کاهش آفلاتوکسین M_1 در شرایط invitro با استفاده از تثبیت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر سرامیک آلوماسیلیکات

مرجان فروغی[۱]، محبوبه سرابی جماب[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
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
٤- استادیار گروه صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد
(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹٦/۰۳/۲۷)

چکیده

در این پژوهش، توانایی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC5052 در جذب آفلاتوکسین M_1 مورد بررسی قرار گرفت. به منظور افزایش عملکرد مخمر در محیط واکنش، مخمر تحت فرایند تثبیت سلولی بر حامل سرامیکی، از جنس آلوماسیلیکات قرار گرفت و فرایند تثبیت مخمر روی این سرامیک بررسی شد. نتایج نشان داد، تثبیت مخمر زنده روی سرامیک آلوماسیلیکات بهتر صورت پذیرفت ($P<۰/۰۵$). سپس محلول آفلاتوکسین M_1 با غلظت ۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم در زمان های ۵، ۱۰و ۲۰ دقیقه از روی بستر سرامیکی آلوماسیلیکات حاوی مخمر تثبیت شده (به دو روش زنده و غیر زنده) عبور داده شد. نتایج نشان داد میزان باقی مانده 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 ۷۰ درصد، رسید. بستر آلوماسیلیکات حاوی مخمر تثبیت شده به صورت زنده در مقایسه با آلوماسیلیکات حاوی مخمر تثبیت شده به صورت غیر زنده، آفلاتوکسین M_1 محلول را به طور معناداری کاهش داد. نتایج این تحقیق نشان داد سرامیک آلوماسیلیکات می‌تواند به عنوان یک بستر مناسب جهت تثبیت مخمر به منظور حذف آفلاتوکسین مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژگان: مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* ، تثبیت، آلوماسیلیکات ،آفلاتوکسین

* مسئول مکاتبات: mahboobe.sarabi@gmail.com

۱- مقدمه

مایکوتوکسین‌ها سموم قارچی هستند که در حیوانات و انسان خاصیت جهش‌زایی و سرطان‌زایی دارند آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها بوده به عنوان محصول ثانویه توسط قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس*[1]، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*[2] و *آسپرژیلوس نومیوس*[3] تولید می‌گردند [۱] . آفلاتوکسین‌ها شامل ۱۸ نوع سم شبیه به هم هستند که شش نوع آن از اهمیت بیشتری برخوردار هستند و ترتیب کاهش سمیت در انواع آن‌ها به صورت $B_1>M_1>G_1>B_2>M_2\neq G_2$ می‌باشد. شیر و فراورده‌های آن از جمله 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 آفلاتوکسینB_1 در بدن گاوهای شیری است[۲]. حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین‌ها در غذای دام وطیور، ۲۰ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر مقدار مجاز آن در شیرخام و پاستوریزه، ۰/۱ میکروگرم در کیلوگرم و جهت شیر خشک مخصوص تغذیه اطفال ۰/۰۲۵ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد [۳]. پژوهش های انجام شده در ایران نشان می‌دهد میزان آفلاتوکسین در بسیاری از نمونه‌های موادغذایی از جمله شیر و فراورده‌های لبنی احتمالا بیش از حد مجاز بوده [٤]. که علاوه بر خطر بروز مسمومیت‌ها و سرطان‌ها و به خطر افتادن سلامت جامعه، منجر به کاهش بازارهای صادراتی این محصولات می‌گردد [٥].

پژوهشگران سال‌ها است که حذف آفلاتوکسین‌ها را از مواد غذایی مختلف مورد مطالعه قرار داده‌اند. در این رابطه استفاده از روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی پیشنهاد شده است. در میان این روش‌ها استفاده از روش بیولوژیک به دلیل عدم باقی‌مانده مواد شیمیایی و عدم تاثیر روی ماده غذایی توصیه می‌گردد. ثابت شده است که برخی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک و مخمرها قادر به جذب آفلاتوکسین می‌باشند، که این ویژگی به دلیل ساختار خاص دیواره سلولی آن‌ها می‌باشد، از این‌رو می‌توان از این میکروارگانیسم‌ها حتی در حالت غیر فعال به عنوان جاذب برای آفلاتوکسین استفاده کرد [٦،٢]. در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای در این زمینه انجام شده است، جذب سطحی آفلاتوکسین B_1 را به‌وسیله *ساکارومایسس سرویزیه* به عنوان یک روش حذف آلودگی در غذاهای تخمیری مورد بررسی قرار دادند [۷]. شاهین (۲۰۰۷)، توانست ٤٠ گونه باکتری را از ماست، شیر جداسازی کند و از بین باکتری های جداسازی شده *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* به صورت مرده توانستند به ترتیب ٨٦ و١٠٠ درصد از آفلاتوکسین B_1 را از محلول آزمایشگاهی آلوده شده کاهش دهد. کاباک و وار (۲۰۰۸) توانایی چهار گونه از لاکتوباسیلوس‌ها و دوگونه 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. کارسین و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی کفایت و کارآمدی *ساکارومایسس سرویزیه* و باکتری‌های اسید لاکتیک جهت جذب آفلاتوکسین M_1 در شیر کم چرب فرادما (استریل) پرداختند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در مقایسه با باکتری‌های اسید لاکتیک ظرفیت بالاتری را در جذب آفلاتوکسین M_1 داشت که این جذب در مدت زمان‌های ۳۰ و ٦٠ دقیقه به ترتیب۹۰ و مدت ۹۲ درصد بود.میکروارگانیسم-هایی که به منظور کاهش آفلاتوکسین مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توانند به دلیل عملکرد بهتر تحت فرایند تثبیت سلولی[4] قرار گیرند. تثبیت سلولی به این جهت انجام می‌پذیرد که از حرکت آزادانه میکروارگانیسم‌ها به ویژه 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 به صورت کلی بر مبنای اتصال میکروارگانیسم به حامل، محصور شدن در داخل یک ماده جامد و یا تجمع آن‌ها در کنار یکدیگر انجام می‌پذیرد. میکروارگانیسم‌های تثبیت شده می‌توانند بر یک حامل یا بستر قرار گرفته و یا مستقیما به محیط واکنش اضافه گردند. در این زمینه می‌توان از بسترهایی استفاده کرد، که علیرغم عدم واکنش با ماده غذایی، نسبت به استریلیزاسیون، مقاوت دمایی بالایی داشته باشند [۸]. سرامیک از جمله بسترهایی است که به طور گسترده در فرایند

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

4. Cell immobilization

تثبیت سلولی به ویژه در فرایند تخمیر مورد استفاده قرار می-گیرد. سرامیک‌ها می‌توانند متشکل از طیف وسیعی از موادمعدنی باشند. به طورکلی به مواد جامدی که بخش عمده‌ی تشکیل دهنده آن‌ها غیر فلزی و غیر آلی باشد سرامیک گفته می‌شود. در این پژوهش به منظور ساخت بستر میکروبی از سرامیک متخلخل بر پایه آلوماسیلیکات استفاده شد. آلوماسیلیکات[1] از اکسید آلومینیوم و سیلیس تشکیل شده و در طی تماس با ماده غذایی با آن واکنش نمی‌دهد و هیچ نوع باقی مانده‌ای از خود به‌جای نمی‌گذارد [۱۰و۷،۹]. 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 ٤۲۰ متر مربع سطح دارد).

جانسیسن و همکاران (۲۰۰۷) تولید اتانل با مخمر تثبیت شده بر ذرات متخلخل سرامیک را مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد فرایند تولید با مخمر تثبیت شده بازده بالاتری را در مقایسه با مخمرهای آزاد دارد. رهایی و همکاران (۲۰۱۰) از تثبیت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* ATCC9763 جهت رفع آلودگی آفلاتوکسین پسته به صورت سطحی استفاده کردند. پریرا 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 در زمینه بیوتکنولوژی و علوم زیستی کاربرد دارد ولی تاکنون جهت کاهش سموم با استفاده از مخمر به روش بیولوژیک در بستر ثابت مطالعه ای انجام نپذیرفته است. از این رو پژوهش حاضر با هدف کاهش بیولوژیکی آفلاتوکسین M_1 در شرایط in vitro با استفاده از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC5052 تثبیت شده بر بستر ثابت، انجام شد. جهت افزایش عملکرد، جلوگیری از پراکندگی و تمرکز بیشتر در محیط واکنش، مخمر بر دانه‌های سرامیک آلوماسیلیکات تثبیت و بستر حاوی مخمر تثبیت شده در مجاورت محلول آفلاتوکسین مورد آزمایش قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC5052 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران به صورت ویال تهیه شد. محیط کشت YM^2 broth و YM agar ازشرکت Biochemو 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 آلوماسیلیکات فعال، از شرکت تولیدی مواد اولیه سرامیک اردکان خریداری شد.

۲-۲- روش ساخت و تهیه ستون

ستون شیشه ای با ارتفاع ۵۰ سانتی متر و قطر ۵ سانتی متر مجهز به صفحه مشبک شیشه‌ای[3] (در داخل ستون)، ساخته شد. به منظور ایجاد جریان و سیرکولاسیون مایع در طول ستون، پمپ پریستالتیک با توانایی تنظیم جریان ۱۰۰-۵ میلی لیتر در دقیقه خریداری شد[۹].

۲-۳- آماده سازی کشت

گونه مخمر در محیط کشت YM broth در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. با توجه به منحنی رشد مخمر، مخمر رشد یافته در انتهای مرحله لگاریتمی رشد بعد از ٤٤ ساعت جداسازی گردید [۱۱]. بدین صورت که محیط کشت مایع حاوی مخمر با سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ٤ درجه سانتی گراد و با ۷۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ ، سپس محیط کشت از آن جدا شد و بار دیگر با محلول بافرفسفات pH= ٦/۸ شستشو و سانتریفیوژ گردید. محلول بافر فسفات رویی جدا و مجددا با محلول بافر فسفات رقیق شد، آنگاه به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۰۰ نانومتر غلظت ۳×۱۰^{۷} واحد شمارش کلنی در هر میلی‌لیتر[4] تعیین شد. سوسپانسیون میکروبی به دو صورت (زنده یا غیر زنده) جهت فرایند تثبیت مورد استفاده قرار گرفت. جهت غیرفعال کردن مخمر نیز قسمتی از سوسپانسیون سلولی مخمر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت [۱۳، ۱۲].

1. Alumina silicate Beads

2. Yeast mold broth
3. Center Glass
4. cfu/ml

۲-٤- آمـــاده‌ســـازی بـــستر ثابـــت ســـرامیک آلوماسیلیکات

دانه‌های سرامیک از جنس آلوماسیلیکات ابتدا با آب مقطر شستشو و سپس در آون ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت خشک شد. سپس دانه‌های خشک شده مجددا در ظروف درب بسته استریل شدند (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه) [۱٤،۱۳].

۲-۵- تثبیت مخمر بر آلوماسیلیکات

به منظور تثبیت مخمر بر ذرات سرامیک آلوماسیلیکات متخلخل، سوسپانسیون میکروبی به دو صورت (زنده و غیرزنده) تهیه شد. در این روش، به میزان ۲۵۰ میلی‌لیتر به صورت 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 به عنوان شاهد، به مدت ۲٤ و ٤۸ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (شکل ۱). سوسپانسیون از ذرات سرامیک جداسازی و سرامیک با آب مقطر شتشو داده شد. جهت تعیین کفایت فرایند تثبیت، تعداد سلول‌های مخمر در محلول باقی مانده با لام هموسایتومتر شمارش شد[۱۳،۱۲].

Fig 1 Yeast cell suspension (In the left image) and Alumina silicate with cell suspension (in the right)

۲-٦- آماده سازی آلوماسیلیکات حاوی مخمر تثبیت شده جهت فرایند جذب آفلاتوکسین

مخمر*ساکارومایسس سرویزیه* یک مخمر فعال زیستی است و در تماس با ماده غذایی ممکن است منجر به تخمیر و فساد در ماده غذایی گردد، از این رو از مخمر غیرزنده در فرایند سم-زدایی استفاده شد. به این منظور دانه‌های آلوماسیلیکات حاوی مخمر زنده و غیر زنده، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل و مخمر موجود به صورت کامل غیرفعال گشت [۱٤،۱۳].

۲-۷- ارزیابی ریز ساختار

جهت انجام مطالعات سلول‌های تثبیت شده مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر سرامیک آلوماسیلیکات از میکروسکوپ الکترونی روبشی[1] استفاده گردید. ابتدا دانه‌های سرامیک حاوی مخمر تثبیت شده با چسب آلوماسیلیکاتیومی بر پایه مورد نظر به صورت ثابت قرار گرفتن سپس جهت رسانایی بیشتر بر 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 تحقیق حاضر مدل XL30 ساخت شرکت فیلیپس از کشور هلند بود [۱۵].

۲-۸- عملیات سم‌زدایی محلول آفلاتوکسین با بستر ثابت سرامیک آلوماسیلیکات

بر اساس استاندارد موجود بالاترین حد مجاز آفلاتوکسین M_1 در مواد غذایی مایع مانند شیر ۰/۱ میکروگرم در کیلوگرم می-باشد. به منظور انجام عملیات سم زدایی 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، متانول به نسبت ٦:۲:۲) به میزان ۱۵۰ میلی‌لیتر در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تهیه شد و در مجاورت ۲۵۰ میلی لیتر سرامیک حاوی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* تثبیت شده (به دو شکل زنده و غیر زنده) که در داخل ستون شیشه‌ای ثابت ریخته شده بود، قرار گرفت و به مدت ۲۰ دقیقه بصورت 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.

۲-۹- 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

1 . Scanning Electron Microscope (SEM)

آشکارساز مدل Multi and fluorescence detector استفاده شد. ابتدا با تزریق ۵ رقت محلول استاندارد آفلاتوکسین M_1 منحنی کالیبراسیون بدست آمد و معادله خط مربوط به آن رسم شد (شکل ۲). سپس محلول مورد نظر از فیلتر سرسرنگی ٤٦ میکرومتر عبور داده شد و به میزان ۲۰۰ میکرولیتر محلول به HPLC تزریق شد [١٦].

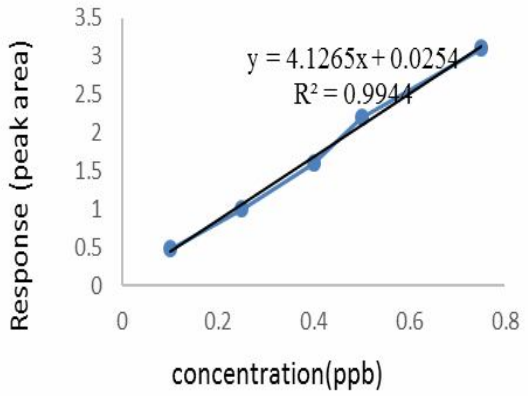

Fig 2 Calibration curve of aflatoxin M1

۲-۱۰- .تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی فرایند تثبیت و تحلیل باقی‌مانده آفلاتوکسین آزمایشات با دو نوع تثبیت (زنده و مرده) در ۳ زمان مختلف (۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه) به صورت فاکتوریل، در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. داده ها با نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و پس از آنالیز واریانس، میانگین‌های مربوطه با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح α = ۰/۰۵ مقایسه شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی نتایج فرایند تثبیت

بررسی نتایج شمارش سلول‌های باقی مانده مخمر در محلول عبوری نشان داد در فرایند تثبیت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر روی دانه‌های آلوماسیلیکات به دو صورت (زنده و غیرزنده) در زمان‌های ٢٤ و ٤٨ ساعت، زمان تثبیت به طور معنی‌داری موثر بوده و میزان تثبیت مخمر طی زمان ٤٨ ساعت افزایش یافته است (P<۰/۰۵) (جدول ۱). میزان باقی مانده تعداد کمتری از سلول‌های مخمر در محلول نشان دهنده تثبیت بهتر می‌باشد (شکل ۳) و این نتیجه بیانگر این موضوع می‌باشد که سلول‌های مخمر در طی زمان ٤٨ ساعت فرصت بیشتری جهت نفوذ و قرارگرفتن در بافت متخلخل سرامیک را داشته و همچنین فرایند تثبیت مخمر زنده در مقایسه با مخمر غیر زنده بر روی سرامیک به دلیل اتصال قوی‌تر مخمر به شکل زنده، از میزان بالاتری برخوردار بود. جانسیسن و همکاران (۲۰۰۷) طی بررسی مشابه نیز مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* را بر روی سرامیک اکسید آلوماسیلیکات به شکل زنده تثبیت کردند. بررسی‌های کروکوتاس و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد، جذب میکروارگانیسم بر یک حامل جامد می‌تواند به واسطه پیوندهای الکترواستاتیکی و نیروهای کووالانی بین سلول و حامل(جامد) ایجاد شود. براساس آزمایشات ناوارو و همکاران (۱۹۹۷) تثبیت مخمر بر روی بستر شیشه‌ای متخلخل در زمانی که مخمر فعال و زنده است صورت می‌پذیرد. همچنین نتایج آزمایشات راپوپورت و همکاران (۲۰۱۱) 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. حامدی و همکاران (۱۹۹۰)، تولید اتانل به صورت پیوسته و مداوم با استفاده از مخمر تثبیت شده بر ذرات اکسید آلوماسیلیکاتیوم را مورد بررسی قرار دادند. با کاربرد این روش پایداری فرایند تولید تضمین شده و تعداد زیادی از سلول‌ها در معرض واکنش‌های تخمیری قرار می-گیرند.

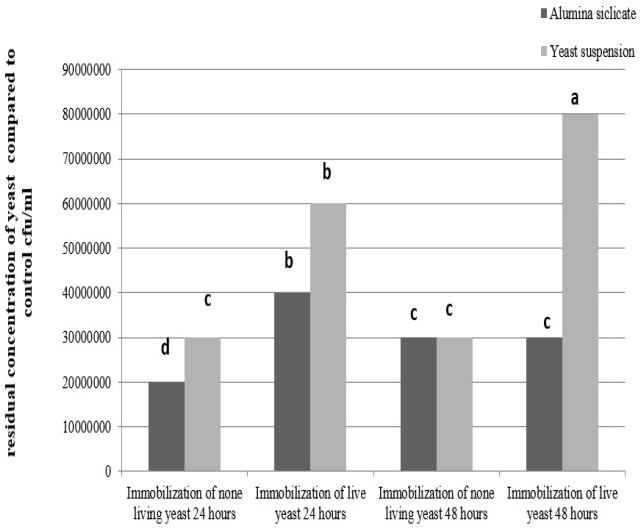

Fig 3 Compare the average remaining number of yeast after immobilization

Table 1 Amount of living and non- living yeast that immobilized on Alumina silicate after 24 and 48 hours.

	Yeast living immobilized after 24 h (Log CFU mL^{-1})	Yeast non living immobilized after 24 h (Log CFU mL^{-1})	Yeast living immobilized after 48 h (Log CFU mL^{-1})	Yeast non living immobilized after 48 h (Log CFU mL^{-1})
Alumina silicate	0.176 ± 0.002^{b}	0.175 ± 0.002^{c}	0.424 ± 0.006^{a}	0.002 ± 0.000^{d}

Means with different letters within a row are significantly different ($P < 0.05$).
± Each value is expressed as mean ± standard deviation ($n = 3$).

۳-۲- بررسی نتایج عملیات جذب آفلاتوکسین

پس از انتخاب بستر سرامیکی آلوماسیلیکات حاوی مخمر تثبیت شده (زنده و غیرزنده) و عبور محلول آفلاتوکسین با غلظت ۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم در زمان‌های ۵، ۱۰و ۲۰ دقیقه، نتایج نشان داد (جدول۲)، میزان باقی مانده آفلاتوکسین در محلول پس از گذشت زمان ۲۰ دقیقه سیرکولاسیون حداقل بوده است و آفلاتوکسین موجود ۷۵ درصد کاهش یافت. نتایج بررسی شتی و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد دیواره سلولی مخمر شبکه‌ای از بتا ۱ و ۳ گلوکان با زنجیره‌های جانبی بتا ۱ و ٦ گلوکان است که مانو پروتئین‌ها 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 مختلف از جمله 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 مطالعه الگرب و همکاران (۲۰۰٦) نشان داد که برای گونه‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم سرعت حذف توکسین در حدود ١٤-٠ درصد بعد از ٢٤ ساعت تماس می‌باشد و بعد از ٩٦ ساعت تماس در حدود ٧٣-٤/٥ درصد است. شتی و همکاران (۲۰۰٦)، جذب سطحی آفلاتوکسین B_1را به وسیله *ساکارومایسس سرویزیه* به عنوان یک روش حذف آلودگی در غذاهای تخمیری مورد بررسی قرار دادند.

Table 2 Reduction of aflatoxin in different circulation time in alumina silicate

Immobilization method	initial concentration of aflatoxin standard (solution(0.2 ppb)	Time circulation(min)	Aflatoxin residues	Reduction of ٪ aflatoxin
Alive cells immobilized	0.2	5	0.10 ± 0.010^{c}	50
Alive cells immobilized	0.2	10	0.09 ± 0.009^{d}	55
Alive cells immobilized	0.2	20	0.06 ± 0.00^{f}	70
Non-living cells immobilized	0.2	5	0.2 ± 0.00^{a}	0
Non-living cells immobilized	0.2	10	0.12 ± 0.010^{b}	40
Non-living cells immobilized	0.2	20	0.08 ± 0.002^{e}	60

Means with different letters within a column are significantly different ($P < 0.05$).±Each value is expressed as mean ± standard deviation ($n = 3$).

نتایج آن‌ها نیز نشان داد بعد از گذشت ۲۰ دقیقه میزان آفلاتوکسین توسط مخمر ساکارومایسس*A18* که با حرارت غیر فعال شده بود، به طور معناداری کاهش یافت.آزاد و همکاران (۲۰۰۵) تیمارهای غیر فعال کننده مانند اسید و حرارت را در فرایند جذب آفلاتوکسین توسط باکتری لاکتوباسیلوس موثر دانستند. کراسین و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی کفایت و کارآمدی *ساکارومایسس سرویزیه* و باکتری‌های اسید لاکتیک جهت جذب آفلاتوکسین M_1 در شیر کم چرب فرادما (استریل) پرداختند. نتیجه این مطالعه نشان داد که *ساکارومایسس سرویزیه* کشته شده به وسیله حرارت به تنهایی یا به همراه باکتری‌های اسید لاکتیک پتانسیل بالایی در حذف آفلاتوکسین M_1 دارد. همچنین بررسی نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر نشان داد، کاهش آفلاتوکسین در محلول توسط آلوماسیلیکات حاوی مخمر تثبیت شده به صورت زنده در مقایسه با آلوماسیلیکات تثبیت شده به صورت غیر زنده، بیشتر بود که ناشی از تعداد مخمر بیشتر در این روش تثبیت می‌باشد. تعداد بیشتر مخمر منجر به افزایش جایگاه‌های اتصال به سم آفلاتوکسین و کاهش سم می‌گردد. بر اساس نتایج بررسی‌های شتی و همکاران (۲۰۰٦) پدیده اتصال آفلاتوکسین یک پدیده فیزیکی بوده که در سطح مخمر یعنی در دیواره

سلولی آن اتفاق می‌افتد. آن‌ها مشاهده کردند که ۷۵درصد قدرت اتصال مخمرمربوط به مواد استخراج شده از دیواره سلولی بوده و زمانی که الیگوساکارید مانان تغییر یافته از دیواره مخمر مشتق می‌شود این مقدار به ۹۵ درصد می‌رسد و نتیجه گرفتند که قسمت پلی ساکاریدی دیواره سلولی و همچنین بتا گلوکان در اتصال سطحی آفلاتوکسین در گونه مخمر موثر می‌باشد.

۳-۳- ارزیابی ریز ساختار

در این پژوهش برای حصول اطمینان از تثبیت مخمر بر روی دانه‌های سرامیک آلوماسیلیکات، تصاویر الکترونی در چهار بزرگنمایی ۱۲۵، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ برابر تهیه شد (شکل ٤). پیکان‌های مشخص شده بر تصاویر نشان می‌دهند که مخمرها به خوبی در خلل و فرج آلوماسیلیکات تثبیت شده‌اند و این می‌تواند دلیلی بر حضور و توانایی مخمر در اتصال سم آفلاتوکسین موجود در ماده غذایی باشد.

٤- نتیجه گیری

استفاده از روش‌های مختلف جلوگیری از آلوده شدن مواد غذایی مصرفی و خوراک دام به مایکوتوکسین‌ها از مبدا تامین، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و سلامت ماده غذایی تولید شده را تضمین می‌کند. اما متاسفانه، با توجه به تحقیقات انجام شده مشخص گردیده است که میزان آفلاتوکسین در نمونه‌های بسیاری از مواد غذایی و فراورده‌های لبنی بیش از حد مجاز می‌باشد. این مساله باعث شده است که علاوه بر خطر بروز مسمومیت‌ها و سرطان‌ها و به خطر افتادن سلامت جامعه، محصولات 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؛ با توجه به اینکه استفاده از میکروارگانیسم ها به عنوان یک روش بیولوژیک جهت کاهش آفلاتوکسین به کار می‌رود، به این منظور 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 معمولا تحت فرایند تثبیت قرار می‌گیرند. فرایند تثبیت امروزه به عنوان دانش جدیدی مطرح می‌گردد. در این مطالعه بهترین روش تثبیت بر روی سرامیک آلوماسیلیکات ارائه شد. پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات و مطالعات آتی طراحی و ساخت بیوفیلترها جهت رفع آلودگی مواد غذایی به ویژه مواد غذایی مایع، مورد بررسی قرار گیرد.

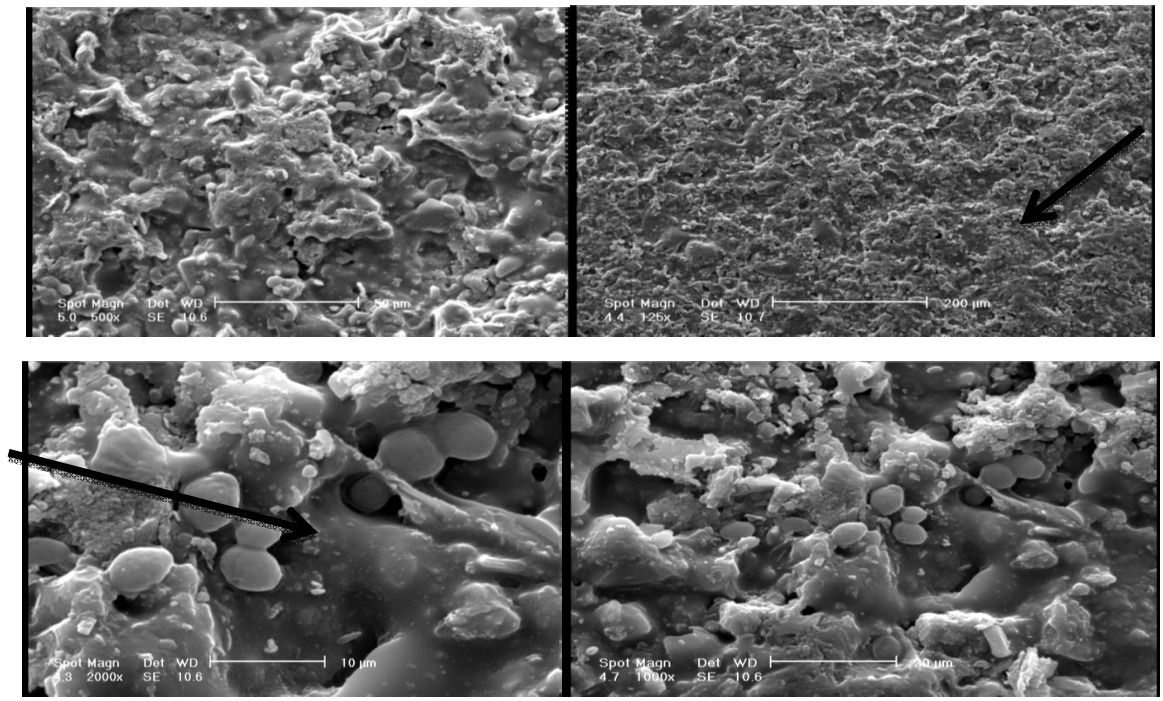

Fig 4 SEM images of Living yeast cells immobilized on alumina silicate in four magnifications of 125X, 500X, 1000Xand 2000X.

۵- منابع

[1] Moss, M. O. 1998. Economic importance of mycotoxins. J. Appl. Microbiol, 84:62–76.

[2] Razzaghi-Abyaneh, M. 2013. Aflatoxins, Recent Advances and Future Prospects, 6:129-138

[3] ISIRI, 5925., Institute of Standard and Industrial Research of Iran . (2002). Maximum Tolerated Limits of Mycotoxins in Foods and Feeds .National Standard, 5925p

[4] Fallah,a.,jafari,T.,Fallah,A.,Rahnama,M., 2009.Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. Food and Chemical Toxicology, 1872-1873.

[5] 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, 18:1216–1218.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

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

[10] 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.

[11] Webber, A. Hettiarachchy, N.S. webber, D. Sivarooban, T. Horax, R. 2014. Heat-Stabilized Defatted Rice Bran (HDRB) as an Alternative Growth Mediumfor *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Food and Nutrition, 1:103

[12] 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.

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

[14] 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.

[15] 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.

[16] ISIRI, 7133., Institute of Standard and Industrial Research of Iran . (2012). Milk and milk prouducts -Determination of aflatoxin M1 by HPLC method and immunoaffinity column clean up-Test method.National Standard, 7133p

[17- 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.

[18] 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.

[19] 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:43-617.

[20] 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.

[21] 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.

[22] 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.

Reduction of aflatoxin M_1 (invitro) by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on Alumina silicate ceramic Beads

Foroughi, M. [1], Sarabi Jamab, M. [2*], Keramat, J. [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.
3. Associated Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agricultural, Isfahan, Iran.
4. Assistant Professor, Department of FoodIndustries ,Agricultural and Natural Resources Research and Education center, AREEO, Mashhad, Iran.

(Received: 2017/02/02 Accepted:2017/05/17)

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 silicate 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 silicate 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 70. Alumina silicate beads containing live immobilized yeast cells compared non- live yeasts, significantly reduced aflatoxin M_1. The results of this study showed that the alumina silicate ceramic can be used as a suitable bed for immobilization of *saccharomyces cerevisiae* to remove aflatoxin M_1.

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

*Corresponding Author E-Mail Address: mahboobe.sarabi@gmail.com