

بررسی قابلیت *Bifidobacterium bifidum* در جذب آفلاتوکسین M₁ از ماست پروبیوتیک

محبوبه سرابی جماب^{۱*}، فائزه تجلی^۲ و نسیم ادیب‌پور^۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۶

^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 M₁ 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 M₁ از ماست پروبیوتیک بررسی گردید. بدین منظور حدوداً ۱۰^۸ cfu/ml از باکتری پروبیوتیک و آغازگر به شیر پس‌چرخ بازسازی شده فاقد آفلاتوکسین M₁ تلقیح شد. سپس نمونه‌ها با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۰/۷۵ قسمت در بیلیون (ppb) آفلاتوکسین M₁ آلوده شدند. غلظت آفلاتوکسین باقیمانده در سوپرناتانت نمونه‌های ماست در روزهای اول، هفتم، چهاردهم و بیست و یکم پس از تولید ماست، توسط روش الیزای رقابتی تعیین و نتایج توسط HPLC تایید شد. یافته‌های حاصل از این 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 ۴ سیکل لگاریتمی کاهش یافت.

واژگان کلیدی: آفلاتوکسین M₁، *Bifidobacterium bifidum*، ماست پروبیوتیک

مقدمه

خوراک دام تولید می‌شوند. آلودگی میکوتوکسین در مواد غذایی تهدید بزرگی برای سلامت انسان، حیوانات و تجارت بین‌المللی محسوب می‌شود (بیندر و همکاران، ۲۰۰۷). آفلاتوکسین‌ها از خطرناک‌ترین میکوتوکسین‌ها

میکوتوکسین‌ها متابولیت‌های سمی تولید شده توسط قارچ‌ها هستند که به‌طور عمده توسط قارچ‌های ساپروفیت در حال رشد روی برخی از مواد غذایی و

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^۱ حداکثر مقدار مجاز آفلاتوکسین M_1 در شیر ۰/۵ قسمت در بلیون تعیین شده است. این مقدار در کشورهای اروپایی کمتر است؛ به طوری که حداکثر مجاز آفلاتوکسین M_1 در شیر ۰/۰۵ قسمت در بلیون 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 بلیون تعیین گردیده است (استاندارد ملی ایران ۷۱۳۳، ۱۳۹۰؛ سازمان غذا و داروی آمریکا، ۲۰۱۱ و اتحادیه اروپا، ۲۰۰۶).

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، ۲۰۱۶). 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

می‌باشند و عمدتاً توسط برخی از گونه‌های جنس *Aspergillus* نظیر *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* 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 *Aspergillus* 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 ۴- 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، ۱۳۸۶؛ آردیک و همکاران، ۲۰۰۸ و ماسوره و همکاران، ۲۰۰۹؛ وماک و همکاران، ۲۰۱۶).

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. حضور آفلاتوکسین M_1 در این فراورده‌ها در مقادیر بالاتر از حد استاندارد، برای

¹ Food and Drug Administration (FDA)

انسان شوند شامل تولید اسیدهای آلی، پراکسیدها و باکتریوسیدها و رقابت با باکتری‌های مضر و بیماری-زای 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 M₁ از ماست پروبیوتیک مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

آفلاتوکسین M₁

پودر آفلاتوکسین M₁ از شرکت سیگمای آلمان خریداری شد. سپس با استفاده از استونیتریل محلول مادری با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. به منظور آماده کردن نمونه‌های ماست، محلول‌های آفلاتوکسین M₁ با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۰/۷۵ قسمت در بلیون تهیه شد (ساریمهت اوغلو و کوپلولو، ۲۰۰۴).

تهیه استاندارد ۱۰ مک فارلند

در این پژوهش برای بدست آوردن کدورت سلولی معادل 10^9 cfu/ml تا 10^{11} 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، ۱/۴۴ گرم فسفات مونو هیدروژن سدیم و ۰/۲۴ گرم از فسفات دی هیدروژن پتاسیم توزین و در بالون ژوزه به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسید. pH بافر تهیه شده روی ۷/۲ تنظیم شد (سامبروک و همکاران، ۱۹۸۹).

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، ۲۰۰۶).

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، ۲۰۱۴). 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 سوی دیگر برخی از این میکروارگانیسم‌ها به عنوان پروبیوتیک شناخته شده و سبب افزایش ارزش غذایی محصول می‌گردند (ساریمهت اوغلو و کوپلولو، ۲۰۰۴، بنت و کلیک، ۲۰۰۳، باتا و لاسزیتینی، ۱۹۹۹ و 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 ۲۰۱۴). 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 به وسیله آن می‌توانند موجب ارتقای سلامت

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 °C ۳۷ 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 بی‌هوایی 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 g ۳۴۰۰ شستشو شده و رسوب میکروبی جداسازی گردید. غلظت باکتری‌ها توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰nm 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، ۱۳۸۶، قیاسی و همکاران، ۲۰۱۱ و لاهتین و همکاران، ۲۰۰۴).

تهیه ماست

جهت تهیه ماست، شیر پس چرخ بازساخته ۱۲٪ ابتدا تا دمای °C ۹۰-۹۵ به مدت ۵ دقیقه حرارت دهی شد، پس از سرد سازی تا دمای °C ۴۲ و افزودن آفلاتوکسین در ۳ سطح ۰/۱، ۰/۵ و ۰/۷۵ 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 °C ۴۲ گرمخانه گذاری شد (ساریمهت اوغلو و کوپولو، ۲۰۰۴). نمونه‌های ماست تولید شده جهت اطمینان از قرار داشتن در دامنه pH مناسب (حدود

۴/۶)، تعیین pH شدند. سنجش pH در فواصل ۷ روزه در طول دوره نگهداری ۲۱ روزه نیز انجام گرفت. تعیین زنده مانی میکروارگانیزم‌ها در نمونه‌های ماست طی دوره نگهداری جهت تعیین زنده مانی باکتری‌های آغازگر و پروبیوتیک مورد نظر در نمونه‌های تولید شده، از نمونه‌های 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 رقت‌های ۵- 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 g ۲ نئومایسین سولفات، g ۳ اسید نالیدیکسیک، g ۶۰ کلرور لیتیم و g ۴ پارمومایسین سولفات (NNLP)، در ۱ لیتر آب مقطر آماده سازی شده و پس از استریل سازی توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون در دمای °C ۴ نگهداری شد. از محلول استوک به دست آمده مقدار ۵ mL به ۱۰۰ mL محیط کشت MRS agar در حالت مذاب که حاوی ۰/۵ mg/mL ال-سیستئین هیدروکلراید بود، افزوده گردید. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای °C ۳۷ و شرایط بی‌هوایی قرار داده شد.

اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین M₁ به روش الایزا و

HPLC

پس از هر بار نمونه برداری نمونه‌های ماست، جهت تعیین میزان آفلاتوکسین جذب نشده توسط میکروب‌های نمونه، سوپرناتانت ماست‌ها به وسیله سانتریفوژ با دور g ۳۴۰۰، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه جداسازی و در دمای °C ۲۰- نگهداری شد (ساریمهت اوغلو و کوپولو، ۲۰۰۴). اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین M₁ باقیمانده در سوپرناتانت با روش الایزا انجام شد. کیت خریداری شده ساخت شرکت یوروپروکسیما^۱ و روش به‌کار رفته برپایه الایزای رقابتی مستقیم بود. به

¹ Euro Proxima

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 (*Lactobacillus* و *Streptococcus thermophilus*) *Bifidobacterium bulgaricus* و باکتری پروبیوتیک *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 در شکل ۲ مشاهده می‌شود. مخلوط دو باکتری *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus* پس از حدود ۱۶ ساعت به بالاترین میزان رشد خود دست یافتند.

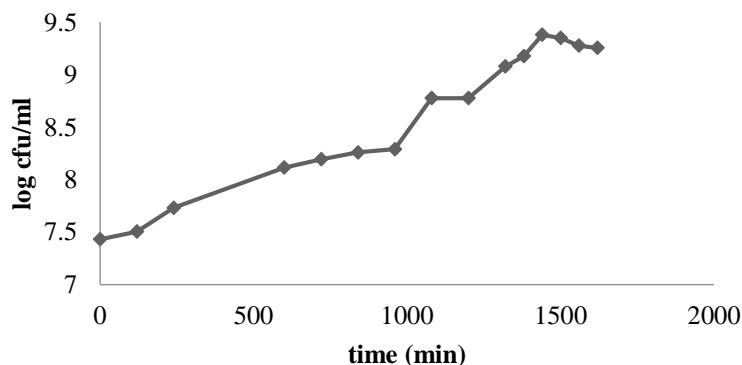
منظور تایید نتایج حاصل از الیزا از روش HPLC استفاده گردید (کالری و همکاران، ۲۰۰۷).

آنالیز آماری

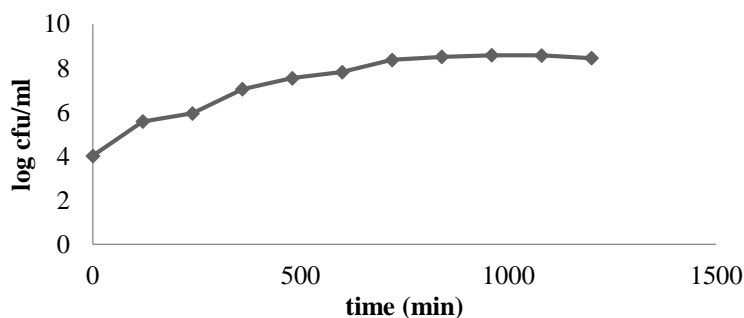
به منظور آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. نتایج این تحقیق بر پایه طرح آماری کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل آنالیز شد. فاکتورهای لحاظ شده شامل غلظت سم (سه سطح) و زمان نگهداری (چهار سطح) بود. آزمایش‌ها در دو تکرار انجام شد. میانگین نتایج با نرم افزار آماری SPSS و براساس آزمون 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



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

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

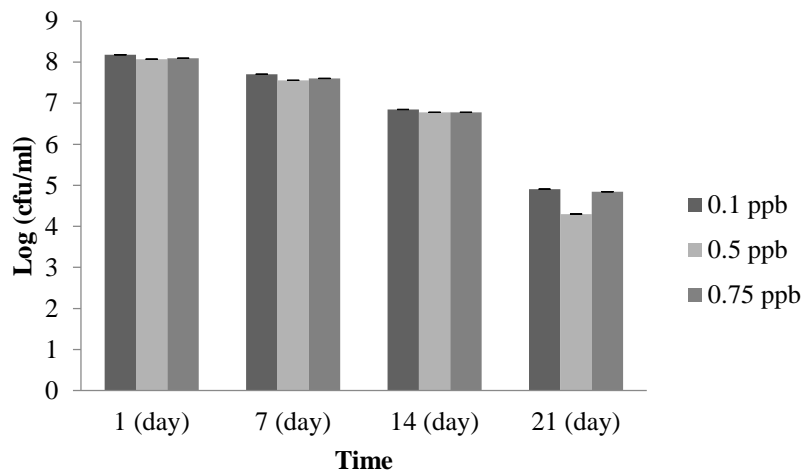
همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است زنده‌مانی مخلوط آغازگرهای ماست (*Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus*) در نمونه‌های آلوده شده با غلظت‌های پایین سم (۰/۱ و ۰/۵ قسمت در بلیون) بیشتر بود. هرچند باکتری‌های آغازگر ماست در مقایسه با باکتری‌های پروبیوتیک به کاهش pH مقاوم‌تر می‌باشند (علی و همکاران، ۲۰۱۳) در طول زمان ماندگاری ماست، تعداد 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.

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

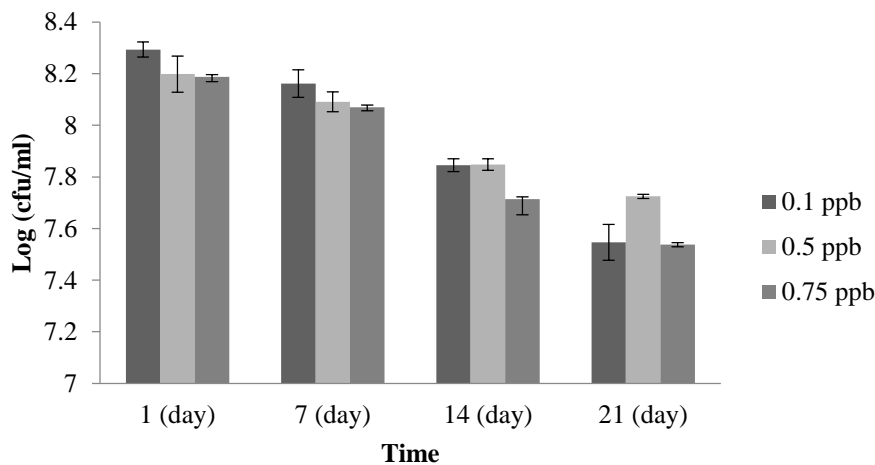
فعالیت و زنده‌ماندن پروبیوتیک‌ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات دارویی است. به همین دلیل فدراسیون بین‌المللی لبنیات وجود حداقل 10^7 باکتری پروبیوتیک زنده در هر گرم از فراورده‌های لبنی به هنگام مصرف را ضروری دانسته است. این درحالی‌است که در مطالعات مختلف حداقل دوز مورد نیاز برای بروز اثرات درمانی پروبیوتیک‌ها 10^8 - 10^9 cfu/ml بیان شده است. بر این اساس، حدود 10^8 - 10^9 cfu/ml از مخلوط باکتری‌های آغازگر ماست و *Bifidobacterium bifidum* جهت تهیه ماست معمولی و ماست پروبیوتیک تلقیح گردید و سپس زنده‌مانی آن‌ها 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 بلیون آلوده شده بودند، بیشترین تعداد باکتری‌های زنده در نمونه‌های آلوده شده به کمترین غلظت سم مشاهده گردید (شکل ۳). همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، زنده‌مانی *Bifidobacterium bifidum* با افزایش زمان ماندگاری ماست در ۴ 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 10^0 cfu/ml رسید. نتایج این تحقیق نشان داد که در نمونه‌های آلوده شده با هر سه سطح غلظت سم، کمترین میزان زنده‌مانی 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



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

در زمان‌های اول نگهداری حاصل گردید. پس از آن ۱۴ روز نگهداری ماست بیشترین تأثیر را در کاهش سم در سوپرناتانت ماست داشت؛ به طوری که درصد حذف آفلاتوکسین پس از گذشت ۱۴ روز ۹۴/۲ 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 توریبک و همکاران (۲۰۰۷) اتصال اختصاصی آفلاتوکسین M₁ موجود در مواد لبنی با باکتری‌های اسید لاکتیک را مورد مطالعه

بررسی اثر *Bifidobacterium bifidum* در میزان جذب آفلاتوکسین M₁ با توجه به نتایج آنالیز واریانس، بیشترین درصد حذف سم به نمونه های آلوده شده با کمترین میزان سم آفلاتوکسین M₁ 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*

ماتیو (۲۰۰۴) در رابطه با اثر باکتری *Lactobacillus rhamnosus* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* بر کاهش اوکراتوکسین هماهنگ است. حرارت ممکن است سبب دناتوره شدن پروتئین و شکل‌گیری 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 می‌شود. همچنین حرارت می‌تواند با انحلال برخی واحدهای مانانی سطح سلول سبب افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی گردد. که در نهایت سبب افزایش دسترسی بیشتر سایت‌های اتصال می‌شود.

بررسی اثر باکتری‌های آغازگر ماست در میزان جذب آفلاتوکسین M₁

همانطور که در شکل ۶، 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 M₁ بسیار کاهش یافت به طوری که در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ قسمت در بیلیون درصد جذب سم به ترتیب تنها ۲۹/۴۵ و ۴۹/۵۳ 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 ۰/۵ و ۰/۷۵ قسمت در بیلیون آفلاتوکسین M₁، پس از ۲۱ روز نگهداری ماست در دمای ۴ °C حاصل گردید.

ساریمهت اوغلو و کوپلولو (۲۰۰۴) اثر *Lactobacillus bulgaricus* سویه CH-2 و

قرار دادند. در این مطالعه توانایی این باکتری‌ها 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 نمی‌کشد. 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 پروبیوتیک‌ها و pH نهایی تخمیر روی کاهش مقدار آفلاتوکسین M₁ را در دوغ بررسی کرده و گزارش کردند که *Lactobacillus acidophilus* بصورت زنده در مقدار تلقیح $\log \text{cfu/ml}$ ۷ در pH نهایی تخمیر ۴/۵ بهترین شرایط را در مقایسه با *Lactobacillus rhamnosus* و *Bifidobacterium bifidum* و *Lactobacillus casei* برای کاهش آفلاتوکسین M₁ آزاد در سطح ۰/۵ 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 B₁ در سویه‌های مختلف *Saccharomyces cerevisiae* در شرایط فیزیکی و شیمیایی مختلف سنجیدند. این سویه‌ها از غذاهای تخمیری آفریقای شرقی جدا شده بودند. نتایج نشان داد تیمار حرارتی ۵۲ °C به مدت ۵ دقیقه سبب افزایش جذب از ۳۸٪ به ۴۶٪ و بعد از ۱۰ دقیقه به ۵۶٪ شد. در تحقیق دیگری که توسط شتی و جسرپرسن (۲۰۰۶) انجام شد، تیمار اتوکلاو میکروب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه جذب را تا ۷۹٪ افزایش داد. افزایش جذب در تیمارهای فیزیکی بیانگر اتصال آفلاتوکسین B₁ به سطح سلول میکروب است. این نتایج با نتایج به دست آمده از بررسی‌های ال-نظامی و همکاران (۱۹۹۸) و بژیوآ و

کرد. از طرف دیگر، کاهش قابل ملاحظه ای در مقدار آفلاتوکسین M₁ در شیر اسیدی شده پس از ۱۴ روز مشاهده شد.

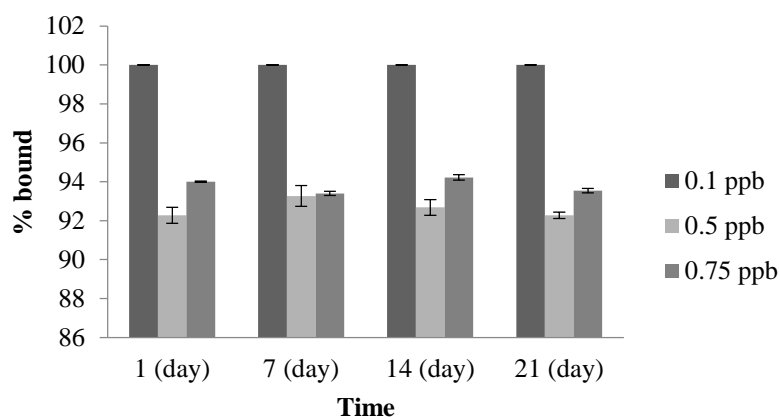
پریدز و همکاران (۲۰۰۰) تاثیر سویه‌های مختلف باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک، به صورت زنده و نیز کشته شده در اثر حرارت را در کاهش آفلاتوکسین M₁ از محیط مایع، شیر پس چرخ و شیر کامل بررسی نمودند. باکتری‌های کشته شده توانایی حذف مقادیر بیش‌تری از آفلاتوکسین را دارا بودند.

ال خوری و همکاران (۲۰۱۱) مشخص نمودند توانایی باند شدن *Lactobacillus bulgaricus* به آفلاتوکسین M₁ بعد از ۱۴ ساعت ۸۷/۶ درصد و در مورد *Streptococcus thermophilus* ۷۰ درصد است. درحالی‌که اتصال با آفلاتوکسین M₁ 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 ۱۴ ساعت به ترتیب ۲۱/۶ و ۶۸ درصد گزارش گردید.

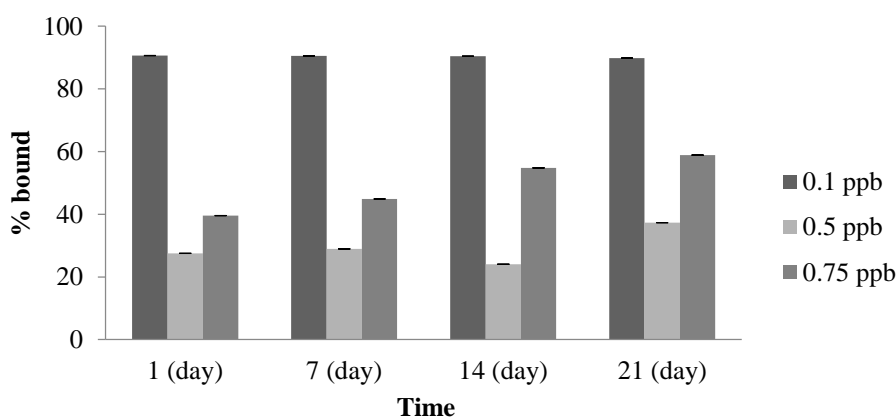
Streptococcus thermophilus سویه ST-36 را در اتصال به آفلاتوکسین M₁ در محلول بافر نمکی فسفات ارزیابی نمودند. فعالیت هر دو سویه در حذف آفلاتوکسین M₁ از شیر بازسازی شده و آلوده به توکسین و ماست تهیه شده از آن نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد قابلیت هر دو سویه مذکور در حذف آفلاتوکسین M₁ از شیر بازسازی شده بیش از بافر نمکی فسفات و ماست بود. میزان اتصال آفلاتوکسین M₁ در ماست ۱۴/۳ درصد به دست آمد. دلیل اصلی آن می‌تواند مربوط به اتصال سم به کازئین شیر باشد. براکت و مارث (۱۹۸۲ الف و ب) گزارش کردند که به طور متوسط آفلاتوکسین M₁ ۳۰/۷٪ در شیر تیمار شده با آنزیم پروتئولیتیک بیشتر از شیر تیمار نشده وجود دارد و پیشنهاد کردند که آفلاتوکسین M₁ توسط پروتئین شیر جذب می‌شود. این محققان در مطالعه ای دیگر گزارش کردند که آفلاتوکسین M₁ توزیع همگن و یکنواختی در شیر نشان نمی‌دهد و بخشی از توکسین قابل استخراج از شیر نیست.

توانایی اتصال کمتر آغازگرهای ماست به آفلاتوکسین M₁ در ماست نسبت به شیر می‌تواند 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 می‌افتد (راسیک و همکاران ۱۹۹۱). تاباتا و همکاران (۱۹۹۳) نیز گزارش کردند که غلظت شیر بر روی میزان جذب آفلاتوکسین موثر است.

حسنین (۱۹۹۴) پایداری آفلاتوکسین M₁ در طول فرایند تولید و انبارمانی ماست، ماست پنیری و شیر اسیدی شده را بررسی کرد. بیشترین میزان آفلاتوکسین M₁ (۷۱٪) از ماست پنیری پس از ۱۴ 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 ۱۴ روز در ماست به میزان ۴۱٪ باقی ماند. کاهش pH در طی نگهداری در ماست، آن را مستعد کاهش بیشتر آفلاتوکسین خواهد



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



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

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 الیزا و نیز تایید نتایج به کمک روش HPLC انجام شد. همچنین میزان زنده-مانی باکتری پروبیوتیک و آغازگرهای ماست در طول

نتایج اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین در سوپرناتانت

نمونه‌های ماست با استفاده از دستگاه HPLC

به منظور تایید آزمون الیزا 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 الیزا مطابقت داشته و روش الیزا 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

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 (*Lactobacillus* و *Streptococcus thermophilus*) در مجموع می‌توان نتیجه گرفت استفاده از باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium bifidum* در جذب بیولوژیکی آفلاتوکسین M₁ از نمونه‌های غذایی بسیار موثر خواهد بود.

نتایج حاصل از زنده‌مانی در طی زمان ماندگاری نمونه‌های ماست نشان داد که تعداد *Bifidobacterium bifidum* در پایان دوره نگهداری ماست (۲۱ روز) حدود ۴ سیکل لگاریتمی در مقایسه با اولین روز کاهش یافت.

منابع مورد استفاده

ارسالی ع، 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 B₁ در حضور لاکتوباسیل های جدا شده از ترخینه با روش الیزا. مجله علمی-پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، دوره سوم، شماره هشتم، صفحه‌های ۴۳ تا ۴۸.

جعفری ر، ۱۳۸۸. بررسی میزان آلودگی آفلاتوکسین M₁ 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 M₁ در دوغ. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی، سال هشتم، شماره ۳. صفحه‌های ۲۴۱ تا ۲۴۹.

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 M₁ به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص سازی با ستون ایمونوفینیتی-روش آزمون.

میردامادی س، رجبی ا، عزیز محسنی ف و مومن ب، ۱۳۸۶. تولید اسید لاکتیک توسط سویه‌های مختلف لاکتوباسیل. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، دوره دوم، شماره سوم، صفحه‌های ۵۷ تا ۶۴.

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 B₁ 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 M₁ with casein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 174: 439-441.
- Brackett RE and Marth EH, 1982b. Fate of aflatoxin M₁ 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 B₁ in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44: 396-403.
- Caloni F, Stamatii A, Frigge G and De-Angelis I, 2006. Aflatoxin M₁ 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 M₁ in milk and yogurt and AFM₁ 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 B₁. *Food and Chemical Toxicology* 36: 321-326.
- Elsanhoty RM, Salam SA, Ramadan MF and Badr FH, 2014. Detoxification of aflatoxin M₁ 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 M₁ 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 M₁: 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 B₁ and ochratoxin A using an in vitro 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. acidophilus 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 B₁ 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 tuberculosis*. 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 M₁ 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 M₁ 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 M₁ in a food model. Journal of Food Protection 63: 645-650.
- Rahimi E, Bonyadian M, Rafei M and Kazemeini HR, 2010. Occurrence of aflatoxin M₁ 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 B₁ 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 M₁ to yoghurt Bacteria. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 51: 195-198.
- Shetty PH, Hald B and Jespersen L, 2007. Surface binding of aflatoxin B₁ 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 B₁ 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 M₁ in milk and milk products: a short review. World Mycotoxin Journal 9(2): 305-315.

Assessment of *Bifidobacterium bifidum* ability to adsorption of Aflatoxin M₁ in probiotic yoghurt

M Sarabi-Jamab^{1*}, F Tajalli² and N Adibpour³

Received: November 30, 2015

Accepted: September 27, 2016

¹Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran

²Academic 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 M₁ 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 M₁ in probiotic yoghurt was assessed. Thus, probiotic and starters (10⁸ cfu/ml) were inoculated to restructured skimmed milk without aflatoxin M₁. Then, the samples were spiked by aflatoxin M₁ 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 M₁, 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 *Bifidobacterium bifidum* showed that during storage time, the number of surviving cells decreased 4 logarithmic cycles.

Keywords: Aflatoxin M₁, *Bifidobacterium bifidum*, Probiotic yoghurt