

ارزیابی پروبیوتیک‌ها، پاراپروبیوتیک‌ها و عصاره‌های گیاهی برای خنثی‌سازی آفلاتوکسین با استفاده از HPLC

امید حاجی کندی^۱، سید محمد مهدی حمیدی^{۱*}، منصور بیات^۲، مریم تاج آبادی ابراهیمی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۰

چکیده مبسوط

زمینه و هدف مطالعه: آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای با سمیت بسیار بالا هستند که توسط گونه‌های *Aspergillus* تولید می‌شوند و می‌توانند طیف گسترده‌ای از محصولات غذایی را آلوده کنند. در میان آن‌ها، آفلاتوکسین B₁ به عنوان قوی‌ترین ترکیب سرطان‌زای طبیعی طبقه‌بندی شده و مطالعات اپیدمیولوژیک ارتباط آن را با سرطان کبد نشان داده‌اند. بنابراین، یافتن راهکارهای مؤثر برای کاهش این آلودگی در زنجیره غذایی اهمیت بالایی دارد. این پژوهش با هدف ارزیابی کمی و مقایسه کارایی سه گروه مختلف در مهار آفلاتوکسین انجام شد: (۱) پروبیوتیک‌های زنده، (۲) پاراپروبیوتیک‌ها (فرم‌های غیرفعال شده با حرارت) و (۳) عصاره‌های گیاهی. همچنین تأثیر استفاده ترکیبی از این عوامل نیز مورد بررسی قرار گرفت. **مواد و روش‌ها:** مواد مورد آزمایش شامل پروبیوتیک‌های زنده (*Lactobacillus* و *Lactobacillus brevis*) و *paracasei*، پاراپروبیوتیک‌های حاصل از حرارت‌دهی این باکتری‌ها (95°C به مدت ۶۰ دقیقه) و عصاره‌های اتانولی گیاهان *Punica granatum* (انار) و *Asparagus khorasanensis* (مارچوبه خراسانی) بودند. ارزیابی کارایی مهار آفلاتوکسین به صورت مجزا و ترکیبی با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) صورت گرفت. **نتایج:** پاراپروبیوتیک‌ها به طور معنی‌داری عملکرد بهتری نسبت به پروبیوتیک‌های زنده و عصاره‌های گیاهی منفرد داشتند و غلظت آفلاتوکسین را تا 1.6 ± 26.8 میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش دادند. مؤثرترین تیمار، ترکیب پاراپروبیوتیک‌ها با هر دو عصاره گیاهی بود که غلظت آفلاتوکسین را به کمترین میزان، یعنی 2.4 ± 6.9 میکروگرم در میلی‌لیتر رساند. ترکیب دو عصاره گیاهی به تنهایی نیز مؤثر بود و غلظت را به 4.5 ± 28.1 میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش داد. **نتیجه‌گیری:** ترکیب پاراپروبیوتیک‌ها با عصاره‌های گیاهی انار و مارچوبه خراسانی، یک راهکار زیستی مؤثر و برتر برای کاهش آلودگی آفلاتوکسین در مواد غذایی است. به نظر می‌رسد مکانیسم این اثر از طریق جذب آفلاتوکسین توسط دیواره سلولی باکتری‌های غیرفعال شده و سرکوب ژن‌های تولید آفلاتوکسین توسط ترکیبات گیاهی صورت می‌گیرد.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک، *Asparagus khorasanensis*، *Punica granatum*

* نویسنده مسئول: سید محمد مهدی حمیدی

آدرس: گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیک: mm.hamdi@iau.ac.ir

مقدمه

آلودگی مواد غذایی توسط مایکوتوکسین‌ها یکی از چالش‌های اساسی در امنیت غذایی جهانی محسوب می‌شود و پیامدهای گسترده‌ای بر سلامت انسان و اقتصاد کشاورزی دارد. در میان انواع مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها - که متابولیت‌های ثانویه بسیار سمی هستند و عمدتاً توسط گونه‌های *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* ترشح می‌شوند - به دلیل قدرت سمیت بالا و توانایی آلودگی گسترده، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این سموم چربی‌دوست قادرند دامنه‌ی وسیعی از مواد غذایی از جمله مغزها، لبنیات، گوشت و میوه‌ها را آلوده کنند و در نتیجه، خسارات قابل‌توجهی از نظر بهداشتی و اقتصادی به‌بار آورند (Hosseinpour et al., 2018; Klich, 2007; Jalili, 2015; Khlangwiset, 2010). بر اساس برآورد سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO)، تقریباً یک چهارم از کل محصولات کشاورزی جهان در اثر حضور آفلاتوکسین‌ها دچار آلودگی می‌شوند که این امر گستره‌ی فراگیر این سموم را نشان می‌دهد (Food and Agriculture Organization). قرارگیری طولانی‌مدت در معرض آفلاتوکسین‌ها به‌طور قطعی با بروز کارسینوم سلول‌های کبدی (Hepatocellular Carcinoma) و اختلالات سیستم ایمنی مرتبط دانسته شده است (Kensler et al., 2011; Turner et al., 2009). از این‌رو، توسعه‌ی راهکارهای مؤثر برای پیشگیری و کاهش آلودگی ناشی از این ترکیبات ضروری است.

تعیین کمی آفلاتوکسین‌ها معمولاً با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام می‌شود، روشی که به دلیل دقت بالا و قدرت تفکیک مطلوب، به‌عنوان ابزار استاندارد در آنالیز مایکوتوکسین‌ها شناخته شده است (Stroka and Anklam, 2002; Trucksess and Trujillo, 2016; Shephard, 2008). با این حال، HPLC تنها روشی تشخیصی است و توانایی حذف یا خنثی‌سازی مستقیم سم را ندارد. روش‌های سنتی کنترل آلودگی عمدتاً بر اقدامات پیشگیرانه مانند بهبود تکنیک‌های زراعی، بهینه‌سازی شرایط انبارداری پس از برداشت و رعایت استانداردهای فرآوری مواد غذایی متمرکز بوده‌اند. با وجود این، پایداری بالای آفلاتوکسین‌ها در زنجیره‌ی غذایی، ناکارآمدی نسبی این روش‌ها را آشکار ساخته و لزوم جستجوی راهکارهای نوآورانه و ترکیبی را برجسته می‌سازد (Ezekiel et al., 2014).

در سال‌های اخیر، مداخلات زیست‌فناورانه، به‌ویژه بهره‌گیری از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، به‌عنوان رویکردی نوین در کاهش سمیت و حذف آفلاتوکسین‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک از طریق سازوکار جذب سطحی توسط اجزای دیواره‌ی سلولی خود، توانایی اتصال به مولکول‌های آفلاتوکسین و کاهش زیست‌دسترسی‌پذیری و سمیت آن‌ها را دارند (Peltonen et al., 2001). سویه‌هایی نظیر *Lactobacillus paracasei* و *Lactobacillus brevis* نقش حفاظتی در برابر آسیب‌های کبدی ناشی از



مواد و روش‌ها

آماده‌سازی استانداردهای آفلاتوکسین، عوامل

میکروبی و عصاره‌های گیاهی

محللول استاندارد آفلاتوکسین با غلظت ۱۰۰۰ قسمت در میلیارد (ppb) از شرکت «فروغ لایف ساینسز» (تهران، ایران) تهیه شد. پودر لیوفیلیزه‌ی باکتری‌های *Lactobacillus brevis* و *Lactocaseibacillus paracasei* (هرکدام ۱۰ گرم) از شرکت «تک‌ژن گروپ» (تهران، ایران) خریداری گردید. برای آماده‌سازی سوسپانسیون‌های پروبیوتیکی، باکتری‌ها در محیط کشت MRS با pH برابر ۶٫۲ حل شده و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا چگالی نوری (OD₆₀₀) آن‌ها به مقدار ۰/۱ برسد، که معادل حدود ۱۰^۸ واحد کلنی‌ساز در هر میلی‌لیتر بود.

پاراپروبیوتیک‌ها از طریق غیرفعالسازی حرارتی کشت‌های پروبیوتیکی در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و سپس سردسازی در دمای محیط تهیه شدند.

عصاره‌ی اتانولی گیاه *Asparagus khorasanensis* از طریق خیساندن ۳۰ گرم از برگ‌های خشک و پودر شده‌ی گیاه در ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶٪ به دست آمد. این فرایند در شیکر مدور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. پس از آن، محللول حاصل از طریق فیلتر واتمن شماره‌ی ۱ صاف گردید و مایع فیلتر شده به وسیله‌ی تبخیرکننده‌ی دوار در دمای ۶۸ درجه‌ی

آفلاتوکسین از خود نشان داده‌اند (Liew and Mohd-Redzwan, 2018) و فرم‌های حرارت‌دیده و غیرفعال‌شده‌ی آن‌ها - موسوم به پاراپروبیوتیک‌ها - قدرت بالاتری در خنثی‌سازی سم نسبت به فرم‌های زنده از خود بروز داده‌اند (Zhao et al., 2015).

در کنار این عوامل زیستی، ترکیبات فیتوشیمیایی استخراج‌شده از گیاهان دارویی نیز به عنوان عوامل مکمل در مهار تولید آفلاتوکسین مطرح شده‌اند (Razzaghi-Abyaneh et al., 2008). عصاره‌های اتانولی *Punica granatum* (انار) و *Asparagus khorasanensis* (مارچوبه‌ی خراسانی) دارای خواص ضدقارچی بوده و قادرند مسیرهای بیوسنتزی تولید آفلاتوکسین را در قارچ‌ها مختل کنند و بدین ترتیب اثرات ژنوتوکسیک آن را کاهش دهند (Rezaei-Matehkolaei and Shams-Ghahfarokhi, 2017; Hamidi and Taghizadeh, 2021). ترکیب این ترکیبات گیاهی با عوامل میکروبی می‌تواند اثرات هم‌افزایی ایجاد کرده و بازده سم‌زدایی را افزایش دهد.

بر این اساس، پژوهش حاضر به بررسی توان ترکیبی پروبیوتیک‌ها، پاراپروبیوتیک‌ها و عصاره‌های گیاهی در کاهش آلودگی ناشی از آفلاتوکسین پرداخته است. در این مطالعه، تعامل میان *Lactobacillus brevis* و *Lactobacillus paracasei* و عصاره‌های اتانولی *Asparagus khorasanensis* و *Punica granatum* مورد ارزیابی قرار گرفته تا راهکارهای زیستی مؤثر و هم‌افزا برای بهبود ایمنی غذایی و کاهش خطرات بهداشتی ناشی از آفلاتوکسین ارائه شود.



- ترکیب پروبیوتیک و پاراپروبیوتیک پروتکل ۲ (مرحله‌ی بهینه‌سازی)
 - کنترل منفی: (۱٪ DMSO)
 - کنترل مثبت: آفلاتوکسین در PBS
 - مخلوط دو عصاره‌ی گیاهی
 - پاراپروبیوتیک‌ها
 - ترکیب سه‌گانه‌ی پاراپروبیوتیک‌ها به همراه هر دو عصاره‌ی گیاهی
- در تیمارهای میکروبی، ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت باکتریایی سانتریفیوژ شد ($8000 \times g$ ، ۱۰ دقیقه)، رسوب با دو بار شست‌وشو با بافر PBS استریل (pH 7.4) شسته و مجدداً در ۱ میلی‌لیتر PBS حاوی ۵۰ میکرولیتر محلول آفلاتوکسین معلق گردید. سوسپانسیون‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و با تکان آرام (۱۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، نمونه‌ها سانتریفیوژ ($10000 \times g$ ، ۱۰ دقیقه) و سوپرناتانت‌ها برای آنالیز جمع‌آوری گردیدند.

طراحی آزمایش و تیمارها

برای بررسی کارایی سم‌زدایی آفلاتوکسین، دو طرح آزمایشی مجزا اجرا شد:

پروتکل ۱ (مرحله‌ی غربالگری اولیه)

- کنترل منفی (وسیله) DMSO: با غلظت ۱٪ (v/v)
- کنترل مثبت: محلول آفلاتوکسین (۵۰ میکرولیتر، ۱۰۰۰ ppb) در بافر PBS
- عصاره‌ی انار (*Punica granatum*) با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر
- عصاره‌ی مارچوبه‌ی خراسانی (*Asparagus khorasanensis*) با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر
- ترکیب دو عصاره‌ی گیاهی (هرکدام ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)
- پروبیوتیک‌های زنده (*L. brevis* و *L. paracasei*)
- پاراپروبیوتیک‌ها (فرم حرارت‌دیده‌ی *L. paracasei* و *L. brevis*)

خالص‌سازی آفلاتوکسین و آنالیز کروماتوگرافی

برای جداسازی آفلاتوکسین باقی‌مانده در نمونه‌ها، ۱ میلی‌لیتر از سوپرناتانت هر نمونه از ستون‌های ایمونوآفینیته عبور داده شد (نرخ جریان: یک قطره در ثانیه). ستون‌ها



سطح معنی‌داری آماری در تمامی تحلیل‌ها برابر $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

کالیبراسیون و اعتبارسنجی اندازه‌گیری آفلاتوکسین

غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین با استفاده از منحنی استاندارد که بر اساس استانداردهای مرجع در مقادیر ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شده بود، کالیبره گردید.

نتایج تحلیل رگرسیون خطی، ضریب همبستگی (R^2) برابر با ۰/۹۹۸ را نشان داد که بیانگر دقت بالا و تکرارپذیری مناسب دستگاه بود (شکل ۱).

برای تأیید صحت اندازه‌گیری، نمونه‌ای حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین به‌عنوان کنترل بازیابی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده با مقدار واقعی اختلافی کمتر از ۲٪ داشت که نشان‌دهنده‌ی عملکرد دقیق و قابل اعتماد سیستم HPLC (مدل Cecil با آشکارساز UV-Vis و ستون C18 در طول موج ۳۶۵ نانومتر) بود.

کارایی تیمارهای زیستی و گیاهی در مرحله‌ی اول آزمایش

در نخستین مرحله‌ی بررسی، هشت گروه آزمایشی در مقایسه با کنترل‌ها (DMSO) و کنترل مثبت (مورد ارزیابی قرار گرفتند. این گروه‌ها شامل عصاره‌های منفرد *Asparagus khorasanensis* و *Punica granatum* ترکیب دو عصاره، پروبیوتیک‌های زنده (*L. brevis* و *L. paracasei*)، پاراپروبیوتیک‌های حرارت‌دیده و ترکیب پروبیوتیک و پاراپروبیوتیک بودند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و طی مراحل تصفیه‌ی ایمونوافینی، غلظت باقی‌مانده‌ی آفلاتوکسین‌ها به روش HPLC اندازه‌گیری شد.

دو بار با ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه (۳ میلی‌لیتر در ثانیه) شسته و به‌مدت ۱۰ ثانیه با فشار ۰/۵ بار هوا خشک شدند. سپس آفلاتوکسین متصل‌شده با استفاده از ۱ میلی‌لیتر متانول با درجه‌ی خلوص HPLC شسته و از ستون جدا شد. الوات‌ها قبل از تزریق به دستگاه HPLC، با فیلتر سرنگی PTFE با منافذ ۰/۲۲ میکرومتر صاف گردیدند. آنالیز کمی آفلاتوکسین‌ها با استفاده از دستگاه HPLC مدل Cecil مجهز به آشکارساز UV-Vis (طول موج ۳۶۵ نانومتر) و ستون فاز معکوس C18 (با اندازه ذرات ۵ میکرومتر و ابعاد ۴،۶×۲۵۰ میلی‌متر) انجام شد. فاز متحرک ایزوکراتیک شامل استونیتریل، متانول و آب با نسبت حجمی ۶۰:۲۵:۱۵ بود و نرخ جریان بر روی ۱/۲ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم گردید.

برای کالیبراسیون، ۲۰ میکرولیتر از استانداردهای آفلاتوکسین با غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تزریق شد و منحنی استاندارد با ضریب همبستگی $R^2 > 0.995$ رسم گردید. غلظت آفلاتوکسین در نمونه‌ها بر اساس مساحت پیک‌ها و زمان بازداری آن‌ها نسبت به منحنی استاندارد محاسبه شد.

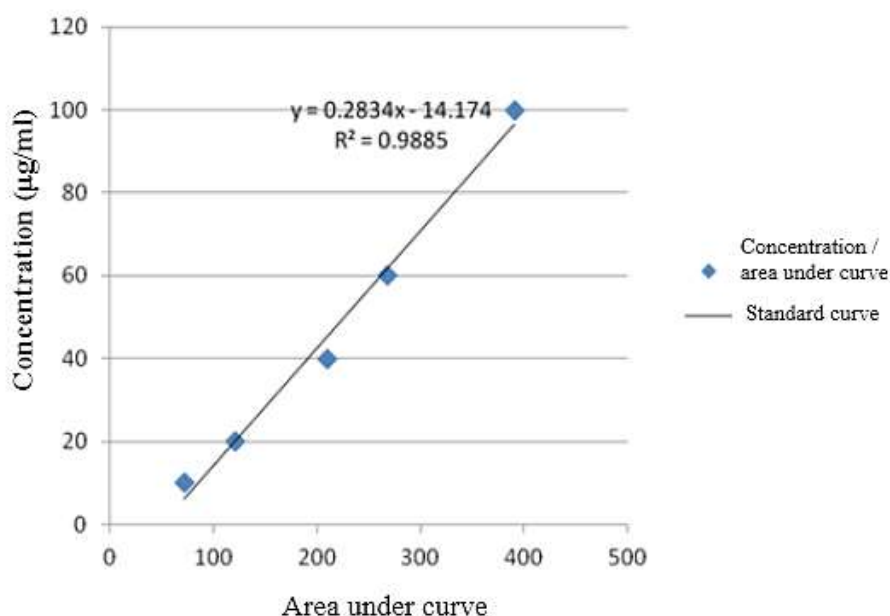
تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل انجام شد و داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) گزارش شدند. تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت. نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. مقایسه‌ی میان گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون پس‌هک تاکی (Tukey HSD) صورت گرفت.



نتایج نشان داد که همه‌ی تیمارهای میکروبی باعث کاهش معنی‌دار سطح آفلاتوکسین در مقایسه با کنترل مثبت شدند ($P < 0.05$)، بر اساس آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی) پاراپروبیوتیک‌ها بیشترین اثر مهار را داشتند و غلظت آفلاتوکسین را به 1.7 ± 26.55 میکروگرم در میلی‌لیتر رساندند، که به‌طور معنی‌داری کمتر از مقدار ثبت‌شده برای پروبیوتیک‌های زنده ($3/2 \pm 34.7$ میکروگرم در میلی‌لیتر؛ $P < 0.05$) بود. ترکیب پروبیوتیک و پاراپروبیوتیک نیز کاهش قابل

توجهی ایجاد کرد (30.2 ± 2.9 میکروگرم در میلی‌لیتر) اما از نظر آماری کمتر از پاراپروبیوتیک‌ها مؤثر بود. در بین تیمارهای گیاهی نیز کاهش معنی‌داری نسبت به کنترل DMSO مشاهده شد ($P < 0.05$). عصاره‌ی ترکیبی *Punica granatum* و *Asparagus khorasanensis* (28.33 ± 4.7 میکروگرم در میلی‌لیتر) عملکرد معنی‌دار بهتری نسبت به عصاره‌های منفرد انار (39.8 ± 4) و مارچوبه‌ی خراسانی (41.3 ± 3.8) داشت (در هر دو مورد). این موضوع بیانگر بروز اثر هم‌افزایی میان ترکیبات فیتوشیمیایی دو گیاه است.



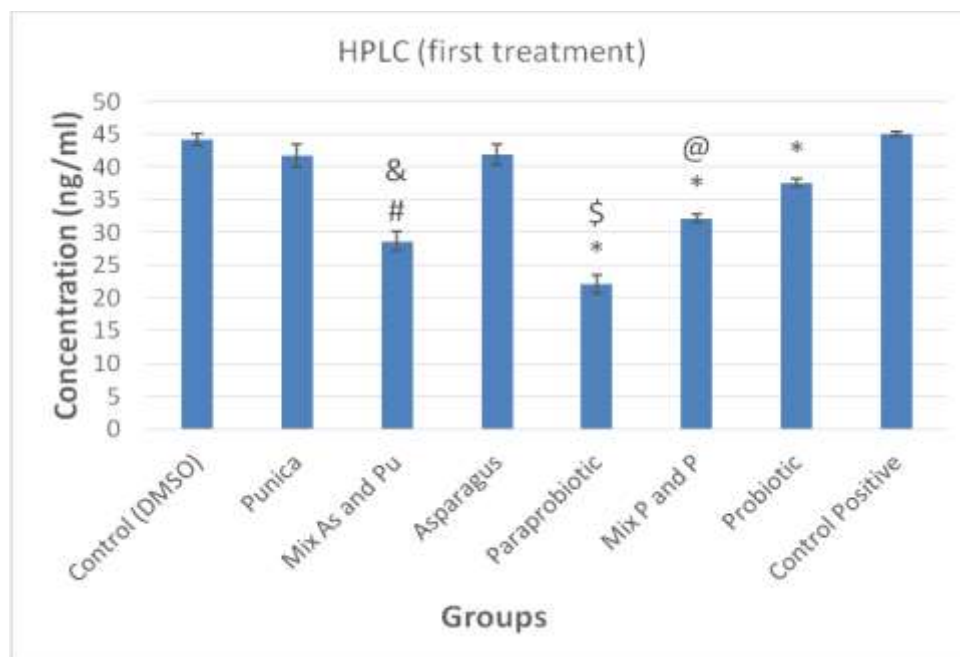
شکل ۱. منحنی استاندارد کالیبراسیون برای تعیین آفلاتوکسین

(منحنی بر اساس غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ترسیم شده است).

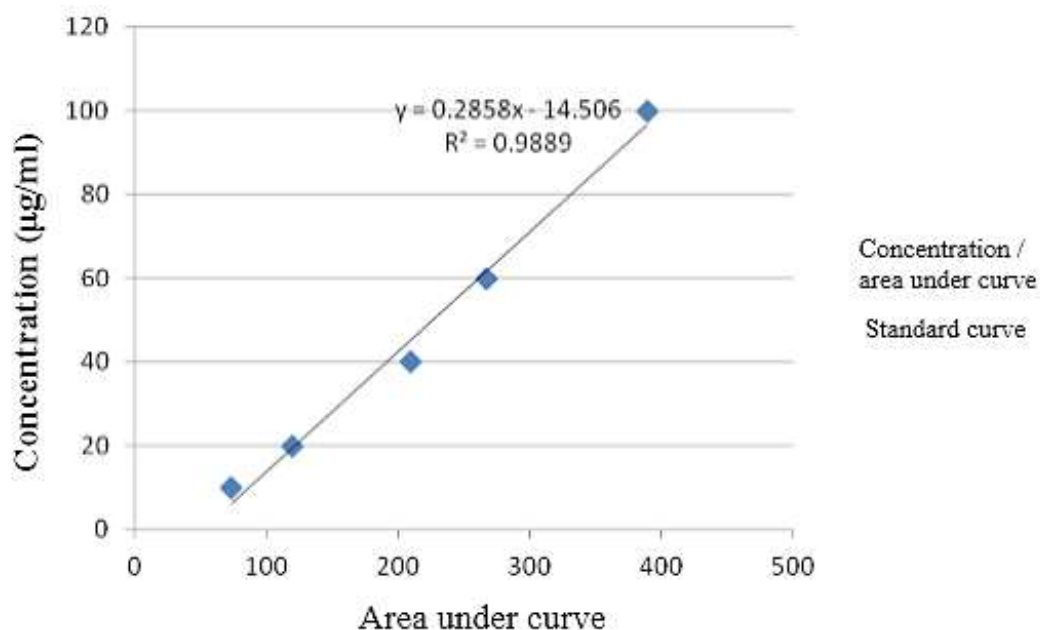
نتایج مرحله‌ی دوم (ترکیبات بهینه‌سازی‌شده)

با توجه به نتایج مرحله‌ی نخست، در فاز دوم آزمایش تنها گروه‌های مؤثرتر مورد ارزیابی قرار گرفتند: کنترل مثبت، کنترل DMSO، پاراپروبیوتیک‌ها، ترکیب دو

عصاره‌ی گیاهی و ترکیب سه‌گانه‌ی پاراپروبیوتیک‌ها با هر دو عصاره. کالیبراسیون غلظت‌ها مشابه مرحله‌ی اول انجام شد (شکل ۳).



شکل ۲. کروماتوگرام HPLC مربوط به تیمارهای مرحله‌ی اول

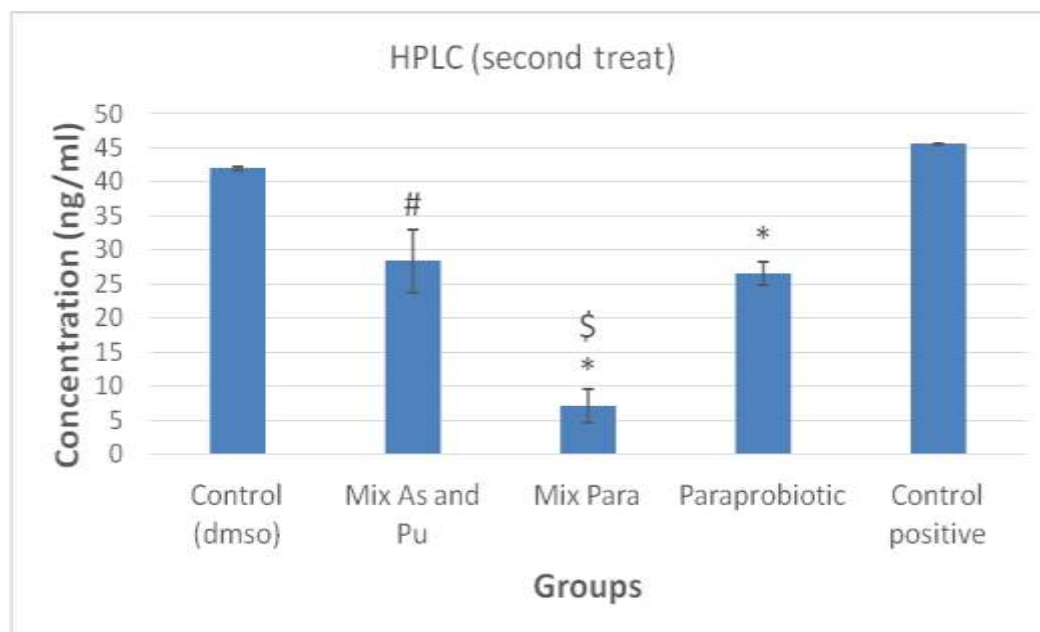


شکل ۳. منحنی استاندارد کالبراسیون در آزمایش دوم (غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)

ثبت نمود. با این حال، بهترین نتیجه مربوط به ترکیب سه‌گانه بود که کمترین سطح باقی‌مانده آفلاتوکسین ($2/5 \pm 7/1$ میکروگرم در میلی‌لیتر) را ایجاد کرد. این مقدار به‌طور معنی‌داری کمتر از مقدار حاصل از هر یک از تیمارهای منفرد بود و حاکی از اثر هم‌افزایی قوی بین پاراپروبیوتیک‌ها و ترکیبات گیاهی است.

پاراپروبیوتیک‌ها و ترکیب پروبیوتیک-پاراپروبیوتیک هر دو کاهش معنی‌داری در میزان آفلاتوکسین نسبت به کنترل مثبت نشان دادند.

پاراپروبیوتیک‌ها به‌تنهایی غلظت را به $1/6 \pm 26/8$ میکروگرم در میلی‌لیتر رساندند و ترکیب دو عصاره‌ی گیاهی نیز مقدار $4/5 \pm 28/1$ میکروگرم در میلی‌لیتر را



شکل ۴. کروماتوگرام HPLC مربوط به آزمایش دوم. (نشانه‌های آماری مشابه شکل ۲، سطح معنی‌داری $P=0.001$ داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده‌اند).

یافته‌های تجمیعی

بهتری نشان داد. در نهایت، ترکیب پاراپروبیوتیک‌ها با عصاره‌های گیاهی بیشترین میزان کاهش را (حدود ۸۶٪) به دنبال داشت. داده‌های آماری نیز از پایداری و اعتبار نتایج حمایت کردند؛ انحراف معیار در تمامی تیمارها کمتر از ۴/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و تمامی تفاوت‌ها از نظر آماری در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار ارزیابی شدند. آزمون کولموگروف-اسمیرنوف نیز توزیع نرمال داده‌ها را تأیید نمود.

نتایج هر دو مرحله‌ی آزمایش نشان داد که تیمارهای زیستی و گیاهی، چه به صورت مستقل و چه ترکیبی، در مقایسه با کنترل‌ها باعث کاهش معنی‌دار غلظت آفلاتوکسین شدند. پاراپروبیوتیک‌ها به عنوان مؤثرترین عامل منفرد شناخته شدند و در مقایسه با کنترل مثبت (50 ± 2.5 میکروگرم در میلی‌لیتر) حدود ۴۷٪ کاهش در سطح آفلاتوکسین ایجاد کردند. مخلوط گیاهی نیز نسبت به عصاره‌های منفرد بین ۲۹ تا ۳۱ درصد عملکرد

جدول ۱. کاهش میزان آفلاتوکسین در گروه‌های مختلف آزمایشی

گروه آزمایشی	غلظت آفلاتوکسین ($\mu\text{g/ml}$)	توضیح
کنترل مثبت (بدون تیمار)	50 ± 2.5	—
پروبیوتیک‌ها (<i>L. paracasei</i> و <i>L. brevis</i>)	34.7 ± 3.2	کاهش نسبت به کنترل مثبت
پاراپروبیوتیک‌ها	26.55 ± 1.7	کاهش بیشتر نسبت به پروبیوتیک‌ها
عصاره‌ی <i>Punica granatum</i>	39.8 ± 4.0	کاهش متوسط
عصاره‌ی <i>Asparagus khorasanensis</i>	41.3 ± 3.8	کاهش متوسط
ترکیب دو عصاره‌ی گیاهی	28.33 ± 4.7	کاهش بیشتر نسبت به عصاره‌های منفرد
ترکیب پروبیوتیک و پاراپروبیوتیک	30.2 ± 2.9	کاهش نسبت به پروبیوتیک‌های زنده
ترکیب پاراپروبیوتیک و عصاره‌ها	7.1 ± 2.5	بیشترین کاهش (اثر هم‌افزایی)

بحث و نتیجه‌گیری



et al 1998). به‌ویژه سویه‌ی *L. rhamnosus* GG نمونه‌ای شناخته‌شده از این مکانیسم است که با دربرگیری فضایی (steric entrapment) مولکول‌های آفلاتوکسین B1، زیست‌دسترس‌پذیری و سمیت آن‌ها را به‌طور مؤثر کاهش می‌دهد (Zhao et al., 2015; El-Nezami et al., 1998). یافته‌های پژوهش حاضر نیز این سازوکار را تأیید می‌کند، چراکه فرم‌های حرارت‌دیده‌ی *L. brevis* و *L. paracasei* (پاراپروبیوتیک‌ها) نسبت به سلول‌های زنده توانایی بیشتری در کاهش سطح آفلاتوکسین از خود نشان دادند. این امر احتمالاً ناشی از تغییرات ساختاری در دیواره‌ی سلولی پس از حرارت‌دهی است که موجب افزایش تعداد یا دسترسی‌پذیری محل‌های اتصال به مولکول‌های سم می‌شود؛ موضوعی که بررسی‌های ساختاری و مولکولی بیشتر را می‌طلبد.

در کنار عوامل میکروبی، ترکیبات فیتوشیمیایی نقش مکملی در مهار تولید و اثرات آفلاتوکسین ایفا می‌کنند. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که عصاره‌ی گیاهان دارویی مختلف از جمله *Peganum harmala*، *Glycyrrhiza glabra* و *Heracleum persicum* می‌تواند بیان ژن‌های دخیل در مسیر زیست‌سازی آفلاتوکسین (*aflR aflP aflM*) را سرکوب کند و از این طریق تولید سم توسط قارچ را متوقف سازد (Zoghi et al., 2014; Taghizadeh, 2021; Reddy et al., 2013; Atanda, et al., 2010). در همین راستا، عصاره‌های گیاهان *Punica granatum* و *Asparagus khorasanensis* حاوی ترکیبات فعالی نظیر پلی‌فنول‌ها و ساپونین‌ها هستند که اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچی و مهارکننده‌ی زیست‌سازی آفلاتوکسین دارند (Singh et al 2002). نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب دو عصاره‌ی گیاهی کارایی به‌مراتب بالاتری از هر کدام

پژوهش حاضر ظرفیت خنثی‌سازی آفلاتوکسین را توسط دو گونه‌ی باکتری لاکتوباسیل (*Lactobacillus brevis* و *Lactobacillus paracasei*) در دو حالت زنده (پروبیوتیک) و غیرفعال‌شده‌ی حرارتی (پاراپروبیوتیک) در کنار عصاره‌های اتانولی دو گیاه *Punica granatum* (انار) و *Asparagus khorasanensis* (مارچوبه‌ی خراسانی) مورد بررسی قرار داد. نتایج حاصل از آنالیز HPLC نشان داد که تمامی تیمارها باعث کاهش معنی‌دار سطح آفلاتوکسین شدند و بیشترین میزان کاهش مربوط به ترکیب پاراپروبیوتیک‌ها با عصاره‌های گیاهی بود. به‌طور مشخص، پاراپروبیوتیک‌ها به‌تنهایی غلظت آفلاتوکسین را به 26.55 ± 1.7 میکروگرم در میلی‌لیتر رساندند، مخلوط عصاره‌های گیاهی مقدار 28.33 ± 4.7 میکروگرم در میلی‌لیتر را ثبت کرد و ترکیب هر دو عامل (پاراپروبیوتیک + عصاره‌ها) بیشترین اثر مهار را با مقدار 7.1 ± 2.5 میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد. این یافته‌ها بیانگر وجود اثر هم‌افزایی میان عوامل میکروبی و فیتوشیمیایی و تقویت چشمگیر کارایی سم‌زدایی در مقایسه با کاربرد منفرد هر عامل است.

پیش‌تر نیز نقش گونه‌های باکتری اسیدلاکتیک (LAB) در کاهش سمیت آفلاتوکسین‌ها گزارش شده است. این باکتری‌ها عمدتاً از طریق جذب سطحی و نه از مسیر تجزیه‌ی آنزیمی، قادر به اتصال و مهار مولکول‌های آفلاتوکسین هستند (Peltonen et al., 2001). در مطالعات پیشین نشان داده شده که گونه‌هایی مانند *L. acidophilus*، *Lactobacillus rhamnosus* و *paracasei* به‌واسطه‌ی ترکیبات دیواره‌ی سلولی خود نظیر پپتیدوگلیکان‌ها و اگزوپلی‌ساکاریدها، توانایی بالایی در اتصال و حذف آفلاتوکسین دارند (Liew et al 2018; El-Nezami H, WPP, Mohd-Redzwan S 2018).



به صورت منفرد داشت که بیانگر بروز اثر هم افزایی یا تجمعی میان اجزای فیتوشیمیایی است.

مقایسه‌ی نتایج این تحقیق با مطالعات پیشین نشان می‌دهد که داده‌های به دست آمده با شواهد قبلی در خصوص جذب آفلاتوکسین توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک (Shokri H, et al 2015) و نیز اثر مهار ترکیبات انار بر ترشح مایکوتوکسین‌ها (Khademi R, Samadi M 2025) هم خوانی دارد. با این حال، وجه تمایز مطالعه‌ی حاضر در ارائه‌ی شواهدی از اثر چندبرابری (Multiplicative Effect) هنگام استفاده‌ی هم زمان از پاراپروبیوتیک‌ها و عصاره‌های گیاهی است. این هم افزایی می‌تواند ناشی از دو مکانیسم مکمل باشد: نخست، جذب فیزیکی آفلاتوکسین توسط دیواره‌ی سلولی باکتری و دوم، غیرفعالسازی شیمیایی یا ژن‌مهار توسط ترکیبات گیاهی. به بیان دیگر، ممکن است باکتری‌ها ابتدا مولکول‌های سم را در سطح خود متمرکز کرده و سپس ترکیبات فیتوشیمیایی باعث غیرفعال سازی آن‌ها شوند؛ فرضیه‌ای که برای تأیید نیازمند مطالعات سینتیکی و ژنتیکی بیشتر است.

به طور کلی، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که پاراپروبیوتیک‌های حاصل از *L. brevis* و *L. paracasei* در ترکیب با عصاره‌های *Punica granatum* و *Asparagus khorasanensis* می‌توانند به عنوان رویکردی زیستی و دوجبه‌ی در کاهش آلودگی‌های ناشی از آفلاتوکسین به کار گرفته شوند. این راهبرد با اتکا به دو سازوکار مکمل - جذب فیزیکی توسط باکتری و مهار رونویسی ژنی توسط ترکیبات گیاهی - چارچوبی پایدار و سازگار با محیط زیست برای بهبود ایمنی غذایی فراهم می‌کند.

با توجه به نتایج امیدوارکننده‌ی حاصل از آزمایش‌های درون کشتگاهی، پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های آتی در سه محور دنبال شوند:

۱. ارزیابی کارایی این ترکیب‌ها در شرایط واقعی مواد غذایی و زنجیره‌ی تأمین،
 ۲. بررسی مقیاس‌پذیری صنعتی و پایداری طولانی مدت این ترکیبات،
 ۳. انجام آزمون‌های سمیت‌زایی و ایمنی‌سنجی به منظور اطمینان از بی‌ضرری مصرف انسانی و دامی آن‌ها.
- به کارگیری چنین رویکردهایی می‌تواند گامی مؤثر در جهت ارتقاء سلامت عمومی و کاهش خطرات ناشی از مایکوتوکسین‌ها در محصولات غذایی باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از رویکرد ترکیبی شامل پاراپروبیوتیک‌های حاصل از *Lactobacillus brevis* و *Lactobacillus paracasei* به همراه عصاره‌های اتانولی دو گیاه *Punica granatum* (انار) و *Asparagus khorasanensis* (مارچوبه‌ی خراسانی)، می‌تواند به طور قابل توجهی غلظت آفلاتوکسین را در شرایط آزمایشگاهی کاهش دهد. در میان تیمارهای بررسی شده، پاراپروبیوتیک‌ها به تنهایی اثربخشی بیشتری نسبت به پروبیوتیک‌های زنده و عصاره‌های گیاهی منفرد نشان دادند؛ با این حال، بیشترین میزان کاهش (حدود ۸۶٪) زمانی مشاهده شد که پاراپروبیوتیک‌ها همراه با هر دو عصاره‌ی گیاهی به کار گرفته شدند. این نتیجه بیانگر وجود اثر هم افزایی میان ترکیبات فیتوشیمیایی و اجزای ساختاری باکتری است. سازوکار پیشنهادی برای این اثر شامل دو مسیر مکمل است:



این پژوهش بدون حمایت مالی مستقیم از هیچ نهاد خاصی انجام شده است و نویسندگان تضاد منافع احتمالی در ارتباط با نتایج این مقاله ندارند.

منابع

1. Hosseinpour M, et al. Review of the characteristics and toxicity of aflatoxins in food products. (2018). *Iranian Journal of Food Science and Technology*. 15 (4):421–433.
2. Klich MA. (2007). Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycopathologia*. 162(3):125–132.
3. Wu F, Khlangwiset P. (2010). Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin reduction strategies in Africa: Case studies in biocontrol and post-harvest interventions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 27 (4):496–509.
4. Jalili M. (2015). A review on aflatoxins reduction in food. *Iran J Health Saf Environ*. 3(1):445–459.
5. Food and Agriculture Organization (FAO). Food Loss and Waste Database. 2018. Available from: <https://www.fao.org>.
6. Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, Groopman JD. (2011). Aflatoxin: A 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicol Sci*. 120(Suppl 1):S28–S48.
7. Turner PC, et al. (2009). The role of aflatoxins in the etiology of hepatocellular carcinoma. *Food Chem Toxicol*. 47(1):56–64.
8. Stroka J, Anklam E. (2002). New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing molds in food and feed. *TrAC Trends Anal Chem*. 21(2):90–95.

۱. جذب فیزیکی و غیرقابل برگشت مولکول‌های آفلاتوکسین به دیواره‌ی سلولی باکتری‌های غیرفعال‌شده (پاراپروبیوتیک)،

۲. مهار مسیرهای زیست‌سازنده‌ی آفلاتوکسین از طریق ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنولی موجود در عصاره‌های گیاهی.

این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیب عوامل زیستی و گیاهی می‌تواند به‌عنوان یک روش زیست‌سازگار، ایمن و کارآمد برای کنترل آلودگی آفلاتوکسینی در محصولات غذایی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به پایداری بالای آفلاتوکسین‌ها و محدودیت کارایی روش‌های شیمیایی یا حرارتی، استفاده از چنین ترکیب‌های طبیعی و زیستی می‌تواند جایگزینی مناسب و پایدار برای بهبود ایمنی مواد غذایی در صنایع مختلف به‌شمار آید.

در نهایت، انجام پژوهش‌های تکمیلی در مقیاس صنعتی، بررسی پایداری این ترکیبات در فرآیندهای فرآوری مواد غذایی و ارزیابی اثرات احتمالی آن‌ها بر ویژگی‌های حسی و تغذیه‌ای محصولات غذایی پیشنهاد می‌شود. این رویکرد نه تنها می‌تواند از نظر ایمنی و سلامت عمومی حائز اهمیت باشد، بلکه با اصول توسعه‌ی پایدار و کاهش وابستگی به ترکیبات شیمیایی نیز هم‌راستا است.

سپاسگزاری

نویسندگان بدین وسیله از همکاری و پشتیبانی آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز در اجرای مراحل آزمایشگاهی این پژوهش سپاسگزاری می‌نمایند. همچنین از همیاری صمیمانه‌ی همکاران محترم بخش شیمی تجزیه و بیوتکنولوژی دانشگاه، به‌ویژه در فرایند آماده‌سازی نمونه‌ها و انجام آنالیزهای HPLC، قدردانی می‌شود.



17. Hamidi M, Taghizadeh SF. (2021). Evaluation of antioxidant and antifungal properties of *Asparagus khorasanensis* extract. *Iran J Med Aromat Plants*. **37**(3):412–421.
18. Kosalec I, Pepeljnjak S, Kopjar N. (2005). Antifungal and cytotoxic activities of *Punica granatum* L. *Acta Pharm*. **55**(4):417–422.
19. El-Nezami H, et al. (1998). Removal of aflatoxin B1 by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol*. **64**(1):153–158.
20. Reddy KRN, Salleh B, Saad B. (2010). Biocontrol of aflatoxin: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **50**(8):775–791.
21. Zoghi A, Khosravi-Darani K, Sohrabvandi S. (2014). Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini Rev Med Chem*. **14**(1):84–98.
22. Atanda OO, et al. (2013). The critical role of aflatoxin in food security. *Afr J Food Agric Nutr Dev*. **13**(4):7844–7864.
23. Singh RP, et al. (2002). Polyphenols from *Punica granatum* possess strong antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*. **50**(1):81–86.
24. Shokri H, et al. (2015). Detoxification of aflatoxin-contaminated feed by lactic acid bacteria. *Iran J Vet Res*. **16**(4):403–409.
25. Khademi R, Samadi M. (2020). Inhibition of aflatoxin biosynthesis by pomegranate peel extract in *Aspergillus flavus*. *Iran J Microbiol*. **12**(2):125–134.
9. Trucksess MW, Trujillo S. (2016). Determination of aflatoxins in foods and feeds. *J AOAC Int*. **99**(4):852–861.
10. Shephard GS. (2008). Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Addit Contam*. **25** (2):146–151.
11. Ezekiel CN, et al. (2014). Aflatoxin exposure in Nigeria: Molecular epidemiology and health perspectives. *Food Control*. **38**:24–31.
12. Peltonen K, El-Nezami H, Haskard C, Ahokas J, Salminen S. (2001). Aflatoxin B1 binding by dairy strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacterium freudenreichii*. *J Dairy Sci*. **84**(10):2152–2156.
13. Liew WPP, Mohd-Redzwan S. (2018). Mycotoxin: Its impact on gut health and microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*. **8**:60.
14. Zhao L, Jin H, Zhang R, Yang L. (2015). Detoxification of aflatoxin B1 by *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented foods and identification of degradation products. *Food Control*. **47**:285–291.
15. Razzaghi-Abyaneh M, et al. (2008). Inhibitory effects of *Punica granatum* L. on aflatoxin production. *Iran J Basic Med Sci*. **11**(2):83–88.
16. Rezaei-Matehkolaei A, Shams-Ghahfarokhi M. (2017). Anti-aflatoxigenic activity of medicinal plant extracts against *Aspergillus parasiticus*. *World Mycotoxin J*. **10**(1):67–75.



Evaluation of Probiotics, Paraprobiotics and Plant Extracts for Aflatoxin Neutralization Using HPLC

Omid Haji-Kondi¹, Seyed Mohammad Mehdi Hamdi^{1*}, Mansour Bayat², Maryam Tajabadi Ebrahimi¹

1. Department of Biology, CT.C, Islamic Azad University Tehran, Iran

2. Department of Veterinary Pathobiology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 04 November 2025 Accepted: 11 January 2026

Extended Abstract

Introduction: Aflatoxins are highly toxic secondary metabolites produced by *Aspergillus* species, capable of contaminating a wide range of food products. Among them, Aflatoxin B1 (AFB1) is classified as the most potent natural carcinogen, with epidemiological studies linking its exposure to liver cancer. Therefore, finding effective strategies to reduce this contamination in the food supply chain is of great importance. This study aimed to quantitatively evaluate and compare the efficacy of three different groups in inhibiting aflatoxin: 1) live probiotics, 2) paraprobiotics (heat-inactivated forms), and 3) plant extracts. The effect of combined use of these agents was also investigated. **Materials and methods:** The tested materials included live probiotics (*Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus paracasei*), paraprobiotics obtained by heat-treatment of these bacteria (95°C for 60 minutes), and ethanolic extracts of *Punica granatum* (pomegranate) and *Asparagus khorasanensis* (Khorasan asparagus). The efficacy of aflatoxin inhibition was evaluated individually and in combination using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Statistical analysis of the data was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). **Results:** Paraprobiotics performed significantly better ($P < 0.001$) than live probiotics and individual plant extracts, reducing aflatoxin concentration to $26.8 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$. The most effective treatment was the combination of paraprobiotics with both plant extracts, which reduced the concentration to the lowest level of $6.9 \pm 2.4 \mu\text{g/mL}$. The combination of the two plant extracts alone was also effective, reducing the concentration to $28.1 \pm 4.5 \mu\text{g/mL}$. **Conclusion:** The findings indicate that combining paraprobiotics with pomegranate and Khorasan asparagus plant extracts is a superior and effective biological strategy for reducing aflatoxin contamination in food. The mechanism of this effect appears to involve the adsorption of aflatoxin by the cell wall components of inactivated bacteria and the suppression of aflatoxin-biosynthesis genes by phytochemical compounds.

Keywords: Aflatoxin, Probiotic, Paraprobiotic, *Punica granatum*, *Asparagus khorasanensis*

Corresponding Author: Seyed Mohammad Mahdi Hamdi

Address: Department of biology, CT.C, Islamic Azad University Tehran Iran.

Email: mm.hamdi@iau.ac.ir