



ISMJ 2015;18(4): 701-710

دوماهنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال هجدهم، شماره ۴، صفحه ۷۱۰ - ۷۰۱ (مهر و آبان ۱۳۹۴)

کاهش زیستی آفلاتوکسین B₁ در آرد گندم با استفاده از مخمر ساکارومایسس سرویزیه

مهسا عظیمی^۱، عیسی غلامپورعزیزی^۲، سمانه روحی^۳، فاطمه زابلی^۴، *^۵

^۱ گروه میکروب‌شناسی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت الله آملی، آمل

^۲ گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل

^۳ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج

^۴ مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی و گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج

^۵ گروه زیست‌شناسی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت الله آملی، آمل

(دریافت مقاله: ۹۳/۲/۲۰- پذیرش مقاله: ۹۳/۵/۲۱)

چکیده

زمینه: مطمئن‌ترین روش کاهش مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی آلوده به آن استفاده از گونه‌های خاصی از میکروب‌ها است. هدف از این مطالعه ارزیابی کاهش زیستی آفلاتوکسین B₁ توسط مخمر ساکارومایسس سرویزیه در نمونه‌های آرد گندم جمع‌آوری شده در شهرستان چالوس (استان مازندران، شمال ایران) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۲۲ نمونه از آرد گندم از لحاظ آلودگی به آفلاتوکسین B₁ به روش الایزا اندازه‌گیری و سپس مخمر ساکارومایسس سرویزیه به آرد گندم اولیه افزوده شد. پس از ۴۸ ساعت برای بار دوم میزان سم به روش الایزا اندازه‌گیری گردید. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۹ و آزمون آماری تی تست استفاده شد.

یافته‌ها: طبق نتایج به‌دست آمده تمامی ۲۲ نمونه از آرد گندم آلوده به آفلاتوکسین B₁ بودند. بیشترین و کمترین غلظت این سم در آرد گندم اولیه یا خام به‌ترتیب ۱۰/۶ و ۱/۱ نانوگرم بر گرم بود. پس از افزودن مخمر ساکارومایسس سرویزیه به آرد گندم مقدار این سم کاهش یافت و به‌ترتیب ۹/۱ و ۰/۵ نانوگرم بر گرم تعیین شد.

نتیجه‌گیری: اثر مهارکنندگی ساکارومایسس سرویزیه و کاهش دادن آفلاتوکسین B₁ در آرد گندم در این تحقیق ثابت شد. بنابراین می‌توان امیدوار بود از مخمر ساکارومایسس سرویزیه به‌عنوان عامل خنثی‌کننده این سم در آرد می‌توان استفاده نمود. مصرف محصولات آلوده به آفلاتوکسین B₁ سلامت مصرف‌کنندگان را به‌مخاطره می‌اندازد، لذا کاهش این سم در مواد غذایی می‌بایست مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: آفلاتوکسین B₁، ساکارومایسس سرویزیه، آرد گندم، الایزا

* آمل، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت الله آملی، آمل، ایران

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه حاصل از قارچ‌های رشته‌ای مختلف هستند که موجب از بین رفتن ارزش غذایی شده و با اثرهای بیولوژیک فراوان و ایجاد بیماری‌های حاد و مزمن مختلف در انسان و حیوان ایجاد خطر می‌کنند (۱-۳).

اکثر مایکوتوکسین‌ها توسط سه جنس معروف *آسپرژیلوس*، *فوزاریوم* و *پنسیلیوم* در انواع غلات مانند: ذرت، پنبه، سویا، برنج و گندم تولید می‌شوند (۴-۶). *آسپرژیلوس فلاووس*، آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*، آفلاتوکسین‌های B_1 ، B_2 و G_1 و G_2 را تولید می‌کند (۴ و ۵).

آفلاتوکسین‌ها در انسان‌ها و حیوانات با اتصال به DNA و جهش‌زایی در ژن P53 (ژن باز دارنده تومور) باعث ابتلا به سرطان کبد و اختلال در سیستم ایمنی می‌شوند. آژانس پژوهشی بین‌المللی سرطان آفلاتوکسین‌ها را در گروه ۱ ترکیبات سرطان‌زا قرار داده است (۶ و ۷). استاندارد جهانی حد مجاز ۲۰-۱۵ نانوگرم بر گرم و استاندارد ایران حد مجاز ۵ نانوگرم بر گرم ($ppb = \mu g/kg$) را برای آفلاتوکسین B_1 در مواد غذایی مورد مصرف انسان تعیین نموده‌اند (۸ و ۹). جهت کاهش میزان این سم در مواد غذایی از روش‌های مختلف شیمیایی، فیزیکی و میکروبی استفاده می‌شود. گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک، پروبیوتیک‌ها، انواع قارچ‌ها و گونه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* از جمله میکروب‌های مورد استفاده در کاهش مایکوتوکسین‌ها به شمار می‌روند (۱۰). از این میان مخمرها دسته‌ای از یوکاریوت‌های تک سلولی و پروبیوتیک می‌باشند. پروبیوتیک‌ها ارگانیسم‌هایی زنده هستند که باعث ایجاد تعادل در جمعیت میکروبی دستگاه گوارش می‌شوند و

معروف‌ترین آن‌ها *ساکارومایسس سرویزیه* است (۱۱-۱۳). این مخمر دارای آنزیم‌های تجزیه کننده مانند استیل ترانسفراز بوده و به این ترتیب در ساختار این سم تغییر به وجود می‌آورد و از خاصیت سمی آن می‌کاهند. همچنین *ساکارومایسس سرویزیه* به علت حضور عامل باند کننده بتا گلوکان و مانان در دیواره سلولی خود قادر به اتصال مولکول‌های این سم به دیواره سلولی خود و بی‌حرکت شدن (کلاته کردن) آن می‌شود و میزان آن را در بدن کاهش می‌دهد (۱۴-۱۶).

مطالعات مختلف حضور و کاهش میزان مایکوتوکسین‌ها را در مواد غذایی را به روش‌های مختلف توسط میکروارگانیزم نشان داده است. سعیدی اصل و صفری در سال ۲۰۱۰ در ایران در نمونه‌های پودر ماهی کیلکا به روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا High Performance Liquid Chromatography (HPLC) میزان آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 را قبل و بعد از تأثیر مخمر *ساکارومایسس* اندازه‌گیری کرده و نشان دادند که توانایی کاهش آفلاتوکسین‌ها توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* برای آفلاتوکسین B_1 ۸۵-۹۱ درصد و برای آفلاتوکسین B_2 ۸۷/۷۰-۸۷/۰۵ درصد بود (۱۷).

حمیدی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایران نشان دادند که *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* و *لاکتوباسیلوس برویس* به ترتیب توانایی جذب و جداسازی ۱۷/۴ و ۳۴/۷ درصد از آفلاتوکسین B_1 موجود در نمونه‌های مواد غذایی، بالینی و محیطی را داشتند. میزان آفلاتوکسین B_1 قبل و بعد از تأثیر میکروبی در تحقیق حمیدی به روش الایزا Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) تعیین شد (۱۸). همچنین در مطالعه

یا بیشتر به وسیله شیکر تکان داده تا به خوبی مخلوط شد. سپس محلول به دست آمده با کاغذ صافی (واتمن ۱) صاف و عصاره جدا گردید (۱۹).

اصول تست الایزا

با استفاده از کیت تشخیصی الایزای رقابتی آگراکوآنت Agraquant (تهیه شده از شرکت رومر Romer سنگاپور)، میزان کمی آفلاتوکسین B₁ در نمونه مطابق با روش ذکر شده در کیت مورد سنجش قرار گرفت. در اولین مرحله ۲۰۰ میکرولیتر کونژوگه آنزیمی به چاهک‌های که به وسیله آنتی‌بادی پوشیده نشده بودند اضافه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر μL از هر محلول استاندارد و عصاره نمونه به چاهک‌های مذکور اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط فوق برداشته و به چاهک‌هایی که به وسیله آنتی‌بادی پوشیده شده بودند انتقال داده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. آفلاتوکسین B₁ در نمونه و استانداردهای کنترل با کونژوگه آنزیمی جهت اتصال به آنتی‌بادی در فاز جامد رقابت کردند. بعد از مرحله شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای آنزیمی به هر چاهک اضافه و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، در نتیجه رنگ آبی در چاهک‌ها مشاهده گردید. غلظت رنگ با غلظت آفلاتوکسین B₁ در نمونه‌ها و استانداردها نسبت عکس دارد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به چاهک‌ها اضافه و رنگ آبی به زرد تبدیل شد. جذب چاهک‌ها در طول موج اولیه ۴۵۰ نانومتر و ثانویه ۶۳۰ نانومتر توسط یک خوانشگر الایزا خوانده شد. غلظت نمونه‌ها در مقایسه با غلظت استانداردها و جذب با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد. اطلاعات به وسیله آزمون تی تست t-test و نرم افزار SPSS (SPSS Inc، Chicago، IL، USA) ویرایش ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

دیگری که در ایران توسط کریمی دستجرد و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد، کروماتوگرافی مایع با فشار بالا جهت تعیین میزان کاهش آفلاتوکسین M₁ توسط لاکتوباسیلوس‌ها در شیر مورد استفاده قرار گرفت و به این ترتیب دامنه کاهش آفلاتوکسین M₁ ۴۷/۶۵-۵۱/۲۶ درصد تعیین گردید (۱۶). غلامپور عزیزی و روحی در سال ۲۰۱۳ در ایران به روش الایزا نشان دادند که از ۳۰ نمونه کلوچه تهیه شده از آرد گندم، ۷/۹ درصد به آفلاتوکسین توتال آلوده بودند (۱۹). گندم و محصولات آن از مهم‌ترین مواد غذایی مورد مصرف در ایران و جهان می‌باشند و با توجه به شرایط آب و هوایی معتدل و مرطوب استان مازندران که برای رشد قارچ مناسب است، ارزیابی و کاهش مایکوتوکسین‌ها در این منطقه ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق تعیین میزان کاهش آفلاتوکسین B₁ در نمونه‌های آرد گندم با استفاده از روش الایزا در حضور مخمر ساکارومایسس سرویزیه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه ۲۲ نمونه از آرد گندم به طور تصادفی در طی سه هفته در فصل بهار و در ماه خرداد در سال ۱۳۹۱ از ۲۲ نانوائی (با کسب اجازه از صاحبان نانوائی‌ها) در شهرستان چالوس (شمال ایران، استان مازندران) جمع‌آوری شد و از نظر وجود آفلاتوکسین B₁ مورد سنجش قرار گرفت.

عصاره‌گیری

در ابتدا ۵ گرم از هر نمونه آرد گندم به وسیله ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری و داخل ۲۲ ارلن به طور جداگانه ریخته شد. در مرحله بعد ۲۵ سی‌سی متانول ۷۰ درصد به ارلن‌های حاوی آرد اضافه و به مدت ۳ دقیقه

کشت مخمر ساکارومایسس سرویزیه

محیط کشت سابارو دکستروز آگار با توجه به دستورالعمل شرکت مربوطه (Merk، آلمان) تهیه و در اتوکلاو برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد گذاشته شد. مخمر ساکارومایسس سرویزیه به صورت آمپول لیوفیلیزه تهیه و آمپول روی تنظیف قرار گرفت. در محلی که پنبه درون آمپول قرار داشت الکل ریخته شد. روی آن را با قلم الماس خط انداخته و دوباره روی همان قسمت الکل ریخته و با تنظیف خشک شد. این کار مانع از کشیده شدن الکل به داخل آمپول هنگام شکسته شدن خلا می شود. با فشار دست آمپول از محل خراش شکسته و با استفاده از پنس استریل پنبه درون آمپول خارج شد. با پیپت پاستور استریل ۰/۳ تا ۰/۴ میلی لیتر از محلول استریل به ماده خشک درون آمپول اضافه و مخلوط شد تا به شکل سوسپانسیون یکنواختی در آید. چند قطره از سوسپانسیون روی پلیت حاوی محیط سابارو دکستروز آگار به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید.

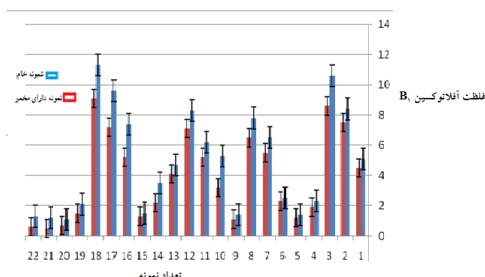
افزودن مخمر ساکارومایسس سرویزیه به آرد گندم

در این مرحله تعداد ۲۲ ارلن تهیه و در هر کدام ۹۷ سی سی آب مقطر جوشیده و ۳ گرم آلژینات سدیم ریخته و مخلوط شد. مقداری از مخمر رشد یافته در لوله حاوی آب مقطر ریخته و مخلوط شد. سپس مخلوط مورد نظر به ارلن های حاوی آلژینات و آب مقطر اضافه شد. سپس کربنات کلسیم ۰/۲ مولار (به ازای ۱ لیتر ۱۰ سی سی) به آن اضافه شد تا اینکه به شکل رشته های ژله ای سفت در آید. در مرحله بعد ۵۰ سی سی از محلول به دست آمده را به عصاره هر کدام از نمونه های آرد افزوده و سپس سر آن ها با پارافیلیم بسته و تکان داده شد. بعد از ۴۸ ساعت به نمونه ها

متانول اضافه و از صافی عبور داده شد. در انتها برای بار دوم مقدار آفلاتوکسین B₁ به روش الیزا سنجیده شد (۱۰).

یافته ها

نتیجه مطالعه ما نشان داد که همه ۲۲ نمونه از آرد گندم مورد بررسی آلوده به آفلاتوکسین B₁ بودند. بیشترین و کمترین غلظت آفلاتوکسین B₁ در آرد گندم خام (آرد گندم اولیه بدون مخمر) مورد بررسی به ترتیب ۱۰/۶ و ۱/۱ نانوگرم بر گرم بود. بعد از تأثیر مخمر ساکارومایسس سرویزیه به آرد گندم بیشترین و کمترین غلظت سم به ترتیب ۹/۱ و ۰/۵ نانوگرم بر گرم تعیین شد. همچنین بیشترین و کمترین درصد کاهش میزان این سم به ترتیب ۵۸/۳۳ و ۸ درصد ارزیابی شد (نمودار ۱، جدول ۱).



نمودار ۱) مقایسه کاهش غلظت آفلاتوکسین B₁ قبل و بعد افزودن مخمر ساکارومایسس سرویزیه به نمونه های آرد گندم (محور عمودی: غلظت آفلاتوکسین B₁ نانوگرم بر گرم) در نمونه های خام و نمونه های حاوی مخمر، محور افقی: تعداد نمونه

نتایج حاصل از آزمون تی تست نیز نشان داد که بین میزان آفلاتوکسین B₁ در آرد گندم اولیه یا خام و کاهش آفلاتوکسین B₁ در آرد گندم حاوی مخمر ساکارومایسس سرویزیه رابطه معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$). بنابراین نتیجه این آزمون یک خروجی است که ضریب همبستگی و سطح معنی داری را ارائه می دهد. ضریب همبستگی برابر با ۰/۹۵ و سطح

جدول ۲) نتایج حاصل از آزمون تی تست برای مقایسه بین آفاتوکسین B₁ در نمونه‌های خام و حاوی مخمر در آرد گندم

مقدار	تفاوت زوج					
P						
	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$
	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$
	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$
	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$
	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$	$\frac{B_1}{\text{خام}}$	$\frac{B_1}{\text{مخمر}}$
۶/۶۱	۴۱	۰/۷۰	۱/۳۴	۰/۱۵	۰/۷۲	۱/۰۲

* میانگین: Mean، انحراف از معیار: Standard Deviation، انحراف از میانگین دو متغیر: Standard Error Mean، فاصله اطمینان ۹۵ درصد: 95% Confidence Interval of the Difference، بالاترین: Upper، پایین‌ترین: Lower، درجه آزادی: df، Degrees of Freedom، t: شاخص آماری تی تست، -p مقدار: Probability Value -p-value

بحث

آفاتوکسین‌ها سموم قارچی هستند و توسط گروهی از قارچ‌ها به ویژه جنس *آسپریلیوس* در اکثر محصولات گیاهی از جمله گندم ایجاد می‌گردند (۲۰). در مطالعه حاضر تعداد ۲۲ نمونه از آرد گندم جمع‌آوری شده از ناوایی‌های شهرستان چالوس از نظر آلودگی به آفاتوکسین B₁ مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی نمونه‌های مورد بررسی آلوده به این سم بودند. همچنین در ۱۱ نمونه آلودگی بیش از ۵ نانوگرم بر گرم که بیشتر از حد مجاز استاندارد ایران بود مشاهده شد اما آلودگی که بیشتر از حد مجازی که استاندارد جهانی جهت بی‌خطر بودن آفاتوکسین B₁ تعیین کرده است وجود نداشت (بر اساس استاندارد ایران، حد مجاز آفاتوکسین B₁ در آرد گندم ۵ نانوگرم بر گرم و بر اساس استاندارد جهانی حد مجاز ۲۰-۱ نانوگرم بر گرم می‌باشد). بیشترین و کمترین غلظت آفاتوکسین B₁ در نمونه‌های مورد سنجش در این تحقیق به ترتیب ۱۰/۶ و ۱/۱ نانوگرم بر گرم تعیین شد. هدایتی و محمدپور در سال ۲۰۰۵ به روش کروماتوگرافی لایه نازک Thin Layer

معنی‌داری برابر با ۰/۰۰ به دست آمد که کمتر از ۰/۰۵ است و این بدان معنی است که فرض صفر رد می‌شود. در نتیجه بین میزان آفاتوکسین B₁ در آرد گندم اولیه که بدون حضور مخمر ساکارومایسس سرویزیه بود و کاهش میزان آفاتوکسین B₁ در آرد گندم حاوی مخمر ساکارومایسس سرویزیه تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۱) غلظت آفاتوکسین B₁ (نانوگرم بر گرم) قبل و بعد افزودن مخمر ساکارومایسس سرویزیه به نمونه‌های آرد گندم

تعداد نمونه	میزان آفاتوکسین B ₁ در آرد گندم	میزان آفاتوکسین B ₁ در آرد گندم حاوی مخمر ساکارومایسس سرویزیه	درصد کاهش میزان آفاتوکسین B ₁
۱	۵/۱	۴/۵	۱۱/۷۶
۲	۸/۴	۷/۵	۱۰/۷۱
۳	۱۰/۶	۸/۶	۱۸/۸۷
۴	۲/۳	۱/۹	۱۷/۳۹
۵	۱/۴	۱/۲	۱۴/۲۹
۶	۲/۵	۲/۳	۸
۷	۶/۵	۵/۵	۱۵/۳۸
۸	۷/۸	۶/۵	۱۶/۶۷
۹	۱/۴	۱/۱	۲۱/۴۳
۱۰	۵/۳	۳/۲	۳۹/۶۲
۱۱	۶/۲	۵/۲	۱۶/۱۳
۱۲	۸/۳	۷/۱	۱۴/۴۶
۱۳	۴/۷	۱/۴	۱۲/۷۷
۱۴	۳/۵	۲/۲	۱۴/۳۷
۱۵	۱/۵	۱/۳	۱۳/۳۳
۱۶	۷/۴	۵/۲	۲۹/۷۳
۱۷	۹/۶	۷/۲	۲۵
۱۸	۱۱/۳	۹/۱	۱۹/۴۷
۱۹	۱/۲	۱/۵	۲۸/۵۷
۲۰	۱/۱	۰/۷	۳۶/۳۶
۲۱	۱/۲	۰/۵	۵۸/۳۳
۲۲	۱/۳	۰/۶	۵۳/۸۴

Chromatography (TLC) در ایران در ۱۱۸ نمونه از گندم نشان دادند که ۲/۵۴ درصد از نمونه‌ها به آفلاتوکسین B_۱ آلوده بودند (۲۱). مهم‌ترین راه ورود آفلاتوکسین به مواد غذایی قارچ‌های توکسین‌زای موجود در آن می‌باشد، در نتیجه رعایت اصول بهداشتی در نگهداری مواد غذایی اهمیت به‌سزایی دارد و علت کاهش مایکوتوکسین‌ها در آن‌ها است. لازم است تلاش و کوشش بیشتری هنگام برداشت اقلام تشکیل دهنده مواد غذایی از مزرعه تا مصرف و ذخیره‌سازی به عمل آید تا میزان آلودگی به کمترین حد ممکن برسد (۲۲). طاهری و همکاران در سال ۲۰۱۲ در ایران به روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا در ۲۰۰ نمونه از آرد گندم گزارش دادند که ۷۷ درصد از نمونه‌ها در زمستان و ۳۳ درصد از نمونه‌ها در تابستان به آفلاتوکسین B_۱ آلوده بودند. در مطالعه طاهری میزان این سم در فصل زمستان از تابستان بیشتر بود و رابطه بین رطوبت و میزان آفلاتوکسین در فصل زمستان مستقیم و قابل توجه بود اما به رغم آلودگی در نمونه‌ها، آلودگی بالاتر از حد مجاز تعیین شده توسط مؤسسه استاندارد ایران وجود نداشت (۲۳ و ۲۴). مطالعات مختلف نشان داده است که بهترین و مطمئن‌ترین روش سم‌زدایی مواد غذایی آلوده به مایکوتوکسین‌ها استفاده از گونه‌های مؤثر میکروبی است که دارای خصوصیت کاهش دادن این سموم می‌باشند (۱۰). از جمله این میکروب‌ها می‌توان به ساکارومایسس سرویزیه، باسیلوس سوتیلیس، لاکتوکوکوس لاکتیس، لاکتوکوکوس سانفرانسیسکو و لوکونوستوک مزوتروئیدس اشاره کرد (۲۵ و ۲۶). در مطالعه حاضر نیز اثر مخمر ساکارومایسس سرویزیه در کاهش آفلاتوکسین B_۱ مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این مخمر در کاهش میزان این سم در

آرد گندم مؤثر است. بعد از افزودن مخمر ساکارومایسس سرویزیه میزان آفلاتوکسین B_۱ در آرد گندم کاهش یافت و بیشترین و کمترین میزان آفلاتوکسین B_۱ به ترتیب ۹/۱ و ۰/۵ نانوگرم بر گرم به‌دست آمد. پرادو (Prado) و همکاران در سال ۲۰۱۱ در برزیل با استفاده از ساکارومایسس سرویزیه در نمونه‌های بادام زمینی نشان دادند که میزان کاهش این سم بعد از استفاده از این مخمر در طی ۷ روز ۷۴/۴ درصد بود. تعیین میزان کاهش این سم قبل و بعد از تأثیر مخمر به روش کروماتوگرافی لایه نازک صورت گرفت (۲۷). ساکارومایسس سرویزیه بر اساس پدیده اتصال سم به دیواره سلولی، تولید آنزیم‌های تجزیه کننده و عمل بیوترانسفورمسیون یا تغییر شکل بیولوژیکی قادر به تبدیل مایکوتوکسین‌ها به مواد کمتر سمی می‌باشد (۲۵ و ۲۶).

در مطالعه دیگر صاحب‌قلم و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ایران گزارش دادند که ساکارومایسس سرویزیه قادر به کاهش دادن میزان آفلاتوکسین B_۱ در خوراک دام می‌باشد و در میانگین غلظت‌های مختلف از این سم بیشترین میزان کاهش آفلاتوکسین B_۱ به ترتیب مربوط به تیمار اسیدی (۳/۴۱ درصد)، تیمار حرارتی (۳/۶۰ درصد) و مخمر زنده (۳/۹۶ درصد) بود. همچنین ارزیابی میزان کاهش این سم در این تحقیق به روش الیزا قبل و بعد از افزودن مخمر انجام گرفت (۱۴).

آرماندو (Armando) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در آرژانتین نشان دادند که مخمر ساکارومایسس سرویزیه توانایی اتصال به آفلاتوکسین B_۱ را در محیط کشت آسپیریلیوس پارازیتیکوس (در شرایط pH برابر با ۶ و ۴، درجه حرارت ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) دارد و این اتصال در حضور اکسیژن کاهش می‌یابد. در

مطالعه آرماندو بیشترین میزان جذب و کاهش آفاتوکسین توسط این میکروارگانیسم در فاز لگاریتمی رشد و دمای ۳۷ درجه بود که به روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا تأیید شد (۲۸). نتایج مطالعات مختلف نشان داده تحت شرایط محیطی متفاوت میزان تجزیه سم تغییر می‌کند.

تیمارهای اسیدی و حرارتی توانایی کاهش را به ترتیب ۶۰ درصد و ۵۵ درصد افزایش می‌دهند. بنابر این می‌توان نتیجه گرفت که شرایط محیطی نیز در روند و میزان اتصال مؤثر است و می‌تواند یکی دیگر از علت‌های تفاوت در میزان کاهش سم در مطالعات مختلف باشد (۱۰). همچنین به‌کارگیری سویه مناسب از مخمر که توانایی رشد و فعالیت ضد قارچی بیشتری را داشته باشد و در مقابل اثرات محیطی مقاوم‌تر باشد مطلوب تر است (۱ و ۲۹).

در مطالعه‌ای که توسط تاج‌آبادی ابراهیمی و همکاران در ایران در سال ۲۰۱۱ انجام شد، میزان آفاتوکسین B₁ در نمونه‌های دوغ و ترخینه به روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا تعیین و مشخص شد که بعد از افزودن سویه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک به نمونه‌ها میزان آفاتوکسین B₁ کاهش یافت (۳۰).

در مطالعه دیگر سلیزوسکا و اسمولیکووسکا (Śliżewska & Smulikowska) در سال ۲۰۱۱ در هلند گزارش دادند که افزودن لاکتوباسیل پاراکاسی، لاکتوباسیل برویس، لاکتوباسیل پلاتناروم و ساکارومایسس سرویزیه به نمونه‌های غلات و گندم میزان آفاتوکسین B₁ را در غلظت‌های بالای این سم که به روش الایزا تعیین شده بود به میزان ۳۹ درصد کاهش داد (۳۱). بیشترین درصد کاهش میزان این سم در مطالعه ما ۵۸/۳۳ درصد ارزیابی شد که در مقایسه با مطالعه سلیزوسکا و اسمولیکووسکا بیشتر بود. در

نتیجه اهمیت به مسئله نیز مهم است که می‌توان اثر سایر میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده آفاتوکسین را بررسی و با هم مقایسه نمود تا بهترین و مؤثرترین نوع شناسایی گردد. با توجه به مطالب گفته شده میزان غلظت و کاهش آفاتوکسین B₁ در مطالعات مختلف با توجه به عوامل مختلف فیزیکی، شیمیایی، محیط منطقه مورد بررسی و نوع گونه و سویه میکروبی به کار گرفته شده جهت کاهش سم می‌تواند متغیر باشد.

همچنین در این تحقیق روش الایزا نسبت به دیگر روش‌های ذکر شده به علت حساسیت، تکرارپذیری، کم هزینه بودن و سرعت بالا جهت تعیین میزان آفاتوکسین B₁ استفاده شد. در مقایسه با روش الایزا سایر روش‌ها مانند کروماتوگرافی مایع با فشار بالا و کروماتوگرافی لایه نازک از تکرارپذیری و صحت بیشتری برخوردار می‌باشند اما در عمل مقایسه بین دو روش نشان می‌دهد که هر دو روش از نظر اتوماتیک بودن و کاربرد در بررسی تعداد زیاد نمونه، مطالعات اپیدمیولوژیک و کنترل کیفی مشابه هم می‌باشند (۳۲).

در نتیجه اختلاف روش‌ها در سنجش میزان مایکوتوکسین نیز می‌تواند یکی دیگر از علت‌های تفاوت در نتایج مختلف باشد. میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک نقش بسزایی در کاهش مایکوتوکسین‌ها دارند که با نتایج به دست آمده در تحقیق ما نیز مطابقت دارد، با این وجود اطلاعات بیشتری جهت روشن شدن اثر سایر گونه‌های پروبیوتیکی، مکانیسم‌های اثر آن‌ها و روش‌های کاهش مایکوتوکسین‌ها مورد نیاز می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق اثر مهارکنندگی ساکارومایسس سرویزیه بر روی آفاتوکسین B₁ در ۲۲ نمونه آرد گندم مورد

مراحل تهیه نان از بین نرفته و در نهایت از طریق زنجیره غذایی وارد بدن انسان شده و در دراز مدت ایجاد عوارض گوناگون می‌کند. از آنجایی که نان جزء مهم‌ترین و ضروری‌ترین مواد غذایی در بین خانواده‌هاست و مصرف آن برای سنین مختلف ضروری است، جهت کاهش مواد مختلف آلوده کننده آن می‌بایست برنامه‌ریزی کرده و سعی و تلاش بیشتر نمود.

ارزیابی قرار گرفت. بیشترین و کمترین میزان آلودگی در نمونه خام اولیه به ترتیب ۱۰/۶ و ۱/۱ نانوگرم بر گرم به دست آمد و بعد از تأثیر مخمر این مقدار به ۹/۱ و ۰/۵ نانوگرم بر گرم کاهش یافت. نتایج این تحقیق بیانگر این مطلب است که میزان آلودگی آرد گندم به قارچ‌های آلوده کننده و سموم آن‌ها نگران کننده است، به خصوص اینکه بعضی از این سموم مقاوم به حرارت بوده و در طی

References:

- Prandini A, Tansini G, Sigolo S, et al. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 984-91.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 497-516.
- Sreenivasa MY, Dass RS, Raj AC, et al. Molecular detection of fumonisin producing fusarium species of freshly harvested maize kernels using polymerase chain reaction (PCR). *Taiwania-Taipei* 2006; 51: 251-7.
- Hadizadeh Moalem SH, Gholampour Azizi I, Azarmi M. Prevalence of aflatoxin B1 in feedstuffs in northern Iran. *Global Vet* 2010; 4: 144-8.
- Sherif SO, Salama EE, Abdel-Wahhab MA. Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. *Int J Hyg Environ Health* 2009; 212: 347-68.
- Zinedine A, Manes J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control* 2009; 20: 334-44.
- Moreno EC, Garcia GT, Ono MA, et al. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Parana State, Brazil. *Food Chem* 2009; 116: 220-6.
- Institute of Standards & Industrial Research of Iran [ISIRI]. Food and feed- mycotoxins: maximum tolerated level, 1st ed. Tehran, Iran. Institute of standards and industrial research of Iran (ISIRI); 2002. (Persian)
- Yazdanpanah H, Zarghi A, Shafaati AR, et al. Analysis of aflatoxin b1 in iranian foods using HPLC and a monolithic column and estimation of its dietary intake. *Iran J Pharm Res* 2013; 12: 83-9.
- Rahaie S, Razavi SH, Emam jomeh Z. The ability of *Saccharomyces cerevisiae* strain in aflatoxin reduction in pistachio nuts. *J Food Sci Technol* 2010; 7: 81-8. (Persian)
- Sarfaraz A, Azizi MH, Hamidi Esfahani Z. Evaluation of lactic acid bacteria and baker's yeast interactions in liquid sourdough fermentation. 18th National Congress on Food Technology, Mashhad, Khorasan Research Institute for Food Science and Technology 2005.
- Khoi A, Beygi M, Asadollahi M. Extracting biclusters from multiple time-series of gene expression profiles. The 17th National & 5th International Iranian Biology Confrence, Martyr of Shahid Bahonar Kerman University, Iranian Society of Biology 2012.
- Golabi M, Tavassoli M, Nahvi I, et al. The study of CO2 production and growth rate in suitable industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for production of bakers yeast. *J Food Sci Technol* 2011; 8: 35-44. (Persian)
- Sahebghalam H, Mohammadi Sani A, Mehraban M. Bio-detoxification of AFB1 in animal feeds using *Saccharomyces cerevisiae*. *J Innovation Food Sci Technol* 2013; 5: 99-104. (Persian)
- Sanjarian F, Mousavi A, Alizadeh A, et al. Evaluation of the yeast acetyltransferase (AYT1) in detoxification of the *F. graminearum* toxin deoxynivalenol in transgenic plants. *Iran J Biol* 2006; 19: 222-32. (Persian)
- Karimi dastjerd A, Tajabadi Ebrahimi M, Sharifan A, et al. Binding ability of some Iranian Native *Lactobacillus* spp. to Aflatoxin M1. *Ournal Microbial Biotech* 2012; 4: 7-12. (Persian)
- Saeidi AM, Safari R. Evaluation of inhibitory effect of *Saccharomyces cerevisiae* on B1 and B2 aflatoxins in culture media and Kilka fish meal. *Iran comparis Biophatol* 2010; 7: 223-32. (Persian)
- Hamidi A, Didehdar M, Jafari P, et al. The Survey of Potential of B1 Aflatoxin Isolation

- by Lactic Acid Bacteria. J Microbial Biotech 2011; 3: 13-8. (Persian).
19. Gholamour Azizi I, Rouhi S. The comparison of total fumonisin and total aflatoxin levels in biscuit and cookie samples in Babol City, Northern Iran. Iran J Publ Health 2013; 42: 422-7.
 20. Gholampour Azizi I, Khoushnevis SH, Hashemi SJ. Aflatoxin M1 level in pasteurized and sterilized milk of Babol city. Tehran Univ Med J 2007; 65: 20-4. (Persian)
 21. Hedayati MT, Mohammad Pour A. Contamination rate of *Aspergillus flavus* and aflatoxin f wheat samples in Mazandaran province Store (2002). J Kermansha University Med Sci 2005; 9: 52-62. (Persian)
 22. Roohi S, Gholampour Azizi I, Hashemi M. Fumonisin contamination based on flour quality used in bakeries and confectioneries in Qaemshahr (city of the Northern Iran). Afr J Microbiol Res 2012; 6: 1815-18.
 23. Taheri N, Semnani S, Roshandel G, et al. Aflatoxin contamination in wheat flour samples from Golestan Province, Northeast of Iran. Iran J Publ Health 2012; 41: 42-7.
 24. Hashemi M, Gholampour Azizi I, Rezai Z, et al. Mycological survey and total aflatoxin analyze in silage from Qaemshahr City (Northern Iran). J Chem Health Risks 2012; 2: 51-6.
 25. Benedetti R, Nazzi F, Locci R, et al. Degradation of fumonisin B1 by a bacterial strain isolated from soil. Biodegradation 2005; 17: 31-8.
 26. Upadhaya SD, Park MA, Ha JK. Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: a review. Asian-Aust J Anim Sci 2010; 23: 1250-60.
 27. Prado G, Madeira JE, Morais VA, et al. Reduction of aflatoxin B1 in stored peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using *Saccharomyces cerevisiae*. J Food Protect 2011; 74: 1003-6.
 28. Armando MR, Dogi CA, Rosa CAR, et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains and the reduction of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production at different interacting environmental conditions, in vitro. Food Add Contamin: Part A 2012; 29: 1443-9.
 29. Khorasanchi N, Peighambari SH, Golshan Tafti A, et al. Evaluating the ability of liquid sourdough containing *L. plantarum* and *L. reuteri* starters in inhibition of bread mold spoilage. J Food Res 2012; 21: 391-400.
 30. Tajabadi Ebrahimi M, Jafari P, Bahrami H, et al. Evaluation of aflatoxin B1 reduction in present of lactobacilli isolated from Tarkhineh and fermented milk of Tarkhineh by ELISA. Q J Biol Sci 2011; 8: 43-8. (Persian)
 31. Śliżewska K, Smulikowska S. Detoxification of aflatoxin B1 and change in microflora pattern by probiotic in vitro fermentation of broiler feed. J Anim Feed Sci 2011; 20: 300-9.
 32. Allameh A, Razzaghi-Abyaneh M. Mycotoxins: mycological, chemical and environmental aspects. 1th ed. Emam Hossein University, Tehran, Iran, 2001, 698. (Persian)

Original Article

Biological reduction of aflatoxin B₁ in wheat flour using yeast *Saccharomyces cerevisiae*

*M. Azimi*¹, *I. Gholampour Azizi*², *S. Rouhi*^{3,4}, *F. Zaboli*^{5*}

¹ Department of Microbiology, Faculty of Food Industry, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran

² Department of Mycology, Faculty of Nursing and Midwifery, Islamic Azad University Babol Branch, Babol, Iran

³ Student Research Committee, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

⁴ Cellular & Molecular Research Center and Microbiology Department, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

⁵ Department of Biology, Faculty of Food Industry, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran

(Received 10 May, 2014 Accepted 12 Aug, 2014)

Abstract

Background: The safest way to reduce mycotoxins in contaminated foods with it; it is using certain strains of various microbes. Aim of this study is biological reduction of aflatoxin B₁ by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) in wheat flour samples that were collected in Chaloos city (Mazandaran province, North Iran).

Material and Methods: Aflatoxin B₁ contamination was measured by ELISA method in 22 samples of wheat flour. Then *S. cerevisiae* was added to primary wheat flour. After 48 h aflatoxin B₁ contamination in samples were measured by ELISA, again. For statistical analysis, the statistical software SPSS18 and t-test was used.

Results: all 22 samples of wheat flour were contaminated with aflatoxin B₁. The minimum and maximum levels of aflatoxin B₁ in primary wheat flour were 1.1 and 10.6 ppb, respectively. *S. cerevisiae* reduced the amount of aflatoxin B₁ in wheat flour samples. Minimum and maximum amount of aflatoxin contamination after adding *S. cerevisiae* was 0.5 and 9.1 ppb, respectively.

Conclusion: Inhibitory effect of *S. cerevisiae* and aflatoxin B₁ reduction in wheat flour was proved in this study. Therefore we can be hoped that yeast *S. cerevisiae* as neutralizing agents can be used in flour for this toxin. Consumption of products that contaminated with aflatoxin B₁ endangers consumers' health, thus reducing of this toxin in the food should be considered.

Key words: Aflatoxin B₁, *Saccharomyces cerevisiae*, Wheat Flour, ELISA

*Address for correspondence: Fatemeh Zaboli, Department of Biology, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran; E-mail: microbiol_sci@yahoo.com