Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:58 +0330 on Wednesday October 18th 2017

ORIGINAL ARTICLE

Antifungal Properties of Gelatin-based Coating Containing Mannoprotein from Saccharomyces Cerevisiae *on* Aspergillus flavus *Growth in Pistachio*

Anna Abdolshahi[1],
Farideh Tabatabaiee Yazdi[2],
Ali Akbar Shabani[3],
Seyed Ali Mortazavi[2],
Abdolreza Mohammadi Nafchi[4]

[1] PhD Student in Food Microbiology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2] Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[3] Associate Professor, Department of Biotechnology, Center for Biotechnology Research, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
[4] Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

(Received November 21, 2015 ; Accepted April 25, 2016)

Abstract

Background and purpose: Mannoprotein in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* is a glycoprotein with antimicrobial and antitoxin effects. In this research antifungal properties of gelatin based edible coating containing *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein were tested against *Aspergillus flavus* growth and the inhibitory effect on pistachio kernel.

Materials and methods: Antifungal properties of gelatin based edible coating containing *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein against *Aspergillus flavus* (PTCC 5004) were evaluated employing Serial Dilution (in plate and tube), Agar-well diffusion methods and inhibitory effects in coating of the pistachio kernels.

Results: Gelatin-based coating containing mannoprotein showed to have inhibitory effects against *Aspergillus flavus* growth. MIC and MFC values for mannoprotein were 0.005 and 0.01 µg/ml, respectively.

Conclusion: The application of gelatin based edible coating containing mannan delayed and reduced *Aspergillus flavus* growth. In this regard, this active coating could be applied in preservation and storing of foods such as pistachio to reduce *Aspergillus flavus* growth and eventually diminution of aflatoxin.

Keywords: *Aspergillus flavus*, mannoprotein, MIC, MFC, pistachio

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(139): 93-102 (Persian).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:58 +0330 on Wednesday October 18th 2017

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۳۹ مرداد سال ۱۳۹۵ (۱۰۲-۹۳)

بررسی اثرات ضد قارچی پوشش خوراکی حاوی مانوپروتئین مخمر ساکارومیسس سرویزیه بر رشد آسپرژیلوس فلاووس در مغز پسته

آنا عبدالشاهی[۱]
فریده طباطبایی یزدی[۲]
علی اکبر شعبانی[۳]
سید علی مرتضوی[۲]
عبدالرضا محمدی نافچی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: مانوپروتئین موجود در دیواره سلولی مخمر ساکارومیسس یک ترکیب گلیکوپروتئینی است که دارای خواص ضدمیکروبی و آنتی‌توکسینی است. در این مطالعه اثرات ضدقارچی پوشش خوراکی بر پایه ژلاتین حاوی مانوپروتئین (مانان) مخمر ساکارومیسس سرویزیه بر رشد آسپرژیلوس و اثر مهارکنندگی آن بر روی مغز پسته بررسی شد.

مواد و روش‌ها: اثرات ضد قارچی پوشش خوراکی بر پایه ژلاتین حاوی مانوپروتئین (مانان) مخمر ساکارومیسس سرویزیه بر آسپرژیلوس فلاووس (PTCC 5004) به روش رقت سازی متوالی لوله‌ای و پلیت و نیز انتشار در چاهک اندازه‌گیری و اثر مهار کنندگی آن بر روی مغز پسته ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پوشش ژلاتینی حاوی مانان اثر مهارکنندگی بر رشد آسپرژیلوس فلاووس دارد. کم ترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کم‌ترین غلظت کشندگی قارچ (MFC) برای مانان به ترتیب برابر ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

استنتاج: کاربرد پوشش ژلاتینی حاوی مانان بر روی مغز پسته سبب تعویق و کاهش رشد آسپرژیلوس فلاووس گردید. با توجه به نتایج به دست آمده، از این پوشش فعال می‌توان برای نگهداری مواد غذایی از جمله پسته در جهت کاهش رشد آسپرژیلوس فلاووس و نهایتاً کاهش مقدار تولید آفلاتوکسین استفاده نمود.

واژه های کلیدی: آسپرژیلوس فلاووس، مانوپروتئین، پسته، MIC، MFC

مقدمه

پسته یکی ازمهم‌ترین محصولات کشاورزی و سومین کالای غیر نفتی صادراتی در ایران است. میزان صادرات پسته از ایران، سالانه در حدود ۲۰ هزار تن است که قسمت اعظم آن به کشورهای اروپایی صادر می‌گردد. بارزترین مشکل در امر صادرات پسته، مقررات سختگیرانه در زمینه میزان آفلاتوکسین موجود در پسته می‌باشد. این مسئله در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. و تلاش‌های زیادی برای پیشگیری از تولید و یا کاهش آفلاتوکسین پسته به عمل آمده است. زیرا ضرر و زیان اقتصادی غیر مستقیم زیادی از طریق برگشت محصول

مولف مسئول: فریده طباطبایی– مشهد: دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی E-mail: tabatabai@um.ac.ir
۱. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
۴. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۸/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۹/۲ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۲/۶

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:58 +0330 on Wednesday October 18th 2017

پسته دارای آفلاتوکسین بیش از حد مجاز استاندارد برای تولیدکنندگان و صادرکنندگان و در نهایت جایگاه کشور عزیزمان ایران در بازارهای تجارت جهانی ایجاد می‌گردد(۱). آفلاتوکسین‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه سرطان زا و سمی تولید شده توسط گونه‌هایی از آسپرژیلوس مانند آسپرژیلوس فلاووس[1]، آسپرژیلوس پارازیتیکوس[2]، آسپرژیلوس نومیوس[3] و آسپرژیلوس سودوتاماری[4] می‌باشند. اسپور آسپرژیلوس می‌تواند در شرایط مساعد از نظر رطوبت، درجه حرارت و pH موجود در مغزهای آجیلی از جمله پسته و بادام زمینی رشد کرده و تولید آفلاتوکسین نماید که این سم می‌تواند در بافت‌های کبدی تجمع نموده و باعث سرطان کبد شود(۲،۱).

یکی از راه‌های جلوگیری و کاهش این مشکل، استفاده از پوشش/ فیلم‌های خوراکی در مغز پسته می‌باشد. پوشش‌های خوراکی می‌توانند حاوی مواد فعال (ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، آنتی بیوتیک و غیره) باشند که رهایش ماده فعال از پوشش/ فیلم به ماده غذایی می‌تواند ماندگاری فراورده غذایی را افزایش داده و سلامت آن‌ها را از نظر میکروبی تامین نماید. پوشش/ فیلم‌های خوراکی فعال باعث کاهش، مهار و یا به تعویق انداختن رشد میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی می‌گردند. پوشش‌های خوراکی لایه نازکی از مواد طبیعی هستند که سطح ماده غذایی را در بر می‌گیرند و به صورت محافظ عمل می‌کنند و به این ترتیب از بروز تغییرات نامطلوب در طعم، بافت و خواص ظاهری مواد غذایی جلوگیری می‌نمایند. برای تهیه پوشش/ فیلم‌های خوراکی می‌توان از پروتئین‌های خوراکی با منشاء گیاهی و حیوانی (زئین، گلوتن، گندم، سویا، بادام زمینی، ژلاتین، کازئین،پروتئین آب پنیر و غیره) یا از پلی ساکاریدها استفاده نمود. این پوشش‌ها را می‌توان از طریق غوطه‌وری، به صورت یک لایه پیوسته بر روی محصول مورد نظر تهیه کرد(۳). دیواره سلولی مخمر ساکارومیسس سرویزیه[5] شبکه‌ای متشکل از ۶-۱ β گلوکان با زنجیره‌های جانبی ۳-۱ β گلوکان است که به مانوپروتئین‌های گلیکوزیله متصل شده‌اند. پروتئین‌ها به همراه گلوکان‌ها، سایت‌های باندکننده بسیار زیادی را فراهم نموده‌اند که می‌توانند با مکانیزم‌های متفاوت با گروه‌های عاملی متفاوت کنش متقابل داشته باشند. حتی می‌توانند در تعامل با سایر میکروارگانیزم‌ها قرار بگیرند. گزارش شده که مانان مشتق شده از دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه به دلیل ظرفیت باند کنندگی بالا می تواند سبب جذب آکراتوکسین A و نیز اثرات بازدارنده بر آفلاتوکسین B_1 باشد(۵،۴). اخیراً نیز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان و آنتی‌موتاژن شناخته شده که می تواند در جلوگیری از انواع سرطان ها دخالت داشته باشد(۶، ۷). هم چنین به عنوان یک ماده بیواکتیو آلی می تواند در سیستم غذایی دام‌ها به کار رود و توسط پروتئین لکتین با پاتوژن‌هایی مثل اشرشیا کولی[6] ترکیب و آن‌ها را از سیستم گوارشی حیوان خارج کند(۸). تاکنون اثر ترکیبات زیادی از جمله روغن تیمول، روغن سینامون، عصاره مریم گلی، عصاره آویشن شیرازی، عصاره ریشه گیاه باریجه، اسانس گیاه درمنه و مرزه، روغن‌های اسانسی زیره سبز کاکوتی و سیاه دانه و غیره، بر رشد آسپرژیلوس مورد بررسی قرار گرفته‌اند. هم‌چنین به منظور بررسی اثر پوشش‌های فعال بر رشد آسپرژیلوس در پسته نیز تحقیقات زیادی از جمله پوشش متیل سلولز حاوی سوربات پتاسیم، پوشش کیتوزان، پوشش کنسانتره آب پنیر و عصاره آویشن شیرازی، بررسی شده است(۱۶،۱-۹).

اهداف این مطالعه بررسی اثر مانوپروتئین استخراج شده از دیواره سلولی ساکارومیسس سرویزیه به عنوان یک ترکیب زیست فعال بر روی رشد و نابودی قارچ آسپرژیلوس فلاووس مولد سم آفلاتوکسین درپسته می‌باشد.

1. *Aspergillus flavus*
2. *Aspergillus parasiticus*
3. *Aspergillus nomius*
4. *Aspergillus pseudotamarii*
5. *Saccharomyces cerevisiae*
6. *E.coli*

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:58 +0330 on Wednesday October 18th 2017

مواد و روش ها

سویه‌های استاندارد از مرکز کلکسیون میکروبی و قارچی ایران وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری گردید. محیط کشت های مورد استفاده از شرکت بتاژن (مشهد، ایران) تهیه گردید. ژلاتین تیپ B (گاوی) از شرکت سیگما، گلیسرول (به عنوان پلاستی سایزر) از شرکت مرک و سایر مواد و محلول شیمایی از شرکت‌های معتبر وارد کننده محصولات سیگما و مرک در ایران تهیه گردید. رقم اکبری پسته از ایستگاه تحقیقات پسته دامغان در شهریور ماه ۱۳۹۴ تهیه شد.

استخراج مانان از مخمر

ابتدا مخمر ساکارویسس سرویزیه (PTCC 5052) از حالت لیوفیلیزه خارج و در محیط YM[1] آگار (حاوی ۰/۱ درصد گلوکز، ۰/۳درصد عصاره مخمر، ۰/۵درصد پپتون و ۰/۳ درصد عصاره مالت و ۲ درصد آگار) کشت گردید. پس از آن یک لوپ کامل از کلنی خالص مخمر به یک ارلن مایر ۱۰۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط YM براث[2] منتقل و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در دور ثابت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سلول‌های مخمر به وسیله چند مرحله سانتریفوژ محیط کشت محلول در شرایط g× ۴۵۰۰ برای مدت ۱۰ دقیقه و سه مرتبه شستشو با آب سرد دی یونیزه جدا شدند. رسوب حاصل در محلول بافر ۰/۱ مولار سیترات پتاسیم و ۰/۰۲ مولار متا بی سولفیت پتاسیم در pH = ۷ به مدت ۲ ساعت اتوکلاو گذاری شد. مانوپروتئین محلول حاصله پس از سانتریفوژ (g ×۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) به وسیله سه حجم اتانول اسیدی حاوی ۱ درصد اسید استیک در اتانول ۹۶درصد، رسوب داده شد. جهت کامل شدن رسوب، نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری و سپس در g × ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. جهت خلوص بیش‌تر، از ستاولون (هگزا دسی تری متیل آمونیم بروماید) به عنوان یک حلال آلی برای رسوب انتخابی و خالص‌سازی مانوپروتئین از گلوکان‌ها و دیگر ماکرومولکول‌ها استفاده شد. رسوب حاصله در مقابل آب مقطر توسط کیسه‌های دیالیز (حد نهایی وزن مولکولی ۱۰ کیلو دالتون، Sigma) به ضخامت ۳۰میکرومتر به مدت ۴۸ ساعت دیالیز و سپس با خشک کن انجمادی (Ehrisa 317, Germany) خشک گردید(۱۸،۱۷).

تهیه سوسپانسیون قارچی

آسپرژیلوس فلاووس (PTCC 5004) از ویال لیوفیلیزه در محیط سابوراد دکستروز براث (SDB)[3] فعال گردید و سپس در محیط پوتیتودکستروز آگار (PDA)[4] به صورت شیبدار در درجه حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۷ روز کشت شد. اسپورها پس از برداشت از محیط کشت به آب مقطر استریل حاوی توین ۸۰ (۰/۰۱ درصد) منتقل و به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط گردید و ۵ دقیقه اجازه داده شد تا قطعات سنگین ته نشین شوند. تعداد اسپورهای موجود در سوسپانسیون حاصل توسط لام نئوبار (boeco,0/0025 mm2, Germany) شمارش و در نهایت در غلظت ۱×۱۰^{۷} اسپور در میلی لیتر استاندارد گردید(۱۹).

تعیین فعالیت ضد قارچی (MIC و MFC) مانان

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) از دو روش رقیق‌سازی متوالی (ماکرودایلوشن) لوله‌ای و پلیت استفاده شد. قبل از انجام آزمون و به منظور سنجش اثر غلظت مانان بر رشد آسپرژیلوس، مقادیر مشخصی از پودر مانان در حجم مشخص آب مقطر استریل حل شد و محلول‌های مانان با غلظت‌های شامل ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. پس از آن در لوله‌های

1. Yeast mold agar
2. Yeast mold broth
3. Sabouraud dextrose broth
4. Potato dextrose agar

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:58 +0330 on Wednesday October 18th 2017

آزمایش حاوی محیط کشت استریل، حجم یکسانی از هر غلظت محلول مانان ریخته شد و به هر لوله آزمایش مقدار $۱۰^{۷}$ ×۱ آسپرژیلوس فلاووس تلقیح شد. پس از گرم‌خانه‌گذاری (۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت)، مشاهده گردید در هیچ یک از لوله‌های آزمایش، آسپرژیلوس رشد ننموده است. بنابراین مبنای ارزیابی حداقل غلظت مهارکننده، غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. با استفاده از نتایج حاصل، از غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رقت‌های متوالی دو تایی تهیه شد و مورد آزمون به روش‌های لوله‌ای و پلیت قرار گرفت.

روش لوله‌ای: در لوله‌های آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و محیط کشت پوتیتو دکستروز براث، غلظت‌های ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ و ۰/۰۷۸ میلی‌گرم بر میلی لیتر مانان تهیه گردید به هر لوله اسپور قارچ برابر با غلظت ۱× $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر اضافه گردید. یک لوله به عنوان شاهد مثبت (حاوی محیط کشت و اسپورهای قارچ) و یک لوله به عنوان شاهد منفی (حاوی محیط کشت و مانان) در نظر گرفته شد. لوله‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت (بر اساس روش رزاقی ابیانه و همکاران، ۲۰۰۹) گرم‌خانه‌گذاری گردید و پس از این مدت، کدورت لوله‌ها از نظر درجه رشد یا عدم رشد مورد ارزیابی بصری قرار گرفت. علاوه بر آن از هرکدام از نمونه‌های مورد آزمایش، کشت مجدد در محیط جامد (PDA) به عمل آمد که نتایج آن‌ها ثبت و قضاوت بر آن مبنا به عمل آمد(۲۲). MIC در پلیت‌های حاصل از کشت پلیتی است که کاهش رشد قارچ در آن غلظت از ماده مورد موردنظر (مانان) در مقایسه با پلیت شاهد مثبت مشهود است. MFC پلیتی است که در آن غلظت از ماده مورد نظر و در مقایسه با پلیت شاهد مثبت هیچ رشد قابل ملاحظه قارچی حتی پس از انکوباسیون کشت‌های مجدد مشهود نیست.

روش پلیت: در روش پلیت حجمی از غلظت‌های آماده شده مانان به گونه‌ای در پلیت قرار داد شد که غلظت نهایی مانان در پلیت شامل ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ و ۰/۰۷۸میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. برای این منظور ابتدا محلول مانان به یک گوشه پلیت‌های استریل خالی منتقل و به گوشه دیگر هر پلیت با احتیاط محیط کشت PDA مذاب ریخته شد و هر پلیت به آرامی به صورت پورپلیت چرخانده شد تا محلول مانان کاملاً با محیط کشت مخلوط گردد. پس از جامد شدن محیط‌ها، هر پلیت به روش کشت سطحی توسط یک سواپ پنبه‌ای با اسپور قارچ آسپرژیلوس فلاووس تلقیح شد. در نهایت پلیت‌ها در شرایط ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید. در این جا MIC پلیتی با کم‌ترین غلظت مانان است که در آن هیچ رشدی مشاهده نمی‌گردد(۱۱،۹).

بررسی اثر ضد قارچی به روش چاهک

از سوسپانسیون قارچی آسپرژیلوس فلاووس به صورت کشت خطی و شطرنجی بر روی محیط PDA تلقیح شد. در محیط چهار چاهک به قطر ۵ میلی‌متر در شرایط استریل به کمک پیپت پاستور ایجاد گردید و در چاهک‌های ایجاد شده محلول مانان با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. این عمل برای هر غلظت مانان سه بار تکرار و در نهایت میانگین قطر هاله محاسبه گردید(۱).

تهیه پوشش خوراکی و پوشش دهی پسته

دانه‌های پسته ابتدا با دست پوست‌گیری شده و مغز پسته‌ها با قرار دادن در ظروف درب دار شیشه‌ای استریل (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) گردید. برای تهیه پوشش خوراکی ابتدا پودر ژلاتین در آب دیونیزه در حمام آب داغ ۵۵ درجه سانتی‌گراد حل شد و پس از سرد شدن، مانان و گلیسرول (به عنوان پلاستی سایزر) با نسبت های متفاوت طبق جدول شماره ۱ (به طور کلی ۵

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:58 +0330 on Wednesday October 18th 2017

درصد ماده جامد) اضافه و محلول حاصل توسط دستگاه توراکس (ultra torax IKA T25D, Germany) همگن گردید. مغز پسته به صورت غوطه‌وری به مدت ۱۵ دقیقه در محلول‌های پوشش قرار داده شد و پس از قرار گرفتن بر روی توری استیل و خارج شدن محلول‌های اضافی در آون ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا رطوبت مشخص خشک گردید. رطوبت پسته ها در این مرحله ۱۵ درصد در نظر گرفته شد که برای رشد قارچ مناسب باشد(۱۹).

جدول شماره ۱ : نسبت مواد جامد در پوشش خوراکی در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه

شماره نمونه	ژلاتین (گرم)	مانان (گرم)	گلیسرول (گرم)
۱	۵	۰	۲
۲	۴/۵	۰/۵	۲
۳	۴	۱	۲
۴	۳/۵	۱/۵	۲

به منظور ارزیابی تاثیر محلول مانان بر رشد قارچ نیز، با حل کردن مقدار مشخصی از پودر مانان در آب دیونیزه، محلول‌های مانان با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر تهیه شد و بر روی سطح پسته با استفاده از یک سرنگ استریل اسپری شد.

ارزیابی فعالیت ضد قارچی پوشش پسته

پسته‌های پوشش شده در شرایط استریل در داخل پلیت‌های استریل با قطر ۹۰ میلی‌متر قرار داده شدند. سپس براساس روش Aldras و همکاران (۲۰۱۵) به میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ آسپرژیلوس به مرکز هندسی پلیت‌ها بر روی پسته‌ها تلقیح گردید. پلیت‌ها در ظروف پلاستیکی که در کف آن‌ها آب قرار داشت و شرایط رطوبتی لازم را فراهم می‌کند، قرار داده شد و به گرمخانه دارای دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیده و رشد قارچ روزانه مورد ارزیابی قرار گرفت(۱۸).

سه گروه نمونه به این ترتیب آماده سازی شد:

گروه کنترل: مغز پسته بدون پوشش

گروه پوشش دار: مغز پسته پوشش شده

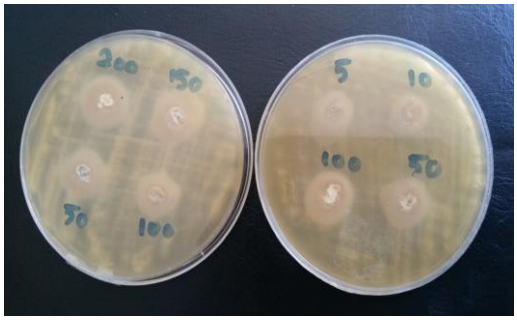
گروه اسپری شده: مغز پسته اسپری شده با محلول مانان

آنالیز آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ و روش‌های آماری توصیفی داده‌ها پردازش شد.

یافته ها

کم‌ترین غلظت مهارکننده (MIC) و کم‌ترین غلظت کشندگی (MFC) بعد از سه بار تکرار برای مانوپروتئین (مانان) حاصل از دیواره سلولی مخمر ساکارومیسس سرویزیه علیه آسپرژیلوس فلاووس در هر دو روش لوله‌ای و پلیت به ترتیب برابر با ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. میانگین قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک‌های حاوی غلظت‌های متفاوت مانان شامل ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از سه بار تکرار به ترتیب برابر با ۵/۲۶، ۶/۷۶، ۸/۶۶، ۱۱/۳۳، ۱۲/۱۶، ۱۳/۶۶ میلی‌متر بود. نتایج این مرحله نشان داد محلول‌های مانان مخمر ساکارومیسس به خوبی باعث مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت می‌گردد. تصویر شماره ۱، هاله عدم رشد ایجاد شده در آزمایشات را نشان می‌دهد. در جدول شماره ۲ کلیه نتایج آورده شده است.



تصویر شماره ۱: هاله عدم رشد ایجاد شده توسط محلول مانان با غلظت های متفاوت (۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ میکروگرم بر میلی لیتر) بر رشد آسپرژیلوس فلاووس در روش انتشار در چاهک

جدول شماره ۳، ارزیابی رشد قارچ آسپرژیلوس در گروه‌های پسته‌های پوشش شده و کنترل را نشان می‌دهد. در پسته‌هایی که به عنوان گروه کنترل، هیچ گونه

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:58 +0330 on Wednesday October 18th 2017

تیماری (عدم پوشش دهی و عدم وجود مانان) بر روی آن‌ها اعمال نشده است، میسلیای قارچ آسپرژیلوس فلاووس پس از ۲ روز، تمام سطح پلیت‌های حاوی مغز پسته را پوشاند. در گروه اسپری شده با محلول مانان نیز میسلیای قارچ به طور کامل سطح پلیت را پس از ۴ روز فرا گرفت. در گروه پوشش دیده، تا پایان روز سوم محدودیت رشد کاملاً مشهود است که در مقادیر بالاتر مانان، غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم تعویق رشد تا روز ششم مشاهده شد. تصویر شماره ۲، رشد میسیلیوم بر روی گروه‌های پسته مورد آزمون و نیز پسته طبیعی سالم بدون تلقیح اسپور را نشان می‌دهد که می‌توان منطقه رشد و گسترش قارچ بر روی پسته را مشاهده نمود.

جدول شماره ۲: ارزیابی رشد آسپرژیلوس فلاووس در حضور غلظت های متفاوت مانان در روش های متفاوت

غلظت مانان $\mu g\ ml^{-1}$	رشد آسپرژیلوس در روش لوله ای	رشد آسپرژیلوس در پلیت تکمیلی روش لوله ای	رشد آسپرژیلوس در روش پلیت	هاله عدم رشد آسپرژیلوس در روش چاهک (mm)
۰/۲	–*	–	–	۱۳/۶۶
۰/۱۵	–	–	–	۱۲/۱۶
۰/۱	–	–	–	۱۱/۳۳
۰/۰۵	–	–	–	۸/۶۶
۰/۰۱	–	–	–	۶/۷۶
۰/۰۰۵	– (MIC)	+** (MFC)	– (MIC)	۵/۲۶
۰/۰۰۵>	+	+	+	۰

*: عدم رشد **: رشد

تصویر شماره ۲: رشد آسپرژیلوس بر روی پسته گروه کنترل(۱)، پسته اسپری شده(۲)، پسته پوشش دار(۳) و پسته شاهد (بدون تلقیح آسپرژیلوس)(۴) پس از ده روز

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مانوپروتئین موجود در دیواره سلولی مخمر ساکارومیسس سرویزیه دارای اثر ضدقارچی بر رشد آسپرژیلوس فلاووس می‌باشد. هم‌چنین یافته‌ها حاکی از آن است که پوشش ژلاتینی حاوی مانان بر روی مغز پسته باعث مهار و به تعویق انداختن رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس می‌گردد. با افزایش غلظت مانان در پوشش، تاثیر مهارکنندگی قارچ نیز بالاتر است.

Armando و همکاران (۲۰۱۳) اثر دو گونه ساکارومیسس سرویزیه را بر ضدآسپرژیلوس کاربوناریوس[1] در شرایط محیطی متفاوت (درجه حرارت، دسترسی اکسیژن، فعالیت آبی و PH) بررسی نمودند. نتایج نشان داد هر دو گونه مخمر فعالیت آنتاگونیستی و کاهنده نرخ رشد و تولید توکسین در مقابل آسپرژیلوس دارند(۲۰).

Muñoz و همکاران (۲۰۱۰) گزارش دادند که مخمر ساکارومیسس سرویزیه و اسید لاکتیک باکتری دارای اثر ممانعت کنندگی بر رشد و تولید توکسین در آسپرژیلوس نومیوس می‌باشند(۲۱). محققین بسیاری بر روی اثرات ساکارومیسس و محصولات جانبی آن از جمله دیواره سلولی، جسم سلولی اتولیز شده مخمر و یا مخمر زنده بر کاهش میزان آفلاتوکسین مطالعه نموده و

جدول شماره ۳: ارزیابی رشد قارچ آسپرژیلوس در گروه های پسته پوشش شده، پسته اسپری شده و کنترل

گروه نمونه پسته	غلظت مانان	رشد آسپرژیلوس فلاووس						
		روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم
کنترل	۰	–*	+**	+ +***	+ +	+ +	+ +	+ +
پسته پوشش دار	٪ ۰	–	–	–	–	–	+	+
	٪ ۰/۵	–	–	–	–	–	+	+
	٪ ۱	–	–	–	–	–	+	+
	٪۱/۵	–	–	–	–	–	–	–
پسته اسپری شده	۰/۰۰۰۵ ($\mu g\ ml^{-1}$)	–	–	_	+	+	+ +	+ +
	۰/۰۰۱ ($\mu g\ ml^{-1}$)	–	–	–	+	+	+ +	++

*: عدم رشد **: رشد میسلیومی (رنگ سفید) ***: رشد میسلیوم و تولید اسپور (کلنی سفید و سبز رنگ)

1. Aspergillus carbonarius

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:58 +0330 on Wednesday October 18th 2017

لـذا ایـن مخمـر و محصـولات آن را بـه عنـوان کاهنـده آفلاتوکسین و جزء دسته mycotoxin binders تقسیم‌بندی نموده‌انـد. توانـایی ایـن مخمـر در کـاهش آفلاتوکسـین مربـوط بـه اجـزاء دیـواره سـلولی از جملـه گلوکـان، گلوکومانـان و مـانوپروتئین اسـت کـه مـی‌تواننـد بـا آفلاتوکسین پیوند برقرار کنند و لـذا آن‌هـا را از محـیط خارج کنند(۲۲،۲۱).

تـاکنون مطالعـه‌ای در زمینـه اثـر ترکیبـات دیـواره سلولی بر رشد قارچ آسپرژیلوس انجام نشده و لذا نتایج به دست آمده در این پژوهش است که نشان دهنده تاثیر مهارکنندگی مانوپروتئین دیواره سـلولی ساکارومیسـس سرویزیه بر رشد قارچ آسپرژیلوس است. با توجه بـه آن که پسته یکی از محصولات غذایی بسیار مهم اسـت کـه ایمنی و کیفیت آن به شدت به رشد و تولید سم توسـط این قارچ وابسته است، به طوری که میزان آفلاتوکسـین یکی از نقص‌های بحرانی محصول به شمار می‌آیـد، لـذا در این پژوهش ارزیابی تاثیر مانان بر رشـد آسـپرژیلوس بر روی پسته به دو روش انجام گردیـد. در روش اول از مانان در فرمولاسـیون یـک پوشـش خـوراکی (پوشـش ژلاتینی) با غلظت‌های متفاوت استفاده گردید که نتـایج نشان می‌دهد با بالا رفتن غلظت مانـان در ترکیـب پوشـش، خاصیت مهارکنندگی و تعویـق انـداختن رشـد افـزایش می‌یابد؛ بنابراین این پوشش خوراکی فعال مـی‌توانـد بـه عنوان ابزاری مناسب برای کاهش رشد آسـپرژیلوس در پسته استفاده شود که این امر در نهایت منجر بـه کـاهش میزان تولید آفلاتوکسـین نیـز خواهـد گردیـد. در روش دوم محلول مانان که حاصل حل کردن مقـدار مشـخص مانان در آب دیونیزه می‌باشد، بر روی پسته اسپری شـد. در این روش نیز کاهش رشد قارچ بر روی پسته مشاهده شد اما میزان تاثیر، کـم‌تـر از پوشـش مانـان (روش اول) بود. این امر نشان می‌دهد که استفاده از مانان در ترکیب پوشـش خـوراکی ژلاتینـی در کـاهش و تعویـق رشـد آسپرژیلوس موثرتر است. پوشش خوراکی بـا توجـه بـه آن‌که یک لایه پیوسته و با نفوذپـذیری کـم را بـر روی سطح مغز پسته ایجاد مـی کنـد، لـذا دسترسـی قـارچ بـه مواد غذایی و رطوبت را کاهش مـی‌دهـد، پـس مـی‌توانـد بیش‌تر سبب مهار رشد آسپرژیلوس شود. هم‌چنین مانـان موجود در پوشش با رهایش تدریجی در این روش، بهتر توانسته اثر مهارکنندگی بر رشد آسپرژیلوس بر مغز پسته داشته باشد.

قنبـرزاده و همکـاران (۱۳۹۰)، بـا بررسـی اثـرات ضدمیکروبی فیلم خوراکی بر پایـه کربوکسـی متیـل سـلولز (CMC) حاوی سوربات پتاسیم بر آسپرژیلوس فلاووس (PTCC5004) و آسـپرژیلوس پـارازیتیکوس بـا روش انتشار آگار دریافتند که ایـن پوشـش اثـر مهارکننـدگی رشـد علیـه قـارچ هـای مـورد نظـر دارد و در پسـته‌هـای پوشش شده با آن، رشدی از کپک آسپرژیلوس مشاهده نشـد(۱). مقصـودلو و همکـاران (۱۳۹۱)، بـا مطالعـه اثـر پوشش خـوراکی کیتـوزان بـر رشـد آسـپرژیلوس نشـان دادند بـا افـزایش غلظـت کیتـوزان در ترکیـب پوشـش، اثرات ضد قارچی آن افزایش می‌یابد(۱۲). توکلی پـور و همکـاران (۱۳۸۹) نشـان دادنـد کـه پوشـش خـوراکی کنسانتره پروتئینی آب پنیر حاوی عصاره مریم گلـی بـر روی پسته می‌تواند سبب مهار رشـد آسـپرژیلوس فـلاووس گردد(۱۳). مصلحی و همکاران (۱۳۹۲)، گـزارش دادنـد پوشـش خـوراکی متیـل سـلولز در مغـز پسـته مـی‌توانـد رشـد قـارچ آسـپرژیلوس را کـاهش دهـد(۳). Manso و همکـاران (۲۰۱۴) دریافتنـد بسـته‌بنـدی فعـال پروپیلنـی حاوی روغن سـینامون[1] مـی‌توانـد از رشـد آسـپرژیلوس فـلاووس جلـوگیری نمـوده و اثـرات کاهنـده بـر میـزان آفلاتوکسین دارد(۱۶). لذا نتایج تحقیق حاضر در توافـق با نتایج سایر محققین از نظر اثر پوشش‌های فعال بر رشد آسپرژیلوس فلاووس در پسته می‌باشد. بنـابر نتـایج ایـن پژوهش می‌توان اذعان داشـت کـه مـانوپروتئین دیـواره سـلولی مخمـر ساکارومیسـس سـرویزیه یـک ترکیـب گلیکوپروتئینی است کـه دارای خاصـیت ضـد میکروبـی علیه آسپرژیلوس فلاووس است. کاربرد آن در ترکیـب

1. Cinnamon oil

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:58 +0330 on Wednesday October 18th 2017

پوشش خوراکی ژلاتینی نشان می دهد که می توان از آن به عنوان یک ماده زیست فعال[1] مناسب در پوشش ها و فیلم‌های خوراکی با اثر ضد قارچی برای مواد غذایی استفاده نمود. با توجه به آن که مخمر ساکارومیسس سرویزیه یا مخمر نان یک میکروارگانیسم سازگار با بدن انسان و محیط زیست و کاملاً ایمن شناخته شده و در لیست GRAS قرار دارد[2]، بنابراین ترکیبات به دست آمده ازجمله ترکیبات دیواره سلولی نیز از ایمنی بالایی برخوردار بوده و می‌تواند جایگزین مناسبی برای مواد ضدقارچی شیمیایی باشد. امروزه مبارزه با رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین یکی از چالش‌های بحرانی در امر تولید، توزیع، مصرف و صادرات و واردات پسته و سایر مغزهای آجیلی در تمامی کشورهای دنیاست. از سوی دیگر نگرانی‌های استفاده از مواد شیمیایی یا سنتتیک و آلاینده محیط زیست فزونی می‌یابد. بنابراین تحقیق و کاربرد ترکیبات زیست فعال سازگار با محیط زیست و بدن انسان از جایگاه والایی برخوردار است. در نهایت این که می‌توان از مانان حاصل از مخمر ساکارومیسس به عنوان یک افزودنی ایمن و بر پایه غذایی (food grade) مناسب در صنایع غذایی در جهت مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس و کاهش آفلاتوکسین استفاده نماییم.

سپاسگزاری

این مقاله بر اساس طرح پژوهشی شماره ۳ گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است. لذا بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Ghanbarzadeh B, Saianjali S, Ghiyasifar SH. Antifungal properties of CMC-based films containing potassium sorbate on selected Aspergillus strains in pistachio. Journal of FoodScience Technology 2011; 32(8): 43-50 (Persian).
2. Marín S, Ramos A, Sanchis V. Modelling Aspergillus flavus growth and aflatoxins production in pistachio nuts. Food Microbiol 2012; 32(2): 378-388.
3. Moslehi Z, Araghi M, Moslehi M. Shelf life effect of CMC edible coating in pistachio nuts. Journal of Olom & fonon 2013; 4(14): 62-69 (Persian).
4. Kogan G, Kocher A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. Livestock Science 2007; 109(1-3): 161-165.
5. Kogan G, Paviak V, Sandula J, Masler L. Structure of cell wall mannans of the pathogenic yeast of candida species-A complex insight. Carbohydrate Polymers 1991; 14(1): 65-76.
6. Kogan G, Pajtinka M, Babincova M, Miadokova E, Rauko P, Korolenko TA, et al. Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: Can they fight cancer? Neoplasma 2008; 55(5): 387-391.
7. Krizková L, Zitnanová I, Mislovicová D, Masárová J, Sasinková V, Duracková Z,etal. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: Mannan–human serum albumin and mannan–penicillin G acylase. Mutat Res 2006; 606(1-2): 72–79.
8. Liu HZ, Qiang W, He Y. Immunoactivities and antineoplastic activities of Saccharomyces cerevisiae mannoprotein. Carbohydrate Polymers 2011; 83(4): 1690–1695.

1. bioactive
2. GRAS (generally recognize as safe)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 21:58 +0330 on Wednesday October 18th 2017

9. Minoueian Haghighi MH, khosravi A. The effect of the herbal essences on the two important species of Aspergillus. OFOGH-E-DANESH 2010; 16(4): 6-16 (Persian).
10. Enayati M, Bayat M, Mohsenifar A. Effect of nanochitosan contain plant essence on Aspergilluse strains from fish powder produced Mazandaran province factories. Patobiology 2014; 11(2): 1303-1310 (Persian).
11. Salehi M, Hashemi Karuie SM, Nasrolahi Omran A, Mobini M, Asghar Hedari M. Antifungal activity of vitro aqueous and alcoholic extracts of Barije root (Ferula gummosa). Journal of Birjand University of Medical Sciences 2015; 21(4): 444-450 (Persian).
12. Maghsoudluo A, Maghsoudlou Y, Khomairi M, Ghorbani M. Evaluation of antifungal activity of chitosan and its effect on the moisture absorption and organoleptic characteristics of pistachio nuts. Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology 2012; 1(2): 87-98 (Persian).
13. Tavakolipour H, Javanmard M, Zirjani L. Inhibitory effect of edible coating on pistachio nut with whey protein concentrate and Avishan on Aflatoxin production. JFST 2011; 36(9): 11-19 (Persian).
14. Javanmard M. Usage of Edible coating containing *Saliva officinalis* alcoholic extract on inhibitory of Aspergillus Flavus growth on pistachio nuts. Iranian Journal of Food Science and Technology 2012; 9(34): 85-93 (Persian).
15. Manso S , Pezo D, Gómez-Lus R, Nerín C. Diminution of aflatoxin B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil. Food Control 2014; 45: 101-108.
16. Lukondeh T, Ashbolt NJ, Rogers PL. Evaluation of Kluyveromyces marxianus as a source of yeast autolysates. J Ind Microbiol Biotechnol 2003; 30(1): 52-56.
17. Liu HZ1, Wang Q, Liu XY, Tan SS. Effects of spaceflight on polysaccharides of Saccharomyces cerevisiae cell wall. Appl Microbiol Biotechnol 2008; 81(3): 543-550.
18. Aldars-García L, Ramos A, Sanchis V, Marín S. An attempt to model the probability of growth and aflatoxin B1 production of Aspergillus flavus under non-isothermal conditions in pistachio nuts. Food Microbiol 2015; 51: 117-129.
19. Armando MR, Dogi CA, Poloni V, Rosa CAR, Dalcero AM, Cavaglieri LR. In vitro study on the effect of Saccharomyces cerevisiae strains on growth and mycotoxin production by Aspergillus carbonarius and Fusarium graminearum. Int J Food Microbiol 2013; 161(3): 182-188.
20. Muñoz R1, Arena M.E, Silva J, González S. Inhibitio of mycotoxin-producing Aspergillus nomius VSC 23 by Acid lactic bacteria and Saccharomyces cerevisiae. Braz Microbiol 2010; 41(4): 1019-1026.
21. Gonçalves BL, Rosim R, Oliveira C, Corassin C. The in vitro ability of different Saccharomyces cerevisiae Based products to bind aflatoxin B1. Food Control 2015; 47: 298-300.
22. Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee MB, Jaimand K, Alinezhad S, Saberi R, et al. Chemical composition and antiaflatoxigenic activity of Carum carvi L., Thymus vulgaris and Citrus aurantifolia essential oils. Food Control 2009 20(11): 1018-1024.