JRIFST
مقالهٔ کامل پژوهشی

www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۹، جلد ۹، شماره ۳، صفحات ۲۶۸-۲۵۵
DOI: 10.22101/JRIFST.2020.194483.1103

بررسی اثر مخمر *ساکارومایسس سرویزیهٔ* زنده و تیمارشده با حرارت و اسید بر میزان سیترینین و رنگدانه‌های *موناسکوس پورپورئوس*

هدیه داودی مقدم[۱]، فخری شهیدی[۲*]، فریده طباطبایی یزدی[۲]، محبوبه سرابی جماب[۳]، زرین اسحاقی[۴]

۱- دانشجو دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
* نویسند، مسئول (fshahidi@um.ac.ir)
۳- دانشیار، گروه زیست فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
۴- استاد، گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۳۱

واژه‌های کلیدی
تیمار اسیدی
تیمار حرارتی
رنگدانه
ساکارومایسس سرویزیهٔ سیترینین
موناسکوس پورپورئوس

چکیده

کپک *موناسکوس پورپورئوس* به‌دلیل تولید دامنهٔ گسترده‌ای از رنگدانه‌های طبیعی، توجه بسیاری از تولیدکنندگان مواد غذایی را به‌عنوان جایگزینی برای رنگ‌های سنتزی جلب کرده است. رنگدانه‌های موناسکوس معمولاً آلوده به سیترینین هستند که همین امر کاربرد گستردهٔ آنها را در مواد غذایی محدود می‌کند. استفاده از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* یک روش بیولوژیکی مناسب برای حذف توکسین شناخته می‌شود. در این پژوهش اثر مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در دو حالت غیرفعال‌شده (تیمار حرارتی در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد و تیمار اسیدی در اسید هیدروکلریک دو مولار) و زنده در سه غلظت مختلف (10^3، 10^4 و 10^5 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر) بر میزان سیترینین و رنگدانهٔ زرد، نارنجی و قرمز تولیدشده توسط کپک *موناسکوس پورپورئوس* موردبررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که مخمر زنده و تیمارشده با حرارت و اسید به‌طور قابل‌توجهی باعث کاهش سیترینین در محیط شد، به‌طوری‌که میزان سیترینین از ۴/۴۳ میلی‌گرم بر لیتر در نمونهٔ کنترل فاقد مخمر به‌ترتیب به ۰/۹، ۰/۱ و ۰/۰۷ میلی‌گرم بر لیتر (در غلظت 10^5 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمری) کاهش یافت. حداکثر مقدار رنگدانه‌های خارج سلولی و داخل سلولی زرد، نارنجی و قرمز اندازه‌گیری‌شده متعلق به نمونه‌های حاوی مخمر زنده بود، درحالی‌که مقدار این رنگدانه‌ها در نمونه‌های حاوی مخمر تیمارشده با حرارت و اسید به‌ترتیب کاهش داشتند. از بین تیمارها، استفاده از مخمر زنده در غلظت 10^4 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بهترین شرایط را برای رسیدن به هدف موردنظر فراهم کرد.

مقدمه

رنگ‌های خوراکی گروهی از افزودنی‌هایی هستند که به‌صورت طبیعی یا مصنوعی تهیه می‌شوند و نقش مهمی در ایجاد تنوع، افزایش جذابیت و بازارپسندی مواد غذایی دارند (Kongruang, 2011; Malik, Tokkas, & Goyal, 2012؛ عوض‌پور، سیفی‌پور، عبدی، نبوی و زمانیان‌عضدی، ۱۳۹۲)؛ همچنین، افزودنی‌های رنگی به‌منظور جبران رنگ ازدست‌رفتهٔ مادهٔ غذایی در طول فرایند اهمیت پیدا کرده‌اند (Manan, Mohamad, & Ariff, 2017). از دیدگاه صنایع غذایی، استفاده از رنگ‌های مجاز خوراکی به‌منظور

PROOF

تولید فراوردۀ جدید یا بهبود رنگ آن امری ضروری است. رنگ‌های سنتزی به‌دلیل پایداری زیاد و قیمت پایین کاربرد گسترده‌ای برای بهبود رنگ مواد غذایی در صنعت غذا دارند؛ اما امروزه مصرف آنها به‌دلیل مشخص‌شدن اثرات منفی بر سلامت انسان ازجمله سرطان‌زابودن و ایجاد جهش کاهش یافته است، همین امر باعث افزایش تقاضای استفاده از رنگ‌های طبیعی به‌عنوان جایگزین رنگ‌های سنتزی شده است (Kobylewski & Jacobson, 2012; Kurniawati & Zubaidah, 2014; Mu, Huang, Ding, & Zhao, 2015). امروزه منابع طبیعی زیادی ازجمله گیاهان (میوه، برگ، گل و ریشه)، حشرات، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها شناسایی شده‌اند که قادر به تولید رنگدانه هستند؛ اما فقط تعداد محدودی از آنها شرایط مناسب برای استخراج و استفاده در سطح وسیع را دارند (Nadzri, 2012).

رنگ‌های طبیعی به‌دست‌آمده از منابع میکروبی یکی از مهم‌ترین منابع طبیعی برای تولید رنگدانه محسوب می‌شوند. ازجمله مزایای تولید رنگ‌های طبیعی توسط گونه‌های میکروبی می‌توان به رشد سریع و آسان در محیط ارزان‌قیمت، تولید انبوه رنگ و وابسته‌نبودن به شرایط اقلیمی اشاره کرد (Manan *et al.*, 2017; Seyedin, Hatamian-Zarmi, Rasekh, & Mirderikvand, 2015).

گونه‌های مختلف جنس موناسکوس به‌دلیل تولید رنگدانه‌های متنوع از زرد تا قرمز با پایداری شیمیایی بالا در pHهای مختلف توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Lin, Yakushijin, Büchi, & Demain, 1992; Satapa, 2013). موناسکوس متعلق به خانوادۀ موناسکاسه[1] و شاخۀ آسکومایکوتا[2] می‌باشد و جزء کپک‌های واقعی محسوب می‌گردد. رنگدانه‌های تولیدشده توسط گونه‌های کپکی موناسکوس از زمان‌های گذشته تا به امروز به‌طور گسترده‌ای در چین و کشورهای آسیای شرقی به‌عنوان رنگ‌دهندۀ طبیعی و نگهدارندۀ مواد غذایی تخمیری مانند ماهی ترش (ماهی تخمیری)، پنیر چینی، کچاپ، نوشیدنی‌ها ازجمله شراب قرمز، فراورده‌های گوشتی مانند سوسیس و همبرگر (Nadzri, 2012; Suh & Shin, 2000a) و همچنین مصارف دارویی (Li *et al.*, 2010) استفاده می‌شدند. بسیاری از گونه‌های کپک موناسکوس همراه با رنگدانه، مقادیر قابل‌توجهی مایکوتوکسین به نام سیترینین تولید می‌کنند که باعث ایجاد آسیب‌های کبدی و کلیوی می‌شود؛ همین امر باعث منع استفاده از آن در بسیاری از کشورها و محدودشدن کاربرد گستردۀ آن در محصولات شده است (Duraklı-Velioğlu, Boyacı, Şimşek, & Gümüş, 2013; Wang, H., Zhang, Lin, & Zheng, 2017). حد مجاز سیترینین در مواد غذایی در کشورهای مختلف متفاوت است. حد مجاز قابل‌قبول در کشورهای تایوان، کره‌جنوبی، ژاپن و اتحادیۀ اروپا به‌ترتیب ۲۰۰۰، ۵۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد (Karazhiyan, Mehraban Sangatash, Karazhyan, Mehrzad, & Haghighi, 2016; Patakova, 2013).

تحقیق‌های زیادی برای غلبه بر مشکل تولید سیترینین توسط کپک موناسکوس انجام شده است که ازجملۀ آنها می‌توان به تیمارهای فیزیکی، شیمیایی و ایجاد جهش در کپک اشاره کرد. حذف سیترینین به روش جهش به‌دلیل ناپایداربودن فراورده‌های ناشی از جهش و زمان‌بربودن کاربرد زیادی ندارد (Jia, Xu, Zhou, & Sung, 2010)؛ همچنین برخی روش‌های فیزیکی مانند استفاده از دمای بالا، باعث تولید سیترینین H_1 شده که ۱۰ مرتبه سمی‌تر از سیترینین است. از معایب روش‌های شیمیایی می‌توان به حذف برخی از ترکیبات زیست‌فعال اشاره کرد (Suharna, 2015). روش‌های بیولوژیکی به‌دلیل راندمان بالا، قیمت کم و سازگاری با محیط‌زیست، امروزه توجه زیادی را به خود جلب کرده است. از بین میکروارگانیسم‌های مختلف که قادر به حذف توکسین هستند، گونه‌های مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*[3] به‌دلیل ویژگی‌های تکنولوژیکی متعدد و همچنین به‌دلیل داشتن درجۀ خوراکی[4]، گزینۀ مناسبی برای‌این‌منظور محسوب می‌شوند (Armando *et al.*, 2012; Shetty & Jespersen, 2006).

تاکنون تحقیق‌های متعددی درزمینۀ افزایش تولید رنگدانه‌های *موناسکوس پورپورئوس*[5] انجام شده است؛ اما اطلاعات کافی درزمینۀ کاهش سیترینین تولیدشده از محیط در دسترس نیست. باتوجه‌به اینکه خطر مصرف سیترینین بالاست و همچنین به‌دلیل محدودیتی که برای کاربرد گستردۀ رنگدانه‌های طبیعی موناسکوس ایجاد کرده است، لازم است مطالعه‌های بیشتری درزمینۀ حذف یا کاهش آن انجام شود.

[1] Monascaceae
[2] Ascomycotina
[3] *Saccharomyces cerevisiae*
[4] Generally Regarded as Safe (GRAS)
[5] *Monascus purpureus*

PROOF

هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف سوسپانسیون مخمری در حالت زنده و غیرفعال‌شده با اسید و حرارت در جذب سیترینین و رنگدانهٔ تولیدشده توسط کپک *موناسکوس پورپورئوس* بود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

سیترینین خالص تجاری به‌عنوان مادهٔ استاندارد در HPLC از شرکت سیگما آلدریچ (ساخت اسرائیل) تهیه شد که خلوص آن بیش از ۹۸ درصد بود.

میکروارگانیسم‌ها، محیط‌های کشت و آماده‌سازی اولیهٔ آنها

کپک *موناسکوس پورپورئوس* (PTCC 5303) و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (PTCC 5052) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران واقع در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. محیط‌کشت‌های مورداستفاده در این پژوهش از شرکت کیولب (ساخت انگلستان) تهیه شد.

کپک *موناسکوس پورپورئوس* روی محیط‌کشت جامد پودر مخمر و نشاسته[1] (عصارهٔ مخمر ۴ گرم در لیتر، نشاستهٔ محلول ۱۵ گرم در لیتر، دی‌پتاسیم فسفات ۱ گرم در لیتر، منیزیم سولفات ۷ آبه ۰/۵ گرم در لیتر، آگار ۱۵ گرم در لیتر)کشت و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد؛ سپس تا زمان مصرف در یخچال نگهداری و هر ۲ هفته یک‌بار از آن کشت مجدد تهیه شد. کشت اصلی و تخمیر ۱۴ روزهٔ موناسکوس در محیط‌کشت مایع حاوی عصارهٔ مخمر و ساکارز[2] (عصارهٔ مخمر ۴۰ گرم در لیتر و ساکارز ۱۶۰ گرم در لیتر) انجام شد. مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* روی محیط‌کشت پتیتو دکستروز آگار[3] به‌صورت خطی کشت و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد سپس تا زمان مصرف در یخچال نگهداری و هر ماه یک‌بار از آن کشت مجدد تهیه شد (Dikshit & Tallapragada, 2011; Kurniawati & Zubaidah, 2014; Seyedin *et al.*, 2015).

آماده‌سازی سوسپانسیون مخمری

مقداری از کشت اولیهٔ (کشت مادر) مخمر به لولهٔ آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت پتیتو دکستروز براث[4] منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد تا تعداد سلول مخمر به حد مطلوب برسد (Kurniawati & Zubaidah, 2014). به‌منظور جداکردن سلول‌های مخمر از محیط‌کشت، از سانتریفیوژ (Centrifuge، Sigma 3-30K، ساخت آلمان) با سرعت چرخش ۷۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. سلول‌های جداشده ۲ مرتبه با محلول نمک بافری فسفاته (Phosphate Buffered Saline (PBS)، Sigma-aldrich، ساخت آمریکا)، (pH، ۶) استریل شسته شد و در هر مرحله مجدد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت چرخش ۷۲۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد (Karazhiyan *et al.*, 2016; Shetty, Hald, & Jespersen, 2007) سرانجام سلول‌های مخمر با حجم مشخصی از نمک بافری فسفاتهٔ استریل مخلوط و کدورت آن براساس استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تنظیم شد سپس از این سوسپانسیون، رقت‌های 10^{-6}، 10^{-5}، $10^{-4}\times1$ واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر تهیه شد (NCCLS, 2002).

تیمار اسیدی و حرارتی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*

به‌منظور انجام تیمار حرارتی، سوسپانسیون سلول‌های مخمری با غلظت‌های تنظیم‌شده (10^{-6}، 10^{-5}، $10^{-4}\times1$ واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر) به‌طور جداگانه به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (Hirayama، ساخت ژاپن) با دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد حرارت داده شد (Karazhiyan *et al.*, 2016; Rahaie, Emam-Djomeh, Razavi, & Mazaheri, 2010; Shetty *et al.*, 2007).

در تیمار اسیدی، ۱۰ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک دو مولار به سلول‌های مخمر جداشده افزوده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد همراه با تکان ملایم نگهداری شد؛ سپس سلول‌ها دو مرتبه با نمک بافری فسفاتهٔ استریل شسته و هر مرتبه با سرعت چرخش ۷۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سلول‌های تیمارشده با حجم مشخصی از نمک بافری فسفاتهٔ استریل مخلوط و براساس استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند سوسپانسیون اصلی تهیه و از آن سوسپانسیون با رقت‌های موردنیاز آماده شد (Karazhiyan *et al.*, 2016; Rahaie *et al.*, 2010; Shetty *et al.*, 2007).

[1] Yeast Powder Soluble Starch agar (YPSS)
[2] Yeast Extract Sucrose (YES)
[3] Potato Dextrose Agar (PDA)
[4] Potato Dextrose Broth (PDB)

PROOF

کشت کپک موناسکوس پورپورئوس

تخمیر در محیط‌کشت مایع براساس روش Wang، Ju و Zhou (۲۰۰۵) به‌همراه تغییراتی در آن انجام شد. *موناسکوس پورپورئوس* روی محیط‌کشت جامد حاوی پودر مخمر و نشاسته کشت شد و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. اسپورهای تولیدشده به کمک نمک بافری فسفاتهٔ استریل از سطح محیط‌کشت شسته شد. ۴۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپوری با غلظت تنظیم‌شده (۱×۱۰^{۶} واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر) به فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع حاوی ساکارز منتقل و به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۶۰ دور بر دقیقه در محیط تاریک نگهداری شد (Al-Sarrani & El-Naggar, 2006; Blanc, Loret, & Goma, 1995; Wang *et al.*, 2005). pH اولیهٔ محیط‌کشت روی ۵/۵ تنظیم شد (Orozco & Kilikian, 2008; Zhang, Li, Dai, Zhang, & Yuan, 2013).

افزودن مخمر به کشت موناسکوس

۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی سلول‌های مخمر زنده و یا تیمارشده با حرارت و اسید با غلظت‌های اولیهٔ معین (۱×۱۰^{۶}، ۱×۱۰^{۵}، ۱×۱۰^{۴} واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر) در روز ۱۳ از کشت کپک به آن افزوده شد. غلظت نهایی مخمر در کشت اصلی به ۱×۱۰^{۵}، ۱×۱۰^{۴}، ۱×۱۰^{۳} واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر رسید. فرایند تخمیر در روز ۱۴ به اتمام رسید (Kurniawati & Zubaidah, 2014; Wang, Zhao, Mu, Sun, & Chen, 2014).

اندازه‌گیری رنگدانه‌ها

رنگدانهٔ خارج سلولی

برای اندازه‌گیری رنگدانهٔ خارج سلولی تمام محتویات محیط‌کشت به کمک کاغذ صافی واتمن[1] صاف شد تا میسلیوم‌ها از محیط مایع جدا شوند (Dikshit & Tallapragada, 2011)؛ سپس محیط‌کشت صاف‌شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت چرخش ۸۸۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد تا ذرات ریزی که از صافی عبور کرده‌اند، ته‌نشین شوند. جذب نوری محلول صاف‌شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش مرئی (Spectrophotometer، WPA S2000UV/VIS، ساخت انگلستان) در طول موج‌های ۴۰۰، ۴۶۰ و ۵۰۰ نانومتر که به‌ترتیب بیانگر رنگدانه‌های زرد، نارنجی و قرمز هستند، اندازه‌گیری شد (Chen, Shi, Song, Quan, & Wu, 2015; Seyedin *et al.*, 2015).

رنگدانهٔ داخل سلولی

میسلیوم باقی‌مانده روی کاغذ صافی از مرحلهٔ قبل، دو مرتبه با آب‌مقطر شست‌وشو و سپس به قطعه‌های کوچک برش داده شد و به آن ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد (حجمی/حجمی) (pH، ۲) افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در شیکر با سرعت چرخش ۱۲۰ دور بر دقیقه قرار گرفت. محلول اتانولی حاوی رنگدانهٔ داخل سلولی به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت چرخش ۸۸۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد تا میسلیوم ته‌نشین شود. محلول رویی از سطح جمع‌آوری و جذب نوری آن به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش مرئی در طول موج‌های ۴۰۰، ۴۶۰ و ۵۰۰ نانومتر که به‌ترتیب بیانگر رنگدانهٔ زرد، نارنجی و قرمز هستند، اندازه‌گیری شد (Chen, *et al.*, 2015; Xiong, Zhang, Wu, & Wang, 2014; Zhou, Zhu, Wang, Wu, & Liang, 2009).

اندازه‌گیری سیترینین باقی‌مانده در محیط‌کشت

به‌منظور سنجش میزان سیترینین باقی‌مانده در محیط‌کشت از روش HPLC استفاده شد. محلول حاوی رنگدانه یک‌بار دیگر به کمک صافی (Millipore، ساخت آمریکا) با اندازهٔ قطر ذرات ۰/۴۵ میکرومتر صاف شد تا ذرات بسیار ریز آن نیز گرفته شود. ۲۰ میکرولیتر از نمونهٔ صاف‌شده، به دستگاه HPLC (High Performance liquid Chromatography، Agilent، ساخت آمریکا) دارای ستون فاز معکوس C18 با قطر ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر و اندازهٔ ذره ۵ میکرومتر، پمپ و کنترل‌کنندهٔ جریان تزریق شد. فاز متحرک حاوی استونیتریل/آب (۳۵:۶۵ حجمی/حجمی) بود. pH نمونه توسط اسید فسفریک به ۲/۵ رسانده شد. سرعت حرکت فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد. سنجش مقدار سیترینین توسط دتکتور فلوئورسانس با طول موج برانگیختگی ۳۳۱ نانومتر و طول موج نشر ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Chen, Xue, Chen, Li, & Wang, 2016; Chen, *et al.*, 2015; Wang, Zhang, Lu, Huang, & Xu, 2013).

[1] Whatmann No. 42, 125 mm

PROOF

آنالیز آماری

در این تحقیق تأثیر مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* به‌صورت زنده و تیمارشده با اسید و حرارت در سه غلظت نهایی مختلف در جذب سیترینین و رنگدانهٔ تولیدشده توسط *موناسکوس پورپورئوس* بررسی گردید. آزمایش‌ها بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی انجام شد. هر تیمار ۳ مرتبه تکرار و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد. داده‌ها به روش بونفرونی[1] ($P<۰/۰۵$) مقایسه شد و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار مینی‌تب نسخهٔ ۱۶ در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

مقایسهٔ تأثیر مخمر زنده و تیمارشده با اسید و حرارت در کاهش سیترینین

در این تحقیق به بررسی و مقایسهٔ تیمار اسیدی با اسید هیدروکلریک دو مولار و تیمار حرارتی در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد در اتوکلاو در حذف سیترینین پرداخته شده است. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد (جدول ۱) که هر دو تیمار به‌طور قابل‌توجهی توانستند، میزان سیترینین در محیط را کاهش دهند، به‌طوری‌که میزان سیترینین از ۴/۴۳ میلی‌گرم بر لیتر در نمونهٔ کنترل (بدون افزودن مخمر) به ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار حرارتی و ۰/۰۷ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار اسیدی در غلظت $۱۰^{۵}$ واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمری کاهش یافت. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی تأثیر مخمر زنده در کاهش سیترینین تولیدشده توسط کپک موناسکوس نشان داد، مخمر زنده به‌طور معنی‌داری قادر به حذف سیترینین بود، اما تأثیر آن بسیار کمتر از حالت تیمارشده بود، به‌طوری‌که قابلیت جذب سیترینین آن در بیشترین غلظت سوسپانسیون مخمری ($۱۰^{۵}$ واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر) ۰/۸ واحد جذب ($AU^{۲}$) از تیمار حرارتی و ۰/۸۳ واحد جذب از تیمار اسیدی کمتر بود.

نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق با نتایج Shetty و همکاران (۲۰۰۷) درزمینهٔ جذب آفلاتوکسین B_1 توسط گونه‌های مختلف *ساکارومایسس سرویزیه* که توسط اسید و حرارت تیمار شدند، مطابقت دارد. آنها نشان دادند که تیمار حرارتی سلول مخمر در دمای ۱۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد و همچنین تیمار سلول مخمر در اسید هیدروکلریک دو مولار باعث افزایش جذب دو برابری آفلاتوکسین در مقایسه با سلول زنده می‌شود. به‌طور مشابه Rahaie و همکاران (۲۰۱۰) نیز با بررسی توانایی اتصال آفلاتوکسین به دیوارهٔ سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* تثبیت‌شده به‌منظور کاهش آفلاتوکسین نمونه‌های آلودهٔ پسته به این نتیجه رسیدند که تیمار اسیدی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در غلظت ۲×۱۰^{۱۰} واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر توانایی جذب را برای دو غلظت متفاوت آفلاتوکسین (۱۰ و ۲۰ میکروگرم در لیتر) به‌ترتیب تا حدود ۶۰ و ۷۳ درصد و تیمار حرارتی جذب سطحی را به‌ترتیب ۵۵ و ۷۵ درصد افزایش داد (Rahaie *et al.*, 2010). Bejaoui، Mathieu، Taillandier و Lebrihi (۲۰۰۴) به نقش مؤثر تیمار حرارتی و اسیدی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در حذف اکراتوکسین پرداختند، نتایج نشان داد که هر دو تیمار مخمر قادر به حذف توکسین تا ۴۵ درصد بودند (Bejaoui *et al.*, 2004).

براساس مطالعه‌های انجام‌شده مشخص شده است که حذف مایکوتوکسین ازطریق اتصال به دیوارهٔ سلولی است، به‌همین‌دلیل مرگ سلول مخمر نه تنها قابلیت توانایی آن در جذب توکسین را کاهش نمی‌دهد (Shetty & Jespersen, 2006)، بلکه تیمارهای اسیدی و حرارتی باعث افزایش جذب مایکوتوکسین‌ها توسط این مخمر می‌شود. شرایط اسیدی با تأثیر روی پلی‌ساکاریدها و تبدیل آنها به مونومر و همچنین ازطریق شکستن پیوندهای گلیکوزیدی آنها و تبدیل‌شدن به آلدهیدها عمل می‌کند. این ترکیبات آزادشده باعث افزایش جایگاه‌های جذب توکسین در سطح سلول مخمر می‌شود. براساس پژوهش‌های پیشین، احتمال می‌رود که در شرایط اسیدی مقداری از اتصالات بین توکسین و مخمر، درون‌سلولی باشد (Karazhiyan *et al.*, 2016; Rahaie *et al.*, 2010; Shetty *et al.*, 2007)؛ که همین امر باعث‌شده تا میزان جذب در مخمر تیمارشده با اسید بیشتر از تیمارهای دیگر باشد. حرارت‌دهی ممکن است باعث دناتوره‌شدن پروتئین‌ها یا تشکیل محصولات واکنش میلارد در دیوارهٔ سلولی شده و یا با انحلال بعضی از مانوپروتئین‌های موجود در دیوارهٔ سلولی، نفوذپذیری دیواره افزایش پیدا کند که منجربه‌افزایش دسترسی مکان‌های اتصال مخفی دیواره می‌شود (Karazhiyan *et al.*, 2016; Rahaie *et al.*, 2010; Shetty *et al.*, 2007).

[1] Bonferroni
[2] Absorbance Unit (AU)

PROOF

جدول ۱- مقایسهٔ تأثیر مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* زنده و تیمارشده با حرارت و اسید در سه غلظت متفاوت در کاهش سیترینین تولیدشده توسط کپک *موناسکوس پورپورئوس*

غلظت سوسپانسیون / مخمری تیمار اعمال‌شده	سیترینین (میلی‌گرم بر لیتر)		
	10^3 (واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر)	10^4 (واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر)	10^5 (واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر)
۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد	۰/۱۷±۰/۰۴^{Ca}	۰/۱۴±۰/۰۲^{Cab}	۰/۱۰±۰/۰۲^{Cb}
اسید هیدروکلریک دو مولار	۰/۱۲±۰/۰۱^{Ca}	۰/۱۰±۰/۰۱^{Da}	۰/۰۷±۰/۰۱^{Cb}
مخمر زنده	۲/۳۵±۰/۱۲^{Ba}	۱/۵۰±۰/۱۰^{Bb}	۰/۹۰±۰/۱۰^{Bc}
کنترل (بدون مخمر)	۴/۴۳±۰/۵۴^{A}	۴/۴۳±۰/۵۴^{A}	۴/۴۳±۰/۵۴^{A}

تفاوت حروف بزرگ (ستون) و حروف کوچک (ردیف) بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.
نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

غلظت سوسپانسیون مخمر نیز از دیگر عوامل مؤثر در جذب توکسین توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* است. جدول (۱)، قابلیت کاهش سیترینین در سه غلظت متفاوت از سوسپانسیون مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در حالت زنده و تیمارشده با اسید و حرارت را نشان می‌دهد. مطابق جدول (۱)، با افزایش غلظت سوسپانسیون مخمری، میزان سیترینین کاهش یافته است. میزان سیترینین باقی‌مانده در محیط برای تیمار اسیدی مخمر در غلظت 10^4 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر کمتر از غلظت 10^3 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بود، ولی اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد نشان نداد اما در غلظت 10^5 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر این اختلاف با دو سطح غلظتی دیگر معنی‌دار بود (جدول ۱). به‌طور مشابه، نتایج گزارش‌شده توسط Piotrowska (۲۰۱۱) نشان داد که با افزایش تعداد سلول مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* از ۱، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم وزن خشک بیومس بر میلی‌لیتر میزان اکراتوکسین به‌ترتیب ۲۰، ۲۹ و ۷۵ درصد کاهش یافت (Piotrowska, 2011). دیوارهٔ سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* از سه جزء اصلی تشکیل شده است که عبارتند از ۶, ۱-ß و ۳, ۱-ß گلوکان، مانوپروتئین و مقدار کمی کیتین. مشخص شده است که مانان و گلوکان موجود در دیوارهٔ سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* عامل اصلی جذب توکسین می‌باشد به‌طوری‌که قادر است به طیف وسیعی از مایکوتوکسین‌ها متصل شود (Armando *et al.*, 2012; Shetty & Jespersen, 2006). با افزایش غلظت سوسپانسیون مخمر، تعداد سلول‌ها و جایگاه‌های گیرندهٔ توکسین بیشتر شده و درنتیجه قابلیت جذب توکسین از محیط بیشتر می‌شود (Bueno, Casale, Pizzolitto, Salvano, & Oliver, 2007).

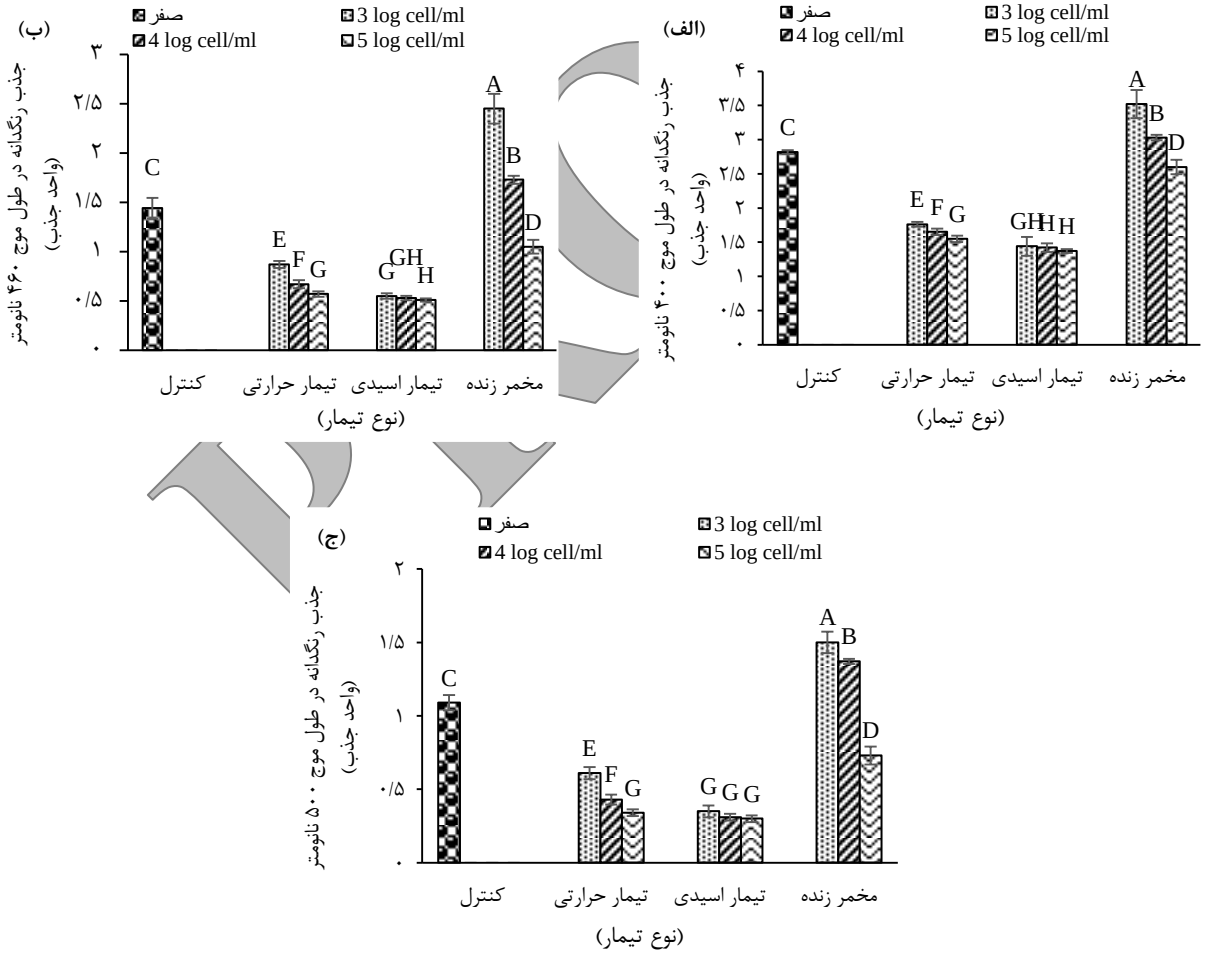
مقایسهٔ تأثیر مخمر زنده و تیمارشده با اسید و حرارت بر رنگدانه‌ها

نتایج تأثیر مخمر زنده و مخمر تیمارشده با اسید و حرارت در غلظت‌های مختلف مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر رنگدانه‌های خارج سلولی و داخل سلولی در طول موج‌های ۴۰۰، ۴۶۰ و ۵۰۰ نانومتر به‌ترتیب در شکل (۱) و (۲)، نشان داده شده است.

با مقایسهٔ شکل‌های (۱-الف)، (۱-ب)، (۱-ج)، (۲-الف)، (۲-ب) و (۲-ج)، می‌توان دریافت که مقدار تولید رنگدانهٔ زرد داخل سلولی و خارج سلولی هم برای کنترل و هم نمونه‌های زنده و تیمارشده بیشتر از رنگدانهٔ نارنجی و قرمز است. نوع رنگ تولیدشده توسط کپک موناسکوس بستگی به pH محیط‌کشت دارد به‌طوری‌که در محیط اسیدی تمایل کپک برای تولید رنگدانهٔ زرد بیشتر است و به‌تدریج با افزایش pH تمایل برای تولید رنگدانهٔ نارنجی بیشتر می‌شود تاجایی‌که در pH قلیایی، رنگدانهٔ قرمز غالب است (Said, 2010). باتوجه‌به اینکه رشد کپک موناسکوس در محیط اسیدی بیشتر از محیط قلیایی است و محققان زیادی pH، ۵/۵ را بهترین شرایط برای رشد کپک *موناسکوس پورپورئوس* و تولید رنگدانه توسط آن دانسته‌اند (Orozco & Kilikian, 2008; Said, 2010; Zhang *et al.*, 2013). به‌منظور افزایش بازدهی، در این تحقیق از محیط‌کشت با اسیدیتهٔ متوسط (pH، ۵/۵) استفاده شد، که درنتیجه تولید رنگدانهٔ زرد بیشتر از دو رنگدانهٔ دیگر بود.

PROOF

شکل (۱)، نشان می‌دهد که مقدار رنگدانه‌های خارج سلولی زرد، نارنجی و قرمز در تیمار اسیدی و حرارتی کمتر از نمونهٔ کنترل (بدون مخمر) است که همین امر نشان می‌دهد که تیمارکردن سلول‌های مخمر علاوه‌بر جذب سیترینین، مقداری از رنگدانه‌های خارج سلولی که در محیط آزاد شده‌اند را نیز جذب می‌کند؛ همچنین با افزایش غلظت سوسپانسیون مخمری در تیمارهای اسیدی و حرارتی، مقدار رنگدانهٔ خارج سلولی کمتر می‌شود که علت این امر افزایش تعداد سلول مخمر و افزایش جایگاه‌های گیرنده در سطح سلول و همچنین حذف عوامل محافظتی از جایگاه‌های گیرنده در تیمارهای اسیدی و حرارتی می‌باشد که باعث افزایش جذب رنگدانه‌های خارج سلولی می‌شود (Bueno *et al.*, 2007; Rahaie *et al.*, 2010; Shetty *et al.*, 2007)؛ این موضوع برای مخمر زنده نیز صادق است اما به‌دلیل اینکه مخمر زنده با تولید متابولیت‌های مفید باعث تحریک تولید رنگدانه توسط کپک موناسکوس می‌شود اگرچه مقداری از رنگدانهٔ خارج سلولی جذب دیوارهٔ سلولی مخمر می‌شود با این وجود مقدار نهایی رنگدانهٔ خارج سلولی آن بیشتر از مخمر تیمارشده با حرارت و اسید می‌باشد. قطبیت رنگدانه نیز ازجمله عواملی است که در جذب رنگدانهٔ خارج سلولی تأثیرگذار است (Morata, Loira, & Suárez Lepe, 2016). نتایج به‌دست‌آمده از مقایسهٔ دو تیمار حرارتی و اسیدی مخمر نشان داد که میزان کاهش رنگدانهٔ خارج سلولی زرد، نارنجی و قرمز برای تیمار اسیدی بیشتر از تیمار حرارتی بود (شکل ۱) که علت آن حذف بیشتر عوامل محافظتی از جایگاه‌های گیرنده در سطح سلول مخمر در تیمار اسیدی نسبت به تیمار حرارتی است (Bejaoui *et al.*, 2004; Shetty *et al.*, 2007).



شکل ۱- مقایسهٔ تأثیر مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* زنده و تیمارشده با حرارت و اسید بر رنگدانهٔ خارج سلولی تولیدشده توسط کپک *موناسکوس پورپورئوس*، (الف) رنگدانهٔ زرد، (ب)رنگدانهٔ نارنجی، (ج) رنگدانهٔ قرمز

حروف یکسان در این نمودار بیانگر عدم تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

در میان نمونه‌های تیمارشده با اسید و حرارت، بیشترین مقدار رنگدانهٔ خارج سلولی زرد با جذب نوری ۱/۷۶ واحد جذب مربوط به تیمار حرارتی مخمر در غلظت 10^3 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بود؛ درحالی‌که این مقدار جذب برای رنگدانهٔ زرد خارج سلولی در نمونهٔ کنترل (بدون مخمر) ۲/۸۲ واحد جذب به‌دست آمد. رنگدانهٔ قرمز تولیدشده توسط موناسکوس که تحت تیمار اسیدی مخمر با غلظت 10^5 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر قرار گرفته بود با حداکثر جذب نوری ۰/۳ واحد جذب کمترین مقدار رنگدانهٔ خارج سلولی در این تحقیق بود که در مقایسه با نمونهٔ کنترل (۱/۰۹ واحد جذب) ۰/۷۹ واحد کاهش داشت. جذب نوری رنگدانهٔ خارج سلولی نارنجی که تحت تیمار حرارتی مخمر در غلظت‌های 10^5، 10^4، 10^3 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بود به‌ترتیب ۰/۵۷، ۰/۶۷ و ۰/۸۷ واحد جذب به‌دست آمد که در مقایسه با جذب نوری این رنگدانه که تحت تیمار اسیدی قرار گرفته بود به‌ترتیب ۰/۰۶، ۰/۱۴ و ۰/۳۲ واحد کاهش داشت.

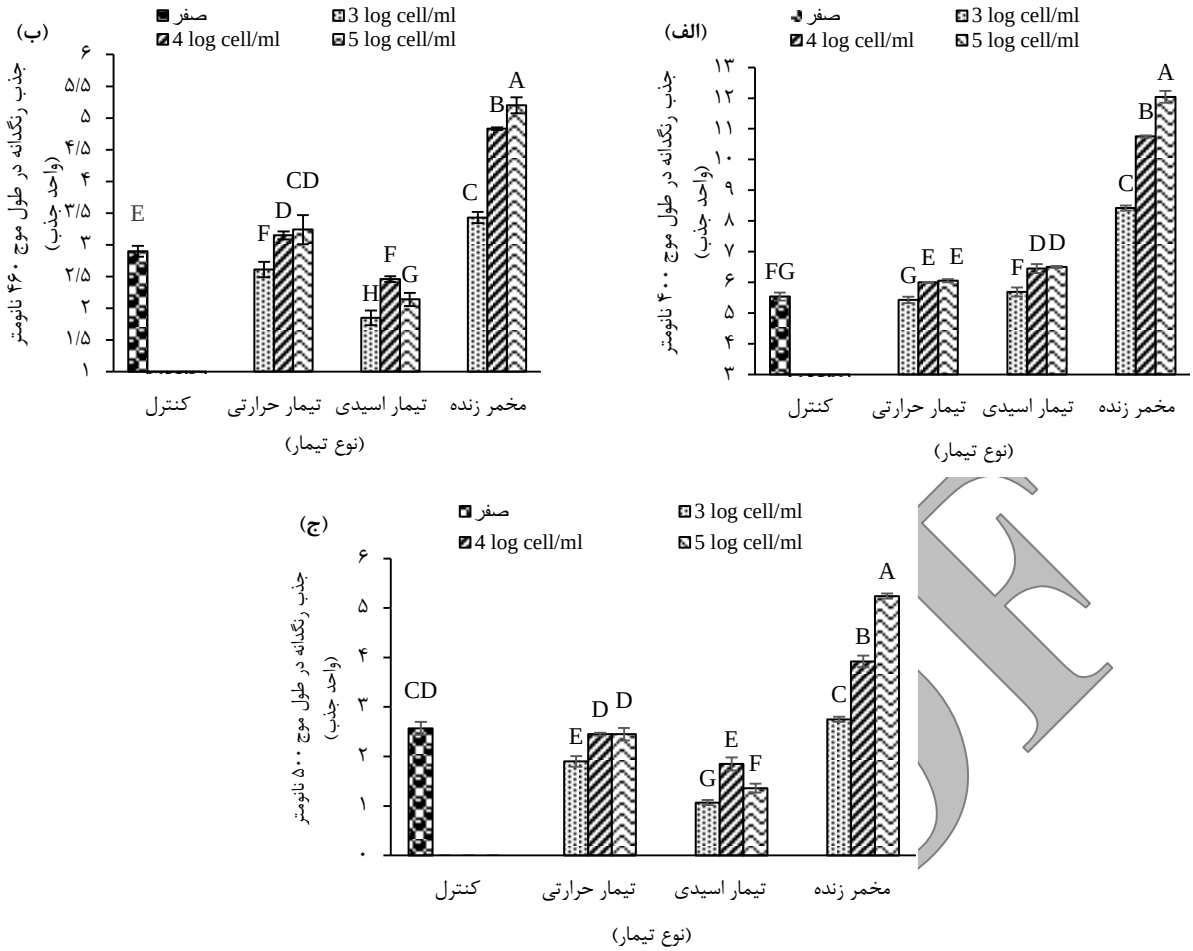
نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق با نتایج انجام‌شده توسط Suh و Shin (۲۰۰۰a) درزمینهٔ کشت هم‌زمان مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* با کپک *موناسکوس پورپورئوس* مطابقت دارد. آنها گزارش کردند که مقدار رنگدانهٔ خارج سلولی اندازه‌گیری‌شده کمتر از نمونهٔ کنترل بود که بیانگر جذب این رنگدانه توسط مخمر است. به‌طور مشابه Kurniawati و Zubaidah (۲۰۱۴) با مقایسهٔ سه غلظت مختلف مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* نشان دادند میزان کاهش رنگدانه در غلظت 10^6 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بیشتر از دو غلظت دیگر 10^5 و 10^4 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر به‌دست آمد (Kurniawati & Zubaidah, 2014).

حذف رنگدانه‌های خارج سلولی در تیمارهای مختلف بیشتر از رنگدانه‌های داخل سلولی بود (شکل ۱ و ۲). به‌دلیل اینکه رنگدانه‌های داخل سلولی در داخل سلول‌های کپک موناسکوس تولید می‌شوند، از دسترس سلول‌های مخمر دور هستند و بنابراین مخمر قادر به جذب آنها نیست. عدد جذب رنگدانهٔ زرد داخل سلولی مخمر تیمارشده با اسید و حرارت در غلظت‌های 10^4 و 10^5 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بیشتر از نمونهٔ کنترل بود، درحالی‌که در غلظت 10^3 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری با کنترل مشاهده نشد.

بررسی و مقایسهٔ نمونه‌ها نشان داد، مقدار تولید رنگدانه‌های داخل سلولی در هر سه غلظت مخمر زنده و همچنین رنگدانه‌های خارج سلولی در دو غلظت مخمر زنده 10^4 و 10^3 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بیشتر از نمونه‌های تیمارشده با حرارت، اسید و نمونهٔ کنترل فاقد مخمر بود (شکل ۱ و ۲). مقدار تولید رنگدانهٔ زرد خارج سلولی در غلظت 10^3 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر سوسپانسیون مخمر زنده، ۳/۵۲ واحد جذب بود که در مقایسه با مقدار رنگدانه در تیمارهای حرارتی، اسیدی و کنترل بدون مخمر به‌ترتیب ۱/۷۶، ۲/۰۸ و ۰/۷ واحد بیشتر بود. این افزایش برای رنگدانه‌های نارنجی و قرمز خارج سلولی نیز صدق می‌کرد. افزایش تولید رنگدانه در نمونهٔ حاوی مخمر زنده، علاوه‌بر رنگدانه‌های خارج سلولی، برای رنگدانه‌های داخل سلولی هم صادق بود به‌طوری‌که مقدار رنگدانه‌های زرد، نارنجی و قرمز داخل سلولی در این حالت بیشتر از سه مورد دیگر بود (شکل ۲).

متابولیت‌هایی که مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در طول رشد خود با کپک موناسکوس تولید می‌کند با ایجاد تغییر در شکل مورفولوژیکی کپک، می‌تواند در فرایند رشد آن و تولید رنگدانه تأثیرگذار باشد (Shin, Kim, Kim, & Ju, 1998; Suh & Shin, 2000b). تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* مانند آمیلاز و کیتیناز با ایجاد شکستگی جزئی در دیوارهٔ سلولی کپک موناسکوس باعث ایجاد تغییرات ساختاری کپک و درنتیجه افزایش تولید رنگدانه می‌شود (Shin *et al.*, 1998; Suh & Shin, 2000a). همچنین تولید برخی ترکیبات مانند اتانول در طول تخمیر ازجمله عوامل مؤثر دیگر برای تحریک بیشتر تولید رنگدانه است (Hamdi, Blanc, Loret, & Goma, 1997; Kurniawati & Zubaidah, 2014).

PROOF



شکل۲- مقایسهٔ تأثیر مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* زنده و تیمارشده با حرارت و اسید بر رنگدانهٔ داخل سلولی تولیدشده توسط کپک *موناسکوس پورپورئوس*؛ (الف) رنگدانهٔ زرد، (ب) رنگدانهٔ نارنجی و (ج) رنگدانهٔ قرمز

حروف یکسان در این نمودار بیانگر عدم تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری

امروزه به‌دلیل توجه روزافزون ارگان‌های نظارتی در جهت کاهش یا حذف افزودنی‌های سنتزی و شیمیایی در مواد غذایی ازجمله رنگدانه‌های سنتزی که اثرات سرطان‌زایی آنها به اثبات رسیده است و همچنین تمایل مصرف‌کنندگان به غذاهای طبیعی و فاقد مواد شیمیایی و سنتزی، صاحبان صنایع به سمت استفاده از منابع طبیعی ازجمله منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی به‌عنوان رنگ‌دهندهٔ طبیعی مواد غذایی گرایش پیدا کرده‌اند. در سال‌های اخیر رنگدانهٔ به‌دست‌آمده از کپک *موناسکوس پورپورئوس* به‌دلیل قابلیت حجم بالای تولید، تنوع رنگ رنگدانه‌ها، پایداری نسبتاً بالای رنگدانه‌ها نسبت به حرارت و pHهای مختلف جایگاه خاصی به‌عنوان رنگدانهٔ طبیعی به‌دست‌آورده است؛ اما تولید مایکوتوکسین سیترینین همراه با تولید رنگدانه توسط این کپک، باعث منع استفاده از آن در بسیاری از کشورها و محدودشدن کاربرد گستردهٔ آن در فراورده‌های غذایی شده است. حذف بیولوژیکی سیترینین توسط مخمر تیمارشده یکی از روش‌های مؤثر برای حذف توکسین از رنگدانهٔ موناسکوس می‌باشد.

در این تحقیق به بررسی و مقایسهٔ اثر مخمر زنده و غیرفعال‌شده با دو تیمار مؤثر شناخته‌شدهٔ اسیدی و حرارتی برای حذف توکسین توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در غلظت‌های مختلف پرداخته شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد مخمر در تمام حالت‌های موردبررسی در این پژوهش باعث کاهش سیترینین و رنگدانهٔ خارج سلولی از محیط گردید. قابلیت جذب و کاهش سیترینین در مخمر تیمارشده با اسید و حرارت بیشتر از مخمر زنده بود، به‌طوری‌که با افزایش غلظت سوسپانسیون قابلیت جذب نیز بیشتر شد. همچنین بررسی نتایج به‌دست‌آمده نشان داد استفاده از مخمر زنده

در کشت کپک موناسکوس باعث تحریک تولید رنگدانه و افزایش تولید رنگدانهٔ داخل سلولی و خارج سلولی می‌شود. باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت استفاده از مخمر زنده در غلظت 10^4 واحد تشکیل کلنی در میلی‌لیتر بهترین تیمار است، زیرا علاوه‌بر اینکه مقدار رنگدانه‌های داخل سلولی و خارج سلولی بیشتر از نمونهٔ کنترل است، مقدار سیترینین باقی‌مانده در محیط نیز به کمتر از حد مجاز استاندارد اروپا رسیده است. همچنین استفادهٔ هم‌زمان از مخمر زنده و تیمارشده تأثیر بیشتری در افزایش تولید رنگدانه و کاهش سیترینین خواهد داشت که دراین‌زمینه بررسی‌های بیشتری لازم است.

منابع

عوض‌پور، م.، سیفی‌پور، ف.، عبدی، ج.، نبوی، ط.، و زمانیان‌عضدی، م. (۱۳۹۲). جداسازی رنگ‌های خوراکی از فراورده‌های قنادی به روش کروماتوگرافی با لایه نازک. *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*، ۸(۳)، ۷۳-۷۸.

Al-Sarrani, A. Q. M., & El-Naggar, M. Y. M. (2006). Application of Plackett-Burman factorial design to improve citrinin production in Monascus rubber batch cultures. *Botanical Studies*, *47*, 167-174.

Armando, M., Pizzolitto, R., Dogi, C., Cristofolini, A ,.Merkis, C., Poloni, V., . . . Cavaglieri, L. (2012). Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic Saccharomyces cerevisiae strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of applied microbiology*, *113*(2), 256-264. doi:https//:doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05331.x

Avazpour, M., Seifipour, F., Abdi, J., Nabavi, T., & Zamanian-Azodi, M. (2013). Detection of dyes in confectionery products using thin-layer chromatography. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, *8*(3), 73-78 .

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., & Lebrihi, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological Saccharomyces strains. *Journal of applied microbiology*, *97*(5), 1038-1044 .

Blanc, P., Loret, M., & Goma, G. (1995). Production of citrinin by various species ofMonascus. *Biotechnology Letters*, *17*(3), 291-294. doi:https://doi.org/10.1007/BF01190639

Bueno, D. J., Casale, C. H., Pizzolitto, R. P., Salvano, M. A., & Oliver, G. (2007). Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and Saccharomyces cerevisiae: a theoretical model. *Journal of food protection*, *70*(9), 2148-2154. doi:https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2148

Chen, D., Xue, Y., Chen, M., Li, Z., & Wang, C. (2016). Optimization of submerged fermentation medium for citrinin-free monascin production by Monascus. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *46*(8), 772-779. doi:https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1135461

Chen, G., Shi, K., Song, D., Quan, L., & Wu, Z. (2015). The pigment characteristics and productivity shifting in high cell density culture of Monascus anka mycelia. *BMC biotechnology*, *15*(1), 1-9. doi:https://doi.org/10.1186/s12896-015-0183-3

Dikshit, R., & Tallapragada, P. (2011). Monascus purpureus: A potential source for natural pigment production. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, *1*(4), 164-174 .

Duraklı-Velioğlu, S., Boyacı, İ. H., Şimşek, O., & Gümüş, T. (2013). Optimizing a submerged Monascus cultivation for production of red pigment with bug damaged wheat using artificial neural networks. *Food Science and Biotechnology*, *22*(6), 1639-1648. doi:https://doi.org/10.1007/s10068-013-0261-z

PROOF

Hamdi, M., Blanc, P., Loret, M., & Goma, G. (1997). A new process for red pigment production by submerged culture of Monascus purpureus. *Bioprocess Engineering*, *17*(2), 75-79. doi:https://doi.org/10.1007/PL00008958

Jia, X. Q., Xu, Z. N., Zhou, L. P., & Sung, C. K. (2010). Elimination of the mycotoxin citrinin production in the industrial important strain Monascus purpureus SM001. *Metabolic engineering*, *12*(1), 1-7. doi:https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.08.003

Karazhiyan, H., Mehraban Sangatash, M., Karazhyan, R., Mehrzad, A., & Haghighi, E. (2016). Ability of different treatments of Saccharomyces cerevisiae to surface bind aflatoxin M1 in yoghurt. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *18*(6), 1489-1498 .

Kobylewski, S., & Jacobson, M. F. (2012). Toxicology of food dyes. *International journal of occupational and environmental health*, *18*(3), 220-246. doi:https://doi.org/10.1179/1077352512Z.00000000034

Kongruang, S. (2011). Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated Monascus purpureus in a stirred tank bioreactor. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *38*(1), 93-99. doi:https://doi.org/10.1007/s10295-010-0834-2

Kurniawati, S., & Zubaidah, E. (2014). Enhanced Production of Red Pigment and Lovastatin by Co-Culture with Saccharomyces cereviciae in Angkak Rice-Mung Bean. *International Journal of Technical Research and Application*, *2*(5), 64-67 .

Li, J.-J., Shang, X.-Y., Li, L.-L., Liu, M.-T., Zheng, J.-Q., & Jin, Z.-L. (2010). New cytotoxic azaphilones from Monascus purpureus-fermented rice (red yeast rice). *Molecules*, *15*(3), 1958-1966. doi:https://doi.org/10.3390/molecules15031958

Lin, T., Yakushijin, K., Büchi, G., & Demain, A. (1992). Formation of water-solubleMonascus red pigments by biological and semi-synthetic processes. *Journal of Industrial Microbiology*, *9*(3-4), 173-179. doi:https://doi.org/10.1007/BF01569621

Malik ,K., Tokkas, J., & Goyal, S. (2012). Microbial pigments: a review. *International Journal of Microbial Resource Technology*, *1*(4), 361-365 .

Manan, M., Mohamad, R., & Ariff, A. (2017). Monascus spp.: A source of Natural Microbial Color through Fungal Biofermentation. *Journal of Microbiology & Experimentation*, *5*(3), 00148. doi:https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00148

Morata, A., Loira, I., & Suárez Lepe, J. (2016). Influence of yeasts in wine colour. *Grape and Wine Biotechnology; Morata, A., Loira, I., Eds.* 285-305

Mu, H., Huang, L., Ding, X., & Zhao, S. (2015). Influence of different substrates on the production of pigments and citrinin by Monascus FJ46. In *Advances in Applied Biotechnology* (pp. 257-264): Springer, Berlin, Heidelberg.

Nadzri, N. S. (2012). *The optimization of red pigment by Monascus purpureus FTC 5356 in solid state fermentation.* (Doctoral dissertation), Universiti Malaysia Pahang, Retrieved from https://www.semanticscholar.org/paper/The-optimization-of-red-pigment-by-monascus-FTC-in-Shazwani/8cd6570e4f56849847ae042ba09693b3c4eaf0f1?p2df

NCCLS, N. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. In (Second ed.): NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, NCCLS Wayne, PA, USA.

Orozco, S. F. B., & Kilikian, B. V. (2008). Effect of pH on citrinin and red pigments production by Monascus purpureus CCT3802. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(2), 263-268. doi:https://doi.org/10.1007/s11274-007-9465-9

Patakova, P. (2013). Monascus secondary metabolites: production and biological activity. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *40*(2), 169-181. doi:https://doi.org/10.1007/s10295-012-1216-8

PROOF

Piotrowska, M. (2011). Adsorption of ochratoxin A by Saccharomyces cerevisiae living and non-living cells. *Acta alimentaria*, *41*(1), 1-7. doi:https://doi.org/10.1556/aalim.2011.0006

Rahaie, S., Emam-Djomeh, Z., Razavi, S., & Mazaheri, M. (2010). Immobilized Saccharomyces cerevisiae as a potential aflatoxin decontaminating agent in pistachio nuts. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*(1), 82-90 .

Said, F. (2010). *Monascus ruber ICMP 15220 Fermentation for the Production of Pigment.* (Doctoral dissertation), Massey University, New Zealand, Retrieved from https://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/2654/02_whole.pdf

Satapa, N. A. A. (2013). *Optimization of Yellow Pigment Production by Monascus Purpureus from Banana Peel.* (Doctoral dissertation), Universiti Malaysia Pahang, Retrieved from http://umpir.ump.edu.my/id/eprint/7220/1/Optimization_of_yellow_pigment_production.pdf

Seyedin, A., Hatamian-Zarmi, A., Rasekh, B., & Mirderikvand, M. (2015). Natural Pigment Production by Monascus purpureus: Bioreactor Yield Improvement through Statistical Analysis. *Applied Food Biotechnology*, *2*(2), 23-30. doi:https://doi.org/10.22037/afb.v2i2.7457

Shetty, P. H., Hald, B., & Jespersen, L. (2007). Surface binding of aflatoxin B 1 by Saccharomyces cerevisiae strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International journal of food microbiology*, *113*(1), 41-46. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.013

Shetty, P. H., & Jespersen, L. (2006). Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, *17*(2), 48-55. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.004

Shin, C. S., Kim, H. J., Kim, M. J., & Ju, J. Y. (1998). Morphological change and enhanced pigment production of Monascus when cocultured with Saccharomyces cerevisiae or Aspergillus oryzae. *Biotechnology and bioengineering*, *59*(5), 576-581. doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980905)59:5<576::AID-BIT7>3.0.CO;2-7

Suh, J.-H., & Shin, C. S. (2000a). Analysis of the morphologic changes of Monascus sp. J101 cells cocultured with Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiology Letters*, *193*(1), 143-147. doi:https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09416.x

Suh, J.-H., & Shin, C. S. (2000b). Physiological analysis on novel coculture of Monascus sp. J101 with Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiology Letters*, *190*(2), 241-245. doi:https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09293.x

Suharna, N. (2015). Production of Non Citrinin Chinese Red Yeast Rice by Using Monascus purpureus Skw2 Co-cultured with Bacillus megaterium. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, *2*(2), 72-78. doi:https://doi.org/10.5072/RIN/SDWT8R

Wang, H., Zhang, S., Lin, T., & Zheng, D. (2017). Introduction and safety evaluation of citrinin in foods. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, *5*(5), 179-183. doi:https://doi.org/10.11648/j.jfns.20170505.13

Wang, S., Zhao, S., Mu, H., Sun, F., & Chen, P. (2014). *Effect of Lactococcus lactis subsp. on Production of Pigment and Citrinin by Monascus.* Paper presented at the Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012).

Wang, Y.-Z., Ju, X.-L., & Zhou, Y.-G. (2005). The variability of citrinin production in Monascus type cultures. *Food Microbiology*, *22*(1), 145-148. doi:https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.006

Wang, Y., Zhang, B., Lu, L., Huang, Y., & Xu, G. (2013). Enhanced production of pigments by addition of surfactants in submerged fermentation of Monascus purpureus H1102. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(13), 3339-3344. doi:https://doi.org/10.1002/jsfa.6182

Xiong, X., Zhang, X., Wu, Z., & Wang, Z. (2014). Optimal selection of agricultural products to inhibit citrinin production during submerged culture of Monascus anka. *Biotechnology and bioprocess engineering*, *19*(6), 1005-1013 .doi:https://doi.org/10.1007/s12257-014-0419-4

PROOF

Zhang, L., Li, Z., Dai, B., Zhang, W., & Yuan, Y. (2013). Effect of submerged and solid-state fermentation on pigment and citrinin production by Monascus purpureus. *Acta Biologica Hungarica*, *64*(3), 385-394. doi:https://doi.org/10.1556/abiol.64.2013.3.11

Zhou, B., Zhu, M.-J., Wang, J.-F., Wu, Z.-Q., & Liang, S.-Z. (2009). Effect of Ammonium Salts on Monascus Yellow and Red Pigments and Citrinin Production. *Journal of Chongqing Institute of Technology (Natural Science)*, *1*, 010 .

PROOF

Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Live Cell and Treated with Heat and Acid on Citrinin and Pigments of *Monascus purpureus*

Hediyeh Davoudi Moghadam[1], Fakhri Shahidi[2*], Farideh Tabatabaei Yazdi[2], Mahboobe Sarabi-Jamab[3], Zarrin Es'haghi[4]

1- PhD. Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
* Corresponding author (fshahidi@um.ac.ir)
3- Associated Professor, Department of Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
4- Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University, Mashhad, Iran

PROOF

Abstarct

Monascus purpureus can produce a wide range of natural pigments so attract the attention of food producers as substitute of synthetic colors. Monascus pigments usually accompanied with citrinin contamination which limits their wide application in foods. The usage of *Saccharomyces cerevisiae* is known as a useful biological way for citrinin elimination. In this study, the effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells in two modes of treatment (heat treatment at 121 °C and acid treatment in 2M HCL) and live at three different concentrations (10^3, 10^4, 10^5 CFU/mL) were investigated on the amount of citrinin and yellow, orange and red pigments produced by *Monascus purpureus*. The results showed that live yeast cell and yeast cells treated by heat and acid significantly decreased the citrinin in culture, so that citrinin content decreased from 4.43 mg/L in control sample to 0.9, 0.10 and 0.07 mg/L (at 10^5 CFU/mL yeast suspension) respectively. The maximum amount of yellow, orange and red extracellular and intracellular measured pigments belong to the samples with live yeast, while the amount of this pigments in the samples containing yeast treated with heat and acid reduced respectively. Among the treatments, the use of live yeast at concentration of 10^4 CFU/mL per milliliter provided the best conditions to achieve the desired goal.

Keywords: Acid treatment, Heat treatment, Pigment, *Saccharomyces cerevisiae* Citrinin, *Monascus purpureus*