مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد اول، شماره سوم، پاییز ۸۸
۵۱-٦٤
www.ejfpp.info

توانایی سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG (LBGG) جهت کاهش آفلاتوکسین B_1 موجود در پسته

***سمیه رهایی[۱]، زهرا امام‌جمعه[۲]، سیدهادی رضوی[۲] و منصوره مظاهری[۳]**

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تهران، [۲]دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تهران، [۳]کارشناس‌ارشد مهندسی شیمی، مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱/۲۷

چکیده

در این پژوهش، توانایی اتصال آفلاتوکسین به *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* زیر گونه *GG* به‌منظور کاهش سمیت آفلاتوکسین برروی نمونه‌های پسته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بیانگر این بود که در غلظت اولیه ppb ۱۰ آفلاتوکسین، باکتری در فاز لگاریتمی می‌تواند با حدود ۳۵ درصد از آفلاتوکسین موجود اتصال برقرار کند. تیمارهای اسیدی و حرارتی، این توانایی را به‌حدود ۸۵ درصد افزایش دادند. در غلظت دوم آفلاتوکسین (ppb ۲۰) این توانایی اتصال به‌ترتیب برای باکتری‌های زنده به‌حدود ٦۰ درصد و تحت تیمار اسیدی و حرارتی به‌میزان ۹۰ درصد افزایش یافت. به‌نظر می‌رسد اتصال آفلاتوکسین به باکتری یک پدیده فیزیکی باشد که در مدت ۳-۲ ساعت ابتدای فرآیند به حداکثر مقدار خود می‌رسد. براساس داده‌های به‌دست آمده، تثبیت باکتری برروی پسته آلوده به آفلاتوکسین در جهت کاهش سم، تأثیری بر فاکتور رنگ و عدد پراکسید نداشت. نتایج نشانگر آن بود که سلول‌های باکتری، زنده یا غیرزنده، متصل‌کننده مؤثر آفلاتوکسین می‌باشند و این ویژگی به‌خصوص در غذاهایی که میزان بالای آفلاتوکسین در آن‌ها یک عامل مخاطره‌آمیز محسوب می‌شود، قابل‌توجه است.

واژه‌های کلیدی: پسته، آفلاتوکسین B_1، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*

* مسئول مکاتبه: s_rahaiee@yahoo.com

مقدمه

پسته یکی از محصولات صادراتی ایران که به‌عنوان طلای سبـز شهـرت جهـانی دارد و از نظر استراتژیکی از جایگاه خاصی در بین تولیدات کشاورزی برخوردار می‌باشد. پسته با سطح زیر کشت ۳۵٤ هزار هکتار مقام اول را در جهان دارا می‌باشد و سالانه با صدور بیش از ۱۰۰ هزار تن پسته بیش‌تر از ٤۰۰ میلیون دلار ارزآوری برای کشور دارد (سایت فائو). محصولات پسته در معرض خطر آلودگی با قارچ آسپرژیلوس به‌ویژه دو گونه *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* قرار دارند که اهمیت این مسأله به متابولیت ثانویه حاصل از فعالیت این قارچ‌ها یعنی سم آفلاتوکسین (B_1، B_2، G_1 و G_2) برمی‌گردد (چراغعلی و همکاران، ۲۰۰٦). پسته‌هایی که دارای پوسته سالم و صدمه ندیده هستند به‌ندرت توسط آفلاتوکسین‌ها آلوده می‌شوند، اما اگر پوسته آسیب ببیند مغز پسته به سرعت به آلودگی قارچی مبتلا می‌شود. سنتز آفلاتوکسین وابسته به شرایط محیطی از جمله رطوبت، دما، سوبسترا و رقابت با دیگر میکروارگانیسم‌های هوازی و یا شرایط ژنتیکی پسته می‌باشد (عبدالقادر و همکاران، ۲۰۰۰).

تحت دما و شرایط رطوبتی مناسب این قارچ‌ها و سموم‌شان روی مواد غذایی خاص نظیر دانه‌های درختی از جمله پسته، بادام، شاه‌بلوط و گردو، همچنین در ذرت، بادام‌زمینی، پنبه‌دانه، نارگیل خشک، ادویه‌جات و غلات رشد می‌کنند. تاکنون ۱۸ نوع آفلاتوکسین مورد شناسایی قرار گرفته است که از این میان نوع B_1 سمی‌تر و خطرناک‌تر است (چراغعلی و همکاران، ۲۰۰٦).

در بررسی‌های انجام شده، مشخص شده است که LD_{50} انواع افلاتوکسین‌ها به عواملی مانند سن، جنسیت، نژاد، راه ورود به بدن، ترکیب رژیم غذایی و... بستگی دارد. براساس پژوهش‌های عمل آمده، LD_{50} سم برای بیشتر گونه‌های حیوانی ۱۰-۰/۵ درصد میکروگرم به‌ازای کیلوگرم وزن بدن گزارش شده است (پارک و همکاران، ۲۰۰۰).

اهدافی که در راستای مبارزه با آفلاتوکسین و استفاده از روش‌های مختلف باید مورد نظر قرار گیرد شامل:

۱) حفظ ارزش غذایی محصول، ۲) تغییر نکردن خواص ماده غذایی، ۳) حذف یا تخریب و یا غیرفعال کردن سم، ٤) اقتصادی بودن روش.

امروزه از روش‌های متعددی برای جداسازی آفلاتوکسین استفاده می‌کنند که می‌توان از روش‌های فیزیکی، روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی نام برد. بسیاری از این روش‌ها در صنعت به‌دلیل هزینه بالا،

راندمان پایین و یا تأثیر در بافت و طعم پسته قابل استفاده نیستند. آفلاتوکسین‌ها به حرارت مقاومند و دیگر روش‌های فیزیکی چندان کارا نیستند. استفاده از مواد شیمیایی مختلف برای از بین بردن آفلاتوکسین‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفته، اما باقی‌مانده بعضی از این ترکیبات ممکن است مشکلاتی از نظر ایمنی و سلامت غذایی ایجاد کنند. از طرفی روش‌های شیمیایی باعث کاهش ارزش غذایی پسته می‌شوند (پارک و لیانگ، ۱۹۹۳؛ بتا و لاستیتی، ۱۹۹۹). بیشتر محققان معتقدند که بهترین روش برای سم‌زدایی، استفاده از گونه‌های مؤثر میکروبی است که دارای توانایی کاهش آفلاتوکسین در شرایط آسان و راحت بوده، بدون این‌که از مواد شیمیایی مضر استفاده شود و یا کاهشی در ارزش مواد تغذیه‌ای دیده شود (بتا و لاستتیتی، ۱۹۹۹؛ شتی و جسپرسن، ۲۰۰۶؛ نظامی و همکاران، ۱۹۹۸).

بر طبق مطالعات انجام شده میکروارگانیسم‌هایی مانند *Saccharomyces cerevisiae*، *Flavobacterium auranticum* و گونه‌های لاکتوباسیلوس از جمله *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus rhamnosus* و دیگر زیرگونه‌ها توانایی تجزیه و باند کردن آفلاتوکسین‌ها را دارند. توانایی آن‌ها به ساختار دیواره سلولی آن‌ها وابسته است (کویلمن و همکاران، ۲۰۰۲). غلظت‌های باکتریایی جهت خروج آفلاتوکسین B_1 باید بالاتر از 10^9 سلول بر میلی‌لیتر باشد.

محدوده مقررات جهانی برای آفلاتوکسین کل ۵۰-۰ میکروگرم در گرم و برای آفلاتوکسین B_1، ۳۰-۰ میکروگرم در گرم گزارش شده است (سوک‌چون و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین براساس اجلاس کدکس بین‌المللی در هلند در سال ۲۰۰۸، حد مجاز آفلاتوکسین برای پسته خام ppb ۱۵ و برای پسته فرآوری شده (خشکبار) معادل ppb ۱۰ تعیین شد. با توجه به این‌که مصرف درازمدت آفلاتوکسین‌ها در انسان اثرات موتاسیون‌زایی، سرطان‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی را به دنبال دارد و از طرفی پسته و فرآورده‌های آن مورد مصرف اکثریت قریب به اتفاق مردم می‌باشند، بنابراین بررسی وجود این سموم در پسته می‌تواند وسعت و اهمیت مسأله را نشان دهد. این پژوهش با هدف بررسی توانایی آفلاتوکسین‌زدایی توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* زیرگونه *GG* (*LBGG*) تثبیت شده بر پسته انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه محلول‌ها و گونه باکتری: محلول استاندارد آفلاتوکسین از Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) و محلول بافر فسفاته، متانول، کلروفرم، استون، هگزان نرمال، استونیتریل، پتاسیم بروماید

و محیط کشت MRS مایع[1] از شرکت مرک (اشتوتگارت، آلمان) خریداری شد. آلژینات سدیم از شرکت بی‌دی‌اچ (دبی، امارات‌متحده) و کلرید کلسیم از شرکت اسکارلو (آلمان) تهیه گردید.

لاکتوباسیلوس رامنوسوس زیرگونه *GG* (L.GG ATCC 53103) به‌صورت پودر خشک شده به روش انجمادی از شرکت پروبیوتیکال (ایتالیا) فراهم گردید.

تهیه پسته: رقم اکبری، رقم انتخابی در این مطالعه، یکی از ارقام تجاری پسته است که از نظر اقتصادی دارای بالاترین ارزش می‌باشد. میوه‌های آن بادامی‌شکل، کشیده و درشت هستند و از مراکز پسته فروشی در کرج تهیه گردید.

آماده‌سازی کشت: پس از کشت، گونه باکتری در محیط MRS broth در جار بی‌هوازی (استفاده از گاز پک) قرار گرفت و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. برای تعیین زمان مناسب جهت برداشت غلظت ۲×۱۰^{۱۰} سلول بر میلی‌لیتر باکتری از محیط کشت فوق جهت انجام آزمایش‌ها در پژوهش، نیاز به رسم منحنی رشد باکتری بود. بنابراین در فواصل زمانی مناسب (معمولاً یک‌ساعته) از محیط کشت باکتری نمونه‌گیری صورت گرفت و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۰۰ نانومتر دانسیته نوری (OD) خوانده شد و در همان زمان از نمونه یادشده کشت سلولی انجام گرفت و سپس منحنی دانسیته نوری در مقابل تعداد باکتری‌ها رسم گردید. در طی انجام پژوهش با حفظ شرایط رشد مشابه با حالت اولیه و با توجه به منحنی، غلظت لازمه باکتری از محیط کشت برداشت گردید. قابل ذکر است که پس از هر بار نمونه‌گیری، شرایط بی‌هوازی برای باکتری کاملاً مهیا بود. برای بررسی توانایی سلول‌های زنده، ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت دارای باکتری در مرحله لگاریتمی برداشت نموده و در ۷۳۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و دو بار با محلول بافر فسفاته شستشو گردید.

جهت بررسی توانایی سلول‌های غیرزنده در کاهش سم آفلاتوکسین، دو تیمار اسیدی و حرارتی استفاده شد. جهت انجام تیمار حرارتی، پس از برداشت سلول در مرحله رشد لگاریتمی و عمل سانتریفوژ کردن، ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفاته افزوده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. آنگاه با محلول بافر فسفاته شستشو داده و سانتریفیوژ گردید. برای تیمار اسیدی، سلول‌های باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محلول اسید کلریدریک ۲ مولار برای زمان ۹۰ دقیقه در ۱۵۰ دور بر دقیقه درون انکوباتور شیکردار قرار گرفتند و مراحل ذکرشده در تیمار قبلی

1- De Man-Rogosa-Sharp

تکرار شد. در هر سه تیمار بعد از شستشو با محلول بافر فسفاته و سانتریفیوژ شدن، ۲ میلی‌لیتر محلول آب نمک ۰/۹ درصد به آن‌ها افزوده و هموژن شدند (شتی و همکاران، ۲۰۰۶).

تثبیت باکتری بر پسته: جهت تهیه محلول آلژینات سدیم ۳ درصد، به‌میزان ۳ گرم آلژینات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. میزان ۲×۱۰^{۱۰} سلول بر میلی‌لیتر سلول‌های هر تیمار (مخمر زنده در مرحله لگاریتمی، تیمار شده با حرارت و تیمار شده با اسید) پس از جمع‌آوری و حل شدن در محلول آب نمک به روش ذکرشده در بالا، به محلول آلژینات آماده شده اضافه گردید (بشای، ۲۰۰۳؛ پینادو، ۲۰۰۶). نمونه‌های پسته پوست‌گیری شده پس از آلوده شدن با محلول آفلاتوکسین (در دو سطح غلظت ppb ۱۰ و ppb ۲۰) توسط دستگاه کروماتوگرافی جهت اطمینان از میزان آلودگی مورد نظر (میزان اولیه افلاتوکسین) آنالیز گردیدند و آنگاه با محلول آلژینات سدیم تهیه شده، پوشش داده شدند. سپس جهت تثبیت سلول‌ها در آلژینات، بلافاصله نمونه‌های پسته در محلول کلرید کلسیم ۰/۲ مولار غوطه‌ور شدند. آنگاه پسته‌های پوشش داده شده برای ۱/۵، ۳، ۸ و ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. جهت آنالیز، پس از ساعات ذکرشده نمونه‌برداری انجام شد.

آنالیز آفلاتوکسین: آنالیز پسته‌ها جهت وجود یا نبود آفلاتوکسین در مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام شد. از دستگاه HPLC مدل Waters 2475، با ستون C18 مدل Novapak و آشکارساز مدل Multi and fluroscence detector در این پژوهش استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری آفلاتوکسین از استاندارد شماره ٦٨٧٢ استفاده شد (استاندارد ملی ایران، ۲۰۰۳).

جهت استخراج آفلاتوکسین از نمونه‌های پسته، ۵۰ گرم پسته با ۵ گرم نمک و ۱۰۰ میلی‌لیتر هگزان و ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول آسیاب شد. پس از سانتریفیوژ کردن، ۲۰ میلی‌لیتر از محلول رویی صاف شده آن را با ۱۳۰ میلی‌لیتر آب مخلوط کرده و برای ۵ دقیقه هم‌زده شد. محلول را با کاغذ GF صاف کرده و ۷۰ میلی‌لیتر آن از ستون Aflatest عبور داده شد. ستون را با ۱۵ میلی‌لیتر محلول بافر فسفاته و ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده و در نهایت با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول آفلاتوکسین را جمع‌آوری کرده و ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و سپس با HPLC آنالیز انجام گرفت (چراغعلی و همکاران، ۲۰۰۶):

درصد باند شدن آفلاتوکسین=$\{$(میزان آفلاتوکسین در نمونه / میزان آفلاتوکسین در محلول)-۱$\}\times$ ۱۰۰

قابل ذکر است که پس از آلوده شدن نمونه‌های پسته به افلاتوکسین براساس استاندارد شماره ۱۰۳٦، در جهت اطمینان از صحت میزان آلودگی نمونه‌برداری صورت گرفت (استاندارد ملی ایران، ۱۹۹۷).

ارزیابی ریزساختار: جهت انجام مطالعات مورفولوژی سلول‌های تثبیت شده باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در شبکه آلژینات، از میکروسکوپ نوری مدل Axiophot, Zeiss ساخت آلمان استفاده شد.

اندازه‌گیری رنگ پسته: رنگ نمونه‌های پسته توسط دستگاه هانترلب مدل Konica Minolta ساخت کشور ژاپن، براساس فاکتورهای L^*، a^* و b^* اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری عدد پراکسید: اندازه‌گیری عدد پراکسید با توجه به مقدار بالای چربی پسته، بر طبق روش اندازه‌گیری پراکسید در چربی‌ها انجام شد (AOAC روش شماره ۳۳ و ۹٦۵).

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش آزمایش‌ها براساس طرح کاملاً تصادفی طراحی و هر آزمایش ۳ بار تکرار لحاظ شده و داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) گزارش گردیدند. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار MSTATC استفاده شد.

نتایج و بحث

باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (*LGG*) یک میکروارگانیسم مناسب دارای اثرات محافظتی جهت مصرف انسانی می‌باشد که قادر است به AFB_1 متصل شود و بنابراین جذب سریع آن را از روده کاهش دهد. ترکیبات پروتئینی و کربوهیدراتی موجود در سطح باکتری در اتصال به آفلاتوکسین اهمیت دارند و تیمار گرمایی نمی‌تواند این باند شدن را کاهش دهد (گرتز و همکاران، ۲۰۰۷). همان‌طورکه در شکل ۱ و ۲ دیده می‌شود اتصال آفلاتوکسین به باکتری فرآیند سریعی است که در فاصله زمانی ۳-۲ ساعت به حداکثر مقدار خود رسید. حرارت دادن حتی در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برای زمان ۲۰ دقیقه قدرت باند کردن را در باکتری افزایش داد که به‌ترتیب برای غلظت اول و دوم آفلاتوکسین به‌حدود ۸۵ درصد و ۹۰ درصد رسید.

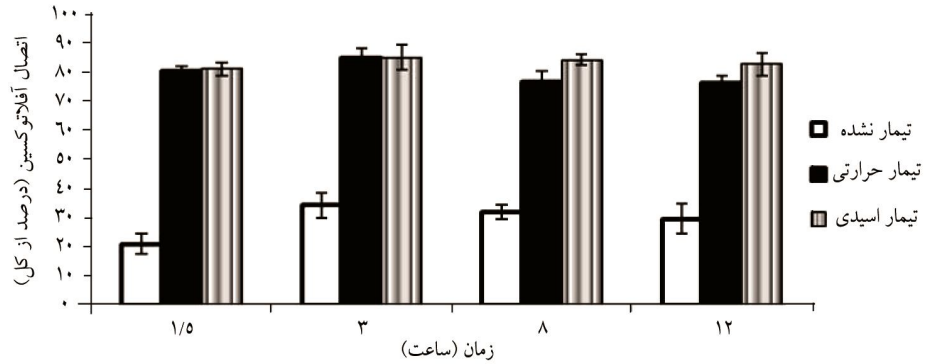
تیمار سلول‌های گونه باکتری با اسیدکلریدریک ۲ مولار برای ۹۰ دقیقه در دمای اتاق، قدرت اتصال آفلاتوکسین را به‌حدود ۹۰ درصد رسانید. به‌نظر می‌رسد که اتصال AFB_1 توسط گونه باکتری

زنده و تیمار حرارتی شده یک پدیده خارج سلولی است. براساس پژوهش‌های گذشته پلی‌ساکاریدها و پپتیدوگلیکان‌های دیواره سلولی دو عنصر اصلی قابل انتظار برای اتصال موتاژن‌ها به LAB هستند که هر دو این ترکیبات در جهت مؤثر واقع شدن در اتصال به موتاژن‌ها به شدت تحت‌تأثیر تیمار اسیدی و حرارتی قرار می‌گیرند. حرارت باعث دناتوره پروتئین یا تشکیل محصولات واکنش میلارد بین پلی‌ساکاریدها و پروتئین یا پپتیدها می‌شود. همچنین اسید می‌تواند پیوندهای گلیکوزیدیک را در پلی‌ساکاریدها بشکند و منومر آزاد شود که بعداً به آلدئید تبدیل گردد و در ادامه پیوندهای پپتیدی را شکسته و ترکیبات آمینواسیدی را آزاد کند. اگرچه لایه پپتیدوگلیکان کاملاً در این ارگانیسم‌ها ضخیم است، اما ممکن است در این حالت یک کاهش ضخامت در آن اتفاق افتد و کاهش در اتصالات عرضی و یا افزایش اندازه روزنه در آن دیده شود (هاسکارد و همکاران، ۲۰۰۱).

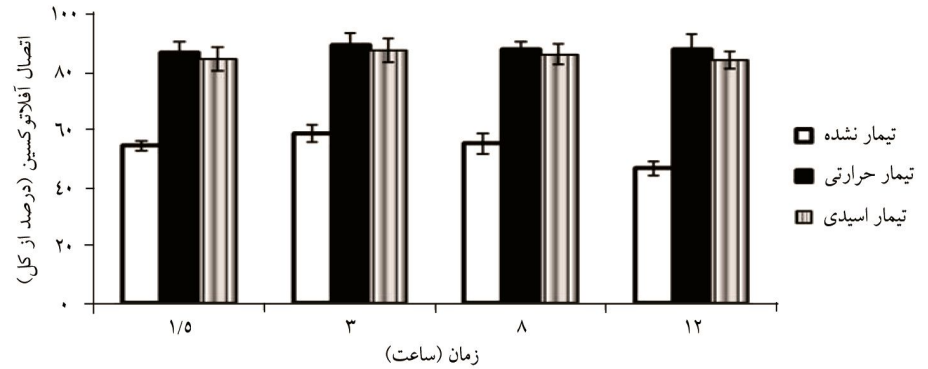
آزمایش‌های انجام شده با آنزیم‌های پروناز E، لیپاز و M- periodate بر اتصالات بین باکتری و آفلاتوکسین نشان داد که غالب اتصالات با ترکیبات پروتئینی و کربوهیدراتی صورت می‌گیرند. آنزیم Periodate باعث اکسیداسیون گروه‌های هیدروکسیل به آلدئیدها و گروه‌های کربن- اسید شده که بیش‌ترین کاهش در اتصال AFB_1 به باکتری ایجاد می‌کند و در واقع نشان می‌دهد که غالب اتصالات با ترکیبات کربوهیدراتی باکتری صورت می‌گیرد. البته در استفاده از آنزیم‌ها، آزادسازی آفلاتوکسین باند شده به باکتری به‌طور کامل کاهش نمی‌یابد که در واقع بیانگر درگیری ترکیبات دیگر است. با استفاده از آنزیم لیپاز مشخص شد که ترکیبات لیپیدی مؤثر نیستند. اتصال به باکتری به‌صورت $AFB_1 > AFB_2 > AFG_1 > AFG_2$ می‌باشد که مرتبط با کاهش یافتن قطبیت ترکیبات و سازگار با واکنش‌های هیدروفوبیک بوده که در اتصال نقش اساسی ایفا می‌کنند (سامینن و همکاران، ۲۰۰٤؛ هاسکارد و همکاران، ۲۰۰۰). اگر یک سلول باکتریایی آفلاتوکسین بیشتری جذب نماید، مولکول آفلاتوکسین به‌مدت طولانی‌تر در سطح سلول باقی می‌ماند (لی و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین ممانعت رقابتی غیرمستقیم در ELISA نشان می‌دهد که ترکیبات سطحی در دیواره باکتری‌های لاکتیک اسید، در اتصال آفلاتوکسین درگیر هستند (هاسکارد و همکاران، ۲۰۰۱).

آسیب‌دیدگی و یا ایجاد تخریب در دیواره سلولی باکتری می‌تواند باعث آشکار شدن مکان‌های اتصال غیرقابل دسترس شده و ممکن است اجازه اتصال AFB_1 را به دیواره سلولی و ترکیبات غشای پلاسمایی بدهد، در مقایسه با زمانی که باکتری کاملاً سالم است و مکان‌های اتصال در دسترس نیستند.

در استفاده از تیمار اسیدی احتمال می‌رود که شکل ساختاری از حالت یک‌پارچگی خارج شده، بنابراین اجازه اتصال AFB_1 به ترکیبات درون سلولی داده شود. این موضوع در زمان استفاده از آنتی‌بادی جهت آنالیز AFB_1 در باکتری تحت تیمار اسیدی مشخص شد، که از ورود آنتی‌بادی جلوگیری کرده زیرا اندازه مولکول آنتی‌بادی بزرگ بوده و قدرت عبور از دیواره سلولی باکتری و اتصال به مولکول AFB_1 در دیواره داخلی ندارد (هاسکارد و همکاران، ۲۰۰۱). بنابراین براساس مطالعات قبلی و داده‌های پژوهش انجام شده، نتایج مشابه بین سلول زنده و غیرزنده نشان می‌دهد در ایجاد اتصالات، زنده‌مانی میکروارگانسیم چندان مؤثر نیست و همچنین در حالت تیمار اسیدی ممکن است میزانی از اتصالات به‌صورت درون‌سلولی باشد و در مقایسه با تیمارهای دیگر (حرارت و لگاریتمی)، سلول‌های باکتریایی درصد اتصال بالاتری از سم آفلاتوکسین را به خود نشان می‌دهند. اطلاعات حاضر بر خصوصیات سطحی باکتری LGG بسیار محدود است و مطالعات بیش‌تری جهت توضیح مکانیسم‌های اتصال نیاز است و باید به‌صورت اساسی پایداری ترکیب سم و باکتری را در حالت *In vivo* بررسی نمود. اگرچه مطالعات حیوانی نشان داد که اتصال آفلاتوکسین B_1 به‌وسیله باکتری‌های پروبیوتیک، جذب بافتی AFB_1 را در دوازدهه جوجه کاهش می‌دهد (گرتز و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین در طی یک بررسی انجام شده ملاحظه گردید کمپلکس باکتری/ آفلاتوکسین می‌تواند به‌طور مؤثری از روده مرغ عبور کند بدون این‌که شکسته شود و یا در ارتباط با گونه باکتری لاکتو*باسیلوس رامنوسوس*، وقتی به AFB_1 متصل شود، چسبندگی آن به لوله گوارش کاهش می‌یابد (شتی و همکاران، ۲۰۰۶). اسید معده، آنزیم‌های روده‌ای و مخاط روده‌ای مزاحمتی بر اتصال AFB_1 توسط گونه پروبیوتیک *LGG* ایجاد نمی‌کنند (گرتز و همکاران، ۲۰۰۶). در پایان باید یادآور شد که با توجه به مطالعات محدود در زمینه کاهش آفلاتوکسین به‌وسیله گونه‌های میکروبی، هنوز نکات مبهمی وجود دارد که باید در پژوهش‌های آینده روشن گردد و همچنین با توجه به اثرات اتصال سم آفلاتوکسین و ممانعت از هر گونه اثر زیان‌آور طولانی‌مدت کمپلکس سم- باکتری متصل شده به مخاط روده‌ای، مطالعه خصوصیات چسبندگی لاکتوباسیلوس‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

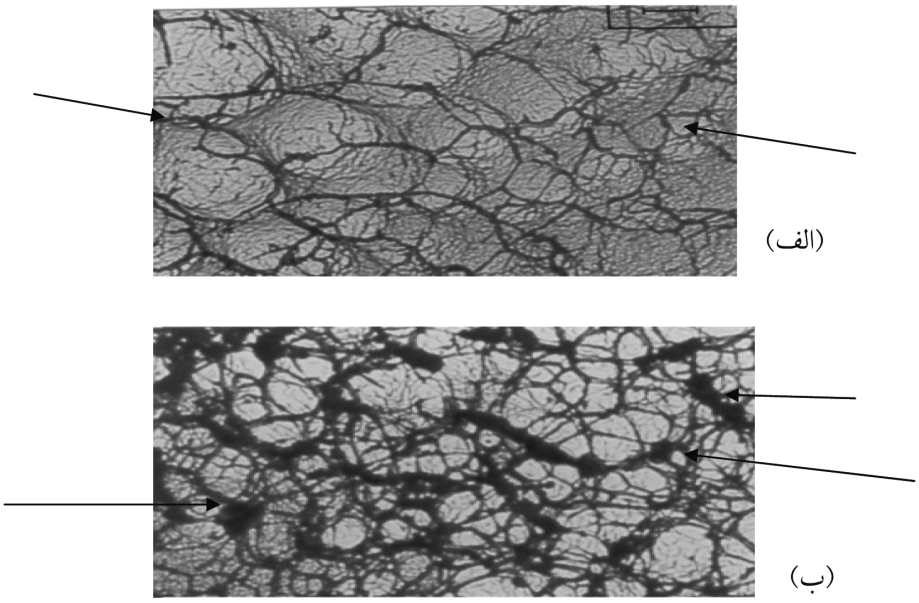


شکل ۱- مقایسه درصد اتصال آفلاتوکسین توسط گونه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG* در سه شرایط مختلف تیمار نشده (سلول زنده در فاز لگاریتمی)، تیمار اسیدی و تیمارحرارتی در پسته آلوده به غلظت ppb ۱۰ آفلاتوکسین.



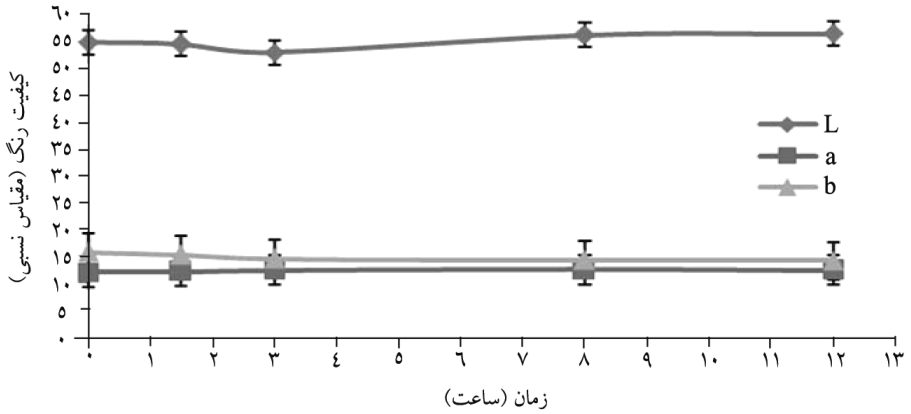
شکل ۲- مقایسه درصد اتصال آفلاتوکسین توسط گونه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG* در سه شرایط مختلف تیمار نشده (سلول زنده در فاز لگاریتمی)، تیمار اسیدی و تیمارحرارتی در پسته آلوده به غلظت ppb ۲۰ آفلاتوکسین.

ارزیابی ریزساختار: در این پژوهش جهت حصول اطمینان از تثبیت باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (LGG) در محیط آلژینات سدیم که به‌صورت پوشش در اطراف پسته قرار گرفت، تصاویر میکروسکوپی در دو بزرگ‌نمایی ٤٠ و ١٠٠ برابر تهیه شد. مکان‌های مشخص شده در تصاویر (نقاط تیره و گره‌مانند در شبکه آلژینات) نشان می‌دهند که باکتری‌ها به‌خوبی در پوشش آلژیناتی تثبیت شده‌اند و این امر می‌تواند دلیلی بر حضور باکتری به‌عنوان جایگاهی برای اتصال سم آفلاتوکسین موجود بر پسته باشد (شکل ۳).



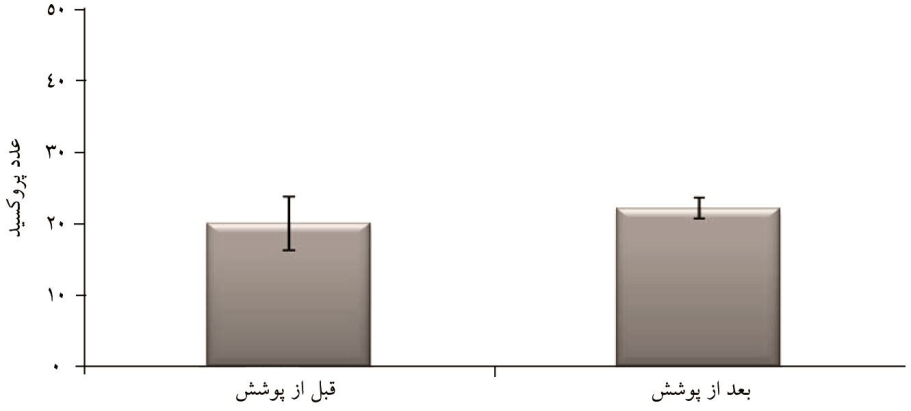
شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ نوری از تثبیت باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LGG در پوشش آلژینات.
الف: بزرگ‌نمایی ٤٠ برابر، ب: بزرگ‌نمایی ١٠٠ برابر.

بررسی فاکتور کیفی رنگ: ظاهر ماده غذایی، به‌خصوص رنگ، یکی از فاکتورهای مهم و قابل‌توجه در جهت قابلیت پذیرش ماده غذایی توسط مشتری محسوب می‌شود. رنگ پسته یکی از فاکتورهای کیفی و قابل بررسی در این پژوهش بود با این هدف که آیا محلول آلژینات سدیم به‌عنوان ماده پوشش‌دهنده و جایگاهی برای تثبیت باکتری در طی زمان‌های آزمایش (۱/۵، ۳، ۸ و ۱۲ ساعت) بر رنگ پسته اثر می‌گذارد و رنگ آن را تغییر داده و کدر می‌کند و یا این‌که بی‌تأثیر است و پارامترهای رنگی میوه پسته تغییری نخواهد کرد. بنابراین پارامترهای L^*، a^* و b^* واحدهای اندازه‌گیری سفیدی، قرمزی و زردی نمونه، به‌ترتیب ٥٤/٨٧، ١٢/١٣ و ١٥/٧٧ برای نمونه‌های شاهد (نمونه اولیه) اندازه‌گیری شد. میزان رنگ نمونه‌های پسته پوشش داده شده نشان می‌دهد که پارامترهای رنگ هانتر لب (L^* و b^*) به‌میزان اندکی کاهش می‌یابند در حالی‌که فاکتور (a^*) کمی افزایش می‌یابد. اما با توجه به نتایج به‌دست آمده تغییرات چشم‌گیری مشاهده نمی‌شود و نشان داده شد که رنگ نمونه‌های پوشش داده شده تفاوت آشکاری با نمونه‌های اولیه ندارند و پسته‌ها قابلیت پذیرش خود را حفظ کرده‌اند (شکل ٤).



شکل ٤- تأثیر تثبیت باکتری بر فاکتور کیفی رنگ پسته در مدت زمان ۱۲ ساعت.

بررسی عدد پراکسید: یکی دیگر از فاکتورهای کیفی مورد نظر در پسته با توجه به اسیدهای چرب اشباع‌نشده در پسته اندازه‌گیری عدد پراکسید بود. اسیدهای چرب سیرنشده می‌توانند در محل پیوندهای دوگانه، اکسیژن جذب کرده و پراکسید تولید کنند. مشاهده شده است که بین عدد پراکسید و فساد ماده غذایی رابطه مستقیم وجود دارد. نتایج نشان داد که تثبیت میکروارگانیسم‌ها هیچ تأثیر مشخصی بر عدد پراکسید نداشته‌اند (شکل ۵).



شکل ۵- اندازه‌گیری عدد پراکسید نمونه‌های پسته قبل و بعد از پوشش با آلژینات

منابع

Abdulkadar, A.H.W., Al-Ali, A., and Al-Jedah, J. 2000 .Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. *Food Control*, 11: 157-160.

AOAC official method 965.33. 2005. Peroxide value of oils and fats. Official methods of analysis of AOAC International.

Beshay, B. 2003. Production of alkaline protease by *Teredinobacter turnirae* cells immobilized in Ca-alginate beads. *African Journal of Biotechnology*, 2: 3. 60-65.

Beta, A., and Lasztity, R. 1999. Detoxification of mycotoxin contaminated food and feed by microorganism. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 223-228.

Cheraghali, A.M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., and Ali-Abadi, S. 2006. Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 812-816.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Web site: http://www.fao.org.

Gratz, S., Täubel, M., Juvonen, R.O., Viluksela, M., Turner, P.C., Mykkänen, H., and El-Nezami, H. 2006. *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG Modulates Intestinal Absorption, Fecal Excretion, and Toxicity of Aflatoxin B1 in Rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 11, 7398-7400.

Gratz, S., Wu, Q.K., El-Nezami, H., Juvonen, R.O., Mykkanen, H., and Turner, P.C. 2007. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B_1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, Pp: 3958-3964.

Haskard, C., Binnion, C., and Ahokas, J. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-biological Interactions*, 128: 39-49.

Hasakard, C.A., El-Nezami, H.S., Kakkaanpaa, P.E., Salminen, S., and Ahokas, J.T. 2001. Surface binding of aflatoxin B1 by Lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, Pp: 3086-3091.

Iran public standard. 2003. Food products - Determination of aflatoxin B_1 and total aflatoxins using HPLC and immunoaffinity column, 6872p.

Iran public standard. 1997. Methods of sampling for dried fruits, 1036p.

Kuilman-wahls, M.E.M., Vilar, M.S., De Nijs-Tjon, V., Maas, F.M., and Fink-Gremmels, J. 2002. Cyclopiazonic acid inhibits mutagenic action of aflatoxin B_1. *Environmental Toxicology and Pharmocology*, 11: 207-212.

Lee, Y.K., El-Nezami, H., Haskard, C.A., Gratz, S., Puong, K.Y., Salminen, S., and Mykkanen, H. 2003. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B1 by viable and nonviable bacteria. *Journal of Food Protection*, 66: 426-430.

Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., and Ahokas, J. 1998. Ability of strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogenic, aflatoxin B_1. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 321-326.

Park, D.L., and Liang, B. 1993. Perspectives on Aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends in Food Science and Technolology*, 4: 334-342.

Park, D.L., Ayala, C.E., Guzman-Perez, S.E., Lopez-Garcia, R., and Trujillo, S. 2000. Microbial Toxins in Foods: Algal, Fungal, and Bacterial. In: Helferich, W., and Winter, C.K. (eds), *Food Toxicology*, CRC PRESS, London, England, Pp: 81-124.

Peinado, R.A., Moreno, J.J., Villalba, J.M., Gonzalez-Reyes, J.A., Ortega, J.M., and Mauricio, J.C. 2006. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 79-84.

Salminen, S., Wright, A.V., and Ouwehand, A. 2004. Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Marcel Decker. New York.

Shetty, P.H., and Jespersen, L. 2006. *Saccharomyces cervisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 48-55.

Shetty, P.H., Hald, B., and Jespersen, L. 2006. Surface binding of aflatoxin B1 by *saccharomyces cervisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*. Pp: 1-6.

Sook Chun, H., Jung Kim, H., Ee Ok, H., Hwang, J.B., and Chung, D.H. 2007. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*, 102: 385-391.

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

EJFPP., Vol. 1 (3): 51-64
www.ejfpp.info

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

The ability of *Lactobacillus rhamnosus LGG* strain to reduce of Aflatoxin B_1 in pistachio

***S. Rahaie[1], Z. Emam-Djomeh[2], S.H. Razavi[2] and M. Mazaheri[3]**

[1]Former M.Sc. Student, Dept. of Food Science and Technology, University of Tehran,
[2]Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, University of Tehran,
[3]M.Sc. Dept. of Chemistry Engineering, Iran Industrial Research and Standards Institution

Abstract

In this study, binding ability of *Lactobacillus rhamnosus LGG* to aflatoxin of pistachio was investigated. Results indicate that the bacterium has aflatoxin surface binding ability of 35% (with initial concentration of 10 ppb aflatoxin) in exponential phase. Acid and heat treatment increase this ability to 85%. In the second concentration of aflatoxin (20 ppb), this binding ability for viable cells and acid, heat treated cells increased to 60% and 90%, respectively. Binding appears to be a physical phenomenon that reaches to maximum point within first 2-3 hours of process. Also, results showed that bacteria immobilization on aflatoxin contaminated pistachio had no effect on color and peroxide value. Bacteria cells, viable or nonviable, are effective in aflatoxin binding and this property is considered as a good solution, especially for foods having high risk of aflatoxin contamination.

Keywords: Pistachio; Aflatoxin B_1; *Lactobacillus rhamnosus*

* Corresponding Author; Email: s_rahaiee@yahoo.com