

## ارزیابی اتصال و سم‌زدایی آفلاتوکسین M<sub>1</sub> موجود در شیر توسط لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD<sub>2</sub>، پروبیوتیک بومی ایران در شرایط فیزیکی شیمیایی مختلف

محمد رضا فخرالاسلام<sup>۱</sup>، پروانه جعفری<sup>۲\*</sup>، سید داود حسینی<sup>۳</sup>، حمیدرضا مهاجرانی<sup>۴</sup>، علی بناساز<sup>۵</sup>، مریم تاج‌آبادی ابراهیمی<sup>۶</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات مرکزی، اراک، ایران.
- ۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات مرکزی، اراک، ایران.
- ۳- استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، اراک، ایران.
- ۴- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، ایران.
- ۵- کاشناس علوم آزمایشگاهی دامپزشکی، سازمان دامپزشکی اراک، ایران.
- ۶- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** آفلاتوکسین ها توسط آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC) به عنوان عوامل سرطان‌زای انسانی طبقه‌بندی شد هاند. میکروارگانسیم های متعددی گزارش شد هاند که توانایی متصل شدن یا تخریب آفلاتوکسین ها را در مواد غذایی و خوراکی دارا می‌باشند. در این پژوهش توانایی اتصال و سم‌زدایی آفلاتوکسین M<sub>1</sub> توسط لاکتوباسیل کازئی سویه TD<sub>2</sub> پروبیوتیک بومی ایران که توسط تاج‌آبادی و همکاران از ترخینه جدا شده مورد بررسی قرار گرفته است.

**مواد و روش ها:** مقدار سم اولیه نمونه های شیر تهیه شده، با کیت الایزا (Euro clone) تعیین گردید. بعد از کشت و خالص سازی باکتری در محیط MRS Broth، به ۱۹۰۰ μl شیر حاوی ۱۵۰ μg سم آفلاتوکسین M<sub>1</sub> (غلظت ۱۰۰ ppb) با pH برابر ۷ و ۱۵۰ μl از سویه باکتری به تعداد CFU/۱۰<sup>۹</sup> × ۲ افزوده شد. بعد از ۴ h گرماگذاری در ۳۷ °C میزان حذف آفلاتوکسین در شرایط بدون تیمار و نیز با انجام تیمار های فیزیکی شیمیایی اندازه‌گیری شد.

**یافته ها:** باکتری زنده به تن هایی باعث کاهش آفلاتوکسین M<sub>1</sub> می شود (۵۵.۳۵٪ ± ۰.۷۵۶۸) ولی ایجاد تخریب به دلیل اجازه اتصال بیشتر و بهتر به آفلاتوکسین در تیمار با آنزیم لیزوزیم (۶۰.۰۳٪ ± ۰.۵۱۴۴) و اسید کلریدریک (۶۳.۶۱٪ ± ۰.۵۸۸۶) از همه بالاتر بوده و اختلاف معنی‌داری بین این ها مشاهده شد.

**بحث:** در این تحقیق نشان داده شد که زنده مانی میکروارگانسیم برای حذف موثر آفلاتوکسین الزامی نیست ولی باکتری تیمار اسیدی شده درصد حذف بالاتری از سم آفلاتوکسین M<sub>1</sub> را نشان می‌دهد.

**نتیجه گیری:** سویه مذکور با ۵۵.۳۵٪ حذف آفلاتوکسین M<sub>1</sub> می‌تواند به عنوان یک عامل موثر در حذف زیستی آفلاتوکسین از مواد مختلف مورد توجه قرار گیرد.

### مقدمه

قارچی<sup>۱</sup> از اهمیت زیادی برخوردارند. از بین این سموم آفلاتوکسین ها<sup>۲</sup> در درجه‌ی اول اهمیت قرار دارند. بررسی ها نشان داده است که سیستم کنترل مواد غذایی در کشور های در حال توسعه قادر به کنترل و حذف کامل آفلاتوکسین نبوده و بیش از ۵ میلیارد مردمی که در این کشور ها زندگی می‌کنند در معرض مقادیر زیاد و کنترل نشده‌ی این

از میان عوامل متعددی که سبب فساد مواد غذایی می‌شوند، سموم

آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات مرکزی، اراک

پست الکترونیکی: P-jafari@iau.arak.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۸/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۱۳

Mycotoxins.۱

Aflatoxins.۲

سموم می باشند (۲۰، ۱۲). مواد غذایی مختلفی از جمله شیر و محصولات لبنی، امکان آلودگی با آفاتوکسین را دارند که حتی در مقادیر کم، اثرات سویی بر روی سلامت انسان و حیوانات می گذارند.

آفاتوکسین ها، سموم قارچی هستند که به وسیله ی چندین گونه از قارچ های اسپرزیلوس<sup>۳</sup> تولید می شوند. هنگامی که مواد خوراکی آلوده به آفاتوکسین B1 توسط گاو های شیری مصرف می شود در کبد هیدروکسیله شده و به آفاتوکسین M1 تبدیل می شود که در شیر و ادرار حیوان قابل اندازه گیری است. پس از ورود این ماده به دستگاه گوارش ابتدا توسط آنزیم های سیتوکروم P450 کبدی متابولیزه می شود که نتیجه ی آن تولید مشتق اپوکسید است که قابلیت واکنش و اتصال به DNA و ایجاد آفاتوکسین- گوانین را دارد. ترکیب اخیر می تواند به عنوان یک شاخص مهم میزان مواجهه با آفاتوکسین قرار گیرد. آفاتوکسین B1 به عنوان گروه اول ترکیبات سرطانزا و آفاتوکسین M1 به عنوان گروه دوم ترکیبات سرطانزا برای انسان و حیوان معرفی شده است (۸، ۱۷، ۱۹).

در کنار صدمات جبران ناپذیر به صنعت دام پروری، ورود آفاتوکسین M1 از طریق شیر به صنایع غذایی انسان، سلامت انسان را نیز با خطر جدی مواجه می کند. به منظور کاهش خطرات ناشی از مصرف خوراک آلوده به آفاتوکسین اتحادیه ی اروپا مقدار مجاز آفاتوکسین M1 در شیر را  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  تعیین کرده است (۱).

سم زدایی و غیر فعال کردن آفاتوکسین شامل روش های فیزیکی، شیمیایی و زیستی می باشد که روش های شیمیایی و فیزیکی محدودیت هایی مثل از دست رفتن ارزش محصولات غذایی، کیفیت، اثرات بهداشتی نامطلوب و هزینه تجهیزات می باشد. ولی کاربرد روش های زیستی توسط میکروارگانیسم مفیدی مثل باکتری ها و قارچ ها، کمک قابل ملاحظه ای به کاهش آفاتوکسین در محیط های آلوده می کند.

میکروارگانیسم های متعددی گزارش شده هاند که توانایی متصل شدن یا تخریب آفاتوکسین در مواد غذایی و خوراکی را دارا می باشند. احتمالاً توانایی حذف آفاتوکسین ها ناشی از اتصال فیزیکی سم به دیواره سلولی باکتری و یا اجزای دیواره سلولی باشد. قسمت پلی ساکاریدی و پپتیدوگلیکانی دیواره سلولی باکتری مسئول اتصال به سموم قارچی و حذف آن است. به دلیل مزایای مثل حذف سریع در مدت زمان کوتاه، باکتری ها کاربرد بیشتری برای حذف آفاتوکسین دارند (۲، ۶).

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که مصرف آن ها به تعداد معین سبب ایجاد اثرات مفید در مصرف کننده می شود. یکی از مهم ترین گروه های پروبیوتیک، باکتری های اسیدلاکتیک هستند

که به طور معمول در مایه ی آغازگر محصولات لبنی استفاده می شوند. فعالیت پروبیوتیکی باکتری های اسیدلاکتیک وابسته به گونه و سویه بوده و به حضور میزان کافی باکتری در روده بستگی دارد. از خصوصیات عملکردی این میکروارگانیسم ها می توان به تعدیل سیستم ایمنی، کاهش کلاسترول سرمی، کاهش عفونت های گوارشی، کاهش احتمال ابتلا به سرطان، کاهش حساسیت های پوستی و غذایی در اطفال، کاهش عفونت های راجعه در مثانه، گوش و کاهش خطر ابتلا به اسهال های مزمن و مسافرتی اشاره کرد. گزارش های متعددی مبنی بر اثر حفاظتی باکتری های اسیدلاکتیک در برابر عوامل جهش زا مانند آمین های چند حلق های، ترکیبات N- نیترووزو و آفاتوکسین ها منتشر شده است. به نظر می رسد که استفاده از این دسته از باکتری های پروبیوتیک با توانایی حذف آفاتوکسین، می تواند علاوه بر خصوصیات مفید نامبرده به افزایش ایمنی غذا نیز کمک نماید (۱۱، ۱۳).

هدف از این پژوهش ارزیابی حذف آفاتوکسین M1 توسط سویه ی لاکتوباسیلوس کارژی جدا شده از ترخینه (TD2) با روش الیزا است. ترخینه ماده اولیه در تهیه یک سوپ سنتی در نواحی کوهستانی غرب ایران می باشد که متشکل از بلغور گندم است که در دوغ گوسفندی خیسانده و پس از طی دوره تخمیر، ادویه های مخصوص به آن افزوده می شود. در مطالعات قبلی دیگر خصوصیات پروبیوتیکی این سویه اعم از مقاومت به اسید معده و املاح صفراوی، توانایی اتصال به سلول های پوششی لوله گوارش، توانایی تولید ترکیبات ضد باکتریایی و همچنین کاهش کلاسترول در شرایط آزمایشگاه به اثبات رسیده است (۱۳، ۱۴، ۱۵).

## روش کار

### باکتری، محیط کشت و شرایط رشد

در این پژوهش از باکتری لاکتوباسیلوس کارژی سویه TD2، پروبیوتیک بومی ایران جدا شده از ترخینه استفاده شد. این باکتری توسط تاج آبادی و همکاران جداسازی و در کلکسیون میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی تهران مرکزی (۱۶) و نیز در موسسه ی واکسن و سرم سازی شعبه مرکزی - اراک در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  - و با ۲۵٪ گلیسرول نگه داری می شود. پس از کشت در محیط MRS broth، باکتری در انکوباتور  $\text{CO}_2$  دار در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرم خانه گذاری شد و سنتیک رشد باکتری تعیین گشت. برای این منظور محیط کشت با ۱٪ پیش کشت باکتری، تلقیح و گرماگذاری شد. در فواصل زمانی ۳ h نمونه برداری از محیط کشت صورت گرفت و جذب نوری با دستگاه اسپکتوفتومتر (JENWAY) ساخت کشور انگلستان در  $600 \text{ nm}$  تعیین گردید. در مرحله ی بعد پس از تعیین سریال رقت از نمونه گرفته شده، تعداد باکتری ها به روش کشت سطحی (Spread culture) تعیین شد.

## تهیه سوسپانسیون باکتریایی

برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی همانند قبل کشت باکتری در محیط MRS Broth صورت پذیرفت. پس از اتمام دوره تخمیر و رسیدن به جذب نوری تعیین شده در قبل، ۱۰ ml از محیط کشت حاوی  $cfu/ml$   $2 \times 10^9$  به لوله آزمایش استریل منتقل شد. لوله آزمایش در  $6000 \text{ rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب سلولی حاصله سه بار با محلول بافر فسفات شستشو داده شد. در نهایت رسوب باکتری در ۱ ml بافر فسفات سوسپانسیون گشت تا در تمامی آزمون های صورت گرفته تعداد یکسانی از باکتری به کار گرفته شود.

## تهیه محلول آفلاتوکسین M<sub>1</sub>

در این تحقیق آفلاتوکسین M<sub>1</sub> از شرکت سیگما با غلظت ۱۰۰ ppt (ng/ml) آماده شده با حلال MeCN/H<sub>2</sub>O به نسبت ۲۵:۷۵ تهیه گردید. به منظور تبخیر حلال استونیتریل، محلول در حمام آب گرم  $80^\circ C$  به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد و بافر فسفات به طور مستقیم به سوسپانسیون اضافه گردید تا به حجم اولیه برسد. محلول حاصله تا زمان استفاده در ظروف شیشه های تیره در دمای  $4^\circ C$  نگهداری شدند.

## تهیه محلول های آنزیمی مورد استفاده

آنزیم پروتئیناز K به صورت محلول از شرکت سیگما تهیه شد و به میزان ۵  $\mu l$  مورد استفاده قرار گرفت. این آنزیم برای فعالیت خود نیاز به دمای  $55^\circ C$  به مدت ۱ h می باشد. آنزیم لیزوزیم به صورت پودر از شرکت سیگما تهیه شد. سپس با بافر STET (Tris-HCl, PH ۸.۰, EDTA, NaCl, Triton X-۱۰۰) به صورت محلول در آمد. برای این منظور پس از افزودن پودر به بافر، محلول حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در  $37^\circ C$  گرماگذاری و در نهایت به مدت ۴۰ ثانیه در آب جوش قرار گرفت تا محلول به صورت فعال تهیه گردد.

## بررسی توانایی حذف آفلاتوکسین

به منظور بررسی توانایی حذف آفلاتوکسین از شیر ابتدا چندین نمونه شیر از مناطق مختلف استان مرکزی تهیه و مقدار اولیه آفلاتوکسین M<sub>1</sub> موجود در آن ها با کیت الایزا (Euro clone) تعیین گردید. از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده  $50 \mu l$  حاوی  $CFU/ml$   $2 \times 10^9$  به  $900 \mu l$  شیر حاوی  $50 \mu l$  سم آفلاتوکسین M<sub>1</sub> (با غلظت ۱۰۰ ppb)، اضافه گردید و در  $37^\circ C$  به مدت ۴ h گرماگذاری شد. پس از اتمام دوره گرماگذاری، سلول ها با استفاده از سانتریفیوژ  $8000 \text{ rpm}$  به مدت ۱۵ دقیقه جدا و میزان غلظت آفلاتوکسین در مایع رویی باقی مانده اندازه گیری گردید. در مرحله بعد با انجام تیمار های حرارتی (اتوکلاو)، اسیدی (اسید

کلریدریک)، آنزیمی (لیزوزیم و پروتاز) و فیزیکی (صوتی) میزان حذف آفلاتوکسین در همان شرایط قبل سنجیده شد. بدین ترتیب، با روش رنگ سنجی الایزا میزان حذف آفلاتوکسین پس از انجام تیمار ها محاسبه گردید.

## تیمار حرارتی

جهت انجام تیمار حرارتی، سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده، در دمای  $121^\circ C$  به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو و به میزان  $150 \mu l$  با تعداد CFU/ml  $2 \times 10^9$  به محلول شیر و سم افزوده شده. پس از اتمام دوره گرماگذاری میزان حذف آفلاتوکسین تعیین شد.

## تیمار اسیدی

برای تیمار اسیدی، سلول های باکتریایی در دمای  $37^\circ C$  در محلول اسید کلریدریک M ۲ به مدت ۹۰ min بر روی شیکر با دور  $100 \text{ rpm}$  گرماگذاری شدند. سپس همانند قبل توانایی حذف آفلاتوکسین بررسی شد.

## تیمار آنزیمی

برای تیمار با آنزیم لیزوزیم با توجه به دستورالعمل شرکت سیگما ۵ پودر آنزیم را در  $500 \mu l$  آب محلول کرده و  $250 \mu l$  محلول آنزیمی با بافر مخصوص آنزیم به نام STET (۳/۵ ml) به ۱ ml سوسپانسیون باکتری اضافه کرده و در شرایط  $37^\circ C$  درجه به مدت ۳۰ دقیقه نگه می داریم و در نهایت به مدت ۴۰ ثانیه در آب جوش قرار می دهیم و در نهایت سانتریفیوژ کرده و به میزان  $50 \mu l$  از باکتری را به محیط حاوی شیر و سم آفلاتوکسین اضافه می کنیم.

برای تیمار با آنزیم پروتئیناز K، از محلول آنزیمی به میزان  $5 \mu l$  در ۱ ml سوسپانسیون باکتریایی اضافه کرده و برای فعالیت آنزیم آن را به مدت ۱ h در دمای  $55^\circ C$  قرار می دهیم. سپس همانند مراحل قبل توانایی حذف آفلاتوکسین بررسی شد.

## تخریب دیواره با امواج مافوق صوت

به منظور تخریب دیواره از امواج فراصوت از دستگاه Ultrasound، ۱۰ بار و هر بار به مدت ۱۰ ثانیه با چرخش ۱/۶، دامنه شدت ۸۰ و صوت ۱/۶ استفاده شد.

## تعیین غلظت آفلاتوکسین با روش الایزا

برای تعیین غلظت آفلاتوکسین از کیت الایزا آفلاتوکسین M<sub>1</sub> (Euro clone) ساخت کشور ایتالیا با دامنه شناسایی ۵ تا ۱۰۰ ppt استفاده شد. کیت مذکور دارای چاهک های میکروتیتر پوشانده شده با آنتی بادی

نتایج نشان داد که سویه TD2 در شرایط فوق  $0.7568\% \pm 55.35$  آفلاتوکسین را از شیر حذف نموده است که این امر تایید کننده توانایی سویه مذکور در حذف این سم می باشد. همان طور که در نمودار و جدول فوق نشان داده شده کمترین درصد حذف سم مربوط به تیمار فیزیکی با امواج مافوق صوت ( $44.69 \pm 0.7370\%$ ) و تیمار آنزیمی با پروتیناز K ( $35.98 \pm 1.697\%$ ) می باشد. در حالی که بالاترین توانایی حذف سم در تیمار آنزیمی با لیزوزیم ( $60.03 \pm 0.5144\%$ ) و تیمار اسیدی با اسید کلریدریک ( $63.61 \pm 0.5886\%$ ) دیده می شود. میزان حذف سم در دو تیمار اخیر به صورت معنی داری بیشتر از نمونه باکتریایی تیمار نشده بود ( $Hydrochloric\ acid\ P\ value=0.0132$ ) و ( $Laysozyme\ P\ value=0.0132$ ) لازم به ذکر است که دو تیمار اسیدی و آنزیمی نیز اختلاف معنی داری ( $P\ value=0.0446$ ) با یکدیگر دارند و تیمار اسیدی بالاترین جذب را بین تیمار ها دارا می باشد.

در تیمار حرارتی با اتوکلاو درصد جذب برابر  $55.44 \pm 2.335\%$  بوده که در اختلاف معنی داری با حالت بدون تیمار نداشت. می توان نتیجه گرفت زنده بودن و یا مرگ سلول های TD2 تاثیری در توانایی حذف آفلاتوکسین M1 در شیر ندارد.

تیمار با امواج صوتی	تیمار با آنزیم پروتیناز K	تیمار با آنزیم لیزوزیم	تیمار با اسید کلریدریک	باکتری کشته شده با اتوکلاو	باکتری زنده
میزان آفلاتوکسین M1 پس از رقت سازی (دو سری 20 و 50) در شیر (ppt)					
56.65	63	40.92	37.38	42.68	45.9
55.16	66.42	39.88	36.19	47.4	44.27
میزان آفلاتوکسین M1 واقعی در شیر (ppt)					
2832.5	3150	2046	1869	2134	2295
2758	3321.5	1994	1809.5	2270	2218.5
میزان آفلاتوکسین M1 جذب شده به علاوه 54 ppt سم اولیه موجود در شیر					
2221.5	1904	3008	3185	2920	2759
2296	1722.5	3060	3244.5	2684	2825.5
درصد جذب آفلاتوکسین M1 در شرایط مختلف					
43.95528	37.67212	59.51721	63.01929	57.77602	54.59042
45.42926	34.27918	60.5461	64.19668	53.10645	56.10408

جدول 1- غلظت آفلاتوکسین در هر یک از نمونه ها و محاسبه درصد جذب این سویه در شرایط مختلف

#### بحث

قرن هاست که از تخمیر به عنوان یک روش نگهداری مواد غذایی استفاده می شود. مطالعات نشان داده است که باکتری های اسید لاکتیک موثر در فرآیند تخمیر، با تولید ترکیبات شبه باکتریوسینی و اسید های آلی سبب م هار رشد کپک ها و تولید آفلاتوکسین می شوند. همچنین اتصال سموم قارچی<sup>4</sup> به دیواره این باکتری ها موجب کاهش دسترسی این سموم می گردد. ترکیبات پروتئینی و کربوهیدراتی موجود در سطح

اختصاصی آفلاتوکسین M1 بود. اضافه کردن  $200\ \mu\text{l}$  آب مقطر در خانه اول،  $200\ \mu\text{l}$  از نمونه های استاندارد موجود در کیت به عنوان کنترل در خانه های بعدی با توجه به دستورالعمل کیت و نمونه حاوی آفلاتوکسین M1 به میزان  $200\ \mu\text{l}$  به خانه های ایزا اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در  $25\ ^\circ\text{C}$  در دمای اتاق قرار گرفت. پس از شستشو در مرحله بعد آنزیم کونژوگه به میزان  $200\ \mu\text{l}$  به چاهک ها افزوده گشت و 15 دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. پس از شستشوی مجدد سوبسترای آنزیم کروموزن به میزان  $200\ \mu\text{l}$  در تاریکی به مدت 10 دقیقه به چاهک ها اضافه شد. به منظور اتمام واکنش و توقف فعالیت آنزیم،  $50\ \mu\text{l}$  محلول متوقف کننده به چاهک ها افزوده گشت و تغییر رنگ آبی به زرد که متناسب با غلظت سم بود در طول موج  $450\ \text{nm}$  ارزیابی و تعیین گردید. غلظت های 0، 5، 10، 25، 50 و 100 ppt آفلاتوکسین M1 بر اساس دستورالعمل کیت به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

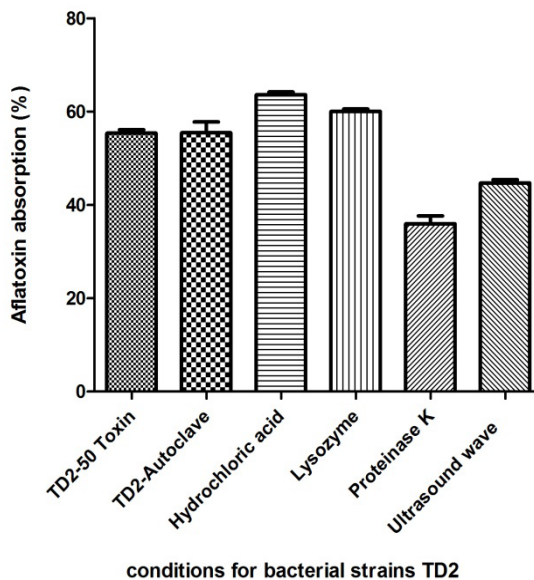
## تجزیه و تحلیل آماری

تحلیل آماری داده های حاصل از دو بار تکرار آزمون ها، با استفاده از نرم افزار RIDAWIN Version 1.78 (ارائه شده توسط شرکت Euro clone) و نرم افزار Prism 5 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

## یافته ها

در این تحقیق به منظور تعیین شرایط موثر در حذف آفلاتوکسین M1 از شیر، تیمار های مختلفی بر روی سویه TD2 صورت گرفت که نتایج حاصله در جدول 1 و نمودار 1 آورده شده است.

نمودار 1- مقایسه درصد جذب آفلاتوکسین توسط سویه TD2 در شرایط مختلف



باکتری در اتصال به آفلاتوکسین اهمیت دارند و تیمار گرمایی نمی تواند درصد اتصال را کاهش دهد (۴،۱۳،۱۴،۱۵،۱۶).

نتایج ارائه شده از سایر تحقیقات نشان می دهد که پلی ساکراید ها و پپتیدوگلیکان دیواره سلولی، دو عنصر اصلی سلول هستند که توانایی اتصال به سم را دارند. حرارت باعث واسرشت شدن پروتئین های دیواره سلولی می گردد و مواد اسیدی نیز می توانند پیوند های قندی را در پلی ساکراید ها شکسته و به آزاد شدن منومر ها منجر شوند (۹). با تیمار اسیدی احتمال می رود که شکل ساختاری از حالت یک پارچگی خارج شده، بنابراین اجازه اتصال آفلاتوکسین به ترکیبات درون سلولی داده شود (۹،۱۸).

نتایج حاصله از این تحقیق نیز نشان داد که اتصال آفلاتوکسین به باکتری فرآیند سریعی است و تیمار حرارتی با اتوکلاو باعث کاهش توانایی اتصال سویه TD۲ نمی گردد. به عبارت دیگر استفاده از حرارت و تغییرات ساختاری ناشی از آن در توانایی حذف آفلاتوکسین M۱ از سیر توسط سویه TD۲ بدون تاثیر است. تیمار اسیدی با اسید کلریدریک M ۲، قدرت اتصال آفلاتوکسین نسبت به شرایط دیگر را به حدود ۶۴٪ رساند که اختلاف معنی دار با باکتری بدون تیمار از خود نشان داد.

اتصال باکتری ها به آفلاتوکسین و حذف آن غالباً توسط ترکیبات پروتئینی و کربوهیدراتی صورت می گیرد. از این رو این اتصال می تواند به شدن تحت تاثیر آنزیم هایی همانند پروناز E، لیپاز، M-periodate و ... قرار گیرد. به عنوان مثال در تحقیق نشان داده شده که آنزیم Periodate باعث اکسیداسیون گروه های هیدروکسیل به آلدئید و گروه های کربن -اسید شده و بیشترین کاهش در اتصال به آفلاتوکسین B۱ را در پی داشته است که در واقع نشان می دهد که غالب اتصالات با ترکیبات کربوهیدراتی باکتری ها صورت می گیرد. البته در استفاده از آنزیم ها آزادسازی آفلاتوکسین متصل شده به باکتری به طور کامل کاهش نمی یابد که در واقع نشان دهنده درگیری ترکیبات دیگر است. در تحقیق دیگر با استفاده از آنزیم لیپاز مشخص شد که ترکیبات لیپیدی در توانایی اتصال باکتری به آفلاتوکسین موثر نمی باشند (۵،۱۰،۱۸).

در تحقیقات نشان داده شده است که پلی ساکراید ها، پپتیدوگلیکان و کربوهیدرات ها عناصر اصلی سلول در اتصال به سم آفلاتوکسین هستند (۲،۶،۱۰) پروتئین ها به لحاظ توانایی اتصال به سم در درجه اهمیت کمتری و نیز لیپید ها توانایی اتصال به آفلاتوکسین را ندارند (۵،۱۰). پس با تخریب دیواره و آشکار شدن پپتیدوگلیکان و کربوهیدرات ها جذب سم افزایش می یابد.

لیزوزیم (مورامیداز)، واکنش هیدرولیز پیوند  $\beta$ -(۱-۴) را بین N-استیل مورامیک اسید و N-استیل گلوکز آمینو در ساختار پپتیدوگلیکان کاتالیز می کند (۳،۷). در واقع این آنزیم باعث آزاد شدن کربوهیدرات ها و جذب

بالاتر می شود. نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که آنزیم پروتئیناز K تن ها روی ساختار پروتئین ها اثر گذاشته و باعث هضم پروتئین ها شده و توانایی تخریب قند های دیواره را ندارد. از این رو افزایش حذف آفلاتوکسین را نخواهد داشت.

باکتری ها را می توان با امواج فرکانس کشته و متلاشی کرد. حساسیت گونه های مختلف باکتری نسبت به امواج صوتی متفاوت است. احتمالاً به دلیل تخریب بسیار ساختار باکتری به خصوص پپتیدوگلیکان و در دسترس نبودن برای آفلاتوکسین و تخریب سایر اجزاء باکتری، در تیمار با امواج فراصوت نیز جذب کمتری مشاهده می شود.

## نتیجه گیری

در این بررسی نتایج بین سلول زنده و غیر زنده نشان داد که در توانایی اتصال به آفلاتوکسین، زندهمانی میکروارگانیسم چندان مؤثر نبوده و تیمار آنزیمی (لیزوزیم) و تیمار اسیدی (اسید کلریدریک) با بیشترین میزان جذب آفلاتوکسین M۱، به عنوان شرایط اید هال برای حذف آفلاتوکسین معرفی شدند. آسیب دیدگی و یا ایجاد تخریب در دیواره سلولی باکتری می تواند باعث آشکار شدن مکان های اتصال غیر قابل دسترس شده و قدرت جذب را بالا می برد. در بین این تیمار ها تیمار اسیدی بالاترین جذب را داشته که این می تواند به خاطر آشکار شدن مکان هایی در داخل سلول باکتری باشد.

همان طور که در قبل ذکر شد لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD۲ جدا شده از ترخینه دارای خصوصیات پروبیوتیک به اثبات رسیده می باشد. استفاده از این سویه در مواد غذایی مختلف به عنوان یک پروبیوتیک بومی ایران، می تواند علاوه بر خصوصیات مفید یک پروبیوتیک و ارتقای سلامت مصرف

کننده به حذف آفلاتوکسین M۱ از محصولات لبنی نیز کمک نماید.

## سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت موسسه واکنس و سرم سازی رازی شعبه مرکزی -اراک انجام شد. هاستوبدینوسیل هازمسئولینو کارشناسان این موسسه تقدیر و تشکر می شود.

1. EEC, Regulation No. 1525/98/EC of 16 July 1998 laying down regulation, the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities, 1998. 201: p. 43-46.
2. Farzaneh, M., et al., Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. Food Control, 2012. 23(1): p. 100-106.
3. Fox, P. and L. Stepaniak, Enzymes in cheese technology. International Dairy Journal, 1993. 3(4): p. 509-530.
4. Gratz, S., et al., *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. Applied and environmental microbiology, 2007. 73(12): p. 3958-3964.
5. Haskard, C.A., et al., Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. Applied and environmental microbiology, 2001. 67(7): p. 3086-3091.
6. Hathout, A.S., et al., Ability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri* to protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet. Toxicon, 2011. 58(2): p. 179-186.
7. Iucci, L., et al., Effects of high pressure homogenization on the activity of lysozyme and lactoferrin against *Listeria monocytogenes*. Food Control, 2007. 18(5): p. 558-565
8. Ochratoxin, A., IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic . Aromatic Amines and Mycotoxins, 1993. 56
9. Peltonen, K., et al., Aflatoxin B<sub>1</sub> Binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Journal of dairy science, 2001. 84(10): p. 2152-2156.
10. Salminen, S. and A. Von Wright, Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 2011: CRC Press.
11. Schrezenmeir, J. and M. de Vrese, Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. The American journal of clinical nutrition, 2001. 73(2): p. 361s-364s.
12. Strosnider, H., et al., Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. Environmental health perspectives, 2006. 114(12): p. 1898
13. TAJABADI EBRAHIMI, M., et al., EVALUATION OF AFLATOXIN B1 REDUCTION IN PRESENT OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM TARKHINEH AND FERMENTED MILK OF TARKHINEH BY ELISA. JOURNAL OF MICROBIAL BIOTECHNOLOGY, 2011.
14. TAJAABADY, E.M., H. BAHRAMI, and Z. ZIYARY, TARKHINEH SOURCE OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA. THE QUARTERLY JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES, 2011.
15. Tajabady Ebrahimi, M., et al., Evaluation adhesion ability of lactobacilli isolated from traditional fermented dairy products to caco 2 cell line by culture and gram staining methods. THE QUARTERLY JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES, 2010.
16. TAJABADI EBRAHIMI, M., M. HEJAZI, and R. GHAFARI, Antagonistic ability of acid and bile tolerance *Lactobacillus* were isolated from dairy products. ARAK MEDICAL UNIVERSITY JOURNAL (AMUJ), 2009.
17. Turner, P.C., et al., Detectable levels of serum aflatoxin B1-albumin adducts in the United Kingdom population: implications for aflatoxin-B1 exposure in the United Kingdom. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 1998. 7(5): p. 441-447.
18. Rahaie, S., et al., Evaluation of aflatoxin decontaminating by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pistachio nuts. International Journal of Food Science & Technology, 2012.
19. Wild, C. and P. Turner, The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. Mutagenesis, 2002. 17(6): p. 471-481.
20. Williams, J.H., et al., Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. The American journal of clinical nutrition, 2004. 80(5): p. 1106-1122

