

Inhibitory Effect of Fatty Acids Produced by *Yarrowia lipolytica* on the Growth of Toxin-Producing Fungi |

Mohaddeseh Larypoor^{1*}, Mehran Abdullahi², Shahrzad Sadeghi Amjad³, Nuredin Bakhtiari⁴

1- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- M.Sc of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, NT. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Ph.D. student, Department of Microbiology Faculty of Biological Sciences, CT. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Associate professor of biochemistry, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, NT. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: Mohaddeseh Larypoor, Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran, Email: m.larypoor@iaui.ir

| Received | 2025/08/09

| Revised | 2025/11/16

| Accepted | 2026/06/22

| Abstract |

Background and Aim: Toxigenic fungi are major causes of food spoilage and agricultural contamination and may threaten human and animal health. This study aimed to evaluate the inhibitory effect of fatty acids produced by *Yarrowia lipolytica* on the growth of *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum*.

Materials and Methods: The fungal strains were cultured under laboratory conditions, and *Y. lipolytica* was grown on sweet almond, bitter almond, and castor bean pomace substrates to produce stearic and oleic acids. Fatty acid production was quantified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Fungal growth was assessed by spore counting and optical density measurement. The effects of these fatty acids on aflatoxin B1 and zearalenone production were evaluated using high-performance liquid chromatography (HPLC), and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were determined.

Results: The results showed that increasing fatty acid concentrations reduced fungal growth and toxin production. Growth inhibition of *A. Flavus* occurred at 8% (v/v), whereas *F. graminearum* was inhibited at 4% (v/v).

Conclusion: Fatty acids produced by *Y. lipolytica* are promising natural, effective, and cost-efficient agents for controlling toxigenic fungi and reducing mycotoxin contamination.

| Keywords |

Yarrowia lipolytica
Aspergillus flavus
Fusarium graminearum
Stearic Acid
Oleic Acid
Minimum Inhibitory
Concentration
Minimum Fungicidal
Concentration

| Iau Science |

اثر مهاری اسیدهای چرب تولیدشده توسط یاروویا لیپولیتیکا بر رشد قارچ‌های توکسین‌زا

محدثه لاری‌پور^{۱*}، مهران عبداللهی^۲، شهرزاد صادقی امجد^۳، نورالدین بختیاری^۴

- ۱- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
 - ۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
 - ۳- دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران
 - ۴- دانشیار گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
- *نویسنده مسئول: محدثه لاری‌پور، دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران، پست الکترونیکی: m.larypooor@iau.ir

تاریخ دریافت | ۱۴۰۴/۰۵/۱۸ | تاریخ ویرایش | ۱۴۰۴/۰۸/۲۵ | تاریخ پذیرش | ۱۴۰۵/۰۴/۰۴

چکیده

زمینه و هدف: قارچ‌های موگد سم از مهم‌ترین عوامل فساد مواد غذایی و آلودگی محصولات کشاورزی هستند و می‌توانند سلامت انسان و دام را به خطر اندازند. این مطالعه با هدف بررسی اثر بازدارندگی اسیدهای چرب تولیدشده توسط یاروویا لیپولیتیکا بر رشد اسپرژیلوس فلاووس و فوزاریوم گرامیناروم انجام شد.

مواد و روش‌ها: سویه‌های قارچی در شرایط آزمایشگاهی کشت شدند و یاروویا لیپولیتیکا روی بسترهای هسته بادام شیرین، بادام تلخ و تفاله کرچک پرورش یافت تا اسیدهای چرب استتاریک و اولئیک تولید شوند. مقدار تولید این اسیدها با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) تعیین شد. رشد قارچ‌ها با شمارش اسپور و سنجش چگالی نوری ارزیابی گردید. همچنین اثر این اسیدهای چرب بر تولید آفلاتوکسین B1 و زیرانون با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) بررسی شد و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) تعیین گردید.

نتایج: نتایج نشان دادند که افزایش غلظت اسیدهای چرب موجب کاهش رشد قارچی و کاهش تولید سم شد. مهار رشد اسپرژیلوس فلاووس در غلظت ۸ درصد حجمی/حجمی و مهار رشد فوزاریوم گرامیناروم در غلظت ۴ درصد حجمی/حجمی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: اسیدهای چرب تولیدشده توسط یاروویا لیپولیتیکا می‌توانند به عنوان عوامل طبیعی، مؤثر و اقتصادی برای کنترل قارچ‌های موگد سم و کاهش آلودگی به مایکوتوکسین‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی

یاروویا لیپولیتیکا
اسپرژیلوس فلاووس
فوزاریوم گرامیناروم
اسید استتاریک
اسید اولئیک
حداقل غلظت مهارکنندگی
حداقل غلظت کشندگی

علوم Iau

۱ | مقدمه

قارچ‌های بیماری‌زا و تولیدکننده سموم یکی از چالش‌های بزرگ در کشاورزی و صنایع غذایی هستند که سلامت انسان، دام و اقتصاد را تهدید می‌کنند (۱-۳). دو گروه مهم قارچ‌های حقیقی *آسکومیست‌ها*^۱ و *بازیدیومیست‌ها*^۲ هستند (۱ و ۴). بیشتر قارچ‌های بیماری‌زای انسان در گروه *آسکومیست‌ها* قرار دارند که گونه‌های کاندیدا شایع‌ترین علل عفونت‌های قارچی مهاجم محسوب می‌شوند (۵ و ۶). گونه‌های مختلف *آسپرژیلوس*^۳ از جمله *آسپرژیلوس فومیگاتوس*^۴ از جمله قارچ‌های تولیدکننده سم بوده و از عوامل مهم عفونت در افراد دارای نقص ایمنی و گیرندگان پیوند محسوب می‌شوند (۷ و ۸). فرایند درمان این عفونت‌ها، اغلب پرهزینه خواهد بود که این امر به یک نگرانی عمده تبدیل شده است (۹ و ۱۰).

از جنبه‌ای دیگر قارچ‌های بیماری‌زا در گیاهان و تولیدکننده سم، بسیار حائز اهمیت بوده و علاوه بر سلامتی، صنایع مختلفی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، قارچ‌ها همچنین عامل بیش از ۸۰۰۰ نوع بیماری گیاهی بوده و با ایجاد ضایعات در برگ، ساقه، ریشه و میوه‌ها به کاهش کیفیت و کمیت محصولات زراعی منجر می‌شوند (۱ و ۱۱). از این رو عوامل بیماری‌زای قارچی و قارچ‌های تولیدکننده سموم و مایکوتوکسین‌ها^۵ یک نگرانی جدی برای تولید و نگهداری محصولات کشاورزی محسوب می‌شوند، بر همین اساس نقش مهمی در اقتصاد صنعت کشاورزی ایفا می‌کنند (۱۲). علاوه بر این، قارچ‌های تولیدکننده سم و مایکوتوکسین‌ها در صنایع غذایی نقش مهمی ایفا نموده به نوعی که نه تنها خسارت‌های اقتصادی قابل توجهی را سبب می‌شوند، بلکه برخی از آن‌ها سرطان‌زا بوده و سلامت حیوانات را به خطر می‌اندازند و به این صورت صنعت دامپروری را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۳).

مایکوتوکسین‌ها، متابولیت‌های ثانویه با وزن مولکولی کم هستند که توسط قارچ‌های رشته‌ای تولید می‌شوند و طبقه‌بندی آن‌ها براساس ساختار شیمیایی، اندام هدف یا منشأ تولید متفاوت است (۱۴ و ۱۵). تعریف مایکوتوکسین‌ها سخت بوده و طبقه‌بندی آن‌ها نیز

چالش‌برانگیز است. متخصصان بیوشیمی با توجه به منشأ بیوسنتز و قارچ‌شناسان توسط قارچ‌هایی که آن‌ها را تولید می‌کنند، این ترکیب‌ها را طبقه‌بندی می‌کنند (۱۶ و ۱۷). برخی از انواع مایکوتوکسین‌ها شامل: آفلاتوکسین (B1، B2، G1 و G2)، سیتترینین، فومونیسین، اوکراتوکسین، پاتولین، تریکوتسن و زیرالنون می‌باشند (۱۸-۲۰). در این بین آفلاتوکسین B1 و زیرالنون مهم‌ترین، فراوان‌ترین و به‌عبارتی آلوده‌کننده‌ترین مایکوتوکسین‌ها می‌باشند که در بسیاری از مواد غذایی یافت می‌شوند (۱۵)، بنابراین مهار تولید آن‌ها در مطالعه حاضر مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

یکی از روش‌های کنترل قارچ‌ها و کاهش تولید سموم استفاده از اسیدهای چرب است که توسط میکروارگانیسم‌ها از جمله *یاروویا لیپولیتیکا*^۶ تولید می‌شوند. این اسیدها با سازوکارهایی مانند اختلال در غشای سلولی، القای استرس اکسیداتیو، مهار آنزیم‌های کلیدی و تداخل با بیوسنتز اسیدهای چرب، رشد قارچ‌ها و تولید توکسین‌ها را کاهش می‌دهند (۲۱-۲۳). تأثیر این اسیدها وابسته به نوع و غلظت آن‌هاست؛ برای مثال اسید اولئیک در غلظت پایین ممکن است تولید آفلاتوکسین را افزایش دهد اما در غلظت‌های بالاتر اثر مهاری دارد (۲۳ و ۲۴). به‌طور کلی، اسیدهای چرب و مشتقات آن‌ها کاندیداهای امیدوارکننده‌ای در زمینه کاهش خطرهای ناشی از قارچ‌های توکسین‌زا و مایکوتوکسین‌ها می‌باشند (۲۱ و ۲۲).

۱-۱ | یاروویا لیپولیتیکا

یاروویا لیپولیتیکا یکی از گونه‌های مخمر غیرمتعارف است که قادر به سنتز گروه‌های گسترده‌ای از متابولیت‌های ارزشمند، به‌ویژه لیپازها و سایر آنزیم‌های هیدرولیتیک، اسید سیتریک، اریتریتول و ۷-دکالاکتون می‌باشد (۲۵). این مخمر به‌دلیل ویژگی‌های خاص مانند تفاوت فیلوژنتیکی با *ساکارومایسس سرویزیه*، ایمنی برای انسان و تأیید سازمان غذا و داروی آمریکا کاربردهای صنعتی وسیعی دارد و در محصولات غذایی مختلف نیز وجود دارد (۲۶ و ۲۷). استفاده از میکروارگانیسم‌ها در تولید صنعتی حلال‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها و دیگر متابولیت‌ها به‌دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و رشد بیماری‌های قارچی

⁴ *Aspergillus fumigatus*

⁵ Mycotoxins

⁶ *Yarrowia lipolytica*

¹ Ascomycota

² Basidiomycetes

³ *Aspergillus* spp.

۲-۲ | کشت مخمر به منظور تولید اسیدهای چرب در محیط کشت القاکننده

ده نمونه از هر تفاله بادام شیرین، بادام تلخ و کرچک روغن‌کشی شده از مراکز تهیه روغن در سطح شهر تهران در ظروف استریل تهیه گردید (نمونه تفاله‌های تهیه شده در ویژگی‌هایی مانند کیفیت، طعم، جنس، سفتی یا سختی پوست و کشور تولیدکننده متفاوت بودند بنابراین از همه انواع در دسترس، نمونه تهیه گردید). محیط کشت پوتیتو دکستروز براث تهیه و در سه ارلن جداگانه تقسیم شد و هریک از سه نوع تفاله استریل شده توسط اتوکلاو (۳۰ گرم در لیتر)، به صورت جداگانه به ارلن حاوی محیط کشت براث استریل اضافه گردید. در ادامه مخمر *یarrowia lipolytica* در سه محیط کشت جداگانه پوتیتو دکستروز براث^۳ به علاوه تفاله‌های بادام شیرین، بادام تلخ و کرچک به طور جداگانه تلقیح شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت با هوادهی ۱۲۰ دور در دقیقه گرمگذاری شد. همچنین این مخمر بر روی محیط کشت پوتیتو دکستروز براث فاقد تفاله به منظور کشت شاهد در شرایط یاد شده گرمگذاری گردید.

۲-۳ | استخراج اسیدهای چرب اسید استئاریک و اسید اولئیک

پس از گذشت ۷۲ ساعت، مقدار ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت پوتیتو دکستروز براث در شرایط استریل به فالكون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد و در سانتریفوژ یخچال‌دار با دور ۴۰۰۰ rpm و با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. ۷ میلی‌لیتر از محلولی شامل اسید کلریدریک ۵ نرمال و آب به رسوب حاصل اضافه گردید و جوشانده شد و بلافاصله ارلن درون آب یخ قرار گرفت و سپس ۳۰ میلی‌لیتر محلول کلروفرم-متانول اضافه گردید و به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از گذشت یک ساعت دو فاز تشکیل شد که فاز زیرین جدا گردید و در آن ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. در ادامه پروفایل اسیدهای چرب با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی تعیین گردید. سپس برای جداسازی اسید استئاریک از اسید اولئیک از روش کریستالیزاسیون (تبلور) استفاده

اهمیت یافته است (۲۵). از سوی دیگر بروز بیماری‌های قارچی در بیماران درگیر با گونه‌های کاندیدا و *آسپرژیلوس* نیز در حال افزایش است (۲۷)؛ بنابراین با توجه به افزایش جمعیت بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی و استفاده زیاد از داروهای ضدقارچ، گونه‌هایی از مخمرها و کپک‌ها ظاهر شده‌اند که می‌توانند باعث بروز مشکلات جدی سلامتی در انسان شوند (۲۸). این مخمر به عنوان منبع کلیدی تولید اسیدهای چرب غیراشباع و ضروری، در صنایع زیست‌فناوری کاربرد دارد و به خاطر متابولیسم منحصر به فرد و قابلیت استفاده از سوسترهای متنوع، اسیدهای چرب تولید شده توسط آن در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی و تولید روغن میکروبی به کار می‌رود که علاوه بر ارزش اقتصادی دارای مزایای زیست‌محیطی و بهداشتی است (۲۹ و ۳۰).

مطالعه‌های اخیر نشان داده‌اند که با اصلاح مسیرهای متابولیکی و ژنتیکی، امکان افزایش قابل توجه تولید اسیدهای چرب با استفاده از سوسترهای متنوع و ارزان فراهم شده است که این امر *یarrowia lipolytica* را به کارخانه سلولی کارآمد برای تولید پایدار و اقتصادی اسیدهای چرب تبدیل می‌کند (۳۱). همچنین تغییرهای ساده در فرایند تخمیر مانند تغییر منابع کربن و نیتروژن، دما، اسیدیته، میزان اکسیژن‌رسانی و استفاده از بسترهای القاکننده مانند تفاله‌ها می‌تواند تولید متابولیت‌ها را بهینه کند (۳۲). در راستای این امر، هدف از این مطالعه، بررسی اثر بازدارندگی اسیدهای چرب تولید شده از مخمر *یarrowia lipolytica* بر روی رشد و توکسین‌زایی قارچ‌های توکسین‌زا می‌باشد.

۲ | مواد و روش‌ها

۲-۱ | تهیه و کشت سویه‌ها

سویه توکسین‌زا استاندارد *آسپرژیلوس فلاووس*^۱ *IBRC-1* و *M30029* و مخمر *یarrowia lipolytica* *IBRC-M30394* از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران و سویه توکسین‌زای استاندارد *فوزاریوم گرامیناروم*^۲ *PFCC NO 573* از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سویه‌ها در محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمگذاری شدند.

³ Potato Dextrose Broth (PDB)

¹ *Aspergillus flavus*

² *Fusarium graminearum*

استاندارد در غلظت‌های (v/v) ۰/۲۵، ۱ و ۴ درصد (۶ فالكون)

۳. اسید اولئیک جداسازی‌شده: محیط PDB + سوسپانسیون استاندارد سوئۀ قارچی *آسپرژیلوس فلاووس* یا *فوزاریوم گرمیناروم* + اسید چرب اسید اولئیک جداسازی‌شده در غلظت‌های (v/v) ۰/۲۵، ۱ و ۴ درصد (۶ فالكون)

۴. اسید استئاریک جداسازی‌شده: محیط PDB + سوسپانسیون استاندارد سوئۀ قارچی *آسپرژیلوس فلاووس* یا *فوزاریوم گرمیناروم* + اسید چرب اسید استئاریک جداسازی‌شده در غلظت‌های (v/v) ۰/۲۵، ۱ و ۴ درصد (۶ فالكون)

۵. ترکیب اسیدهای چرب: محیط PDB + سوسپانسیون استاندارد سوئۀ قارچی *آسپرژیلوس فلاووس* یا *فوزاریوم گرمیناروم* + اسید چرب اسید استئاریک همراه با اسید اولئیک (هر دو استاندارد یا هر دو جداسازی‌شده) در غلظت‌های (v/v) ۰/۲۵، ۱ و ۴ درصد (۱۲ فالكون)

۶. کنترل منفی: سوسپانسیون استاندارد سوئۀ قارچی *آسپرژیلوس فلاووس* یا *فوزاریوم گرمیناروم* (۲ فالكون)

۷. کنترل مثبت: محیط PDB (۱ فالكون)
فالكون‌ها به‌مدت ۷ روز درون انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجۀ سانتی‌گراد قرار داده شدند، آزمایش در سه تکرار انجام گردید و پس از آن شمارش اسپور و اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر جهت بررسی رشد قارچ‌ها صورت گرفت.

۲-۶ | بررسی اثر اسید استئاریک و اسید اولئیک بر

میزان تولید سموم آفلاتوکسین B1 و زیرالنون

فالكون‌ها مطابق دسته‌بندی بیان‌شده در بخش قبل تقسیم‌بندی شدند و به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجۀ سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شدند، سپس قارچ‌ها توسط سانتریفوژ (دور ۹۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه) ته‌نشین گردیدند و میزان ۴ میلی‌لیتر از مایع رویی به فالكون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. سنجش میزان تولید آفلاتوکسین B1 و زیرالنون به کمک روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شد.

گردید، بدین منظور مخلوط اسیدهای چرب به آرامی تا دمای ۴ درجۀ سانتی‌گراد سرد گردید تا اسید استئاریک شروع به تبلور نماید. کریستال‌های حاصل سپس با استفاده از سانتریفوژ از فاز مایع که حاوی اسید اولئیک می‌باشند جدا گردیدند (۳۳ و ۳۴).

۲-۴ | تهیه سوسپانسیون استاندارد قارچ‌های توکسین‌زا

آسپرژیلوس فلاووس و *فوزاریوم گرمیناروم* در شرایط استریل بر روی محیط پوتیتودکستروز آگار در مقدار انبوه کشت داده شدند. از هر نمونه قارچ، توسط آنس به محیط کشت پوتیتودکستروز آگار تلقیح گردید و به‌صورت چمنی کشت داده شد و پلیت‌ها به‌مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجۀ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند تا اسپورزایی به‌مقدار کافی انجام گیرد. بعد از رشد و اسپورزایی کافی قارچ‌ها، سرم فیزیولوژی به‌همراه توئین ۸۰ به محیط کشت اضافه شد و با ایجاد خراش در شرایط استریل بر روی محیط کشت، سوسپانسیون قارچ‌ها به دست آمد. سوسپانسیون حاصل از کاغذ صافی و یا گاز استریل نازک برای جلوگیری از عبور مسلیوم‌های قارچ عبور داده شد و شمارش اسپورها توسط لام نفوبار در زیر میکروسکوپ انجام شد (۳۵).

۲-۵ | بررسی اثر اسید استئاریک و اسید اولئیک بر

رشد قارچ‌های توکسین‌زای *آسپرژیلوس فلاووس* و *فوزاریوم گرمیناروم*

داخل ۳۹ فالكون ۵۰ میلی‌لیتری به‌میزان ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت پوتیتودکستروز براث اضافه گردید و با اضافه شدن اسیدهای چرب در ۳ غلظت مختلف حجمی/حجمی (v/v) به‌صورت منفرد، توأمان با یکدیگر و سوسپانسیون قارچ‌ها به‌صورت مجزا، فالكون‌ها در پنج گروه اصلی و گروه‌های کنترل به‌ترتیب زیر گروه‌بندی شدند:

۱. اسید اولئیک استاندارد: محیط PDB + سوسپانسیون استاندارد سوئۀ قارچی *آسپرژیلوس فلاووس* یا *فوزاریوم گرمیناروم* + اسید چرب اسید اولئیک استاندارد در غلظت‌های (v/v) ۰/۲۵، ۱ و ۴ درصد (۶ فالكون)

۲. اسید استئاریک استاندارد: محیط PDB + سوسپانسیون استاندارد سوئۀ قارچی *آسپرژیلوس فلاووس* یا *فوزاریوم گرمیناروم* + اسید چرب اسید استئاریک

۷-۲ | آنالیز میزان تولید سموم توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

به منظور آنالیز و تعیین مقدار آفلاتوکسین B1 و زیرالنون، از دستگاه HPLC به همراه پمپ (Controller waters 600)، اتوسمپلر (Waters 717 plus)، آشکارساز (Waters 747 scanning fluorescence detector)، نرم افزار Millennium 32 با ستون (C 18, 15 cm, 5 μ m, 4.6 d) CAPITAL HPLC Silica reverse phase استفاده گردید. آنالیز سموم با استفاده از روش بیان شده در استاندارد ملی ایران شماره ۶۸۷۲ انجام گرفت. جهت خلص سازی سموم از ستون‌های ایمونوآفینیتی^۱ و برای شناسایی و تعیین مقدار از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارساز فلورسانس استفاده گردید. در ابتدا روش کار تحت آزمایش‌های اعتبارسنجی قرار گرفت. این کار با انجام آزمایش‌های آلوده سازی عمدی^۲ سطوح مختلف سم صورت گرفت و پارامترهای کارایی روش نظیر محدوده خطی بودن، صحت و دقت محاسبه گردید. پس از حصول نتایج در محدوده قابل قبول علمی، آنالیز نمونه‌های اصلی با استفاده از روش استاندارد آغاز گردید.

شرایط کار با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بدین صورت بود که طول موج تحریکی و نشر به ترتیب ۳۶۵ و ۴۳۵ نانومتر، سرعت فاز متحرک ۱ ml/min، حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر، ستون (C 18, 15 cm, 5 μ m, 4.6 d) CAPITAL HPLC Silica reverse phase و مشتق ساز کبراسل بود و در نهایت، از رسم منحنی کالیبراسیون و روش استاندارد خارجی جهت آنالیز سموم استفاده گردید.

۸-۲ | بررسی اثر کشندگی و بازدارندگی اسید استئاریک و اسید اولئیک جداسازی شده بر رشد قارچ‌های توکسین‌زای اسپرژیلوس فلاووس و فوزاریوم گرمیناروم

در تمامی ستون‌ها و ردیف‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، میزان ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت DMEM اضافه گردید (چرا که این محیط کشت فاقد لیپید و پروتئین می‌باشد و سنجش تأثیر اسیدهای چرب دقیق‌تر خواهد بود). در یکسری از چاهک‌ها اسید اولئیک و در یکسری دیگر اسید استئاریک به ترتیب درصدهای حجمی ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴،

۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ اضافه گردید. از آمفوتریسین B با غلظت ۱ μ g/mL به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس در چاهک‌های تست، سوسپانسیون قارچی اسپرژیلوس فلاووس و فوزاریوم گرمیناروم به میزان ۵۰ میکرولیتر اضافه شد (چاهک‌هایی که تنها حاوی محیط کشت بودند، به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند). سپس پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد و پس از طی دوره گرماگذاری ابتدا نتایج کنترل‌های مثبت و منفی که اعتبار و صحت آزمون را نشان می‌دهند خوانده شد. بعد از تأیید مورد قبول بودن نتایج کنترل‌ها، نتایج تست‌ها با انجام دو تکرار برای هر تست مورد بررسی قرار گرفت، بدین ترتیب که آخرین چاهک شفاف از سمت غلظت بیشتر به سمت غلظت کمتر به عنوان MIC گزارش گردید.

به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی، پس از خوانش نتایج حداقل غلظت مهاری، از چاهکی که بعنوان حداقل غلظت مهاری تعیین گردیده به قبل، حدود ۱۰ میکرولیتر از محتویات داخل چاهک، روی محیط پوتیتودکستروز آگار ریخته شد. دور پلیت‌ها پاریفلم کشیده شد و یک هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. سپس رشد قارچ بررسی شد و کم‌ترین غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش گردید.

۹-۲ | بهینه‌سازی تأثیر ضدقارچی اسیدهای چرب با روش تاگوچی

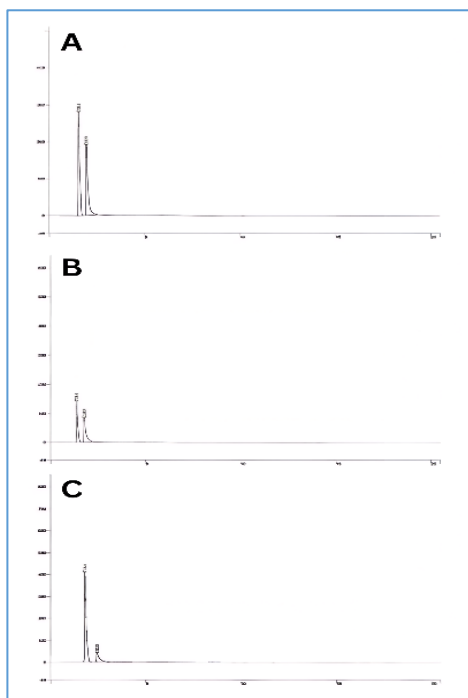
برای انجام طراحی آزمایش به روش تاگوچی از نرم افزار Minitab 20 استفاده شد و براین اساس جهت بهینه‌سازی تأثیر اسیدهای چرب گرفته شده از یاروویا لیپولیتیکا بر رشد و تکثیر قارچ‌های توکسین‌زا پنج فاکتور دما، اسیدیته، غلظت‌های مختلف اسیدهای چرب اسید اولئیک و اسید استئاریک، نوع و غلظت محلول فلزی مورد بررسی قرار گرفتند. فاکتورهای متغیر و سطوح آن‌ها نیز در ادامه در جدول ۱ بیان شده است.

² Spiking

¹ Immunoaffinity Column

۲-۳ | سنجش میزان اسیدهای چرب تولیدشده در محیط‌های کشت مختلف

مقادیر اسیدهای چرب (اسید استئاریک و اسید اولئیک) در محیط‌کشت‌های پوتیتودکستروز براث حاوی تفاله‌ها در حضور مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* IBRC-M 30394 نمودارهای نمودار ۲ نشان داده شده است. همچنین درصد اسیدهای چرب در محیط‌کشت‌های پوتیتودکستروز براث حاوی تفاله‌ها در حضور مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* IBRC-M30394 در جدول ۲ بیان شده است. نتایج بررسی نمودارها حاکی از آنست که مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* IBRC-M30394 در بستر تفاله‌های بادام شیرین، بادام تلخ و کرچک، قادر به تولید میزان بیشتری از اسیدهای چرب اسید استئاریک و اسید اولئیک نسبت به محیط فاقد تفاله می‌باشد. بیشترین میزان تولید اسید اولئیک به ترتیب در محیط‌کشت حاوی تفاله کرچک، تفاله بادام شیرین و بادام تلخ می‌باشد و بیشترین میزان تولید اسید استئاریک به ترتیب در محیط‌کشت حاوی تفاله بادام شیرین، تفاله بادام تلخ و تفاله کرچک می‌باشد. بر همین اساس، محیط‌کشت بهینه برای تولید اسید اولئیک و اسید استئاریک به ترتیب محیط‌کشت‌های حاوی تفاله کرچک و تفاله بادام شیرین می‌باشند.



نمودار ۲-۳ | نمودار کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی تعیین مقدار اسیدهای چرب اسید استئاریک و اسید اولئیک در

جدول ۱- فاکتورها و سطوح بررسی‌شده آن‌ها در بهینه‌سازی تأثیر اسیدهای چرب گرفته‌شده از *یاروویا لیپولیتیکا* بر رشد و تکثیر قارچ‌های توکسین‌زا به روش تاگوچی.

فاکتور	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
A	pH	۴	۵/۶
B	دما	۲۵ °C	۳۰ °C
C	اسید اولئیک	٪۰/۲۵	٪۰/۴
D	اسید استئاریک	٪۰/۲۵	٪۰/۴
F	مقدار فلز	۳۵ ppm	۴۵ ppm
E	نوع فلز	Cu	Mg

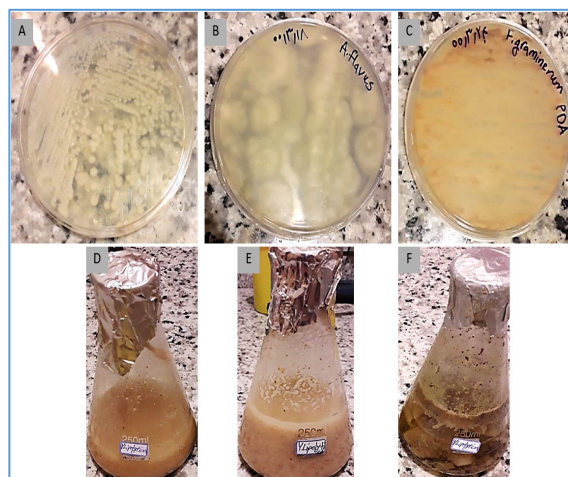
۲-۱۰ | تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS v.26.0 در سطح معنی‌داری (p) برابر با ۰/۰۵ انجام و از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده گردید. شکل، نمودارها و جداول با استفاده از برنامه‌های PowerPoint، Word و Excel تنظیم و رسم گردیدند.

۳ | نتایج

۳-۱ | کشت سویه‌های قارچی و مخمر

رشد سویه‌های قارچی در محیط‌کشت پوتیتودکستروز آگار و رشد مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* در محیط‌کشت پوتیتودکستروز براث حاوی تفاله‌ها، در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱-۱ | رشد مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* (B) اسپرژیلوس فلاووس، فوزاریوم گرامیناروم در محیط‌کشت پوتیتودکستروز آگار، رشد مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* در محیط‌کشت پوتیتودکستروز براث حاوی تفاله بادام شیرین، (E) تفاله بادام تلخ و (F) تفاله کرچک.

محیط کشت پوتیتود کستروز برات حاوی تفاله بادام شیرین، (B)
تفاله بادام تلخ، (C) تفاله کرچک در حضور مخمر یاروویا لیپولیتیکا
IBRC-M 30394

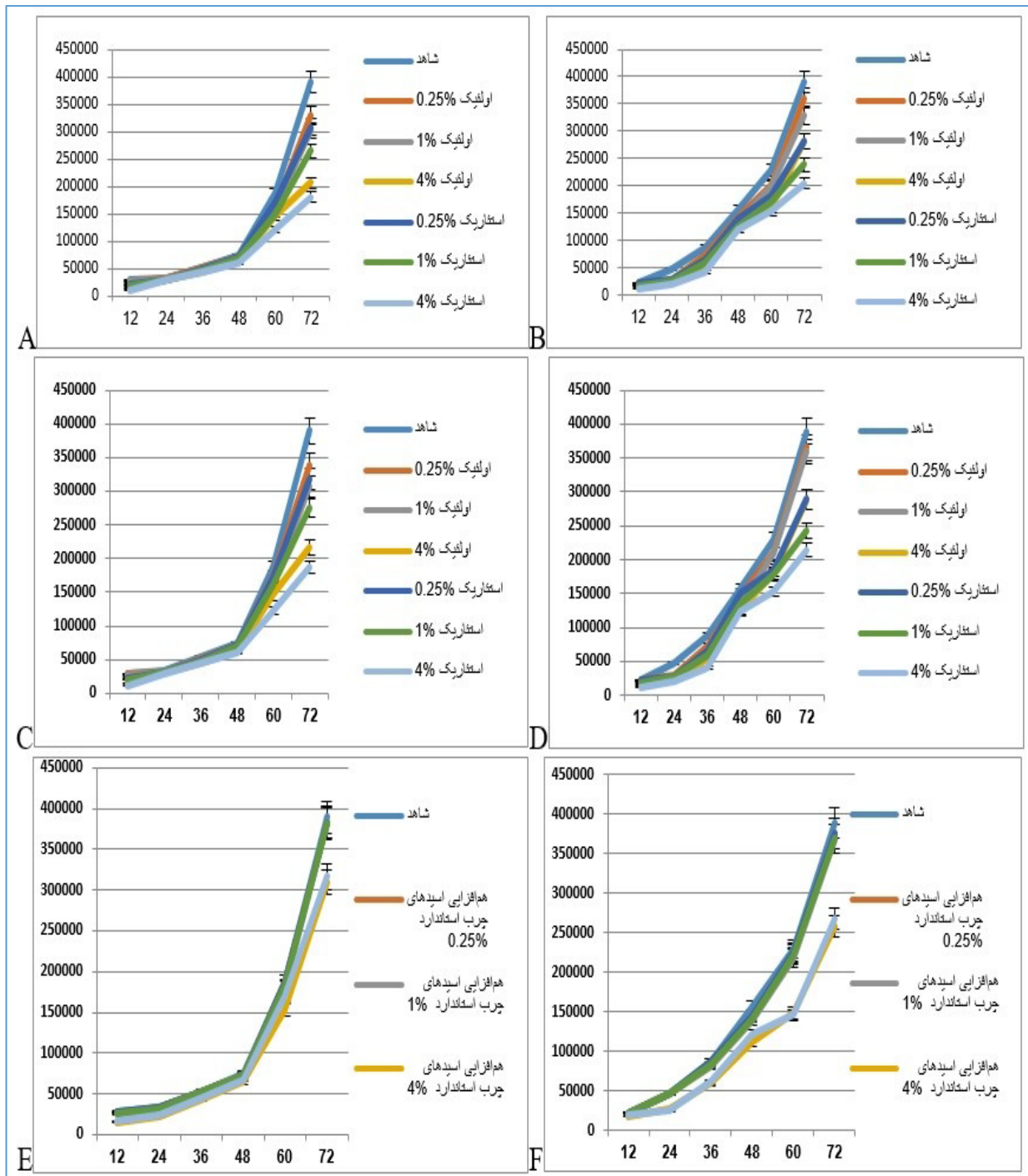
جدول ۲- درصد حجمی/حجمی (v/v) اسیدهای چرب در محیط کشت‌های پوتیتود کستروز برات حاوی تفاله‌ها در حضور مخمر یاروویا لیپولیتیکا
IBRC-M30394

اسید اولئیک C18:1	اسید استئاریک C18:0	
%۱۸/۹۵	%۲۳/۵۱	یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30394 در محیط کشت حاوی تفاله بادام شیرین
%۱۳/۵۲	%۷/۱۸	یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30394 در محیط کشت حاوی تفاله بادام تلخ
%۳۴/۶۹	%۲/۶۴	یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30394 در محیط کشت حاوی تفاله کرچک
%۰/۰۹	-	یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30394 در محیط کشت فاقد تفاله

استاندارد اسید استئاریک در غلظت (v/v) ۴ درصد در مقایسه با اسیدچرب استئاریک جداسازی شده در غلظت (v/v) ۴ درصد باعث کاهش رشد قارچ و باعث کاهش اسپورزایی می‌گردد، همچنین ترکیبی از اسیدهای چرب جداسازی شده در غلظت (v/v) ۴ درصد در مقایسه با ترکیبی از اسیدهای چرب استاندارد در غلظت (v/v) ۴ درصد باعث کاهش رشد قارچ و کاهش اسپورزایی می‌گردد که از نظر آماری معنی دار است.

۳-۳ | بررسی تأثیر اسیدهای چرب بر رشد قارچ‌های توکسین‌زا

رشد سویه‌های قارچی توکسین‌زا در بستر اسیدهای چرب استاندارد و جداسازی شده اولئیک و استئاریک و نیز در بستر ترکیبی این اسیدها با شمارش اسپور توسط لام نئوبار و اندازه‌گیری جذب نوری اسپکتروفتومتری بررسی شد. نتایج هر دو روش مشابه بود و نمودارهای شمارش اسپور در نمودار ۳ نمایش داده شده‌اند. براساس نتایج، افزایش غلظت اسیدهای چرب با کاهش رشد قارچ رابطه معکوس دارد. تأثیر اسیدهای چرب استاندارد در مهار رشد قارچ بیشتر از اسیدهای چرب جداسازی شده بود و تأثیر هم‌افزایی دو اسیدچرب بیشترین مهار را ایجاد کرد. بیشترین مهار رشد قارچ به اسید استئاریک استاندارد با غلظت (v/v) ۴ درصد به صورت منفرد اختصاص داشت. علاوه بر این، اثرهای وابسته به غلظت و زمان اسیدهای چرب جداسازی شده و استاندارد بر مهار رشد قارچ‌ها نسبتاً مشابه بود. همچنین، تأثیرهای هم‌افزایی اسیدهای چرب جداسازی شده به طور معناداری رشد قارچ‌های توکسین‌زا را کاهش داد. به طور کلی می‌توان بیان نمود که اسیدچرب

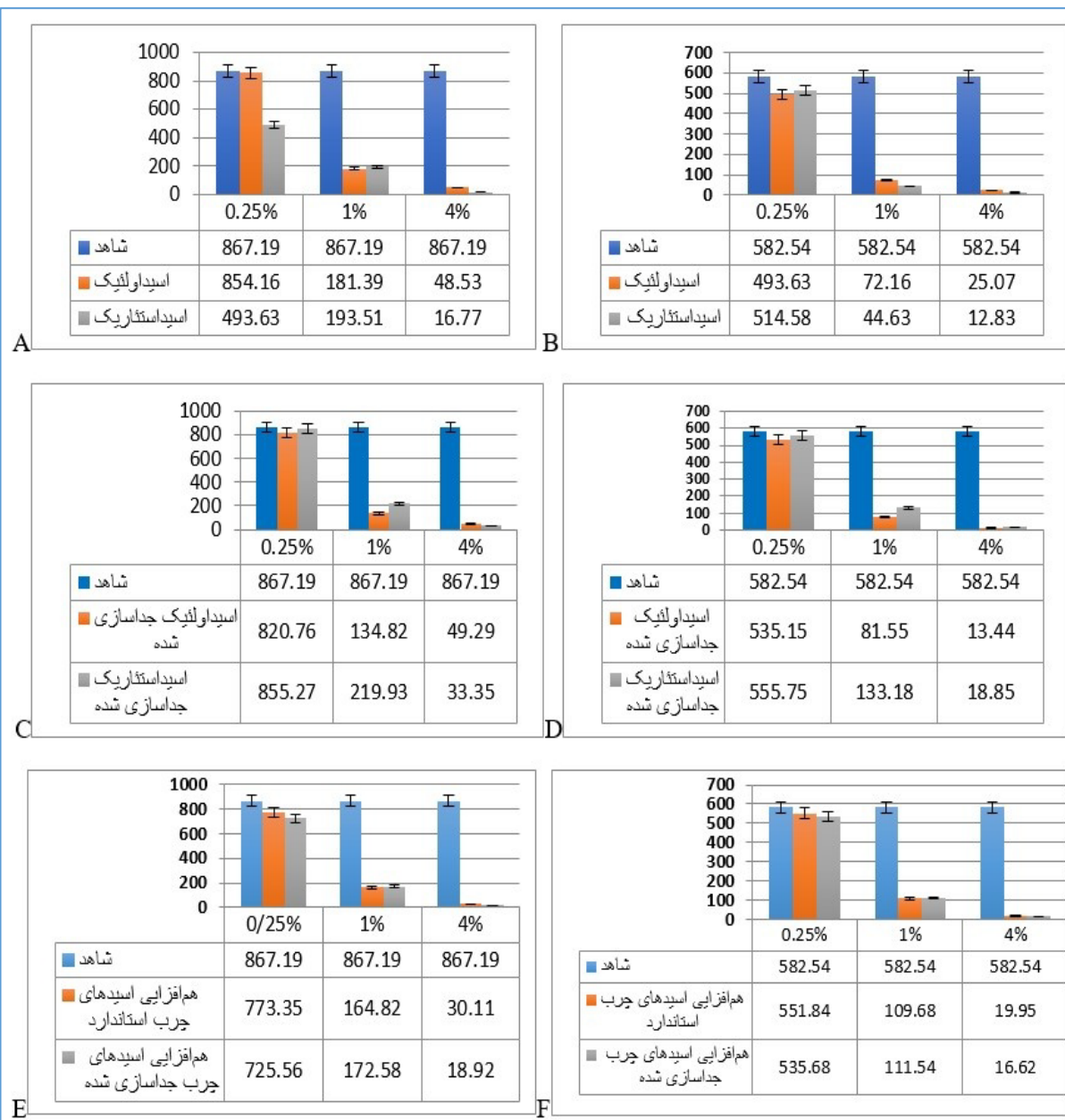


نمودار ۳- نمودارهای مربوط به نتایج بررسی رشد (میزان اسپورزایی) سوبه‌های قارچ‌های توکسین‌زا در بسترهای متفاوت توسط شمارش اسپورها با لام نئوبار، (A) میزان اسپورزایی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در غلظت‌های مختلف اسید چرب استاندارد اولئیک و استتاریک، (B) میزان اسپورزایی قارچ *فوزاریوم گرمیناروم* در غلظت‌های مختلف اسید چرب استاندارد اسید اولئیک و اسید استتاریک، (C) میزان اسپورزایی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در غلظت‌های مختلف اسید چرب جداسازی شده اسید اولئیک و اسید استتاریک، (D) میزان اسپورزایی قارچ *فوزاریوم گرمیناروم* در غلظت‌های مختلف اسید چرب جداسازی شده اسید اولئیک و اسید استتاریک، (E) میزان اسپورزایی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در غلظت‌های مختلف هم‌افزایی اسیدهای چرب استاندارد 0.25% هم‌افزایی اسیدهای چرب استاندارد 1% هم‌افزایی اسیدهای چرب استاندارد 4% (F) میزان اسپورزایی قارچ *فوزاریوم گرمیناروم* در بستر با هم‌افزایی اسیدهای چرب استاندارد اسید اولئیک و اسید استتاریک یا اسیدهای چرب جداسازی شده اسید اولئیک و اسید استتاریک، (F) میزان اسپورزایی قارچ *فوزاریوم گرمیناروم* در بستر با هم‌افزایی اسیدهای چرب استاندارد اسید اولئیک و اسید استتاریک (محور X بیانگر زمان و محور Y بیانگر تعداد اسپورها می‌باشد، همچنین لازم به ذکر است نتایج حاصل از جذب نوری مشابه نتایج بالا می‌باشد).

۳-۴ | بررسی تأثیر اسیدهای چرب بر میزان تولید توکسین

نتایج بررسی تولید آفلاتوکسین و زیرانون توسط *آسپرژیلوس فلاووس* و *فوزاریوم گرامیناروم* در بستر اسیدچرب استاندارد و جداسازی‌شده اسید اولئیک یا اسید

استتاریک و نتایج بررسی تولید آفلاتوکسین و زیرانون در بستر توأمان اسیدهای چرب استاندارد اسید اولئیک و اسید استتاریک یا اسیدهای چرب جداسازی‌شده اسید اولئیک و اسید استتاریک در نمودارهای نمودار ۴ جمع‌بندی شده‌اند.



نمودار ۴- نمودارهای مربوط به تأثیرهای اسیدهای چرب بر تولید آفلاتوکسین و زیرانون در *آسپرژیلوس فلاووس* و *فوزاریوم گرامیناروم* توسط روش HPLC، (A) تأثیر اسیدچرب استاندارد اسید اولئیک یا اسید استتاریک بر تولید آفلاتوکسین در *آسپرژیلوس فلاووس*، (B) تأثیر اسیدچرب استاندارد اسید اولئیک یا اسید استتاریک بر تولید زیرانون در *فوزاریوم گرامیناروم*، (C) تأثیر اسیدچرب جداسازی‌شده اسید اولئیک یا اسید استتاریک بر تولید آفلاتوکسین در *آسپرژیلوس فلاووس*، (D) تأثیر اسیدچرب جداسازی‌شده اسید اولئیک یا اسید استتاریک بر تولید زیرانون در *فوزاریوم گرامیناروم*، (E) تأثیر هم‌افزایی اسیدهای چرب استاندارد اسید اولئیک و اسید استتاریک یا اسیدهای چرب جداسازی‌شده اسید اولئیک و اسید استتاریک بر تولید آفلاتوکسین در *آسپرژیلوس فلاووس*، (F) تأثیر هم‌افزایی اسیدهای چرب استاندارد اسید اولئیک و اسید استتاریک یا اسیدهای چرب جداسازی‌شده اسید اولئیک و اسید استتاریک بر تولید زیرانون در *فوزاریوم گرامیناروم* (محور X بیانگر غلظت اسیدهای چرب و محور Y بیانگر میزان توکسین می‌باشد).

نتایج به دست آمده از تست MIC برای بررسی مهار رشد *آسپریژیلوس فلاووس* و *فوزاریوم گرامیناروم* توسط اسیدهای چرب اسید استتاریک و اسید اولئیک در جدول ۳ آورده شده است. براساس نتایج به دست آمده، حداقل غلظت مهارکنندگی برای *آسپریژیلوس فلاووس* مربوط به اسید اولئیک، اسید استتاریک و اسید اولئیک + اسید استتاریک به ترتیب با غلظت های (v/v) ۱۶، ۱۶ و ۸ درصد می باشد. همچنین، حداقل غلظت مهارکنندگی برای *فوزاریوم گرامیناروم* مربوط به اسید اولئیک، اسید استتاریک و اسید اولئیک + اسید استتاریک به ترتیب با غلظت های (v/v) ۸، ۸ و ۴ درصد می باشد. لازم به ذکر است که نتایج به دست آمده از اسیدهای چرب استاندارد و جداسازی شده یکسان بوده اند. همچنین بهترین تأثیر در مهار رشد مربوط به اثر توأمان اسیدهای چرب با غلظت (v/v) ۴ درصد بر قارچ *فوزاریوم گرامیناروم* بوده است.

۳-۵-۲ | نتایج حداقل غلظت قارچ کشی

نتایج به دست آمده از تست MFC برای بررسی مهار رشد *آسپریژیلوس فلاووس* و *فوزاریوم گرامیناروم* توسط اسیدهای چرب اسید استتاریک و اسید اولئیک در جدول ۴ آورده شده است.

براساس نتایج به دست آمده، افزایش غلظت اسیدچرب با میزان تولید آفلاتوکسین و زیرالنون رابطه عکس دارد. بیشترین تأثیر در کاهش تولید توکسین های آفلاتوکسین و زیرالنون مربوط به اسیدهای چرب استاندارد استتاریک اسید با غلظت (v/v) ۴ درصد به صورت منفرد می باشد. اسیدهای چرب جداسازی شده در مقایسه با اسیدهای چرب استاندارد بر تولید توکسین وابسته به غلظت تأثیر نسبتاً مشابهی داشتند، اما اثرهای هم افزایی اسیدهای چرب جداسازی شده در مقایسه با اسیدهای چرب استاندارد بر تولید توکسین وابسته به غلظت تأثیر قابل ملاحظه ای داشته و در سطح معناداری تولید توکسین ها را کاهش داده است. بیشترین درصد کاهش تولید سموم نسبت به شاهد مربوط به تأثیر اسیدچرب استاندارد استتاریک اسید با غلظت (v/v) ۴ درصد در تولید آفلاتوکسین و تأثیر هم افزایی اسیدهای چرب جداسازی شده با غلظت (v/v) ۴ درصد در تولید آفلاتوکسین می باشد.

۳-۵-۱ | تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت قارچ کشی

۳-۵-۱ | نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی

جدول ۳- نتایج بررسی مهار رشد *آسپریژیلوس فلاووس* و *فوزاریوم گرامیناروم* توسط اسیدهای چرب استاندارد و جداسازی شده اسید استتاریک و اسید اولئیک توسط تست MIC.

نوع قارچ	اسیدچرب	کنترل +	کنترل -	%۶۴	%۳۲	%۱۶	%۸	%۴	%۲	%۱	%۰/۵	%۰/۲۵
اسیدچرب استاندارد	اسید اولئیک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	اسید استتاریک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	اسید اولئیک + اسید استتاریک	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	اسید اولئیک	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	اسید استتاریک	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	اسید اولئیک + اسید استتاریک	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+

اسید چرب جدا سازی شده	موس	اسید اولئیک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
		اسید استئاریک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
		اسید اولئیک + اسید استئاریک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	موس	اسید اولئیک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
		اسید استئاریک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
		اسید اولئیک + اسید استئاریک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
اسید چرب جدا سازی شده	موس	اسید اولئیک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
		اسید استئاریک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
		اسید اولئیک + اسید استئاریک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	موس	اسید اولئیک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
		اسید استئاریک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
		اسید اولئیک + اسید استئاریک	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+

جدول ۴- نتایج بررسی مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس و فوزاریوم گرامیناروم توسط اسیدهای چرب استاندارد و جداسازی شده اسید استئاریک و اسید اولئیک توسط تست MFC.

نوع قارچ	اسید چرب	%۶۴	%۳۲	%۱۶	%۸	%۴
اسید چرب استاندارد	فلاووس	اسید اولئیک	-	-	+	+
	موس	اسید استئاریک	-	-	+	+
	آسپرژ	اسید اولئیک + اسید استئاریک	-	-	-	+
	ناروم	اسید اولئیک	-	-	-	+
	گراف	اسید استئاریک	-	-	-	+
	موس	اسید اولئیک + اسید استئاریک	-	-	-	+
اسید چرب جدا سازی شده	فلاووس	اسید اولئیک	-	-	+	+
	موس	اسید استئاریک	-	-	+	+
	آسپرژ	اسید اولئیک + اسید استئاریک	-	-	-	+
	ناروم	اسید اولئیک	-	-	-	+
	گراف	اسید استئاریک	-	-	-	+
	موس	اسید اولئیک + اسید استئاریک	-	-	-	+

استئاریک و اسید اولئیک + اسید استئاریک به ترتیب با غلظت‌های (v/v) ۳۲، ۳۲ و ۱۶ درصد می‌باشد. همچنین،

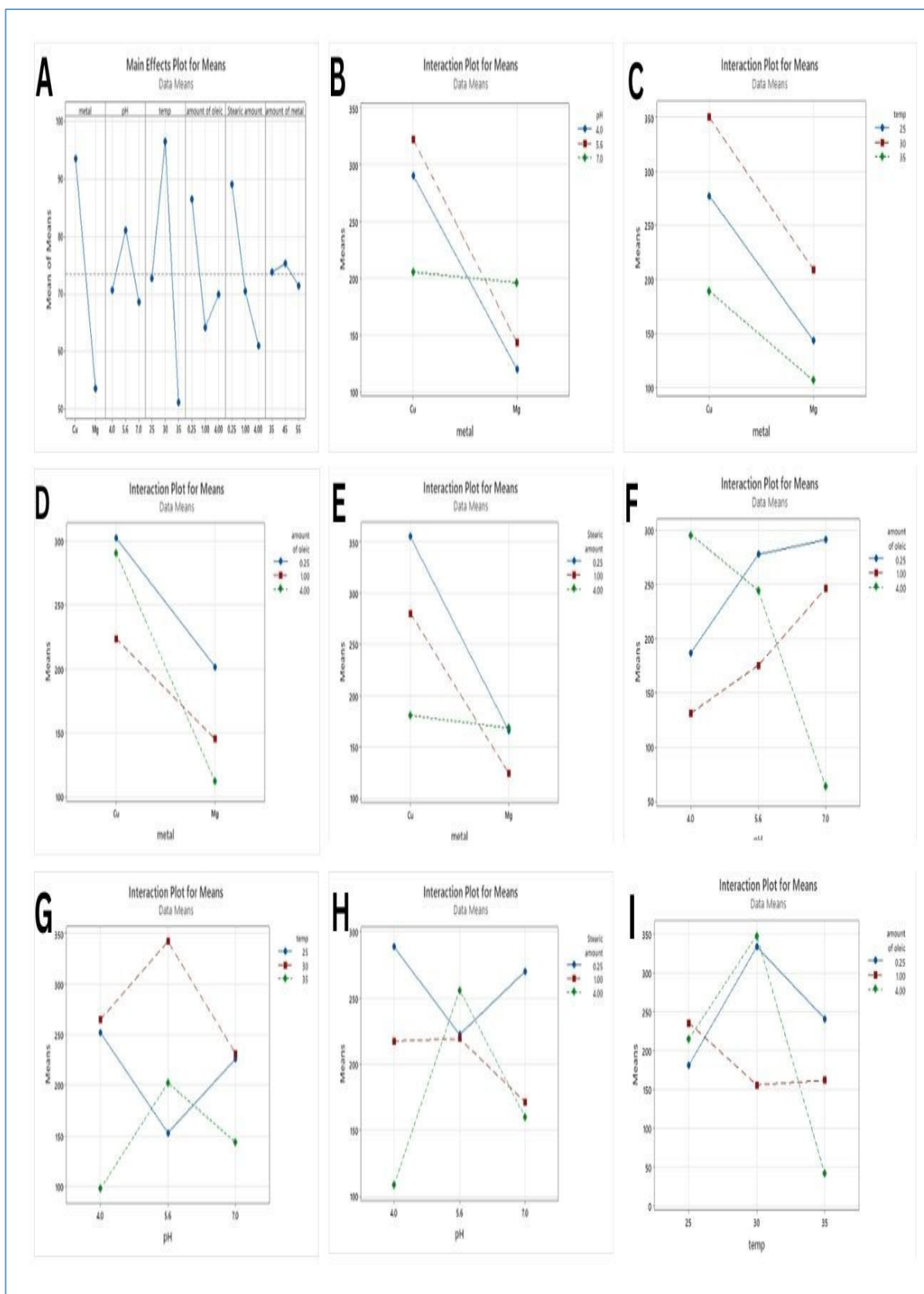
بر اساس نتایج به دست آمده، حداقل غلظت قارچ‌کشی برای قارچ آسپرژیلوس فلاووس مربوط به اسید اولئیک، اسید

حداقل غلظت قارچ‌کشی برای فوزاریوم گرمیناروم مربوط به اسید اولئیک، اسید استئاریک و اسید اولئیک + اسید استئاریک به ترتیب با غلظت‌های (v/v) ۱۶، ۱۶ و ۸ درصد می‌باشد. همچنین بهترین تأثیر کشندگی مربوط به اثر توأمان اسیدهای چرب با غلظت (v/v) ۱۶ درصد بر قارچ فوزاریوم گرمیناروم بوده است. لازم به ذکر است که نتایج به دست آمده از اسیدهای چرب استاندارد و جداسازی شده یکسان بوده‌اند.

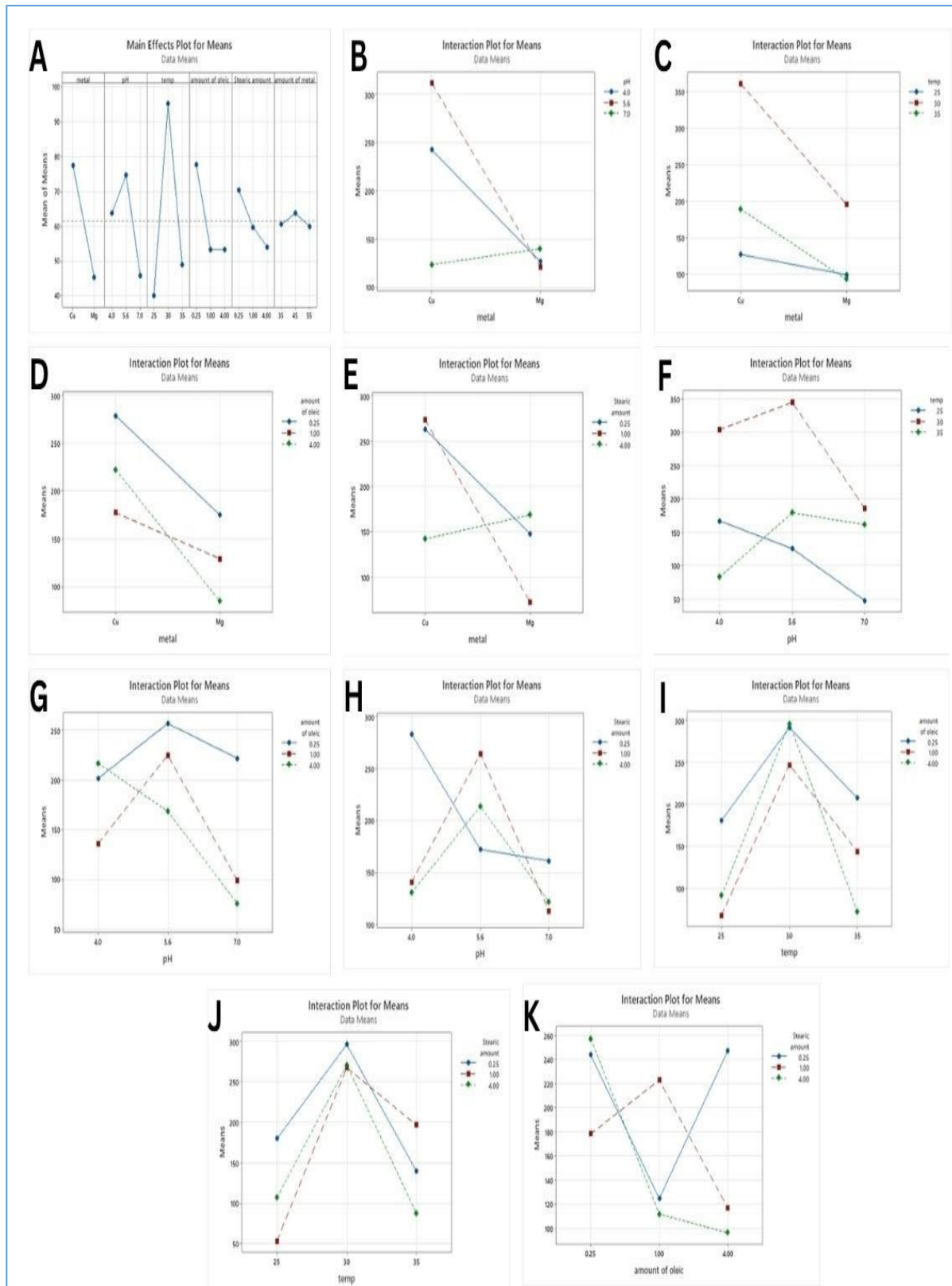
۳-۶ | بهینه‌سازی تأثیر اسیدهای چرب بر روی تولید توکسین به روش تاگوچی

در این مطالعه، جهت بهینه‌سازی تأثیر اسیدهای چرب جداسازی شده از مخمر یاروویا لیپولیتیکا بر تولید توکسین در قارچ‌های توکسین‌زا اسپریلوس فلاووس و فوزاریوم گرمیناروم از طراحی آزمایش بهینه‌سازی با استفاده از روش تاگوچی استفاده گردید. با توجه به نتایج به دست آمده در آزمایش‌های قبلی و تأثیر قابل ملاحظه اسیدهای چرب جداسازی شده به صورت توأمان با یکدیگر، از اسیدهای چرب جداسازی شده استفاده گردید. براین اساس بیشترین میزان

تولید آفلاتوکسین توسط قارچ اسپریلوس فلاووس در شرایط بهینه (دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH معادل ۵/۶، اسید اولئیک (v/v) ۰/۲۵ درصد، اسید استئاریک (v/v) ۴ درصد، غلظت فلز مورد استفاده ۴۵ ppm) برابر با ۵۶۱/۶۵ $\mu\text{g/kg}$ و کم‌ترین میزان تولید آفلاتوکسین توسط قارچ اسپریلوس فلاووس در شرایط بهینه (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، pH معادل ۴، اسید اولئیک (v/v) ۴ درصد، اسید استئاریک (v/v) ۴ درصد، غلظت فلز مورد استفاده ۴۵ ppm) برابر با ۱۳/۷۸ $\mu\text{g/kg}$ و بیشترین میزان توکسین زیرالنون تولید شده توسط فوزاریوم گرمیناروم در شرایط بهینه (دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH معادل ۵/۶، اسید اولئیک (v/v) ۱ درصد، اسید استئاریک (v/v) ۱ درصد، غلظت فلز مورد استفاده ۴۵ ppm) برابر با ۵۳۳/۷۳ $\mu\text{g/kg}$ و کم‌ترین مقدار این توکسین تولید شده در شرایط بهینه (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، pH معادل ۴، اسید اولئیک (v/v) ۴ درصد، اسید استئاریک (v/v) ۴ درصد، غلظت فلز مورد استفاده ۴۵ ppm) برابر با ۱۴/۵۷ $\mu\text{g/kg}$ بود. در نمودارهای ۵ و ۶ نتایج مربوط به این آزمایش آورده شده است.



نمودار ۵- (A) اثرهای اصلی فاکتورها در تولید آفلاتوکسین (B, B1) اثر میان‌کنش pH و محلول‌فلزی، (C) اثر میان‌کنش دما و محلول‌فلزی، (D) اثر میان‌کنش محلول‌فلزی و اسید اولئیک، (E) اثر میان‌کنش محلول‌فلزی و اسید استئاریک، (F) اثر اسید اولئیک و pH، (G) اثر میان‌کنش pH و دما، (H) اثر میان‌کنش اسید استئاریک و pH و (I) اثر میان‌کنش اسید اولئیک و دما بر تولید میزان آفلاتوکسین توسط *اسپرژیلوس فلاووس*.



نمودار ۶- (A) اثرهای اصلی فاکتورها در تولید زیرالنون، (B) اثر میان‌کنش محلول فلزی و pH، (C) اثر میان‌کنش محلول فلزی و دما، (D) اثر میان‌کنش محلول فلزی و اسید اولئیک، (E) محلول فلزی و اسید استئاریک، (F) اثر میان‌کنش دما و pH، (G) اسید اولئیک و pH، (H) اثر میان‌کنش اسید استئاریک و pH، (I) غلظت محلول فلزی و pH، (J) اثر میان‌کنش اسید استئاریک و دما و (K) اثر میان‌کنش اسید استئاریک و اسید اولئیک بر تولید میزان سم زیرالنون توسط فوزاریوم گرامیناروم.

به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که اگرچه اسیدهای چرب استاندارد در مهار رشد قارچ‌ها مؤثرتر از نمونه‌های جداسازی‌شده بودند، اما اسیدهای چرب استخراج‌شده از *یاروویا لیپولیتیکا* نیز اثرهای مهاري قابل‌توجه و وابسته به غلظت از خود نشان دادند. این موضوع اثبات می‌کند که روش تولید اسیدهای چرب توسط *یاروویا لیپولیتیکا* از کارایی زیستی مطلوبی برخوردار بوده و می‌تواند جایگزینی طبیعی و مؤثر برای منابع سنتتیک باشد. علاوه بر این، اثر هم‌افزایی میان اسید اولئیک و استئاریک به‌طور معناداری بازدارندگی قارچی را افزایش داد که این هم‌افزایی می‌تواند با استفاده از شاخص^۱ FIC در مطالعه‌های آتی کمی‌سازی شود تا میزان برهم‌کنش مثبت میان دو اسیدچرب مشخص گردد. همچنین، تحلیل تاگوچی نشان داد که دما، pH و نسبت‌های ترکیبی اسیدهای چرب از مهم‌ترین عوامل مؤثر در کاهش تولید توکسین‌ها هستند. به‌ویژه، شرایط بهینه (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، pH=۴، غلظت هر دو اسید ۴ (v/v) درصد و حضور Mg در ۴۵ ppm) بیشترین مهار تولید آفلاتوکسین B1 و زیرانون را به‌همراه داشت. این یافته‌ها به‌روشنی نشان می‌دهند که ترکیب اسیدهای چرب تولیدی توسط *یاروویا لیپولیتیکا* با تنظیم دقیق پارامترهای محیطی می‌تواند به‌صورت مؤثر برای کنترل قارچ‌های توکسین‌زا و کاهش تولید میکوتوکسین‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

۴ بحث

ظهور ابزارهای جدید آزمایشگاهی فرصت مناسبی برای مطالعه فرایندهای اصلی پاتوژن‌ها فراهم کرده است. این موضوع به‌ویژه در مورد قارچ‌های بیماری‌زا که نقش مهمی در بیماری‌های محصولات کشاورزی، حیوانات و انسان‌ها دارند اهمیت دارد. این قارچ‌ها می‌توانند سلامت انسان را تهدید کرده و باعث خسارت‌های اقتصادی شدید ناشی از آلودگی غذا و بیماری‌های دامی شوند (۱ و ۳۶). در مطالعه‌های پیشین، استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و بهینه‌سازی شرایط کشت *یاروویا لیپولیتیکا* منجر به افزایش بازده تولید اتیل استرها و اسیدهای چرب و اسیدهای چرب آزادشده است (۳۷ و ۳۸). در سال ۲۰۱۴ مطالعه‌ای اثر منابع مختلف روغن (روغن گل گاوزبان، کانولا، کنجد، گل گاوزبان و ماهی قزل‌آلا) و پسماندهای صنایع روغنی (روغن تفاله زیتون، تفاله روغنی فندق و تفاله روغنی آفتابگردان) را بر رشد، تجمع چربی و تولید لیپاز و اسید

سیتریک توسط *یاروویا لیپولیتیکا* بررسی نمود و بیشینه زیست‌توده و تجمع چربی با روغن بزرک مشاهده شد. مشابه پژوهش حاضر، استفاده از منابع کم‌هزینه و تجدیدپذیر برای تولید متابولیت‌های ارزشمند موردتوجه بوده است (۳۹). در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای با تغییرهای متابولیکی و بهینه‌سازی شرایط کشت، تولید اسیدهای چرب توسط *یاروویا لیپولیتیکا* را افزایش داده است. مشابه پژوهش حاضر، تمرکز بر افزایش تولید اسیدهای چرب به‌عنوان متابولیت‌های ارزشمند است، اما اثرهای ضدقارچی این اسیدها موردبررسی قرار نگرفته است (۴۰). در سال ۲۰۱۹ مطالعه‌ای درباره بهینه‌سازی براساس تغییر منبع کربن به‌منظور بررسی تولید میکروبی اسیدهای چرب با استفاده از ماکور سیرکین لوتیدس^۲ نشان داد که شرایط کشت مانند دما و زمان کشت، تأثیر قابل‌توجهی بر تولید اسیدهای چرب دارند. این یافته‌ها با پژوهش حاضر با هدف مشابهی تغییر منبع کربن به‌منظور بهینه‌سازی تولید انجام گردیده است اما در مواردی از جمله انتخاب میکروارگانیسم هم‌خوانی ندارد (۴۱). در سال ۲۰۲۰ مطالعه‌ای بهینه‌سازی شرایط کشت *یاروویا لیپولیتیکا* را در بسترهای ضایعات کشاورزی بررسی کرده و افزایش تولید لیپیدها و اسیدهای چرب را گزارش کرده است. مشابه پژوهش حاضر، استفاده از منابع کم‌هزینه و تجدیدپذیر برای تولید متابولیت‌های ارزشمند موردتوجه بوده است (۴۲). در سال ۲۰۲۱ در مطالعه‌ای امکان استفاده از روغن ضایعات ماهی حاصل از فرایند دودی کردن صنعتی در کشت‌های دسته‌ای مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* با نیتروژن محدود ارزیابی گردید و تأثیر مثبتی بر پارامترهای کشت در محیط کشت روغن ماهی ضایعاتی داشت. کار بیشتر روی ارتقای پسماند اصلی توصیه می‌شود، به‌خصوص به این دلیل که روغن، محتوای بالای پلی‌فنول‌ها و حساسیت کمتر به اکسیداسیون را نسبت به روغن میکروبی مشتق‌شده از محیط کشت روغن زیتون کنترل نشان داد. این پژوهش در استفاده از منابع کم‌هزینه به‌منظور تولید متابولیت‌های میکروبی موردمشابه پژوهش حاضر می‌باشد (۴۳). در سال ۲۰۲۲ پژوهش دیگری بر تولید و بهینه‌سازی گاما-دکالاکتون در مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* با استفاده از روش تاگوچی تأکید کرده است. این موضوع در استفاده از روش تاگوچی به‌منظور بهینه‌سازی شرایط مطلوب آزمایش مشابه پژوهش حاضر است که بهینه‌سازی شرایط

² *Mucor circinelloides*

¹ Fractional Inhibitory Concentration

کشت (دمای ۳۵ درجه، pH=4، اسید اولئیک و استئاریک ۴ درصد) منجر به کاهش رشد قارچ‌ها و تولید سموم می‌شود اما تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای با پژوهش حاضر دارد (۴۴). در سال ۲۰۲۳ در مطالعه‌ای اثر تفاله‌های روغن‌کشی زیتون، کنجد و آفتابگردان بر تولید اسیدهای چرب در کشت نیمه‌باز یاروویا لیپولیتیکا بررسی شده است. نتایج نشان دادند که تفاله زیتون بهترین بستر برای تولید اسیدهای چرب شامل اولئیک اسید، پالمیتیک اسید، لینولئیک اسید و استئاریک اسید است. این اسیدها دارای اثر مهاری بر رشد قارچ‌های بیماری‌زا هستند و تولید چربی میکروبی با بازده بالا (بیش از ۵۰ درصد) گزارش شده است، این مطالعه بسترهای متفاوتی از مطالعه حاضر را مورد استفاده قرار داده است و اثرگذاری اسیدهای چرب را بر توکسین‌زایی و رشد قارچ‌های توکسین‌زا بررسی نکرده است (۴۵). در سال ۲۰۲۳ مطالعه‌ای نشان داده است که اسید اولئیک به‌طور معنی‌داری رشد قارچ‌های توکسین‌زای *آسپرژیلوس* و تولید آفات توکسین را کاهش می‌دهند. همچنین اثرهای این اسیدها در دمای مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعه حاضر در کاهش رشد قارچ و تولید توکسین در شرایط بهینه‌سازی شده کاملاً هم‌خوان است (۴۶). در سال ۲۰۲۵ مطالعه‌ای به بررسی اثرهای ضدقارچی اسیدهای چرب مختلف از جمله اسید اولئیک و استئاریک بر رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و تولید آفات توکسین پرداخته است. نتایج مشابه پژوهش حاضر نشان داد که افزایش غلظت این اسیدها باعث کاهش رشد قارچ و تولید سموم می‌شود. این مطالعه اهمیت اسیدهای چرب طبیعی را در کنترل قارچ‌های بیماری‌زا تأیید می‌کند (۴۷). با توجه به پژوهش حاضر یاروویا لیپولیتیکا قادر به تولید اسیدهای چرب اسید استئاریک و اسید اولئیک در بستر تفاله‌های بادام شیرین، بادام تلخ و کرچک می‌باشد و با افزایش غلظت اسیدهای چرب اسید استئاریک و اسید اولئیک در محیط کشت قارچ‌های توکسین‌زا میزان رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و *فوزاریوم گرمیناروم* و البته میزان تولید سموم آفات توکسین B1 و زیرانتون توسط آن‌ها کاهش می‌یابد. اسیدهای چرب یادشده همچنین دارای حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی قارچی مطلوبی می‌باشند. در بهینه‌سازی عدم تولید آفات توکسین و زیرانتون مشخص گردید که بیشترین میزان آفات توکسین B1 تولیدشده توسط *آسپرژیلوس فلاووس* مربوط به شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH معادل ۵/۶، اسید اولئیک ۰/۲۵ درصد، اسید

استئاریک ۴ درصد، غلظت ۴۵ ppm فلز مس و کمترین مقدار توکسین تولیدشده مربوط به شرایط دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد، pH معادل ۴، اسید اولئیک ۴ درصد، اسید استئاریک ۴ درصد، غلظت ۴۵ ppm فلز منیزیم است. همچنین، بیشترین میزان توکسین زیرانتون تولیدشده توسط *فوزاریوم گرمیناروم* مربوط به شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH معادل ۵/۶، اسید اولئیک ۱ درصد، اسید استئاریک ۱ درصد، غلظت ۴۵ ppm فلز مس و کمترین مقدار این توکسین تولیدشده مربوط به شرایط دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد، pH معادل ۴، اسید اولئیک ۴ درصد، اسید استئاریک ۴ درصد، غلظت ۴۵ ppm فلز منیزیم است. ازسوی دیگر ترکیب دو اسیدچرب اولئیک (غیراشباع) و استئاریک (اشباع) نسبت به هریک به‌صورت منفرد، اثر هم‌افزایی قابل‌توجهی بر مهار رشد و تولید سموم قارچی داشت. مکانیسم احتمالی این تفاوت‌ها را می‌توان با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی دو اسیدچرب توضیح داد. اسید استئاریک (C18:0) دارای زنجیره اشباع و خطی است که می‌تواند با نفوذ در دولایه فسفولیپیدی غشا، نظم بسته‌بندی لیپیدها را افزایش داده و نفوذپذیری غشای قارچی را کاهش دهد. در مقابل، اسید اولئیک (C18:1) با دارا بودن یک پیوند دوگانه، باعث ایجاد خمیدگی در زنجیره هیدروکربنی می‌شود و نظم غشا را مختل کرده و موجب افزایش سیالیت آن می‌گردد. ترکیب این دو اثر متقابل، یعنی افزایش سفتی توسط استئاریک اسید و افزایش نفوذپذیری توسط اولئیک اسید، می‌تواند ساختار غشای قارچی را بی‌ثبات‌تر و آسیب‌پذیرتر کند. این هم‌افزایی احتمالاً توانایی قارچ را در حفظ یکپارچگی غشا، انتقال مواد و تنظیم تنش اکسیداتیو مختل می‌کند و بدین ترتیب باعث مهار رشد و تولید مایکوتوکسین‌ها می‌شود. در مجموع با توجه به نتایج پژوهش حاضر مخمر یاروویا لیپولیتیکا قادر به تولید اسیدهای چرب (اسید استئاریک و اسید اولئیک) در بستر تفاله‌های روغن‌کشی‌شده (بادام شیرین، بادام تلخ و کرچک) می‌باشد و این اسیدهای چرب، اثر مهاری خوبی بر میزان رشد *آسپرژیلوس فلاووس*، *فوزاریوم گرمیناروم* و میزان تولید سموم آفات توکسین B1 و زیرانتون توسط آن‌ها دارند و با دست‌کاری شرایط محیط کشت می‌توان نتایج را بهینه نمود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که از یک مخمر طبیعی و دارای استفاده گسترده در صنعت مانند یاروویا لیپولیتیکا می‌توان جهت تولید متابولیت‌های سودمندی همچون اسیدهای چرب بهره‌برد و این متابولیت‌ها می‌توانند اثر مهاری بر قارچ‌های بیماری‌زا

۷ | تشکر و قدردانی

از تمامی مسئولان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، به‌ویژه دانشکده علوم زیستی که در انجام فعالیت‌ها و امور آزمایشگاهی این مطالعه کمال همکاری و همراهی را داشتند سپاسگزاری می‌گردد.

۸ | تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافع در ارتباط با این پژوهش ندارند.

۹ | سهم نویسندگان

محدثه لاری‌پور: طراحی مطالعه، تفسیر نتایج و بازبینی علمی متن.

مهران عبدالهی: انجام آزمایش‌ها و تحلیل داده‌ها.

شهرزاد صادقی امجد: نگارش مقاله و تفسیر نتایج.

نورالدین بختیاری: نظارت بر پژوهش و اصلاح نهایی مقاله.

۱۰ | کد اخلاق

ندارد.

۱۱ | استفاده از هوش مصنوعی

ندارد.

داشته باشند. بهره بردن از متابولیت‌های طبیعی در واقع از آن جهت حائز اهمیت است که استفاده از آن‌ها دارای حداقل عوارض جانبی بوده و کم‌هزینه می‌باشند؛ از این رو می‌تواند جایگزین مناسبی برای مواد شیمیایی یا سنتتیک باشد.

۵ | نتیجه‌گیری

همان‌طور که بیان شد، در سال‌های اخیر پژوهش‌های متعددی با هدف بررسی اثرهای اسیدهای چرب بر روی قارچ‌های توکسین‌زا و همچنین بررسی مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* به‌عنوان یک میکروارگانیسم ایمن مولد اسیدهای چرب انجام گرفته است و از طرف دیگر، امروزه تلاش تحقیق‌ها بر استفاده از متابولیت‌های با بیشینه بازده و کمینه هزینه در زمینه‌های مختلف، به‌جای مواد مصنوعی و شیمیایی می‌باشد؛ به‌طور خلاصه این مطالعه نشان داد که ترکیب اسیدهای چرب اولئیک و استئاریک تولیدشده توسط *یاروویا لیپولیتیکا* می‌تواند به‌صورت مؤثر رشد و توکسین‌زایی قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *فوزاریوم گرمیناروم* را مهار کند. اثرهای وابسته به غلظت و هم‌افزایی این اسیدها اثبات می‌کند که فرایند تولید میکروبی توسط *یاروویا لیپولیتیکا* از کارایی زیستی مطلوبی برخوردار است. افزایش غلظت این اسیدها سبب کاهش رشد قارچ و مهار کامل تولید آفات توکسین B1 و زیرالنون در شرایط بهینه (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، pH=۴، غلظت هر دو اسید ۴ v/v درصد) گردید. این یافته‌ها بیانگر آن است که متابولیت‌های چربی طبیعی می‌توانند به‌عنوان جایگزین ایمن و کم‌هزینه برای قارچ‌کش‌های سنتتیک مطرح شوند. در پژوهش‌های آینده می‌توان تأثیر اسیدهای چرب اسید استئاریک و اسید اولئیک بر سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، سموم دیگر و شناسایی شرایط هرچه بهینه‌تر به‌منظور تأثیرگذاری هرچه بیشتر متابولیت‌های طبیعی بر میکروب‌های بیماری‌زا را بررسی نمود. همچنین در مطالعه‌های آینده پیشنهاد می‌شود که میزان هم‌افزایی کمی‌شده این ترکیب‌ها با شاخص FIC ارزیابی گردد و فرمولاسیون‌های کاربردی آن‌ها برای کنترل آلودگی‌های قارچی در صنایع غذایی، دارویی و کشاورزی نیز توسعه یابد.

۶ | ملاحظات اخلاقی

این پژوهش شامل مطالعه‌هایی در سطح آزمایشگاهی و برون‌تنی بوده و نمونه انسانی یا حیوانی در این مطالعه مورد استفاده قرار نگرفت، از این رو کد اخلاق برای این پژوهش دریافت نشد.

| **Extended Abstract****Inhibitory Effect of Fatty Acids Produced by *Yarrowia lipolytica* on the Growth of Toxin-Producing Fungi |**

Background and Aim: Toxigenic fungi are among the most important contaminants of food and agricultural products, causing spoilage, economic losses, and serious health problems due to the production of mycotoxins. The search for safe, effective, and natural antifungal alternatives has therefore become an important research priority. In this context, microbial metabolites are considered promising bioactive compounds for controlling fungal growth and reducing toxin contamination. The present study aimed to investigate the inhibitory effect of fatty acids produced by *Yarrowia lipolytica* on the growth of *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum*.

Material and methods: The target fungal strains (*A. flavus* and *F. graminearum*) were cultured under laboratory conditions. *Y. lipolytica* was grown on sweet almond, bitter almond, and castor bean pomace substrates to produce fatty acids, mainly stearic and oleic acids. The produced fatty acids were extracted and quantified using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Fungal growth was assessed by spore counting and optical density measurement under different treatment conditions. In addition, the effects of the fatty acids on aflatoxin B1 and zearalenone production were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were also determined using serial concentrations of standard and extracted fatty acids.

Results: The results demonstrated that *Y. lipolytica* was capable of producing both stearic and oleic acids in the tested substrates. Increasing concentrations of these fatty acids significantly reduced fungal growth and suppressed toxin production in a concentration-dependent manner. *A. flavus* growth was inhibited at 8% (v/v) of the combined fatty acids, whereas *F. graminearum* was inhibited at 4% (v/v). Moreover, at higher concentrations, namely 16% (v/v) for *A. flavus* and 8% (v/v) for *F. graminearum*, complete fungal death was observed, along with total inhibition of aflatoxin B1 and zearalenone production.

Conclusion: These findings indicate that fatty acids produced by *Y. lipolytica* may serve as effective, natural, and cost-efficient antifungal agents for controlling toxigenic fungi and reducing mycotoxin contamination in food and agricultural systems.

| **Keywords**

Yarrowia lipolytica, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, Stearic Acid, Oleic Acid, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Fungicidal Concentration

- 1- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 2006;443(7113):818-22.
- 2- Campbell CK, Johnson EM. Identification of pathogenic fungi: John Wiley & Sons; 2013.
- 3- Deacon JW. Fungal biology: John Wiley & Sons; 2005.
- 4- Naranjo-Ortiz MA, Gabaldón T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*. 2019;94(6):2101-37.
- 5- Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(5):634-43.
- 6- Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Berg JV, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(9):1172-7.
- 7- Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Aspergillosis: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Infectious Disease Clinics*. 2021;35(2):415-34.
- 8- Dasbach EJ, Davies GM, Teutsch SM. Burden of aspergillosis-related hospitalizations in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 2000;31(6):1524-8.
- 9- Fisher MC, Garner TW. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal biology reviews*. 2007;21(1):2-9.
- 10- Gushiken AC, Saharia KK, Baddley JW. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics*. 2021;35(2):493-514.
- 11- Mapuranga J, Zhang N, Zhang L, Chang J, Yang W. Infection strategies and pathogenicity of biotrophic plant fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:799396.
- 12- Palm ME. Systematics and the impact of invasive fungi on agriculture in the United States: Knowledge of the systematics of plant-inhabiting fungi is fundamental for making appropriate plant quarantine decisions and thereby safeguarding US plant resources. *BioScience*. 2001;51(2):141-7.
- 13- Desjardins AE, Hohn TM, McCORMICK SP. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological reviews*. 1993;57(3):595-604.
- 14- Bennett J. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. Springer; 1987. p. 3-5.
- 15- Iqbal SZ. Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review. *Current Opinion in Food Science*. 2021;42:237-47.
- 16- Moss M. Centenary review: mycotoxins. *Mycological Research*. 1996;100(5):513-23.
- 17- Khan R, Anwar F, Ghazali FM. A comprehensive review of mycotoxins: Toxicology, detection, and effective mitigation approaches. *Heliyon*. 2024.
- 18- Bayman P, Baker JL, Doster MA, Michailides TJ, Mahoney NE. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and environmental microbiology*. 2002;68(5):2326-9.
- 19- Venkitasubramanian T, Rodricks J, Hesseltine C, Mehlman M. Mycotoxins in human and animal health. Pathotox Publishers Inc, Park Forest South, Illinois. 1977:83.
- 20- Cole R, Cox R. Handbook of toxic fungal metabolites Academic Press. New York. 1981:128,520.
- 21- Guimarães A, Venâncio A. The potential of fatty acids and their derivatives as antifungal agents: A review. *Toxins*. 2022;14(3):188.
- 22- Carballeira N. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and

- antifungal agents. Progress in lipid research. 2008;47(1):50-61.
- 23- Qiu M, Wang Y, Sun L, Deng Q, Zhao J. Fatty acids and oxylipins as antifungal and anti-mycotoxin agents in food: A review. Toxins. 2021;13(12):852.
- 24- Awuchi CG, Ondari EN, Eseoghene IJ, Twinomuhwezi H, Amagwula IO, Morya S. Fungal growth and mycotoxins production: Types, toxicities, control strategies, and detoxification. Fungal reproduction and growth: IntechOpen; 2021.
- 25- Moja P, Organization WH. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis. 2017.
- 26- Barth G, Gaillardin C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS microbiology reviews. 1997;19(4):219-37.
- 27- Beed M, Sherman R, Holden S. Fungal infections and critically ill adults. Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain. 2014;14(6):262-7.
- 28- Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases. Clinical Infectious Diseases. 2005;41(4):521-6.
- 29- Ledesma-Amaro R, Nicaud J-M. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. Progress in lipid research. 2016;61:40-50.
- 30- Bao W, Li Z, Wang X, Gao R, Zhou X, Cheng S, et al. Approaches to improve the lipid synthesis of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2021;149:111386.
- 31- Park K, Hahn J-S. Engineering *Yarrowia lipolytica* for sustainable ricinoleic acid production: A pathway to free fatty acid synthesis. Metabolic Engineering. 2024;81:197-209.
- 32- Zhao Y, Chan JF-W, Tsang C-C, Wang H, Guo D, Pan Y, et al. Clinical characteristics, laboratory identification, and in vitro antifungal susceptibility of *Yarrowia (Candida) lipolytica* isolates causing fungemia: a multicenter, prospective surveillance study. Journal of Clinical Microbiology. 2015;53(11):3639-45.
- 33- Wei L-J, Cao X, Liu J-J, Kwak S, Jin Y-S, Wang W, et al. Increased accumulation of squalene in engineered *Yarrowia lipolytica* through deletion of PEX10 and URE2. Applied and environmental microbiology. 2021;87(17):e00481-21.
- 34- Nambou K, Zhao C, Wei L, Chen J, Imanaka T, Hua Q. Designing of a “cheap to run” fermentation platform for an enhanced production of single cell oil from *Yarrowia lipolytica* DSM3286 as a potential feedstock for biodiesel. Bioresource technology. 2014;173:324-33.
- 35- Park Y-K, Dulermo T, Ledesma-Amaro R, Nicaud J-M. Optimization of odd chain fatty acid production by *Yarrowia lipolytica*. Biotechnology for biofuels. 2018;11:1-12.
- 36- Anand G, Rajeshkumar KC. Challenges and threats posed by plant pathogenic fungi on agricultural productivity and economy. Fungal diversity, ecology and control management: Springer; 2022. p. 483-93.
- 37- Wei L-J, Ma Y-Y, Cheng B-Q, Gao Q, Hua Q. Metabolic engineering *Yarrowia lipolytica* for a dual biocatalytic system to produce fatty acid ethyl esters from renewable feedstock in situ and in one pot. Applied Microbiology and Biotechnology. 2021;105:8561-73.
- 38- Yang Q, Tian M, Dong P, Zhao Y, Deng Y. Engineering *Yarrowia lipolytica* to Enhance the Production of Malonic Acid via Malonyl-CoA Pathway at High Titer. Advanced Science. 2025;2411665.
- 39- Saygün A, Şahin-Yeşilçubuk N, Aran N. Effects of different oil sources and residues on biomass and metabolite production by *Yarrowia lipolytica* YB 423-12. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2014;91:1521-30.
- 40- Qiao K, Wasylenko TM, Zhou K, Xu P, Stephanopoulos G. Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by

engineering cytosolic redox metabolism.

Nature biotechnology. 2017;35(2):173-7.

41- Hussain SA, Nazir Y, Hameed A, Yang W, Mustafa K, Song Y. Optimization of diverse carbon sources and cultivation conditions for enhanced growth and lipid and medium-chain fatty acid (MCFA) production by *Mucor circinelloides*. Fermentation. 2019;5(2):35.

42- Gao R, Li Z, Zhou X, Bao W, Cheng S, Zheng L. Enhanced lipid production by *Yarrowia lipolytica* cultured with synthetic and waste-derived high-content volatile fatty acids under alkaline conditions. Biotechnology for Biofuels. 2020;13:1-16.

43- Fabiszewska AU, Zieniuk B, Kozłowska M, Mazurczak-Zieniuk PM, Wołoszynowska M, Misiukiewicz-Stępień P, et al. Studies on upgradation of waste fish oil to lipid-rich yeast biomass in *Yarrowia lipolytica* batch cultures. Foods. 2021;10(2):436.

44- Małajowicz J, Fabiszewska A, Nowak D, Kuśmirek S. Improved gamma-decalactone synthesis by *Yarrowia lipolytica* yeast using taguchi robust design method. Applied Sciences. 2022;12(20):10231.

45- Ramezani H, Larypoor M, Sadri M. Evaluation of the effect of olive, sesame and sunflower pulp for fatty acids production in semi-open culture *Yarrowia lipolytica*. JMBS 2023; 13 (2): 31-45

46- Ahmadian F, Nosrati A, Kioumars H. Effects of oleic acid and temperature on aflatoxin production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Asian J Crop Sci. 2023;15:37-42.

47- Yang Y, Ma W, Johnson ET, Xie Y, Zhao R. Antifungal effects of three natural branched medium-chain fatty acids and their potential as fumigants against *Aspergillus flavus* in stored peanut seeds. Food Control. 2025;168:110950.