Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی

دوره پنجم، شماره هجدهم، بهار۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

ارزیابی اتصال و سم‌زدایی آفلاتوکسین M_1 موجود در شیر توسط لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD۲، پروبیوتیک بومی ایران در شرایط فیزیکو شیمیایی مختلف

محمدرضا فخرالاسلام[۱]، پروانه جعفری[۲*]، سید داود حسینی[۳]، حمیدرضا مهاجرانی [۴]، علی بناساز [۵]، مریم تاج‌آبادی ابراهیمی [۶]

۱-دانشجوی کارشناسی‌ارشد، 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 وهدف:آفلاتوکسین ها توسط آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC) به عنوان عوامل سرطان‌زای انسانی طبقه‌بندی شد هاند. میکروارگانیسم 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 M۱ توسط لاکتوباسیل‌کازئی سویه‌ی TD۲ 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 µl۱۹۰۰ شیر حاوی µl۵۰ سم آفلاتوکسین M۱ (غلظت ppb۱۰۰) با pH برابر ۷ و µl۵۰ از سویه باکتری به تعداد CFU/ml$۱۰^{۹}$×۲ افزوده شد. بعد از h۴ گرماگذاری در ۳۷ ^{o}C میزان حذف آفلاتوکسین در شرایط بدون تیمار و نیز با انجام تیمار های فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شد.

یافته ها: باکتری زنده به تن هایی باعث کاهش آفلاتوکسین M۱ می شود (٪۵۵.۳۵ ± ۰.۷۵۶۸) ولی ایجاد تخریب به‌دلیل اجازه اتصال بیشتر و بهتر به آفلاتوکسین در تیمار با آنزیم لیزوزیم (٪۶۰.۰۳ ± ۰.۵۱۴۴) و اسید کلریدریک M۲ (٪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 میکروارگانیسم برای حذف موثر آفلاتوکسین الزامی نیست ولی باکتری تیمار اسیدی شده درصد حذف بالاتری از سم آفلاتوکسین M۱ را نشان می‌دهد.

نتیجه گیری:سویه مذکور با ٪۵۵.۳۵ حذف آفلاتوکسین M۱ می‌تواند به عنوان یک عامل موثر در حذف زیستی آفلاتوکسین از مواد مختلف مورد توجه قرار گیرد.

مقدمه

از میان عوامل متعددی که سبب فساد مواد غذایی می‌شوند، سموم قارچی[۱] از اهمیت زیادی برخوردارند. از بین این سموم آفلاتوکسین ها[۲] 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

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

۱.Mycotoxins
۲.Aflatoxins

www.SID.ir

Archive of SID

سموم می‌باشند (۱۲،۲۰). موادغذایی مختلفی از جمله شیر و محصولات لبنی، امکان آلودگی با آفلاتوکسین را دارند که حتی در مقادیر کم، اثرات سویی بر روی سلامت انسان و حیوانات می‌گذارند.

آفلاتوکسین ها، سموم قارچی هستند که به وسیله‌ی چندین گونه از قارچ های آسپرژیلوس[۳] تولید می‌شوند. هنگامی که مواد خوراکی آلوده به آفلاتوکسین B۱ توسط گاو های شیری مصرف می‌شود در کبد هیدروکسیله شده و به آفلاتوکسین M۱ تبدیل می‌شود که در شیر و ادرار حیوان قابل اندازه‌گیری است. پس از ورود این ماده به دستگاه گوارش ابتدا توسط آنزیم های سیتوکروم P۴۵۰ کبدی متابولیزه می‌شود که نتیجه‌ی آن تولید مشتق اپوکسید است که قابلیت واکنش و اتصال به DNA و ایجاد آفلاتوکسین- گوانین را دارد. ترکیب اخیر می‌تواند به عنوان یک شاخص مهم میزان مواجهه با آفلاتوکسین قرار گیرد. آفلاتوکسین B۱ به عنوان گروه اول ترکیبات سرطان‌زا و آفلاتوکسین M۱ به عنوان گروه دوم ترکیبات سرطان‌زا برای انسان و حیوان معرفی شده است (۸،۱۷،۱۹).

در کنار صدمات جبران ناپذیر به صنعت دام‌پروری، ورود آفلاتوکسین M۱ از طریق شیر به صنایع غذایی انسان، سلامت انسان را نیز با خطر جدی مواجه می‌کند. به منظور کاهش خطرات ناشی از مصرف خوراک آلوده به آفلاتوکسین اتحادیه‌ی اروپا مقدار مجاز آفلاتوکسین M۱ در شیر را ۰/۰۵ µg/kg تعیین کرده است (۱).

سم‌زدایی و غیر فعال کردن آفلاتوکسین شامل روش های فیزیکی، شیمیایی و زیستی می‌باشد که روش های شیمیائی و فیزیکی محدودیت هایی مثل از دست رفتن ارزش محصولات غذایی، کیفیت، اثرات بهداشتی نامطلوب و هزینه تجهیزات می‌باشد. ولی کاربرد روش های زیستی توسط میکروارگانیسم مفیدی مثل باکتری ها و قارچ ها، کمک قابل ملاحظ های به کاهش آفلاتوکسین در محیط های آلوده می‌کند.

میکروارگانیسم های متعددی گزارش شد هاند که توانایی متصل شدن یا تخریب آفلاتوکسین در مواد غذایی و خوراکی را دارا می‌باشند. احتمالاً توانایی حذف آفلاتوکسین 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 آفلاتوکسین دارند (۲،۶).

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زند های هستند که مصرف آن ها به تعداد معین سبب ایجاد اثرات مفید در مصرف‌کننده می‌شود. یکی از مهم‌ترین گروه های پروبیوتیک، باکتری های اسیدلاکتیک هستند که به طور معمول در مایه‌ی آغازگر محصولات لبنی استفاده می‌شوند. 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 می‌توان به تعدیل سیستم ایمنی، کاهش کلسترول 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 اس هال های مزمن و مسافرتی اشاره کرد. گزارش های متعدی مبنی بر اثر حفاظتی باکتری های اسیدلاکتیک در برابر عوامل جهش‌زا مانند آمین های چند حلق های، ترکیبات N- نیتروزو و آفلاتوکسین ها منتشر شده است. به نظر می‌رسد که استفاده از این دسته از باکتری های پروبیوتیک با توانایی حذف آفلاتوکسین، می‌تواند علاوه بر خصوصیات مفید نامبرده به افزایش ایمنی غذا نیز کمک نماید (۱۱،۱۳).

هدف از این پژوهش ارزیابی حذف آفلاتوکسین M۱ توسط سویه‌ی لاکتوباسیلوس کازئی جدا شده از ترخینه (TD۲) با روش الایزا است. ترخینه ماده اولیه در تهیه یک سوپ سنتی در نواحی کوهستانی غرب ایران می‌باشد که متشکل از بلغور گندم است که در دوغ گوسفندی خیسانده و پس از طی دوره تخمیر، ادویه های مخصوص به آن افزوده می‌شود. 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 کلسترول در شرایط آزمایشگاه به اثبات رسیده است (۱۳،۱۴،۱۵).

روش کار

باکتری، محیط کشت و شرایط رشد

در این پژوهش از باکتری لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD۲، 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 موسسه‌ی واکسن و سرم سازی شعبه مرکزی –اراکدردمای ºC ۸۰- و با ۲۵٪ گلیسرول نگه‌داری می‌شود. پس از کشت در محیط MRS broth، باکتری در انکوباتور CO_2 دار در دمای ºC ۳۷ گرم‌خانه‌گذاری شد و سنتیک رشد باکتری تعیین گشت. برای این منظور محیط کشت با ۱٪ پیش کشت باکتری، تلقیح و گرماگذاری شد. در فواصل زمانی h ۳ نمونه‌برداری از محیط کشت صورت گرفت و جذب نوری با دستگاه اسپکتوفتومتر (JENWAY) ساخت کشور انگلستان در nm ۶۰۰ تعیین گردید. در مرحله‌ی بعد پس از تعیین سریال رقت از نمونه گرفته شده، تعداد باکتری ها به روش کشت سطحی (Spread culture) تعیین شد.

۳.Aspergillus

www.SID.ir

Archive of SID

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، ml ۱۰ از محیط کشت حاوی cfu/ml ۲×۱۰^{۹} به لوله آزمایش استریل منتقل شد. لوله آزمایش در rpm ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب سلولی حاصله سه بار با محلول بافر فسفات شستشو داده شد. در نهایت رسوب باکتری در ml ۱ بافر فسفات سوسپانسیون گشت تا در تمامی آزمون های صورت گرفته تعداد یکسانی از باکتری به کار گرفته شود.

تهیه محلول آفلاتوکسین M_1

در این تحقیق آفلاتوکسین M۱ از شرکت سیگما با غلظت ppt ۱۰۰ (ng/ml) آماده شده با حلال $MeCN/H_2O$ به نسبت ۲۵:۷۵ تهیه گردید .به منظور تبخیر حلال استونیتریل، محلول در حمام آب گرم $^{o}C۸۰$ 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 شیش های تیره در دمای ^{o}C ۴ نگهداری شدند.

تهیه محلول های آنزیمی مورد استفاده

آنزیم پروتئیناز K به صورت محلول از شرکت سیگما تهیه شد و به میزان µl ۵ مورد استفاده قرار گرفت. این آنزیم برای فعالیت خود نیاز به دمای ^{o}C ۵۵ به مدت h ۱ می‌باشد. آنزیم لیزوزیم به صورت پودر از شرکت سیگما تهیه شد. سپس با بافر STET (Tris-Hcl، PH ۸.۰، NaCl، EDTA، Triton X-۱۰۰) به صورت محلول در آمد. برای این منظور پس از افزودن پودر به بافر، محلول حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در C^{o} ۳۷ 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 M۱ موجود در آن ها با کیت الایزا (Euro clone) تعیین گردید. از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده µl۵۰ حاوی CFU/ml ۲×۱۰^{۹} به µl ۹۰۰ شیر حاوی µl ۵۰ سم آفلاتوکسین M۱ (با غلظت ppb ۱۰۰)، اضافه گردید و در ^{o}C ۳۷ به مدت h ۴ گرماگذاری شد. پس از اتمام دوره گرماگذاری، سلول ها با استفاده از سانتریفوژ rpm ۸۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جدا و میزان غلظت آفلاتوکسین در مایع رویی باقی مانده اندازه‌گیری گردید.

در مرحله بعد با انجام تیمار های حرارتی (اتوکلاو)، اسیدی (اسید کلریدریک)، آنزیمی (لیزوزیم و پروتئاز) 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 ^{o}C ۱۲۱ به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو و به میزان µl۵۰ با تعداد CFU/ml ۲×۱۰^{۹} 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 ^{o}C ۳۷ در محلول اسید کلریدریک M ۲ به مدت min ۹۰ بر روی شیکر با دور rpm ۱۰۰ گرماگذاری شدند. سپس همانند قبل توانایی حذف آفلاتوکسین بررسی شد.

تیمار آنزیمی

برای تیمار با آنزیم لیزوزیم با توجه به دستورالعمل شرکت سیگما mg ۵ پودر آنزیم را در µl ۵۰۰ آب محلول کرده و µl ۲۵۰ محلول آنزیمی با بافر مخصوص آنزیم به نام STET (ml ۳/۵) به ml ۱ سوسپانسیون باکتری اضافه کرده و در شرایط ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه نگه می‌داریم و در نهایت به مدت ۴۰ ثانیه در آب جوش قرار می‌دهیم و در نهایت سانتریفیوژ کرده و به میزان µl ۵۰ از باکتری را به محیط حاوی شیر و سم آفلاتوکسین اضافه می‌کنیم.

برای تیمار با آنزیم پروتئیناز K، از محلول آنزیمی به میزان µl ۵ در ml ۱ سوسپانسیون باکتریایی اضافه کرده و برای فعالیت آنزیم آن‌را به مدت h ۱در دمای ^{o}C ۵۵ قرار می‌دهیم. 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 ۶/.، دامنه شدت ۸۰ و صوت ۶/. استفاده شد.

تعیین غلظت آفلاتوکسین با روش الایزا

برای تعیین غلظت آفلاتوکسین از کیت الایزا آفلاتوکسین M۱ (Euro clone) ساخت کشور ایتالیا با دامنه شناسایی ۵ تا ppt ۱۰۰ استفاده شد. کیت مذکور دارای چاهک های میکروتیتر پوشانده شده با آنتی‌بادی

www.SID.ir

Archive of SID

اختصاصی آفلاتوکسین M۱ بود. اضافه کردن µl ۲۰۰ آب مقطر در خانه اول، µl ۲۰۰ از نمونه های استاندارد موجود در کیت به عنوان کنترل در خانه های بعدی با توجه به دستورالعمل کیت و نمونه حاوی آفلاتوکسین M۱ به میزان µl ۲۰۰ به خانه های الایزا اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۵ ºC در دمای اتاق قرار گرفت. پس از شستشو در مرحله بعد آنزیم کونژوگه به میزان µl ۲۰۰ به چاهک ها افزوده گشت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. پس از شستشوی مجدد سوبسترای آنزیم کروموژن به میزان µl ۲۰۰ در تاریکی به مدت ۱۰ دقیقه به چاهک ها اضافه شد. به منظور اتمام واکنش و توقف فعالیت آنزیم، µl ۵۰ محلول متوقف‌کننده به چاهک ها افزوده گشت و تغییر رنگ آبی به زرد که متناسب با غلظت سم بود در طول موج nm ۴۵۰ ارزیابی و تعیین گردید. غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ppt ۱۰۰ آفلاتوکسین M۱ بر اساس دستورالعمل کیت به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

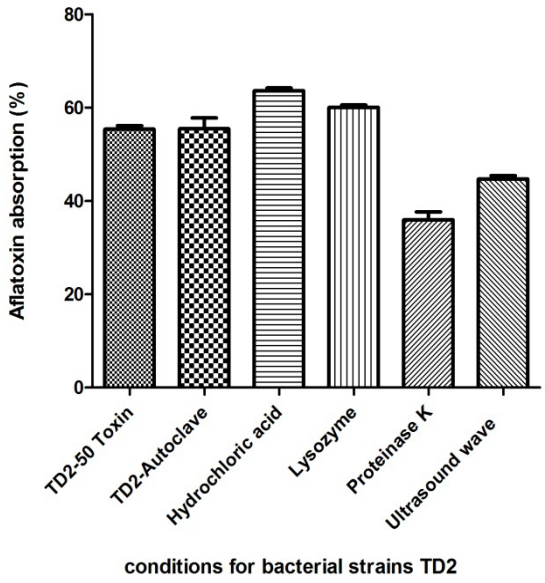
تجزیه و تحلیل آماری

تحلیل آماری داده های حاصل از دو بار تکرار آزمون ها، با استفاده از نرم افزار RIDAWIN Version ۱.۷۸ (ارائه شده توسط شرکت Euro clone) و نرم افزار Prism ۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها

در این تحقیق به منظور تعیین شرایط موثر در حذف آفلاتوکسین M۱از شیر، تیمار های مختلفی بر روی سویه TD۲ صورت گرفت که نتایج حاصله در جدول ۱ و نمودار ۱ آورده شده است.

نمودار۱- مقایسه درصد جذب آفلاتوکسین توسط سویه TD۲ در شرایط مختلف



نتایج نشان داد که سویه TD۲ در شرایط فوق ۵۵.۳۵ ± ۰.۷۵۶۸٪ آفلاتوکسین را از شیر حذف نموده است که این امر تایید کننده توانایی سویه مذکور در حذف این سم می‌باشد. همان طور که در نمودار و جدول فوق نشان داده شده کمترین درصد حذف سم مربوط به تیمار فیزیکی با امواج مافوق صوت (۴۴.۶۹ ± ۰.۷۳۷۰٪) و تیمار آنزیمی با پروتئیناز K (۳۵.۹۸ ± ۱.۶۹۷٪) می‌باشد. در حالی که بالاترین توانایی حذف سم در تیمار آنزیمی با لیزوزیم (۶۰.۰۳ ± ۰.۵۱۴۴٪) و تیمار اسیدی با اسید کلریدریک (۶۳.۶۱ ± ۰.۵۸۸۶٪) دیده می‌شود. میزان حذف سم در دو تیمار اخیر به صورت معنی‌داری بیشتر از نمونه باکتریایی تیمار نشده بود (Hydrochloric acidP value=۰.۰۱۳۲) و (LaysozymeP value=۰.۰۱۳۲) لازم به ذکر است که دو تیمار اسیدی و آنزیمی نیز اختلاف معنی‌داری (P value= ۰.۰۴۴۶) با یکدیگر دارند و تیمار اسیدی بالاترین جذب را بین تیمار ها دارا می باشد.

در تیمار حرارتی با اتوکلاو درصد جذب برابر ۵۵.۴۴ ± ۲.۳۳۵٪ بوده که در اختلاف معنی‌داری با حالت بدون تیمار نداشت. می‌توان نتیجه گرفت زنده بودن و یا مرگ سلول های TD۲ تاثیری در توانایی حذف آفلاتوکسین M۱ در شیر ندارد.

تیمار با امواج صو تی	تیمار با آنزیم پروتئیناز 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 ۲۰ و ۵۰) در شیر(ppt)					
۵۶،۶۵	۶۳	۴۰،۹۲	۳۷،۳۸	۴۲،۶۸	۴۵،۹
۵۵،۱۶	۶۶،۴۳	۳۹،۸۸	۳۶،۱۹	۴۷،۴	۴۴،۳۷
میزان آفلاتوکسین M1 واقعی در شیر (ppt)					
۲۸۳۲،۵	۳۱۵۰	۲۰۴۶	۱۸۶۹	۲۱۳۴	۲۲۹۵
۲۷۵۸	۳۳۲۱،۵	۱۹۹۴	۱۸۰۹،۵	۲۳۷۰	۲۲۱۸،۵
میزان آفلاتوکسین M1 جذب شده به‌علاوهppt ۵۴ سم اولیه موجود در شیر					
۲۲۲۱،۵	۱۹۰۴	۳۰۰۸	۳۱۸۵	۲۹۲۰	۲۷۵۹
۲۲۹۶	۱۷۳۲،۵	۳۰۶۰	۳۲۴۴،۵	۲۶۸۴	۲۸۳۵،۵
درصد جذب آفلاتوکسین M1 در شرایط مختلف					
۴۳،۹۵۵۲۸	۳۷،۶۷۳۱۳	۵۹،۵۱۷۲۱	۶۳،۰۱۹۳۹	۵۷،۷۷۶۰۲	۵۴،۵۹۰۴۲
۴۵،۴۲۹۳۶	۳۴،۲۷۹۷۸	۶۰،۵۴۶۱	۶۴،۱۹۶۶۸	۵۳،۱۰۶۴۵	۵۶،۱۰۴۰۸

جدول ۱- 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 می‌شود. 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 می‌شوند. همچنین اتصال سموم قارچی[۴] به دیواره این باکتری ها موجب کاهش دسترسی این سموم می‌گردد. ترکیبات پروتئینی و کربوهیدارتی موجود در سطح

Mycotoxins.٤

www.SID.ir

Archive of SID

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

نتایج ارائه شده از سایر تحقیقات نشان می‌دهد که پلی‌ساکارید 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 می‌گردد و مواد اسیدی نیز می‌توانند پیوند های قندی را در پلی ساکارید ها شکسته و به آزاد شدن منومر ها منجر شوند (۹). با تیمار اسیدی احتمال می‌رود که شکل ساختاری از حالت یک‌پارچگی 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 نمی‌گردد.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 معنی‌دار با باکتری بدون تیمار از خود نشان داد.

اتصال باکتری ها به آفلاتوکسین و حذف آن غالباً توسط ترکیبات پروتئینی و کربوهیدراتی صورت می‌گیرد. از این‌رو این اتصال می‌تواند 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 Periodateباعث اکسیداسیون گروه های هیدروکسیل به آلدئید و گرو های کربن –اسیدشدهوبیش‌ترینکاهشدراتصال به آفلاتوکسین B۱ را در پی داشته است که در واقع نشان می‌دهد که غالب اتصالات با ترکیبات کربوهیدراتی باکتری ها صورت می‌گیرد. البته در استفاده از آنزیم ها آزادسازی آفلاتوکسین متصل شده به باکتری به طور کامل کاهش نمی یابد که در واقع نشان‌دهنده‌ی در گیری ترکیبات دیگر است. در تحقیق دیگر با استفاده از آنزیم لیپاز مشخص شد که ترکیبات لیپیدی در توانایی اتصال باکتری به آفلاتوکسین موثر نمی‌باشند (۵،۱۰،۱۸).

در تحقیقات نشان داده شده است که پلی‌ساکارید 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 می‌یابد.

لیزوزیم (مورامیداز)، واکنش هیدرولیز پیوند β-(۱-۴) را بین N–استیلمورامیکاسیدو–Nاستیلگلوکزآمینرادرساختارپپتیدوگلیکانکاتالیزمی کند (۳،۷). در واقع این آنزیم باعث آزاد شدن کربوهیدرات ها و جذب بالاتر می شود. نتایج حاصل از تحقیق نشان‌داد که آنزیم پروتئینازK تن ها روی ساختار پروتئین ها اثر گذاشته و باعث هضم پروتئین ها شده و توانایی تخریب قند های دیواره را ندارد. از این‌رو افزایش حذف آفلاتوکسین را نخواهد داشت.

باکتری ها را می‌توان 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 می‌شود.

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. آسیب‌دیدگی و یا ایجاد تخریب در دیواره سلولی باکتری می‌تواند باعث آشکار شدن مکان های اتصال غیر قابل دسترس شده و قدرت جذب را بالا می‌برد. در بین این تیمار ها تیمار اسیدی بالاترین جذب را داشته که این می‌تواند 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 می‌باشد. استفاده از این سویه در مواد غذایی مختلف به عنوان یک پروبیوتیک بومی ایران، می‌تواند علاوه بر خصوصیات مفید یک پروبیوتیک و ارتقای سلامت مصرف

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

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مرکزی –اراکانجامشد هاستوبدینوسیل هازمسئولینوکارشناساناینموسسهتقدیر و تشکرمی‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

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 . AromaticAmines 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., EVALUATIONOF 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 theUnited 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

www.SID.ir