حذف سم افلاتوکسین ام۱ از محیط شیر بازسازی شده از طریق اضافه کردن سه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مخمر ساکارومایسیس بولاردی* به روش کمی‌سازی HPLC

رضا خدیوی بروجنی[۱]، ودوود رضویلر[۱]، سید امیر علی انوار[۱]*،بهروز اکبری ادرگانی[۲]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی،دانشکده دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات آزمایشگاهی دارو و غذا، سازمان دارو و غذا، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.
***نویسنده مسئول:** *saaa4824@gmail.com*

تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۰۵/۱۵

چکیده

این تحقیق بر روی حذف سم افلاتوکسین ام۱ در ۲ غلظت ۰/۵ و ۰/۷۵ نانوگرم در میلی لیتر از محیط شیر بازسازی شده از طریق اضافه کردن سه پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus*، *L. plantarum* و *Saccharomyces boulardii* در تراکم‌های 10^7 و10^9 CFU/ml ، در دمای ۴ و ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ و ۹۰ دقیقه زمان هدف‌گذاری شد. بیشترین عمکرد باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در حذف سم افلاتوکسین ام۱ در غلظت 10^7 CFU/ml و ۰/۷۵ نانوگرم در میلی لیتر، در دمای ۳۷ ^oC (شکل ۱)، پس از ۹۰ دقیقه مواجهه مشاهده شد (۳/۷۹±۶۴/۳۱ درصد) که بدون اختلاف معنی‌داری (p>۰/۰۵). از مقدار مورد نظر در زمان ۳۰ دقیقه (۵/۰۰±۶۳/۸۶) ثبت گردید. بیشترین درصد میانگین برآوردی حاشیه‌ای حذف سم افلاتوکسین ام۱ از محیط شیر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم در دقیقه* ۹۰ تحقیق بود (۳/۷۹±۷۱/۴۶ درصد) کهبا مقدار آن در ۳۰ دقیقه اول (۵/۰۰±۳۶/۷۳) تفاوت معنی داری داشت (p<۰/۰۵). بیشترین توانایی در حذف افلاتوکسین ام۱ از محیط شیر در بین این سه میکروارگانیزم مربوط به مخمر *ساکارومایسیس بولاردی در دقیقه* ۹۰ و غلظت مخمر 10^9 CFU/ml در دمای (۳۷ درجه سانتی‌گراد) بود (۳/۷۹±۹۶/۸۸)که که بدون تغییر معنی دار (p>۰/۰۵) نسبت به دقیقه ۳۰ ام تحقیق (۵/۰۰±۹۱/۵۵) درصد بالایی از سم افلاتوکسین را به خود متصل نمود. از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که در کاهش میزان سم افلاتوکسین ام۱ در دمای یخچال، باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم مناسب است و *ساکارومایسیس بولاردی* در تراکم 10^9 CFU/ml در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌تواند در کاهش سم افلاتوکسین ام۱ به میزان تقریبی ۱۰۰٪ در محیط شیر موثر باشد.

کلید واژه ها: افلاتوکسین، شیر، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مخمر ساکارومایسیس بولاردی.*

مقدمه

یکی از مهمترین سموم قارچ پایه، افلاتوکسین است (Sepahdari, et al., 2010)، که از طریق قارچ‌های سمی از جمله *A flavus*, *Asper*gillus *parasiticus* و *A. nomius* رشد کرده بر روی مواد غذایی بخصوص غلات، تولید می شود (Corassin, et al., 2013) و با خوردن ماده غذایی آلوده به این سموم توسط دام، وارد بدن آنها شده، خطر ابتلا به سرطان کبد و سایر بیماری‌های خطرناک را موجب می‌شود (Elsanhoty, et al., 2014). در دام‌ها، افلاتوکسین ب۱ در کبد متابولیزه شده و تبدیل به افلاتوکسین ام۱، ترکیبی که گفته می‌شد از افلاتوکسین ب۱ کم خطرتر است، می‌شود که موجب بروز بیماری‌های خطرناک از جمله انواع سرطان‌ها و بیماری‌های کبدی در مصرف کنندگان شیر می‌شود (Gürbay, et al., 2010). این مشکل بیشتر در دامداری‌های موجود در مناطق گرم و مرطوب مشاهده می‌شود (Fallah, et al., 2011) و نه تنها کشورهای نگهدارنده مواد غذایی بلکه کشورهای تولید

کننده مواد غذایی نیز از بحران افلاتوکسین رنج می‌برند (Assaf, et al., 2018). در حال حاضر یکی از چالش‌ها و نگرانی‌ها در حوزه سلامت و بهداشت شیر تماس مستقیم انسان و بخصوص سالمندان و کودکان با سم افلاتوکسین ام۱ می‌باشد (Bahrami, et al., 2016; Galvano, et al., 2001; Xiong, et al., 2018). لذا بهداشت مواد غذایی و حفظ کیفیت آن بخصوص در هنگان انبارداری بسیار حایز اهمیت است (Seyfzadeh, et al., 2013). بر خلاف دهه پیش، اخیرا آژانس بین المللی تحقیقات سرطان سم افلاتوکسین ام۱ را در گروه ۱، خطرسازترین گروه سرطانزا دسته‌بندی کرده است (IARC, 2002). راهکارهای مختلفی برای کاهش سم و یا از بین بردن عوارض جانبی مایکوتوکسین ها شناسایی شده است ولیکن روشی که بتواند باعث تغییر کیفیت محصول غذایی و طعم و مزه آن نشود از اهمیت بیشتری برای مصرف کننده گان برخوردار است (Wochner et al., 2018). جلوگیری از رشد قارچهای سمی ، سم زدایی مواد غذایی و خوراکهای آلوده به سموم ، تخریب ساختار و مهار جذب مایکوتوکسین ها در دستگاه گوارش.از جمله این موارد است (Hathout and Aly, 2014). روشهای متفاوتی در صنعت برای حذف مایکوتوکسین ها همچون روش های فیزیکی (حرارت دادن و تابانیدن اشعه ماورا بنفش) و شیمیائی (گاز کلر یا ترکیبات اکسید کننده) مورد استفاده قرار گرفته است (Sarlak et al., 2017). در همین راستا روش‌هایی از جمله ازن درمانی نیز برای حذف افلاتوکسین از شیر در صنعت لبنیات بکار گرفته شده است (Mohammadi, et al., 2017). روشی که دارای حساسیت و اختصاصیت بالا بوده و از طرف دیگز هزینه کاربردی زیادی نیز نداشته باشد، روش حذف زیستی است که با جایگزینی پروبیوتیک با سم و یا حذف یا کاهش مقدار جذب آن از طریق دستگاه گوارش با کمک ترشحات پروبیوتیکی صورت می گیرد (Ji et al., 2016, Alberts et al., 2017). از روش‌های دیگر حذف و یا کاهش افلاتوکسین از شیر، استفاده از باکتری‌ها یا مخمرها در قالب پروبیوتیک‌ها بوده است (Alberts, et al., 2009; Peltonen, et al., 2001). برخی از محققین (Kabak, Var, 2008) به توانمندی و نقش لاکتوباسیلوس‌ها و مخمرها در اتصال به سم اقلاتوکسین در شیر پی برده‌اند و اشاره داشتند که مخمر *ساکارومایسیس بولاردی* بصورت تکی یا در ترکیب با *لاکتوباسیلوس*‌ها قادر است عمده سم افلاتوکسین ام۱ را از محیط شیر جدا کند (Corassin, et al., 2013). تأثیر آنتاگونیستی عوامل پروبیوتیک بر روی قارچهای مایکوتوکسیژنیک مبتنی بر رقابت در فضای فیزیکی و جذب مواد مغذی است که برای رشد و تولید متابولیت های ضد قارچ و انگل با ایجاد یک بیوفیلم و همچنین ایجاد یک واکنش دفاعی در طول انتشار رادیکالهای آزاد اکسیژن صورت می گیرد. مواد مغذی مورد نیاز این میکروارگانیسم ها از طریق تجزیه سلولهای زنده و مرده یا سایر میکروارگانیسم های موجود در محیط است. به نظر می رسد پپتیدوگلیکان موجود در لاکتوباسیولوس رامنوسوس در اتصال کووالانسی با سم افلاتوکسین ام۱ موثر بوده است (Lahtinen et al., 2004). در تحقیق دیگری مشخص شده زنده لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس موثر تر از کشته آنها در حذف افلاتوکسین موجود در شیر نقش دارند. در همین ارتباط نقش دمای ۳۷ درجه از دمای ۴ درجه سانتیگراد موثر تر گزارش گردیده است (Bovo et al., 2013).

با توجه به نتایج و یافته های ذکر شده بالا، این تحقیق بر روی حذف سم افلاتوکسین ام۱ از محیط شیر بازسازی شده از طریق اضافه کردن سه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مخمر ساکارومایسیس بولاردی* به محیط در مواجهه با برخی شرایط متفاوت دمای مواجهه، غلظت سم بکار برده شده، تراکم پروبیوتیک‌های استفاده شده و زمان مواجهه قرار داده شد، متمرکز شد.

روش کار

مواد محلول

برای کشت باکتری‌ها از ترکیب (MRS) Agar and de Man, Rogosa, and Sharpe از شرکت سیگما-اولدریچ، آمریکا استفاده شد. PBS و استونیتریل به ترتیب از Sinagene (ایران) و مرک (آلمان) خریداری گردید. آب مقطر (DW) با استفاده از یک واحد تقطیر آب (GFL،۲۲۰۴ ، آلمان) خالص‌سازی و تهیه شد. تمام مواد شیمیایی HPLC و واکنشگرها از شرکت سیگما-اولدریچ، آمریکا خریداری شده است.

آماده‌سازی میکروبی

هر کپسول ۲۵۰ میلی‌گرمی مشتمل بر $2/5 \times ۱۰^{۹}$ مخمر زنده *S.bulardii* (مخمر خشک از *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN CBS 5926)، یکی از گونه‌های پروبیوتیک مورد استفاده در این تحقیق بود (Gmbh،Ardeypharm Germany) که پس از خریداری به آزمایشگاه غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، ایران منتقل و سپس استخراج و کشت شد. پودر مخمر به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت Sabaro Dextrose Agar 2٪ (SDA)) در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتیگراد کشت شد. سپس از محیط SDA به محیط کشت YNB منتقل شد تا در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در طی ۱۸ ساعت در فاز لگاریتمی کشت داده شود.

Lactobacillus و*L. rhamnosus* PTCC 1637 *plantarum* PTCC 1745 نیز برای قابلیت اتصال افلاتوکسین ام۱ در شیر آلوده، از مرکز کشت‌های میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران (CIMCI) مورد استفاده قرار گرفت. این باکتری‌های لیوفیلیزه در محیط آبگوشت MRS در فضای آزمایشگاه، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت کشت شدند (Biernasiak, et al., 2006). پرگنه‌های رشد کرده در پتری دیش‌ها تا زمانی که کشت‌های جدید لازم بود، در دمای یخچال نگهداری شدند. سپس این باکتری‌ها مکررا کشت داده شد تا حجم آن به $۱۰^{۹}$ CFU برسد. سپس رقت‌های متوالی تهیه شد تا غلظت تمامی پروبیوتیک‌ها به غلظت $۱۰^{۹}$ CFU رسید. پس از ۱۰ دقیقه پلت‌گذاری با سانتریفوژ یخچالدار با سرعت $۳۵۰۰ \times g$، آب رویه باکتری‌های کشت شده حذف گردید. برای جلوگیری از اشتباهات احتمالی در اندازه‌گیری افلاتوکسین ام۱، سلول‌های باکتریایی سه بار با ۵ میلی لیتر از آب مقطر استریل شسته شدند. یک سوسپانسیون میکروبی با اضافه کردنPBS بدست آمد و به وسیله یک اسپکتروفتومتر (Ultrospec 2000، USA،Pharmacia Biotech Inc.) با استاندارد ۳ مک فارلند در غلظت‌های ذکر شده تنظیم و کدورت در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Kahouli, et al, 2017). سپس محلول $۱۰^{۹}$ CFU به نسبت۱۰۰: ۱ رقیق تا رقت $۱۰^{۷}$ برای تلقیح به شیر بدست آید.

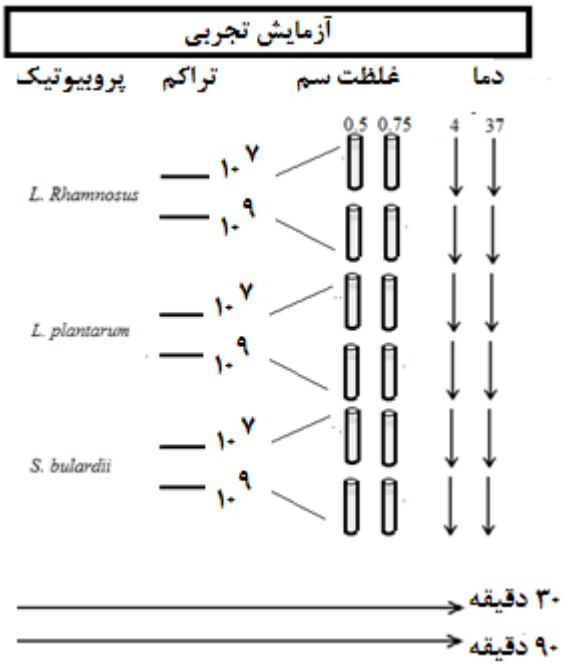
آماده‌سازی شیر

با افزودن آب مقطربه نسبت ۱۰ :V / W۱ به یک بطری حاوی پودر شیر خشک بدون چربی (Merck 115363، Germany) بر اساس دستورالعمل‌های سازنده برای به دست آوردن حجم مناسب محلول برای ۲۴۰ نمونه (هر ۱۰۰ میکرولیتر) که باید از طریق آزمایش ELISA ارزیابی شود، انجام شد

محلول آفلاتوکسین و طراحی مطالعه

یک محلول استاندارد شامل ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر افلاتوکسین ام۱ مخلوط شده در استونیتریل، خریداری گردید (Sigma-Aldrich, ۴۶۳۱۹SUPERCO). سپس به نسبت ۲۵: ۷۵ از ترکیب آب/استونیتریل به محلول ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر رقیق گردید. در این مطالعه برای انجام آزمایش ELISA، ۱۴۴ لوله فالکون حاوی دو سطح از افلاتوکسین ام۱ (۰/۵ و ۰/۷۵ نانوگرم در میلی لیتر) با استفاده از یک اسپکتروفتومتر (Ultrospec, 2000)، تعیین شد. نحوه استفاده از سه میکروارگانیسم .*L. Rhamnosus*،*L.plantarum* و *S.bulardii*، در دو غلظتCFU/ml $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۹}$ در دو دمای ۴ و ۳۷ درجه

سانتی‌گراد در طی دوره انکوباسیون ۳۰ و ۹۰ دقیقه در شکل ۱ توضیح داده شده است.



شکل۱- طرح شماتیک آزمایش تجربی انجام شده

در این تحقیق که نشان دهنده مواجهه شدن چند گونه میکروارگانیزم با تراکم‌های مختلف سم افلاتوکسین ام۱و در شرایط غلظت‌های مختلف افلاتوکسین، دما و در زمان‌های مواجهه ۳۰ تا ۹۰ دقیقه می‌باشد.

تلقیح باکتری به شیر

برای تولید یک پلت باکتریایی، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پلت که در انتهای لوله تشکیل شده بود، دو بار با DW شسته شد و سپس به آرامی آن را چرخانیده تا مخلوط گردد. ۱ میلی لیتر به پلت اضافه شد، سپس به ۹ میلی لیتر شیر خشک اضافه شد. حجم خاصی از کشت شامل $۱۰^{۷}$ و$۱۰^{۹}$ CFU/ml از میکروب‌ها به میکروتیوب‌های اپندورف منتقل و با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. آب رویه حذف و پلت‌های باکتریایی باقیمانده دو بار با نرمال سالین شسته شدند. ۱ میلی لیتر از آب استریل به هر پلت اضافه شد، نهایتا به ۹ میلی لیتر شیر آلوده که از قبل آماده شده بود، اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه و ۹۰ دقیقه به آرامی در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۳۷ درجه سانتیگراد چرخانیده تا مخلوط گردد. پس از گذشت زمان مشخص، میکروتیوبوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵۰۰ × جی سانتریفیوژ شدند و لایه شیر برای آندازه‌گیری افلاتوکسین ام۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این آزمایشات بر اساس روش Elsanhoty و همکاران (۲۰۱۴) با کمی تغییرات مورد استفاده قرار گرفت. اطلاعات مربوط به متغیرهای مستقل که ارتباط اتصال افلاتوکسین ام۱ در شیر خام را متاثر می‌شوند، در شکل ۱ نشان داده شده است.

کمی‌سازی افلاتوکسین ام۱

HPLC

هر نمونه با استفاده از یک سیستم HPLC (Breeze (Separations Module, Waters, MA, USA چسبیده به یک سیستم تحویل حلال دو پمپی، متصل به یک ستون فاز معکوس با استفاده از شیر قابل تنظیم، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این سیستم برای اندازه‌گیری مقدار افلاتوکسین ام۱ باقی مانده در سوسپانسیون شیر آلوده به افلاتوکسین ام۱ با استفاده از ستون ایمونوفیلی با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد بکار گرفته شد. این رهیافت شامل یک شناسه گر فلورسانس کاملا اتوماتیک (Breeze.417) با طول موج‌های انتشاری ۳۶۵ و ۴۶۵ نانومتر است و یک ستون ®ODS Chromolith ساخته شده از سیلیکا مونولیتیک (۲ × ۴. ۶ × ۱۰۰ میلی متر) متصل به یک با RP-18Cستون حفاظتی سرپوشه دار انتهایی (Merck, 102129). سیستم با نرم افزار Empower Chromatography Data استفاده شد.

درصد افلاتوکسین ام۱ که توسط سوسپانسیون باکتری متصل شده بود، با استفاده از معادله زیر محاسبه شد: افلاتوکسین ام۱= (افلاتوکسین ام۱ منطقه پیک نمونه\ افلاتوکسین ام۱ منطقه پیک کنترل سم) × ۱۰۰

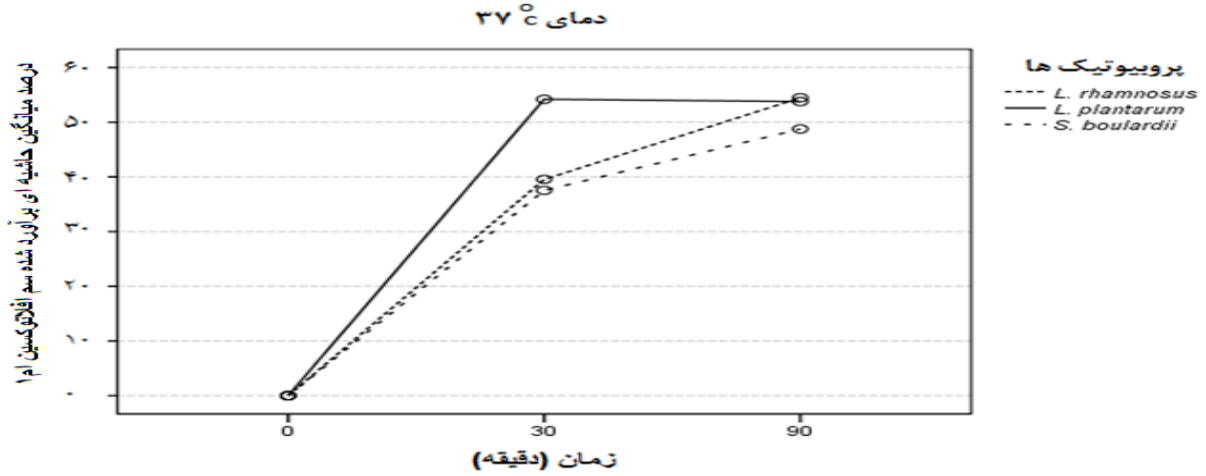
نتایج

نتایج مقادیر اتصال سم افلاتوکسین ام۱ به سه گونه پروبیوتیک در محیط شیر بازسازی شده بدون چربی در مواجهه با شرایط مختلف فیزیکی-شیمیایی انتخابی مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است. بیشترین عمکرد باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در حذف سم افلاتوکسین ام۱ در غلظت 10^7 CFU/ml و ۰/۷۵ نانوگرم در میلی لیتر، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (شکل ۱)، پس از ۹۰ دقیقه مواجهه مشاهده شد (۶۴/۳±۳۱/۷۹ درصد) که بدون اختلاف معنی‌داری ($p>0/05$) از مقدار مورد نظر در زمان ۳۰ دقیقه (۶۳/۸۶±۵/۰۰) ثبت گردید.

جدول ۱- درصد میانگین اتصال سم افلاتوکسین ام ۱ به پروبیوتیک‌های انتخابی در مواجهه با فاکتورهای مختلف

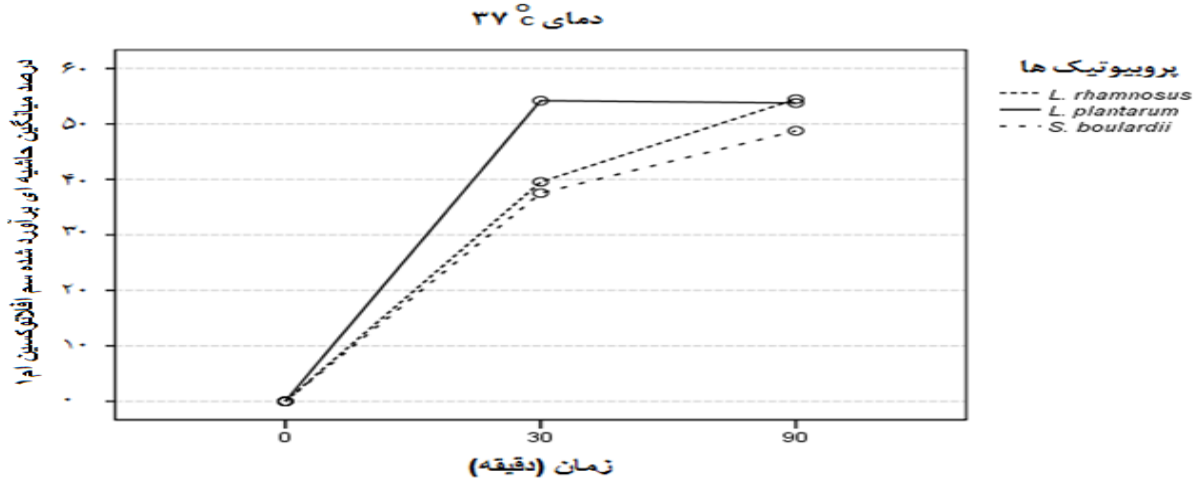
میکروارگانیسم	غلظت میکروب	دما	غلظت سم ng/ml	زمان (دقیقه)	خطای استاندارد±میانگین
L. rhamnosus	10^7CFU/ml	۴ درجه	۰/۵	۳۰	۵۶/۲۶±۵/۰۰^a
				۹۰	۲۹/۸۰±۳/۷۹^b
			۰/۷۵	۳۰	۲۸/۴۰±۵/۰۰^b
				۹۰	۴۶/۸۴±۳/۷۹^c
		۳۷ درجه	۰/۵	۳۰	۲۴/۶۰±۵/۰۰^a
				۹۰	۳۲/۴۰±۳/۷۹^b
			۰/۷۵	۳۰	۶۳/۸۶±۵/۰۰^c
				۹۰	۶۴/۳۱±۳/۷۹^c
	10^9 CFU/ml	۴ درجه	۰/۵	۳۰	۳۱/۱۳±۵/۰۰^a
				۹۰	۴۲/۰۶±۳/۷۹^b
			۰/۷۵	۳۰	۵۹/۹۱±۵/۰۰^c
				۹۰	۵۶/۵۷±۳/۷۹^d
		۳۷ درجه	۰/۵	۳۰	۲۹/۰۰±۵/۰۰^a
				۹۰	۴۸/۰۶±۳/۷۹^b
			۰/۷۵	۳۰	۳۳/۶۶±۵/۰۰^c
				۹۰	۵۰/۲۶±۳/۷۹^b
L. plantarum	10^7 CFU/ml	۴ درجه	۰/۵	۳۰	۳۳/۰۶±۵/۰۰^a
				۹۰	۴۲/۲۶±۳/۷۹^b
			۰/۷۵	۳۰	۴۹/۱۱±۵/۰۰^c
				۹۰	۵۷/۱۵±۳/۷۹^d
		۳۷ درجه	۰/۵	۳۰	۲۳/۴۰±۵/۰۰^a
				۹۰	۶۲/۴۶±۳/۷۹^b
			۰/۷۵	۳۰	۴۱/۴۲±۵/۰۰^c
				۹۰	۴۸/۰۰±۳/۷۹^d
	10^9 CFU/ml	۴ درجه	۰/۵	۳۰	۳۶/۷۳±۵/۰۰^a

			سانتی‌گراد	۹۰	۷۱/۴۶±۳/۷۹^{b}
		۰/۷۵		۳۰	۴۲/۰۰±۵/۰۰^{c}
				۹۰	۵۴/۹۷±۳/۷۹^{d}
				۳۰	۴۱/۱۳±۵/۰۰^{a}
		۰/۵		۹۰	۵۴/۷۳±۳/۷۹^{b}
			۳۷ درجه		
		۰/۷۵	سانتی‌گراد	۳۰	۵۲/۲۲±۵/۰۰^{b}
				۹۰	۵۲/۶۶±۳/۷۹^{b}
	۱۰^{۷} CFU/ml			۳۰	۲۹/۰۰±۵/۰۰^{a}
		۰/۵		۹۰	۴۵/۸۶±۳/۷۹^{b}
			۴ درجه		
		۰/۷۵	سانتی‌گراد	۳۰	۵۳/۱۵±۵/۰۰^{c}
				۹۰	۵۶/۴۰±۳/۷۹^{d}
				۳۰	۴۵/۹۳±۵/۰۰^{a}
		۰/۵		۹۰	۲۸/۰۶±۳/۷۹^{b}
			۳۷ درجه		
		۰/۷۵	سانتی‌گراد	۳۰	۴۳/۰۶±۵/۰۰^{c}
				۹۰	۴۴/۹۳±۳/۷۹^{c}
S. boulardii				۳۰	۳۵/۷۳±۵/۰۰^{a}
	۱۰^{۹} CFU/ml	۰/۵		۹۰	۱۱/۰۰±۳/۷۹^{b}
			۴ درجه		
		۰/۷۵	سانتی‌گراد	۳۰	۴۴/۷۱±۵/۰۰^{c}
				۹۰	۵۹/۸۶±۳/۷۹^{d}
				۳۰	۳۶/۲۰±۵/۰۰^{a}
		۰/۵		۹۰	۴۵/۲۰±۳/۷۹^{b}
			۳۷ درجه		
		۰/۷۵	سانتی‌گراد	۳۰	۹۱/۵۵±۵/۰۰^{c}
				۹۰	۹۶/۸۸±۳/۷۹^{d}



شکل۲- درصد میانگین اتصال سم افلاتوکسین ام ۱ به پروبیوتیک‌های انتخابی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

با توجه به شکل ۲ و بدون در نظر گرفتن غلظت سم افلاتوکسین ام۱ و تراکم پروبیوتیک، بیشترین درصد میانگین برآوردی حاشیه‌ای حذف سم افلاتوکسین ام۱ از محیط شیر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دقایق اولیه متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود که بتدریج تا ۹۰ دقیقه این مقدار برای هر ۳ پروبیوتیک یکسان شد. کمترین مقدار ثبت شده در خصوص باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (۵/۰۰±۲۴/۶۰) در غلظت باکتری و دمای مشابه، زمانی اتفاق افتاد که غلظت سم افلاتوکسین ام۱ ۰/۵ و زمان مواجهه در کمترین مقدار خود یعنی ۳۰ دقیقه بوده است (جدول ۱). البته این مقدار نسبت به مقادیر حذف شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ساکارومایسیس بولاردی* قابل ملاحظه نیست. برخلاف باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشترین پتانسیل خود را در حذف افلاتوکسین ام۱ در محیط شیر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (شکل ۳) نشان داد (۴۶/۷۹±۷۱/۳). حذف افلاتوکسین ام۱ با گذشت زمان از ۳۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه توسط باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (10^9 CFU/ml)، با کاهش غلظت و دما، افزایش یافته است. حداقل میزان متصل شده سم افلاتوکسین ام۱ (۵/۰۰±۲۳/۴۰) به این باکتری در همان دقایق اول، اتفاق افتاده و با افزایش دما تا ۹۰ دقیقه این مقدار (۳/۷۹±۶۲/۴۶) افزایش معنی داری داشته است ($p<0/05$). شکل ۳ نشان می‌دهد که در دمای ۴ درجه سانتیگراد، صرفا میانگین براوردی حاشیه‌ای باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با گذشت زمان تا زمان ۹۰ دقیقه در حذف سم افلاتوکسین ام۱ افزایش می‌یابد و دو پروبیوتیک دیگر ازاین افزایش در دمای ۴ درجه سانتیگراد برخوردار نیستند.



شکل ۳- درصد میانگین اتصال سم افلاتوکسین ام ۱ به پروبیوتیک‌های انتخابی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

این الگوی افزایشی در مورد *ساکارومایسیس بولاردی* صدق نکرد و تابع الگوی خاصی نبود. بیشترین توانایی مخمر *ساکارومایسیس بولاردی* در حذف افلاتوکسین ام۱ از محیط شیر (۳/۷۹±۹۶/۸۸) با گذشت زمان و در همان ساعات اولیه (۹۰ دقیقه) و با افزایش غلظت سم افلاتوکسین ام۱ (۰/۷۵ نانوگرم در میلی لیتر) و غلظت مخمر 10^9 CFU/ml در دمای (۳۷ درجه سانتی‌گراد) افزایش یافت که با کاهش دما از میزان اتصال کاسته گردید. در همین راستا کمترین مقدار حذف سم افلاتوکسین ام۱ از محیط شیر توسط مخمر *ساکارومایسیس بولاردی* (۵/۰۰±۲۹/۰۰) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و البته با کاهش غلظت سم و تراکم مخمر اتفاق افتاد.

بحث

این تحقیق بر روی حذف سم افلاتوکسین ام۱ از محیط شیر بازسازی شده از طریق اضافه کردن سه پروبیوتیک به این محیط در مواجهه با برخی فراسنجه‌های فیزیکی و شیمیایی انتخابی انجام شد.HPLC ، همراه با یک آشکارساز فلورسنت، وسیله‌ای است که به طور گسترده به منظور کنترل AFM1 در شیر استفاده می‌شود. با این حال، نیاز به آماده‌سازی نمونه‌های زیاد و هزینه انجام دادن کار باعث شده تا محققین در خصوص یک روش پیشرفته قابل رقابت و با اولویت برای ارزیابی افلاتوکسین ام۱ در شیر و محصولات جانبی آن اقدام نمایند (Muscarella, et al., 2007). با توجه به نتایج توانمندی دو باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (جدول ۱) در حذف افلاتوکسین ام۱، چنین بنظر می‌رسد که توانایی دو باکتری فوق الاشاره همچنان تا ۹۰ دقیقه پس از مواجهه رو به افزایش است. اخیرا محققین به این نتیجه رسیده‌اند که فرآیند سم زدایی افلاتوکسین ام۱ از شیر توسط پروبیوتیک‌ها یک واکنش زودآید است و عمده سم در زمان‌های اول مواجهه به پروبیوتیک متصل می‌گردد (Adibpour, et al., 2016; Serrano-Niño, et al., 2013; Sarimehmetoğlu, Küplülü, 2004). این نتایج با یافته‌های ما که نشان دادند بیشترین حذف سم افلاتوکسین ام۱ در ساعات اولیه مواجهه رخ می‌دهد و به تدریج از میزان آن کاسته می‌گردد، مشابهت دارد. هر جند این مقدار در مواجهه شیر با ساکارومیسس بولاردی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تغییر ننمود.

در تحقیقی که با کمک دو باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی سم زدایی شیر صورت گرفت مشخص گردید، امکان حذف سم افلاتوکسین ام۱ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مراتب بیشتر از دمای ۴ درجه سانتیگراد است (Bovo et al., 2013). با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق (جدول ۱)، چنین بنظر می‌رسد که *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بیشترین تاثیرگذاری خود را در دماهای بالاتر (۳۷ درجه سانتی‌گراد) و غلظت‌های پایین تر باکتری (CFU/ml $۱۰^۷$) نشان می‌دهد. شاید دلیل بالا بودن میزان اتصال سم افلاتوکسین در دماهای بالاتر را ناشی از تغییر ماهیت پروتئین‌های موجود در دیواره سلولی و افزایش خاصیت آب گریزی این دیواره در دماهای بالاتر دانست (Haskard, et al., 2001; Zinedine, et al., 2005).

در تحقیقی دیگر *L. rhamnosus* GAF01 بیشترین توان خود را در کاهش سم افلاتوکسین ام۱ در تراکم CFU/ml $۱۰^۷$ نشان داد (Abbès, et al., 2013). دیگر محققین (Namvar Rad, et al., 2018) بهترین تراکم باکتری *Bifidobacterium animalis lactis* برای حذف افلاتوکسین ام۱ را CFU/ml $۱۰^۷$، در غلظت ۰/۷۵ نانوگرم در میلی لیتر سم افلاتوکسین ام۱ معرفی کردند. در تحقیق ما، غلظت بیشتر سم افلاتوکسین ام۱ یعنی ۰/۷۵ نانوگرم در میلی لیتر برای دو پروبیوتیک *ساکارومایسیس بولاردی* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بیشترین تاثیرگذاری را در اتصال به افلاتوکسین ام۱ در محیط شیر مشخص کردند در صورتی که بهترین عملکرد برای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در غلظت ۰/۵ نانوگرم در میلی لیتر نشان داده شد. این تحقیق نشان داد که بالاترین عملکرد حذف افلاتوکسین ام۱ توسط *ساکارومایسیس بولاردی* از محیط شیر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد. نتایج این تحقیق نشان داد (جدول ۱) افزایش غلظت سم افلاتوکسین ام۱ و تراکم مخمر با توانایی مخمر *ساکارومایسیس بولاردی* رابطه مستقیم داشته بطوریکه با افزایش مقادیر این دو فاکتور میزان درصد سم افلاتوکسین ام۱ از محیط شیر افزایش می‌یابد.

میزان درصد توانایی کاهش میزان افلاتوکسین ام۱ از محیط شیر توسط *ساکارومایسیس بولاردی* بعد از ۳۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب حدود ۹۰درصد و ۹۳درصد (Corassin, et al., 2013) و در ترکیب با باکتری‌های اسید لاکتیک و در مشابهت با نتایج سایر محققین (Gonçalves, et al., 2015) حدود ۹۹درصد نشان داده

شد که در تحقیقی دیگر این ترکیب تا ۱۰۰درصد از سم افلاتوکسین ام۱ را از محیط شیر حذف کرده است (Namvar Rad, et al., 2018). تحقیق ما میزان حذف سم فوق را توسط *ساکارومایسیس بولاردی* بعد از ۹۰ دقیقه حدود ۹۷درصد نشان داد (جدول ۱). دو سایت کلیدی موثر بر فعالیتهای سمی اقلاتوکسین ها مرتبط با حلقه های فوروفوران و لاکتون می باشد. سم زدایی از مولکول افلاتوکسین هنگامی رخ می دهد که شکاف در حلقه دیفوران از مایکوتوکسین بوجود آید که می تواند از طریق اتصال باکتری یا مخمر و متابولیت های تولیدی آنها اتفاق بیافتد (Adebo et al., 2017). این توانمندی بالقوه در کاهش سم افلاتوکسین ام۱ توسط ساکارومایسس در مقایسه با لاکتوباسیلوس ها می تواند مرتبط با دیواره سلولی این مخمرها باشد که سرشار از پپتیدوگلیکان است. در تحقیقی مشخص شد حجم انبوهی از پپتیدوگلیکان به افلاتوکسین متصل بوده است (Lahtinen § et al., 2004). آنها دریافتند که رابطه بسیار قوی بین پپتیدوگلیکان و اتصال افلاتوکسین ام۱ با پروبیوتیک در شیر وجود دارد. تفاوت گونه در میزان اتصال افلاتوکسین ام۱ بسیار موثر بوده است. شاید به همین دلیل باشد که برخی گزارش ها حکایت از کاهش اتصال به افلاتوکسین در پروبیوتیک های مورد استفاده دارد (Thyagaraja and Hosono, 1994). این نتیجه با یافته های این تحقیق (جدول ۱) در تضاد است که موید تفاوت در گونه ها است. از طرفی بر اساس نتایج این تحقیق لاکتوباسیلوس رامنوسوس توانایی اتصال حدود ٪۶۴ افلاتوکسین ام۱ از شیر را نشان داد در حالیکه در تحقیقی دیگر این میزان حدودا ٪۵۰ گزارش شده است که می تواند ناشی از سایر شرایط محیطی از جمله غلظت پروبیوتیک و سم افلاتوکسین در کنار دمای محیط بوده است (Haskard et al., 2001). از طرفی شرایط سطوح سلولی همسو با شرایط اب گریزی باعث اتصال بیشتر به افلاتوکسین ام۱ گردیده است که می تواند همین نتیجه تقابل ساکارومایسس بولاردی با دو لاکتوباسیلوس دیگر را توجیه نماید (Haskard et al., 2000).

عدم تفاوت معنی دار غلظت‌های سم افلاتوکسین ام۱ و زمان مواجهه در توانمندی پروبیوتیک برای حذف سم مشخص گردید که این یافته با نتایج سایر محققین (Kabak, Var, 2008) همسو بود. در هر حال حذف افلاتوکسین ام۱ از محیط شیر بستگی به سوش‌های میکروبی و زمان مواجهه دارد (Serrano-Niño, et al., 2013). این موضوع ناشی از تفاوت میزان اتصال سم افلاتوکسین ام۱ به دیواره سلولی میکروب‌های بکار گرفته شده داشته که در شرایط یکسان پروبیوتیک‌های مختلف نتایج متفاوتی نشان دادند. افزایش اتصال سم افلاتوکسین ام۱ تا دقیقه ۹۰ مواجهه با پروبیوتیک‌ها در این تحقیق و کاهش آن تا ۲۴ ساعت پس از مواجهه (Namvar Rad, et al., 2018) نشان از این حقیقت دارد که محل‌های اتصال سم بر روی دیواره سلولی پروبیوتیک‌ها بعد از گذشت حدود ۲ ساعت از مواجهه به تدریج اشغال شده و مکانی برای اتصال مابقی سموم باقی نمی‌ماند. از طرفی اگر بپذیریم که بیشترین اتصال سم افلاتوکسین ام۱ به دیواره میکروب‌ها ناشی از ترکیبات پلی ساکاریدی و پپتیدو گلیکانی است (Corassin, et al., 2013; El-Nezami, et al., 1998) می‌توان دلیل بالاتر بودن درصد حذف افلاتوکسین ام۱ در تحقیق خود را ناشی از بالا بودن حجم همین ترکیبات در لایه بیرونی دیواره سلولی *ساکارومایسیس بولاردی* دانست.

از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که *ساکارومایسیس بولاردی* در تراکم 10^7 CFU/ml در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و لاکتوباسیلوس پلانتاروم در دمای ۴ درجه دسانتیگراد و بخصوص در غلظت بالاتر سم، می‌توانند به میزان قابل توجهی در کاهش سم افلاتوکسین ام۱ در محیط شیر موثر باشند. این تحقیق نشان داد بالا بودن تراکم پروبیوتیک در کاهش سم افلاتوکشین بسیار موثر خواهد بود.

منابع

1. Assaf J. C. Atoui A. Khoury A. E. Chokr A. Louka N. 2018. A comparative study of aflatoxin M1 in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. Food Bioprocess Tech., 6, 2230-2234.

11. Corassin C. Bovo F. Rosim R. Oliveira C. 2013. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M 1 in UHT skim milk, Food Control. (31): 80-83.

12. Elsanhoty R. M. Salam S. A. Ramadan M. F. Badr F. H. 2014. Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria, Food Control. (43): 129-134.

13. El-Nezami H. Kankaanpaa P. Salminen S. Ahokas J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B 1, Food Chem Toxicol. (36): 321-326.

14. Fallah A. A. Rahnama M. Jafari T. Saei-Dehkordi S. S. 2011. Seasonal variation of aflatoxin M 1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products, Food Control. (22): 1653-1656.

15. Gürbay A. Sabuncuoğlu S. A. Girgin G. Şahin G. Yiğit, Ş. Yurdakök M. et al. 2010. Exposure of newborns to aflatoxin M 1 and B 1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey, Food Chem Toxicol. (48): 314-319.

16. Galvano F. Piva A. Ritieni A. Galvano G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review, J Food Protect . (64): 120-131.

17. Gonçalves B. L. Rosim R. E. de Oliveira C . A. F. Corassin C. H. 2015. The *in vitro* ability of different *Saccharomyces cerevisiae*–based products to bind aflatoxin B1, Food control. (47): 298-300.

18. Haskard C. A. El-Nezami H. S. Kankaanpää P. E. Salminen S. Ahokas J. T. 2001. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria, Appl Environ Microbiol. (67): 3086-3091.

19. Haskard, C., Binnion, C. & Ahokas, J. 2000. Factors affecting the sequestration of procedures for binding of aflatoxin M1 to *Lactobacillus rhamnosus GG*, Braz J Microbiol. (49): 120-127.

2. Alberts J. Gelderblom W. Botha A. Van Zyl W. 2009. Degradation of aflatoxin B 1 by fungal laccase enzymes, Int J Food Microbiol. (135): 47-52.

3. Adibpour N. Soleimanian-Zad S. Sarabi-Jamab M. Tajalli F. 2016. Effect of storage time and concentration of Aflatoxin M1 on toxin binding capacity of *L. acidophilus* in fermented milk product, J Agricul Sci Technol. (18): 1209-1220.

4. Abbès S. Salah-Abbès J. B. Sharafi H. Jebali R. Noghabi K. A. Oueslati R. 2013. Ability of Lactobacillus rhamnosus GAF01 to remove AFM1 *in vitro* and to counteract AFM1 immunotoxicity *in vivo*, J Immunotoxicol. (10) : 279-286.

5. Adebo, O., Njobeh, P., Gbashi, S., Nwinyi, O. & Mavumengwana, V. 2017. Review on microbial degradation of aflatoxins. Crit Rev Food Sci Nutr , 57, 3208-3217.

6. Alberts, J., Lilly, M., Rheeder, J., Burger, H.-M., Shephard, G. S. & Gelderblom, W. 2017. Technological and community-based methods to reduce mycotoxin exposure. Food Control, 73, 101-109.

7. Bahrami R. Shahbazi Y. Nikousefat Z. 2016 . Aflatoxin M1 in milk and traditional dairy products from west part of Iran: occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure, Food Control. (62): 250-256.

8. Biernasiak J. Piotrowska M. Libudzisz Z. 2006. Detoxification of mycotoxins by probiotic preparation for broiler chickens, Mycotoxin Res. (22): 230-235.

9. Bovo F. Corassin C. H. Rosim R. E. de Oliveira C. A. 2013. Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M1 in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk, Food Bioprocess Tech. (6): 2230-2234.

10. Bovo, F., Corassin, C. H., Rosim, R. E. & De Oliveira, C. A. 2013. Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of

aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. Chem Biol Interact. 128, 39-49.

20. Hathout, A. S. & Aly, S. E. 2014. Biological detoxification of mycotoxins: a review. Annals of Microbiol. 64, 905-919.

21. IARC, 2002. Aflatoxins. In IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans: International Agency for Research on Cancer-World Health Organization. Lyon, France. Vol. 82, pp 171-300.

۲۲. Ji, C., Fan, Y. & Zhao, L. 2016. Review on biological degradation of mycotoxins. Anim Nutr. 2, 127-133.

23. Kabak B. Var I. 2008. Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by Lactobacillus and Bifidobacterium strains, J Environ Sci Heal B. (43): 617-624.

24. Lahtinen S., Haskard C., Ouwehand A., Salminen S. & Ahokas J. 2004. Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. Food Addit Contam.21, 158-164

25. Muscarella M. Magro S. L. Palermo C. Centonze D. 2007. Validation according to European Commission Decision 2002/657/EC of a confirmatory method for aflatoxin M 1 in milk based on immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection, Anal Chim Acta. (594): 257-264.

26. Mohammadi H. Mazloomi S. M. Eskandari M. H. Aminlari M. Niakousari M. 2017. The Effect of Ozone on Aflatoxin M1, Oxidative Stability, Carotenoid Content and the Microbial Count of Milk, Ozone-Sci Eng. (39): 4, 47-53.

27. Namvar Rad M. Razavilar V. Anvar S. A. A. Akbari-Adergani B. 2018. Selected bio-physical factors affecting the efficiency of *Bifidobacterium animalis lactis* and *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* to degrade aflatoxin M1 in artificially contaminated milk, J Food Safety. (in press. doi. org/10. 1111/jfs. 12463).

28. Peltonen K. El-Nezami H. Haskard C. Ahokas J. Salminen S. 2001. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria, J Dairy Sci. (84): 2152-2156.

29. Sepahdari A. Ebrahimzadeh Mosavi H. A. Sharifpour I. Khosravi A. , Motallebi A. A. Mohseni M. et al. 2010. Effects of different dietary levels of AFB1 on survival rate and growth factors of Beluga (*Huso huso*), Iran J Fish Sci. (9): 141-150.

30. Seyfzadeh M. Motalebi A. Kakoolaki S. Gholipour H. 2013. Chemical, microbiological and sensory evaluation of gutted kilka coated with whey protein based edible film incorporated with sodium alginate during frozen storage, Iran J Fish SCI. (12): 140-153.

31. Serrano-Niño J. Cavazos-Garduño A. Hernandez-Mendoza A. Applegate B. Ferruzzi M. San Martin-González M. et al. 2013. Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M 1 in artificially contaminated milk using an *in vitro* digestive model, Food Control. (31): 202-207.

32. Sarimehmetoğlu B. Küplülü Ö. 2004. Binding ability of aflatoxin M1 to yoghurt bacteria, Ankara Üniv Vet Fak Derg. (51): 195-198.

33. Sarlak, Z., Rouhi, M.,Mohammadi, R., Khaksar, R., Mortazavian, A. M., Sohrabvandi, S. & Garvand, F. 2017. Probiotic biological strategies to decontaminate aflatoxin M1 in a traditional Iranian fermented milk drink (Doogh). Food Control, 71, 152-159.

34. Thyagaraja, N. & HosonO, A. 1994. Binding properties of lactic acid bacteria from 'Idly'towards food-borne mutagens. Food and chemical toxicology, 32, 805-809.

۳۵. Wochner, K. F., Becker-Algeri, T. A., Colla, E., Badiale-Furlong, E. & Drunkler, D. A. 2018. The action of probiotic microorganisms on chemical contaminants in milk. *Critical Reviews in Microbiology*, 44**,** 112-123.

36. Xiong J. Xiong L. Zhou H. Liu Y. Wu L. 2018. Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow feedstuff and aflatoxin M1 in UHT and pasteurized milk in central China, Food Control. (96): 386-390.

37. Zinedine A. Faid M. Benlemlih M. 2005. In vitro reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread, Int J Agricul Biol. (7): 67-70.

Removal of aflatoxin M1 from the reconstituted milk by adding three probiotics *Lactobacillus rhamnosus, L. plantarum,* and *Saccharomyces boulardii* using the quantification of HPLC method

Khadivi Boroujeni R[1], Razavilar V[1], Anvar S.A.A[1], Akbari- Adergani B[2]

1. Department of Food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education,Tehran, Iran.

***Corresponding author:** *saaa4824@gmail.com*

Received: May 4, 2020 Accepted: August 5, 2020

Abstract

The current study aimed to remove aflatoxin (0.5 and 0.75 ng/mL) from the reconstituted milk by adding three probiotics, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum*, and *Saccharomyces boulardii*, at the cell concentration of 107 and 109 CFU/mL at 4°C and 37°C within 30 and 90 minutes. The highest activity of *Lactobacillus rhamnosus* in removing aflatoxin M1 was observed in the cell concentration of 107 CFU/mL and 0. 75 ng/mL toxin concentration at 37°C (Figure 1) after 90 minutes exposure (64.31% ± 3.79%) and had no significant difference with the optimum value at 30 minutes exposure (63.86% ± 5.00%) (P >0.05). Regardless of aflatoxin M1 and probiotics concentrations, the highest mean marginal estimation of aflatoxin M1 removal from the milk at 4°C in the early minutes belonged to *L. plantarum,* which gradually became identical for all the three probiotics until 90 min. The potential of *S. boulardii* in removing aflatoxin M1 from the milk (96.88% ± 3.79%) gradually increased within the initial minutes (90 minutes) with increasing the concentration of aflatoxin M1 (0.75 ng/mL) and the yeast by 109 CFU/mL at 37°C; binding affinity also decreased with decreasing the temperature. The current study results indicated that 107 CFU/mL of *S. boulardii* can efficiently remove aflatoxin M1 from milk.

Keywords: Aflatoxin, Milk, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces boulardii*.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited
Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.