مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات ۳۶-۲۷

تولید مخمر غنی شده با سلنیوم به روش طراحی پلاکت برمن

سعیده اسمعیلی[۱]، کیانوش خسروی دارانی[۲]، رضوان پوراحمد[۳]، لیلی ناظمی[۴]، رزیتا کمیلی[۵]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا
۲- نویسنده مسئول: استادیار گروه تحقیقات علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com
۳- استادیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا
۴- مربی گروه تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵- کارشناس گروه تحقیقات علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۹

چکیده

سابقه و هدف: امروزه، کمبود سلنیوم در رژیم غذایی با وجود اهمیت تغذیه‌ای آن در بسیاری از جوامع مطرح است. مخمر غنی شده با سلنیوم که حاصل رشد *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط کشت غنی از سلنیوم است، به عنوان یک منبع غنی از شکل آلی سلنیوم راه حل مناسبی برای جبران کمبود این عنصر به حساب می‌آید. زیرا زیست‌دسترسی، پایداری بالا، قابلیت هضم و جذب و کاربرد وسیعی در گروه‌های مختلف غذایی دارد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر با استفاده از طراحی پلاکت برمن اثر شرایط مختلف کشت شامل دما (۲۸°C و ۳۰°C)، pH (۴/۵ و ۵/۸)، دور همزن (۱۳۰و۱۶۰ دور در دقیقه)، مدت تخمیر (۲۴ و ۴۸ ساعت)، میزان تلقیح (۳۰ و ۶۰ گرم در لیتر)، غلظت منبع سلنیوم (µg/ml ۱۵ و ۲۵) و زمان افزودن منبع سلنیوم به محیط کشت (۰ و ۹ ساعت) در بیوترانسفورماسیون سلنیوم در مخمر مورد بررسی قرار گرفت. مقدار سلنیوم در مخمر به روش جذب اتمی کوره‌ای انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که غلظت منبع سلنیوم، میزان تلقیح، دمای کشت و زمان افزودن منبع سلنیوم به محیط کشت هم‌چنین مدت تخمیر به ترتیب عوامل مؤثر بر بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و تشکیل سلنیوم آلی هستند. با تغییر سطوح این متغیرها بیوترانسفورماسیون سلنیوم و تجمع سلنیوم آلی در سلول‌های مخمر در محدوده ۲۸۷/۶- ۱۰۷/۹، mg/kg ۹۳/۲۷-۲۶۹/۰۵ حاصل شد.

نتیجه‌گیری: بهترین شرایط تولید با حداکثر جذب و تجمع سلنیوم آلی در مخمر عبارت است از: دمای کشت ۲۸ °C؛ pH=۵/۸ ؛ دور همزن ۱۳۰rpm؛ مدت تخمیر ۴۸ ساعت؛ میزان تلقیح ۳۰ g/l؛ غلظت منبع سلنیوم ۲۵ µg/ml و زمان افزودن منبع سلنیوم به محیط کشت ۹ ساعت پس از شروع تخمیر.

واژگان کلیدی: سلنیوم ، مخمر، بیوترانسفورماسیون، پلاکت برمن

• مقدمه

سلنیوم یکی از نادرترین عناصر روی زمین و یک ترکیب کلیدی برای حیات تمام موجودات زنده است. انسان‌ها و حیوانات نمی‌توانند بدون آن رشد مناسب و بقای طولانی داشته باشند. سلنیوم یک آنتی‌اکسیدان قوی است و نقش مهمی در واکنش‌های اکسیداسیون و احیای داخل سلولی دارد. این عنصر یکی از اجزای سلنوپروتئین‌ها و آنزیم‌های مهم بدن مانند Glutathione-peroxydase و Iodothyronine 5-deiodinase است که برای اعمال دفاعی آنتی‌اکسیدانی و تولید هورمون تیروئید و.... ضروری است. این عنصر باعث کاهش ذخیره خون تومورها می‌شود و سلول‌های سرطان‌زا را از بین می‌برد. در نتیجه، دریافت میزان کافی سلنیوم از نظر سلامتی حائز اهمیت است (۳-۱) یافته‌های پیشین نشان می‌دهند که به وسیله حفظ سطح مناسب سلنیوم در رژیم غذایی می‌توان برخی از انواع سرطان پیشگیری کرد (۴).

سلنیوم از نظر تغذیه‌ای در رده عناصر معدنی کمیاب به شمار می‌رود. اهمیت آن در تغذیه انسان در سال ۱۹۷۹ توسط دانشمندان چینی نشان داده شد. این دانشمندان گزارش کردند که مصرف مکمل‌های دارویی سلنیوم می‌تواند از ایجاد بیماری کشان (Keshan disease) پیشگیری کند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-11-25]

بیماری کشان یک بیماری کاردیومیوپاتی همه‌گیر بومی شایع در مناطق شمال غرب چین است که از نظر سلنیوم فقیر هستند (۵). اطلاعات درباره نقش سلنیوم در تغذیه انسان به سرعت در سال ۱۹۸۰ میلادی افزایش یافت و در سال ۱۹۸۹ مقدار دریافت توصیه شده روزانه آن برای زنان و مردان به ترتیب ۵۵ و ۷۰ میکروگرم پیشنهاد شده است (۶، ۷).

از آنجا که نیازهای تغذیه‌ای انسان به سلنیوم از طریق منابع گیاهی و حیوانی تامین می‌شود، دریافت سلنیوم در انسان به سطوح در دسترس سلنیوم خاکی که ماده غذایی در آن رشد یافته، بستگی دارد. با توجه به این که شرایط آب و هوایی مسئول شست و شوی سلنیوم و ترکیبات آن از خاک هستند، میزان این عنصرممکن است در محصولات کشاورزی به دلیل کمبود در خاک یا کاهش زیست‌دسترسی کافی نباشد (۹، ۸). در نتیجه، استفاده از مکمل‌های غذایی سلنیوم در مناطقی که دریافت سلنیوم از طریق رژیم غذایی در حد کافی نیست، توصیه می‌شود. FDA (اداره غذا و داروی امریکا) غنی‌سازی غذای حیوانات را با سلنیوم (سلنیت سدیم یا سلنات سدیم) در غلظت ۰/۳ppm تأیید کرده است (۶).

امروزه، تقاضا برای استفاده از مکمل‌های سلنیوم به ویژه مخمر سلنیوم (سلنیوم آلی) روزافزون شده است. سلنیوم آلی با الگوبرداری از طبیعت ساخته شده است؛ یعنی در ساختار اسیدهای آمینه گوگردار سلنیوم جایگزین گوگرد شده است (۱۳-۱۰). بهترین شکل سلنیوم برای متابولیسم انسان، سلنومتونین است (۱۵، ۱۴). این شکل سلنیوم می‌تواند در توده سلولی مخمر رشد یافته در محیط کشت حاوی سلنیوم معدنی تجمع پیدا کند (۱۱).

مخمر سلنیوم یک محصول مخمری خوراکی دارای میزان بالایی سلنیوم داخل سلولی و به شکل آلی است (۱۹-۱۶، ۱۱). تحقیقات نشان می‌دهد که برخی میکروارگانیسم‌ها به خصوص مخمر می‌تواند با بهره‌گیری از قندهای محلول واسیدهای آلی توده سلولی با محتوای بالای پروتئین تولید کند. در ضمن می‌تواند سلنیوم معدنی را (که زیست دسترسی کمی دارد و بالقوه سمی است) به شکل آلی (که ایمن‌تر و از نظر زیستی فعال‌تر است) تبدیل کند (۲۱، ۲۰).

مخمر یک حامل مناسب برای بیوترانسفورماسیون سلنیوم است (۲۳، ۲۲). یکی از اقتصادی‌ترین منابع سلنیوم آلی، مخمر رشد یافته در محیط کشت غنی شده با سلنیوم است (۲۱). سویه مخمر مورد استفاده در تولید مخمر غنی شده با سلنیوم، مخمر نانوایی استاندارد (*ساکارومایسس سرویزیه*) است (۲۵، ۲۴). FDA چندین گروه مواد غذایی را جهت استفاده مخمر سلنیوم در آن‌ها تعریف کرده است؛ شامل: محصولات نانوایی، پودر نوشیدنی‌ها، غلات صبحانه، محصولات لبنی.

علاوه بر این، حداکثر سروینگ روزانه جهت استفاده این موادغذایی به همراه سطح پیش‌بینی دریافت سلنیوم از هر سروینگ تعیین شده است. حداکثر دریافت سلنیوم از طریق این منابع غذایی ۱۵۰ میکروگرم در روز است که کاملا ایمن تعریف شده است (۲۵).

تا کنون در زمینه تولید مخمر غنی شده با سلنیوم مطالعاتی انجام شده است. *Ferhance* (۲۰۰۱) حداکثر میزان جذب سلنیوم را در مخمر نانوایی *ساکارومایسس سرویزیه* در سطوح مختلف سلنیوم معدنی به شکل سلنیت سدیم و سطوح تلقیح مختلف در دما ۲۷ °C و مدت زمان تخمیر ۸ و ۲۴ ساعت بررسی کرد. حداکثر جذب سلنیوم با افزودن ۱۲/۶ mmol سلنیوم به شکل نمک سلنیت به محیط کشت و تخمیر در مدت ۲۴ ساعت و میزان تلقیح ۶۰ gr/l مشاهده شد. در نهایت، مخمر نانوایی غنی شده با سلنیوم حاوی ۳۵ ± ۱۵۵۰ µg Se/g Yeast حاصل شد (۸).

Olena و همکاران (۲۰۰۸) فرایند تولید نان غنی شده با مخمر نانوایی حاوی سلنیوم بالای داخل سلولی و به شکل آلی را بررسی کردند و نشان دادند که ۱۰۰گرم نان رولی گندم آماده شده با مخمری که در محیط کشت حاوی سدیم هیدروسلنیت رشد کرده، حدود ۵۰ µg سلنیوم به شکل سلنومتیونین دارد (۱۰).

Hongfei و همکاران (۲۰۱۰) اثر ۳ عامل دما، pH و حجم فرمانتور بر تولید مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* غنی شده با سلنیوم را به روش رویه پاسخ (Response Surface Methodology) بررسی کردند و یافتند که وقتی دما ۲۷/۴°C و pH=۵/۸ و حجم محیط کشت ۸۹/۴ml باشد، تولید مخمر غنی شده با سلنیوم بهینه خواهد بود. بیشترین جذب سلنیوم در سلول‌های مخمری ۵/۹mg/l حاصل شد (۱۳).

طراحی آزمایش بر اساس اصول آماری ثابت کرده است که ابزار ارزشمندی در بهینه‌سازی شرایط کشت است (۲۷، ۲۶). این طراحی به تعدادی آزمایش محدود و کارآمد نیاز

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-11-25]

دارد. مفید بودن این طراحی در واقع به دلیل معین کردن اثر تعداد متغیر زیاد به طور مستقل بر پاسخ سیستم است.

در این مطالعه برای اولین بار اثر ۷ متغیر مستقل مؤثر بر تولید مخمر غنی شده با سلنیوم هم‌زمان بر ۳ متغیر وابسته بازده نهایی توده سلولی، بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و محتوی سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمری بررسی شده است. هم‌چنین، در این تحقیق کاربرد پلاکت برمن به عنوان یک طرح غربالگری برای ارزیابی اهمیت نسبی ۷ متغیر (شامل مدت زمان تخمیر، زمان افزودن منبع سلنیوم به محیط کشت مخمر، غلظت منبع سلنیوم، میزان تلقیح، دور همزن، pH و دما) بر متغیرهای وابسته مورد آزمون در سلول‌های مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* غنی شده با سلنیوم برای اولین بار ارزیابی شده است.

• مواد و روش‌ها

مواد: مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (مخمر نانوایی) از شرکت فرانسوی *Lesaffre* به صورت مخمر خشک فعال (active dried yeast) و سلنیت سدیم مورد استفاده جهت غنی‌سازی محیط کشت مخمر از شرکت *Sigma* خریداری شد. سایر مواد شیمیایی استفاده شده در انجام آزمایش از شرکت آلمانی *Merck* تهیه شد.

آماده‌سازی محیط کشت پایه: ملاس نیشکر با آنالیز مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۳۱۹ و بریکس ۸۸/۵۷ درجه بومه تقریبا به نسبت ۱به۱توسط آب مقطر رقیق و به منظور حذف مواد معلق با استفاده از قیف بوخنر صاف شد. سپس بریکس آن در ۴۰ درجه بومه در دمای $20^{\circ}C$ تنظیم شد.

تهیه محیط کشت و شرایط تخمیر: مخمر نانوایی *ساکارومایسس سرویزیه* به منظور تولید توده سلولی غنی شده با سلنیوم کشت داده شد. سطوح مختلف مخمری به عنوان مایه تلقیح به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت دارای pH و غلظت‌های متفاوت منبع سلنیوم در دستگاه انکوباتور شیکردار تحت دمای کشت و دور همزن مختلف کشت شد. ملاس نیشکر استریل با بریکس ۴۰٪ به عنوان محیط کشت پایه استفاده شد. اجزای تشکیل‌دهنده محیط کشت شامل نمک‌های مغذی: ۱/۳۳ g/l کلرید روی، ۱/۱۶ g/l کلرید منیزیم، ۰/۲ g/l تیامین، ۰/۰۲۵g/l کلسیم پانتوتنات، ۱۵ g/l سیترات سدیم، ۱۰ g/l سدیم گلوتامات) جهت بهبود رشد و جذب سلنیوم و آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن و تنظیم‌کننده pH محیط کشت است. سلنیوم به صورت محلول سلنیت سدیم در غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ µg/ml در زمان‌های مختلف به محیط‌کشت اضافه شد. در نهایت، میزان رشد مخمر در محیط کشت غنی از سلنیوم به وسیله اندازه‌گیری دانسته سلول‌های مخمری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین شد (۱۰).

اندازه‌گیری میزان بیوترانسفورماسیون سلنیوم در مخمر: سوسپانسیون مخمری غنی شده با سلنیوم پس از عمل تخمیر توسط سانتریفوژ یخچال‌دار ($g\times$ ۳۰۰۰ به مدت ۱۵دقیقه در دمای $25^{\circ}C$) از محیط کشت جدا شده و به منظور جداسازی سلنیوم معدنی متصل شده به دیواره سلولی سه مرتبه با آب دیونیزه شسته و سانتریفوژ و سپس توسط دستگاه خشک کن انجمادی تا رسیدن به وزن ثابت، خشک شد.

به منظور تعیین میزان سلنیوم جذب شده در متابولیسم سلول‌های مخمر از روش جذب اتمی کوره‌ای استفاده شد. ۰/۲ گرم پودر مخمر غنی شده با سلنیوم توسط ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ در دمای $105^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه (در داخل بالن هضم) هضم و سپس خنک شد. بررسی تکمیل عمل هضم به مدت ۱۰ دقیقه با ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ در دمای $80^{\circ}C$ حرارت داده شد پس از خنک شدن، فیلتر شده (۰/۴۵µm) و با آب دیونیزه به حجم ثابت رسانده شد و برای اندازه‌گیری سلنیوم کل به دستگاه جذب اتمی کوره‌ای تزریق شد. جهت اندازه‌گیری محتوی سلنیوم آلی تشکیل شده مخمر، ۰/۲ گرم پودر مخمر سلنیوم به مدت ۱ ساعت در حمام جوش قرار گرفت و پس از خنک شدن به حجم ثابت رسانده شد. سپس محلول، سانتریفوژ شده ($g\times$ ۸۳۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) و محول رویی از فیلتر عبور داده شد تا برای تزریق به دستگاه جذب اتمی کوره‌ای آماده شود. با محاسبه اختلاف سلنیوم تام و سلنیوم معدنی، میزان بازده نهایی سلنیوم آلی در مخمر سلنیوم به دست آمد (۱۳).

طراحی آزمایش: به منظور تعیین عوامل مؤثر در فرایند غنی‌سازی مخمر با سلنیوم، از طرح آماری پلاکت برمن PBD (Plackett-Burman Design) استفاده شد. لذا ۷ متغیر موثر بر بازده نهایی رشد سلولی مخمر، بیوترانسفورماسیون سلنیوم و میزان سلنیوم جذب شده در مخمر به شکل آلی (مدت زمان تخمیر، زمان افزودن منبع

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-11-25]

سلنیوم به محیط کشت مخمر، غلظت منبع سلنیوم، میزان تلقیح، دور همزن، pH و دما) به شرح جدول ۱ در دو سطح انتخاب شدند.

جدول۱. متغیرهای مؤثر برتولید مخمر سلنیوم در PBD

	متغیرها	سطح کم (-)	سطح زیاد (+)
A	مدت زمان تخمیر (h)	۲۴	۴۸
B	زمان افزودن منبع سلنیوم (h)	۰	۹
C	غلظت منبع سلنیوم (µg/ml)	۱۵	۲۵
D	میزان تلقیح (g/l)	۳۰	۶۰
E	دور همزن (rpm)	۱۳۰	۱۶۰
F	pH	۴/۵	۵/۸
G	دما (°C)	۲۸	۳۰

جدول۲ طرح هشت تایی **PBD** مورد استفاده در این تحقیق را با اعداد کد شده نشان می‌دهد. علامت‌های مثبت و منفی در جدول، نمایانگر سطح بالا و پایین برای هر متغیر است. انتخاب سطوح با استفاده از تجربه‌های قبلی و یا مرور منابع به نحوی انتخاب شده است که یکی از دو سطح بالا یا پایین حدود نقطه بهینه احتمالی قرار گیرد. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده، از نرم افزار Minitab11 استفاده شد. مقدار p به دست آمده برای هر متغیر، کاملا معنی‌دار بودن ($p\leq ۰/۰۱$)، معنی‌دار بودن ($۰/۰۱<p\geq ۰/۰۵$) و معنی‌دار نبودن ($p>۰/۰۵$) اثر آن متغیر روی هریک از پاسخ‌ها (بازده نهایی رشد سلولی مخمر، بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم، محتوی سلنیوم آلی جذب شده در مخمر به شکل آلی) را مشخص می‌کند.

جدول۲. طرح هشت‌تایی PBD

آزمایش	A	B	C	D	E	F	G
۱	-1	-1	1	-1	1	1	1
۲	1	-1	-1	1	-1	1	1
۳	1	1	-1	-1	1	-1	1
۴	1	1	1	-1	-1	1	-1
۵	-1	1	1	1	-1	-1	1
۶	1	-1	1	1	1	-1	-1
۷	-1	1	-1	1	1	1	-1
۸	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

• یافته‌ها

در این مطالعه امکان غنی سازی مخمر با سلنیوم مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی عوامل مؤثر بر فرایند بیوترانسفورماسیون سلنیوم در مخمر نانوایی از طرح عاملی پلاکت برمن استفاده شد. اثر متغیرهای مختلف فرایند بر میزان جذب سلنیوم در سلول‌های مخمر تعیین شد.

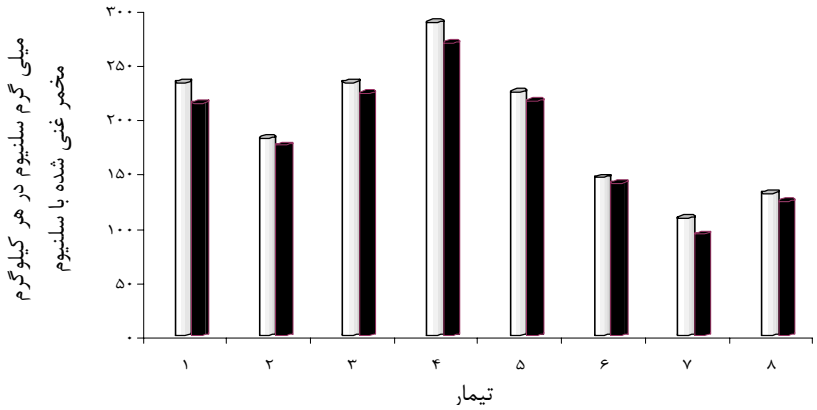
میانگین بازده نهایی توده سلولی، بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و مقدار سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمری هریک از تیمارها در جدول ۳ نشان داده شده است.

نمودارهای ۱ و ۲ به ترتیب مقایسه بین تیمارهای مختلف آزمایش از نظر بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و مقدار سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمر و بازده نهایی رشد توده سلولی بر طبق طرح پلاکت برمن را نشان می‌دهند. . در نمودار ۳ همبستگی هر یک از متغیرهای فرایند با ۳ پاسخ سیستم نشان داده شده است.

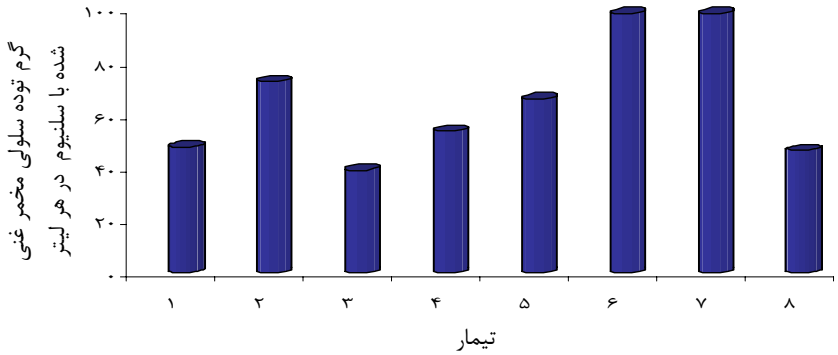
جدول۳. نتایج میانگین بازده نهایی توده سلولی، بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و مقدار سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمر در طراحی پلاکت برمن

آزمایش	بازده نهایی رشد سلولی (g/l)	بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم (mg/kg)	سلنیوم آلی تجمع یافته در مخمر (mg/kg)
۱	۴۷/۵۹	۲۳۲/۵۵	۲۱۳/۸۲
۲	۷۲/۵۰	۱۸۱/۲۰	۱۷۴/۷۷
۳	۳۸/۸۳	۲۳۲/۵۵	۲۲۲/۷۵
۴	۵۳/۶۹	۲۸۷/۶۵	۲۶۹/۰۵
۵	۶۵/۷۷	۲۲۴/۰۵	۲۱۵/۴
۶	۹۸/۳۷	۱۴۵/۲۰	۱۳۹/۹۲
۷	۹۸/۳۷	۱۰۷/۹۰	۹۳/۲۷
۸	۴۶/۳۲	۱۳۰/۵۵	۱۲۳/۳۲

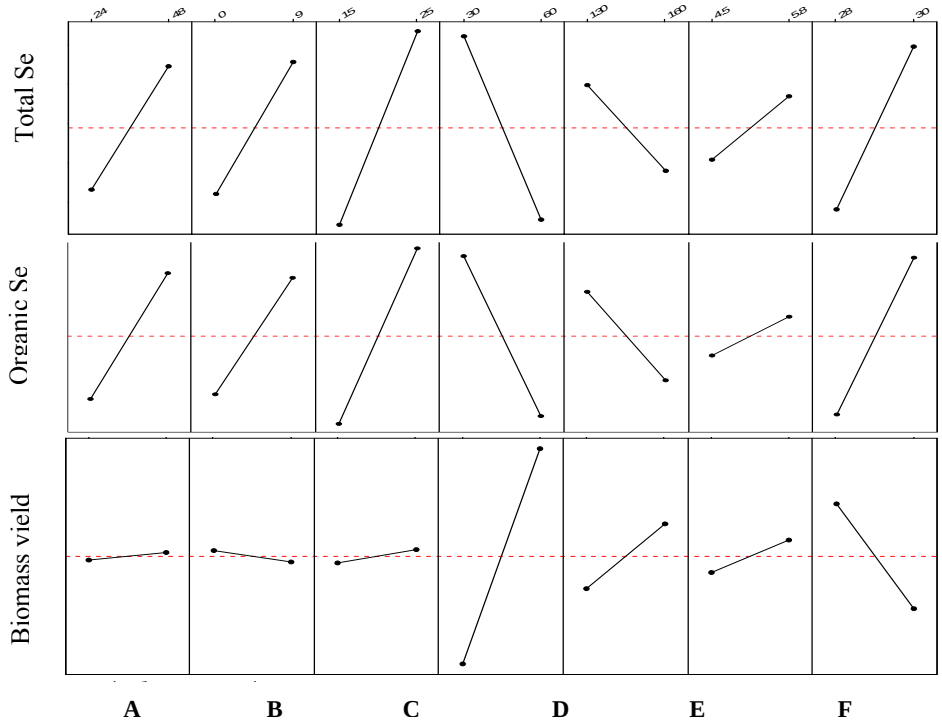
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-11-25]



نمودار ۱. مقایسه بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم (نمودار سفید رنگ) و مقدار سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمری (نمودار مشکی رنگ) طی آزمون‌های مختلف انجام شده طبق طرح پلاکت برمن



نمودار ۲. مقایسه بازده نهایی توده سلولی طی آزمون‌های مختلف انجام شده طبق طرح پلاکت برمن



نمودار۳. همبستگی هریک از متغیرهای فرایند با پاسخ‌های سیستم

A: مدت زمات تخمیر
B: زمان افزودن منبع سلنیوم
C: غلظت منبع سلنیوم
D : میزان تلقیح
E: دور همزن
G: pH
F: دمای کشت

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-11-25]

بررسی اثر متغیرهای مورد بررسی بر بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و مقدار سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمر: تأثیر هریک از ۷ متغیر مورد بررسی بر بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و مقدار سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمری همراه با ضریب مربوطه در جدول‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است.

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که غلظت منبع سلنیوم، میزان تلقیح مخمر، دما، زمان افزودن منبع سلنیوم به محیط کشت و مدت زمان تخمیر اثر معنی‌داری روی بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و مقدار سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمر داشتند.

بازده نهایی جذب سلنیوم و مقدار سلنیوم جذب شده به شکل آلی با غلظت سلنیوم در محیط کشت در محدوده تغییرات مورد بررسی همبستگی مثبت داشتند (نمودار ۳). یعنی با افزایش غلظت منبع سلنیوم در محیط کشت افزایش کاملا معنی‌داری در بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و مقدار سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمر مشاهده شد ($p\leq ۰/۰۱$).

با افزایش میزان تلقیح، کاهش کاملا معنی‌داری در بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و مقدار سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمر رخ داد ($p\leq ۰/۰۱$) که نشان‌دهنده همبستگی منفی بین متغییر مستقل میزان تلقیح و ۲ متغیر وابسته مورد آزمون در محدوده تغییرات مورد بررسی است (نمودار ۳).

دمای کشت اثر کاملا معنی‌داری بر بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و مقدار سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمر داشت. با افزایش دمای کشت، بیوترانسفورماسیون سلنیوم و شکل‌گیری سلنیوم آلی در سلول‌های مخمر افزایش یافت ($p\leq ۰/۰۱$).

زمان افزودن منبع سلنیوم به محیط کشت از دیگر متغیرهای مؤثر بر ۲ پاسخ مورد بررسی بود. زمان افزودن منبع سلنیوم به محیط کشت اثر معنی‌داری بر بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم و مقدار سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمری داشت ($۰/۰۱ \geq p > ۰/۰۵$). نتایج نشان داد که افزودن منبع سلنیوم ۹ ساعت پس از شروع تخمیر (یعنی در مرحله رشد لگاریتمی) می‌تواند سبب بهبود جذب سلنیوم در سلول‌های مخمر و همچنین شکل‌گیری سلنیوم آلی شود.

افزایش مدت زمان تخمیر سبب افزایش معنی‌دار در جذب سلنیوم در سلول‌های مخمر و هم‌چنین شکل‌گیری سلنیوم آلی شد ($۰/۰۱ \geq p > ۰/۰۵$).

تمام فرایندهای سلولی و متابولیسمی تحت تأثیر pH (غلظت یون هیدروژن در محیط مایع) است. pH محیط کشت می‌تواند بر عملکرد دیواره سلولی، ساختمان و مورفولوژی سلولی، جذب ریزمغذی‌ها و بیوسنتز محصول مؤثر باشد. با افزایش pH محیط، بازده نهایی رشد سلولی افزایش یافت ($۰/۰۱ \geq p > ۰/۰۵$). در نتیجه، با افزایش بازده نهایی توده سلولی، جذب سلنیوم در متابولیسم سلول‌های مخمری و تشکیل سلنیوم آلی ($p > ۰/۰۵$) افزایش یافت.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد با افزایش سرعت دور همزن از ۱۳۰ به ۱۶۰ دور در دقیقه بیوترانسفورماسیون سلنیوم و شکل‌گیری سلنیوم آلی کاهش یافت ($p > ۰/۰۵$).

سلنیوم در سلول‌های مخمر به شکل آلی یا معدنی تجمع پیدا می‌کند که رنگ قهوه‌ای مایل به زرد تا صورتی و قرمز به سوسپانسیون مخمر می‌دهد. مقدار سلنیوم معدنی شکل گرفته در سلول‌های مخمر در تحقیق حاضر به اندازه‌ای نبود که رنگ صورتی (بیش از ۲۵٪) در سلول‌های مخمر ایجاد کند. رنگ سلول‌های مخمر در همه نمونه‌ها قهوه‌ای مایل به زرد بود. مقدار سلنیوم معدنی شکل گرفته در سلول‌های مخمری در حدود ۶٪ به دست آمد.

بررسی اثر متغیرهای مورد بررسی بر بازده نهایی رشد سلولی: تأثیر هریک از ۷ متغیر مورد بررسی بر بازده نهایی توده سلولی همراه با ضریب مربوطه در جدول ۶ نشان داده شده است. میزان تلقیح، دما، دور همزن، pH به ترتیب عوامل مؤثر بر رشد سلولی بودند که تأثیر معنی‌داری در افزایش بازده نهایی رشد توده سلولی داشتند.

با افزایش غلظت سلنیوم، رشد مخمر در محیط کشت تا حدودی افزایش یافت. زیرا سنتز اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها در مخمر با میزان بلوغ خاص (به عنوان مایه تلقیح) نسبتا سریع‌تر است و می‌تواند به طور مؤثر و کاراتری سلنیوم را جذب کند. هم‌چنین سمیت سلنیوم روی سلول‌های مخمر رشد یافته اثر نسبتاً کمتری دارد، در حالی که جلوگیری از رشد سلولی می‌تواند در مورد استفاده از کشت میکروبی به عنوان مایه تلقیح دیده شود. در نتیجه، استفاده از سلول‌های مخمری با بلوغ رشدی معین به عنوان مایه تلقیح دلیل این مقاومت نسبت به سلنیوم در محیط کشت تا مقدار ۲۵μg/ml بوده است. بنابراین سلنیوم نه تنها از رشد سلول‌های مخمر جلوگیری نکرده، بلکه در شرایط کمبود گوگرد در محیط کشت، سلنیوم جایگزین گوگرد در متابولیسم مخمر شده و رشد سلولی را افزایش داده است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-11-25]

جدول ۴. نتایج آماری پلاکت برمن – پاسخ: بازده نهایی بیوترانسفورماسیون سلنیوم در مخمر *

متغیرها	اثر متغیر	ضریب متغیر	*t*-value	*p*-value
مدت زمان تخمیر (h)	۳۷/۸۹	۱۸/۹۴	۲/۴۳	۰/۰۴۱
زمان افزودن منبع سلنیوم (h)	۴۰/۶۶	۲۰/۳۳	۲/۶۱	۰/۰۳۱
غلظت منبع سلنیوم (µg/ml)	۵۹/۳۱	۲۹/۶۶	۳/۸۱	۰/۰۰۵
میزان تلقیح (g/l)	-۵۶/۲۴	-۲۸/۱۲	-۳/۶۱	۰/۰۰۷
دور همزن (rpm)	-۲۶/۳۱	-۱۳/۱۶	-۱/۶۹	۰/۱۳۰
pH	۱۹/۲۴	۹/۶۲	۱/۲۴	۰/۲۵۲
دما (°C)	۴۹/۷۶	۲۴/۸۸	۳/۲۰	۰/۰۰۱۳

*t-value محاسبه شده بر اساس درجه آزادی ۷ و ۰/۰۵ = α می‌باشد.

جدول ۵. نتایج آماری پلاکت برمن – پاسخ: محتوی سلنیوم آلی تجمع یافته در سلول‌های مخمر *

متغیرها	اثر متغیر	ضریب متغیر	*t*-value	*p*-value
مدت زمان تخمیر (h)	۴۰/۱۷	۲۰/۰۸	۲/۶۴	۰/۰۳۰
زمان افزودن منبع سلنیوم (h)	۳۷/۱۶	۱۸/۵۸	۲/۴۴	۰/۰۴۰
غلظت منبع سلنیوم (µg/ml)	۵۶/۰۲	۲۸/۰۱	۳/۶۸	۰/۰۰۶
میزان تلقیح (g/l)	-۵۱/۳۹	-۲۵/۷۰	-۳/۳۸	۰/۰۱۰
دور همزن (rpm)	-۲۸/۱۹	-۱۴/۱۰	-۱/۸۵	۰/۱۰۱
pH	۱۲/۳۸	۶/۱۹	۰/۸۱	۰/۴۳۹
دما (°C)	۵۰/۲۹	۲۵/۱۵	۳/۳۱	۰/۰۱۱

*t-value بر اساس درجه آزادی ۷ و ۰/۰۵ = α محاسبه شده است.

جدول۶. نتایج آماری پلاکت برمن – پاسخ : بازده نهایی توده سلولی *

متغیرها	اثر متغیر	ضریب متغیر	*t*-value	*p*-value
مدت زمان تخمیر (h)	۱/۳۳۷	۰/۶۶۸	۰/۹۷	۰/۳۶۰
زمان افزودن منبع سلنیوم (h)	-۲/۰۳۰	-۱/۰۱۵	-۱/۴۸	۰/۱۷۸
غلظت منبع سلنیوم (µg/ml)	۲/۳۴۸	۱/۱۷۴	۱/۷۱	۰/۱۲۶
میزان تلقیح(g/l)	۳۷/۱۴۵	۱۸/۵۷۲	۲۷/۰۰	۰/۰۰۰
دور همزن(rpm)	۱۱/۲۲۵	۵/۶۱۲	۸/۱۶	۰/۰۰۰
pH	۵/۷۱۵	۲/۸۵۷	۴/۱۵	۰/۰۰۳
دما(°C)	-۱۸/۰۱۷	-۹/۰۰۸	-۱۳/۰۹	۰/۰۰۰

*t-value بر اساس درجه آزادی ۷ و ۰/۰۵ = α محاسبه شده است.

• بحث

طبق مطالعات انجام شده، افزایش دریافت سلنیوم به صورت مخمر سلنیوم به عنوان یک روش بسیار مناسب، ایمن و زیست دسترس در غنی سازی مواد غذایی شناخته شده است. زیرا در این روش یک سد بیولوژیک بین سلنیوم معدنی و فرد مصرف‌کننده وجود دارد. هم‌چنین، مخمر به عنوان یک نمونه شامل شکلی از سلنیوم با خاصیت بیواکتیو بالا انتخاب شده است (۱۰).

مخمر سلنیوم محصول تخمیر هوازی *S. cerevisiae* در محیط غنی از سلنیوم است. منبع سلنیوم به شکل نمک سلنیوم (سلنیت سدیم) به محیط کشت افزوده می‌شود. دما، pH، غلظت منبع سلنیوم، زمان تزریق آن به محیط کشت و هوادهی در رشد بهینه مخمر و جذب سلنیوم و تولید حداکثر توده سلولی مؤثر هستند (۲۵، ۲۴).

تحت شرایط کمبود گوگرد (سولفور) در محیط کشت، مخمر، سلنیوم را به عنوان جایگزین جذب می‌کند (۸).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-11-25]

غلظت سلنیوم در محیط کشت از عوامل تأثیرگذار بر رشد مخمر غنی شده با سلنیوم بود. *Olena* و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه خود گزارش کردند که غلظت منبع سلنیوم در محیط کشت عامل جلوگیری کننده از رشد مخمر است (۱۰).

Ferhance در مطالعه خود از خمیرمایه خامه‌ای شکل (yeast cream) به عنوان مایه تلقیح استفاده کرد. وی معتقد است که استفاده از سلول‌های مخمر با بلوغ رشدی معین به جای استفاده از کشت میکروبی سبب مقاومت بیشتر در مقابل سمیت سلنیوم می‌شود. هم‌چنین، قابلیت جذب سلنیوم در این سلول‌ها بیشتر است (۸).

در تحقیق حاضر از مخمر خشک فعال به عنوان مایه تلقیح استفاده شد. نتایج این مطالعه با تحقیق *Ferhance* مطابقت داشت.

طبق مطالعات*Marinescu* و همکاران (۲۰۱۰) هرچه تجمع سلنیوم معدنی در سلول‌های مخمری بیشتر باشد، رنگ سلول‌های مخمر قرمز رنگ‌تر خواهد شد (۲۸). *Suhajda* و همکاران (۲۰۰۰) دریافتند که تجمع سلنیوم به شکل معدنی به میزان بالاتر از ۲۵٪ سبب ایجاد رنگ صورتی و سپس قرمز در سلول‌های مخمری می‌شود (۱۱). در تحقیق حاضر، تجمع سلنیوم معدنی در سلول‌های مخمر در حدود ۶٪ بود و رنگ سوسپانسیون مخمر قهوه‌ای مایل به زرد مشاهده شد.

Ponce de Leon و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که با افزایش غلظت منبع سلنیومی در محیط کشت، جذب سلنیوم در سلول‌های مخمر و هم‌چنین تشکیل سلنیوم آلی در سلول‌های مخمر افزایش می‌یابد (۱۲). این نتایج با مشاهدات *Ponce de Leon* مطابقت داشت.

Marinescu و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود در زمینه غنی‌سازی میکروارگانیسم *Saccharomyces uvarum* با سلنیوم نتیجه گرفتند که افزایش میزان تلقیح در محیط کشت سبب کاهش جذب سلنیوم در سلول‌های مخمر می‌شود (۲۸). اما *Ferhance* در تحقیق خود گزارش کرد با تلقیح g/l ۶۰ ، جذب سلنیوم در سلول‌های مخمر و بازده نهایی رشد سلولی نسبت به تلقیح g/l ۴۵ بیشتر بوده است (۸). نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات*Marinescu* مطابقت داشت.

*Hongfe*i و همکاران (۲۰۱۰) اثر ۳ عامل دما (۲۴، ۲۸ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد)، pH (۴، ۵/۵ و ۷) و حجم محیط کشت (با دورهمزن ثابت ۱۶۰rpm) (۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌متر) با میزان تلقیح ۱۰٪ و افزودن منبع سلنیوم با غلظت µg/ml ۱۵ را در بیوترانسفورماسیون سلنیوم در سلول‌های مخمر بررسی کردند. بیشترین جذب سلنیوم در دمای °C ۲۷/۴ و pH=۵/۸ و حجم محیط کشت ۸۹/۴ میلی‌لیتر حاصل شد. آنان معتقدند افزودن منبع سلنیوم به محیط کشت هنگامی که سلول‌های مخمر در مرحله رشد لگاریتمی هستند جذب سلنیوم را افزایش می‌دهد (۱۳). نتایج تحقیق حاضر با مشاهدات *Hongfe*i مطابقت داشت.

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که مخمر تحت عمل بیوترانسفورماسیون سلنیوم معدنی را از محیط کشت جذب و به شکل آلی با قابلیت جذب و هضم بالا تبدیل می‌کند. با بهره‌گیری از شرایط مختلف تولید (شامل دما، pH، دور همزن، میزان تلقیح و مدت زمان تخمیر، غلظت منبع سلنیوم و زمان افزودن آن به محیط کشت) بیوترانسفورماسیون سلنیوم در سلول‌های مخمری در محدوده mg/kg ۲۸۷/۶۵-۱۰۷/۹ حاصل شد.

مقادیر بهینه ۷ متغیر مورد بررسی برای تولید مخمر غنی شده با سلنیوم به این شرح است:

غلظت منبع سلنیوم در محیط کشت، µg/ml ۲۵؛ زمان افزودن منبع سلنیوم به محیط کشت، ۹ ساعت پس از شروع تخمیر؛ میزان تلقیح، g/l۳۰؛ دور همزن، rpm ۱۳۰؛ مدت زمان تخمیر، ۴۸ ساعت؛ دمای کشت، °C۲۸ و pH محیط کشت، ۵/۸ . با این ترکیب متغیرها حداکثر میزان بیوترانسفورماسیون سلنیوم در سلول‌های مخمری مشاهده شد.

References

1. Combs GF, Clark LC, Turnbull BW. An analysis of cancer prevention by selenium. J Biofactors 2001; 14: 153-9.
2. Haug A, Graham RD, Christophersen OA, Lyons GH. How to use the world's scarce selenium resources efficiently to increase the selenium concentration in food. Microb Ecol Health Dis 2007; 19 (4): 209-28.
3. Safaralizadeh R, Kardar GA, Pourpak Z, Moin M, Zare A, Teimourian S. Serum concentration of Selenium in healthy individuals living in Tehran. Nutr J 2005; 4(32):1-4.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-11-25]

4. Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. JAMA 1996; 276: 1957-63.

5. Ataei N. Selenium. Esfehan: Kia press 2008; 5-30 [in Persian].

6. US Food and Drug Administration (FDA). Food additives permitted in feed and drinking water of animals: Selenium. Fed Reg 1987; 52: 10887.

7. Levander OA. A global view of human selenium nutrition. Ann Rev Nutr 1987; 7: 227-50.

8. Ferhance A. A novel method for the production of selenium-enriched yeast. [dissertation]. Canada: McGill University, National library of Canada; 2001.

9. Graham L, James S, Robin G. High-selenium wheat: biofortification for better health. Nutr Res Rev 2003; 16: 45-60.

10. Olena S, Volodymyr I, Irina L, Viktor S. Ukrainian dietary bakery product with selenium-enriched yeast. LWT - Food Science and Technology 2008; 41: 890-95.

11. Suhajda A, Hegoczki J, Janzso B, Pais I, Vereczkey G. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. J Trace Elem Med Bio 2000; 14(1): 43-47.

12. Ponce de Leon CA, Bayon, MM, Paquin C. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation method. J Appl Microbiol 2002; 92: 602-10.

13. Hongfei Y, Gongjian F, Zhenxin G. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RSM). Food Technol J 2010; 43: 666-9.

14. Alfthan G, Xu GL, Tan WH, Aro A, Wu J, Yang YX. Selenium supplementation of children in a selenium-deficient area in China: Blood selenium levels and glutathione peroxidase activities. Bio Trace Elem Res 2000; 73(2): 113-25.

15. Schrauzer GN. Nutritional selenium supplements: Product types, quality, and Safety. J Am Coll Nutr 2001; 20(1): 1-4.

16. Nagodawithana T, Gutmanis E. Method for the production of selenium yeast. US Patent. 1985; 4:530-846.

17. Janzs B, Suhajda A, Pais I. In: Yeasts enriched with microelements. Food Technol Int Europe. 1993; 173-7.

18. Suhajda A, Janzs B, Heg6czki J. In: New form of microelements, Int. Syrup. On Novel Foods, Int. Com. for Food Industries, Paris, 13.14 Oct. 1993.

19. Suhajda I, Janzs B, Hegczki J, Pals I. In: Accumulation of microelements in yeast. 6th International Trace Element Symposium. Proceedings 1994; 123-34.

20. Chasteen TG, Bentley R. Biomethylation of selenium and tellurium:microorganisms and plants. Chem Rev 2003; 103: 1-25.

21. Hongfei Y, Zhigang C, Zhenxin G, Yongbin H. Optimization of natural fermentive medium for selenium-enriched yeast by D-optimal mixture design. Food Sci Technol J 2009; 42: 327-31.

22. Chanda S, Chakrabatri S. Plant origin liquid waste: a resource for singlecell protein production by yeast. Bioresource Technol 1996; 57: 51-4.

23. Choi MH, Ji GE, Koh KH, Ryu YW, Jo DH, Park YH. Use of waste Chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production. Bioresource Technol. 2002; 83: 251-3.

24. European Food Saftey Authority (EFSA). Selenium-enriched yeast as source for selenium added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses and foods (including food supplements) for the general population. EFSA J. 2008; 766: 1-42

25. GRAS Associates, LLC. Food and Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition, Office of Food Additive Safely (HFS-200). A high-selenium yeast product. 2008; 21 CFR 170.36(1).

26. Khosravi-Darani K, Vasheghani-farahani E, Shojaosadati SA. Application of the Taguchi design for production of polyhydroxybutyrate) by ralstonia eutropha. Iran J Chem Eng 2003; 23:131-36.

27. Khosravi Darani K. Application of Plackett-Burman Design for citric acid production from pretreated and untreated wheat straw. Iran J Chem Eng 2008; 27(1):91-6.

28. Marinescu G, Stoicescu A, Teodorof L. Selenium yeast from spent brewer's yeast. Agroalimentary Processes and Technol 2010; 16(3): 341-5.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-11-25]

Production of selenium-enriched yeast using a Plackett-Burman design

*Esmaeili S[1], Khosravi-Darani K[*2], Pourahmad R[3], Nazemi L[4], Komeili R[5]*

1- M.Sc. in Food Science and Technology, Varamin Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*2- *Corresponding author: Assistant prof (in research), Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. E-mail: kiankh@yahoo.com*

3- Assistant prof, Dept. of Food Science and Technology, Varamin Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Lecturer, Dept. of Nutrition & Biochemistry, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- - B.Sc in Nutrition Sciences, Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received 17 Sept, 2011 **Accepted 4 Dec, 2011**

Background and Objective: Today dietary deficiency of selenium (Se), an important mineral in human nutrition, is common in many regions and communities. Se-enriched yeast, obtainable by growing *Saccharomyces cerevisiae* in Se-rich media, is considered as a source of organic Se suitable for alleviating its deficiency due to its high bioavailability, stability, digestability, and absorbability.

Materials and Methods: Using a Plackett-Burman design, the effects of various culture medium conditions, including temperature (28 and 30 °C), initial pH (4.5 and 5.8), shaking speed (130 and 160 rpm), fermentation duration (24 and 48 h), size of inoculum (30 and 60 g/l), Se concentration (15 and 25 µg/ml) and time of Se addition (0 and 9 h), on the bioaccumulation of Se in the yeast were investigated.. The Se content in the yeast was determined by graphite-furnace atomic-absorption spectroscopy.

Results: The results showed that Se concentration, size of inoculums, temperature, time of Se addition and fermentation duration were, in ascending order, the most significant factors on the yield of total Se accumulation and organic Se formation in the yeast. Manipulating these conditions/variables could markedly affect the magnitudes of incorporation of Se and formation of organic Se in the yeast, the ranges being 107.9 to 287.6 mg/kg and 93.27 to 269.05 mg/kg, respectively.

Conclusion: The most suitable culture medium conditions to attain the highest level of total and organic selenium Se biotransformation in yeast are a concentration of 25 µg/ml sodium selenite, an inoculum size of 30 g/l, a temperature of 28 °C, an initial pH of 5.8, a shaking speed of 130 rpm, an incubation time of 48 h, and adding the selenium source to the culture medium 9 hours after the start of fermentation.

Keywords: Selenium, Yeast, Biotransformation, Plackett-Burman design

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-11-25]