نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۷ شماره ۲/ سال ۱۳۹۶/ صفحات ۱۴۹ تا ۱۶۲

بررسی قابلیت *Bifidobacterium bifidum* در جذب آفلاتوکسین M_1 از ماست پروبیوتیک

محبوبه سرابی جماب*[۱]، فائزه تجلی[۲] و نسیم ادیب‌پور [۳]

تاریخ دریافت: ۹٤/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/٦

[۱] استادیار گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
[۲] مربی گروه پژوهشی پزشکی مولکولی،جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران
[۳] دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی،گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
*مسئول مکاتبه: Email: m.sarabi@rifst.ac.ir

چکیده

توکسین‌زدایی میکروبی یکی از روش‌های حذف آفلاتوکسین‌ها از جمله آفلاتوکسین M_1 محسوب می‌شود. گزارش‌ها نشان دهنده آن است که برخی از سویه‌های باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک از طریق جذب سطحی آفلاتوکسین‌ها به دیواره سلولی خود، می‌توانند در حذف آن‌ها مؤثر باشند. در این تحقیق توانایی باکتری *Bifidobacterium bifidum* در میزان جذب آفلاتوکسین M_1 از ماست پروبیوتیک بررسی گردید. بدین منظور حدود 10^8 cfu/ml از باکتری پروبیوتیک و آغازگر به شیر پس‌چرخ بازسازی شده فاقد آفلاتوکسین M_1 تلقیح شد. سپس نمونه‌ها با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۰/۷۵ قسمت در بیلیون (ppb) آفلاتوکسین M_1 آلوده شدند. غلظت آفلاتوکسین باقیمانده در سوپرناتانت نمونه‌های ماست در روزهای اول، هفتم، چهاردهم و بیست و یکم پس از تولید ماست، توسط روش الایزای رقابتی تعیین و نتایج توسط HPLC تایید شد. یافته‌های حاصل ازاین تحقیق نشان داد هرچند، هم باکتری پروبیوتیک مورد آزمون (*Bifidobacterium bifidum*) و هم آغازگرهای معمولی ماست (*Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus*) قادر به جذب سم می‌باشند، توانایی باکتری پروبیوتیک در جذب مقادیر بالای سم در مقایسه با آغازگرهای ماست به لحاظ آماری معنی‌دار است. همچنین نتایج حاکی از این است که قابلیت باکتری‌ها در کاهش میزان سم در نمونه‌های با مقادیر پایین سم بسیار بیشتر است. نتایج حاصل از بررسی زنده‌مانی در طی زمان ماندگاری نمونه‌های ماست نشان داد که تعداد *Bifidobacterium bifidum* تا پایان دوره نگهداری ماست (۲۱ روز) در مقایسه با اولین روز حدود ٤ سیکل لگاریتمی کاهش یافت.

واژگان کلیدی: آفلاتوکسین M_1، *Bifidobacterium bifidum*، ماست پروبیوتیک

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های سمی تولید شده توسط قارچ‌ها هستند که به‌طور عمده توسط قارچ‌های ساپروفیت در حال رشد روی برخی از مواد غذایی و خوراک دام تولید می‌شوند. آلودگی مایکوتوکسین در مواد غذایی تهدید بزرگی برای سلامت انسان، حیوانات و تجارت بین‌المللی محسوب می‌شود (بیندر و همکاران، ۲۰۰۷). آفلاتوکسین‌ها از خطرناک‌ترین مایکوتوکسین‌ها

می‌باشند و عمدتاً توسط برخی از گونه‌های جنس آسپرژیلوس نظیر *Aspergillus flavus*، *Aspergillus parasiticus* و *Aspergillus nomius* تولید می‌شوند. آفلاتوکسین‌ها ممکن است به طور مستقیم از طریق بلعیدن محصولات آلوده یا به طور غیرمستقیم توسط مصرف مواد غذایی مشتق شده از مواد اولیه آلوده، مانند شیر و فراورده‌های لبنی حاصل از دام آلوده، وارد بدن انسان شوند (کالونی و همکاران، ۲۰۰۶).

سویه‌های مسمومیت‌زای آسپرژیلوس به طور معمول ۲ یا ۳ نوع آفلاتوکسین را سنتز می‌کنند که یکی از آن‌ها به طور ثابت آفلاتوکسین B_1 می‌باشد. آفلاتوکسین B_1 سمی قوی است و در گروه ترکیبات سرطان‌زا قرار دارد. هنگامی که گاو شیری غذای آلوده به آفلاتوکسین دریافت می‌کند، این توکسین در کبد متابولیزه شده، آفلاتوکسین B_1 و B_2 به مشتقات ٤ـ هیدروکسی خود به نام‌های آفلاتوکسین M_1 و M_2 تبدیل و از شیر دفع می‌شوند. غلظت آفلاتوکسین M_1 تولیدی در شیر گاو نسبت به آفلاتوکسین M_2 بیشتر بوده و سمیت آن نیز به مراتب بیشتر می‌باشد (رحیمی و همکاران، ۲۰۱۰). تقریباً ۱ تا ۳ درصد آفلاتوکسین B_1 اولیه موجود در خوراک دام به صورت آفلاتوکسین M_1 در شیر تبدیل می‌شود. اگر مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین B_1 مصرف شوند، ۲ تا ۳ روز پس از هضم، آفلاتوکسین M_1 در شیر ظاهر می‌گردد و می‌تواند باعث به خطر افتادن سلامت دام‌ها و انسان و بروز انواع بسیاری از بیماری‌ها نظیر سرطان، نقص در سیستم ایمنی بدن و ایجاد ناهنجاری‌های جنینی گردد (میردامادی و همکاران، ۱۳۸٦؛ آردیک و همکاران، ۲۰۰۸ و ماسوره و همکاران، ۲۰۰۹؛ وماک و همکاران، ۲۰۱٦).

با توجه به آن‌که شیر و فراورده‌های لبنی مورد مصرف روزانه اکثریت قریب به اتفاق مردم می‌باشند، توجه به ایمنی و سلامت این فراورده‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. حضورآفلاتوکسین M_1 در این فراورده‌ها در مقادیر بالاتر از حد استاندارد، برای مصرف کننده مخاطره‌آمیز است. نتایج تحقیقات مختلف در زمینه اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین M_1 در شیر مناطق مختلف ایران نشان دهنده آن است که شیر کمابیش به این سم آلوده می‌باشد (ارسالی و همکاران، ۱۳۸۸ و جعفری، ۱۳۸۸).

در اغلب کشورها قوانین سختی به منظور محدود نمودن حضور سم آفلاتوکسین در مواد غذایی و محصولات تجاری وضع گردیده است، با این وجود حضور چنین سمومی در مواد غذایی اجتناب ناپذیر است. بر طبق قوانین وضع شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا[1] حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین M_1 در شیر ۰/۵ قسمت در بیلیون تعیین شده است. این مقدار در کشورهای اروپایی کمتر است؛ به طوری که حداکثر مجاز آفلاتوکسین M_1 در شیر ۰/۰۵ قسمت در بیلیون می‌باشد. در حال حاضر حداکثر مجاز آفلاتوکسین M_1 در شیر خام، انواع شیر حرارت دیده و فراورده‌های لبنی در ایران معادل ۰/۱ قسمت در بیلیون تعیین گردیده است (استاندارد ملی ایران ۷۱۳۳، ۱۳۹۰؛ سازمان غذا و داروی آمریکا، ۲۰۱۱ و اتحادیه اروپا، ۲۰۰٦).

اهمیت شیر و فراورده‌های لبنی در تغذیه انسان از یک سو و خطرات بالقوه ناشی از وجود سم آفلاتوکسین M_1 در چنین مواد غذایی از سوی دیگر، نیاز به روشی مناسب جهت غیر فعال نمودن توکسین را آشکار می‌سازد. با افزایش دانش و آگاهی از این موضوع که آفلاتوکسین‌ها می‌توانند به طور بالقوه برای سلامت انسان و دام خطرآفرین باشند، تلاش جهت حذف کامل یا کاهش میزان آفلاتوکسین در مواد غذایی مضاعف گردیده است (وماک و همکاران، ۲۰۱٦). استفاده از بسیاری روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای حذف مایکوتوکسین‌ها از مواد غذایی آلوده به دلیل مشکلات مربوط به مباحث ایمنی و امکان از دست رفتن کیفیت تغذیه‌ای محصول، کارایی کم و هزینه بالای آن‌ها محدود شده است. این دلایل سبب انجام تحقیقاتی گسترده جهت

[1] Food and Drug Administration (FDA)

جایگزینی روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای حصول به روش‌های ایمن، کارا و مطلوب گردیده است. در این راستا استفاده از روش‌های بیولوژیکی یکی از گزینه‌های مناسب می‌باشد (کابک و همکاران، ۲۰۰٦).

نتایج تحقیقات نشان داده است که یکی از مهمترین شیوه‌ها در کاهش بروز اختلالات مربوط به سم یا جلوگیری از ورود آن، استفاده از باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک می‌باشد (السانهوتی و همکاران، ۲۰۱٤). چرا که برخی از سویه‌های باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک از طریق جذب سطحی آفلاتوکسین‌ها به دیواره سلولی خود، می‌توانند در حذف آن‌ها مؤثر باشند. از سویی دیگر برخی از این میکروارگانیسم‌ها به عنوان پروبیوتیک شناخته شده و سبب افزایش ارزش غذایی محصول می‌گردند (ساریمهمت اوغلو و کوپلولو، ۲۰۰٤، بنت و کلیک، ۲۰۰۳، باتا و لاسزتیتی، ۱۹۹۹و فیلیپس و همکاران، ۱۹۹۵؛ ویندرولا و ریتینی، ۲۰۱۵).

ماست از پرمصرف‌ترین فراورده‌های لبنی است که بر اساس تخمیر لاکتیکی بدست می‌آید. کشت آغازگر متداول ماست، *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus* می‌باشند، در حالی‌که در تهیه ماست پروبیوتیک علاوه بر باکتری‌های مذکور، از باکتری‌های پروبیوتیک نظیر گونه‌هایی از لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم استفاده می‌شود (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۵ و ۲۰۱٤). باکتری *Bifidobacterium bifidum* یکی از انواع باکتری‌های ساکن روده انسان بوده و جزو فلور طبیعی دستگاه گوارش محسوب می‌شود. این باکتری به عمل هضم و جذب مواد غذایی از دستگاه گوارش کمک نموده، سیستم ایمنی بدن را تقویت کرده و در حذف میکروارگانیسم‌های مضر از روده مؤثر است. *Bifidobacterium bifidum* به عنوان یک پروبیوتیک می‌تواند در تولید فراورده‌های پروبیوتیک نظیر ماست پروبیوتیک مورد استفاده قرار گیرد (شاکری، ۱۳۸۲). مهم‌ترین مکانیسم‌هایی که این باکتری‌ها به‌وسیله آن می‌توانند موجب ارتقای سلامت انسان شوند شامل تولید اسیدهای آلی، پراکسیدها و باکتریوسیدها و رقابت با باکتری‌های مضر و بیماری‌زای روده‌ای برای تصاحب جایگاه‌های اتصال روی موکوس می‌باشد (کابک و همکاران، ۲۰۰۹).

در این تحقیق سعی بر آن است که اثر *Bifidobacterium bifidum* بر کاهش میزان سم آفلاتوکسین M_1 از ماست پروبیوتیک مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد و روش ها

آفلاتوکسین M_1

پودر آفلاتوکسین M_1 از شرکت سیگمای آلمان خریداری شد. سپس با استفاده از استونیتریل محلول مادری با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. به منظور آلوده کردن نمونه‌های ماست، محلول‌های آفلاتوکسین M_1 با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۰/۷۵ قسمت در بیلیون تهیه شد (ساریمهمت اوغلو و کوپلولو، ۲۰۰٤).

تهیه استاندارد ۱۰ مک فارلند

در این پژوهش برای بدست آوردن کدورت سلولی معادل 10^{9} cfu/ml تا 10^{10} cfu/ml ، از محلول استاندارد ۱۰ مک فارلند استفاده شد. محلول ۱۰ مک فارلند از مخلوط کردن ۹ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک یک درصد و یک میلی‌لیتر کلرور باریم یک درصد تهیه گردید. استاندارد ۱۰ مک فارلند کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی حاوی 3×10^{9} cfu/ml ایجاد می‌کند (مارتین و پالومینو، ۲۰۰۹).

تهیه محلول بافر فسفات

برای تهیه محلول بافر فسفات، ۸ گرم نمک کلرور سدیم، ۰/۲ گرم کلرور پتاسیم، ۱/٤٤ گرم فسفات مونو هیدروژن سدیم و ۰/۲٤ گرم از فسفات دی هیدروژن پتاسیم توزین و در بالون ژوژه به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسید. pH بافر تهیه شده روی ۷/۲ تنظیم شد (سامبروک و همکاران، ۱۹۸۹).

تهیه و آماده‌سازی کشت‌های آغازگر و پروبیوتیک

باکتری پروبیوتیک لیوفلیزه *Bifidobacterium bifidum* و مخلوط آغازگرهای ماست (*Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus*) از شرکت کریستین‌هانسن خریداری شد. پودر Direct Vat آغازگر ماست و پروبیوتیک به میزان ۱٪ در محیط کشت مایع MRS در دمای ۳۷ °C فعال سازی شد. به منظور افزایش میزان رشد گونه *Bifidobacterium bifidum* محیط کشت مایع MRS توسط L- سیستئین هیدروکلراید (۰/۵ گرم در لیتر) غنی شد. فعال سازی بیفیدوباکتر در شرایط بی‌هوازی انجام پذیرفت. پس از فعال سازی باکتری‌های آغازگر ماست و *Bifidobacterium bifidum* و رسیدن آن‌ها به فاز لگاریتمی رشد، کشت‌های مذکور توسط محلول بافر فسفات طی ۳ مرحله سانتریفوژ با دور ۳٤۰۰ g شستشو شده و رسوب میکروبی جداسازی گردید. غلظت باکتری‌ها توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦۰۰nm مطابق محلول استاندارد مک فارلند ۱۰ تنظیم شد و پس از بافر زدایی، به نمونه‌های شیر تلقیح گردید. همچنین میزان رشد باکتری و تعداد آن‌ها، با استفاده از لام نئوبار و نیز شمارش پلیت استاندارد به کمک محیط کشت جامد MRS محاسبه گردید (تاج آبادی ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۰، میردامادی و همکاران، ۱۳۸٦، قباسی و همکاران، ۲۰۱۱ و لاهتینن و همکاران، ۲۰۰٤).

تهیه ماست

جهت تهیه ماست، شیر پس چرخ بازساخته ۱۲ ٪ ابتدا تا دمای ۹۵-۹۰ °C به مدت ٥ دقیقه حرارت دهی شد، پس از سرد سازی تا دمای ٤۲ °C و افزودن آفلاتوکسین در ۳ سطح ۰/۱، ۰/٥ و ۰/۷٥ قسمت در بیلیون و درنهایت تلقیح باکتری‌های آغازگر به تنهایی به عنوان نمونه کنترل و یا همراه با باکتری پروبیوتیک، به مدت حداقل ۳ ساعت در دمای ٤۲ °C گرمخانه گذاری شد (*ساریمهمت اوغلو و کوپلولو*، ۲۰۰٤). نمونه های ماست تولید شده جهت اطمینان از قرار داشتن در دامنه pH مناسب (حدود ٤/٦)، تعیین pH شدند. سنجش pH در فواصل ۷ روزه در طول دوره نگهداری ۲۱ روزه نیز انجام گرفت.

تعیین زنده مانی میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری

جهت تعیین زنده مانی باکتری‌های آغازگر و پروبیوتیک مورد نظر در نمونه های تولید شده، از نمونه های ماست در فواصل زمانی ۷ روزه در طول دوره نگهداری ۲۱ روزه ۲ تکرار نمونه برداری شده و پس از رقت سازی در محلول رینگر رقت های ٥- تا ۷- هم در محیط کشت عمومی MRS و هم در محیط کشت افتراقی خاص *Bifidobacterium bifidum* کشت داده شد. جداسازی و افتراق *Bifidobacterium bifidum* مطابق روش اونگ و شاه (۲۰۰۹) انجام شد. بر این اساس مخلوطی از آنتی‌بیوتیک‌ها شامل ۲ g نئومایسین سولفات، ۳ g اسید نالیدیکسیک، ٦۰ g کلرور لیتیم و ٤ g پارومومایسین سولفات (NNLP)، در ۱ لیتر آب مقطر آماده سازی شده و پس از استریل سازی توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون در دمای ٤ °C نگهداری شد. از محلول استوک به دست آمده مقدار ٥ mL به ۱۰۰ mL محیط کشت MRS agar در حالت مذاب که حاوی ۰/٥ mg/mL ال-سیستئین هیدروکلرید بود، افزوده گردید. پلیت ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ °C و شرایط بی هوازی قرار داده شد.

اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین M_1 به روش الایزا و HPLC

پس از هر بار نمونه برداری نمونه‌های ماست، جهت تعیین میزان آفلاتوکسین جذب نشده توسط میکروب‌های نمونه، سوپرناتانت ماست‌ها به‌وسیله سانتریفوژ با دور ۳٤۰۰ g ، دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٥ دقیقه جداسازی و در دمای ۲۰- °C نگهداری شد (ساریمهمت اوغلو و کوپلولو، ۲۰۰٤). اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین M_1 باقیمانده در سوپرناتانت با روش الایزا انجام شد. کیت خریداری شده ساخت شرکت یوروپروکسیما[1] و روش به‌کار رفته برپایه الایزای رقابتی مستقیم بود. به

[1] Euro Proxima

منظور تایید نتایج حاصل از الایزا از روش HPLC استفاده گردید (کالری و همکاران، ۲۰۰۷).

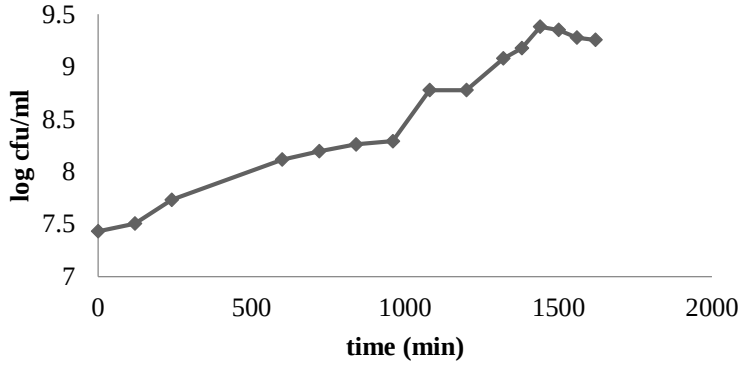
آنالیز آماری

به منظور آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. نتایج این تحقیق بر پایه طرح آماری کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل آنالیز شد. فاکتورهای لحاظ شده شامل غلظت سم (سه سطح) و زمان نگهداری (چهار سطح) بود. آزمایش‌ها در دو تکرار انجام شد. میانگین نتایج با نرم افزار آماری SPSS و براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. برای رسم نمودارها از نرم-افزار Excel-2003 استفاده گردید.

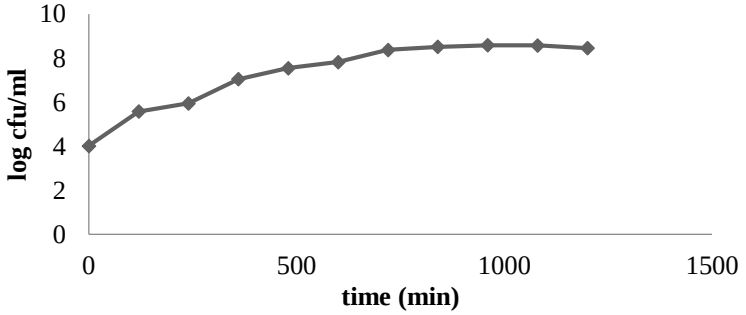
نتایج و بحث

بررسی منحنی رشد باکتری پروبیوتیک و مخلوط آغازگرهای ماست

به منظور دستیابی به میکروارگانیسم‌های فعال جهت استفاده در تولید ماست، تعیین مدت زمان لازم جهت گرمخانه‌گذاری تا رسیدن به فاز لگاریتمی رشد حائز اهمیت می‌باشد. بدین منظور با شمارش میکروارگانیسم-ها در طول زمان، منحنی رشد مخلوط آغازگرهای ماست (*Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus*) و باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium bifidum* رسم گردید و به این ترتیب زمان لازم برای فعال‌سازی هر یک محاسبه شد. همانطور که در شکل ۱، مشاهده می‌گردد، بیشترین تعداد سلول در رابطه با *Bifidobacterium bifidum* ، پس از حدود ۲۵ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی بدست آمد. منحنی رشد مخلوط آغازگرهای ماست درشکل ۲ مشاهده می‌شود. مخلوط دو باکتری *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus* پس از حدود ۱۶ ساعت به بالاترین میزان رشد خود دست یافتند.



شکل ۱- منحنی رشد *Bifidobacterium bifidum* بر مبنای شمارش سلولی در طول زمان



شکل ۲- منحنی رشد مخلوط آغازگرهای ماست بر مبنای شمارش سلولی در طول زمان

بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک و آغازگر در ماست در طی زمان ماندگاری

فعالیت و زنده‌ماندن پروبیوتیک‌ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات دارویی است. به همین دلیل فدراسیون بین‌المللی لبنیات وجود حداقل $۱۰^{۷}$ باکتری پروبیوتیک زنده در هر گرم از فراورده‌های لبنی به هنگام مصرف را ضروری دانسته است. این درحالی-است که در مطالعات مختلف حداقل دوز مورد نیاز برای بروز اثرات درمانی پروبیوتیک‌ها cfu/ml $۱۰^{۹}$–$۱۰^{۸}$ بیان شده است. بر این اساس، حدود cfu/ml $۱۰^{۹}$–$۱۰^{۸}$ از مخلوط باکتری‌های آغازگر ماست و *Bifidobacterium bifidum* جهت تهیه ماست معمولی و ماست پروبیوتیک تلقیح گردید و سپس زنده‌مانی آن-ها در طول زمان ماندگاری ماست (۲۱ روز) و در حضور غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین M_1 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل به شرح ذیل می‌باشد.

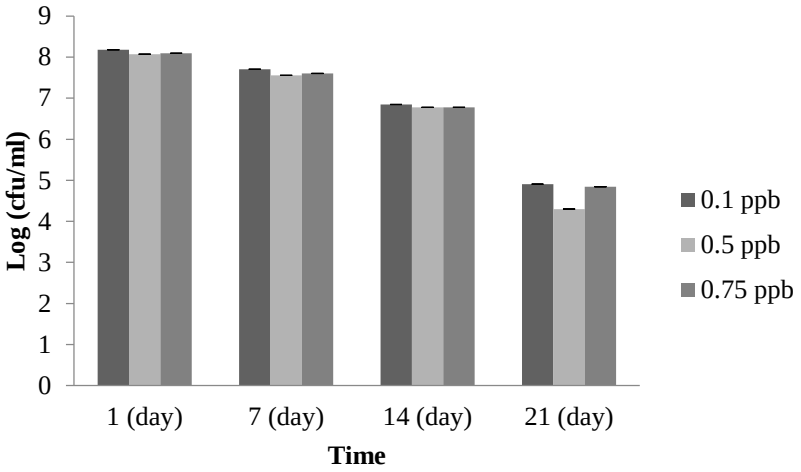
بررسی زنده‌مانی *Bifidobacterium bifidum* در ماست پروبیوتیک

در میان نمونه‌های ماست پروبیوتیک حاوی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* که با سم آفلاتوکسین M_1 در سه سطح ۰/۱، ۰/۵ و ۰/۷۵ قسمت در بیلیون آلوده شده بودند، بیشترین تعداد باکتری‌های زنده در نمونه‌های آلوده شده به کمترین غلظت سم مشاهده گردید (شکل ۳). همانطور که درشکل ۳ مشاهده می‌شود، زنده‌مانی *Bifidobacterium bifidum* با افزایش زمان ماندگاری ماست در ٤ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت به طوری که تعداد آن پس از ۲۱ روز نگهداری بیش از سه سیکل لگاریتمی کاهش یافت و به کمتر از cfu/ml $۱۰^{۵}$ رسید. نتایج این تحقیق نشان داد که در نمونه‌های آلوده شده با هر سه سطح غلظت سم، کمترین میزان زنده مانی پس از ۲۱ روز نگهداری ماست بدست آمد در حالی که بیشترین تعداد باکتری زنده در اولین روز نگهداری ماست حاصل گردید. گزارش‌ها حاکی از آن است که اختلاف معنی‌داری میان زنده‌مانی گونه‌های مختلف باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط دشوار نظیر pH و دمای پایین وجود دارد به طوری که گونه‌های جنس بیفیدوباکتر در مقایسه با لاکتوباسیلوس‌ها از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشند (کیلاساپاتی و ریبکا، ۱۹۹۷).

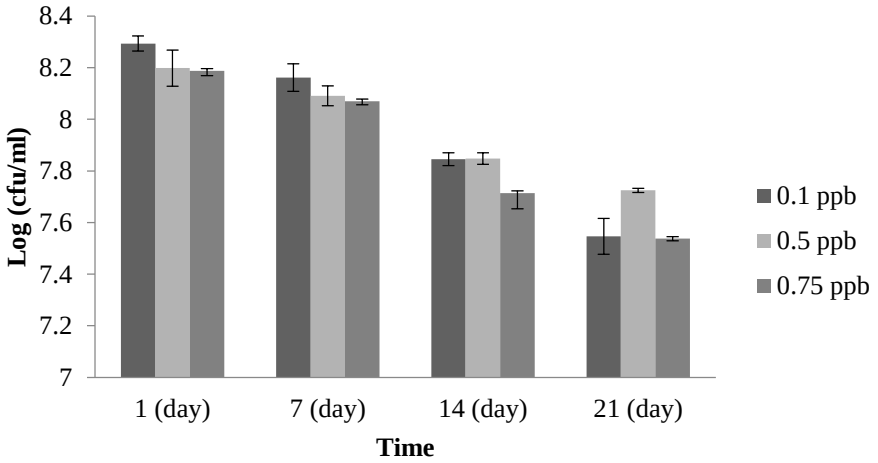
بررسی زنده‌مانی مخلوط آغازگرهای ماست

همانطور که در شکل ٤ نشان داده شده است زنده‌مانی مخلوط آغازگرهای ماست (*Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus*) در نمونه‌های آلوده شده با غلظت‌های پایین سم (۰/۱ و ۰/۵ قسمت در بیلیون) بیشتر بود.

هرچند باکتری‌های آغازگر ماست در مقایسه با باکتری-های پروبیوتیک به کاهش pH مقاوم‌تر می‌باشند (علی و همکاران، ۲۰۱۳) درطول زمان ماندگاری ماست، تعداد سلول‌های زنده کاهش یافت که می‌توان آن را به افزایش اسیدیته ماست نسبت داد. میزان کاهش پس از ۲۱ روز نگهداری در مقایسه با روز اول نگهداری، حدود ۰/۵ سیکل لگاریتمی بدست آمد. در همه نمونه‌های ماست که با سه غلظت مختلف آفلاتوکسین آلوده شده بودند، بیشترین میزان زنده‌مانی متعلق به روز اول پس از تولید بود.



شکل ۳- بررسی اثر متقابل غلظت سم و زمان ماندگاری بر زنده‌مانی *Bifidobacterium bifidum* در ماست پروبیوتیک



شکل ۴- بررسی اثر متقابل غلظت سم و زمان ماندگاری بر زنده‌مانی *مخلوط آغازگرها در* ماست

بررسی اثر *Bifidobacterium bifidum* در میزان جذب آفلاتوکسین M_1

با توجه به نتایج آنالیز واریانس، بیشترین درصد حذف سم به نمونه های آلوده شده با کمترین میزان سم آفلاتوکسین M_1 تعلق داشت. این در حالی است که افزایش غلظت سم از سطح ۰/۵ به ۰/۷۵ قسمت در بیلیون سبب افزایش درصد اتصال سم در ماست حاوی *Bifidobacterium bifidum* گردید که این اختلاف به لحاظ آماری($p<0.05$) معنی‌دار بود. با توجه به شکل ۵، نتایج گویای آن است که بیشترین میزان جذب سم در ماست پروبیوتیک حاوی *Bifidobacterium bifidum* در زمان‌های اول نگهداری حاصل گردید. پس از آن ۱٤ روز نگهداری ماست بیشترین تأثیر را در کاهش سم در سوپرناتانت ماست داشت؛ به‌طوری‌که درصد حذف آفلاتوکسین پس از گذشت ۱٤ روز ۹٤/۲ درصد بود.

بررسی اثر متقابل غلظت سم و زمان نگهداری ماست حاکی از آن است که بیشترین درصد حذف سم در همان اولین روز نگهداری و در رابطه با نمونه های آلوده شده با پایین ترین غلظت سم حاصل گردید.

اسماعیل و همکاران (۲۰۱۵) و توربیک و همکاران (۲۰۰۷) اتصال اختصاصی آفلاتوکسین M_1 موجود در مواد لبنی با باکتری‌های اسید لاکتیک را مورد مطالعه

قرار دادند. در این مطالعه توانایی این باکتری ها در جذب توکسین در محیط مایع مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که فرایند جذب سریع بوده و بیش از ۱ دقیقه طول نمی کشد. این جذب در اثر واکنش توکسین با سطح باکتری و بدون تغییر شیمیایی توکسین صورت می‌گرفت. سرلک و همکاران (۱۳۹۲) اثر سوش، مقدار تلقیح و فیزیولوژی پروبیوتیک ها و pH نهایی تخمیر روی کاهش مقدار آفلاتوکسین M_1 را در دوغ بررسی کرده و گزارش کردند که *Lactobacillus acidophilus* بصورت زنده در مقدار تلقیح ۷ log cfu/ml در pH نهایی تخمیر ٤/٥ بهترین شرایط را در مقایسه با *Lactobacillus rhamnosus*، *Lactobacillus casei* و *Bifidobacterium bifidum* برای کاهش آفلاتوکسین M_1 آزاد در سطح ۰/٥ قسمت در بیلیون طی نگهداری یخچالی دوغ دارد. این درحالی است که یافته‌های پژوهش حاضر نشانگر آن است که *Bifidobacterium bifidum* توانایی جذب مقادیر بالایی از سم را دارا بوده است، البته دلیل این امر را می‌توان به حساسیت *Bifidobacterium bifidum* به pH پایین و در نتیجه از بین رفتن زنده‌مانی آن و به تبع آن تغییر در ساختمان دیواره سلولی باکتری نسبت داد. شتی و همکاران (۲۰۰۷) میزان اتصال سطحی آفلاتوکسین B_1 در سویه های مختلف *Saccharomyces cerevisiae* در شرایط فیزیکی و شیمیایی مختلف سنجیدند. این سویه ها از غذاهای تخمیری آفریقای شرقی جدا شده بودند. نتایج نشان داد تیمار حرارتی ٥٢ °C به مدت ٥ دقیقه سبب افزایش جذب از ٣٨ ٪ به ٤٦ ٪ و بعد از ١٠ دقیقه به ٥٦ ٪ شد. در تحقیق دیگری که توسط شتی و جسپرسن (٢٠٠٦) انجام شد، تیمار اتوکلاو میکروب ها به مدت ١٠ دقیقه جذب را تا ٧٩ ٪ افزایش داد. افزایش جذب در تیمارهای فیزیکی بیانگر اتصال آفلاتوکسین B_1 به سطح سلول میکروب است. این نتایج با نتایج به دست آمده از بررسی های ال-نظامی و همکاران (۱۹۹۸) و بژیوآ و ماتیو (٢٠٠٤) در رابطه با اثر باکتری *Lactobacillus rhamnosus* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* بر کاهش اوکراتوکسین هماهنگ است. حرارت ممکن است سبب دناتوره شدن پروتئین و شکل گیری هزاران واکنش بینابینی در دیواره سلولی شود. شرایط اسیدی سبب رهایی مونومرهای پلی ساکارید دیواره و شکستن آنها به آلدئیدها شود. شکست اتصالات سبب افزایش اتصال فیزیکی آفلاتوکسین و ساختار دیواره سلولی می شود. همچنین حرارت می‌تواند با انحلال برخی واحدهای مانانی سطح سلول سبب افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی گردد. که در نهایت سبب افزایش دسترسی بیشتر سایت های اتصالی می شود.

بررسی اثر *باکتری‌های آغازگر ماست* در میزان جذب آفلاتوکسین M_1

همانطور که در شکل ٦، مشاهده می‌شود، باکتری‌های آغازگر ماست قادر به جذب حدود ۹۰ درصد از آفلاتوکسین در نمونه‌های آلوده شده با پایین‌ترین غلظت سم (۰/۱ قسمت در بیلیون) بودند در حالی که با افزایش غلظت سم، میزان جذب آفلاتوکسین M_1 بسیار کاهش یافت به طوری که در غلظت‌های ۰/٥ و ۰/۷٥ قسمت در بیلیون درصد جذب سم به ترتیب تنها ۲۹/٤٥ و ٤۹/٥۳ بود. نتایج آنالیز واریانس گویای آن است که با افزایش زمان ماندگاری میزان جذب سم افزایش یافت که دلیل این امر را می‌توان به ایجاد تغییر در ساختمان دیواره سلولی باکتری‌ها در اثر افزایش اسیدیته محیط نسبت داد. همچنین نتایج حاکی از آن است که در غلظت پایین سم در اولین روز نگهداری، سم تا حدود ۹۰ درصد جذب آغازگرها گردید و سپس ثابت ماند. درحالی که بیشترین درصد جذب سم در نمونه‌های آلوده شده با ۰/٥ و ۰/۷٥ قسمت در بیلیون آفلاتوکسین M_1، پس از ۲۱ روز نگهداری ماست در دمای ٤ °C حاصل گردید.

ساریمهمت اوغلو و کوپلولو (٢٠٠٤) اثر *Lactobacillus bulgaricus* سویه CH-2 و

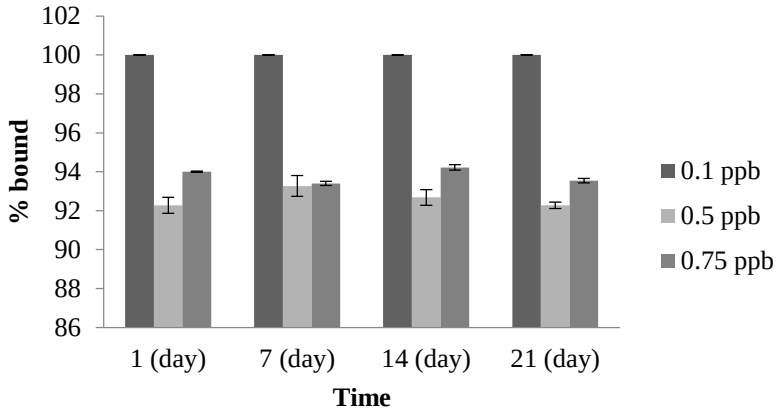
Streptococcus thermophilus سویه ST-36 را در اتصال به آفلاتوکسین M_1 در محلول بافر نمکی فسفات ارزیابی نمودند. فعالیت هر دو سویه در حذف آفلاتوکسین M_1 از شیر بازسازی شده و آلوده به توکسین و ماست تهیه شده از آن نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد قابلیت هر دو سویه مذکور در حذف آفلاتوکسین M_1 از شیر بازسازی شده بیش از بافر نمکی فسفات و ماست بود. میزان اتصال آفلاتوکسین M_1 در ماست ۱٤/۳ درصد به‌دست آمد. دلیل اصلی آن می تواند مربوط به اتصال سم به کازئین شیر باشد. براکت و مارث (۱۹۸۲ الف و ب) گزارش کردند که به طور متوسط آفلاتوکسین M_1 ۳۰/۷ ٪ در شیر تیمار شده با آنزیم پروتئولیتیک بیشتر از شیر تیمار نشده وجود دارد و پیشنهاد کردند که آفلاتوکسین M_1 توسط پروتئین شیر جذب می شود. این محققان در مطالعه ای دیگر گزارش کردند که آفلاتوکسین M_1 توزیع همگن و یکنواختی در شیر نشان نمی دهد و بخشی از توکسین قابل استخراج از شیر نیست.

توانایی اتصال کمتر آغازگرهای ماست به آفلاتوکسین M_1 در ماست نسبت به شیر می تواند مربوط به فرایند تخمیر باشد که به دلیل استخراج توکسین از کازئین پس از فرایند تخمیر و رها شدن آن در محیط نسبت به شیر اتفاق می افتد (راسیک و همکاران ۱۹۹۱). تاباتا و همکاران (۱۹۹۳) نیز گزارش کردند که غلظت شیر بر روی میزان جذب آفلاتوکسین موثر است.

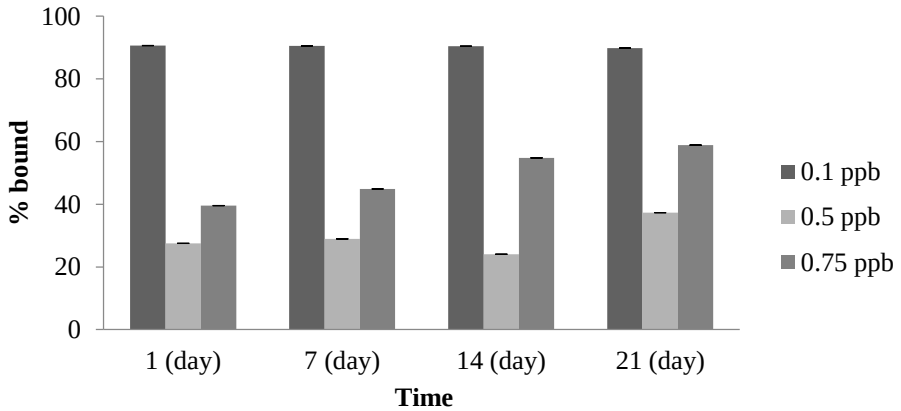
حسنین (۱۹۹٤) پایداری آفلاتوکسین M_1 در طول فرایند تولید و انبارمانی ماست، ماست پنیری و شیر اسیدی شده را بررسی کرد. بیشترین میزان آفلاتوکسین M_1 (۷۱ ٪) از ماست پنیری پس از ۱٤ روز ($p<0/05$) بازیابی شد که دلیل آن محبوس شدن و اتصال آفلاتوکسین در شکاف‌های شبکه کازئینی عنوان گردید. در حالی‌که این توکسین در طی ۱٤ روز در ماست به میزان ٤۱ ٪ باقی ماند. کاهش pH در طی نگهداری در ماست، آن را مستعد کاهش بیشتر آفلاتوکسین خواهد کرد. از طرف دیگر، کاهش قابل ملاحظه ای در مقدار آفلاتوکسین M_1 در شیر اسیدی شده پس از ۱٤ روز مشاهده شد.

پریدز و همکاران (۲۰۰۰) تاثیر سویه‌های مختلف باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک، به صورت زنده و نیز کشته شده دراثر حرارت را در کاهش آفلاتوکسین M_1 از محیط مایع، شیر پس چرخ و شیر کامل بررسی نمودند. باکتری‌های کشته شده توانایی حذف مقادیر بیش‌تری از آفلاتوکسین را دارا بودند.

ال خوری و همکاران (۲۰۱۱) مشخص نمودند توانایی باند شدن *Lactobacillus bulgaricus* به آفلاتوکسین M_1 بعد از ۱٤ ساعت ۸۷/٦ درصد و در مورد *Streptococcus thermophilus* ۷۰ درصد است. درحالی‌که اتصال با آفلاتوکسین M_1 برای *Lactobacillus bulgaricus* بعد از ۲ ساعت،۳۸/۷ درصد و در مورد *Streptococcus thermophilus* ۱۹/۸ درصد میباشد. توانایی ترکیب دو باکتری در اتصال به آفلاتوکسین پس از ۲ و ۱٤ ساعت به ترتیب ۲۱/٦ و ٦۸ درصد گزارش گردید.



شکل ۵- بررسی اثر متقابل غلظت سم و زمان ماندگاری بر میزان جذب سم درماست پروبیوتیک حاوی *Bifidobacterium bifidum*



شکل ۶- بررسی اثر متقابل غلظت سم و زمان ماندگاری بر میزان جذب سم توسط باکتری‌های آغازگر ماس

نتایج اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین در سوپرناتانت نمونه‌های ماست با استفاده از دستگاه HPLC

به منظور تایید آزمون الایزا جهت اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین در نمونه‌های ماست، میزان آفلاتوکسین باقیمانده در سوپرناتانت در ۱۰ درصد نمونه‌های مورد آزمون، به روش HPLC اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده با نتایج حاصل از الایزا مطابقت داشته و روش الایزا را برای اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین تایید نمود.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه خطرات بالقوه ناشی از آلودگی با آفلاتوکسین B_1 و M_1، در ایران و سایر کشورهای جهان مطالعات مختلفی در زمینه چگونگی حذف و یا کاهش آفلاتوکسین انجام گردیده است. لازم به ذکر است که اکثر تحقیقات انجام شده در رابطه با حذف آفلاتوکسین B_1 می‌باشد و پژوهش‌های کمی در رابطه با تأثیر روش‌های بیولوژیکی حذف آفلاتوکسین M_1 انجام شده است.

این تحقیق به هدف بررسی اثر باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium bifidum* در کاهش میزان سم آفلاتوکسین M_1 در ماست پروبیوتیک و اندازه‌گیری درصد جذب سم توسط دستگاه الایزا و نیز تایید نتایج به کمک روش HPLC انجام شد. همچنین میزان زنده-مانی باکتری پروبیوتیک و آغازگرهای ماست در طول

زمان ماندگاری ماست مورد بررسی قرار گرفت.باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک دارای ماتریکس پپتیدوگلیکان اند که ترکیب عمده ساختمانی دیواره سلولی است و ترکیبات دیگر آن اسید تیکوئیک، اسید لیپوتیکوئیک، لایه‌های پروتئینی و پلی‌ساکاریدهای خنثی است. این ترکیبات عملکردهای مختلفی دارند. اسیدتیکوئیک که بیش از ۵۰ درصد وزن کل دیواره سلولی را شامل می‌شود و دارای خاصیت هیدروفوبی بالایی می‌باشد، در مکانیسم جذب سطحی توکسین و اتصال به آن نقش عمده‌ای دارد (بیندر و همکاران، ۲۰۰۷).

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد هر چند، هم باکتری پروبیوتیک مورد بررسی (*Bifidobacterium bifidum*) و هم آغازگرهای معمولی ماست (*Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus*) قادر به جذب سم می‌باشند، توانایی باکتری پروبیوتیک در جذب مقادیر بالای سم در مقایسه با آغازگرهای ماست به لحاظ آماری معنی‌دار است. همچنین نتایج نشان داد که قابلیت باکتری‌ها در کاهش میزان سم در نمونه‌های با مقادیر پایین سم بسیار بیشتر است.

نتایج حاصل از زنده‌مانی در طی زمان ماندگاری نمونه-های ماست نشان داد که تعداد *Bifidobacterium bifidum* در پایان دوره نگهداری ماست (۲۱ روز) حدود ٤ سیکل لگاریتمی در مقایسه با اولین روز کاهش یافت.

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت استفاده از باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium bifidum* در جذب بیولوژیکی آفلاتوکسین M_1 از نمونه‌های غذایی بسیار موثر خواهد بود.

منابع مورد استفاده

ارسالی ع‌ع، بهاء الدین بیگی ف و قاسمی ر، ۱۳۸۸. انتقال آفلاتوکسین از خوراک دام به شیر دام و شیر پاستوریزه در شهر شیراز و حومه. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، دوره هفدهم، شماره سوم، صفحه‌های ۱۷۵ تا ۱۸۳.

تاج آبادی ابراهیمی م، جعفری پ، هاشمی م و بهرامی ه، ۱۳۹۰. ارزیابی کاهش آفلاتوکسین B_1 در حضور لاکتوباسیل های جدا شده از ترخینه با روش الایزا. مجله علمی-پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، دوره سوم، شماره هشتم، صفحه‌های ٤۳ تا ٤۸.

جعفری ر، ۱۳۸۸. بررسی میزان آلودگی آفلاتوکسین M_1 در شیرهای تحویلی و شیر پاستوریزه تولیدی کارخانه شیر منطقه ای آذربایجان شرقی، پایان نامه کارشناسی ارشد تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

سرلک ز، روحی لنگرودی م، محمدی ر، مرتضویان ام و خاکسار ر، ۱۳۹۲. اثر سوش، مقدار تلقیح و فیزیولوژی پروبیوتیک‌ها و pH نهایی تخمیر روی کاهش مقدار آفلاتوکسین M_1 در دوغ. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی، سال هشتم، شماره ۳. صفحه‌های ۲٤۱ تا ۲٤۹.

شاکری م، ۱۳۸۲. بررسی اثر پساب کره بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، میکروبی و ارگانولپتیکی ماست پروبیوتیک. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، استاندارد شماره ۷۱۳۳، ۱۳۹۰. شیر و فراورده‌های آن-اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1 به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص سازی با ستون ایمنوافینیتی-روش آزمون.

میردامادی س، رجبی ا، عزیز محسنی ف و مومن ب، ۱۳۸٦. تولید اسید لاکتیک توسط سویه‌های مختلف لاکتوباسیل. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، دوره دوم، شماره سوم. صفحه‌های ۵۷ تا ٦٤.

مرتضوی ع، قدس روحانی م و جوینده ح، ۱۳۷۵. تکنولوژی شیر و فراورده‌های لبنی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

Ali FS, Saad OAO and Salwa AGH, 2013. Probiotic stability of yoghurts during refrigerated storage. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences 5(2): 9-19.

Ardic M, Karakaya Y, Atasever M and Durmaz H, 2008. Determination of aflatoxin B_1 levels in deep-red ground pepper (isot) using immune affinity column combined with ELISA. Food and Chemical Toxicology 46: 1596-1599.

Bata A and Lasztity R, 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. Trends in Food and Technology 10: 223-228.

Bennet JW and Klich M, 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews 16(3): 497-516.

Bejaoui H and Mathieu F, 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological Saccharomyces strains. Journal of applied microbiology 97(5): 1038-1044.

Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J and Richard J, 2007. Worldwide Occurrences of mycotoxins in commodities, Feeds and feed ingredients. Animal Feed Science and Technology 137: 265-282.

Brackett RE and Marth EH, 1982a. Association of aflatoxin M_1 with casein. Zeitschrift für Le0bensmittel-Untersuchung und -Forschung 174: 439-441.

Brackett RE and Marth EH, 1982b. Fate of aflatoxin M_1 in cheddar cheese and in process cheese spread. Journal of Food Protection 45: 549-552.

Calleri E, Marrubini G, Brusotti G, Massolini G and Caccialanza G, 2007. Development and integration of an immune affinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B_1 in aqueous solutions. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44: 396-403.

Caloni F, Stammati A, Frigge G and De-Angelis I, 2006. Aflatoxin M_1 absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model. Toxicon 47: 409-415.

El-Khoury A, Atoui A and Yaghi J, 2011. Analysis of aflatoxin M_1 in milk and yogurt and AFM_1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. Food Control 22: 1695-1699.

El-Nezami H Kankaanpaa P, Salminen S and Ahokas J, 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food Carcinogen, Aflatoxin B_1. Food and Chemical Toxicology 36: 321-326.

Elsanhoty RM, Salam SA, Ramadan MF and Badr FH, 2014. Detoxification of aflatoxin M_1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. Food Control 43: 129-134.

European Commission, Commission Regulation 1881/2006/EC, 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (text with EEA relevance). Official Journal of European Union L364/5:1.

FDA Mycotoxin Regulatory Guidance, 2011. A Guide for Grain Elevators, Feed Manufacturers, Grain Processors and Exporters, Available online: http://www.fda.gov/.../GuidanceRegulation/Gui.

Gbassi GK, Vandamme TH, Yolou FS and Marchioni E, 2011. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated Lactobacillus plantarum strains in a gastrointestinal tract model. International Dairy Journal 21: 97-102.

Hassanin N, 1994. Stability of aflatoxin M_1 during manufacture and storage of Yoghurt, Yoghurt-Cheese and Acidified Milk. Journal of Science Food Agriculture 65: 31-34.

Ismail A, Akhtar S, Levin RE, Ismail T, Riaz M and Amir M, 2015. Aflatoxin M_1: Prevalence and decontamination strategies in milk and milk products. Critical Reviews in Microbiology 42(3): 418-427.

Kabak B, Brandon EFA, Var I, Blokland M and Sips, AJAM, 2009. Effects of probiotic bacteria on bioaccessibility of aflatoxin B_1 and ochrtoxin A using an in vitor digestion model under fed conditions. Journal of Environmental Science and Health 44: 472-480.

Kabak B, Dobson ADW and Var I, 2006. Strategies to Prevent Mycotoxin contamination of Food and Animal Feed: A review. Critical reviews in Food Science and Nutrition 46: 593-619.

Kailasapathy K and Rybka SL, 1997. acidophillus and Bifidobacterium spp. their therapeutic potential and survival in yoghurt. The Australian Journal of Dairy Technology 52: 28-35.

Lahtinen SJ, Haskard CA, Ouwehand AC, Salminen SJ and Ahokas JT, 2004. Binding of Aflatoxin B_1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. Food Additive and contaminants 21(2): 158-164.

Martin A and Palomino JC, 2009. Nitrate Reductase Assay: Drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberclusis*. Institute of Tropical Medicine, Mycobacteriology Unit, Antwerp, Belgium.Procedure Manual,version 2.

Masoero F, Gallo A, Diaz D, Piva G and Moschini M, 2009. Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxin M_1 excretion into milk of lactating dairy cows. Animal Feed Science and Technology 150: 34-45.

Montaseri H, Arjmandtalab S, Dehghanzadeh G, Karami S, Razmjoo MM, Sayadi M and Oryan A, 2014. Effect of production and storage of probiotic yogurt on aflatoxin M_1 residue. Journal of Food Quality and Hazard Control 1(1): 7-14.

Ong L and Shah NP, 2009. Probiotic Cheddar cheese: influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. LWT-Food Science and Technology 42: 1260-1268.

Phillips TD, Bashir-Sarr A and Grant PG, 1995. Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. Natural Toxins 3: 204-213.

Pierides M, El-Nezami H, Peltonen K, Salminen S and Ahokas J, 2000. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M_1 in a food model. Journal of Food Protection 63: 645–650.

Rahimi E, Bonyadian M, Rafei M and Kazemeini HR, 2010. Occurrence of aflatoxin M_1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. Food and Chemical Toxicology 48: 129-131.

Rasic JL, Skrinjar M and Markov S, 1991. Decrease of aflatoxin B_1 in yoghurt and acidified milks. Mycopathologia 113, 117-119.

Sambrook M, Fritsch A and Maniatis S, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, New York, 2nd Ed, vol. 3.

Sarimehmetoglu B and Kuplulu O, 2004. Binding ability of aflatoxin M_1 to yoghurt Bacteria. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 51: 195-198.

Shetty PH, Hald B and Jespersen L, 2007. Surface binding of aflatoxin B_1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. International journal of food microbiology 113: 41-46.

Shetty PH and Jespersen L, 2006. *Saccharomyces Cervisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating. Food science and Technology 17: 48-55.

Tabata S, Kamimura A, Ibe H, Hasimoto H, Ida M, Tamura Y and Nishima T, 1993. Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokyo: 1986-1990. Journal of AOAC International 76: 32-35.

Turbic A, Salminen S and Ahokas JT, 2008. Surface binding of aflatoxin B_1 by lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology 70: 3014-3020.

Vinderola G and Ritieni A, 2015. Role of probiotics against mycotoxins and their deleterious effects. Journal of Food Research 4: 10-21.

Womack ED, Sparks DL and Brown AE, 2016. Aflatoxin M_1 in milk and milk products: a short review. World Mycotoxin Journal 9(2): 305-315.

Assessment of *Bifidobacterium bifidum* ability to adsorption of Aflatoxin M_1 in probiotic yoghurt

M Sarabi-Jamab[1*], F Tajalli[2] and N Adibpour[3]

Received: November 30, 2015 Accepted: September 27, 2016

[1]Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
[2]Academic Staff Molecular Medicine, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR)-Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran
3PhD Student, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
[*]Corresponding author: E mail: m.sarabi@rifst.ac.ir

Abstract
A method of eliminating aflatoxins including aflatoxin M_1 is microbial detoxification. Reports indicate that some strains of lactic acid bacteria family through adsorption of aflatoxin in their cell wall can be effective in removing them. In this study the ability of *Bifidobacterium bifidum* in the adsorption of aflatoxin M_1 in probiotic yoghurt was assessed. Thus, probiotic and starters (10^8 cfu/ml) were inoculated to restructured skimmed milk without aflatoxin M_1. Then, the samples were spiked by aflatoxin M_1 in different concentrations (0.1, 0.5 and 0.75 ppb). The concentration of aflatoxin residue in supernatant of probiotic yoghurt and control samples after different storage times (1, 7, 14 and 21 day) was measured by ELISA method and the results were confirmed by HPLC. The results showed that although, both probiotic and starters was able to adsorb aflatoxin M_1, the ability of *Bifidobacterium bifidum* was higher. Also, the probiotic and starters were able to reduce the higher amount of toxin, when the toxin concentration was low. The results of survivability of *Bifidobacteriunm bifidum* showed that during storage time, the number of surviving cells decreased 4 logarithmic cycles.

Keywords: Aflatoxin M_1, *Bifidobacterium bifidum*, Probiotic yoghurt