

اثر عصاره برگ‌ی آلوئه‌ورا بر رشد، تولید آفلاتوکسین B1 و الگوی پروتئین‌های خارج سلولی آسپیرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاهی

آرش بابایی^{۱*}، میلاد منافی^۲ و حدیث طوافی^۱

^۱ ملایر، دانشگاه ملایر، گروه میکروبیولوژی

^۲ ملایر، دانشگاه ملایر، گروه علوم دامی

تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۹

چکیده

آسپیرژیلوس فلاووس از جمله قارچ‌هایی است که آلودگی وسیعی بر روی مواد غذایی ایجاد می‌کند. در این مطالعه، فعالیت ضد قارچی عصاره‌های مختلف گیاه آلوئه‌ورا بر رشد و میزان آفلاتوکسین تولیدی آسپیرژیلوس فلاووس و همچنین تأثیر این عصاره‌ها بر الگوی پروتئین‌های خارج سلولی این قارچ مورد بررسی قرار گرفت. حلال مختلف استن، اتانول، آب، متانول، کلروفرم و اتیل اتر برای استخراج عصاره از برگ‌های گیاه آلوئه‌ورا استفاده گردید. فعالیت ضد قارچی عصاره‌ها به روش Agar Plate و Diffusion Plate انجام گرفت. هر کدام از عصاره‌ها در غلظت‌های ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکرو لیتر بر ۲۰ میلی لیتر محیط کشت، آزمایش شدند. بعد از بررسی، از عصاره استنی آلوئه‌ورا، به منظور ارزیابی و تأثیر عصاره بر میزان تولید آفلاتوکسین B1 و الگوی پروتئین‌های خارج سلولی تولیدی توسط قارچ آسپیرژیلوس فلاووس به ترتیب HPLC و SDS-PAGE انجام گرفت. بیشترین فعالیت ضد قارچی در عصاره استن در غلظت ۲۰۰۰ میکرو لیتر، دیده شد. با توجه به نتایج HPLC میزان مهار تولید آفلاتوکسین در غلظت ۲۰۰۰ میکرو لیتر، ۴۰/۹۴ درصد و در غلظت ۲ میکرو لیتر، ۱۸/۱۴ درصد گزارش شد. نتایج SDS-PAGE نشان داد که با کاهش رشد قارچی، میزان تولید پروتئین‌ها نیز کاهش یافته است. از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که، عصاره استنی آلوئه‌ورا می‌تواند به عنوان عامل ضد قارچی مؤثر تری بر مهار رشد آسپیرژیلوس فلاووس نسبت به حلال‌های دیگر باشد.

واژه‌های کلیدی: آلوئه‌ورا، آسپیرژیلوس فلاووس، فعالیت ضد قارچی، آفلاتوکسین B1، HPLC، SDS-PAGE

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۸۵۱۲۶۲۲، پست الکترونیکی: a.babaei@sheffield.ac.uk

مقدمه

متنوعی از جمله، ترکیبات فنولی، ساپونین‌ها و آنتروکوئینون‌ها می‌باشد. این ترکیبات، دارای فعالیت‌های ضد باکتریایی، ویروسی و قارچی می‌باشند (۲۲). قارچ‌ها از جمله میکروارگانیسم‌های دخیل در فساد مواد غذایی (به خصوص مواد غذایی انباری) هستند و باعث کاهش ارزش مواد غذایی می‌شوند. از جمله قارچ‌هایی که به صورت غالب بر روی محصولات انباری رشد می‌کنند، گونه‌های آسپیرژیلوس، فوزاریوم و پنی‌سیلیوم‌ها

از جمله استراتژی‌های درمانی که از دیرباز مورد توجه انسان بوده است، استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد. گیاهان دارویی منبع غنی از عوامل ضد میکروبی هستند که این عوامل، جزء متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند (۱۳ و ۱۶). از جمله این گیاهان دارویی می‌توان به آلوئه‌ورا اشاره کرد. آلوئه‌ورا گیاهی سبز رنگ و دارای برگ‌های سخت می‌باشد که حاشیه و وسط برگ‌ها را ژلی شفاف با ویسکوزیته بالا پر کرده است. آلوئه‌ورا شامل ترکیبات

هستند (۲۶). آسپریلیوس فلاووس و آسپریلیوس پارازیتیکوس از جمله قارچهای رشته ای هستند که دارای توزیع جهانی و بر روی انواع کثیری از مواد آلی فاسد شدنی یافت می‌شوند (۲۳). این قارچها، متابولیت ثانویه سمی و کارسینوژنی به نام آفلاتوکسین تولید می‌کنند که برای سلامتی انسان و حیوان مضر است (۸)، بنابراین، این نگرانی سبب شده است که محدودیتهای تنظیمی بر روی رشد این قارچها و به مراتب بر تولید آفلاتوکسین توسط آنها اتخاذ شود (۷ و ۱۷). مصرف مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین ها باعث بیماریهای حاد و یا مزمن مانند سرطان کبد و اگر در مقادیر بسیار مصرف شوند، منجر به مرگ می‌شوند (۲۰). از جمله راههای مؤثر برای کنترل مشکلات ناشی از آفلاتوکسین ها، جلوگیری از رشد قارچها بر روی سویسترا ها می باشد (۱۵). در طی تحقیقات مختلف گزارش شده است که عصاره ها و پودرهای انواع مختلف گیاهان دارویی و روغنهای استخراج شده از آنها، دارای فعالیت ضد قارچی هستند و همچنین تعدادی از آنها حتی تشکیل و تولید آفلاتوکسین را نیز مهار می‌کنند (۳، ۱۱ و ۲۴). Casion و همکارانش در سال ۲۰۰۷، اثرات مهاري برجسته ای از عصاره های هیدرو الکلیک برگهای تازه آلوئه ورا بر رشد میسلیم های هتروسپوریوم پرونتی، بوتریتیس گلا دیولوم، فوزاریوم اکسیزیوریوم و پنی سیلیوم گلا دیولی مشاهده کردند (۴). گیاهان دارویی متنوعی مانند آرکا کاتکو، پیپر بتل، سنتلا آستییکا، کاسیا باکریانا، سیرتوروس رتیکولیت و موموردیکا کارانتیا به منظور کنترل رشد آسپریلیوس فلاووس مورد بررسی قرار داده شدند و نتایج نشان داد که عصاره های خام اتانولیکی برخی از گیاهان دارویی رشد قارچی را مهار می‌کنند (۲۵). Ranjan و Masood نیز دریافتند که عصاره های آرگمون مکزیکی و سیپروس روتوندوس، تولید آفلاتوکسین را به واسطه مهار رشد قارچ آسپریلیوس فلاووس مهار کرد و نتایج نشان دادند که مهار تولید و تشکیل آفلاتوکسین در نتیجه مهار رشد آسپریلیوس

فلاووس بوده است (۱۴). روشهای آنالیز آفلاتوکسین ها بر پایه ۳ روش HPLC، TLC و ELISA می باشد (۲۷) و (۲۸). در میان این سه روش، HPLC روشی است که از نظر دقت و تعیین کمی میزان سم تولیدی، از حساسیت بیشتری برخوردار است. HPLC روشی شیمیایی است که قادر است میزان ترکیبات شیمیایی درون مخلوطی از مواد شیمیایی را آنالیز و تعیین مقدار کند. این روش، دارای دقت بالا می باشد و در تشخیص روشی سریع است (۱۲). الیزا نیز روشی است که اخیراً برای تعیین مقدار آفلاتوکسین در مواد غذایی از آن استفاده می شود. اما این روش به دلیل ارائه نتایج کاذب بایستی با روشهای دیگر نیز جهت تأیید نتیجه، همراه گردد (۱۹).

در این مطالعه، گیاه آلوئه ورا با حلالهای آلی استن، اتانول، متانول، کلروفرم، اتیل اتر و آب، عصاره گیری شد و اثر هر یک از استخراجها بر ممانعت از رشد شعاعی آسپریلیوس فلاووس مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تأثیر عصاره آلوئه ورا بر میزان تولید آفلاتوکسین B1 و الگوی پروتئینی خارج سلولی قارچ آسپریلیوس فلاووس به ترتیب به وسیله روشهای HPLC و SDS-PAGE نیز بررسی شد.

مواد و روشها

آماده سازی اولیه مواد گیاهی: بعد از جمع آوری برگهای تازه گیاه آلوئه و شستشو آنها توسط آب مقطر، به منظور ضد عفونی کردن آنها از اتانول ۷۰ درصد استفاده شد. سپس به قطعات کوچکی خرد شدند. قطعات ریز شده برگها در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز قرار داده شدند تا به طور کامل خشک شوند. بعد از خشک شدن کامل، برگها توسط دستگاه خردکن الکتریکی پودر شدند.

آماده سازی عصاره ها: ۳۰ گرم از مواد گیاهی پودر شده را با ۱۰۰ میلی لیتر از حلالهای مختلف (استن، اتانول، آب،

گرمادهی شدند. برای هر یک از تیمارها، ۳ تکرار گذاشته شد. در پایان روز هفتم، میزان رشد شعاعی قارچها بر حسب سانتیمتر گزارش گردید و از نظر آماری، داده‌ها در هر تیمار مورد آنالیز قرار گرفت. میزان مهار رشد قارچی با توجه به فرمول مورد تحلیل قرار گرفت (۱۰).

قطر کلنی کنترل / قطر کلنی تیمار شده - قطر کلنی کنترل =
 $\times 100$ درصد مهار رشد میسیلیوم

بررسی میزان تولید آفلاتوکسین B1: با توجه به اینکه عصاره استنی ماکزیمم تأثیر را بر ممانعت از رشد قارچ نشان داده بود، از این عصاره به عنوان عصاره کاربردی برای بررسی میزان تولید آفلاتوکسین مورد استفاده قرار گرفت. به منظور ارزیابی و تعیین مقدار آفلاتوکسین B1، HPLC انجام گرفت. در ابتدا ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت YESB (Yeast Extract Sucrose Broth) که در ارلنهای جدا تحت تأثیر غلظتهای ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکرو لیتر بر ۵۰ میلی لیتر از عصاره آلوئه ورا قرار داشتند، تلقیح شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز گرمادهی گردیدند. از هر کدام از غلظتها، ۳ تکرار تهیه شد. بعد از ۷ روز میسیلیوم های رشد کرده بر سطح محیط کشت خارج شدند و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و به منظور شاخص رشد قارچی، بعد از خشک شدن، وزن شدند. محیط کشت بعد از گذراندن از پارچه کتانی، از کاغذ واتمن شماره ۱ نیز عبور داده شد و برای آنالیز به وسیله HPLC به آزمایشگاه مرجع فرستاده شد و بعد از پاکسازی نمونه‌ها به روش KHA-S001 مطابق با رفرنس موجود در استاندارد ملی ۶۸۷۲ مورد آنالیز قرار گرفتند.

متانول، کلروفرم و اتیل اتر) مخلوط کرده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس محتویات گیاهی مربوط به هر حلالی از کاغذ واتمن شماره ۱ گذرانده شدند و مواد فیلتر شده توسط حمام بخار آب در دمای ۷۰-۶۰ درجه سانتی گراد تبخیر شدند تا خشک گردند. عصاره های خشک شده، پودر شدند و در مقادیر کمی از حجمهای مساوی از حلالهای مربوطه و آب مقطر استریل (۵۰ به ۵۰) دوباره حل گردیدند و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند تا مورد مطالعه قرار گیرند (۵ و ۱۸).

استرین قارچی: در این مطالعه، قارچ *ATCC 5004 Aspergillus flavus* از بخش قارچ شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. قارچها بر روی محیط کشت شیب دار (Potato Dextrose Agar) PDA کشت داده شدند. از قارچهای کشت داده شده در آزمایشگاه به عنوان ذخیره قارچی استفاده گردید و بر روی محیط PDA به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت داده شد و پلیتها بعد از ۷ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای مطالعه بیشتر نگهداری شدند.

بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره های استخراج شده به روش Agar Plate Diffusion: به منظور بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره های استخراج شده توسط حلالهای مختلف از روش Agar Plate Diffusion استفاده گردید. بدین منظور غلظتهای ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ میکرو لیتر بر ۲۰ میلی لیتر، از عصاره‌ها به محیط کشت PDA مذاب که حرارت آن در داخل پلیتها به ۷۰-۶۰ درجه سانتی گراد رسیده بود، اضافه گردید و سپس مخلوط شدند. بعد از جامد شدن محیط کشتها، پلاکهایی از قارچهای کشت داده شده (در حدود ابعاد ۰/۴ میلی متر) را از سویه های استاندارد در مرکز هر پلیت مربوط به غلظتهای مختلف عصاره‌ها، به صورت نقطه ای قرار داده شد و کشتها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد

سطح معنی دار ۵ درصد ($P < 0.05$) و درجه اطمینان ۹۵ درصد انتخاب گردید

نتایج

فعالیت ضد قارچی عصاره های مختلف آلوئه ورا بر رشد آسپریلیوس فلاووس: در این مطالعه فعالیت ضد قارچی عصاره های مختلف آلوئه ورا، بر رشد شعاعی قارچهای آسپریلیوس فلاووس در غلظتهای ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۲۰ میلی لیتر به روش Agar Plate Diffusion مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به تحلیل آماری، اختلاف آماری بین نتایج به دست آمده $p \text{ value} < 0.05$ به طور معنی داری کاهش رشد در قارچهای مذکور را نشان می دهد. طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه، فعالیت ضد قارچی آلوئه ورا در غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر از عصاره استنی، اثر مهاری ۱۰۰ درصد را بر رشد آسپریلیوس فلاووس داشته است و کمترین اثر مهاری در غلظت ۲ میکرولیتر از عصاره متانولی به میزان ۶/۲۵ درصد گزارش شد. (جدول ۱)

نتایج به طور معنی داری نشان می دهد که عصاره استخراج شده از استن در غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر، ۱۰۰ درصد رشد آسپریلیوس فلاووس را مهار نمود و در کمترین غلظت استفاده شده از این عصاره (۲ میکرو لیتر) مهار رشد ۵۱/۷۲ درصد گزارش شد. عصاره های استخراج شده آلوئه ورا توسط حلالهای اتانول، اتیل اتر، آب، کلروفرم و متانول نشان داد که بالاترین غلظت که ۲۰۰۰ (میکرولیتر) می باشد به ترتیب ۷۶/۷۲، ۶۱/۵۳، ۵۸/۳، ۴۸، ۳۷/۵ درصد ممانعت رشد را باعث گردید و در این عصاره های استخراجی توسط حلالهای ذکر شده کمترین غلظت (۲ میکرولیتر) به ترتیب ۳۵/۳۴، ۳۳/۸۴، ۲۸/۳۳، ۲۰ و ۶/۲۵ درصد ممانعت رشد را سبب شد. در صورتی که بیشترین و معنی دارترین مهار رشدی در غلظتهای مختلف عصاره استنی عصاره های دیگر دیده شد (طبق جدول ۱).

بررسی الگوی پروتئینهای خارج سلولی آسپریلیوس فلاووس: جهت بررسی الگوی پروتئینهای خارج سلولی آسپریلیوس فلاووس، از سویه استاندارد کشت داده شده بر روی محیط PDA استفاده گردید. اسپور ها از سطح پتری دیش قارچ توسط مخلوطی از آب و تریتون X به وسیله لوپ به طور کامل شستشو داده شد و از سوسپانسیون به دست آمده، ۱ میلی لیتر (۱۰^۵ اسپور ml^{-۱}) در محیط کشت PDB تلقیح شدند و در شرایط استریل غلظتهای مختلف ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی لیتر از عصاره استنی به محیط کشتها اضافه گردید و به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکر دار قرار داده شدند. این نمونه ها نیز در ۳ تکرار تست شدند. بعد از پایان ۱۰-۷ روز در شرایط استریل، قطعات بزرگ میسیلیوم قارچ، ابتدا توسط پارچه کتانی جدا و سپس مابقی محیط کشت قارچی به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند مایع رویی جمع آوری شدند و برای آنالیز توسط SDS-PAGE در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

الکتروفورز با ژل SDS: به منظور آنالیز پروتئینهای به دست آمده، نمونه ها به وسیله SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی از ژل جدا کننده ۱۲ درصد و ژل فشرده کننده ۴ درصد طبق روش Laemmli (Laemmli, 1970) استفاده گردید. ۲۰ میلی لیتر از نمونه و ۱۰ میکرولیتر از بافر 2x SDS gel loading در لوله تیوب ریخته و مخلوط گردید و سپس به مدت ۷ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و ۳۰ میکرولیتر از نمونه ها در ژل ریخته شد. در میان نمونه ها، نشانگر استاندارد نیز الکتروفورز گردید، که دارای قطعات پروتئینی در اندازه های ۲۰ تا ۱۲۰ کیلو دالتون بود. رنگ آمیزی ژل نیز توسط محلول آبی کوماسی G-250 انجام گرفت.

آنالیز آماری: نتایج به دست آمده با استفاده از نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای آنالیز گردید و

جدول ۱- تأثیر عصاره های آلوئه ورا بر رشد *آسپیرژیلوس فلاووس* در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز

عصاره ها	غلظتها μl/20ml	میانگین ابعاد میسیلیوم cm	میزان مهار رشد بر حسب %
عصاره استنی	۰	۵/۸	۰
	۲	۲/۸	۵۱/۷۲
	۲۰	۲/۳	۶۰/۳۴
	۲۰۰	۱/۶	۷۲/۴
	۲۰۰۰	۰	۱۰۰
عصاره اتانولی	۰	۵/۸	۰
	۲	۳/۷۵	۳۵/۳۴
	۲۰	۳/۲۵	۴۴
	۲۰۰	۲/۲۵	۶۱/۲
	۲۰۰۰	۱/۳۵	۷۶/۷۲
عصاره متانولی	۰	۴	۰
	۲	۳/۷۵	۶/۲۵
	۲۰	۳/۲۵	۱۸/۷۵
	۲۰۰	۲/۷۵	۳۱/۲۵
	۲۰۰۰	۲/۵	۳۷/۵
عصاره اتیل اتری	۰	۶/۵	۰
	۲	۴/۳	۳۳/۸۴
	۲۰	۴/۲۵	۳۴/۶۱
	۲۰۰	۴	۳۸/۴۶
	۲۰۰۰	۲/۵	۶۱/۵۳
عصاره کلروفومی	۰	۶/۲۵	۰
	۲	۵	۲۰
	۲۰	۴	۳۶
	۲۰۰	۳/۷۵	۴۰
	۲۰۰۰	۳/۲۵	۴۸
عصاره آبی	۰	۶	۰
	۲	۴/۳	۲۸/۳۳
	۲۰	۳/۷۵	۳۷/۵
	۲۰۰	۳/۲۵	۴۵/۸
	۲۰۰۰	۲/۵	۵۸/۳

میزان آفلاتوکسین تولیدی، ۷۷/۲ نانوگرم / گرم یافت شد و میزان مهار تولید آفلاتوکسین در غلظت ۲۰۰۰ میکرو لیتر بر ۵۰ میلی لیتر، ۴۰/۹۴ درصد و در کمترین غلظت از عصاره (۲ میکرو لیتر بر ۵۰ میلی لیتر) ۱۸/۱۴ درصد گزارش شد و در غلظتهای ۲۰ و ۲۰۰ میکرو لیتر بر ۵۰

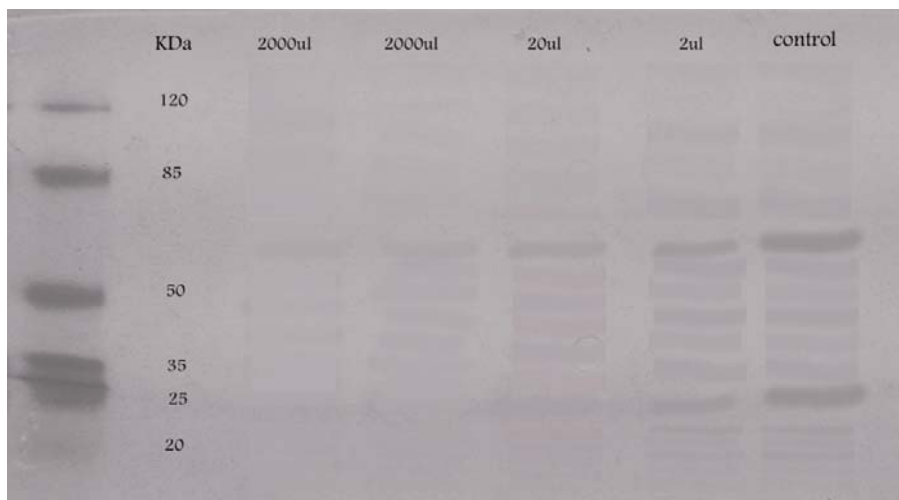
اثر عصاره استنی آلوئه ورا بر تولید آفلاتوکسین B1 به وسیله *A. flavus*: همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، عصاره آلوئه ورا بر کاهش تولید آفلاتوکسین B1 توسط قارچ *آسپیرژیلوس فلاووس* تأثیر داشته است. با توجه به نتایج HPLC، در نمونه کنترل (بدون تأثیر عصاره)

میلی لیتر از عصاره، میزان آفلاتوکسین تولید شده به ترتیب ۵۹/۸ و ۵۲/۶ نانوگرم / گرم گزارش شد. وزن خشک میسیلیوم های ایجاد شده توسط قارچ (به عنوان معیار جدول ۲- ارزیابی عصاره استنی آلوئه ورا بر بیوماس میسیلیومی (g) و میزان تولید آفلاتوکسین از اسپرژیلوس فلاووس در محیط YES

میزان مهار تولید آفلاتوکسین %	آفلاتوکسین BI ng/g	وزن خشک میسیلیوم (g)	غلظتها $\mu\text{l}/50\text{ml}$
۰	۷۷/۲	۳/۵۸	۰
۱۸/۱۴	۶۳/۲	۳/۰۲	۲
۲۲/۵۴	۵۹/۸	۲/۸۶	۲۰
۳۱/۸۷	۵۲/۶	۲/۴۳	۲۰۰
۴۰/۹۴	۴۵/۶	۱/۹۳	۲۰۰۰

مختلف ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی لیتر در محیط کشت PDB تلقیح شده با اسپرژیلوس فلاووس به وسیله روش SDS-PAGE مورد آنالیز قرار گرفت. بعد از گرمادهی به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و جداسازی میسیلیوم ها و آماده سازی نمونه ها، SDS-PAGE انجام گرفت (شکل ۱). در این آنالیز، ۲۴ باند پروتئینی دیده شد که وزن مولکولی آنها بین ۱۰ تا ۱۴۰ کیلو دالتون بود. این نتایج نشان دادند که در نتیجه کاهش رشد میسیلیوم قارچی، میزان تولید پروتئینها نیز کاهش یافته است.

اثر عصاره استنی آلوئه ورا بر الگوی پروتئینهای خارج سلولی قارچ اسپرژیلوس فلاووس: با توجه به انحلال برخی از ترکیبات فعال گیاه آلوئه ورا در حلالهای مختلف، اثرات قابل توجه ای بر تولید و سنتز برخی از متابولیتها و ترکیبات سلولی می تواند داشته باشد. برخی از ترکیبات عصاره آلوئه ورا مانند آنزیمهای مختلف از جمله آلیاز، آلکالین فسفاتازها، آمیلازها، کربوکسی پپتیدازها، کاتالاز، سلولاز، لیپاز، پراکسیداز می تواند بر تولید پروتئینهای حاصله از قارچ، در طی مسیر بیوسنتز آنها تأثیر گذار باشد. الگو تولید پروتئینهای خارج سلولی قارچ در غلظتهای



شکل ۱- الگوی پروتئینهای خارج سلولی قارچ در غلظتهای مختلف استون ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی لیتر در محیط کشت PDB تلقیح شده با اسپرژیلوس فلاووس به وسیله روش SDS-PAGE

نتیجه و بحث

اکسیژوپوریوم و پنی سیلیوم گلا دیولی داشته است (۴). Jasso و همکارانش نیز اثر عصاره این گیاه را در زمینه فعالیت ضد قارچی ارزیابی کردند و آنها نیز گزارش کردند که عصاره آلوئه ورا رشد میسیلیوم ها را در قارچهای فوزاریوم اکسیژوپوریوم، ریزوکتوما سولانی و کولکتوتریکوم کوکودس ممانعت کرده است و کاهش معنی داری در غلظت 10^5 میکرو لیتر بر لیتر مشاهده کردند (۱۰).

مطالعات فراوانی نیز در جهت یافتن روشهای مناسب برای کنترل آلودگی قارچها از مواد غذایی، صورت گرفته است. در مطالعه ای که توسط Horn و همکارانش در سال ۱۹۸۳ انجام دادند، اثر آسپرژیلوس نایجر، به عنوان یک مداخله کننده با عملکرد تولید آفلاتوکسین توسط آسپرژیلوس فلاووس، بررسی شد و آنها نتیجه گرفتند که ذرتهایی که با آسپرژیلوس نایجر نیز آلوده شده بودند، آفلاتوکسین از آنها جدا نشد. این گروه غلظت آفلاتوکسین را با کمک روش TLC آنالیز کردند و در تیمارهای مختلف، دریافتند که pH پایین ۳-۲/۸ تولید آفلاتوکسین را به طور کامل متوقف می کند (۹).

Christiane و همکارانش در سال ۲۰۱۰، اثر روغن نیم را به صورت *in vitro* بر رشد، مورفولوژی و تولید آفلاتوکسین در آسپرژیلوس فلاووس بررسی کردند. در غلظتهای ۰/۵ تا ۴ درصد از روغن تقریباً ۹۵ درصد تولید آفلاتوکسین مهار شده بود و اما رشد قارچ را کاهش نداده بود (۵).

Priyanka و همکارانش در سال ۲۰۱۰، نیز اثر دو روغن سیتروس رتیکولیت و سیمبوپوگن سیترا ته را بر روی رشد آسپرژیلوس فلاووس بررسی کردند. این تیمارها به طور کامل رشد قارچ را در ۷۵۰ ppm مهار کرده بودند و دو روغن به طور کامل تولید توکسین را در غلظتهای ۷۵۰ ppm و ۵۰۰ ppm مهار کرده بودند (۱۸).

برخی از ترکیبات عصاره آلوئه ورا مانند آنزیمهای مختلف از جمله آلیاز، آلکالین فسفاتاز ها، آمیلاز ها، کربوکسی

با توجه به رشد سریع قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی محصولات غذایی و خسارتهایی که در زمینه صنایع غذایی، سلامتی و اقتصادی ایجاد کند، بنابراین مهار رشد این قارچ می تواند کمک شایانی به جامعه سلامتی انسانی و حیوانی کند. نتایج حاصله از این مطالعه می تواند اطلاعات پایه ای در زمینه کارایی و اثر بخشی عصاره های مختلف گیاه آلوئه ورا به منظور کاهش رشد این قارچها و فعالیت ضد قارچی و ضد سمی این گیاه در اختیار قرار دهد. مطالعاتی در زمینه فعالیت ضد قارچی آلوئه ورا توسط محققین انجام گرفته است. در سال ۲۰۰۷، Cooposamy و Magwa ثابت کردند که عصاره آلوئه ورا، اثر ضد قارچی بر روی کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، تریکوفیتون منتاگروفیتس، تریکوفیتون روبروم، آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس گلاوکوس داشته است (۶). طبق مشاهدات و نتایج به دست آمده توسط Arunkumar و Muthuselvam در سال ۲۰۰۹، بالاترین فعالیت ضد قارچی گیاه آلوئه ورا در عصاره استنی آن بر روی رشد آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس فلاووس گزارش داده اند (۱)، که این نتایج موافق با نتایجی که در این مطالعه به دست آمده، است. Sitra و همکارانش در سال ۲۰۱۱ اثر قارچی ژل آلوئه ورا را بر روی رشد ۵ قارچ پاتوژن گیاهی مورد بررسی قرار دادند و گزارش دادند در غلظت ۰/۳۵ درصد از ژل آلوئه ورا رشد دو قارچ *Drechslera hawaiiensis* و *Penicillium digitatum* به طور کامل مهار شدگی دیده شد و در غلظتهای ۰/۱۵، ۰/۲۵ و ۰/۳۵ درصد از ژل آلوئه ورا به طور معنی داری کاهش رشد در قارچهای A. *niger* آسپرژیلوس فلاووس و *Alternaria alternata* را گزارش کردند (۲۱). Casian و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ دریافتند که عصاره های هیدرو الکلیک از برگهای گیاه آلوئه ورا، اثر مهاری بر رشد میسیلیوم های هتروسپوریوم پرونتی، بوتریتیس گلا دیولروم، فوزاریوم

غلظت ۲۰۰۰ میکرو لیتر بر روی رشد *آسپرژیلوس فلاووس* نشان داده است (جدول ۱). بنابراین به نظر می‌رسد که عصاره آلوئه ورا استخراج شده توسط حلال استن می‌تواند به عنوان عامل ضد قارچی مؤثرتری نسبت به حلالهای دیگر در نظر گرفته شود. همچنین در این مطالعه نتیجه گرفته شد که با کاهش رشد *میسیلیوم قارچی*، میزان تولید پروتئینهای خارج سلولی و میزان تولید آفلاتوکسین B1 نیز کاهش یافته است. اگر چه جلوگیری از رشد قارچ، از بهترین عملکردها برای جلوگیری از آلودگی به وسیله آفلاتوکسین در مواد غذایی است، اما معیارهای دیگر نیز ضروری هستند. بنابراین می‌توان مزیت استفاده از ترکیبات تولید شده گیاهی را به عنوان منبعی بی‌خطر و ماده کنترلی مؤثرتری نسبت به عوامل ضد میکروبی ساختگی در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین شرکت خدماتی، آموزشی و تحقیقاتی مرجعان خاتم به خاطر همکاری با گروه، در خصوص آنالیز آفلاتوکسین در نمونه‌ها، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. همچنین از جناب آقای دکتر رزاقی (انستیتو پاستور ایران - بخش قارچ‌شناسی) که در تهیه سویه استاندارد *آسپرژیلوس فلاووس* با این گروه همکاری داشتند نیز تشکر می‌گردد.

پیتیدازها، کاتالاز، سلولاز، لیپاز، پراکسیداز و ... می‌تواند بر تولید پروتئینهای حاصله از قارچ، در طی مسیر بیوسنتز آنها تأثیر گذار باشد. در این مطالعه، اثر عصاره آلوئه ورا بر تولید پروتئینهای خارج سلولی *آسپرژیلوس فلاووس* نیز مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر، پروفایل تولید پروتئینهای خارج سلولی قارچ در غلظتهای مختلف ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی لیتر در محیط کشت به وسیله SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دادند که در نتیجه کاهش رشد *میسیلیوم قارچی*، میزان تولید پروتئینها نیز کاهش یافته است. در مطالعه ای که Basaran در سال ۲۰۰۹ بر روی اثر پرتوی UV-C بر الگوی پروتئینهای خارج سلولی *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* داشت، با استفاده از تکنیک SDS-PAGE، نتیجه گرفت که تولید ۱۲ پروتئین تولید شده توسط این قارچ با اثر پرتوی UV-C کاهش یافته بودند (۲). در این مطالعه نیز ۲۴ باند پروتئینی مشاهده شد که در نتیجه کاهش رشد *میسیلیوم قارچی* با اثر عصاره گیاه آلوئه ورا، میزان تولید پروتئینها نیز کاهش یافته بود.

در این مطالعه آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که در روش Agar Plate Diffusion Plate اثر ضد قارچی عصاره‌های مختلف آلوئه ورا بر رشد قارچ مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری را در همه غلظتهای تست شده دارد ($p < 0.05$). در این مطالعه در میان عصاره‌های مورد بررسی شده، عصاره استنی بیشترین فعالیت ضد قارچی خود را در

منابع

- 1- Arunkumar S, Muthuselvam M. 2009. Analysis of phytochemical constituents and antimicrobial activities of *Aloe vera* L. against clinical pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (5): 572- 576.
- 2- Basaran. P. 2009. Reduction of *Aspergillus parasiticus* on hazelnut surface by UV-C Treatment, *International Journal of Food Science and Technology*. 44 (9): 1857-1863.
- 3- Bullerman LB, Lieu Y, Sieier SA. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by Cinnamon and Clove oils, Cinnamic aldehyde and eugenol, *J. food Sci*, 42(4): 1107-1109.
- 4- Casian OR, Parvu M, Vlase L, Tamas M. 2007. Antifungal activity of *Aloe vera* leaves. *Fitoterapia*. 78 (3): 219-222.
- 5- Christiane L. da Costa, Marcia R. F. Geraldo, Carla C. Arrotéia, Carlos Kemmelmeie. 2010. In vitro activity of neem oil [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] on *Aspergillus flavus* growth, sporulation, viability of spores, morphology and Aflatoxins B1 and B2 production. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 1(1): 292- 299.

- 6- Coopoosamy RM, Magwa ML. 2007. Traditional use, antibacterial activity and antifungal activity of crude extract of *Aloe excelsa*. *African Journal of Biotechnology*. 6(20): 2406-2410.
- 7- Ehrlich KC, Kobbeman K, Montalbano BG, Cotty PJ. 2007. Aflatoxin- producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*. 114(2): 153-159.
- 8- Hesseltine CW. 1965. A millennium of fungi, food and fermentation. *Mycologia*, 57(2): 149-197
- 9- Horn B W, Wicklow DT. 1983. Factor influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*. 29(9): 1087- 1091.
- 10- Jasso de Rodriguez D, Hernandez-Castillo, R. Rodriguez-Gracia, J. L. Angulo-Sanchez. 2005. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. 21(1): 81-87.
- 11- Krishnamurthy Y L, Shashikala J. 2006. Inhibition of aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* isolated from soybean seeds by certain natural plants products. *Letters in Applied Microbiology*. 43(5): 469-474.
- 12- Lee LS, Wah JH, Cotty PJ, Bayman P. 1990. Integration of enzyme- linked immunosorbent assay with conventional chromatographic procedures for quantitation of aflatoxin in individual cotton bolls, seeds and seed sections. *Anal, Chem J*, 73(4): 581-584
- 13- Mahesh B, Satish S. 2008. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. *World J. Agri. Sci* . 4(S): 839- 843.
- 14- Masood A, Ranjan K S. 1991. The effect of aqueous plant extracts on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Letter in Applied Microbiology*. 13(1): 32- 34.
- 15- Moreno-Martinez E, Vazquez-Badillo M, Facio-Parra F., 2000. Use of propionic acid salts to inhibit aflatoxin production in stored grains of maize. *Agrociencia*. 34(4): 477-484.
- 16- Muhammad BI. 1997. Anti-microbialeffects of extract leaf, stem and root bark of *Anogeissus leiocarpus* on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* and *Proteus vulgaris*, *J. Pharma. Devpt*. 2(S), 20-30.
- 17- Narasaiah KV, Sashidhar RB, Subramanyam C., 2006. Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia* 162 (3): 179-189.
- 18- Priyanka S, Ashok Kumar, Shubhra Singh, Ravindra Shukla, Bhanu Prakash, Nawal Kishore Dubey. 2010. Effect of *Citrus reticulata* and *Cymbopogon citratus* Essential Oils on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Production on *Asparagus racemosus*.. *Mycopathologia*. 170(3):195-202.
- 19- Sabino M, Milanez T V, Lamardo L C. A, Navas S A, Stofer M, Gracia C B. 1997. Evaluation of the efficiency of two immunoassay kits for detection of aflatoxin B1 in corn, fish feed, peanuts and its products, *Cienciae Tecnologia de Alimentos*., 17(2): 107-110
- 20- Sergeant T, Ribonnet L, Kolosova A. 2008. Molecular and cellular effects of food contaminants and secondary plant components and their plausible interactions at the intestinal level. *Food and Chemical toxicology*. 46(3): 813-841.
- 21- Sitara U, Hassan N, Naseem J. 2011. Antifungal activity of *Aloe vera* gel against plant pathogenic fungi. *Pak. J. Bot*. 43(4): 2231-2233
- 22- Surjushe A, Vasani R, Sable D G. 2008. *Aloe vera*: a short review. *Indian J Dermatol*; 53 (4): 163-6.
- 23- Thanaboripat D. 2011. Control of Aflatoxins in Agricultural Products using Plant Extracts. *KMITL Sci. Tech. J*. 11(1): 35- 42
- 24- Thanaboripat D, Mongkontanawut N, Suvathi Y, Ruangrattametee V. 2004. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil. *KMITL Science Journal*, 4(1):1-8.
- 25- Thanaboripat, D., Suvathi, Y., Srilohas Srilohasin, P., Sripakdee, S., Patthanawanitchai, O., Chareonsettasilp, S. 2007. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Science and Technology Journal*, 6(1), 18-24.
- 26- Thiruppathi S. Ramasubramanian V. Sivakumar T. Thirumalai Arasu V. 2010. Antimicrobial activity of *Aloe vera* (L.) Burm. f. against pathogenic microorganisms. *J. Biosci. Res*. 1(4): 251- 258.
- 27- Whitaker T, Horwitz W, Albert R, Neshim S. 1996. Variability associated with analytical methods used to measure aflatoxin in agricultural commodities. *AOAC, Int. Mar*. 79 (2): 476- 485.
- 28- Zhonghua Pan, Yan Fang XU. 1995. Improvement of analyzing methods of aflatoxin. *Agro-environ, Develop*; 12(2): 30- 34.

Effect of the Leaf Extract of *Aloe vera* on Growth, Production of Aflatoxin B1 and profile of Extracellular Proteins of *Aspergillus flavus* in vitro

Babaei A.¹, Manafi M.² and Tavafi H.¹

¹ Microbiology Dept., Malayer University, Malayer, Iran

² Animal Science Dept., Malayer University, Malayer, Iran

Abstract

Aspergillus flavus is the fungi that caused massive contamination on feed. In this study antifungal activity of different extracts of *Aloe Vera* plant on the growth, aflatoxin production and extract effects on profile of extracellular proteins of *Aspergillus flavus* were study. This research conducted on *Aloe vera* utilizing sex solvent including acetone, ethanol, water, methanol, chloroform and ethyl ether for extraction from *Aloe Vera* fresh leaves. Antifungal activity of the extracts was evaluated by Agar Plate Diffusion Plate method. Each of extract in different concentrations of 0, 2, 20, 200 and 2000 μ L in 20mL was tested. HPLC and SDS-PAGE techniques in order of evaluation of acetone extract of *Aloe Vera*, and its extract effect on the production of aflatoxin B₁ and extracellular protein patterns produced by *A. flavus* were used respectively. The maximum antifungal activity was observed in acetone extract, in concentration of 2000 μ L. Results obtained from HPLC analysis revealed the inhibition of aflatoxin production in 2000 μ L and 2 μ L was 40.94% and 18.14% respectively. The SDS-PAGE results showed, with decrease in fungal mycelium growth, the proteins production rate was also decreased. Generally result showed that the acetone extract of *Aloe Vera* can be used as a more effective antifungal agent to inhibit the growth of *A. flavus* compared to other solvents.

Key words: *Aloe Vera*, *Aspergillus flavus*, Antifungal activity, Aflatoxin B1, HPLC and SDS-PAGE.