Archi

ORIGINAL ARTICLE

Direct Mutagenic Effects in Some Artificial Food Flavors Using Ames Test

Vahid Moradi Mohem[1],
Fakhri Haghi[2],
Mehran Mohseni[3]

[1] MSc in Food Safety and Hygiene, School of Paramedical and Health, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[2] Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[3] Associate Professor, Department of Food and Drug Control, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

(Received December 26, 2018 ; Accepted July 17, 2019)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

Abstract

Background and purpose: Nowadays, food flavorings are widely used in Iran in different food and beverage items without considering their potential threats. This research aimed at investigating directed mutagenesis caused by flavorings using the Ames Test.

Materials and methods: Direct mutagenesis of five artificial food flavorings (vanilla, banana, orange, coconut, and lemon), from three different brands, was investigated using *salmonella typhimurium* microbial strains TA98 and TA100, all of which carrying selective mutation in histidine operon in form of (His^-). After confirmatory tests of the strains, they were cultured on glucose minimal agar in presence of different concentrations of the flavors. After 48-72 hours of incubation at 37°C, in case of flavor mutagenicity and reverse mutation in the histidine operon, the colonies observed were counted.

Results: Direct mutagenesis of the flavors was investigated in three consecutive runs of three different concentrations. According to the results, the number of colony count in each concentration did not exceed twice the number of negative control colony count, which was the mutagenic criterion in this test.

Conclusion: According to the results, no sign of direct mutation in form of base-pair substitution or Frame Shift mutation was observed among the specimens' DNA in different concentrations of flavorings.

Keywords: direct mutation, flavors, Ames test, TA98, TA100

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (177): 56-68 (Persian).

* **Corresponding Author: Mehran Mohseni -** School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
(E-mail: mohsenim@zums.ac.ir)

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره ۱۷۷ مهر سال ۱۳۹۸ (۶۸-۵۶)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

ارزیابی وجود جهش زایی مستقیم در چند طعم دهنده خوراکی مصنوعی مواد غذایی با استفاده از آزمون Ames

وحید مرادی مهم[۱]
فخری حقی[۲]
مهران محسنی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: امروزه به طور گسترده از طعم‌دهنده‌های خوراکی در مواد غذایی مختلف مثل نوشیدنی‌ها، تنقلات و غیره در ایران استفاده می‌شود بدون این که به زیان‌های احتمالی حاصل از آن‌ها توجه گردد. این مطالعه با هدف بررسی جهش زایی مستقیم طعم دهنده‌ها به کمک تست ایمز انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، جهش زایی مستقیم ۵ طعم دهنده مصنوعی عمده (وانیل، موز، پرتغال، نارگیل و لیمو) از سه برند معروف، توسط سویه‌های *سالمونلا تیفی موریوم* TA98 و TA100 که حامل جهش انتخابی در اپرون هیستیدین به صورت His^- هستند مورد مطالعه قرار گرفت. پس از انجام تست‌های تأییدی، سویه‌ها بر روی محیط کشت گلوکز حداقل و در حضور غلظت‌های مختلفی از طعم دهنده ها کشت گردید و پس از ۷۲-۴۸ ساعت انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در صورت جهش‌زایی طعم دهنده‌ها و جهش برگشتی در اپرون هیستیدین، کلنی‌های میکروبی مشاهده شده شمارش گردید.

یافته‌ها: جهش‌زایی مستقیم طعم دهنده‌ها، در سه غلظت متفاوت و طی سه بار تکرار، بررسی شد. نتایج نشان داد که تعداد کلنی‌های برگشتی در هیچ کدام از نمونه‌ها در سه غلظت مورد بررسی از دو برابر تعداد کلنی‌های کنترل منفی که ملاک جهش‌زایی در این آزمون است، فراتر نرفت.

استنتاج: بر اساس نتایج، هیچ کدام از نمونه‌ها در غلظت‌های مورد بررسی، جهش‌زایی مستقیم مبتنی بر جایگزینی جفت باز های آلی در DNA و یا جهش مبتنی بر تغییر چارچوب نشان ندادند.

واژه های کلیدی: جهش زایی مستقیم، طعم دهنده ها، تست ایمز، TA98،TA100

مقدمه

احساس طعم شامل دو جنبه فیزیکی و شیمیایی است. از لحاظ حس فیزیکی، می‌توان به ویژگی‌هایی مانند ظاهر، بافت و یکنواختی اشاره نمود و از جنبه شیمیایی ویژگی هایی نظیر طعم و بو حائز اهمیت هستند. طعم دهنده‌ها در سیستم های غذایی نقش‌های مهمی را ایفا می‌کنند که مهم‌ترین آن، افزایش احساس لذت و رضایت از غذا است. عطر و طعم، ارزش تغذیه‌ای، احساس دهانی و کیفیت ظاهری غذا، چهار

مولف مسئول: مهران محسنی: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده داروسازی ، گروه کنترل غذا و دارو E-mail: mohsenim@zums.ac.ir
۱. کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۲. دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۳. دانشیار، گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۷/۹/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۷/۹/۱۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۸/۴/۲۶

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

ویژگی مهم در مقبولیت یک ماده غذایی محسوب می‌گردد. طعم‌دهنده‌ها به دو دسته اصلی، طبیعی و مصنوعی تقسیم می‌شوند. طعم دهنده های طبیعی شامل اسانس‌ها، ادویه جات، میوه‌ها، آب میوه‌ها و عصاره‌های حیوانی و گیاهی است و طعم‌دهنده‌های مصنوعی شامل ترکیبات آلیفاتیک، آروماتیک و ترپن‌ها می‌باشد. با این حال به دلایل مختلفی تعیین مکانیزم دقیق درک انسان از طعم با مشکلاتی همراه بوده که برای درک آن طیف وسیعی از تحریکات عصبی درگیر هستند و ترکیبات شیمیایی و ساختارهای غذایی فعال‌کننده حسگرهای طعم، در پی مصرف غذا دچار تغییر می‌شوند و در نهایت عوامل یاد شده در مسیرهای پیچیده‌ای با یکدیگر در تداخل هستند(۱). مواد طعم‌دهنده موادی هستند که برای ایجاد طعم به مواد غذایی اضافه می‌شوند و فقط موادی که منحصراً مزه شیرین، ترش یا شور دارند (مانند شکر، سرکه یا نمک) را در برنمی‌گیرد(۲). این ترکیبات دارای ماهیت شیمیایی هستند و بوسیله فرایندهای شیمیایی یا از موادی با منشا گیاهی یا حیوانی حاصل می‌شوند(۳). مواد طعم دهنده مصنوعی گروهی از مواد افزودنی هستند که در ترکیبات طبیعی یافت نمی‌شوند و دارای تفاوت‌هایی با مواد طعم‌دهنده طبیعی بوده، و گروه‌های شیمیایی تشکیل‌دهنده آن‌ها شامل اجزای زیادی هستند که آن اجزا در ترکیبات غذا وجود دارد(۴). مصرف مواد طعم‌دهنده از کشوری به کشور دیگر و ناحیه‌ای به ناحیه دیگر متفاوت است. تولید و عرضه این مواد در هر کشور مطابق با عادات غذایی مردم آن کشور تغییر می‌کند. در سال ۲۰۰۹، نوشیدنی‌ها با مصرف حدود ۶۱ درصد از مواد طعم‌دهنده بالاترین درصد بهره‌گیری از آن‌ها را به خود اختصاص دادند. نوشیدنی‌هایی با طعم میوه با مصرف ۷۵ درصد از سال ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۴ بیش‌ترین محبوبیت را در میان انواع نوشیدنی‌های طعم‌دار دارا بوده‌اند(۵). این مواد برای اصلاح یا ایجاد طعم در غذا استفاده می‌شوند و نباید در مواد غذایی به گونه‌ای استفاده شوند که سبب دریافت آن ها در مقادیر غیر ایمن شود(۳). بیش از ۲۵۰۰ طعم دهنده در غذاها استفاده می‌شود، که در مورد سمیت سلولی آن‌ها اطلاعاتی در دست نیست اما در مورد سمیت گروه‌های ساختاری آن‌ها اطلاعات زیادی وجود دارد، با این وجود در مورد خاصیت جهش زایی و متعاقب آن سرطان زایی آن‌ها اطلاعاتی وجود ندارد(۶). مواد جهش زا به دو دسته تقسیم می‌شوند بسیاری از آن‌ها می‌توانند خودشان مستقیماً جهش زا باشند که مواد جهش‌زای مستقیم محسوب می‌شوند و دسته دوم موادی هستند که خود جهش‌زا نیستند بلکه متابولیت‌های آن‌ها در بدن جهش زا است و قبل از نشان دادن جهش‌زایی باید در بدن فعال شوند. این فرایند اغلب با متابولیسم مواد در کبد رخ می‌دهد، که مواد با جهش‌زایی غیر مستقیم نامیده می‌شوند(۶). در قرن حاضر یکی از علل مرگ و میر در جوامع صنعتی و پیشرفته سرطان است. سرطان‌زاها در واقع مواد شیمیایی، فیزیکی و زیستی هستند که موجب بروز انواع سرطان می‌شوند، از این نظر شناخت آن‌ها از جنبه بهداشت همگانی اهمیت زیادی دارد(۷). اکثر سرطان ها غیر قابل علاج بوده و کاهش طول عمر را به دنبال دارند. عوامل متعددی در ایجاد آن‌ها نقش دارند، از جمله می‌توان به عوامل شیمیایی، وراثتی، پرتوها و رادیکال‌های آزاد اشاره نمود(۸). این امر امروزه آنقدر اهمیت یافته است که بنا به اعلام کمیته مشترک FDA/WHO یکی از مهم‌ترین تست‌های تأییدی برای افزودنی‌ها، بررسی جهش‌زایی (موتاژنز) این فرآورده‌ها است که انجام بقیه مطالعات به نتیجه آن بستگی دارد(۹). امروزه به کمک میکرو ارگانیسم‌های گوناگون می‌توان به جهش زایی و مکانیسم آن توسط ترکیبات گوناگون پی برد(۷). در گذشته از موش‌های صحرایی برای بررسی مواد سرطان زا استفاده می‌شد که طولانی و پرخرج بوده است، ولی در سال‌های اخیر برای حل این مشکل از باکتری‌ها استفاده می‌گردد. یکی از مهم‌ترین تست‌هایی که از باکتری در بررسی مواد سرطان زا استفاده می‌کند، تست ایمز است که توسط پروفسور Ames در دانشگاه کالیفرنیا ابداع شد. در این تست از سویه‌های سالمونلایی که در اثر جهش قدرت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

سنتز هیستیدین را از دست داده اند استفاده می گردد. مواد جهش زا قادرند در محیط‌های محدود از نظر هیستیدین موجب بروز موتاسیون برگشتی شده و این سوش‌ها قادر به سنتز هیستیدین خواهند شد(۱۰). از آن‌جا که جهش‌زایی مکانیسم‌های مختلفی دارد، پروفسور ایمز و همکاران با ایجاد انواعی از این تغییرات ژنتیکی به صورت انتخابی در باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* موفق به ایجاد سویه‌های متفاوت از این باکتری شدند. به عنوان مثال سویه TA98 برای بررسی جهش‌زایی‌های مبتنی بر Frame Shift (تغییر چارچوب) در DNA طراحی شده است در حالی که سویه TA100 قادر به شناسایی جهش‌های جایگزینی جفت بازهای آلی در DNA است(۱۱). تحقیقات پروفسور ایمز و همکاران نشان داد که ۸۳ درصد ازترکیباتی‌که توسط این تست جهش‌زا ارزیابی شده‌اند، سرطان‌زای بالقوه هستند(۷). مصرف روزافزون طعم‌دهنده‌های مصنوعی و بی‌توجهی نسبت به عوارض ناشی از مصرف بی‌رویه آن‌ها در انواع مواد غذایی سبب شد تا مطالعه حاضر با هدف بررسی جهش‌زایی مستقیم طعم دهنده‌های مصنوعی پرمصرف (وانیل، موز، پرتغال، نارگیل، لیمو در سه برند مختلف) بر روی سوش‌های *سالمونلا تیفی موریوم* (Ames Test) انجام گیرد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، برای تهیه نمونه و غلظت‌های مورد آزمایش، طعم دهنده‌های مصنوعی مورد استفاده در مواد غذایی شامل وانیل، موز، پرتغال، نارگیل و لیمو، از سه شرکت عمده تولیدکننده عطر و طعم در ایران و از هر کدام یک نمونه و در مجموع ۱۵ نمونه تهیه گردید و در نهایت ۳ غلظت مختلف از هر نمونه، ۳ بار توسط هر یک از سویه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه به جهت ملاحظات اخلاقی از حروف A، B و C به جای نام شرکت‌های سازنده این طعم‌ها استفاده گردید. میزان مجاز استفاده روزانه از هر یک از طعم‌دهنده‌ها در مواد غذایی بر حسب وزن بدن هر فرد، توسط شرکت‌های تولید کننده مشخص شده است و در هیچ مورد بیش از ۲۰ µg/10ml آب مقطر نبوده است که ملاک غلظت اولیه مورد استفاده در این مطالعه برای هر یک از نمونه‌ها قرار گرفت و بر این اساس دو غلظت دیگر یعنی دو برابر و نصف غلظت اولیه انتخاب شد. بر این مبنا از تمام نمونه‌های مورد بررسی غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ µg/10ml آب مقطر تهیه گردید. محیط‌های کشت مورد استفاده شامل نوترینت آگار، آگار، نوترینت براث و مولر هینتون آگار از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. مواد شیمیایی، پودر بیوتین و ۴-نیتروکینولین n- اکساید (4NQO) از شرکت سیگما و سدیم آزاید، کریستال ویوله، سدیم آمونیوم سولفات، دی پتاسیم سولفات، اسید سیتریک، منیزیم سولفات و گلوکز از شرکت مرک آلمان تهیه گردید و دیسک‌های امپی‌سیلین با غلظت ۱۰ میکروگرم بر دیسک از شرکت پادتن طب ایران تهیه شد. سویه‌های باکتریایی *سالمونلا تیفی موریوم* TA98 و TA100 از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

آزمون‌های تأیید ژنوتیپ سویه‌های سالمونلا تیفی موریوم TA98 و TA100: جهت تایید سویه‌ها از هر کدام کشت تازه شبانه در محیط براث تهیه و آزمون‌های جهش rfa (تست حساسیت به کریستال ویوله)، جهش uvrB و تست مقاومت به آمپی‌سیلین (R-factor) انجام گرفت.

جهش rfa (تست حساسیت به کریستال ویوله): سویه‌ها مورد استفاده از نظر حساسیت به کریستال ویوله مورد آزمایش قرار گرفت. یک دیسک کاغذی استریل آغشته به کریستال ویوله با غلظت ۱mg/ml (۰/۱ درصد) در سطح پلیت های جداگانه کشت شده با هر یک از سویه‌های *سالمونلا تیفی موریوم* (TA100 و TA98) قرار داده شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله مهار رشد اندازه گیری شد. بر خلاف سویه‌های وحشی، کریستال ویوله قادر است به درون باکتری‌های مورد آزمایش نفوذ کند و رشد آن‌ها را مهار سازد. قطر هاله مهار رشد باید حدود ۱۴میلی‌متر باشد(۱۱،۱۰).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

جهش uvrB حساسیت به اشعه UV در سوش‌های TA100 و TA98 و وجود جهش uvrB در سویه‌ها بررسی شد. در منطقه‌ای از پلیت حاوی کشت‌های هر یک از سویه‌ها که در معرض اشعه UV قرار گرفته بودند، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، هیچ کلنی‌ای نباید رشد کند. به دلیل آن که این جهش حذفی به ناحیه‌ی Bio-uvrB هم‌گسترش می‌یابد و به‌حالت وحشی قابل برگشت نیست، وابستگی رشدی سویه‌ها به حضور بیوتین در محیط کشت نیز باید آزمایش شود و نقص در مسیر ترمیم DNA در اثر حذف uvrB تأیید گردد(۱۱).

تست مقاومت به آمپی‌سیلین (R-factor): سویه‌های TA100 و TA98 نسبت به آمپی‌سیلین مقاوم هستند و برای وجود فاکتور مقاومت به آمپی‌سیلین مورد بررسی قرار گرفتند. این تست برای کسب اطلاع از وجود پلاسمید نواحی خاص DNA یعنی پلاسمید Pkm101 است که برای افزایش حساسیت به مواد جهش‌زا، همانندسازی و حساسیت به UV، ضروری می‌باشد(۱۱،۱۰). به منظور بررسی وجود این فاکتور، در سطح پلیت‌های مجزای کشت شده از *سالمونلا تیفی موریوم* TA98 و TA100 دیسک‌های آغشته به آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰ میکروگرم در دیسک را قرار می‌دهیم. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نباید هیچ هاله‌ای در اطراف آن‌ها مشاهده گردد زیرا عدم وجود هاله دلالت بر مقاومت سویه‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک امپی‌سیلین دارد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) طعم‌دهنده‌های مورد مطالعه روی سویه‌های TA98 و TA100: پیش از انجام تست ایمز، اثر کشندگی طعم دهنده‌های مورد بررسی بر روی سویه‌های مورد استفاده، انجام گرفت. برای این کار از پلیت‌های ۹۶ خانه استفاده شد(۱۲). برای تامین غلظت مناسبی از سویه‌ها در محیط کشت نوترینت آگار، ابتدا کشت شبانه‌ای از هر دو سویه تهیه شد و پس از ۱۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تراکم هر یک از آن‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. وجود میزان جذبی بین ۰/۱ تا ۰/۲ می‌توان بیانگر حضور 10^8 cfu/ml از باکتری باشد. جهت کنترل غلظت باکتری و میزان جذب در مواردی که مقدار جذب خوانده شده بیش از ۰/۲ باشد از محیط کشت استریل نوترینت براث استفاده شده است. سپس ۸ چاهک از هر پلیت برای هر طعم دهنده مورد بررسی در هر یک از پلیت‌های تلقیح شده با هر یک از سویه‌ها انتخاب شد و به دلیل اهمیت اثر کشندگی غلظت‌های مختلف طعم دهنده‌های مورد بررسی بر سویه ها، به ترتیب از غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ (میکرولیتر بر ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) در ۶ چاهک مجزا استفاده شد و دو چاهک نیز یکی جهت کنترل منفی و دیگری کنترل مثبت در نظر گرفته شد. ابتدا در داخل کلیه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت نوترینت براث استریل ریخته شد و برای تامین رقت‌های مناسب از هر یک از نمونه‌ها به صورت متوالی، به اولین چاهک موجود در هر یک از پلیت‌های تلقیح شده با سویه‌های مجزا، ۱۰۰ میکرو لیتر از غلظت ۸۰ میکرولیتر بر ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر از یکی از طعم‌دهنده‌های مورد بررسی ریخته شد. سپس از همین چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر برداشته و به چاهک بعدی افزوده شد و به همین ترتیب تا چاهک ششم این عمل تکرار گردید. در نهایت از چاهک ششم ۱۰۰ میکرو لیتر برداشته و بیرون ریخته شد. به چاهک هفتم در هر یک از پلیت‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت نوترینت براث حاوی سویه‌های مورد استفاده (به طور مجزا) به عنوان کنترل مثبت و به چاهک هشتم نیز ۱۰۰ میکرو لیتر محیط نوترینت براث استریل به عنوان کنترل منفی ریخته شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد سویه‌ها در چاهک‌های حاوی غلظت‌های مختلف از طعم دهنده‌ها و کنترل مثبت، دلالت بر عدم اثر کشندگی آن غلظت‌ها بر سویه‌های *سالمونلا تیفی موریوم* مورد استفاده، دارد. برای اطمینان از صحت نتیجه، این تست سه بار تکرار گردید.

آزمون جهش‌زایی طعم‌دهنده‌ها به روش مستقیم با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم سویه‌های TA98 و TA100: ابتدا نمونه‌های مورد آزمایش را با ۱۰ درصد

www.SID.ir

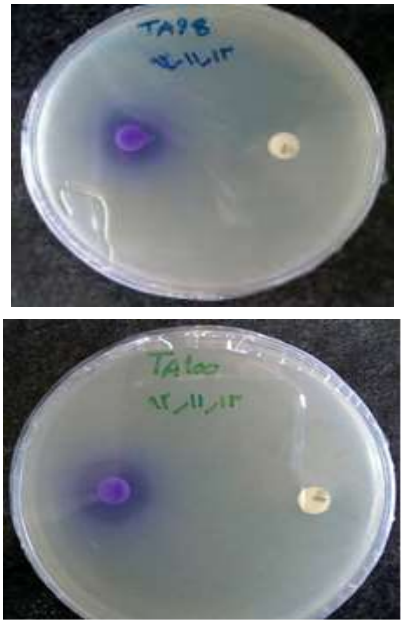
Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

توویین ۸۰ به صورت محلول در آورده و سپس در مرحله اول به لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر تاپ آگار تهیه شده که حاوی محلول هیستیدین- بیوتین به نسبت ۰/۱ می‌باشد ۵۰ میکرولیتر از نمونه مورد آزمایش و ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه شبانه *سالمونلا تیفی موریوم* TA98 و TA100 (در لوله‌های آزمایش مجزا) اضافه شد و در نهایت محتویات این لوله پس از ۳ ثانیه تکان در شیکر، به‌طور یکنواخت در سطح محیط آگار حداقل پخش گردید و بعد از سفت شدن آگار به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در ۳۷°C قرار گرفت. برای هر سه غلظت مختلف از نمونه مورد آزمایش به طور جداگانه ۳ پلیت در نظر گرفته شد وکنترل مثبت و منفی نیز درآزمون لحاظ گردید. کنترل منفی حاوی باکتری و توویین ۸۰ بوده، و حضور آن برای هر سوش آزمایشی ضروری است، که نشانگر تشکیل کلنی توسط باکتری در حالت نرمال و بدون حضور نمونه مورد آزمایش است. کنترل مثبت که برای TA100 سدیم آزاید و برای TA98 ۴- نیتروکینولین‌n- اکساید است که یک ماده با جهش‌زایی و سرطان زایی اثبات شده می‌باشد و برای اثبات این که باکتری خاصیت جهش‌زایی را دارد یا ندارد مورد استفاده قرار گرفت. برای هر سویه پس از ۷۲-۴۸ ساعت انکوباسیون، کلنی‌های برگشت یافته در پلیت‌های مورد آزمایش و کلنی‌های برگشتی درکنترل‌ها شمارش شدند. این‌که در غلظتی خاص میزان کلنی‌های برگشتی در نمونه به دو برابر یا بیش‌تر نسبت به تعداد کلنی‌های برگشتی در کنترل منفی برسد، بیانگر جهش‌زا بودن ماده مورد مطالعه است(۱۳). پس از اتمام انکوباسیون سویه‌ها، تعداد کلنی‌های برگشت یافته در پلیت‌های هر یک از غلظت‌های مختلف طعم دهنده‌ها و تعداد کلنی‌های برگشتی در کنترل منفی شمارش گردید و نسبت جهش برگشتی (MR) محاسبه و ملاک ارزیابی جهش‌زایی قرار گرفت. اگر متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های حاوی غلظت‌های مختلف طعم‌دهنده‌ها و هر سویه، مساوی و یا بیش از ۲ برابر میانگین تعداد کلنی‌ها در ۳ پلیت کنترل منفی باشد (MR بزرگ‌تر و یا مساوی ۲)، دلیل بر جهش‌زا بودن آن طعم‌دهنده در آن غلظت خواهد بود. برای محاسبه میانگین و انحراف‌معیار در نتایج از SPSS استفاده شد.

یافته ها

نتایج حاصل از بررسی ژنوتیپ سویه‌های سالمونلایی TA100 و TA98 در تست حساسیت به کریستال ویوله: همان‌گونه که در تصویر شماره ۱ مشهود است، هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های حاوی کریستال ویوله در هر دو سویه مشاهده شد و قطر هاله عدم رشد حدود ۱۴ میلی‌متر بود و سویه‌ها از لحاظ حساسیت به کریستال ویوله تایید شدند.



تصویر شماره ۱: عدم وجود هاله عدم رشد در اطراف دیسک امپی سیلین در دو پلیت حاوی سویه های TA100، TA98 دلالت بر مقاومت سویه ها در مقابل آنتی بیوتیک امپی سیلین دارد در حالی که وجود هاله عدم رشد در اطراف دیسک حاوی کریستال ویوله دلالت بر حساسیت هر دو سویه به کریستال ویوله دارد. این دو تست در مجموع صحت دو سویه را تایید می نماید

نتایج تست حساسیت به اشعه UV: عدم وجود رشد هر یک از سویه‌ها در قسمت اشعه دیده توسط اشعه UV دلالت بر نقص در ترمیم DNA و وجود حساسیت به اشعه UV در هر یک از سویه‌ها داشته است در حالی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

که در هر دو سویه در ناحیه‌ای از پلیت که اشعه ندیده بود رشد سویه‌ها قابل توجه بود. نتایج تست مقاومت به آمپی‌سیلین: همان گونه که در تصویر شماره ۱ مشاهده می‌شود، رشد کلنی‌های هر دوسویه در اطراف دیسک‌های حاوی آمپی‌سیلین در پلیت‌های مجزا، حضور فاکتور R جهت ایجاد مقاومت به آمپی‌سیلین (حضور پلاسمید Pkm101) را اثبات می‌کند که باعث افزایش حساسیت به اشعه UV و ماده جهش‌زا نیز می‌شود.

نتایج تست MIC: این تست براساس غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرو لیتر بر ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر از طعم دهنده‌های مورد بررسی انجام شد و همان گونه که درتصویر شماره ۲ مشاهده می‌گردد، در هیچ یک از این غلظت‌ها هیچ فعالیت ضدمیکروبی و بازدارندگی در رشد سویه‌های *سالمونلا تیفی موریوم* TA98 و TA100 مشاهده نشد و استفاده از غلظت‌هایی از طعم‌دهنده‌های مورد مطالعه در این دامنه غلظتی جهت تست جهش‌زایی مورد تایید قرار گرفت. کدورت در تمام چاهک ها به‌جز در چاهک‌های مربوط به کنترل منفی که نباید هیچ گونه رشدی در آن‌ها دیده می شد مشهود است.

آزمون جهش‌زایی مستقیم طعم‌دهنده‌های خوراکی مصنوعی به روش Ames: نتایج بررسی جهش‌زایی مستقیم طعم‌دهنده‌های وانیل، موز، پرتغال، نارگیل، لیمو در سه برند تجاری مختلف با استفاده از سویه‌های *سالمونلا تیفی موریوم* TA98 و TA100 در جداول شماره ۱، ۲ و ۳ آورده شده است. پلیت‌های کنترل مثبت برای تأیید خصوصیت جهش برگشتی و پلیت‌های کنترل منفی نشان دهنده جهش خود به خودی است که در حضور توبین ۸۰ به عنوان کنترل منفی رشد می‌کنند. در این مطالعه سه پلیت برای هر یک از ۳ غلظت مورد استفاده از طعم‌دهنده‌ها و به طور مجزا برای هر سویه در نظر گرفته شده بود و در نهایت متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در ۳ پلیت مربوط به هر غلظت با متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های کنترل منفی در جداول شماره ۱ تا ۳ که به ترتیب مربوط به برندهای A، B، C می‌باشد با هم مقایسه شدند.

تصویر شماره ۲: بررسی MIC هر دو سویه در غلظت های مختلف از طعم دهنده ها، همانطور که در شکل مشهود است، کدورت در تمام چاهک ها، بجز چاهک حاوی کنترل منفی که تنها حاوی محیط کشت به تنهایی بوده مشهود است.

جدول شماره ۱: نتایج بررسی جهش زایی طعم دهنده های شرکت A

نمونه مورد بررسی	غلظت (µL/10ml)	تعداد کلنی های برگشتی با استفاده از سویهTA100		تعداد کلنی های برگشتی با استفاده از سویه TA98	
		MR	انحراف معیار ± میانگین	*MR	انحراف معیار ± میانگین**
کنترل منفی	---	(۱)	۴۰±۲/۸۸	۵/۶۸	۲۳±۱
کنترل مثبت	---	****(۲۲/۵)	۹۰۰±۳۵/۲۳	****(۲۱/۷۳)	۵۰۰±۱۶/۶۲
طعم دهنده وانیل	۱۰	(۱/۱۷)	۴۷±۱/۵۲	(۰/۹)	۲۱±۱/۵۲
	۲۰	(۱/۱۷)	۴۷±۲/۵۴	(۰/۹۵)	۲۲±۲/۰۸
	۴۰	(۱/۱۵)	۴۶±۷/۰۲	(۱/۱۳)	۲۶±۳/۰۵
طعم دهنده موز	---	NT		***NT	
کنترل منفی	---	(۱)	۴۰±۲/۵۱	(۱)	۲۰±۱/۷۳
کنترل مثبت	---	****(۲۵)	۱۰۰۰±۵۷/۷۳	****(۲۵/۴۵)	۵۰۹±۱۰/۰۱
طعم دهنده پرتغال	۱۰	(۱/۲۵)	۵۰±۴/۵	(۱/۱۵)	۲۳±۳/۵۱
	۲۰	(۱/۴۳)	۵۷±۷/۳۷	(۱/۱۵)	۲۳±۲/۰۸
	۴۰	(۱/۲۵)	۵۰±۴/۷	(۱/۰۵)	۲۱±۲/۸۸
طعم دهنده نارگیل	---	NT		NT	
کنترل منفی	---	(۱)	۴۰±۲/۵۱	(۱)	۲۰±۱/۷۳
کنترل مثبت	---	****(۲۵)	۱۰۰۰±۵۷/۷۳	****(۲۵/۴۵)	۵۰۹±۱۰/۰۱
طعم دهنده لیمو	۱۰	(۰/۸)	۳۵±۳/۲۱	(۱/۱۰)	۲۲±۱/۱۵
	۲۰	(۰/۹۵)	۳۸±۲/۵۱	(۱/۱۵)	۲۳±۱/۵۲
	۴۰	(۱/۲)	۴۸±۲/۵۱	(۱/۲۵)	۲۵±۳/۶۰

*: نسبت تعداد کلنی های برگشتی در نمونه ها به کنترل منفی.

**: میانگین و انحراف معیار برای سه پلیت مورد استفاده در هر غلظت.

***: (Not tested) مطالعه جهش زایی بر روی این طعم دهنده ها به علت عدم تولید توسط شرکت های مربوطه انجام نشد.

****: در این پلیتها تعداد کلنی های برگشتی بیش از ۲ برابر در مقایسه با پلیت های کنترل منفی است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

جدول شماره ۲: نتایج بررسی جهش زایی طعم دهنده های شرکت B

نمونه مورد بررسی	غلظت (µL/10ml)	تعداد کلنی های برگشتی با استفاده از سویهTA100		تعداد کلنی های برگشتی با استفاده از سویه TA98	
		MR	انحراف معیار ± میانگین	MR*	انحراف معیار ± میانگین**
کنترل منفی	---	(۱)	۴۵±۶/۰۲	(۱)	۲۴±۴/۱۶
کنترل مثبت	---	***(۲۰/۹۱)	۹۴۱±۲۰	***(۲۷/۲۱)	۵۱۷±۱۷/۴۳
طعم دهنده وانیل	۱۰	(۰/۹۳)	۴۲±۲/۳۲	(۱/۰۴)	۲۵±۳
	۲۰	(۱/۱۵)	۵۲±۲/۶۴	(۱/۱۶)	۲۸±۴/۵۰
	۴۰	(۱/۲)	۵۴±۵/۵۰	(۱/۲۰)	۲۹±۴/۰۴
کنترل منفی	---	(۱)	۴۵±۶/۰۲	(۱)	۲۴±۴/۱۶
کنترل مثبت	---	***(۲۰/۹۱)	۹۴۱±۲۰	***(۲۱/۵۴)	۵۱۷±۱۷/۴۳
طعم دهنده موز	۱۰	(۱/۲۴)	۵۶±۱۴/۱۷	(۰/۹۵)	۲۳±۲/۵۱
	۲۰	(۱/۲۶)	۵۷±۵/۱۳	(۱/۱۶)	۲۸±۴/۷۱
	۴۰	(۱/۱۳)	۵۱±۴/۱۶	(۱/۲۰)	۲۹±۴/۰۴
کنترل منفی	---	(۱)	۳۲۰±۶۷/۱۲	(۱)	۱۹±۴/۹۳
کنترل مثبت	---	***(۳)	۹۶۱±۲۷/۷۸	***(۲۶/۴۷)	۵۰۳±۷/۵۰
طعم دهنده پرتغال	۱۰	(۱/۱۵)	۳۷۰±۶۶/۵۸	(۱/۲۱)	۲۳±۳/۲۱
	۲۰	(۱/۱۸)	۳۸۰±۲۶/۴۵	(۱/۲۱)	۲۳±۳/۷۸
	۴۰	(۱/۲۵)	۴۰۰±۹۲/۹۱	(۱/۴۲)	۲۷±۷
کنترل منفی	---	(۱)	۴۵±۶/۰۲	(۱)	۲۴±۴/۱۶
کنترل مثبت	---	***(۲۰/۹۱)	۹۴۱±۲۰	***(۲۷/۲۱)	۵۱۷±۱۷/۴۳
طعم دهنده نارگیل	۱۰	(۱/۰۸)	۴۹±۶/۲۴	(۱/۲۱)	۲۳±۳/۰۵
	۲۰	(۱/۳۳)	۶۰±۲/۰۸	(۱)	۲۴±۲/۵۱
	۴۰	(۱)	۴۵±۳/۲۱	(۱/۰۴)	۲۵±۴/۳۵
کنترل منفی	---	(۱)	۳۲۰±۶۷/۱۲	(۱)	۱۹±۴/۹۳
کنترل مثبت	---	***(۳)	۹۶۱±۲۷/۷۸	***(۲۶/۴۷)	۵۰۳±۷/۵۰
طعم دهنده لیمو	۱۰	(۱/۰۶)	۳۴۰±۳۵/۲۳	(۱/۳۱)	۲۵±۳/۲۱
	۲۰	(۱/۱۸)	۳۹۰±۷۰/۹۴	(۱/۱۵)	۲۲±۳/۰۵
	۴۰	(۱/۰۳)	۳۳۰±۶۰/۲۷	(۱/۱۰)	۲۱±۲/۶۴

*: نسبت تعداد کلنی های برگشتی در نمونه ها به کنترل منفی.

**: میانگین و انحراف معیار برای سه پلیت مورد استفاده در هر غلظت.

***: در این پلیت ها تعداد کلنی های برگشتی بیش از ۲ برابر در مقایسه با پلیت های کنترل منفی است.

جدول شماره ۳: نتایج بررسی جهش زایی طعم دهنده های شرکتC

نمونه مورد بررسی	غلظت (µL/10ml)	تعداد کلنی های برگشتی با استفاده از سویهTA100		تعداد کلنی های برگشتی با استفاده از سویه TA98	
		MR	انحراف معیار ± میانگین	* MR	انحراف معیار ± میانگین **
کنترل منفی	---	(۱)	۴۵±۷/۶۳	(۱)	۱۹±۴/۹۳
کنترل مثبت	---	***(۲۰/۹۱)	۹۴۱±۲۰	***(۲۶/۴۷)	۵۰۳±۷/۵۰
طعم دهنده وانیل	۱۰	(۰/۸۸)	۴۰±۳/۲۱	(۱/۲۶)	۲۴±۴/۵۰
	۲۰	(۰/۸۸)	۴۰±۲	(۱/۲۱)	۲۳±۲/۰۸
	۴۰	(۰/۷۷)	۳۵±۲/۸۸	(۱/۱)	۲۱±۳/۹۶
کنترل منفی	---	(۱)	۳۲۰±۶۷/۱۲	(۱)	۱۹±۴/۹۳
کنترل مثبت	---	***(۳)	۹۶۱±۲۷/۷۸	*** (۲۶/۴۷)	۵۰۳±۷/۵۰
طعم دهنده موز	۱۰	(۱/۰۶)	۳۴۰±۳۵/۲۳	(۱/۱۵)	۲۲±۳
	۲۰	(۱/۲۱)	۳۹۰±۷۰/۹۴	(۱/۱۵)	۲۲±۱
	۴۰	(۱/۰۳)	۳۳۰±۶۰/۲۷	(۱/۲۱)	۲۳±۲/۵۱
کنترل منفی	---	(۱)	۴۰±۲/۵۱	(۱)	۲۰±۱/۷۳
کنترل مثبت	---	***(۲۵)	۱۰۰۰±۵۷/۷۳	***(۲۵/۴۵)	۵۰۹±۱۰/۰۱
عم دهنده پرتغال	۱۰	(۱)	۴۰±۲/۲۶	(۱/۱۵)	۲۳±۵/۱۳
	۲۰	(۱)	۴۰±۳/۶۰	(۱/۲)	۲۴±۲/۵۱
	۴۰	(۱/۲۵)	۵۰±۲/۰۸	(۱/۳)	۲۶±۱۰/۴
کنترل منفی	---	(۱)	۴۵±۶/۰۲	(۱)	۲۴±۴/۱۶
کنترل مثبت	---	***(۲۰/۹۱)	۹۴۱±۲۰	***(۲۱/۵۴)	۵۱۷±۱۷/۴۳
طعم دهنده نارگیل	۱۰	(۱/۲۲)	۵۵±۶/۰۲	(۱/۰۸)	۲۶±۵/۰۳
	۲۰	(۱/۱۷)	۵۵±۷/۹۳	(۱/۰۸)	۲۶±۱/۵۲
	۴۰	(۱/۳۵)	۶۱±۶/۲۴	(۰/۸۸)	۲۱±۳
طعم دهنده لیمو	----	NT		**** NT	

*: نسبت تعداد کلنی های برگشتی در نمونه ها به کنترل منفی.

**: میانگین و انحراف معیار برای سه پلیت مورد استفاده در هر غلظت.

***: در این پلیت ها تعداد کلنی های برگشتی بیش از ۲ برابر در مقایسه با پلیت های کنترل منفی است.

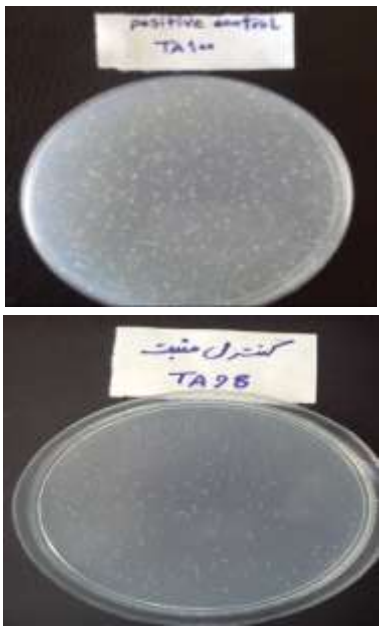
****: (Not tested) مطالعه جهش زایی بر روی این طعم دهنده ها به علت عدم تولید توسط شرکت های مربوطه انجام نشد.

www.SID.ir

Archive of SID

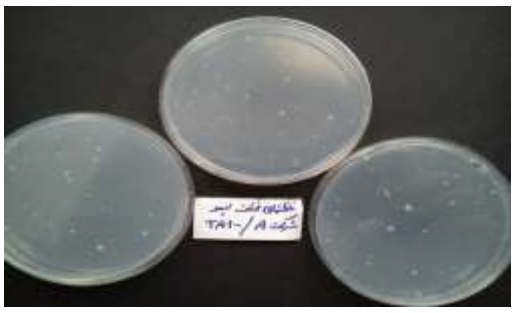
Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

مطابق جدول شماره ۱، هیچ یک از غلظت‌های مورد استفاده از طعم‌دهنده‌های برند A در مقایسه با گروه کنترل منفی از خود جهش‌زایی مستقیم نشان نداد. بالاترین میزان کلنی‌های برگشتی در طعم‌دهنده‌های خوراکی مصنوعی شرکت A با استفاده از سویه TA98 و TA100 به ترتیب برابر با ۲۶ کلنی (برای غلظت ۴۰ میکرولیتر بر ۱۰ میلی‌لیتر از طعم‌دهنده وانیل) و ۵۷ کلنی (برای غلظت ۲۰ میکرو لیتر بر ۱۰ میلی‌لیتر از طعم‌دهنده پرتغال) بود و این در حالی است که متوسط کم‌ترین تعداد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های کنترل مثبت برابر با ۵۰۰ کلنی برای سویه TA98 و ۹۰۰ کلنی برای TA100 بوده است (تصاویرشماره ۳، ۴ و ۵). در خصوص پلیت‌های کنترل منفی نیز بالاترین تعداد کلنی مشاهده شده ۲۳ کلنی درمورد سویه TA98 و ۴۰ کلنی برای سویه TA100 مشاهده شد. نتایج نشان داد که در هیچ موردی متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در غلظت‌های مختلف طعم دهنده‌های برند A مساوی و یا بیش از ۲ برابر متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های کنترل منفی نبوده است (MR≥ ۲). لازم به توضیح است که شرکت A در تولید طعم‌های موز و نارگیل فعالیت نداشته است.



تصویر شماره ۳: نمونه پلیت حاوی کنترل مثبت TA98 و TA100

تصویر شماره ۴: غلظت های مختلف لیمو ساخت شرکت A با استفاده از سویه TA98 از خود جهش زایی مستقیم نشان نداد.



تصویر شماره ۵: غلظت های مختلف لیمو ساخت شرکت A با استفاده از سویه TA100 از خود جهش زایی مستقیم نشان نداد.

مطابق جدول شماره ۲، بالاترین میزان کلنی‌های برگشتی در طعم دهنده‌های خوراکی مصنوعی شرکت B با استفاده از سویه TA98 و TA100 به ترتیب برابر با ۲۹ کلنی (برای غلظت ۴۰ میکرو لیتر بر ۱۰ میلی لیتر از طعم دهنده وانیل و موز) و ۴۰۰ کلنی (برای غلظت ۴۰ میکرولیتر بر ۱۰ میلی‌لیتر از طعم‌دهنده پرتغال) بود و این در حالی است که متوسط کم‌ترین تعداد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های کنترل مثبت برابر با ۵۰۳ کلنی برای سویه TA98 و ۹۴۱ کلنی برای TA100 بوده است. در خصوص پلیت‌های کنترل منفی نیز بالاترین تعداد کلنی مشاهده شده ۲۴ کلنی در مورد سویه TA98 و ۳۲۰ کلنی برای سویه TA100 مشاهده شد و نتایج حاکی از آن است که در هیچ موردی متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در غلظت‌های مختلف طعم‌دهنده‌های برند B مساوی و یا بیش از ۲ برابر متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های کنترل منفی نبوده است (MR≥ ۲). مطابق جدول شماره ۳، بالاترین میزان کلنی‌های برگشتی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

در طعم‌دهنده‌های خوراکی مصنوعی شرکت C با استفاده از سویه TA98 و TA100 به ترتیب برابر با ۲۶ کلنی (برای غلظت ۴۰ میکرولیتر بر ۱۰ میلی‌لیتر از طعم دهنده پرتغال و ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر بر ۱۰ میلی‌لیتر از طعم‌دهنده نارگیل) و ۳۹۰ کلنی (برای غلظت ۲۰ میکرولیتر بر۱۰ میلی‌لیتر از طعم‌دهنده موز) بود و این در حالی است که متوسط کمترین تعداد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های کنترل مثبت برابر با ۵۰۳ کلنی برای سویه TA98 و ۹۴۱ کلنی برای TA100 بوده است. در خصوص پلیت‌های کنترل منفی نیز بالاترین تعداد کلنی مشاهده شده ۲۴ کلنی در مورد سویه TA98 و ۳۲۰ کلنی برای سویه TA100 مشاهده شد و نتایج حاکی از آن است که در هیچ موردی متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در غلظت‌های مختلف طعم‌دهنده‌های برند C مساوی و یا بیش از ۲ برابر متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های کنترل منفی نبود (MR≥ ۲). لازم به توضیح است که شرکت C در تولید طعم‌دهنده لیمو فعالیت نداشت.

بحث

افزودنی‌های غذایی ترکیباتی هستند که به دلایل مختلفی مثل دوام و بهتر نمودن ظاهر غذا، طعم و مزه و ارزش غذایی به مواد غذایی افزوده می‌شود(۱۴). روش ایمز اولین بار طی مطالعه بر روی ۳۰۰ ماده شیمیایی که جهش زا و سرطان‌زا شناخته شده بودند و متعاقباً طی مطالعاتی که توسط مرکز صنایع شیمیایی سلطنتی انستیتو ملی مرکز تحقیق سرطان در توکیو و آژانس بین المللی تحقیق بر روی سرطان، انجام گرفت، معتبر شناخته شد(۱۰،۷). در سال ۱۹۷۵، Ames و Mccann رابطه جهش‌زایی و سرطان زایی را حدود ۸۳ درصد ارزیابی کردند(۷).

طی مقایسه‌ای که E.Zeiger و همکاران در سال ۱۹۹۶ بر روی روش‌های مختلف سنجش جهش‌زایی مواد شیمیایی انجام دادند، به این نتیجه دست یافتند که حدود ۷۶-۷۱ درصد از نتایج جهش‌زایی مواد شیمیایی، از طریق کاربرد *سالمونلا* در آزمون‌هاست(۱۵). محققین سرطان را ناشی از بروز تغییرات ژنتیکی در ژن‌ها وکروموزوم‌ها به دنبال تغییر در توالی و انسجام مولکول DNA می‌دانند. به دلیل تنوع این صدمات و تغییرات ژنتیکی، روش‌های مختلفی برای شناسایی جهش‌زاها با مکانیسم‌های مختلف وجود دارد. یک روش ساده برای شناسایی ترکیباتی که در جهش‌زایی از مکانیسم‌های مبتنی بر Frame Shift (تغییر چارچوب) در DNA استفاده می‌کنند، استفاده از سویه TA98 *سالمونلا تیفی موریوم* است در حالی که می‌توان از سویه TA100 این باکتری برای شناسایی ترکیباتی که مکانیسم جهش‌زایی آن‌ها، جهش‌های جایگزینی جفت بازهای آلی در DNA است استفاده کرد(۱۱). وجود جهش‌های مورد نظر در سویه‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر مورد آزمون قرار گرفت که نتایج با جدول ارایه شده توسط پروفسور ایمز و همکاران هم خوانی داشته و سویه‌ها برای استفاده مورد تایید قرار گرفتند. ملاک جهش‌زایی در آزمون ایمز دو برابر شدن تعداد کلنی‌های برگشتی بر روی محیط کشت حاوی نمونه‌ها در مقایسه با کنترل منفی است. براساس تعداد کلنی‌های برگشتی ایجاد شده توسط ترکیبات جهش‌زا، آن‌ها به چهار گروه جهش‌زاهای ضعیف، متوسط، قوی و بسیار قوی تقسیم می‌شوند که به ترتیب کمتر از ۵۰۰ کلنی برگشتی، بین ۵۰۰ تا ۲۵۰۰، بین ۲۵۰۰ تا ۵۰۰۰ و بیش از ۵۰۰۰ کلنی برگشتی ایجاد می‌نمایند(۱۶).

در مطالعه حاضر به دلیل محدودیت‌های مالی و نبود امکانات لازم امکان تهیه میکروزم کبدی (S9) برای بررسی جهش‌زایی متابولیت‌های حاصل از متابولیسم طعم‌دهنده‌های مصنوعی مورد مطالعه (جهش‌زایی غیرمستقیم) فراهم نشد به همین دلیل از خود طعم‌دهنده‌ها به طور مستقیم برای بررسی جهش‌زایی به کمک سویه‌های *سالمونلا تیفی موریوم* TA98 و TA100 استفاده شد. براساس نتایج به‌دست آمده که در جداول شماره ۱ تا ۳ درج شده است از

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

آن‌جا که هیچ یک از طعم‌دهنده‌های مصنوعی از برندهای A، B، C، تعداد کلنی برگشتی برابر یا بیش از ۲ برابر نسبت به کنترل منفی در محیط کشت ایجاد نکرد، فرضیه جهش‌زایی مستقیم طعم‌دهنده‌های مصنوعی وانیل، موز، پرتغال، نارگیل و لیموی برندهای یاد شده با استفاده از هر دو سویه TA98 و TA100 منتفی است و به عنوان جهش‌زای مستقیم محسوب نمی‌گردند. در مطالعه‌ای که Wild و همکاران در سال ۱۹۸۲ بر روی جهش‌زایی غیر مستقیم ۷۶ ترکیب که در ساخت مواد طعم‌دهنده مصنوعی استفاده می‌شوند انجام دادند به این نتیجه دست یافتند که ۴ ترکیب از آن‌ها، از جمله اتیل نیتریت، اتیل -۳- فنیل گلایسید، ۶- فنیل گلایسید و مشک از خود خاصیت جهش‌زایی غیرمستقیم نشان دادند(۴). در مطالعه‌ای که Kayraldiz و همکاران بر روی ۵ ماده افزودنی از جمله پتاسیم سولفات، سدیم سولفات، پتاسیم نیتریت، پتاسیم متا بی سولفیت و سدیم نیترات انجام دادند در مقایسه با مطالعه انجام گرفته به طور مشابه از دو سویه فوق استفاده شد و بر خلاف مطالعه حاضر از روش مستقیم و غیرمستقیم به طور توأم استفاده گردید که در آن پتاسیم سولفات و سدیم نیتریت به‌طور ضعیف از خود خاصیت جهش‌زایی نشان دادند(۱۴). سازمان غذا و داروی ایالات متحده همه ساله لیستی از مواد افزودنی مجاز را برای مصرف در مواد غذایی اعلام می‌دارد. بر اساس این لیست مواد با منشا طبیعی به‌عنوان GRAS یا عموما سالم تلقی می‌گردند(۱۷). تحقیقات اخیر نشان داده است که افزودنی‌های طبیعی نیز همواره خالی از اشکال نیستند. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط اکبری و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی جهش‌زایی مستقیم چند نوع از رنگ‌های طبیعی خوراکی به روش ایمز و با سویه‌های TA98 و TA100 انجام گرفت در چند رنگ طبیعی خوراکی مورد مطالعه مانند آلبالویی، زرد طلایی، نارنجی و قهوه‌ای تیره جهش‌زایی مستقیم دیده شد(۱۸). ازآن‌جا که سرطان‌زایی نتیجه جهش‌زایی است و مصرف طعم‌دهنده‌های طبیعی و مصنوعی برای مقبولیت مواد غذایی نزد مصرف‌کنندگان رو به فزونی است، باید خصوصیت جهش‌زایی آن‌ها مورد توجه قرار گرفته شود. با توجه به این‌که طعم‌دهنده‌های طبیعی در لیست GRAS و مورد تایید FDA هستند، پژوهش پیرامون جهش‌زایی طعم دهنده‌های مصنوعی از اهمیت بیش‌تری برخوردار است و با این حال تحقیقات زیادی در این خصوص تاکنون به چاپ نرسیده است و مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار زمینه را برای مطالعات بعدی بر روی سایر طعم‌دهنده‌های مصنوعی فراهم نمود.

طعم‌دهنده‌های مورد بررسی در این مطالعه از جمله طعم‌های وانیل، موز، پرتغال، نارگیل، لیمو که از سه برند عمده تولیدکننده طعم و عطر تهیه شده بود مطابق با نتایج جداول شماره ۱، ۲ و۳ در هیچ کدام از غلظت‌های مورد بررسی از خود جهش زایی نشان نداد. اما با توجه به این‌که در بعضی از طعم‌دهنده‌ها مثل وانیل و لیمو شرکت A، وانیل، موز، پرتغال و نارگیل شرکت B و پرتغال شرکت C با افزایش غلظت تعداد کلنی‌ها هم افزایش یافته است پس به دلیل حساسیت موضوع و ارتباط با سلامتی انسان کنترل‌های لازم و دقیق باید در پروسه تولید و استفاده این طعم‌دهنده‌ها صورت گیرد، تا از استفاده آن‌ها در مقادیر غیر ایمن جلوگیری به عمل آید. انجام مطالعه مشابه با S9 (میکروزوم کبدی) می‌تواند به تکمیل این مطالعه و بررسی جهش‌زایی غیر مستقیم این طعم‌دهنده‌ها کمک نماید. چرا که هر چند به روش مستقیم جهش‌زایی دیده نشده است ولی احتمال آن که متابولیت‌های این طعم دهنده‌ها دارای خاصیت جهش‌زایی باشند وجود دارد.

به دلیل نگرانی‌های موجود از جهش زایی افزودنی‌های غذایی، انجام بررسی‌های تکمیلی مانند بررسی جهش‌زایی غیر مستقیم با میکروزم کبدی، Comet Assay بر روی این طعم‌دهنده‌ها توصیه می‌گردد. همچنین به دلیل نگرانی از اثرات تجمعی مواد افزودنی غذایی در بدن انسان، توصیه به مصرف

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

طعم‌دهنده‌های طبیعی که درلیست GRAS قرار دارند تا حد زیادی ازنگرانی مصرف‌کنندگان خواهد کاست.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر، حاصل از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته بهداشت و ایمنی مواد غذایی است که در دانشگاه علوم پزشکی زنجان به تصویب رسیده است و دارای مصوبه کمیته اخلاق پزشکی به شماره ZUMS.REC.1392.187 می‌باشد. از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان به خاطر حمایت مالی این پروژه کمال تشکر و قدردانی را داریم. همچنین از بخش کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌خاطر در اختیار قرار دادن سویه‌های میکروبی تشکر می‌گردد.

References

1. Fischetti F, Flavouring material In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p. 1-28.
2. Moldes AB, Vecino X, Cruz JM. Nutraceuticals and food additives. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Amsterdam Elsevier; 2017.
3. CAC/ GL. Guidelines for the use of flavouring. Rome: FAO/WHO; 66-2008.
4. Wild D, King M, Gocke E, Eckiiardt K. Study of artificial flavouring substances for mutagenicity in the salmonella/microsome, Basc and micronucleus tests. Food Chem Toxicol 1983; 21(6): 707-719.
5. International Markets bureau. The global flavour industry. Canada: Agriculture & Agri Food 2014; March. Report No: 1.
6. Kroes R, Kleiner J, Renwick A. The threshold of toxicological concern concept in risk assessment. Toxicol Sci 2005; 86(2): 226-230.
7. Mccana J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. Proc Natl Acad Sci U S A 1975; 72(12): 5135-5139.
8. Mehrabian S, TohidPour M, Emtiazjo H, Mohamadian Z. Mutagenic and carcinogenic effects of plastic bags and disposable food containers using salmonella typhimurium and microsomes. Hakim Health Systems Research Journal 2005; 8(3): 45-53.
9. Esmaili-rad S, Daneshvar N, Rastegar-lari A, Mahmoudian M. Mutagenicity screening of food coloring agents with Ames Test. Proceedings of the 12thIranian congress of physiology and pharmacology; 1995 Nov 6-9; Tehran: Iran Univ Med Sci.
10. Hakura A, Shimada H, Nakajimia M, Sui H, Kitamoto S, Suzuki S, et al. Salmonella/ human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. Mutagenesis 2005; 20(3): 217-228.
11. Tejs S. The Ames Test: A methodological short review. Environ Biotech 2008; 4(1): 8-14.
12. Shahverdi A, Ostad S, Khodaee S, Bitarafan L, et al. Antimicrobial and cytotoxicity potential of Peganum harmala smoke. Pharmacog Mag 2008; 4(15): 236-240.
13. Mortelmans K, Zeiger E. The ames salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutat Res 2000; 455(1-2): 29-60.
14. Kayraldiz A, Kaya F, Canimoglu S, Rencuzogullari E. Mutagenicity of five food additives in Ames/salmonella/microsome test. Annals of Microbiol 2006; 56(2): 129-133.
15. Zeiger E, Shloyj A, Bakaleetal G. Prediction of salmonella mutagenicity. Mutagenesis 1996; 11(5): 471-484.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:16 +0330 on Wednesday November 13th 2019

16. Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: a review. Mutat Res 2004; 567(2-3): 109-149.
17. Shibamoto T, Bjeldanes B. Introduction to food toxicology. 2thed. Davis, USA: Academic Press; 2009.
18. Akbari H, Zeighami H, Mohseni M. Evaluation of Direct Mutagenesis in some of Natural Food Colors Using Ames Test. J Adv Med Biomed Res 2018; 26(115): 53-68.

www.SID.ir