای متعددی برای سم‌زدایی از مواد غذایی آلوده وجود دارد که از جمله می‌توان به جداسازی فیزیکی، غیرفعال کردن گرمایی، تشعشع، تجزیه میکروبی و تیمار با مواد شیمیایی مختلف اشاره نمود. روش‌های بیولوژیکی حذف سموم به دلیل کارایی 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 توکسین‌ها هستند، گونه‌های مخمر ساکارومایسس سرویزیه بعنوان "نگهدارنده‌های سبز" به دلیل ویژگی‌های تکنولوژیکی متعدد و همچنین به دلیل داشتن درجه‌ی خوراکی، گزینه‌ی مناسبی برای استفاده از آنها در مواد غذایی و به منظور حذف آفاتوکسین‌ها می‌باشد [۳ و ۴].

از آنجایی که پروتئین‌ها و گلوکان‌های موجود در دیواره‌ی سلولی ساکارومایسس سرویزیه جایگاه‌های فعال زیادی برای ایجاد پیوندهای هیدروژنی، یونی یا هیدروفوبیک ایجاد می‌کنند [۴]، لذا شرایط مناسبی برای اتصال به گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار آفاتوکسین دارند. در مطالعه‌ای با استفاده از ساکارومایسس سرویزیه در نمونه‌های بادام‌زمینی نشان دادند که میزان کاهش این سم بعد از استفاده از این مخمر در طی ۷ روز، ۷۴/۴ درصد بود [۵]. براساس مطالعات دیگری توانایی سویه‌های مختلف ساکارومایسس سرویزیه برای کاهش آفاتوکسین B₁ مورد بررسی قرار گرفت و گزارش‌ها نشان داد که این مخمر توانسته است ۴۰٪ آفاتوکسین B₁ را در محلول استاندارد کاهش دهد که علت این کاهش را جذب توسط مخمر اعلام کردند. تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که مخمرها به دلیل وجود عوامل باندکننده مانان در دیواره سلولی خود، قادر به اتصال مولکول‌های مختلف

مانند سم‌های کشنده و یون‌های فلزی روی سطح دیواره سلولی خود هستند [۴]. مطالعات نشان می‌دهد که حذف مایکوتوکسین‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها بیشتر به دلیل چسبیدن توکسین به ترکیبات دیواره سلولی است تا ایجاد اتصال کووالانسی یا متابولیسم سلولی، به طوری که با کشتن میکروارگانیسم‌ها توسط عوامل مختلفی از جمله فراصوت، حرارت و اسید، سلول‌های مرده توانایی اتصال را از دست نداده و در سم‌زدایی نقش دارند [۵]. بطوریکه El Nezami و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که میکروارگانیسم‌های تیمار شده با اسید و حرارت در مقایسه با سلول‌های زنده، خاصیت سم‌زدایی بیشتری از خود نشان می‌دهند [۶]. عبارات دیگر، پدیده اتصال آفاتوکسین پدیده‌ای فیزیکی می‌باشد که در سطح مخمر یعنی در دیواره سلولی آن اتفاق می‌افتد [۴].

فراصوت یکی از فناوری‌های نوظهور است که در هم‌وزنیزه کردن، تمیز کردن، استریل کردن، حرارت دادن، امولسیفیه کردن، مهار فعالیت آنزیم‌ها و میکروب‌ها و متلاشی کردن سلول، تشدید واکنش‌های اکسیداسیون، اصلاح گوشت و اصلاح کریستالیزاسیون کاربرد دارد. به کارگیری فراصوت توان پایین در محیط‌های کشت میکروبی، موجب کاهش یا از بین رفتن بقای زیستی نمی‌شود [۷]. میکروارگانیسم‌های مختلف به طور متفاوتی می‌توانند نسبت به شوک فراصوت از خود حساسیت نشان دهند ولی در بسیاری از موارد، امواج اولتراسونیک، باعث افزایش نرخ رشد و تولید میکروارگانیسم‌ها می‌شوند. بنابراین، تیمار با فراصوت می‌تواند بعنوان تکنیک تجاری مناسب در فرآیندهای زیستی مورد استفاده قرار گیرد. تیمار اولتراسونیک با افزایش نفوذپذیری غشای دیواره‌ی سلولی، کاهش انتخاب‌پذیری، محبوس کردن گرما، تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل و نازک کردن غشای دیواره‌ی سلولی بر میکروارگانیسم‌ها تأثیر می‌گذارد. تحقیقات نشان داده است که ترموسونیکیشن بعنوان روشی ترکیبی از امواج اولتراسونیک و حرارت، می‌تواند جمعیت میکروارگانیسم‌ها را بهبود بخشد [۸ و ۹]. تحقیقات نشان داده‌اند لاکتوباسیلوس‌های کشته شده با اسید و حرارت در مقایسه با سلول‌های زنده، مایکوتوکسین‌ها را با کارایی بیشتری از بین می‌برند [۷]. عابدی و همکاران، ۲۰۲۱

نشان دادند که باکتری‌های لاکتوباسیلوس تیمار شده با تیمار همزمان اولتراسونیک و حرارت بیشترین میزان جذب سموم آفلاتوکسین را داشتند [۱۰]. مطالعات زیادی در خصوص تیمار میکروارگانسیم‌ها با اسید و حرارت و تأثیر آن بر جذب سموم انجام شده است ولی مطالعات در خصوص بررسی سینتیک جذب سم آفلاتوکسین توسط مخمرهای تیمار شده با اسید و اولتراسونیک در دماها و زمان‌های مختلف در خمیر نان سنگک و همچنین مقایسه‌ی پتانسیل جذب سموم توسط مخمرهای زنده و غیرزنده محدود است.

این مطالعه به منظور بررسی مدل سینتیکی جذب آفلاتوکسین B₁ توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه در دماهای ۲۴، ۲۸ و ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد و زمان‌های ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت و مقایسه توانایی سلول‌های زنده و غیرزنده (تیمار شده با اسید و اولتراسونیک) در کاهش سم در خمیر نان سنگک انجام شد.

۲-۴- تیمار اسیدی مخمر ساکارومایسس سرویزیه

به منظور تیمار اسیدی، ۹۱ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۲ مولار به سلول‌های مخمر افزوده و به مدت ۹ ساعت در دمای ۵۲ درجه‌ی سانتیگراد همراه با تکان ملایم نگهداری شد؛ سپس سلول‌ها دو مرتبه با نمک بافری فسفات 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 استریل مخلوط و بر اساس استاندارد ۰/۵ مکفرلند سوسپانسیون اصلی تهیه و از آن سوسپانسیون مخمر اسیدی آماده شد [۷].

۲-۵- تیمار اولتراسونیک مخمر ساکارومایسس

سرویزیه

به منظور انجام تیمار اولتراسونیک بر روی مخمرها و ایجاد سلول‌های کشته شده، تیمار اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه با توان ۲۰۰ وات و ۲۴ کیلوهرتز، با دستگاه UP100H، ساخت آلمان، انجام شد [۹].

۲-۶- تهیه‌ی محلول استاندارد آفلاتوکسین B₁

به منظور تهیه‌ی غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آفلاتوکسین B₁، پودر سم آفلاتوکسین به همراه استونیتریل/ بنزن (۷:۹۳)

نشان دادند که باکتری‌های لاکتوباسیلوس تیمار شده با تیمار همزمان اولتراسونیک و حرارت بیشترین میزان جذب سموم آفلاتوکسین را داشتند [۱۰]. مطالعات زیادی در خصوص تیمار میکروارگانسیم‌ها با اسید و حرارت و تأثیر آن بر جذب سموم انجام شده است ولی مطالعات در خصوص بررسی سینتیک جذب سم آفلاتوکسین توسط مخمرهای تیمار شده با اسید و اولتراسونیک در دماها و زمان‌های مختلف در خمیر نان سنگک و همچنین مقایسه‌ی پتانسیل جذب سموم توسط مخمرهای زنده و غیرزنده محدود است.

این مطالعه به منظور بررسی مدل سینتیکی جذب آفلاتوکسین B₁ توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه در دماهای ۲۴، ۲۸ و ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد و زمان‌های ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت و مقایسه توانایی سلول‌های زنده و غیرزنده (تیمار شده با اسید و اولتراسونیک) در کاهش سم در خمیر نان سنگک انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

آرد گندم کامل (مخصوص نان سنگک با درصد استخراج ۹۵٪) که از نانوائی سطح شهر فسا تهیه شد، آب، مخمر ساکارومایسس سرویزیه (PTCC 517) (تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بخش کلکسیون میکروبی) و سم آفلاتوکسین B₁، در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- تهیه‌ی خمیر نان سنگک

به منظور تهیه‌ی ۱۰۰ گرم خمیر نان سنگک، ۷۵ گرم آرد گندم کامل (مخصوص نان سنگک) با ۷۵ میلی‌لیتر آب مخلوط شد. خمیر به منظور تلقیح مخمر زنده، مخمر تیمار شده با اولتراسونیک و مخمر تیمار شده با اسید به قسمت‌های مختلف تقسیم شد و نمونه‌ی بدون مخمر به عنوان نمونه‌ی شاهد در نظر گرفته شد. نمونه‌های مورد آزمایش شامل خمیرهای حاوی ۱۰^۴ cfu/g مخمر زنده، ۱۰^۴ cfu/g مخمر تیمار شده با اولتراسونیک و ۱۰^۴ cfu/g مخمر تیمار شده با اسید بودند.

۲-۳- تهیه و آماده‌سازی مخمر

۶۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۲۰ میلی لیتر از عصاره‌ی بدست آمده در ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات (PBS, pH 7.4) رقیق شد. نمونه‌های استخراج شده از ستون‌های ایمونوآفینیتی عبور داده شدند (Ochraprep, R- Biopharm). میزان آفاتوکسین B₁ توسط روش Pakfetrat و همکاران، ۲۰۱۹ [۱] تعیین و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نهایی به دستگاه HPLC تزریق شد. فاز متحرک شامل آب/استونیتریل/متانول (۶۰:۳۰:۱۰، حجمی/حجمی/حجمی) حاوی ۳۵۰ میکرولیتر از ۴ مول بر لیتر اسید نیتریک و ۱۲۰ میلی گرم KBr با جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه و شناسایی توسط فلورسنس در طول موج ۴۳۵/۳۶۵ نانومتر جذب/انتشار انجام شد. LOD ۱ میکروگرم/کیلوگرم و LOQ ۱۰/۳۵ میکروگرم/کیلوگرم و میزان بازیابی ۹۸٫۵٪ بود [۹].

مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها و انجام آزمایش‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است.

حجمی/حجمی) در کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) مخلوط شد. با حرارت دادن در حمام آب، بنزن/استونیتریل تبخیر می‌شود و محلول آبی ایجاد می‌شود (۸۰ درجه سانتیگراد/۱۰ دقیقه). محلول استاندارد با حل کردن آب/استونیتریل/متانول (۶:۲:۳، حجمی/حجمی/حجمی) در ۱۰ نانوگرم/میلی لیتر بعنوان غلظت نهایی بدست آمد. حلال آلی در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب (Memmert مدل WNB 14، ساخت کشور آلمان) تبخیر شد [۱۲].

۷-۲- آنالیز HPLC

بررسی اتصال مایکوتوکسین به مخمر بر اساس روش Armando و همکاران، ۲۰۱۲ [۴] با کمی اصلاحات انجام شد. ۵ گرم نمک NaCl به ۲۵ گرم خمیر اضافه و با ۲۰۰ میلی لیتر متانول/آب/هگزان (۸:۲:۱، حجمی/حجمی/حجمی) در Ultra-Turrax به مدت ۱۰ دقیقه هموژن شد. سپس نمونه‌ها در سانتریفیوژ (اپندورف، مدل ۲۲۳۳۱AG، ساخت آلمان) در دور

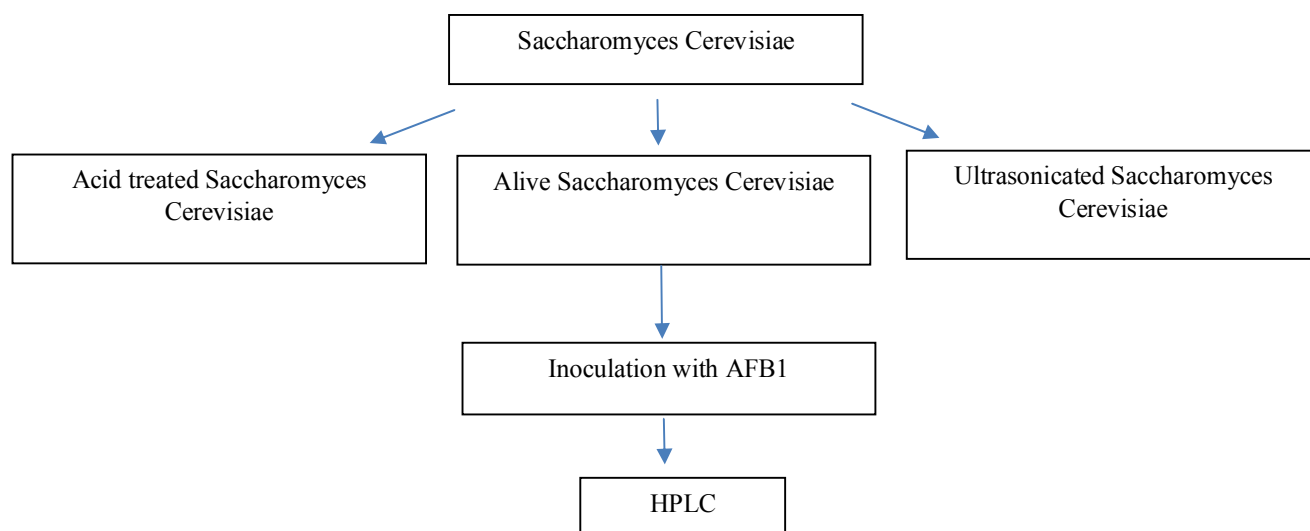


Fig 1 Schematic of the treatments.

همکاران، ۲۰۲۱ و توسط دستگاه اسپکتروسکوپی CD استفاده شد [۱۰]. نتایج اندازه‌گیری در طول موج ۲۶۰-۲۰۰ نانومتر و با استفاده از اسپکتروپولاریومتر AVIV (مدل ۲۱۵، ساخت آمریکا) با طول نمونه (۰/۱ سانتیمتر) ثبت شد. تمام آزمون‌های CD در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد انجام شد. طیف‌ها با فواصل ۱

۸-۲- آزمون سیر کولاردیکرویزم^۱

به منظور بررسی تأثیر تیمار اسیدی و اولتراسونیک بر تغییرات ساختار درجه‌ی دوم دیواره‌ی سلولی مخمر از روش Abedi و

1. Circular dichroism (CD)

داشته باشد، نمودار شامل خط صافی می‌باشد که از مبدأ مختصات عبور می‌کند.

۲-۱۰- آنالیز آماری

این پژوهش بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای لحاظ شده شامل زمان‌ها و دماهای مختلف انکوباسیون مخمر زنده، مخمر تیمار شده با اولتراسونیک و اسید در خمیر نان انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTAT مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و بر اساس آن، نمودارها بوسیله نرم افزار EXCEL رسم گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تأثیر نوع پیش تیمار بر جذب آفاتوکسین

در این تحقیق، تیمار اسیدی و اولتراسونیک به منظور کشتن مخمر مورد استفاده قرار گرفت. همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، اضافه کردن مخمر (زنده، تیمار شده با اسید و اولتراسونیک) به خمیر آلوده به آفاتوکسین باعث کاهش میزان آفاتوکسین آزاد شده است. همچنین بین کاهش میزان توکسین در خمیرهای تیمار شده با سوسپانسیون مخمر اسیدی، اولتراسونیک، مخمر زنده و نمونه کنترل (فاقد مخمر) تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$). همانطور که در جدول مشاهده می‌شود، بطور کلی میزان کاهش سم توسط تیمارهای مختلف به قرار زیر است: مخمرهای تیمار شده با اولتراسونیک < مخمرهای تیمار شده با اسید < مخمرهای زنده < نمونه‌ی کنترل. تحقیقات همچنین نشان دادند که مخمرها در بین همه‌ی میکروارگانسیم‌ها بیشترین تأثیر را در کاهش سموم آفاتوکسین داشتند و این پدیده را به بیشتر بودن جایگاه‌های اتصال به دیواره‌ی سلولی و ثابت تعادل^۵ نسبت دادند [۱۴].

بر اساس تحقیق Shetty و همکاران (۲۰۰۷)، در سلول‌های تیمار شده با اسیدکلریدریک ۲ مولار به مدت یک ساعت بیش از ۲ برابر افزایش در اتصال توکسین مشاهده شد [۷]. در مطالعه Rahaei و همکاران، ۲۰۱۱ مشاهده شد که تیمارگونه‌های مخمر با اسیدکلریدریک ۲ مولار برای ۹۰ دقیقه در دمای اتاق، قدرت اتصال آفاتوکسین را به حدود ۶۰ درصد می‌رساند [۱۵].

نانومتر و با سرعت اسکن ۲۰ نانومتر/دقیقه تعیین شدند. هر طیف میانگین ۲ اسکن بود و نوزده داده‌ها توسط نرم افزار AVIV ۲۱۵ (cdmn) گرفته شد.

۲-۹- سینتیک جذب آفاتوکسین B_1

سینتیک جذب توسط مکانیزم‌های مستقل مختلفی کنترل می‌شود. به منظور بررسی مکانیزم کنترل‌کننده جذب سم آفاتوکسین توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه، و تیمار شده آن با اسید و اولتراسونیک، مدل‌های سینتیک مختلف برای داده‌های آزمایشگاهی بکار گرفته شد. با در نظر گرفتن مدل شبه درجه یک^۱، نرخ جذب می‌تواند توسط معادله زیر مدل شود [۱۳]:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1 t}{2.303} \quad (1)$$

که q_e و q_t ، به ترتیب مقدار ماده جذب شده در واحد جرم جاذب ($\mu\text{g/g}$) در زمان تعادل و در هر زمان t ، k_1 (h^{-1}) ثابت نرخ جذب می‌باشد.

معادله نرخ سینتیک شبه درجه دو^۲ به صورت زیر می‌باشد [۱۳]:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (2)$$

که k_2 ($\text{g}/\mu\text{g h}$) ثابت نرخ شبه درجه دو می‌باشد. معادله الویج^۳ نیز برای توصیف سینتیک مرتبه دو با فرض اینکه سطوح جامد واقعی از نظر انرژی ناهمگن هستند استفاده می‌شود. شکل خطی این معادله بصورت زیر است [۱۳]:

$$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha \beta) + \frac{1}{\beta} \ln t \quad (3)$$

که α و β به عنوان ثابت‌های الویج شناخته شده‌اند که نشان دهنده نرخ جذب اولیه و ثابت واجذب می‌باشند.

اگر احتمال نفوذ ماده جذب شونده به درون حفرات جاذب وجود داشته باشد، مدل دیفیوژن درون ذره‌ای^۴ می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد [۱۳]:

$$q_t = k_{id} t^{0.5} + C \quad (4)$$

که k_{id} ثابت نرخ دیفیوژن درون ذره‌ای و C مقدار ثابت می‌باشد. زمانیکه نفوذ درون ذره‌ای نقش مهمی در کنترل سینتیک جذب

1. Pseudo first-order model
2. Pseudo second-order model
3. Elovich model
4. Intra-particle diffusion model

5. Equilibrium constant

Table 1 The amount of released aflatoxin in samples at different times and temperatures.

Treatments	Temperature	Aflatoxin ($\mu\text{g/kg}$)					
		Incubation period					
		8 h		16 h		24 h	
Control (without Saccharomyces)	24 °C	8.83	$\pm 0.09\text{aA}$	8.52	$\pm 0.14\text{aB}$	7.79	$\pm 0.11\text{aC}$
	28 °C	7.85	$\pm 0.12\text{bcA}$	7.64	$\pm 0.10\text{bA}$	7.24	$\pm 0.04\text{bB}$
	32 °C	7.52	$\pm 0.22\text{cA}$	7.16	$\pm 0.09\text{cB}$	7.08	$\pm 0.15\text{bB}$
Viable Saccharomyces	24 °C	7.90	$\pm 0.13\text{bA}$	7.39	$\pm 0.17\text{cB}$	6.49	$\pm 0.26\text{cC}$
	28 °C	6.48	$\pm 0.09\text{fA}$	5.61	$\pm 0.14\text{fB}$	4.44	$\pm 0.31\text{hC}$
	32 °C	7.26	$\pm 0.07\text{dA}$	6.76	$\pm 0.09\text{dB}$	5.53	$\pm 0.25\text{eC}$
Acid treated Saccharomyces	24 °C	7.92	$\pm 0.20\text{bA}$	6.89	$\pm 0.15\text{dB}$	5.90	$\pm 0.13\text{dC}$
	28 °C	6.89	$\pm 0.14\text{eA}$	5.63	$\pm 0.19\text{fB}$	4.89	$\pm 0.14\text{gC}$
	32 °C	5.03	$\pm 0.11\text{gA}$	4.05	$\pm 0.07\text{hB}$	2.86	$\pm 0.11\text{jC}$
Ultrasound treated Saccharomyces	24 °C	6.98	$\pm 0.09\text{eA}$	6.36	$\pm 0.09\text{eB}$	5.16	$\pm 0.10\text{fC}$
	28 °C	4.90	$\pm 0.12\text{gA}$	4.49	$\pm 0.15\text{gB}$	3.89	$\pm 0.13\text{iC}$
	32 °C	2.77	$\pm 0.12\text{hA}$	2.36	$\pm 0.20\text{iB}$	1.62	$\pm 0.22\text{kC}$

Within the same column, mean values with different small letters are significantly different ($p < 0.05$).

Within the same row, mean values with different capital letters are significantly different ($p < 0.05$).

شرایط اسیدی مقداری از اتصالات بین توکسین و مخمر، درون سلولی باشد [۱۱ و ۱۵].

بطور کلی، دیواره سلولی ساکارومایس سرویزیه که شامل شبکه‌ای از β -glucan 1,3- تا زنجیره‌ی جانبی 1,6- β -glucan است و به منوپروتئین‌های گلیکوزیلات شده متصل شده‌است، به همراه مانان و گلوکان در دیواره‌ی سلولی مخمر، سطح فعال و وسیعی را برای جذب مواد ایجاد می‌کند [۳-۶]. پروتئین‌ها و گلوکان‌ها تعداد زیادی سایت فعال برای ایجاد پیوندهای هیدروژنی، یونی یا هیدروفوبیک ایجاد می‌کنند. همچنین با افزایش غلظت سوسپانسیون مخمر، تعداد سلول‌ها و جایگاه‌های گیرنده توکسین بیشتر شده و در نتیجه قابلیت جذب توکسین از محیط بیشتر می‌شود [۱۴]. تحقیقات دیگر نشان داد که گلوکومانان‌های استریفیه شده‌ی موجود در دیواره‌ی سلولی مخمر محل اتصال به سموم آفلاتوکسین و اکراتوکسین می‌باشد [۱۵]. برخی تحقیقات نشان دادند که کاهش آفلاتوکسین می‌تواند در اثر تبدیل آفلاتوکسین به ترکیبات با سمیت کمتر باشد که در اثر آزاد شدن آنزیم‌های تجزیه کننده، اسید لاکتیک، اتانول و دی اکسید کربن باشد [۱۴].

امواج اولتراسونیک باعث انفجار حباب‌های حفره‌ای و ایجاد اغتشاش، اعمال نیروی برشی بالا و افزایش چشمگیر دما می‌شود. این پدیده‌ها منجر به تخریب ساختار پپتیدوگلیکان‌ها و پلی‌ساکاریدهای دیواره‌ی سلولی و دناتور شدن پروتئین‌ها

این محققان نشان دادند که شرایط اسیدی از طریق تأثیر بر روی پلی‌ساکاریدها و تبدیل آن‌ها به منومرها و شکسته شدن به آلدئیدها باعث تأثیر بر عملکرد مخمرها می‌شوند، بطوریکه آلدئیدهای آزاد شده باعث افزایش جایگاه‌های جذب توکسین در سطح سلول مخمر می‌شود. مقایسه‌ی تأثیر مخمر زنده و تیمار شده با اسید و حرارت در کاهش سیتترینین در تحقیق Davoodi Moghadam و همکاران، ۲۰۲۱ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که هر دو تیمار به طور قابل توجهی توانستند میزان سیتترینین در محیط را کاهش دهند، به طوریکه میزان سیتترینین از $4/49$ میلی‌گرم بر لیتر در نمونه‌ی کنترل (بدون افزودن مخمر) به $0/1$ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار حرارتی و $0/07$ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار اسیدی از سوسپانسیون مخمری کاهش یافت [۱۶]. نتایج به دست آمده از بررسی تأثیر مخمر زنده در کاهش سیتترینین تولیدشده توسط کپک موناسکوس نشان داد، مخمر زنده به طور معنی‌داری قادر به حذف سیتترینین بود، اما تأثیر آن بسیار کمتر از حالت تیمار شده بود. [۸]. براساس مطالعه‌های انجام شده مشخص شده است که حذف مایکوتوکسین از طریق اتصال به دیواره‌ی سلولی است، به همین دلیل مرگ سلول مخمر نه تنها قابلیت توانایی آن در جذب توکسین را کاهش نمی‌دهد، بلکه تیمارهای اسیدی و حرارتی باعث افزایش جذب مایکوتوکسین‌ها توسط این مخمر می‌شود. براساس پژوهش‌های پیشین، احتمال می‌رود که در

کنترل فاقد مخمر، میزان جذب آفلاتوکسین توسط مخمر زنده، مخمر تیمار شده با اسید و مخمر تیمار شده با اولتراسونیک در دماها و زمانهای مختلف محاسبه شد. نتایج در شکل ۳ ارائه شده است. با توجه به شکل ۳-الف، مخمر زنده، در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد که دمای بهینه‌ی رشد مخمر است، بیشترین میزان سم را بعد از ۲۴ ساعت به خود جذب کرده است ($10.37 \mu\text{g/g}$)، در حالیکه در مخمرهای تیمار شده با اسید (شکل ۳-ب) و تیمار شده با اولتراسونیک (شکل ۳-ج)، با افزایش دما از ۲۴ به ۳۲ درجه سانتیگراد، میزان جذب سم نیز افزایش یافته است و بیشترین جذب در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد و بعد از ۲۴ ساعت اتفاق افتاده است (به ترتیب $15.65 \mu\text{g/g}$ و $20.22 \mu\text{g/g}$). از طرفی، همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود با گذشت زمان از ۸ تا ۲۴ ساعت، میزان جذب سم آفلاتوکسین توسط نمونه‌های مختلف، در دماهای مختلف افزایش یافته است، به گونه‌ای که بیشترین میزان جذب سم مربوط به مخمر تیمار شده با اولتراسونیک در مدت ۲۴ ساعت بود ($20.22 \mu\text{g/g}$). بنابراین افزایش زمان اینکوباسیون از نظر آماری باعث افزایش معنی‌داری در میزان آفلاتوکسین جذب شده نسبت به زمان شروع اینکوباسیون (صفر ساعت) شد. به استثنای نمونه مخمر زنده در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد، جذب سم توسط همه‌ی نمونه‌ها، پدیده‌ی سریعی بوده است، بدلیل اینکه تنها با گذشت ۸ ساعت از زمان اینکوباسیون، افزایش در میزان سموم جذب شده در نمونه‌ها مشاهده شد. Shetty و همکاران، ۲۰۰۷ نشان دادند که اتصال آفلاتوکسین پدیده سریعی بوده بطوریکه در ۳۰ دقیقه ابتدایی اینکوباسیون، مخمر، ۳۲ درصد از آفلاتوکسین B_1 را باند کرد [۷]. همچنین در تحقیق Rahaei و همکاران، ۲۰۱۰ بر اساس اندازه‌گیری آفلاتوکسین نمونه‌های پسته در زمان‌های مختلف پس از تثبیت سلول‌های مخمر بر آن، مشاهده شد که متصل شدن آفلاتوکسین به دیواره سلولی مخمر فرآیند نسبتاً سریعی است که در زمان اندکی (حدود ۳ ساعت) بعد از تثبیت مخمر بر پسته آلوده حداکثر سم آفلاتوکسین جذب شد [۱۵]. یافته‌های این قسمت با نتایج Shetty و همکاران، ۲۰۰۷ و Rahaei و همکاران، ۲۰۱۰ مطابقت دارد [۷ و ۱۵].

می‌شود [۱۱]. در اثر اعمال اولتراسونیک، دیواره‌ی ضخیم سلولی در مخمر، نازک می‌شود و اتصالات عرضی در دیواره کاهش می‌یابد و قطر منافذ دیواره‌ی سلولی افزایش می‌یابد. تخریب ساختار دیواره‌ی سلولی مخمر باعث باز شدن بیشتر ساختار پروتئین‌ها می‌شود و با ایجاد تعداد زیادی مناطق هیدروفوبیک، می‌تواند به سم آفلاتوکسین فرصت بیشتری برای اتصال به دیواره‌ی سلولی بدهد [۱۰].

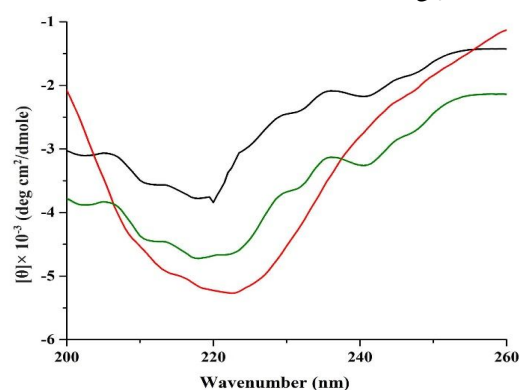


Fig 2 Circular dichroism (CD) of (a) viable *Saccharomyces*, (b) acid treated *Saccharomyces*, (c) ultrasonicated *Saccharomyces*.

همچنین در اثر ایجاد کایتاسیون در تیمار اولتراسونیک رادیکال‌های آزاد OH و H ایجاد می‌شوند که منجر به انجام واکنش‌های شیمیایی در دیواره‌ی سلولی میکروارگانیسم می‌شود و اتصال سم به دیواره‌ی سلولی را تسهیل می‌کند [۹]. همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، ساختار آلفاهلیکس، بتاترن و بتاشیت در مخمرهای زنده، تیمار شده با اولتراسونیک و اسید با یکدیگر متفاوت هستند که نشان‌دهنده‌ی تأثیر تیمارهای اسیدی و اولتراسونیک بر ساختار پروتئینی دیواره‌ی سلولی مخمر می‌باشد. Abedi و همکاران، ۲۰۲۱ نشان دادند که با اعمال تیمار حرارت-اولتراسونیک بر لاکتوباسیلوس‌ها، ساختار آلفاهلیکس و بتاترن افزایش و ساختار بتاشیت کاهش می‌یابد که همین امر منجر به تغییر هیدروفوبیسیته‌ی سطح دیواره‌ی سلولی باکتری و افزایش جذب سم می‌شود [۱۰].

۳-۲- تأثیر دما و زمان بر جذب آفلاتوکسین

با در نظر گرفتن مقدار آفلاتوکسین جذب شده توسط نمونه

مدل‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی نرخ واقعی جذب توسط عوامل فوق، نمونه کنترل (فاقد مخمر) نیز در زمان‌ها و دماهای مختلف، مشابه نمونه‌های حاوی مخمر و تیمار شده آن مورد بررسی قرار گرفت. پارامترهای محاسبه شده برای مدل‌های مختلف برای نمونه‌های آزمایش شده، در جدول ۲ ارائه شده‌است. با توجه به جدول، در مورد مخمر زنده و مخمر تیمار شده با اسید، مقدار R^2 برای مدل شبه درجه یک، در بیشتر دماها بزرگتر از مدل شبه درجه دو است، از طرفی مقدار محاسبه شده q_e دارای تطابق بیشتری با مقادیر آزمایشگاهی می‌باشد. بنابراین، می‌توان گفت که جذب آفلاتوکسین توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه، و تیمار شده آن با اسید توسط مدل شبه درجه یک تخمین زده می‌شود. ولی در مورد مخمر تیمار شده با اولتراسونیک، مقادیر R^2 برای مدل شبه درجه دو بزرگتر از مدل شبه درجه یک می‌باشد، همچنین مقادیر آزمایشگاهی q_e دارای تطابق بهتری با داده‌های محاسبه شده از مدل درجه دو می‌باشد. بنابراین جذب آفلاتوکسین توسط مخمر تیمار شده با اولتراسونیک توسط مدل شبه درجه دو می‌تواند پیش‌بینی شود. در مورد مخمر زنده، بیشترین مقدار q_e مربوط به دمای ۲۸ درجه سانتیگراد می‌باشد، در صورتیکه در دو حالت مخمر تیمار شده با اسید و اولتراسونیک، با افزایش دما، q_e افزایش می‌یابد. در نتیجه، بیشترین ظرفیت جذب در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد مشاهده شد.

مدل الویچ نیز دارای تطابق مناسبی با داده‌های آزمایشگاهی می‌باشد، به غیر از دو مورد جذب توسط مخمر زنده و مخمر تیمار شده با اولتراسونیک در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد، در بقیه موارد R^2 بزرگتر از ۰/۹۰ می‌باشد.

معمولترین روش مورد استفاده برای پیش‌بینی مرحله کنترل‌کننده نرخ جذب، مدل دیفیوژن درون ذره‌ای است. شکل ۴-الف نمودار q_t بر حسب $t^{0.5}$ برای جذب آفلاتوکسین توسط مخمر زنده در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد را نشان می‌دهد. دو ناحیه مشخص نرخ در نمودار نشان دهنده حداقل دو مرحله در فرآیند جذب سم آفلاتوکسین می‌باشد. احتمالاً در مرحله اول، مولکول‌های آفلاتوکسین به سایت‌های جذب فعال در سطح جذب متصل می‌شوند، در حالیکه مرحله دوم توسط نرخ نفوذ درون ذره ای کنترل می‌شود. با اینحال، دیفیوژن درون ذره‌ای تنها

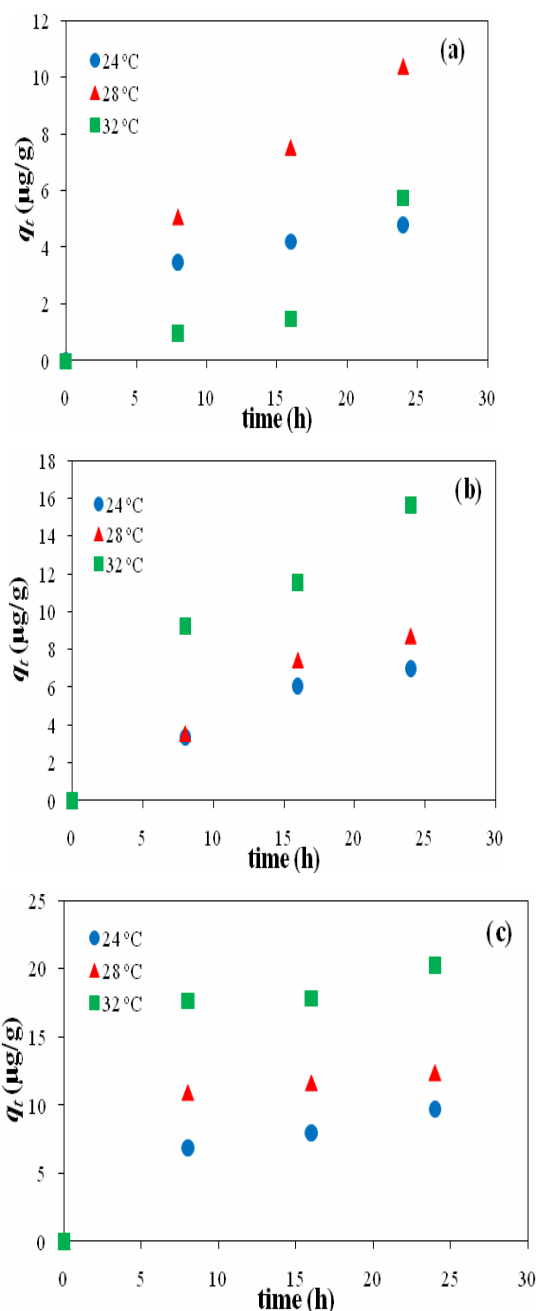


Fig 3 Effect of temperature and time on aflatoxin adsorbed by (a) viable *Saccharomyces*, (b) acid treated *Saccharomyces*, and (c) ultrasonicated *Saccharomyces*.

۳-۳- سینتیک جذب آفلاتوکسین B_1

سینتیک مکانیزم جذب آفلاتوکسین توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه، و تیمار شده آن با اسید و اولتراسونیک با استفاده از

منحنی دوم از مبدأ مختصات عبور نمی‌کند، در نتیجه دیفیوژن درون ذره‌ای تنها مرحله محدود کننده جذب نمی‌باشد و مکانیزم‌های دیگر نیز در نرخ جذب مشارکت دارند. نمودار حاصل برای مخمر تیمار شده با اولتراسونیک در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد در شکل-ب نشان داده شده است. برای مخمر تیمار شده با اولتراسونیک نیز در دمای ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد، نمودار تطابق مناسبی با داده‌های آزمایشگاهی ندارد.

مکانیزم محدود کننده نرخ جذب نمی‌باشد زیرا خط مستقیم دوم از مبدأ مختصات عبور نکرده است. با توجه به مقدار C در جدول ۲، جذب سم در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد نیز دارای دو مرحله مشخص می‌باشد. در دمای ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد، نمودار تطابق مناسبی با داده‌های آزمایشگاهی ندارد. تطابق مدل دیفیوژن درون ذره‌ای با داده‌های آزمایشگاهی جذب توسط مخمر تیمار شده با اسید و اولتراسونیک نیز نشان‌دهنده دو ناحیه مجزا می‌باشد (مقادیر C در جدول ۲). در این حالت نیز

Table 2 Parameters of the different kinetic models for aflatoxin adsorption.

Kinetic models	Parameters	Viable <i>Saccharomyces</i>			Acid treated <i>Saccharomyces</i>			Ultrasound treated <i>Saccharomyces</i>		
		Incubation temperature			Incubation temperature			Incubation temperature		
		24 °C	28 °C	32 °C	24 °C	28 °C	32 °C	24 °C	28 °C	32 °C
Pseudo first-order	k_1 (h^{-1})	0.129	0.081	0.0189	0.126	0.120	0.084	0.107	0.175	0.132
	q_e Cal. ($\mu g/g$)	4.416	10.280	5.669	7.820	10.048	14.524	8.612	9.692	14.581
	q_e Exp. ($\mu g/g$)	4.790	10.370	5.741	6.975	8.691	15.654	9.728	12.407	20.222
	R^2	0.982	0.999	0.979	0.963	0.936	0.964	0.943	0.915	0.778
Pseudo second-order	k_2 ($g/(\mu g h)$)	0.0278	0.0017	0.0052	0.0025	0.0005	0.0029	0.0114	0.0398	0.0183
	q_e Cal. ($\mu g/g$)	5.935	21.692	4.082	14.993	31.250	23.981	12.300	13.298	21.834
	q_e Exp. ($\mu g/g$)	4.790	10.370	5.741	6.975	8.691	15.654	9.728	12.407	20.222
	R^2	0.995	0.925	0.356	0.928	0.617	0.905	0.972	0.999	0.985
Elovich model	α ($\mu g/g$)	2.630	13.267	28.557	9.483	17.560	9.097	4.555	741.72	774.11
	β ($g h/\mu g$)	0.836	0.213	0.254	0.299	0.210	0.180	0.400	0.774	0.462
	R^2	0.991	0.963	0.703	0.986	0.982	0.906	0.924	0.972	0.675
Intra-particle diffusion	k_{id} ($\mu g/(g h^{1/2})$)	0.643	2.535	2.204	1.768	2.521	3.039	1.362	0.698	1.216
	C ($\mu g/g$)	1.631	2.254	5.873	1.448	3.299	0.27	2.866	8.940	13.783
	R^2	0.999	0.986	0.768	0.963	0.958	0.944	0.959	0.991	0.743

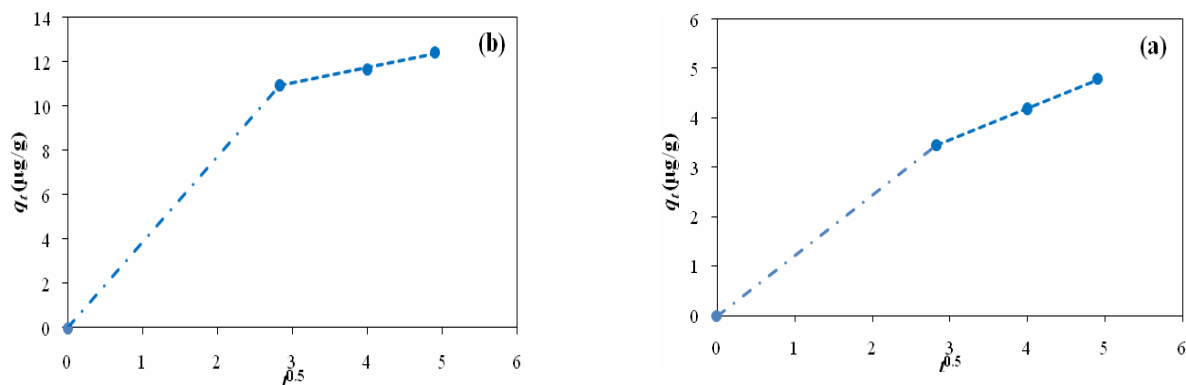


Fig 4 Plot of the intra-particle diffusion model for aflatoxin adsorption by (a) viable *Saccharomyces* at 24 °C, and (b) ultrasonicated *Saccharomyces* at 28 °C.

derived food products. Food Microbiology, 27(2), 187–198.

- [3] Shetty, P., Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. Trends in Food Science and Technology, 17:48–55.
- [4] Armando, M. R., Pizzolitto, R. P., Dogi, C. A., Cristofolini, A., Merkis, C., Poloni, V., Dalcerio, A. M., & Cavaglieri, L. R. (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.
- [5] Prado G, Madeira JE, Morais VA, et al (2011). Reduction of aflatoxin B1 in stored peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Food Protection; 74:1003-6.
- [6] EL-Nezami, H., Kankaanpau, P. Salminen, S. And Ahokas, J. (1998a). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. Food and Chemical Toxicology. 36:321-326.
- [7] Shetty, P.H., Hald, H., Jespersen, L. (2007). Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. International Journal of Food Microbiology. 113: 41–46.
- [8] Ojha, K. S., Mason, T. J., O'Donnell, C. P., Kerry, J. P., & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. Ultrasonics Sonochemistry, 34, 410–417.
- [9] Majid, I., Nayik, G. A., & Nanda, V. (2015). Ultrasonication and food technology: A review. Cogent Food & Agriculture, 1(1), Article 1071022.
- [10] Abedi, E., Pourmohammadi, K., Mousavi Fard, M., Sayadi, M. (2021). Comparison between surface hydrophobicity of heated and thermosonicated cells to detoxify aflatoxin B1 by co-culture *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* in sourdough: Modeling studies. LWT,(154), 112616.
- [11] Karazhiyan, H., MehrabanSangatash, M., Karazhyan, R., Mehrzad, A., & Haghghi, E. (2016). Ability of different treatments of *Saccharomyces cerevisiae* to surface bind

۴- نتیجه گیری

اضافه کردن مخمر ساکارومایسس سرویزیه به خمیر نان آلوده به سم آفلاتوکسین، باعث کاهش قابل توجهی در میزان آفلاتوکسین B₁ شد و مخمرهای تیمار شده با اولتراسونیک و اسید در مقایسه با مخمر زنده، کاهش بیشتری در میزان آفلاتوکسین در خمیر ایجاد کردند. به عبارت دیگر، بیشترین میزان جذب سم آفلاتوکسین B₁ مربوط به مخمرهای تیمار شده با امواج اولتراسونیک و کمترین میزان جذب مربوط به نمونه‌های مخمر زنده بود. در مخمرهای زنده، بیشترین میزان جذب سم در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت حاصل شد. در حالیکه مخمرهای کشته شده با اولتراسونیک و اسید، بیشترین میزان اتصال به سم را در دمای ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد و زمان ۲۴ ساعت از خود نشان دادند. بعلاوه فرآیند اتصال آفلاتوکسین به مخمر نسبتاً سریع بود و با گذشت تنها ۸ ساعت از زمان انکوباسیون کاهش سم مشاهده شد. با بکاربردن مدل‌های سینتیکی جذب برای داده‌های آزمایشگاهی، مشاهده شد که جذب آفلاتوکسین توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه زنده و مخمر تیمار شده با اسید، از نرخ واکنش شبه درجه یک پیروی می‌کنند، در حالیکه داده‌های جذب توسط مخمر تیمار شده با اولتراسونیک دارای تطابق بهتری با مدل شبه درجه دو می‌باشد. علاوه بر این، مکانیزم‌های دیفیوژن درون ذره‌ای و دیفیوژن سطحی نیز دارای نقش مهمی در جذب سم توسط مخمر زنده و تیمار شده آن با اسید و اولتراسونیک می‌باشند. پیشنهاد می‌شود، به منظور محافظت مواد غذایی از آلوده شدن به سموم کشنده‌ای مانند آفلاتوکسین، مخمرهای تیمار شده با اولتراسونیک را بصورت انکپسوله شده با مواد خوراکی، به فرآورده‌های غذایی اضافه نمود.

۵- منابع

- [1] Pakfetrat, S., Amiri, S., Radi, M., Abedi, E., & Torri, L. (2019). Reduction of phytic acid, aflatoxins and other mycotoxins in wheat during germination. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(10), 4695–4701.
- [2] Duarte, S. C., Pena, A., & Lino, C. M. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal

- theoretical model. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2148–2154.
- [15] Rahaie, S., Razvi, S.H. and Jomeh, E.Z. (2010). The ability of *Saccharomyces cerevisiae* strain in aflatoxin reduction in pistachio nuts. *Journal of Food Science and Technology*, 7: 81-88. [In Persian].
- [16] Davoodi Moghadam, H., Shahidi, F., TabatabaeeYazdi, F., Sarabi, M., Eshaghi, Z. (2021). Investigation of the effect of live and acid-treated *Saccharomyces cerevisiae* on citrinin and pigments of *Monascuspurpureus*. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Industry*, Volume 1, Number 9, Pages 522-562.
- aflatoxin M1 in yoghurt. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(6), 1489-1498.
- [12] Fazeli, M. R., Hajimohammadali, M., Moshkani, A., Samadi, N., Jamalifar, H., Khoshayand, M. R., Vaghari, E., & Pouragahi, S. (2009). Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 72(1), 189–192.
- [13] Wang, J., & Guo, X. (2020). Adsorption kinetic models: Physical meanings, applications, and solving methods. *Journal of Hazardous Materials*, 390, 122156.
- [14] 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



Evaluation of kinetic model of aflatoxin B₁ adsorption by *Saccharomyces cerevisiae* treated with acid and ultrasonic in Sangak bread dough

Sayadi, M.¹, Pourmohammadi, K.^{2*}, Maleki, Sh.³, Abedi, E.²

1. Department of Food Safety and Hygiene, Faculty of Health, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa University Fasa, Iran.

3. Department of Civil Engineering, Faculty of Engineering, Fasa University, Fasa, Iran.

ABSTRACT

Because food contamination with mycotoxins is a serious problem, in this study, the ability of aflatoxin B₁ to bind to the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall was investigated to reduce Sangak bread dough toxicity. For this purpose, aflatoxin B₁ at a concentration of 10 µg/kg inoculated to the dough containing 0.27 g of viable *saccharomyces cerevisiae*, acid treated *saccharomyces cerevisiae*, and ultrasonicated *saccharomyces cerevisiae*. Toxin adsorption kinetics were investigated at 24, 28 and 32 °C and 8, 16 and 24 h incubation. The trend for toxin adsorption was as follows: ultrasonicated yeast > acidic yeast > viable yeast. With increasing the incubation temperature and time, toxin adsorption increased in acid treated and ultrasonicated *Saccharomyces cerevisiae*, while active yeast samples showed the highest toxin removal at 28 °C. The results showed that the adsorption kinetics by active yeast and acid treated yeast could be explained by means of pseudo first order model, while for the ultrasonicated yeast, the data are more consistent with the pseudo second order model. Also, both surface adsorption and intra-particle diffusion contributed to the adsorption rate steps. Therefore, live or non-living yeast cells are suitable biological agents for aflatoxin removal in a contaminated culture medium, however, ultrasonic treatment is more effective.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2021/ 12/ 31

Accepted 2022/ 02/ 26

Keywords:

Saccharomyces cerevisiae,
Aflatoxin B₁,
Adsorption,
Bread dough,
Kinetic model

DOI: 10.52547/fsct.19.124.19

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.124.20.7

*Corresponding Author E-Mail:
kpourmohammadi@yahoo.com