مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره 3، پاییز 1392، صفحات 249-241

اثر سوش، مقدار تلقیح و فیزیولوژی پروبیوتیک‌ها و pH نهایی تخمیر روی کاهش مقدار آفلاتوکسین M_1 آزاد در دوغ

زهرا سرلک[1] ، میلاد روحی لنگرودی[2]، رضا محمدی[3]، سید امیر محمد مرتضویان[4] ، رامین خاکسار[5]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

2- دانشجوی دکتری تخصصی مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

3- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

4- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
پست الکترونیکی: mortazvn@sbmu.ac.ir

5- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/7/10 تاریخ پذیرش: 92/9/10

چکیده

سابقه و هدف: یکی از مهمترین آلودگی‌های دوغ در ایران، آفلاتوکسین M_1 است. در این پژوهش، در طراحی یکی در هر زمان، اثر متغیرهای نوع گونه (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*)، مقدار تلقیح (7 و 9 log cfu/ml) و زنده یا مرده بودن باکتری‌های پروبیوتیک و همچنین pH نهایی تخمیر (4/2 و 4/5) روی کاهش 0/500 ppb آفلاتوکسین M_1 آزاد طی تخمیر و نگهداری یخچالی (5°C) در دوغ بررسی شد.

مواد و روش‌ها: شیر مورد استفاده برای تولید دوغ از راه بازسازی پودر شیر بی چربی با ماده خشک 4% ساخته شد و پس از افزودن نمک کلرید سدیم (0/7%) و آلوده سازی با 0/500 ppb آفلاتوکسین M_1 تحت فرآیند گرمایی قرار گرفت. بعد از تلقیح کشت استارترهای مختلف، نمونه‌ها در گرمخانه تا رسیدن به pH نهایی مورد نظر قرار گرفتند. برای استخراج و اندازه‌گیری مقدار آفلاتوکسین M_1 آزاد، به ترتیب از ستون ایمونوافینیتی و دستگاه HPLC با دتکتور فلورسانس استفاده شد. همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام شد.

یافته‌ها: تیمار حاوی *ل.اسیدوفیلوس* (AY-7-A-4.2) نسبت به سوش‌های پروبیوتیک دیگر بیشترین کاهش آفلاتوکسین M_1 آزاد را طی تخمیر و نگهداری یخچالی داشت. کاهش آفلاتوکسین M_1 به وسیله تیمار *ل.اسیدوفیلوس* با مقدار تلقیح 9 log cfu/ml نسبت به 7 log cfu/ml به طور معنی‌داری بیشتر بود ولی این مقدار کاهش نسبت به مقدار تلقیح صرفه اقتصادی نداشت. تیمار حاوی 7 log cfu/ml باکتری *ل.اسیدوفیلوس* کشته شده، در روز اول نگهداری، به طور معنی‌داری آفلاتوکسین M_1 آزاد بیشتری را باند کرد. با این وجود، پروبیوتیک‌های زنده در تیمار AY-7-A-4.2 در روزهای 14 و 28 نگهداری، آفلاتوکسین M_1 آزاد را بیشتر کاهش دادند. همچنین تیمار با pH نهایی تخمیر بالاتر (4/5) نسبت به تیمار با pH نهایی 4/2 در روزهای 14 و 28 نگهداری، به طور معنی‌داری آفلاتوکسین M_1 آزاد بیشتری را کاهش داد.

نتیجه گیری: *ل.اسیدوفیلوس* بصورت زنده، در مقدار تلقیح 7 log cfu/ml و در pH نهایی تخمیر 4/5 بهترین شرایط را برای کاهش آفلاتوکسین M_1 آزاد طی نگهداری یخچالی داشت و از نظر اقتصادی، مقرون به صرفه بود.

واژگان کلیدی: آفلاتوکسین M_1، دوغ، فیزیولوژی، پروبیوتیک

• مقدمه

در کشور ما در میان محصولات لبنی تخمیری، دوغ مورد توجه خاص قرار گرفته است. مقبولیت دوغ نه فقط به عنوان فراورده‌ای با ویژگی‌های حسی مطلوب که به عنوان نوشیدنی تخمیری سالم و سلامت بخش سبب شده است که به عنوان نوشیدنی ملی ایران پذیرفته شود (1).

یکی از مهمترین آلودگی‌های دوغ، آفلاتوکسین می‌باشد (3، 2). آفلاتوکسین‌ها از جمله متداول‌ترین مایکوتوکسین-هایی هستند که مطالعات بسیار گسترده‌ای روی آن‌ها انجام گرفته است. آفلاتوکسین‌ها به وسیله گونه‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *آسپرژیلوس نومیوس* تولید می‌شوند و اثرات سمی آن‌ها شامل سرطان زایی، جهش زایی، ناقص الخلقه زایی و هپاتوتوکسیک است (4). زمانی که آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 همراه با غذا توسط گاو شیری بلع می‌شود، بعد از 12 ساعت، بخشی از آفلاتوکسین در کبد حیوان به وسیله سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 هیدروکسیله شده و به صورت آفلاتوکسین M_1 و M_2 به داخل شیر ترشح می‌شود (5). این ترکیبات، نسبت به مولکول‌های مادر، سمیت کمتری دارند ولی به علت مصرف زیاد شیر گاو توسط کودکان و افراد آسیب‌پذیر جامعه، اهمیت کاهش یا حذف آن‌ها افزایش می‌یابد. آفلاتوکسین M_1 سمیت بیشتری نسبت به آفلاتوکسین M_2 دارد و به دمای پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون و دیگر روش‌های فرآوری حرارتی مقاومت نشان می دهد، بنابراین در دماهای متعارف فرآوری، مقدار آن تغییر نمی کند (4). سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا و اتحادیه اروپا مقدار بیشینه آن را در محصولات لبنی به ترتیب 0/5 و 0/05 ppb تعیین کرده اند (7، 6). همچنین در کشورمان، مقدار بیشینه آفلاتوکسین M_1 در دوغ توسط مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران 0/1 ppb تعیین شده است. (8). مصرف بیش از حد آن، به دلیل اثرات سرطان زایی، سرکوب فعالیت سیستم ایمنی بدن و کاهش رشد بدن به طور بالقوه برای سلامتی انسان به ویژه کودکان و نوزادان مخاطره‌انگیز است (4). بنابراین با توجه به پتانسیل ایجاد خطر به وسیله آفلاتوکسین ها، باید تلاش‌های گسترده ای برای کاهش یا در صورت امکان، حذف آلودگی از مواد غذایی صورت گیرد.

بکارگیری بسیاری از روش‌های فیزیکی (مانند اتوکلاو کردن، استفاده از ماکروویو، اشعه گاما و اشعه UV) و شیمیایی (مانند تیمار غذای دام آلوده به آفلاتوکسین با آمونیاک و تیمار مواد غذایی با سدیم بی سولفیت و هیدوکسید کلسیم) مورد استفاده برای سم زدایی از محصولات غذایی آلوده به آفلاتوکسین، به دلیل مشکلات ایمنی، کاهش احتمالی مواد مغذی، کارایی محدود و پر هزینه بودن، محدودیت دارند (9). این امر، منجر به تحقیق بیشتر پیرامون راهکارهای دیگری مانند عوامل زیستی می-شود (10). در حال حاضر، فرضیه‌ای وجود دارد که اظهار می‌کند می‌توان آفلاتوکسین‌ها را در غذاهای مصرفی بوسیله باند کردن با ترکیبات دیواره میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک کاهش داد. مطالعات در محلول‌های بافر و شیر نشان داده است که نوع گونه پروبیوتیک، مقدار تلقیح، pH، زنده یا مرده بودن باکتری‌های پروبیوتیک، غلظت آفلاتوکسین، مقدار ماده خشک، حضور یون ها، زمان و دمای انکوباسیون و دوره نگهداری یخچالی و ... از عواملی هستند که احتمالاً می توانند توانایی باند کردن پروبیوتیک‌ها با آفلاتوکسین را تحت تأثیر قرار دهند (8). با این وجود، تاکنون تحقیقاتی مبنی بر کاهش آفلاتوکسین M_1 در دوغ به وسیله پروبیوتیک‌ها انجام نشده است. امکان سنجی کاهش میزان آفلاتوکسین آزاد در دوغ به وسیله باکتری‌های پروبیوتیک نه تنها یک روش بی‌ضرر و عملی است که در نهایت منجر به عدم جذب آفلاتوکسین باند شده در بدن می شود (12، 11)؛ بلکه مصرف فرآورده‌های پروبیوتیک به عنوان غذاهای فراویژه نیز اهمیت خاصی از نظر ارتقاء سلامت انسان دارد.

در این پژوهش، به ترتیب در چهار مرحله، اثر متغیرهای نوع گونه (*ل. اسیدوفیلوس*، *ل. رامنوسوس*، *ل. کازئی* و *ب. بیفیدوم*)، مقدار تلقیح (7 و 9 log cfu/ml) و زنده یا مرده بودن باکتری‌های پروبیوتیک و همچنین pH نهایی تخمیر (4/2 و 4/5) روی کاهش 0/500 ppb آفلاتوکسین آزاد M_1 طی تخمیر و نگهداری یخچالی (5°C) در دوغ بررسی شد.

• مواد و روش‌ها

روش تولید نمونه‌ها (طرح آزمایش): این پژوهش به روش "یک عامل در هر زمان" و در چهار مرحله طراحی شد. در مرحله اول، شیر مورد استفاده برای تولید دوغ از راه بازسازی پودر شیر بی‌چربی ساخته شد (ماده خشک 4%) و پس از افزودن نمک طعام (0/7%) و آلوده‌سازی با آفلاتوکسین M_1 (0/500 ppb)، مورد فرایند گرمایی (90°C به مدت 15 دقیقه) قرار گرفت. پس از سرد کردن نمونه‌ها تا دمای تلقیح، کشت استارترهای سنتی ماست به شیر بازسازی شده افزوده شد. سپس کشت یکی از گونه‌های متفاوت پروبیوتیک (ل. رامنوسوس HN001 از شرکت دنیسکو دانمارک، ل. کازئی L26 از شرکت DSM استرالیا، ل. اسیدوفیلوس LA-5 و ب. بیفیدوم BB-12؛ هردو تهیه شده از شرکت کریستین هنسن دانمارک) تا رسیدن به جمعیت 7 log cfu/ml مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، تلقیح شد. نمونه‌های فاقد

میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک نیز به عنوان شاهد میکروبی، منظور شدند. تمامی نمونه‌ها در لیوان‌های پلاستیکی بسته‌بندی شده و در دمای 40°C تا رسیدن به pH= 4/2 گرمخانه‌گذاری شدند. اندازه گیری pH هر نیم ساعت طی تخمیر انجام شد. سپس نمونه‌ها از گرمخانه خارج شده و طی دو مرحله سرد شدند (ابتدا به سرعت تا 15°C و سپس تا 5°C). در این مرحله، تیمار مناسب از نظر نوع گونه پروبیوتیک انتخاب شد. در مرحله دوم، کشت گونه مناسب پروبیوتیک (حاصل از مرحله اول) تا رسیدن به جمعیت‌های متفاوت (7 و log cfu/ml 9) تلقیح شد و در این مرحله، جمعیت مناسب پروبیوتیک انتخاب شد. در مرحله سوم، کشت گونه مناسب پروبیوتیک (حاصل از مرحله اول) به مقدار جمعیت مناسب آن (حاصل از مرحله دوم) تحت فرآیند حرارتی (90°C به مدت 15 دقیقه) قرار گرفت و پروبیوتیک‌های زنده به مرده (تیمار شده گرمایی) تبدیل شد. سپس این پروبیوتیک‌های مرده به شیر باز ساخته تلقیح شد. در این مرحله، تیمار مناسب از نظر زنده یا مرده بودن پروبیوتیک، انتخاب شد. در مرحله چهارم، تمامی نمونه‌ها در دمای 40°C تا رسیدن به pH= 4/5 گرمخانه‌گذاری شدند و در این مرحله، اثر pH نهایی تخمیر بر مقدار کاهش آفلاتوکسین توسط پروبیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

اسم هر تیمار از 4 بخش تشکیل شده است که به ترتیب، نوع استارتر (Y= استارترهای سنتی ماست، A= ل. اسیدوفیلوس، R= ل. رامنوسوس، C= ل. کازئی، B= ب. بیفیدوم)، مقدار تلقیح پروبیوتیک، زنده (A) یا مرده (D) بودن پروبیوتیک و pH نهایی تخمیر را نشان می‌دهند.

اندازه‌گیری pH: pH نمونه‌ها طی تخمیر با استفاده از pH متر اندازه‌گیری شد. پیش از اندازه گیری pH، pH متر توسط بافرهای استاندارد (pH7 و pH4) کالیبره شد.

اندازه‌گیری قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها: شمارش زنده پروبیوتیک‌ها با استفاده از محیط کشت MRS-bile آگار انجام شد (15-13). پلیت‌ها در شرایط هوازی و بی‌هوازی (برای باکتری‌های بیفیدوباکتریوم) در دمای 37°C به مدت زمان حداقل 72 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. شرایط بی‌هوازی با کاربرد جار بی‌هوازی و گازپک تیپ A ایجاد شد.

استخراج آفلاتوکسین M_1 آزاد: نمونه‌ها در فالکون به مدت 10 min در 3000 g سانتریفوژ شدند و 10 ml از محلول شفاف رویی از ستون ایمونوافینیتی عبور داده شد. سپس ستون ایمونوافینیتی با استفاده از 10 ml از PBS شستشو شده و در دمای اتاق خشک شد. 1 ml استونیتریل از ستون ایمونوافینیتی عبور داده شد. این عمل، آنتی ژن را از آنتی بادی جدا کرد. این عصاره را در لوله آزمایش جمع آوری و لوله‌ها در خشک کن تحت خلأ قرار گرفت تا عصاره به دست آمده در دمای 50°C کاملاً خشک شود. برای انحلال مجدد عصاره خشک شده، از 500 µl استونیتریل 25% (فاز متحرک) استفاده شد و برای انحلال بهتر عصاره خشک شده از سونیکیتور (Digital ultrasonic Cleaner) استفاده شد و سپس با استفاده از ورتکس، انحلال کامل صورت گرفت. نمونه آماده تزریق به HPLC در ویال نگهداری شد (17، 16، 2).

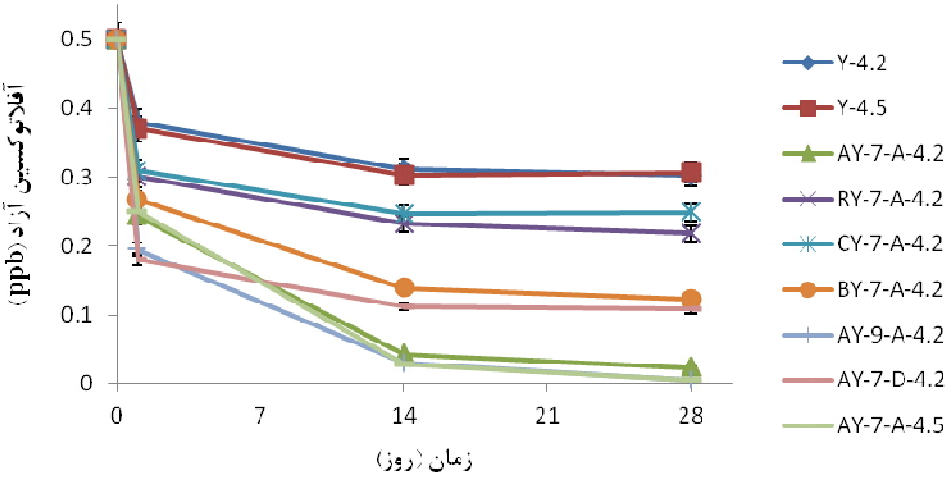
اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1 آزاد با HPLC: 200 میکرولیتر از عصاره حل شده در فاز متحرک (استونیتریل 25%)، به دستگاه HPLC (HPLC System: Waters Separations Module 2695 - Alliance) با دتکتور فلورسنس (Waters 2475 Fluorescence Detector) و فاز معکوس (Chromolith Performance RP-18 endcapped 100 x 2 mm) تزریق شد. سرعت جریان فاز متحرک 1 میلی‌لیتر در دقیقه و زمان بازداری آفلاتوکسین M_1 بین 4-3 دقیقه بود. همچنین طول موج برانگیختگی (Excitation wavelength) 360 nm و طول موج نشر (Emission Wavelength) 435 nm بوده و حد تشخیص این روش 0/003 ppb بود (17، 16، 2).

تجزیه و تحلیل آماری: این پژوهش، با روش "یک عامل در هر زمان" و در 4 مرحله انجام شد. تمامی آزمون‌ها در 3 تکرار انجام شدند. همچنین تحلیل واریانس یک‌طرفه برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و آزمون دانکن (در سطح معنی‌داری 0/05) برای یافتن تفاوت معنی‌دار میان میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS16 انجام شد.

• یافته‌ها

آنالیز آفلاتوکسین M_1 شیر خشک مصرفی در این مطالعه، آلوده نبودن آن را به آفلاتوکسین تأیید کرد. همچنین حرارت دادن شیر بازسازی شده آلوده به 0/5 ppb آفلاتوکسین M_1 به مدت 15 min در دمای 90 °C برای تولید دوغ، تأثیری بر کاهش مقدار آفلاتوکسین آزاد نداشت (P>0/05). شکل 1 و جدول 1 به ترتیب مقدار آفلاتوکسین آزاد و درصد کاهش (درصد باند شدن) آفلاتوکسین آزاد در نمونه‌های دوغ طی نگهداری یخچالی را نشان می‌دهند. در مرحله اول، تیمار *ل. اسیدوفیلوس* به طور معنی‌داری بهترین

باند کننده آفلاتوکسین بود (P<0/05). همچنین در مرحله دوم این مطالعه، مقایسه بین کاهش مقدار آفلاتوکسین M_1 بین دو تیمار AY-7-A-4.2 (تیمار مناسب مرحله اول) و AY-9-A-4.2 نشان داد که کاهش مقدار آفلاتوکسین آزاد با افزایش مقدار تلقیح به طور معنی‌داری افزایش می یابد (P<0/05). ولی به علت مقرون به صرفه نبودن، تیمار AY-9-A-4.2 در این مرحله به عنوان تیمار مناسب انتخاب نشد. در مرحله سوم این مطالعه، داده‌ها در شکل 1 و جدول 1 نشان می‌دهند که در روز اول نگهداری یخچالی، کاهش مقدار آفلاتوکسین M_1 به وسیله تیمار AY-7-D-4.2 بیشتر از AY-7-A-4.2 (تیمار مناسب مرحله اول و دوم) بوده ولی در روزهای 14 و 28 نگهداری یخچالی، کاهش مقدار آفلاتوکسین به وسیله تیمار AY-7-A-4.2 بیشتر بود (P<0/05). همچنین در مرحله چهارم این مطالعه، مقایسه تیمار AY-7-A-4.2 (تیمار مناسب از مرحله اول، دوم و سوم) با تیمار AY-7-A-4.5 در باند شدن با آفلاتوکسین M_1 نشان داد که در روز اول نگهداری، اختلافی در باند شدن آفلاتوکسین نداشتند (P>0/05) ولی تیمار AY-7-A-4.5 در روزهای 14 و 28 نگهداری یخچالی به طور معنی‌داری مقدار آفلاتوکسین آزاد را بیشتر کاهش داد (P<0/05). با توجه به شکل 1 و جدول 1، دو تیمار شاهد Y-4.2 (تیمار شاهد در مرحله اول، دوم و سوم) و Y-4.5 (تیمار شاهد در مرحله چهارم) نیز به طور معنی‌داری در کاهش مقدار آفلاتوکسین M_1 آزاد مؤثر بودند (P<0/05). با این وجود، پتانسیل سم-زدایی تیمارهای شاهد (بدون پروبیوتیک) از تیمارهای حاوی پروبیوتیک کمتر بود.



شکل 1. تغییرات مقدار آفلاتوکسین آزاد (ppb) موجود در نمونه‌های دوغ طی نگهداری یخچالی

(Y= استارترهای سنتی ماست، A= *ل. اسیدوفیلوس*، R= *ل. رامنوسوس*، C= *ل. کازئی*، B= ب. *بیفیدوم*، 7 یا 9= مقدار تلقیح باکتری‌های پروبیوتیک (log cfu/ml)، A= باکتری‌های پروبیوتیک تلقیح شده بصورت زنده، D= باکتری‌های پروبیوتیک تلقیح شده بصورت مرده و 4.2 یا 4.5= pH نهایی تخمیر / منظور از روز صفر، قبل از تخمیر و نگهداری یخچالی است و مقادیر آن، آفلاتوکسین آزادی است که به شیر افزوده شده است. مقادیر سایر روزهای نگهداری یخچالی، آفلاتوکسین آزاد موجود (اندازه‌گیری شده) در نمونه‌ها را نشان می‌دهند).

جدول 1. مقدار کاهش (مقدار باند شدن) آفلاتوکسین آزاد (%) در نمونه‌های دوغ طی نگهداری یخچالی*

	تیمارها**	روز 1	روز 14		روز 28	
		0-1	1-14	0-14	14-28	0-28
مرحله اول	Y-4.2	24/2	13/6	37/8	1/8	39/6
	AY-7-A-4.2	51/2	40/2	91/4	3/8	95/2
	RY-7-A-4.2	39/8	13/8	53/6	2/8	56/4
	CY-7-A-4.2	38/0	12/6	50/6	***-0/4	50/2
	BY-7-A-4.2	46/6	25/6	72/2	3/2	75/4
مرحله دوم	AY-9-A-4.2	61/0	33/0	94/0	5/0	99/0
مرحله سوم	AY-7-D-4.2	64/0	13/6	77/6	0/8	78/4
مرحله چهارم	Y-4.5	26/0	13/4	39/4	-0/8	38/6
	AY-7-A-4.5	50/0	44/4	94/4	4/4	98/8

* منظور از روز صفر، زمان قبل از تخمیر و نگهداری یخچالی است و مقادیر آن، آفلاتوکسین آزادی است که به شیر افزوده شده است. مقادیر سایر روزهای نگهداری یخچالی، آفلاتوکسین آزاد موجود (اندازه‌گیری شده) در نمونه‌ها را نشان می‌دهند.

** Y= استارترهای سنتی ماست، A= *ل. اسیدوفیلوس*، R= *ل. رامنوسوس*، C= *ل. کازئی*، B= ب. *بیفیدوم*، 7 یا 9= مقدار تلقیح باکتری‌های پروبیوتیک (log cfu/ml)، A= باکتری‌های پروبیوتیک تلقیح شده بصورت زنده، D= باکتری‌های پروبیوتیک تلقیح شده بصورت مرده و 4.2 یا 4.5= pH نهایی تخمیر.

*** علامت منفی (-) افزایش مقدار آفلاتوکسین آزاد در نمونه‌ها است.

• بحث

حرارت دادن شیر بازسازی شده آلوده به 0/5 ppb آفلاتوکسین M_1 به مدت 15 min در دمای 90°C برای تولید دوغ، تأثیری بر کاهش مقدار آفلاتوکسین آزاد نداشت (P>0/05). مطالعات مختلفی نیز پایداری آفلاتوکسین‌ها را در فرآیندهای پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون ثابت کرده‌اند (18-20).

مطابق با شکل 1 و جدول 1، در مرحله اول این مطالعه، مشاهده شد که نوع گونه پروبیوتیک در کاهش مقدار آفلاتوکسین M_1 آزاد تأثیر معنی‌دار دارد (P<0/05). به طوری که در این مطالعه، تیمار *ل. اسیدوفیلوس* به طور معنی‌داری بهترین باند کننده آفلاتوکسین بود (P<0/05). محققین بسیاری گزارش کرده اند که اختلاف در توانایی باند کردن گونه‌های مختلف پروبیوتیک به تفاوت گلیکوپروتئین‌ها و پلی ساکاریدهای دیواره سلولی آن‌ها مربوط است (22، 21، 10). بعضی از محققین نیز قدرت تخمیر سریع‌تر یک گونه را نسبت به سایر گونه‌ها در کاهش بیشتر مقدار آفلاتوکسین آزاد مؤثر می‌دانند. به طوری که Pierides و همکاران اعلام کردند که توانایی باند شدن بیشتر آفلاتوکسین M_1 به وسیله *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LC-705 نسبت به *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG به علت تخمیر سریع‌تر آن است (23).

در مرحله دوم این مطالعه، مقایسه بین کاهش مقدار آفلاتوکسین M_1 آزاد بین دو تیمار AY-7-A-4.2 و AY-9-A-4.2 نشان داد که کاهش مقدار آفلاتوکسین با افزایش مقدار تلقیح پروبیوتیک‌ها به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (P<0/05). همچنان که مطابق پژوهش Kabak و Var، توانایی پیوند با آفلاتوکسین M_1 به وسیله باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم در مقدار cfu/ml 10^8 در محیط PBS، با توجه به مقدار آلودگی و مدت زمان گرمخانه‌گذاری، بین 10/22-26/65 درصد متغیر بود. درحالیکه توانایی پیوند این باکتری‌ها با آفلاتوکسین M_1 در مقدار cfu/ml 10^7 با کاهش قابل ملاحظه‌ای به محدوده 0-5/2% رسید (10). مطالعات El-Nezami و همکاران نیز نشان داد که به طور تقریبی جمعیت cfu/ml 2×10^9 برای پیوند آفلاتوکسین B_1 لازم است (24). همچنین Line و Brackett نشان دادند که حداقل cfu/ml 1×10^9 سلول زنده برای پیوند مؤثر آفلاتوکسین B_1 ضروری است (25). در این مطالعه، با توجه به شکل 1 و جدول 1 مشاهده می‌شود که

اگرچه درصد تلقیح بالاتر، سطح آفلاتوکسین را بیشتر کاهش می دهد اما به عنوان تیمار مناسب انتخاب نمی شود. زیرا با توجه به این که در دو تیمار AY-7-A-4.2 و AY-9-A-4.2 درصد کاهش آفلاتوکسین طی 28 روز نگهداری به ترتیب 95/2% و 99% بود، بنابراین با صد برابر کردن تلقیح پروبیوتیک، میزان کاهش آفلاتوکسین M_1 صد برابر نمی شود. به عبارت دیگر، هر سلول پروبیوتیک در تلقیح log cfu/ml 7 به طور نسبی بازدهی بیشتری در کاهش آفلاتوکسین M_1 نسبت به هر سلول پروبیوتیک در تلقیح log cfu/ml 9 دارد. همچنین از نظر صنعتی، در تلقیح log cfu/ml 7، حجم محصول بیشتری را می توان نسبت به تلقیح log cfu/ml 9 تولید کرد. بنابراین صد برابر کردن تلقیح پروبیوتیک، فقط 3/8% مقدار آفلاتوکسین M_1 آزاد را بیشتر کاهش می‌دهد و مقرون به صرفه نیست. بنابراین می-توان با انتخاب متغیرهای مستقل دیگر که باصرفه‌تر هستند (مثلاً در این مطالعه، افزایش pH نهایی تخمیر از 4/2 به 4/5)، این 3/8% کاهش بیشتر را جبران کرد.

در مرحله سوم این مطالعه، داده‌ها در شکل 1 و جدول 1 نشان می‌دهند که در روز اول نگهداری یخچالی، کاهش مقدار آفلاتوکسین M_1 آزاد به وسیله تیمار AY-7-D-4.2 بیشتر از AY-7-A-4.2 ولی در روزهای 14 و 28 نگهداری یخچالی کاهش مقدار آفلاتوکسین آزاد به وسیله تیمار AY-7-A-4.2 بیشتر بود ($P<0/05$). بنابراین زنده بودن پروبیوتیک ها، عاملی ضروری برای کاهش آفلاتوکسین M_1 نیست. احتمالاً چون منظور از کاهش آفلاتوکسین آزاد، باند شدن با پلی ساکاریدها و پپتیدوگلیکان دیواره سلولی پروبیوتیک‌ها است و سم زدایی متابولیکی وجود ندارد، بنابراین پروبیوتیک‌ها علیرغم کشته شدن نیز قابلیت باند شدن را از دست نمی دهند. همان طور که Kabak و Var به نداشتن اختلاف معنی‌دار بین باکتری‌های زنده و تیمار شده گرمایی در باند شدن با آفلاتوکسین M_1 اشاره داشته‌اند (10). از طرفی، بعضی مطالعات نشان داده‌اند که تیمار گرمایی سلول‌های باکتری‌ها توانایی باند شدن را از طریق واکنش میلارد بین پلی ساکاریدها و پپتیدها و پروتئین‌ها افزایش می دهد (27، 26) یا اینکه احتمالاً گرما دادن با افزایش سایز منافذ لایه پپتیدوگلیکان سطح باکتری به افزایش باند کردن کمک می کند. همان طور که داده‌های این مطالعه نشان داد، اگرچه پروبیوتیک مرده، آفلاتوکسین را باند می کند و در روز اول نگهداری یخچالی به طور معنی‌داری آفلاتوکسین M_1 را بیشتر از پروبیوتیک زنده کاهش می دهد ($P<0/05$)، ولی پروبیوتیک‌های زنده همزمان با رشدشان در روزهای 14 و 28 نگهداری یخچالی در تیمار AY-7-A-4.2، لاشه ای از پروبیوتیک‌های مرده را نیز طی نگهداری یخچالی به وجود می آورند. بنابراین وجود تعداد بیشتری سلول زنده و مرده در محیط، تیمار AY-7-A-4.2 را از تیمار AY-7-D-4.2 در روزهای 14 و 28 نگهداری یخچالی در کاهش آفلاتوکسین M_1 مناسب‌تر می کند ($P<0/05$).

در مرحله چهارم این مطالعه، مقایسه تیمار AY-7-A-4.2 (تیمار مناسب مرحله اول، دوم و سوم) با تیمار AY-7-A-4.5 در باند شدن با آفلاتوکسین M_1 آزاد نشان داد که در روز اول نگهداری، اختلافی در باند شدن با آفلاتوکسین نداشتند ($P>0/05$) ولی تیمار AY-7-A-4.5 در روزهای 14 و 28 نگهداری یخچالی به طور معنی‌داری مقدار آفلاتوکسین را بیشتر کاهش داد ($P<0/05$). این در حالی است که Govaris و همکاران اعلام کردند که سطح آفلاتوکسین پس از تخمیر در ماست معمولی (غیر پروبیوتیک) با pH= 4/0 به طور معنی‌داری کمتر از ماست با pH= 4/6 است و کاهش بیشتر مقدار آفلاتوکسین را در ماست با pH کمتر به تولید اسید لاکتیک و ترکیبات اسیدی بیشتر مربوط دانستند (28). احتمالاً در تیمار AY-7-A-4.5 به علت بالا بودن pH نهایی تخمیر، پروبیوتیک‌ها طی تخمیر قبل از رسیدن به مرحله سکون و در مرحله رشد به pH= 4/5 می رسند و طی نگهداری یخچالی فعالتر بوده و قابلیت زیستی بیشتری دارند. این جمعیت بالاتر در pH= 4/5، در نتیجه رشد بیشتر طی نگهداری، علاوه بر پروبیوتیک‌های زنده، پروبیوتیک‌های مرده بیشتری را نیز نسبت به pH= 4/2 در پی دارد و در نهایت به طور معنی‌داری به کاهش آفلاتوکسین بیشتر می انجامد.

همان طور که مشاهده شد با تغییر pH نهایی تخمیر به 4/5، می‌توان باند شدن آفلاتوکسین را به 98/8% رساند. پس می توان با تغییر این فاکتور به جای افزایش تلقیح پروبیوتیک‌ها به نتایج مشابهی رسیده که مقرون به صرفه است.

با توجه به شکل 1 و جدول 1، دو تیمار شاهد Y-4.2 (تیمار شاهد در مرحله اول، دوم و سوم) و Y-4.5 (تیمار شاهد در مرحله چهارم) نیز به طور معنی‌داری در کاهش مقدار آفلاتوکسین آزاد مؤثر بودند. کاهش آفلاتوکسین در این تیمارها به دو دلیل است؛ اولاً در مقالاتی به نقش تخمیر

در کاهش آفلاتوکسین اشاره شده است (30، 29). بطوریکه کاهش pH طی تخمیر، سبب تغییر ساختمان پروتئین‌های شیر مانند کازئین و تشکیل لخته ماست می‌شود. تغییر ساختمان کازئین طی تولید ماست ممکن است در ایجاد پیوند آفلاتوکسین M_1 با این پروتئین تأثیر گذاشته و منجر به جذب یا احتباس توکسین در لخته شود. در مقابل، Van Egmondو همکاران به افزایش بیشتر آفلاتوکسین طی تخمیر اشاره داشته اند (18). ثانیاً استارترهای ماست همانند پروبیوتیک ها، آفلاتوکسین را باند می کنند. Sarimehmetoglu و Kuplulu نیز گزارش کردند که استارترهای ماست در کاهش آفلاتوکسین مؤثرند (31).

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که پروبیوتیک‌ها و فرآوری دوغ در کاهش مقدار آفلاتوکسین آزاد تأثیر معنی‌دار دارند و طی تخمیر و طی دوره نگهداری یخچالی سطح آفلاتوکسین M_1 با تغییر چهار متغیر نوع گونه پروبیوتیک، مقدار تلقیح پروبیوتیک، زنده یا مرده بودن پروبیوتیک‌ها و pH نهایی تخمیر تغییر می کند ($P<0/05$). تیمار AY-7-A- 4.5 با کمترین هزینه پروبیوتیک و بیشترین مقدار کاهش آفلاتوکسین M_1 آزاد، از نظر سلامت‌بخشی و اقتصادی، بهترین تیمار شناخته شد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری بسیار ارزشمند جناب آقای دکترمحمد حسین شجاعی علی آبادی و اعضای محترم آزمایشگاه "علوم حیاتی فاروق" صمیمانه تشکر می‌شود. این مقاله از پایان‌نامه دانشجویی مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استخراج شده است.

• References

1. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Doogh-Specifications and test method. ISIRI no 2453. 2nd revision, Karaj: ISIRI; 2006.
2. Tabari M, Tabari KH, Tabari O. Occurrence of aflatoxin M_1 in pasteurized doogh commercialized in Tehran, Iran. Aust. J. Basic Appl. Sci. 2011;5(12):1734-7.
3. Fallah A, Rahnama M, Jafari T, Saei-Dehkordi S. Seasonal variation of aflatoxin M_1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. Food Control. 2011;22:1653-6.
4. Jay JM. Modern food microbiology, editor. Aspen Publishers Inc. 2000.
5. Fallah AA, Jafari T, Fallah A, Rahnama M. Determination of aflatoxin M_1 levels in Iranian white and cream cheese. Food Chem. Toxicol. 2009;47(8):1872-5.
6. US FDA. Sec.527.400 whole milk, low fat milk, skim milk-aflatoxin M_1 (CPG 7106.210). FDA compliance policy guides. FDA, Washington, DC. 1996; p. 219.
7. The Commission of the European Communities. Commission regulation (EC) No 1525/98 of 16 July 1998 amending Regulation (EC) No 194/97 of 31 January 1997 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. 1998; Communities 201:43-6.
8. Arab M, Sohrabvandi S, Mortazavian AM, Mohammadi R, Rezaei-Tavirani M. Reduction of aflatoxin in fermented milks during production and storage. J. Toxicol., Toxin Rev. 2012;31(3-4):44-53.
9. Piva G, Galvano F, Pietri A, Piva A. Detoxification methods of aflatoxins. Nutr. Res. 1995;15(5):767-76.
10. Kabak B, Var I. Factors affecting the removal of aflatoxin M_1 from food model by Lactobacillus and Bifidobacterium strains. J. Environ. Sci. Health, Part B. 2008;43(7):617-24.
11. El-Nezami H, Mykkanen H, Kankaanpaa P, Suomalainen T, Salminen S, Ahokas J. Ability of mixture of Lactobacillus and Propionibacterium to influence the faecal aflatoxin content in health Egyptian volunteers: a pilot clinical study. Biosci. Microflora. 2000;19:41-5.
12. Kankaanpaa P, Tuomola E, El-Nezami H, Ahokas J, Salminen S. Binding of aflatoxin B_1 alters the adhesion properties of Lactobacillus rhamnosus strain GG in a Caco-2 model. J. Food Prot. 2000;63:412-4.
13. Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Sohrabvandi S, Reinheimer J. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganism in yogurt. Int. J. Dairy Technol. 2009;17:123-7.
14. Mortazavian AM, Ehsani MR, Sohrabvandi S and Reinheimery. MRS-bile agar: Its suitability for the enumeration of mixed probiotic cultures in cultured dairy products. Michwissenschaft. 2007; 62(3):270-2.
15. Sohrabvandi S, Mortazavian AM, Dolatkhahnejad MR and Monfared A. Suitability of MRS-bile agar for the selective enumeration of mixed probiotic bacteria in presence of mesophilic lactic acid

cultures and yoghurt bacteria. Iran. J. Biotech. 2012;10(1):16-21.

16. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Milk and dried milk determination of aflatoxin M_1 content. ISIRI no 4925. Karaj:ISIRI;1996.

17. BS EN ISO 14501. Milk and milk powder. Determination of aflatoxin M_1 content. clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high performance liquid chromatography;2007.

18. Van Egmond HP, Paulsch WE, Veringa HA, Schuller PL. The effect of processing on the aflatoxin M_1 content of milk and milk products. Arch. Inst. Pasteur.1977;4:381-90.

19. Wiseman DW, Marth EH. Behavior of aflatoxin M_1 in yoghurt, buttermilk and kefir. J. Food Prot. 1983;46:115-8.

20. Yousef AE , Marth EH. Stability and degradation of aflatoxin M_1. Mycotoxins in Dairy Products, edited by H.P. van Egmond (NEW York: Elsevier). 1989; pp. 127-61.

21. Peltonen KD, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT. Binding of aflatoxin B_1 by probiotic bacteria. J. Sci. Food Agric. 2000;80(13):1942-5.

22. Hernandez-Mendoza A, Garcia HS, Steele JL. Screening of *lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B_1. Food Chem. Toxicol. 2009;47:1064-8.

23. Pierides M, El-Nezami HS, Peltonen KD, Salminen SJ, Ahokas JT. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M_1 in a food model. J. Food Prot. 2000;63(5):645-50.

24. El-Nezami, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J. Ability of Dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B_1. Food Chem. Toxicol. 1998;36:321-6.

25. Line JE, Brackett RE. Factors affecting aflatoxin B_1 removal by Flavobacterium aurantiacum. J. Food Prot. 1995;58:91-4.

26. El-Nezami HS, Chrevatidis A, Auriola S, Salminen S, Mykkanen H. Removal of common Fusarium toxins in vitro by strains of Lactobacillus and Propionibacterium. Food Addit. Contam. 2002;19:680-6.

27. Haskard C, El-Nezami HS, Kankaanpaa PE, Salminen SE, Ahokas JT. Surface binding of aflatoxin B_1 by lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 2001;67: 2086-3091.

28. Govaris A, Roussi V, Koidis P, Botsoglou N. Distribution and stability of aflatoxin M_1 during production and storage of yoghurt. Food Addit. Contam. 2010;19(11):1043-50.

29. Rasic J, Skrinjar M, Markov S. Decrease of aflatoxin B_1 in yoghurt and acidified milks. Mycopathologia. 1991;113(2):117-9.

30. Hassanin N I. Stability of aflatoxin M_1 during manufacture and storage of yoghurt, yoghurt-cheese and acidified milk. J. Sci. Food Agric. 1994;65:31-4

31. Sarimehmetoglu B, Kuplulu O. Binding ability of aflatoxin M_1 to yoghurt bacteria. Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. 2004;51:195-98.

Effects of probiotic strains and inoculated population, physiology of probiotic bacteria and fermentation final pH on free aflatoxin M_1 binding in Doogh

Sarlak Z[1], Rouhi M[2], Mohammadi R[3], Mortazavian AM[4], Khaksar R[5]*

1- M.Sc Student in Food Sciences and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Ph.D Student in Food Science, Engineering and Technology, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Iran.

3- Ph.D Student in Food Sciences and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*4- *Corresponding author: Associate prof, Dept.of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Email: mortazvn@sbmu.ac.ir*

5- Associate prof, Dept.of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received 2 Oct, 2013 **Accepted 1 Dec, 2013**

Background and Objective: One of the major contaminants of Doogh in Iran is aflatoxin M_1. In this study, the effects of probiotic strains (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* and *B. bifidum*), inoculated probiotic population (7 and 9 log cfu/ml), physiology of probiotic bacteria and fermentation final pH (4.2 and 4.5) at four stages (respectively) on the reduction in 0.500 ppb of free aflatoxin M_1 in Doogh during fermentation and refrigerated storage (5°C) were studied.

Materials and Methods: Doogh milk with 4% of dry matter was made by reconstitution of skim milk powder. The mixture also contained 0.7% of sodium chloride and 0.500 ppb of aflatoxin M_1. After heat treatment, treatments with different starter culture inoculations were prepared. The treatments were incubated until the determined final pH was reached. Immunoaffinity column and HPLC with fluorescence detector were used for extraction and measurement of free aflatoxin M_1, respectively. Data were analyzed by SPSS software.

Results: Treatment with *L. acidophilus* (AY-7-A-4.2) compared to other probiotic strains had highest reduction in free aflatoxin M_1 during fermentation and refrigerated storage. *L. acidophilus* with inoculation of 9 log cfu/ml (AY-9-A-4.2) compared to 7 log cfu/ml (AY-7-A-4.2), had significantly more free aflatoxin M_1 binding capacity.. However, AY-9-A-4.2 was not suitable treatment because of the strongly higher cost. Treatment containing 7 log cfu/ml dead (heat-killed) *L. acidophilus* (AY-7-D-4.2) significantly binded more free aflatoxin M_1 than AY-7-A-4.2 treatment at the first day of storage. However, the live probiotics in AY-7-A-4.2 treatment were more effective in the reduction of free aflatoxin M_1 at day 14 and 28 of storage. Treatment with higher fermentation final pH (AY-7-A-4.5) was more effective on free aflatoxin M_1 binding than AY-7-A-4.2 at day 14 and 28 of storage.

Conclusion: Live cells of *L. acidophilus* with inoculation of 7 log cfu/ml and final fermentation pH of 4.5 showed the highest free aflatoxin M_1 binding capacity during refrigerated storage; meanwhile, it was the best treatment from health and economic points of view.

Keywords: Aflatoxin M_1, Doogh, Physiology, Probiotic