

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

Anna Abdolshahi¹,
Farideh Tabatabaiee Yazdi²,
Ali Akbar Shabani³,
Seyed Ali Mortazavi²,
Abdolreza Mohammadi Nafchi⁴

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).

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 ضد میکروبی و آنتی توکسینی است. در این مطالعه اثرات ضد قارچی 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 اندازه گیری و اثر مهارکنندگی 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 کم ترین 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 می توان برای نگهداری مواد غذایی از جمله پسته در جهت کاهش رشد آسپرژیلوس فلاووس و نهایتاً کاهش مقدار تولید آفات توکسین استفاده نمود.

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

مقدمه

پسته یکی از مهم ترین 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 می گردد. بارزترین مشکل در امر صادرات پسته، مقررات سختگیرانه

در زمینه میزان آفات توکسین موجود در پسته می باشد. این مسئله در سال های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. و تلاش های زیادی برای پیشگیری از تولید و یا کاهش آفات توکسین پسته به عمل آمده است. زیرا ضرر و زیان اقتصادی غیر مستقیم زیادی از طریق برگشت محصول

E-mail: tabatabai@um.ac.ir

مؤلف مسئول: فریده طباطبایی - مشهد: دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی

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

پسته دارای آفلاتوکسین بیش از حد مجاز استاندارد برای تولید کنندگان و صادر کنندگان و در نهایت جایگاه کشور عزیزمان ایران در بازارهای تجارت جهانی ایجاد می گردد (۱). آفلاتوکسین ها گروهی از متابولیت های ثانویه سرطان زا و سمی تولید شده توسط گونه هایی از آسپرژیلوس مانند آسپرژیلوس فلاووس^۱، آسپرژیلوس پارازیتیکوس^۲، آسپرژیلوس نومیوس^۳ و آسپرژیلوس سودوتاماری^۴ می باشند. اسپور آسپرژیلوس می تواند 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 می تواند در بافت های کبدی تجمع نموده و باعث سرطان کبد شود (۱، ۲).

یکی از راه های جلوگیری و کاهش این مشکل، استفاده از پوشش / فیلم های خوراکی در مغز پسته می باشد. پوشش های خوراکی می توانند حاوی مواد فعال (ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، آنتی بیوتیک و غیره) باشند که رهایش ماده فعال از پوشش / فیلم به ماده غذایی می تواند ماندگاری فراورده غذایی را افزایش داده و سلامت آن ها را از نظر میکروبی تامین نماید. پوشش / فیلم های خوراکی فعال باعث کاهش، مهار و یا به تعویق انداختن رشد میکروارگانیسم ها در مواد غذایی می گردند. پوشش های خوراکی لایه نازکی از مواد طبیعی هستند که سطح ماده غذایی را در بر می گیرند و به صورت محافظ عمل می کنند و به این ترتیب از بروز تغییرات نامطلوب در طعم، بافت و خواص ظاهری مواد غذایی جلوگیری می نمایند. برای تهیه پوشش / فیلم های خوراکی می توان از پروتئین های خوراکی با منشأ گیاهی و حیوانی (زئین، گلوتن، گندم، سویا، بادام زمینی، ژلاتین، کازئین، پروتئین آب پنیر و غیره) یا از پلی ساکاریدها استفاده نمود. این پوشش ها را می توان از طریق غوطه وری، به صورت یک لایه پیوسته بر روی

محصول مورد نظر تهیه کرد (۳). دیواره سلولی مخمر ساکارومیسس سرویزیه^۵ شبکه ای متشکل از ۶-۱ β گلوکان با زنجیره های جانبی ۳-۱ β گلوکان است که به مانوپروتئین های گلیکوزیده متصل شده اند. پروتئین ها به همراه گلوکان ها، سایت های باند کننده بسیار زیادی را فراهم نموده اند که می توانند با مکانیزم های متفاوت با گروه های عاملی متفاوت کنش متقابل داشته باشند. حتی می توانند در تعامل با سایر میکروارگانیسم ها قرار بگیرند. گزارش شده که مانان مشتق شده از دیواره سلولی مخمر ساکارومیسس سرویزیه به دلیل ظرفیت باند کنندگی بالا می تواند سبب جذب آکراتوکسین A و نیز اثرات بازدارنده بر آفلاتوکسین B₁ باشد (۴، ۵). اخیراً نیز به عنوان یک آنتی اکسیدان و آنتی موتازن 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 دام ها به کار رود و توسط پروتئین لکترین با پاتوژن هایی مثل اشرشیا کولی^۶ ترکیب و آن ها 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، روغن های اسانسی زیره سبز کاکوتی و سیاه دانه و غیره، بر رشد آسپرژیلوس مورد بررسی قرار گرفته اند. هم چنین به منظور بررسی اثر پوشش های 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 (۱، ۱۶-۹).

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 در پسته می باشد.

1. *Aspergillus flavus*
2. *Aspergillus parasiticus*
3. *Aspergillus nomius*
4. *Aspergillus pseudotamarii*

5. *Saccharomyces cerevisiae*
6. *E.coli*

مواد و روش ها

سویه های استاندارد از مرکز کلکسیون میکروبی و قارچی ایران وابسته به سازمان پژوهش های 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 شرکت های 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 ساکاروویسس سرویزیه (PTCC 5052) از حالت لیوفیلیزه خارج و در محیط YM¹ آگار (حاوی ۰/۱ درصد گلوکز، ۰/۳ درصد عصاره مخمر، ۰/۵ درصد 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 میلی لیتری حاوی ۵۰۰ میلی لیتر محیط YM² براث^۲ منتقل و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در دور ثابت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سلول های مخمر به وسیله چند مرحله سانتریفوژ محیط کشت محلول در شرایط ۴۵۰۰ × g برای مدت ۱۰ دقیقه و سه مرتبه شستشو با آب سرد دی یونیزه جدا شدند. رسوب حاصل در محلول بافر ۰/۱ مولار سترات 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 (۲۵۰۰ × g به مدت ۱۰ دقیقه) به وسیله سه حجم اتانول اسیدی حاوی ۱ درصد اسید استیک در اتانول ۹۶ درصد، رسوب داده شد. جهت کامل شدن رسوب، نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری و سپس در ۸۰۰۰ × g به مدت ۱۰

دقیقه سانتریفوژ گردید. جهت خلوص بیش تر، از ستاولون (هگزا دسی تری متیل آمونیم بروماید) به عنوان یک حلال آلی برای رسوب انتخابی و خالص سازی مانوپروتئین از گلوکان ها و دیگر ماکرومولکول ها استفاده شد. رسوب حاصله در مقابل آب مقطر توسط کیسه های دیالیز (حد نهایی وزن مولکولی ۱۰ کیلو دالتون، Sigma) به ضخامت ۳۰ میکرومتر به مدت ۴۸ ساعت دیالیز و سپس با خشک کن انجمادی (Ehrisa 317, Germany) خشک گردید (۱۷، ۱۸).

تهیه سوسپانسیون قارچی

آسپرژیلوس فلاووس (PTCC 5004) از ویال لیوفیلیزه در محیط سابوراد دکستروز براث^۳ (SDB) فعال گردید و سپس در محیط پوتیتودکستروز آگار (PDA)^۴ به صورت شیدار در درجه حرارت ۲۸ درجه سانتی گراد و به مدت ۷ روز کشت شد. اسپورها پس از برداشت از محیط کشت به آب مقطر استریل حاوی توبین ۸۰ (۰/۱ 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 نوبار (boeco, 0/0025 mm², Germany) شمارش و در نهایت در غلظت 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 قارچ کشی (MFC) از دو روش رقیق سازی متوالی (ماکرودایلوشن) لوله ای 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 محلول های مانان با غلظت های شامل ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. پس از آن در لوله های

3. Sabouraud dextrose broth

4. Potato dextrose agar

1. Yeast mold agar

2. Yeast mold broth

آزمایش حاوی محیط کشت استریل، حجم یکسانی از هر غلظت محلول مانان ریخته شد و به هر لوله آزمایش مقدار 1×10^7 اسپرژیلوس فلاووس تلقیح شد. پس از گرم‌خانه‌گذاری (۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت)، مشاهده گردید در هیچ یک از لوله‌های آزمایش، اسپرژیلوس رشد ننموده است. بنابراین مبنای ارزیابی حداقل غلظت مهارکننده، غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد. با استفاده از نتایج حاصل، از غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر رقت‌های متوالی دو تایی تهیه شد و مورد آزمون به روش‌های لوله‌ای و پلیت قرار گرفت. روش لوله‌ای: در لوله‌های آزمایش حاوی ۱ میلی لیتر 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 میلی گرم بر میلی لیتر مانان تهیه گردید به هر لوله اسپور قارچ برابر با غلظت 1×10^7 اسپور در میلی لیتر 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 ایبانه 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 هر کدام 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 مورد نظر (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 ۰/۰۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر 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 سوپ پنبه‌ای با اسپور قارچ اسپرژیلوس فلاووس تلقیح شد. در نهایت پلیت‌ها در شرایط ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری 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 اسپرژیلوس فلاووس به صورت کشت خطی و شطرنجی بر روی محیط PDA تلقیح شد. در محیط چهار چاهک به قطر ۵ میلی متر در شرایط استریل به کمک پیت پاستور ایجاد گردید و در چاهک‌های ایجاد شده محلول مانان با غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اندازه گیری 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

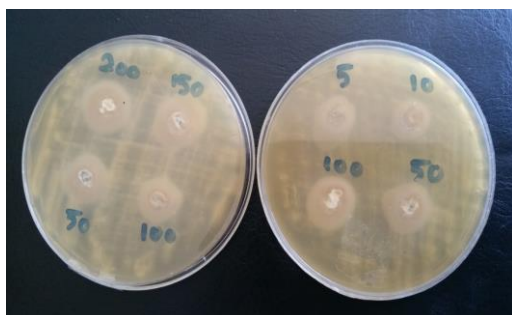
دانه‌های پسته ابتدا با دست پوست گیری شده و مغز پسته‌ها با قرار دادن در ظروف درب دار شیشه‌ای استریل (۱۲۱) درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) گردید. برای تهیه پوشش خوراکی ابتدا پودر ژلاتین در آب دیونیزه در حمام آب داغ ۵۵ درجه سانتی‌گراد حل شد و پس از سرد شدن، مانان و گلیسرول (به عنوان پلاستی سایزر) با نسبت‌های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

آنالیز آماری

نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ و روش های آماری توصیفی داده ها پردازش شد.

یافته ها

کم ترین غلظت مهارکننده (MIC) و کم ترین 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 لوله ای و پلیت به ترتیب برابر با ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. میانگین قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک های حاوی غلظت های متفاوت مانان شامل ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ میکروگرم بر میلی لیتر پس از سه بار تکرار به ترتیب برابر با ۵/۲۶، ۶/۷۶، ۸/۶۶، ۱۱/۳۳، ۱۲/۱۶، ۱۳/۶۶ میلی متر بود. نتایج این مرحله نشان داد محلول های مانان مخمر ساکارومیسس به خوبی باعث مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت می گردد. تصویر شماره ۱، هاله عدم رشد ایجاد شده در آزمایشات را نشان می دهد. 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 گروه های پسته های پوشش شده و کنترل را نشان می دهد. در پسته هایی که به عنوان گروه کنترل، هیچ گونه

درصد ماده جامد) اضافه و محلول حاصل توسط دستگاه توراکس (ultra torax IKA T25D, Germany) همگن گردید. مغز پسته به صورت غوطه وری به مدت ۱۵ دقیقه در محلول های پوشش قرار داده شد و پس از قرار گرفتن بر روی توری استیل و خارج شدن محلول های اضافی در آن ۴۵ درجه سانتی گراد 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، محلول های مانان با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد و بر روی سطح پسته با استفاده از یک سرنگ استریل اسپری شد.

ارزیابی فعالیت ضد قارچی پوشش پسته

پسته های پوشش شده در شرایط استریل در داخل پلیت های استریل با قطر ۹۰ میلی متر قرار داده شدند. سپس براساس روش Aldras و همکاران (۲۰۱۵) به میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ آسپرژیلوس به مرکز هندسی پلیت ها بر روی پسته ها تلقیح گردید. پلیت ها در ظروف پلاستیکی که در کف آن ها آب قرار داشت و شرایط رطوبتی لازم را فراهم می کند، قرار داده شد و به گرمخانه دارای دمای ۲۶ درجه سانتی گراد منتقل گردید 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

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 ضد آسپرژیلوس کاربوناریوس^۱ 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 ممانعت‌کنندگی 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 آفات توکسین مطالعه نموده و

تیماری (عدم پوشش دهی و عدم وجود مانان) بر روی آن‌ها اعمال نشده است، میسلای قارچ آسپرژیلوس فلاووس پس از ۲ روز، تمام سطح پلیت‌های حاوی مغز پسته را پوشاند. در گروه اسپری شده با محلول مانان نیز میسلای 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 میلی گرم 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 غلظت‌های متفاوت مانان در روش‌های متفاوت

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

*: عدم رشد **: رشد



تصویر شماره ۲: رشد آسپرژیلوس بر روی پسته گروه کنترل (۱)،

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

گروه نمونه پسته	غلظت مانان	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم
کنترل	۰	-*	++	+++	++	++	++	++
پسته پوشش دار	۰	-	-	-	-	-	+	++
	۰/۰۵	-	-	-	-	-	+	+
	۱	-	-	-	-	-	+	+
	۱/۵	-	-	-	-	-	-	-
پسته اسپری شده	$0.0005 (\mu\text{g ml}^{-1})$	-	-	-	+	+	++	++
	$0.01 (\mu\text{g ml}^{-1})$	-	-	-	+	+	++	++

***: رشد میسیلیوم و تولید اسپور (کلنی سفید و سبز رنگ)

***: رشد میسیلیومی (رنگ سفید)

*: عدم رشد

1. *Aspergillus carbonarius*

لذا این مخمر و محصولات آن را به عنوان کاهنده آفلاتوکسین و جزء دسته mycotoxin binders تقسیم‌بندی نموده‌اند. توانایی این مخمر در کاهش آفلاتوکسین مربوط به اجزاء دیواره سلولی از جمله گلوکان، گلوکومانان و مانوپروتئین است که می‌توانند با آفلاتوکسین پیوند برقرار کنند و لذا آن‌ها را از محیط خارج کنند (۲۲،۲۱).

تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثر ترکیبات دیواره سلولی بر رشد قارچ آسپرژیلوس انجام نشده و لذا نتایج به دست آمده در این پژوهش است که نشان دهنده تاثیر مهارکنندگی مانوپروتئین دیواره سلولی ساکارومیسس سرویزیه بر رشد قارچ آسپرژیلوس است. با توجه به آن که پسته یکی از محصولات غذایی بسیار مهم است که ایمنی و کیفیت آن به شدت به رشد و تولید سم توسط این قارچ وابسته است، به طوری که میزان آفلاتوکسین یکی از نقص‌های بحرانی محصول به شمار می‌آید، لذا در این پژوهش ارزیابی تاثیر مانان بر رشد آسپرژیلوس بر روی پسته به دو روش انجام گردید. در روش اول از مانان در فرمولاسیون یک پوشش خوراکی (پوشش ژلاتینی) با غلظت‌های متفاوت استفاده گردید که نتایج نشان می‌دهد با بالا رفتن غلظت مانان در ترکیب پوشش، خاصیت مهارکنندگی و تعویق انداختن رشد افزایش می‌یابد؛ بنابراین این پوشش خوراکی فعال می‌تواند به عنوان ابزاری مناسب برای کاهش رشد آسپرژیلوس در پسته استفاده شود که این امر در نهایت منجر به کاهش میزان تولید آفلاتوکسین نیز خواهد گردید. در روش دوم محلول مانان که حاصل حل کردن مقدار مشخص مانان در آب دیونیزه می‌باشد، بر روی پسته اسپری شد. در این روش نیز کاهش رشد قارچ بر روی پسته مشاهده شد اما میزان تاثیر، کم‌تر از پوشش مانان (روش اول) بود. این امر نشان می‌دهد که استفاده از مانان در ترکیب پوشش خوراکی ژلاتینی در کاهش و تعویق رشد آسپرژیلوس موثرتر است. پوشش خوراکی با توجه به آن که یک لایه پیوسته و با نفوذپذیری کم را بر روی

سطح مغز پسته ایجاد می‌کند، لذا دسترسی قارچ به مواد غذایی و رطوبت را کاهش می‌دهد، پس می‌تواند بیش‌تر سبب مهار رشد آسپرژیلوس شود. هم‌چنین مانان موجود در پوشش با رهایش تدریجی در این روش، بهتر توانسته اثر مهارکنندگی بر رشد آسپرژیلوس بر مغز پسته داشته باشد.

قبرزاده و همکاران (۱۳۹۰)، با بررسی اثرات ضد میکروبی فیلم خوراکی بر پایه کربوکی متیل سلولز (CMC) حاوی سوربات پتاسیم بر آسپرژیلوس فلاووس (PTCC5004) و آسپرژیلوس پارازیتیکوس با روش انتشار آگار دریافتند که این پوشش اثر مهارکنندگی رشد علیه قارچ‌های مورد نظر دارد و در پسته‌های پوشش شده با آن، رشدی از کپک آسپرژیلوس مشاهده نشد (۱). مقصودلو و همکاران (۱۳۹۱)، با مطالعه اثر پوشش خوراکی کیتوزان بر رشد آسپرژیلوس نشان دادند با افزایش غلظت کیتوزان در ترکیب پوشش، اثرات ضد قارچی آن افزایش می‌یابد (۱۲). توکلی پور و همکاران (۱۳۸۹) نشان دادند که پوشش خوراکی کنسانتره پروتئینی آب پنیر حاوی عصاره مریم گلی بر روی پسته می‌تواند سبب مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس گردد (۱۳). مصلحی و همکاران (۱۳۹۲)، گزارش دادند پوشش خوراکی متیل سلولز در مغز پسته می‌تواند رشد قارچ آسپرژیلوس را کاهش دهد (۳). Manso و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند بسته‌بندی فعال پروپیلنی حاوی روغن سینامون^۱ می‌تواند از رشد آسپرژیلوس فلاووس جلوگیری نموده و اثرات کاهنده بر میزان آفلاتوکسین دارد (۱۶). لذا نتایج تحقیق حاضر در توافق با نتایج سایر محققین از نظر اثر پوشش‌های فعال بر رشد آسپرژیلوس فلاووس در پسته می‌باشد. بنابر نتایج این پژوهش می‌توان اذعان داشت که مانوپروتئین دیواره سلولی مخمر ساکارومیسس سرویزیه یک ترکیب گلیکوپروتئینی است که دارای خاصیت ضد میکروبی علیه آسپرژیلوس فلاووس است. کاربرد آن در ترکیب

1. Cinnamon oil

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 بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد تشکر و قدردانی می‌گردد.

پوشش خوراکی ژلاتینی نشان می‌دهد که می‌توان از آن به عنوان یک ماده زیست فعال^۱ مناسب در پوشش‌ها 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^۲، بنابراین ترکیبات به دست آمده از جمله 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

References

- Ghanbarzadeh B, Saianjali S, Ghiyasifar SH. Antifungal properties of CMC-based films containing potassium sorbate on selected *Aspergillus* strains in pistachio. *Journal of Food Science Technology* 2011; 32(8): 43-50 (Persian).
- Marín S, Ramos A, Sanchis V. Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. *Food Microbiol* 2012; 32(2): 378-388.
- 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).
- Kogan G, Kocher A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science* 2007; 109(1-3): 161-165.
- 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.
- 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.
- Krizková L, Zitnanová I, Mislovicová D, Masárová J, Sasinková V, Duracková Z, et al. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: Mannan-human serum albumin and mannan-penicillin G acylase. *Mutat Res* 2006; 606(1-2): 72-79.
- 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)

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 *Aspergillus* 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 *Salvia 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. Inhibition 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.