تأثیر سوش‌های مختلف از *ساکارومایسس سرویزیه* در کاهش میزان آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2

روح‌الله کرمی‌اسبو[۱*]، منصوره میرابولفتحی[۲]

۱. استادیار مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کل کشور، تهران، ایران
۲. استاد مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کل کشور، تهران، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: karamiosboo@gmail.com
(دریافت مقاله: ۹۳/۹/۱۸ پذیرش نهایی: ۹۵/۹/۳)

چکیده

ساکارومایسس سرویزیه **(*Saccharomyces cerevisiae*) یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های درگیر در تخمیر مواد غذایی در سرتاسر جهان است که گزارش‌های مختلفی از اثر این میکروارگانیسم بر جذب آفلاتوکسین‌ها منتشر شده است. هدف این مطالعه تأثیر سوش‌های مختلف *ساکارومایسس سرویزیه* بر کاهش آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 بود. برای این منظور سویه‌های استاندارد PTCC ۵۰۵۲ و PTCC ۵۲۶۹ *ساکارومایسس سرویزیه* تهیه و در محیط Yeast Mold Agar کشت گردید. سوسپانسیون حاوی 10^7 سلول *ساکارومایسس سرویزیه* در میلی‌لیتر بر روی محلول حاوی مخلوط هر یک از آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_2 و G_1 با غلظت ۲۰ ng/ml درون بافر نمک فسفات (pH= 7.2) اثر داده شدند. میزان آفلاتوکسین باقی‌مانده در محلول با استفاده از روش HPLC و ستون‌های ایمنوافینیتی مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه نتایج نشان داد که میزان کاهش آفلاتوکسین‌ها و زمان اثرگذاری سوش‌ها متفاوت است. در زمان ۳۲۰ دقیقه سوش ۵۰۵۲ توانست آفلاتوکسین B1، B2، G1 و G2 را به‌ترتیب ۱۱/۲، ۱۳/۹، ۸/۰ و ۸/۱ درصد کاهش دهد، در حالی که در همین مدت سوش ۵۲۶۹ به‌ترتیب ۹/۵، ۸/۰، ۲/۳ و ۱۶/۲ درصد، قدرت کاهش آفلاتوکسین‌ها را داشت. نتایج مطالعه حاضر بیان‌کننده این مسئله است که سوش‌های مختلف از ساکارومایسس پاسخ‌های مختلفی به آفلاتوکسین‌ها می‌دهند و برای جذب نیاز به زمان کافی دارند.**

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، *ساکارومایسس سرویزیه*، ستون ایمنوافینیتی، HPLC

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها ترکیبات شیمیایی سنتزی حاصل از فعالیت قارچ‌های مختلفی هستند که بر روی محصولات کشاورزی ایجاد می‌شوند و با آلوده نمودن مواد غذایی از یک‌سو سبب از بین رفتن ارزش غذایی و خسارات اقتصادی شده و از سوی دیگر باعث زیان‌های بهداشتی مانند بیماری‌های مزمن و حاد اولیه و یا اثرات ثانویه مانند سرطان‌زایی، جهش ژنتیکی، ناقص‌الخلقه‌زائی و مهار سیستم ایمنی می‌شوند. آفلاتوکسین‌ها در اوایل دهه ۱۹۶۰ به‌عنوان عامل مرگ ۱۰۰۰۰۰ بوقلمون و صدها جوجه اردک در انگلیس شناسایی شدند . قارچ‌های خانواده آسپرژیلوس از جمله *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نومینوس* (*Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus, Aspergillus nominus*) و تعدادی دیگر از گونه‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم توانایی تولید آفلاتوکسین‌ها را دارند. خطرات آفلاتوکسین‌ها در سال‌های ۱۹۷۲, ۱۹۷۶, ۱۹۸۷, ۱۹۹۳ و ۲۰۰۳ توسط آژانس تحقیق بر روی سرطان (IARC) مورد بررسی قرارگرفته و این آژانس آفلاتوکسین‌ها را جز مواد سرطان‌زای انسانی (سرطان‌زاهای گروه ۱) طبقه‌بندی نمود (Siemiatycki *et al.*, 2004).

آفلاتوکسین‌ها به‌علت ایجاد مسمومیت‌های کبدی شدید در حیوانات آزمایشگاهی مختلف و وقوع طبیعی آن در محصولات گوناگون کشاورزی به‌عنوان آلوده‌کننده محیط‌زیست به‌خوبی شناخته شده‌اند (Karami-Osboo *et al.*, 2012). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) اثرات بیولوژیکی بلند مدت آفلاتوکسین‌ها عبارتند از سمیت حاد، سرطان، نازایی، سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و جهش ژنتیکی (IPCS, 2001). تحقیقات بسیاری در مورد استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای خارج‌سازی آفلاتوکسین‌ها انجام‌شده است، در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های بیولوژیکی در توکسین‌زدایی آفلاتوکسین‌ها به‌شدت افزایش‌یافته است و به‌عنوان یک روش نوین در دست بررسی هستند (Wu *et al.*, 2009; Ahlberg, 2015). البته کاهش آفلاتوکسین B_1 به‌وسیله باکتری‌ها نیز گزارش‌شده است (Khanafari *et al.*, 2007). اکثر نتایج گزارش‌شده بر روی باکتری اسیدلاکتیک مانند گونه‌های مربوط به لاکتوباسیل بیفیدوباکتریوم, لاکتوباسیل پروپیونی‌باکتریوم (*Lactobacillus, Bifidobacterium, Lactococcus Propionibacterium*) متمرکز شده است، اما باکتری‌های مؤثر دیگری ازجمله رودوکوکوس اریتروپلیس (*Rhodococcus erythropolis*) *مایکوباکتریوم فلوراتینیورانس* (*Mycobacterium fluoranthenivorans*) *نوکاردیا کورینه‌باکتریودیس* (*Nocardia corynebacterioides*) و *فلاوباکتریوم آورانتیاکوم* (*Flavobacterium aurantiacum*) نیز تجزیه آفلاتوکسین B_1 به‌کار برده شده‌اند (Guan *et al.*, 2008).

مخمرها میکروارگانیسم‌های بسیار مهمی هستند که توسط بشر مورد استفاده قرار گرفته‌اند. تولید مخمر بیشتر از میلیون‌ها تن در سال است (Ashton Acton, 2013) و بیشتر آن در سه شاخه تخمیر مواد (Hammond, 1993)، تصفیه (Watson, 1993) و پخت نان (Rose, 1993) مصرف می‌شود و در سال‌های اخیر کاربردهای جدیدی پیدا کرده‌اند. چندین قرن است که از ساکارومایسس به‌عنوان مخمر غذایی

در کشورهای آسیایی و آفریقایی استفاده می‌شود و تعدادی از گونه‌های مخمر به‌ویژه *ساکارومایسس سرویزیه* نقش اصلی در تخمیر مواد غذایی را به همراه باکتری اسید لاکتیک ایفا می‌کنند (Jespersen, 2003). دیواره سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* شامل شبکه‌ای از β-1,3 glucan با زنجیره جانبی β-1,6 glucan است و به منوپروتئین‌های گلیکوزیلات شده متصل شده است و سطح فعال و وسیعی را برای جذب مواد در اختیار دارد (Kollar *et al.*, 1997). پروتئین‌ها و گلوکان‌ها تعداد زیادی سایت‌های فعال برای ایجاد پیوندهای هیدروژنی، یونی یا هیدروفوبیک ایجاد می‌کنند (Huwig *et al.*, 2001). اتصال بین مایکوتوکسین‌های مختلف مانند زیرالنون، اکراتوکسین و آفلاتوکسین B_1 با سطح دیواره مخمر قبلاً مشخص شده بود و معلوم شده است که زیرالنون و اکراتوکسین به گلوکان‌ها متصل می‌شوند اما در مورد آفلاتوکسین B_1 هنوز مطالعات سامان‌مند انجام نشده است (Piotrowska and Masek, 2015; Yiannikouris *et al.*, 2004). خوراک طیور به همراه *ساکارومایسس سرویزیه* تأثیر مناسبی در کاهش سمیت آفلاتوکسین B_1 نشان داده است (Stanley *et al.*, 1993).

زمانی‌که مخمر خشک و دیواره سلولی مخمر به یک نسبت با آفلاتوکسین B_1 مخلوط شده‌اند، کاهش چشمگیری در سمیت آن مشاهده شده است (Baptista *et al.*, 2004). سویه‌های مختلف *ساکارومایسس سرویزیه* برای کاهش آفلاتوکسین B_1 مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که برخی از آن‌ها تا ٤٠٪ آفلاتوکسین B_1 را در محلول استاندارد کاهش دادند و کاهش آفلاتوکسین به خاطر جذب آن توسط مخمر بوده در نتیجه آفلاتوکسین تجزیه نشده بود (Shetty *et al.*, 2007). هم‌چنین مشخص شده است که گلوکومان‌های به‌دست آمده از دیواره سلولی برخی از مخمرها، توانایی جذب مایکوتوکسین‌ها در خوراک دام آلوده را دارند (Smith *et al.*, 2000). تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر *ساکارومایسس سرویزیه* در کاهش آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 انجام گردید تا در صورت یافتن سویه مؤثر در مراحل بعدی به‌عنوان عامل بیولوژیکی کاهش آفلاتوکسین‌ها در غذا و خوراک مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تمام محلول‌ها، مواد و معرف‌های مورد استفاده دارای کیفیت مناسب برای آزمایشگاه بودند و از شرکت Merck تهیه شدند. آب مورد استفاده در این استاندارد با ویژگی‌های درجه ۳ استاندارد بین‌المللی ۳٦۹٦ مطابقت داشته و برای آزمایشات شیمیایی و ساخت محلول‌ها مناسب بود (ISO/TC 47-3696; 2011). سویه‌های استاندارد PTCC ۵۰۵۲ و PTCC ۵۲٦۹ مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. پودر استاندارد آفلاتوکسین های B_1، B_2، G_1 و G_2 خالص از شرکت Sigma تهیه و هر یک از استانداردها درغلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در متانول HPLC grade حل شده و با دستگاه اسپکتروفتومتر با روش AOAC به‌طور کمی در طول موج ۳٦۵ نانومتر تعیین غلظت گردیدند (Nesheim *et al.*, 1999)، سپس محلولی از استاندارد مخلوط آفلاتوکسین‌ها با غلظتی برابر ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر برای آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1

و G_2 به‌عنوان استاندارد ذخیره ثانویه ساخته شد، از این محلول برای ساخت محلول‌های مورد آزمون استفاده گردید.

- تهیه مایه *ساکارومایسس سرویزیه*

سویه‌های استاندارد *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC (5052 , 5269) در مرحله اول در محیط Yeast Mold Agar (Merck) کشت گردیدند، برای تکثیر و انجام بررسی‌های بعدی از محیط فوق استفاده شد. فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری محتوی ۱۰۰۰۰ سلول در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا تعداد سلول تکثیر شده در طول موج ٦۰۰ نانومتر به سطح جذب ۱ رسانیده و سوسپانسیون سلول مخمر با غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر تهیه شوند. تراکم سلولی با جذب نوری ۱ در حجم ۱۰ میلی‌لیتر بافر نمک فسفات رقیق (pH=6) به‌مدت ۱۰ دقیقه ثابت نگه‌داشته شدند، سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ٤٥۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس دو بار با بافر فسفات شستشو و پس از هر بار شستشو در ٤٥۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند (Shetty *et al.*, 2007).

- شرایط کروماتوگرافی

از دستگاه HPLC مدل Breeze شرکت Waters استفاده شد. ستون فاز معکوس (Waters Nova-pak® C-18, 3.9×250 mm, 4 µm particle size) جهت جداسازی در دمای ٤۰ درجه سلسیوس مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط آب/ متانول/ استونیتریل (۱۰/٤۰/٦۰ حجمی/ حجمی) با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان فاز متحرک در شیوه شویش تک‌توانی بکار گرفته شد. مشتق‌سازی بعد از ستون با برم به روش الکتروشیمیایی و کبری سل انجام شد، حجم تزریق برابر با ۱۰۰ میکرولیتر و آشکارسازی با آشکارگر فلورسانس در طول موج‌های تابش و بازتاب (exition, emission) ۳٦۰ و ٤٥۰ نانومتر انجام شد (Karami-Osboo *et al.*, 2012).

- اندازه‌گیری میزان کاهش آفلاتوکسین‌ها

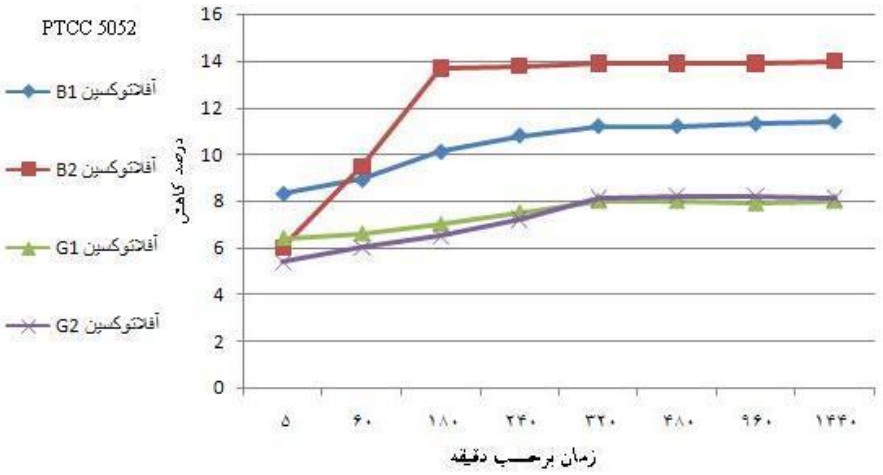
اندازه‌گیری میزان کاهش آفلاتوکسین‌ها در محلول بافر نمک فسفات و در تراکم 10^7 سلول *ساکارومایسس سرویزیه* در میلی‌لیتر که قبلاً تهیه شده بود و جذبی معادل یک را در دستگاه اسپکترومتر نشان داد، انجام شد (El-Nezami *et al.*, 1998)، به این منظور یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلول مخمر با غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر، در سطح ۲۰ ng/ml آفلاتوکسین آلوده شد و در دمای ۲٥ درجه سلسیوس بر روی دستگاه شیکر افقی، مخلوط شدند. میزان کاهش آفلاتوکسین‌ها در تماس با سلول *ساکارومایسس سرویزیه* در فاصله زمانی ٥ تا ۳۲۰ دقیقه و در زمان‌های ٥، ٦۰، ۱۸۰ و ۳۲۰ دقیقه، مورد بررسی قرار گرفت؛ نمونه‌برداری در زمان‌های ٤۸۰، ۹٦۰ و ۱٤٤۰ دقیقه نیز جهت بررسی روند اشباع شدن میزان کاهش انجام شد. نمونه‌ها پس از اتمام زمان مخلوط کردن، در ٤٥۰۰ دور بر دقیقه و به‌مدت ٥ دقیقه سانتریفیوژ شدند، محلول رویی برداشته شد و در یک ویال تیره رنگ ریخته شد. میکرواورگانیزم ته‌نشین شده با یک میلی‌لیتر بافر شستشو داده شد و مجدداً به‌مدت ۱۰ دقیقه در ٤٥۰۰ دوربر دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی برداشته شد و به محلول جمع‌آوری شده از مرحله اول اضافه گردید و از فیلتر ۰/٤٥ µm عبور داده شد و مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ٦۸۷۲ از ستون ایمینوافینیتی حاوی آنتی‌بادی منوکلونال در برابر

آفلاتوکسین‌ها عبور داده شد (ISIRI 6872/2011)؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نهایی به دستگاه HPLC تزریق شد (آزمون‌ها سه مرتبه تکرار شد). در طول آزمایش از یک محلول کنترل بافر نمک فسفات، حاوی هر چهار آفلاتوکسین در غلظت ng/ml ۲۰ و عاری از سلول‌های جاذب ساکارومایسس بود نیز استفاده گردید تا هر عاملی به‌جز کاهش توسط سلول‌های ساکارومایسس حذف شوند.

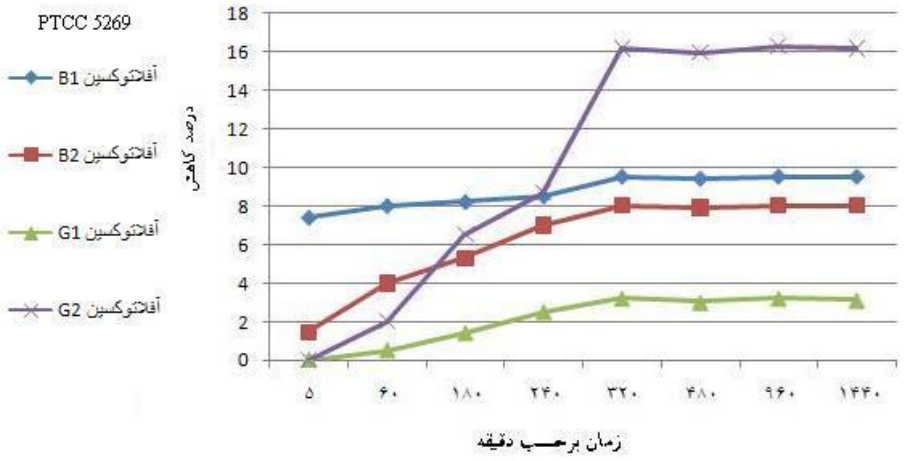
یافته‌ها

تأثیر دو سوش *ساکارومایسس سرویزیه* بر کاهش استانداردهای آفلاتوکسین در زمان‌های ۵، ٦۰، ۲٤۰ و ۳۲۰ و پس از آن تا ۱٤٤۰ دقیقه در نمودارهای (۱) و (۲) نشان داده شده است. این نمودارها به‌خوبی نشان می‌دهد که تأثیر سوش‌ها روندهای متفاوتی دارد. به عنوان مثال سوش شماره ۵۰٦۹ پس از ۳۲۰ دقیقه بیشترین اثر را برروی آفلاتوکسین B_2 داشت، در حالی‌که سوش دیگر بیشترین اثر را بر روی آفلاتوکسین G_2 نشان داد و الگوی اثر در زمان‌های مختلف متفاوت بود. همان‌طور که از نمودارها مشخص است میزان کاهش برای هر چهار آفلاتوکسین توسط مخمر فرآیند نسبتاً سریع است که در زمان ۳۲۰ دقیقه به حداکثر مقدار خود می‌رسد و پس از آن تا زمان ۱٤٤۰ دقیقه تفاوت چشمگیری در میزان کاهش دیده نمی‌شود. این فرایند به‌خوبی نشان می‌دهد که سوش‌های مختلف توانایی متفاوتی در جذب آفلاتوکسین داشته‌اند. در تحقیق حاضر یکی از سوش‌ها نسبت به سوش دیگر میزان بیشتری از آفلاتوکسین گروه B را جذب نمود و مقایسه نتایج نشان داد که میزان کاهش آفلاتوکسین‌ها و زمان اثر سوش‌ها متفاوت می‌باشد؛ ولی هر دو سوش در زمان مشابهی حداکثر جذب را از خود نشان دادند و تفاوت معنی‌داری بین دو نوع مختلف سوش از این‌لحاظ وجود نداشت. از آن‌جایی‌که حداکثر میزان جذب برای هر چهار آفلاتوکسین در صنعت مواد غذایی اهمیت بالایی دارد بنابراین برای نیل به این مهم می‌بایست مخلوطی از سوش‌های مختلف این مخمر در صنعت تهیه شود که قادر به جذب حداکثر میزان آفلاتوکسین‌ها از محیط باشد و به‌عنوان یک‌روش بیولوژیکی در کاهش آفلاتوکسین‌ها به‌کارگرفته شوند.

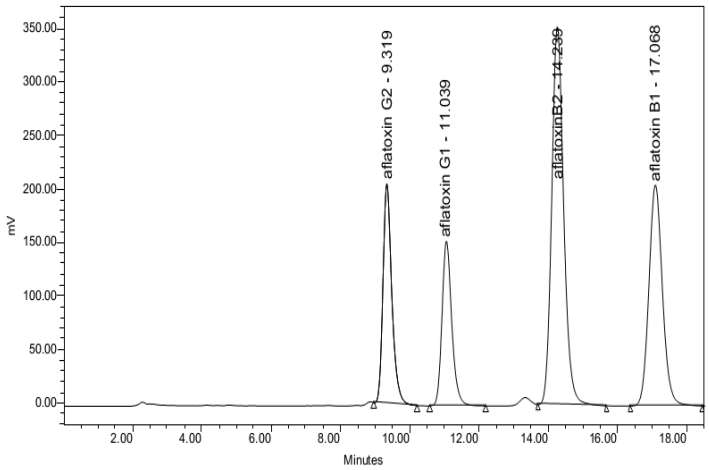
کروماتوگرام‌های (۱) و(۲) محلول حاوی ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین‌ها و سوش ساکارومایسس ۵۰۵۲ در زمان‌های ۳۲۰ و ۳۰ دقیقه را نشان می‌دهد.



نمودار (۱)- میزان کاهش آفلاتوکسین‌ها (درصد) در محلول حاوی ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از هر یک از آفلاتوکسین‌ها توسط سوش *ساکارومایسس سرویزیه* ۵۰۵۲

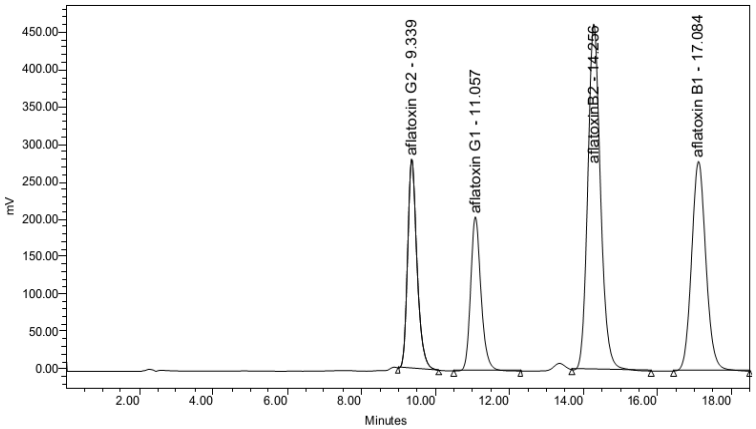


نمودار (۲)- میزان کاهش آفلاتوکسین‌ها (درصد) در محلول حاوی ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از هریک از آفلاتوکسین‌ها توسط سوش *ساکارومایسس سرویزیه* ۵۲۶۹



	Peak Name	RT (min)	Peak Type	Area (V *sec)	% Area	Height (V)	% Height	Integration Type	Response	Points Across Peak
1	aflatoxin G2	9.319	Found	3636337	17.52	205409	22.33	bb	3.636e+006	75
2	aflatoxin G1	11.039	Found	3024178	14.57	153937	16.74	bb	3.024e+006	97
3	aflatoxinB2	14.239	Found	8490867	40.90	353711	38.46	bb	8.491e+006	118
4	aflatoxin B1	17.068	Found	5606454	27.01	206634	22.47	bb	5.606e+006	123

کروماتوگرام (۱)- کروماتوگرام آفلاتوکسین ها در محلول حاوی ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتـر از هریک از آفلاتوکسین‌ها و سوش ساکارومایسس سرویزیه ۵۰۵۲ در زمان ۳۲۰ دقیقه



	Peak Name	RT (min)	Peak Type	Area (V *sec)	% Area	Height (V)	% Height	Integration Type	Response	Points Across Peak
1	aflatoxin G2	9.339	Found	4930857	17.90	280539	22.80	bb	4.931e+006	67
2	aflatoxin G1	11.057	Found	4028527	14.62	206352	16.77	bb	4.029e+006	108
3	aflatoxinB2	14.256	Found	11042469	40.08	463066	37.64	bb	1.104e+007	129
4	aflatoxin B1	17.084	Found	7550398	27.40	280302	22.78	bb	7.550e+006	123

کروماتوگرام (۲) – کروماتوگرام آفلاتوکسین‌ها در محلول حاوی ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از هریک از آفلاتوکسین‌ها و سوش *ساکارومایسس سرویزیه* ۵۰۵۲ در زمان ۳۰ دقیقه

بحث و نتیجه‌گیری

سم‌زدایی بیولوژیکی مایکوتوکسین با استفاده از میکروارگانیسم یک استراتژی شناخته شده برای مدیریت مایکوتوکسین در غذا و خوراک دام است. گنجاندن چنین میکروارگانیسم در رژیم غذایی ممکن است اثرات سمی از مایکوتوکسین‌ها در حیوانات مزرعه را کاهش می‌دهد زیرا یک مجتمع AFB1-میکروارگانیسم ممکن است در دسترس بودن مایکوتوکسین را کاهش داده و در نتیجه جذب آن در دستگاه گوارش جاندار خواهد شد (Gratz *et al.*, 2007). *ساکارومایسس سرویزیه* قرن‌ها در صنعت غذا استفاده شود و از آن‌جایی که پروتئین‌ها و گلوکان‌های موجود در *ساکارومایسس سرویزیه* سایت‌های فعال زیادی برای ایجاد انواع پیوند مانند پیوند هیدروژنی، یونی یا هیدروفوبیک ایجاد می کنند (Huwig *et al.*, 2001)، لذا شرایط خوبی برای اتصال به گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار آفلاتوکسین دارند. در مطالعه‌ای با استفاده از *ساکارومایسس سرویزیه* در نمونه‌های بادام زمینی نشان دادند که میزان کاهش این سم بعد از استفاده از این مخمر در طی ۷ روز ۷٤/٤ درصد بود (Prado *et al.*, 2011). براساس مطالعات دیگری توانایی سویه‌های مختلف *ساکارومایسس سرویزیه* برای کاهش آفلاتوکسین B_1 مورد بررسی قرار گرفت و گزارش نمودند که بعضی از آن‌ها تا ٤٠٪ آفلاتوکسین B_1 را در محلول استاندارد کاهش می‌داد و این کاهش را به‌دلیل جذب آن توسط مخمر اعلام نمودند. در نتیجه، پدیده اتصال آفلاتوکسین یک پدیده فیزیکی می‌باشد که در سطح مخمر یعنی در دیواره سلولی آن اتفاق می‌افتد (Shetty *et al.*, 2007). همانند این تحقیق، در پژوهش حاضر نیز یکی از سوش‌ها نسبت به سوش دیگر سبب کاهش میزان بیشتری از آفلاتوکسین در محلول گردید و مقایسه نتایج نشان داد که میزان کاهش آفلاتوکسین‌ها و زمان اثر سوش‌ها متفاوت است، اما تفاوت معنی‌داری بین دو نوع مختلف سوش وجود نداشت. یافته‌های مطالعه دیگر نیز تأیید می‌کند که به‌کارگیری سوش مناسب از مخمر که توانایی رشد و فعالیت ضدقارچی بیشتری را داشته باشد و در مقابل اثرات محیطی مقاوم‌تر باشد، مطلوب‌تر است (Azimi *et al.*, 2015). آفلاتوکسین‌های گروه B به‌میزان بیشتری توسط *ساکارومایسس سرویزیه* جذب شدند و سوش ۵۰۵۲ بیشتر از سوش دیگر قدرت جذب این گروه را داشت. سوش ۵۲٦۹ در زمان‌های ابتدایی جذب بسیار کمی داشت و بعد از گذشت زمان توانایی جذب را پیدا نمود.

در تحقیقی که بر روی خوراک دام انجام گرفت، نشان دادند که *ساکارومایسس سرویزیه* و *رایزوپوس الیگواسپروس* (*Rhizopus oligosporus*) توانایی کاهش آفلاتوکسین B_1 را دارند و ساکارومایسس به‌تنهایی حدود ۳۰ درصد آفلاتوکسین را کاهش داد. از سوی‌دیگر با گذشت زمان، میزان بیشتری از آفلاتوکسین کاهش پیدا نمود که با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد (Kusumaningtyas *et al.*, 2006). در زمان ۳۲۰ دقیقه سوش ۵۰۵۲ توانست آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 را به‌ترتیب ۱۱/۲٪، ۱۳/۹٪، ۸/۰٪ و ۸/۱٪ کاهش دهد، در حالی‌که در همین مدت سوش ۵۲٦۹ به‌ترتیب ۹/۵٪، ۸/۰٪، ۲/۳٪ و ۱٦/۲٪ قدرت جذب و کاهش آفلاتوکسین‌ها را داشت. با توجه به این‌که هیچ تیمار فیزیکی بر روی سوش‌های استفاده شده در این

تحقیق صورت نگرفت، به‌نظر می‌رسد برای اینکه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* توانایی جذب مناسب آفلاتوکسین‌ها را پیدا کند می‌بایست تأثیرات حرارت و تخریب ساکارومایسس و تهیه مانن توسط اسید را بررسی نمود. تیمارهای اسیدی و حرارتی توانایی کاهش را به‌ترتیب ٦٢ و ٥٥ درصد افزایش می‌دهند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که شرایط محیطی نیز در روند و میزان اتصال مؤثر است و می‌تواند یکی دیگر از علت‌های تفاوت در میزان کاهش سم در مطالعات مختلف باشد (Rahie *et al*., 2010). میزان غلظت و کاهش آفلاتوکسین در مطالعات مختلف با توجه به عوامل مختلف فیزیکی، شیمیایی، محیط منطقه مورد بررسی و نوع گونه و سویه میکروبی به‌کارگرفته شده جهت کاهش سم می‌تواند متغیر باشد (Azimi *et al*., 2015) و نتایج مطالعه حاضر بیان‌کننده این مسئله است که سوش‌های مختلف از *ساکارومایسس سرویزیه* پاسخ‌های مختلفی به جذب آفلاتوکسین‌ها می‌دهند و برای جذب نیاز به زمان دارند. به همین دلیل تنها از سوشی از *ساکارومایسس سرویزیه* می‌توان استفاده نمود که در حداقل زمان ممکن بتواند آفلاتوکسین‌ها (به‌ویژه آفلاتوکسینB_1) را جذب کند. از آن‌جایی‌که حداکثر میزان جذب برای هر چهار آفلاتوکسین در صنعت مواد غذایی اهمیت بالایی دارد، بنابراین برای رسیدن به این هدف، می‌بایست مخلوطی از سوش‌های مختلف این مخمر در صنعت تهیه شده و به‌عنوان یک روش بیولوژیکی در کاهش آفلاتوکسین‌ها به‌کارگرفت.

منابع

- Anonymous, AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA. Official method 49.2.02.
- Ahlberg, S.H., Joutsjoki, V. and Korhonen, H.J. (2015). Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. International Journal of Food Microbiology. 207: 87-102.
- Ashton Acton, Q. (2013). Saccharomycetales-Advances in Research and Treatment: Edition: Scholarly Brief. p. 159.
- Azimi, M, Gholampour A,I,, Rouhi, S. and Zaboli, F. (2015). Biological reduction of aflatoxin B_1 in wheat flour using yeast *Saccharomyces cerevisiae*. iranian South Medical Journal, 18(4): 701-710.
- Bata, A. and Lasztity, R. (1999). Detoxification of mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. Trends in Food Science and Technology, 10: 223–228.
- Baptista, A.S., Horii, J., Calori-Domingues, M.A., da Gloria, E.M., Salgado, J.M. and Vizioli, M.R. (2004). The capacity of manno-oligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 474–748.
- El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B_1. Food and Chemical Toxicology 36: 321–326.
- Gratz, S., Wu, Q.K., El-Nezami, H., Juvonen, R.O., Mykkänen, H. and Turner, P.C. (2007). *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B_1 transport, metabolism and toxicity in caco-2 cells. Applied and Environmental Microbiology, 73: 3958–3964.

- Guan, S., Ji, C., Zhou, T., Li, J., Ma, Q and Niu, T. (2008). Aflatoxin B_1 degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. International Journal of Molecular Sciences, 9: 1489-1503
- Hammond, J.R.M. (1993) Brewer's yeasts. In: The Yeasts, Vol. 5, Rose, A.H. and Harrison, J.S. (Eds) Academic Presss, London, 7-67.
- Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O., Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters 122, 179–188.
- IPCS. (2001) International Program on Chemical Safety. World Health Organization Geneva, p. 345.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2011). Food and Feed Stuffs: Determination of aflatoxins B & G by HPLC method using immunoaffinity column clean up-Test method. ISIRI No. 6872 [In Persian].
- International Organization for Standardization (ISO), (2011). Water for analytical laboratory use - Specification and test methods. ISO No. 3696.
- Jespersen, L. (2003). Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. FEMS Yeast Research 3, 191–200.
- Karami-Osboo, R., Mirabolfathy, M., Kamran, R., Shetab-Boushehri, M. and Sarkari, S. (2012). Aflatoxin B_1 in maize harvested over 3 years in Iran. Food Control, 23(1): 271–274.
- Khanafari, A., Soudi, H., Miraboulfathi, M. and Karami-Osboo, R. (2007). An in vitro investigation of aflatoxin B_1 biological control by *Lactobacillus plantarum*. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10: 1596-1603.
- Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonova, J. et al. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta 1, 6-glucan interconnects mannoprotein, beta 1, 3-glucan, and chitin. Journal of Biological Chemistry. 272: 17762–17775.
- Kusumaningtyas, E., R. Widiastuti and R. Maryam. (2006). Reduction of aflatoxin B1 in chicken feed by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* and their combination. Mycopathologia, 162: 307–311.
- Nesheim, S., Trucksess, M.W. and Page, S.W. (1999). Molar absorptivities of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in acetonitrile, methanol, and toluene-acetonitrile (9 + 1) (modification of AOAC Official Method 971.22): collaborative study. Journal of AOAC International, 82(2): 251-258.
- Piotrowska, M. and Masek, A. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components as tools for Ochratoxin A decontamination. Toxins, 7(4): 1151–1162.
- Prado, G., Madeira, J.E. and Morais, V.A. (2011). Reduction of aflatoxin B1 in stored peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Food Protection; 74: 1003-1006.
- Rahie, 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].
- Rose, A.H. and G. Vijayahkeshima. (1993). Baker's yeast. In: The Yeasts, Vol. 5. A.H. Rose and J.S. Harrison (Eds), Academic Press, London, 357-397.
- Shetty, P., Hald, B. and 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.
- Siemiatycki, J., Richardson, L., Straif, K., Latreille, B., Lakhani, R., Campbell, S. et al. Listing occupational carcinogens. Environmental Health Perspectives, 112: 1447-1459.

- Smith, T.K., Modirsanei, M. and MacDonald, E.J. (2000). The use of binding agents and amino acids supplements for dietary treatment of Fusarium mycotoxicoses. In: Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of the 16th Annual Symposium. Lyons, T.P. and Jacques, K.A. (Eds), Nottingham University Press, UK. pp 383-390.
- Watson, D.C. (1993). Yeasts in distilled alcoholic-beverage production. In: The Yeasts, Vol. 5. Rose, A.H. and Harrison, J.S. (Eds), Academic Press, London, 215-244.
- Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V. and Kuca. K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. Drug Metabolism Reviews, 41(1):1-7
- Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G. and et al. (2004). Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Journal of Food Protection, 67: 1195–1200.

Effect of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on reduction of aflatoxin B_1, B_2, G_1 and G_2

Karami Osboo, R.[1*], Mirabolfathy, M.[2]

1. Associate Professor of Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran
2. Professor of Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran
[*]Corresponding author's Email: karamiosboo@gmail.com
(Received: 2014/12/9 Accepted: 2016/11/23)

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is one of the major microorganisms widely used in food fermentation, and the ability of its strains to reduce the level of aflatoxins has been reported. The aim of this study was to test the capability of *S. cerevisiae* strains on reduction of aflatoxin B_1, B_2, G_1 and G_2 levels. For this reason, standard strains of PTCC 5052 and PTCC 5269 were cultivated on Yeast Mold Agar. Afterwards, cell suspension containing 10^7 cell/ml was spiked into PBS (pH= 7.2) containing 20 ng/ml of each B_1, B_2, G_2 and G_1 aflatoxins. Aflatoxin levels were determined using HPLC and immunoaffinity columns. The results show that different strains of *S. cerevisiae* reduced the aflatoxin levels in a different rate and various durations. At the time 320 min the PTCC 5052 strain reduced the aflatoxin B_1, B_2, G_1 and G_2 levels to 11.2 , 13.9, 8.0 and 8.1%, respectively; meanwhile, these results for the PTCC 5269 strain 9.5, 8.0, 2.3 and 16.2%, respectively. Results suggested that different strains of *S. cerevisiae* had a different reduction rate on aflatoxins. Moreover, the strains need to have sufficient time to absorb the maximum amounts of aflatoxin.

Key words: Aflatoxins, *Saccharomyces cerevisiae*, Immunoaffinity columns, HPLC