

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. کمترین 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

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

پسته یکی از مهم‌ترین 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

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 می‌گردد (۱). آفلاتوکسین‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه سرطان‌زا و سمی تولید شده توسط گونه‌هایی از آسپرژیلوس مانند آسپرژیلوس فلاووس^۱، آسپرژیلوس پارازیتیکوس^۲، آسپرژیلوس نومیوس^۳ و آسپرژیلوس سودوتاماری^۴ 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 کبیدی 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، آنتی‌بیوتیک و غیره) باشند که رهایش ماده فعال از پوشش/فیلم به ماده غذایی می‌تواند مانند گاری فرآورده 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 منشأ 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^۵ شبکه‌ای متشکل از ۱-۶ β گلوکان با زنجیره‌های جانبی ۱-۳ β گلوکان است که به مانوپروتئین‌های گلیکوزیله متصل شده‌اند. پروتئین‌ها به همراه گلوکان‌ها، سایت‌های باند کننده بسیار زیادی را فراهم نموده‌اند که می‌توانند با مکانیزم‌های متفاوت با گروه‌های عاملی متفاوت کنش متقابل داشته باشند. حتی می‌توانند در تعامل با سایر میکروارگانیسم‌ها قرار بگیرند. گزارش شده که مانان مشتق شده از دیواره سلولی مخمر ساکارومیسس سرویزیه به دلیل ظرفیت باند کننده گی بالا می‌تواند سبب جذب آکراتوکسین A و نیز اثرات بازدارنده بر آفلاتوکسین B₁ باشد (۵،۴). اخیراً نیز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان و آنتی‌موتازن شناخته شده که می‌تواند در جلوگیری از انواع سرطان‌ها دخالت داشته باشد (۶،۷). هم‌چنین به عنوان یک ماده بیواکتیو آلی می‌تواند در سیستم غذایی دام‌ها به کار رود و توسط پروتئین لکتین با پاتوژن‌هایی مثل اشرشیا کولی^۶ ترکیب و آن‌ها را از سیستم گوارشی حیوان خارج کند (۸). تاکنون اثر ترکیبات زیادی از جمله روغن تیمول، روغن سینامون، عصاره مریم‌گلی، عصاره آویشن شیرازی، عصاره ریشه گیاه باریجه، اسانس گیاه درمنه و مرزه، روغن‌های اسانسی زیره سبز کاکوتی و سیاه‌دانه 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،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 می‌باشد.

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 برات² 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 متابی سولفیت پتاسیم در pH = ۷ به مدت ۲ ساعت اتوکلاو گذاری شد. مانوپروتئین محلول حاصله پس از سانتریفوژ (۲۵۰ × 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 برات³ (SDB) فعال گردید و سپس در محیط پوتیتودکستروز آگار (PDA)⁴ به صورت شیب دار 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 تویین ۸۰ (۱/۰ 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 ۱۰^۷ × ۱ 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

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 پلیت های 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 محیط ها، هر پلیت به روش کشت سطحی توسط یک سوپ پنبه ای با اسپور قارچ آسپرژیلوس فلاووس تلقیح شد. در نهایت پلیت ها در شرایط ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید. در این جا MIC پلیتی با کم ترین غلظت مانان است که در آن هیچ رشدی مشاهده نمی گردد (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 میلی متر در شرایط استریل به کمک پیت پاستور ایجاد گردید و در چاهک های ایجاد شده محلول مانان با غلظت های ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، 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

دانه های پسته ابتدا با دست پوست گیری شده و مغز پسته ها با قرار دادن در ظروف درب دار شیشه ای استریل (۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) گردید. برای تهیه پوشش خوراکی ابتدا پودر ژلاتین در آب دیونیزه در حمام آب داغ ۵۵ درجه سانتی گراد 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

آزمایش حاوی محیط کشت استریل، حجم یکسانی از هر غلظت محلول مانان ریخته شد و به هر لوله آزمایش مقدار $10^7 \times 1$ اسپرژیلوس فلاووس تلقیح شد. پس از گرمخانه گذاری (۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت)، مشاهده گردید در هیچ یک از لوله های آزمایش، آسپرژیلوس 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 رقت های متوالی دو تایی تهیه شد و مورد آزمون به روش های لوله ای و پلیت قرار گرفت. روش لوله ای: در لوله های آزمایش حاوی ۱ میلی لیتر آب مقطر استریل و محیط کشت پوتیتو دکستروز براث، غلظت های 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 $10^7 \times 1$ 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. لوله ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت (بر اساس روش رزاقی ابیانه و همکاران، ۲۰۰۹) گرمخانه گذاری گردید و پس از این مدت، کدورت لوله ها از نظر درجه رشد یا عدم رشد مورد ارزیابی بصری قرار گرفت. علاوه بر آن از هر کدام از نمونه های مورد آزمایش، کشت مجدد در محیط جامد (PDA) به عمل آمد که نتایج آن ها ثبت و قضاوت بر آن مبنای عمل آمد (۲۲). MIC در پلیت های 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 کشت های مجدد مشهود نیست.

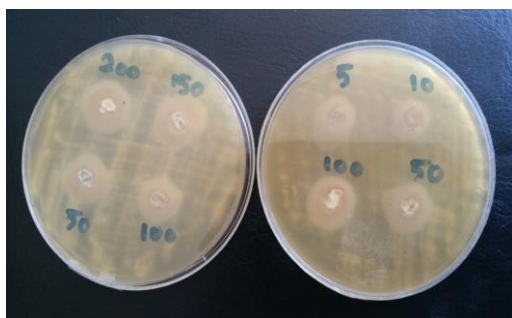
روش پلیت: در روش پلیت حجمی از غلظت های آماده شده مانان به گونه ای در پلیت قرار داد شد که

آنالیز آماری

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

یافته‌ها

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 غلظت‌های متفاوت (۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) 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، هیچ‌گونه

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 آن ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا رطوبت مشخص خشک گردید. رطوبت پسته‌ها 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 میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر 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 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 اسپرژیلوس) (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 اسپرژیلوس 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 اسپرژیلوس 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 اسپرژیلوس 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 کاهش نرخ رشد و تولید توکسین در مقابل اسپرژیلوس 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 اسپرژیلوس 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

تیماری (عدم پوشش دهی و عدم وجود مانان) بر روی آن‌ها اعمال نشده است، میسلیای قارچ اسپرژیلوس 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 میسلیوم 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 اسپرژیلوس فلاووس در حضور غلظت‌های متفاوت مانان در روش‌های متفاوت

غلظت مانان $\mu\text{g ml}^{-1}$	رشد اسپرژیلوس در روش لوله ای	رشد اسپرژیلوس در پلیت تکمیلی در روش پلیت روش لوله ای	رشد اسپرژیلوس 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)	۵/۲۶
۰/۰۰۵ <	+	+	۰

*: عدم رشد
*: رشد



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

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

رشد اسپرژیلوس فلاووس						غلظت مانان	گروه نمونه پسته
روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم	
-*	**	***	++	++	++	++	کنترل
-	-	-	-	-	+	+	پسته پوشش دار
-	-	-	-	-	+	+	
-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	+	+	+	++	پسته اسپری شده
-	-	-	+	+	+	++	

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

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 نافوذپذیری 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.

قنبرزاده و همکاران (۱۳۹۰)، با بررسی اثرات ضد میکروبی فیلم خوراکی بر پایه کریوکی 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 FoodScience 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.