

اثر بازدارندگی پوشش خوراکی مغز پسته با پایه‌ی کنسانتره‌ی پروتئینی آب پنیر و عصاره‌ی آویشن شیرازی بر تولید سم آفلاتوکسین

حمید توکلی‌پور^{۱*}، مجید جوانمرد داخلی^۲، لیلا زیرجانی^۳

^۱ عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران
^۲ عضو هیات علمی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده‌ی شیمی و صنایع غذایی، تهران، ایران
^۳ دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۱۶

چکیده

در این پژوهش از پلیمر طبیعی بر پایه‌ی کنسانتره‌ی پروتئین آب پنیر همراه با عصاره‌ی آویشن شیرازی برای پوشش دهی خوراکی مغز پسته‌ی رقم اکبری دامغان استفاده گردید. جهت به کارگیری ماده‌ی ضد میکروبی، ابتدا غلظت کمینه‌ی ممانعت‌کنندگی و غلظت کمینه‌ی کشندگی این ماده، علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس تعیین گردید. سپس، عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی در مقادیر ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰، ۳۰۰۰، ۳۵۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۵۵۰۰ پی پی ام در ترکیب پوشش به کار رفت. گروه شاهد شامل مغز پسته‌ی بدون پوشش و بدون عصاره و مغز پسته‌ی پوشش یافته و بدون عصاره بود. گروه‌های تیمار و شاهد جهت بررسی اثرات ضد قارچی در مدل واقعی، در پلیت‌های استریل قرار داده شد و کشت هفت روزه‌ی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به مرکز هندسی پلیت‌ها تلقیح گردید. سپس، به شکل روزانه، رشد دیسک تلقیحی اندازه‌گیری شد. در بررسی تاثیر مقادیر مختلف عصاره در ترکیب پوشش مغز پسته، میزان بازدارندگی عصاره‌ی آویشن شیرازی بر روی تولید سموم آفلاتوکسین B₁، B₂، G₁ و G₂ که توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد، نشان داد که مقادیر بالاتر از ۵۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی آویشن شیرازی در پوشش خوراکی کنسانتره‌ی پروتئینی آب پنیر، باعث جلوگیری از تولید آفلاتوکسین در مغز پسته می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، مغز پسته، آویشن شیرازی، پوشش خوراکی، آسپرژیلوس فلاووس.

۱۱/۸ درصد، دارای آلودگی به آفلاتوکسین B₁ بیش‌تر از حداکثر حد مجاز بوده‌اند (۷).

آب پنیر یکی از فرآورده‌های جانبی فرآوری و تولید پنیر محسوب می‌گردد که به عنوان یک فرآورده با ارزش کاربردهای زیادی در فناوری غذایی و سایر صنایع پیدا کرده است ولی بخش قابل توجهی از آن دفع و به عنوان پساب موجب آلودگی محیط زیست می‌شود. افزایش مصرف اکسیژن زیستی (BOD) و سایر مشکلات زیست محیطی، فراوری یا دفع آب پنیر را به یکی از دغدغه‌های صنایع لبنیات تبدیل کرده است. از سوی دیگر، دارا بودن مقادیر بالای پروتئین، مواد معدنی و سایر ریزمغذی‌ها، آب پنیر را در زمره‌ی یکی از با ارزش‌ترین ضایعات صنایع غذایی قرار داده است. هرگونه استفاده از این ماده و استفاده از آن در صنایع غذایی و بسته‌بندی علاوه بر ایجاد ارزش افزوده، مشکلات زیست محیطی ناشی از دفع آن را نیز مرتفع می‌سازد. در سال‌های اخیر امکان استفاده از پروتئین آب پنیر در ساخت پوشش‌های خوراکی، موضوع پژوهش‌های بسیاری بوده است. پایه‌ی فیلم‌های خوراکی می‌تواند یکی از چهار ترکیب اصلی یعنی لیپیدها، رزین‌ها، پلی ساکاریدها و پروتئین‌ها باشد. انتخاب نهایی بر مبنای خواص بازاریابی فیلم مانند نفوذ رطوبت، انتقال گازها به ویژه اکسیژن و نگهداری ترکیبات مولد طعم و بو در مواد غذایی انجام می‌گیرد. بسته‌بندی ضد میکروبی^۵ نوعی بسته‌بندی فعال^۶ محسوب می‌شود که مدت زمان ماندگاری محصولات غذایی را افزایش داده و ایمنی مواد خوراکی را از نظر میکروبی تامین می‌نماید (۹). این بسته‌بندی باعث کاهش، مهار و یا به تعویق انداختن رشد میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی می‌گردد.

گرایش فزاینده‌ی جهانی در راستای استفاده از ترکیبات طبیعی به جای نگه‌دارنده‌های شیمیایی موجب مطالعات زیادی در حیطه‌ی گیاهان دارویی و جست و جوی انواع عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی شده است. آویشن شیرازی از دیر باز در طب سنتی ایران برای درمان بیماری‌های دستگاه تنفس و گوارشی، تسکین درد مفاصل و نیز برای درمان سرماخوردگی استفاده می‌شود. همچنین از آن به عنوان طعم دهنده‌ی مواد غذایی به ویژه ماست، استفاده می‌شده است. یکی از روش‌های کنترل

درخت پسته از گیاهان خانواده‌ی آناکاردیاسه است که در مناطق نیمه گرمسیری رشد می‌کند و کشت و کار آن در ایران سابقه‌ی تاریخی دارد. در حال حاضر، ایران بزرگ‌ترین صادر کننده‌ی پسته در جهان است به طوری که میزان پسته تولیدی در سال ۱۳۸۵ خورشیدی بالغ بر ۱۹۰۰۰۰ تن بود که ۶۲ درصد تولید جهانی پسته را به خود اختصاص داده است. این در حالی است که به دلیل خشک‌سالی‌های طولانی و عوامل طبیعی دیگر در کنار کشاورزی سنتی و نارسایی‌های پس از برداشت در سال‌های اخیر، تولید پسته ایران افت چشم‌گیری داشته است و کشورهای دیگر به سرعت در حال تسخیر بازارهای سنتی ایران هستند (۱۲). در سال ۱۳۷۶ خورشیدی که اتحادیه‌ی اروپا پسته‌ی ایران را به دلیل ادعای وجود سم آفلاتوکسین در آن مورد تحریم قرار داد، موضوع آلودگی مواد غذایی به این سموم قارچی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته، پژوهش‌های دامنه‌داری در این زمینه، توسط دانشگاه‌ها و مراکز پژوهشی انجام شد. مغزهای خوراکی ممکن است در حین برداشت، حمل و نقل و فرآوری دچار آلودگی‌های قارچی شوند که در صورت وجود شرایط مناسب از نظر دما و رطوبت نسبی فعالیت آبی مغز افزایش یافته که خود منجر به رشد و گسترش قارچ و تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله مایکوتوکسین‌ها می‌گردد. آفلاتوکسین‌ها ترکیبات سمی از دسته مایکوتوکسین‌ها هستند که توسط قارچ‌هایی مانند اسپرژیلوس فلاووس^۱، آ. پارازیتیکوس^۲ و آنومیوس^۳ تولید می‌شوند و باعث بروز بیماری‌های خطرناکی در انسان مانند سرطان کبد می‌شود. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۷ (۱۳۸۶) در مورد آلودگی پسته به سم آفلاتوکسین در استان اصفهان صورت گرفت، مشاهده شد که به ترتیب مقادیر آفلاتوکسین کل (AFT) و آفلاتوکسین B₁ (AFB₁) ۳۶ و ۲۹ درصد از پسته‌های تولیدی از حداکثر حد مجاز (MTL)^۴ بیش‌تر بودند (۱۰). در پژوهش دیگری بین سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ (۱۳۸۲ و ۱۳۸۳) که بر روی آلودگی پسته‌های ایران به سم آفلاتوکسین صورت گرفته است، مشخص شد که ۷/۵ درصد آن‌ها دارای آلودگی به آفلاتوکسین کل و

1. *Aspergillus flavus*
2. *Aspergillus parasiticus*
3. *Aspergillus nomius*
4. Maximum Tolerated Level

پسته و ارزیابی میزان بازدارندگی پوشش مذکور بر تولید آفلاتوکسین در این محصول می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

در این پژوهش از پسته‌ی تازه‌ی رقم اکبری، محصول دامغان استفاده گردید. برای اطمینان از عدم آلودگی قبلی پسته به قارچ‌های مولد آفلاتوکسین از پسته‌ی دهان بسته استفاده شد. کنسانتره‌ی پروتئینی ۸۵٪ آب پنیر از شرکت آرلا فودز دانمارک، گلیسرول ۸۷٪ از شرکت مرک آلمان، محیط‌های کشت SDA و SDB از شرکت HEMEDIA (M063, RM027-500G) و اتانول ۹۶٪ از شرکت بیدستان، آویشن شیرازی مورد نیاز از گروه گیاهان دارویی پژوهشکده‌ی صنایع شیمیایی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و قارچ آسپرژیلوس فلاووس (PTCC5006) از مرکز کلکسیون قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری گردید.

دستگاه‌های مورد استفاده عبارت بودند از: انکوباتور لرزاننده مدل INNOVA 4330 ساخت آمریکا، اتو کلاو مدل BEASAT SANYO LABO ساخت ژاپن، هود بیولوژیک مدل BUCHI B-126 ساخت ایران، تبخیر کننده‌ی گردان مدل BUCHI B-480 ساخت سوئیس، آسیاب برقی مولینکس ساخت فرانسه، گرم کننده با همزن مغناطیسی مدل Heidolph RZR 2041 ساخت آلمان و کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا (HPLC) مدل واترز مجهز به آشکارساز فلورسانس، ساخت آمریکا.

۲-۱- ساخت پوشش خوراکی

ابتدا یک محلول ۱۰٪ از کنسانتره‌ی پروتئین آب پنیر در آب مقطر تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد تا پروتئین‌های آن دناتوره شوند و سپس تا دمای اتاق خنک و به وسیله‌ی سود ۱ نرمال pH آن روی ۷ تنظیم گردید. پس از آن گلیسرول به محلول پوشش به گونه‌ای اضافه شد که نسبت گلیسرول به پروتئین برابر ۶/۰ (وزنی/وزنی) باشد (۱۱). تیمارهای مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از: مغز پسته (نمونه‌ی شاهد)، پسته پوشش داده‌ی بدون عصاره و پسته‌ی پوشش داده همراه با مقادیر مختلف عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی (در مقادیر ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰،

میکروارگانیزم‌های نامطلوب در مواد غذایی، افزودن ترکیبات ضد میکربی مانند عصاره‌های روغنی گیاهی^۱ در پلیمرهایی مثل کنسانتره‌ی پروتئینی آب پنیر است که در واقع به عنوان حامل مواد ضد میکربی عمل می‌نماید.

پژوهش‌های بسیاری در داخل و خارج کشور بر روی تاثیر اسانس روغن‌های اساسی گیاهی بر روی میکروارگانیزم‌ها و ارزیابی قدرت مهار کنندگی و کشندگی آن‌ها در سیستم‌های مدل و نیز در مواد غذایی با و بدون پوشش انجام گرفته است. برای مثال سیدیم و ساریکوس (۲۰۰۶) اثرات ضد میکربی پوشش ایزوله پروتئینی آب پنیر همراه با اسانس‌های پونه، رزماری و سیر را بر روی میکروارگانیزم‌های مختلف مانند سالمونلا و لیستریا مونو سیتوژنز بررسی نمودند (۱۱).

در تحقیقی تاثیر ضد میکربی پوشش خوراکی بر پایه‌ی آب پنیر برای مغز پسته در برابر رشد آسپرژیلوس فلاووس، نشان داده شد و در پژوهشی دیگر، تاثیر ضد میکروبی فیلم‌های خوراکی بر پایه‌ی کیتوزان محتوی اسانس‌های آویشن و میخک بر روی پنج باکتری گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار گرفت (۳ و ۲). پژوهش‌های متعددی نیز برای بررسی اثرات ضد میکربی اسانس آویشن شیرازی انجام یافته است که در ادامه به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود.

در یک تحقیق آزمایشگاهی دیگر، اثر دو اسانس طبیعی آویشن و زنیان به ترتیب در مقادیر ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در لیتر بر کنترل رشد قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس در پسته (با پوست سبز و بدون پوست سبز) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که علی‌رغم این که اسانس آویشن حاوی تیمول کم‌تری بوده و در غلظت پایین‌تری نسبت به اسانس زنیان مورد استفاده قرار گرفت، فعالیت ضد قارچی بالاتری نشان داد که احتمالاً به علت وجود اثرات سینرژیستی سایر ترکیبات فنلی نظیر کارواکرول می‌باشد (۴).

بررسی‌های انجام شده، نشان داد تا کنون تحقیقی در مورد تاثیر روغن‌های اساسی گیاهی بر روی تولید آفلاتوکسین در مغز پسته پوشش یافته با ترکیب خوراکی صورت نگرفته است. هدف از این پژوهش، بررسی اثرات ضد قارچی پوشش کنسانتره‌ی پروتئینی آب پنیر و عصاره‌ی آویشن شیرازی در

بالا (HPLC) استفاده شد (۵). برای تعیین میزان آفلاتوکسین از مقایسه‌ی سطح زیر منحنی و یا ارتفاع منحنی های استاندارد با نمونه‌ی مجهول، با احتساب ضریب رقت، محاسبه گردید. آزمون‌ها در آزمایشگاه اکریدیته مورد تأیید وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران صورت گرفت.

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

از آنالیز واریانس یک طرفه برای نشان دادن تاثیر عصاره‌ی آویشن شیرازی بر میزان تولید آفلاتوکسین توسط مهار رشد قارچ در دو سطح ۱ و ۵ درصد استفاده شد. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن به کمک نرم‌افزار آماری SPSS انجام گرفت و از سه تکرار برای غلظت‌های مختلف اسانس و شاهد استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

نتایج رشد دیسک اسپرژیلوس فلاووس پس از هر ۲۴ ساعت تا زمانی که به رشد کامل خود برسد و همه‌ی فضای پلیت را پر کند، طی نه روز پس از تلقیح بررسی شد که برای اجتناب از افزایش حجم مقاله فقط روزهای فرد ارائه شده‌اند.

۳-۱- روز اول پس از تلقیح

در هیچ یک از تیمارها رشدی صورت نگرفته بود.

۳-۲- روز سوم پس از تلقیح

در روز سوم، بین مغز پسته و پسته‌ی پوشش داده بدون عصاره در هر دو سطح ($p \leq 0/01$) و ($p \leq 0/05$) تفاوت معنی داری در کاهش قطر دیسک اسپرژیلوس فلاووس وجود ندارد. اما میان پسته‌ی پوشش داده‌ی فاقد عصاره با پسته‌ی پوشش داده که حاوی ۱۰۰ قسمت در میلیون عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی است از نظر کاهش قطر دیسک اسپرژیلوس فلاووس تفاوت معنی داری وجود دارد و چنان که مشاهده می‌گردد میان غلظت‌های ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی هم تفاوت معنی داری در کاهش قطر دیسک اسپرژیلوس فلاووس دیده نمی‌شود. اما میان غلظت ۲۰۰۰ تا ۴۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی نیز به‌طور معنی داری قطر دیسک اسپرژیلوس فلاووس کاهش می‌یابد (شکل ۱).

۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰، ۳۰۰۰، ۳۵۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۵۵۰۰ پی پی ام).

۲-۲- استخراج اسانس

برای تهیه‌ی عصاره‌ی الکلی، آویشن شیرازی با آسیاب پودر گردید و سپس به نسبت ۱ به ۶ با حلال الکلی مخلوط شد. حلال مورد استفاده عبارت بود از مخلوطی از اتانول ۹۶٪ و آب مقطر به نسبت ۷۵٪ الکل. فرایند استخراج به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم ارتعاشی در دمای ۴۵°C انجام و سپس با استفاده از فیلتر خلاء، عصاره‌ی حاصل صاف گردید. عصاره‌ی رقیق به دست آمده برای تغلیظ به یک تبخیر کننده‌ی گردان تحت خلأ منتقل شد تا حلال (الکل) آن جدا گردد و در نهایت اسانس حاصل مجدداً با حلال الکلی مخلوط شد و تا انجام آزمایش‌های بعدی در یخچال نگهداری گردید (۸).

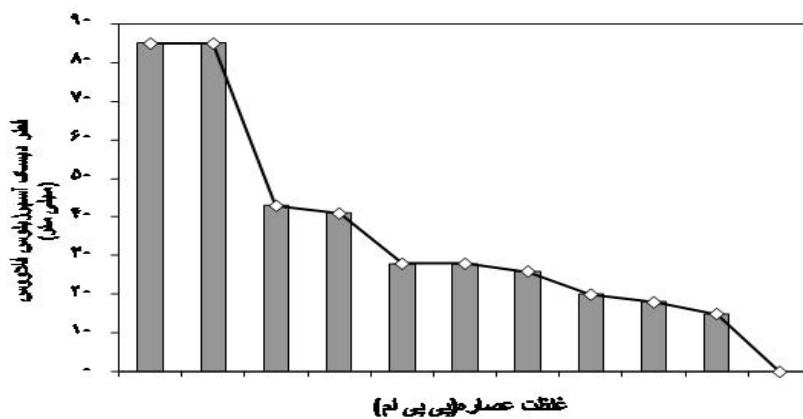
۲-۳- کشت میکروبی

مغزهای پسته، توسط محلول ضد میکروبی پوشش داده شده و تحت دما و رطوبت مناسب خشک گردیدند. نمونه‌های پوشش داده شده در زیر هود بیولوژیک داخل پلیت‌های استریل با قطر ۹۰ میلی‌متر قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله با استفاده از خط کش مرکز هندسی پلیت مشخص و با استفاده از پانچری که قطر دهانه اش در حدود ۵ میلی‌متر است از کشت ۷ روزه تهیه شده از اسپرژیلوس فلاووس دایره‌های ۵ میلی‌متری تهیه گردید و بعد از اتمام کلیه‌ی مراحل، پلیت‌هایی که حاوی پسته‌ها و قارچ اسپرژیلوس فلاووس بود در کیسه‌های پلاستیکی زیپ دار قرار داده شد.

قارچ اسپرژیلوس فلاووس پس از تطبیق شرایط با محیط و برحسب غلظت‌های مختلف عصاره، شروع به رشد کرد. قطر پرگنه توسط کولیس هر روز اندازه‌گیری گردید. چون رشد اسپرژیلوس فلاووس ممکن است به شکل یک دایره‌ی کامل نباشد، شعاع پرگنه قارچی در دو جهت قائم و افقی، اندازه‌گیری شد. سپس حاصل جمع شعاع‌ها از قطر اسپرژیلوس تلقیح شده‌ی اولیه که ۵ میلی‌متر است کم شده، به صورت روزانه تا ۱۱ روز یادداشت گردید (۶).

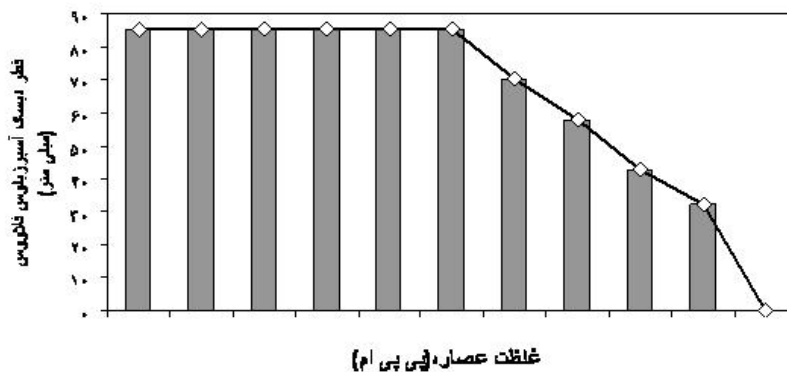
۲-۴- اندازه‌گیری آفلاتوکسین

علاوه بر این، در این بررسی از نمونه‌هایی که در آن‌ها عصاره از رشد قارچ اسپرژیلوس بر روی مغز پسته‌ی پوشش دیده با کنسانتره‌ی پروتئین آب پنیر جلوگیری کرده بود، برای ارزیابی میزان آفلاتوکسین تولید شده به روش کروماتوگرافی با کارایی



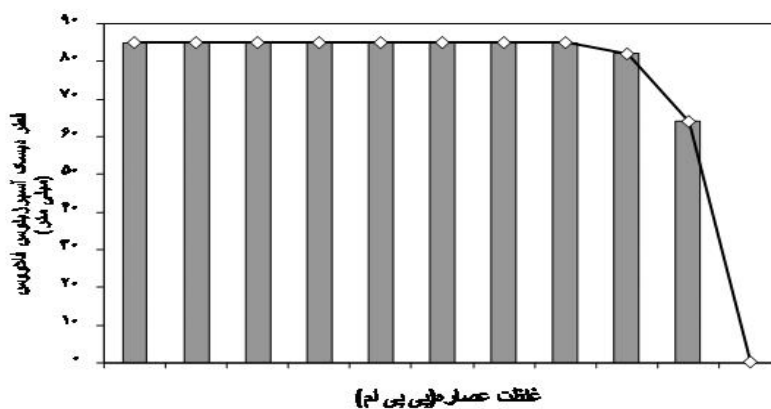
شکل ۱- اثر عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی روی رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* تلقیح شده در پلیت‌های استریل پسته (روز سوم)

(به ترتیب از چپ به راست: مغز پسته، پسته پوشش دیده، پسته پوشش دیده + ۱۰۰، پسته پوشش دیده + ۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۱۰۰۰، پسته پوشش دیده + ۱۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۲۰۰۰، پسته پوشش دیده + ۲۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۳۰۰۰، پسته پوشش دیده + ۳۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۴۰۰۰)



شکل ۲- اثر عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی روی رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* تلقیح شده در پلیت‌های استریل پسته (روز پنجم)

(به ترتیب از چپ به راست: مغز پسته، پسته پوشش دیده، پسته پوشش دیده + ۱۰۰، پسته پوشش دیده + ۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۱۰۰۰، پسته پوشش دیده + ۱۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۲۰۰۰، پسته پوشش دیده + ۲۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۳۰۰۰، پسته پوشش دیده + ۳۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۴۰۰۰)



شکل ۳- اثر عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی روی رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* تلقیح شده در پلیت‌های استریل پسته (روز هفتم)

(به ترتیب از چپ به راست: مغز پسته، پسته پوشش دیده، پسته پوشش دیده + ۱۰۰، پسته پوشش دیده + ۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۱۰۰۰، پسته پوشش دیده + ۱۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۲۰۰۰، پسته پوشش دیده + ۲۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۳۰۰۰، پسته پوشش دیده + ۳۵۰۰، پسته پوشش دیده + ۴۰۰۰)

۳-۳- روز پنجم پس از تلقیح

وجود ندارد به جز در تیمار پسته‌ی پوشش داده که حاوی ۴۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی است. نتایج تجزیه‌ی واریانس نیز نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی بر مهار رشد دیسک اسپرژیلوس فلاووس در تمام روزهای مورد بررسی پس از تلقیح در سطح اطمینان ($p \leq 0/01$) معنی دار بوده است. گندمی نصر آبادی و همکاران (۱۳۸۷) نشان دادند که اثر بازدارندگی عصاره‌ی آویشن شیرازی بر روی قارچ اسپرژیلوس فلاووس در محیط PDA به این صورت بود که در غلظت ۲۰۰ پی پی ام تا روز سوم، هیچ رشدی مشاهده نشد و در غلظت ۴۰۰ پی پی ام دارای اثر مهارکنندگی کامل بر روی رشد بود و در طول ۱۰ روز هیچ رشدی مشاهده نگردید (۵).

در روز پنجم، نشان می‌دهد بین مغز پسته، پسته‌ی پوشش داده بدون عصاره و پسته‌های پوشش داده که حاوی ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ قسمت در میلیون عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی هستند از نظر کاهش قطر دیسک اسپرژیلوس فلاووس تفاوت معنی داری در هر دو سطح ($p \leq 0/01$) و ($p \leq 0/05$) وجود ندارد که این بدان علت است که در روز پنجم تا غلظت ۱۵۰۰ پی پی ام قارچ اسپرژیلوس فلاووس تمام فضای پلیت را گرفته و از این نظر دیگر تفاوت معنی داری با هم ندارند. اما بین غلظت ۱۵۰۰ تا ۴۰۰۰ پی پی ام کاهش قطر دیسک اسپرژیلوس فلاووس با افزایش غلظت عصاره نسبت مستقیم دارد و این کاهش در این تیمارها در هر دو سطح ($p \leq 0/01$) و ($p \leq 0/05$) معنی دار شده است (شکل ۲).

۳-۴- روز هفتم پس از تلقیح

۳-۶- تاثیر عصاره‌ی آویشن شیرازی بر مهار آفلاتوکسین در مغز پسته

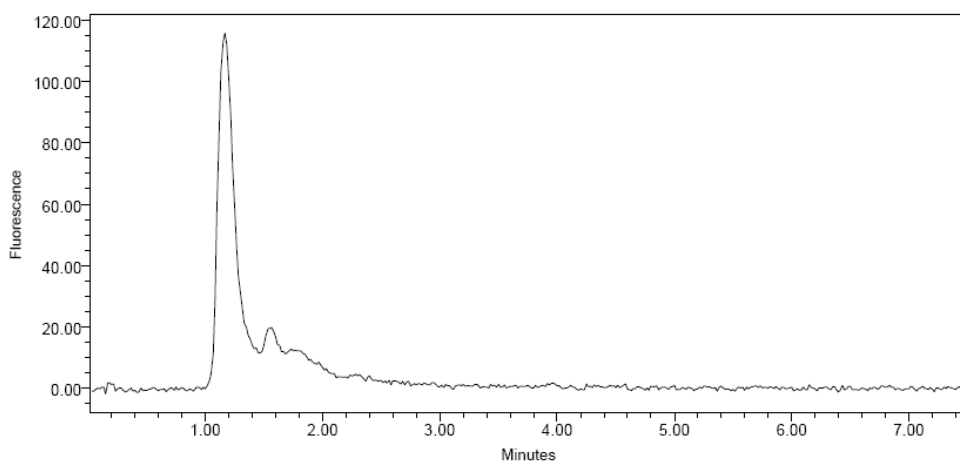
نتایج آزمون اندازه گیری آفلاتوکسین به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با راندمان عالی (HPLC) در نمونه‌ی شاهد و نمونه‌هایی که از عصاره‌ی آویشن شیرازی در فرمولاسیون پوشش خوراکی آن‌ها استفاده شده بود، در شکل‌های ۴ تا ۱۱ ارائه شده است. بررسی نتایج آزمون اندازه گیری میزان آفلاتوکسین نشان داد که مقادیر بالاتر از ۴۰۰۰ پی پی ام از غلظت عصاره‌ی آویشن شیرازی، باعث جلوگیری از تولید آفلاتوکسین در مغز پسته می‌گردد.

در شکل‌های ۶ و ۷، یک پیک اصلی دیده می‌شود که مربوط به حلال (اتانل) است اما در شکل ۸ یک پیک دیگر نیز دیده می‌شود که مربوط به آفلاتوکسین B₁ است با زمان ماندگاری ۵/۶۶۶ min این بدان معناست که در غلظت ۴۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی آویشن شیرازی مقداری آفلاتوکسین تولید شده و غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی آویشن شیرازی، باعث جلوگیری از تولید آفلاتوکسین در مغز پسته شده است.

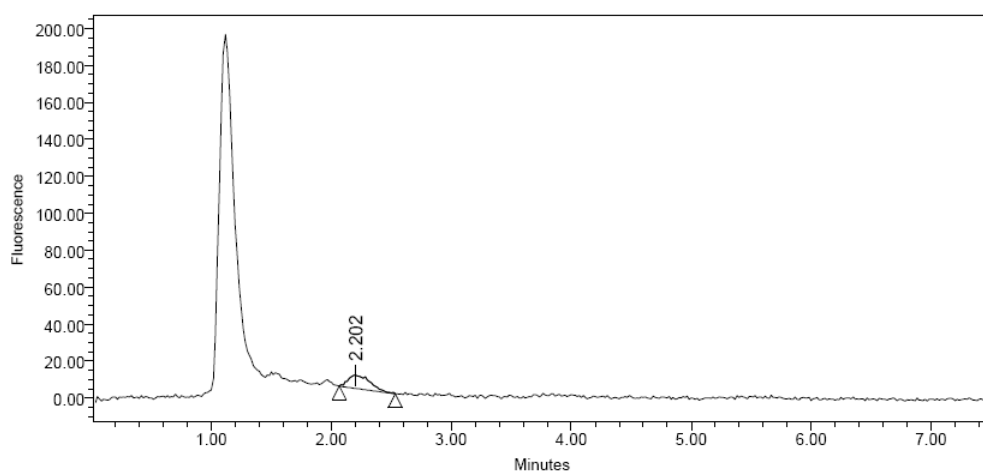
در روز هفتم، بین تیمارهای مغز پسته تا پسته‌ی پوشش داده که غلظت عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی در آن ۲۵۰۰ پی پی ام است، تفاوت معنی داری در کاهش قطر دیسک اسپرژیلوس فلاووس در هر دو سطح ($p \leq 0/01$) و ($p \leq 0/05$) دیده نمی‌شود. همان‌طور که قبلاً نیز ذکر شد هر روز که می‌گذرد قطر قارچ اسپرژیلوس فلاووس به تدریج افزایش می‌یابد به طوری که در نهایت به ۹۰ میلی‌متر می‌رسد و کل پلیت را در بر می‌گیرد. از این رو، پس از گذشت زمان و رشد قارچ، تفاوت معنی دار در کاهش قطر دیسک اسپرژیلوس فلاووس بین تیمارها از بین می‌رود. اما از غلظت ۲۵۰۰ تا ۴۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی که در پوشش کنسانتره‌ی پروتئینی مغز پسته است، قطر دیسک اسپرژیلوس فلاووس به تدریج کاهش می‌یابد. در این روز نیز هیچ‌گونه رشدی در قارچ اسپرژیلوس تلقیح شده در غلظت ۴۰۰۰ پی پی ام مشاهده نگردید (شکل ۳).

۳-۵- روز نهم پس از تلقیح

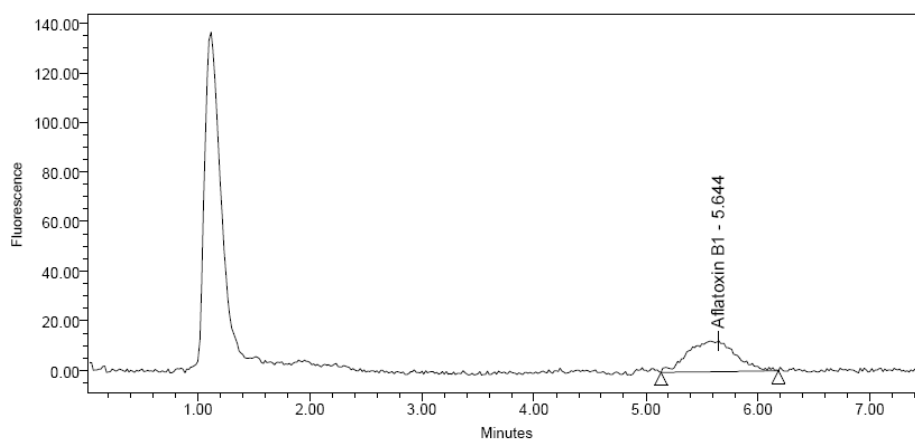
در روز نهم، قارچ اسپرژیلوس فلاووس تمام فضای پلیت، تیمار پسته‌ی پوشش داده که حاوی ۳۵۰۰ پی پی ام عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی است را دربرگرفته و لذا دیگر تفاوت معنی داری از نظر کاهش رشد دیسک اسپرژیلوس، بین تیمارها



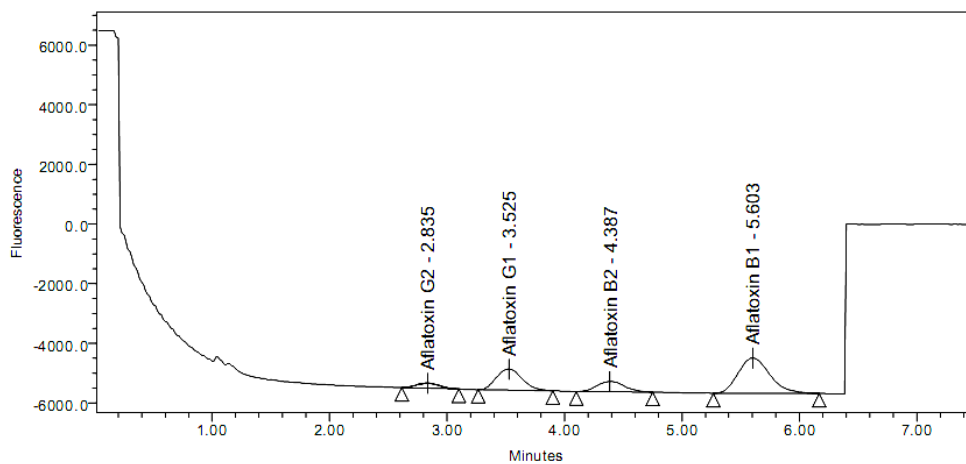
شکل ۴- کروماتوگرام آنالیز آفلاتوکسین G_1 ، B_2 ، G_2 و B_1 در مغز پسته‌ی حاوی ۵۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی آویشن شیرازی



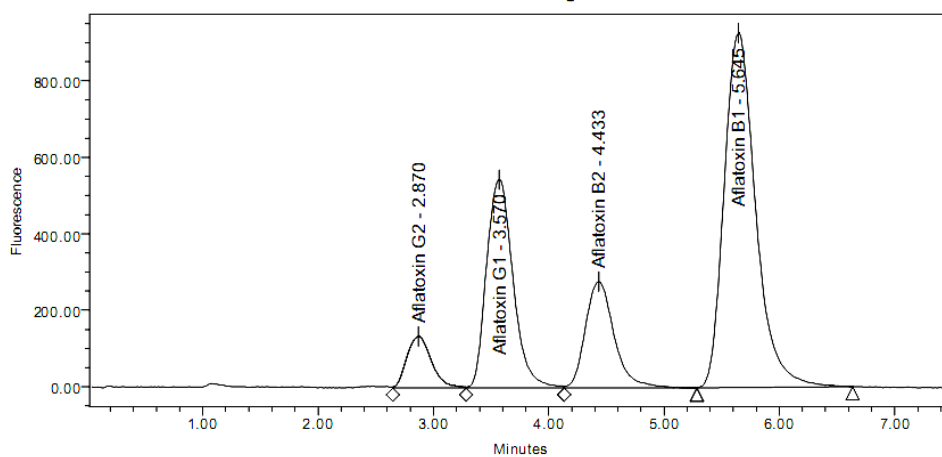
شکل ۵- کروماتوگرام آنالیز آفلاتوکسین G_1 ، B_2 ، G_2 و B_1 در مغز پسته‌ی حاوی ۵۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی آویشن شیرازی



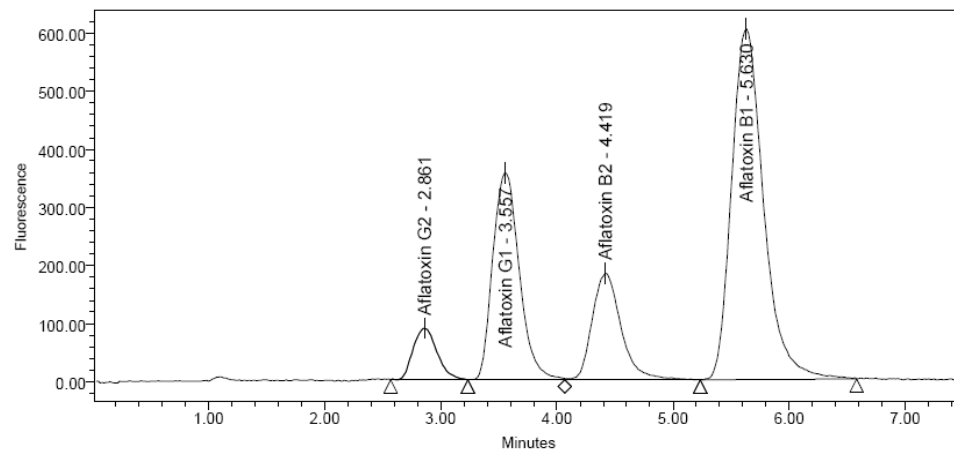
شکل ۶- کروماتوگرام آنالیز آفلاتوکسین G_1 ، B_2 ، G_2 و B_1 در مغز پسته‌ی حاوی ۴۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی آویشن شیرازی



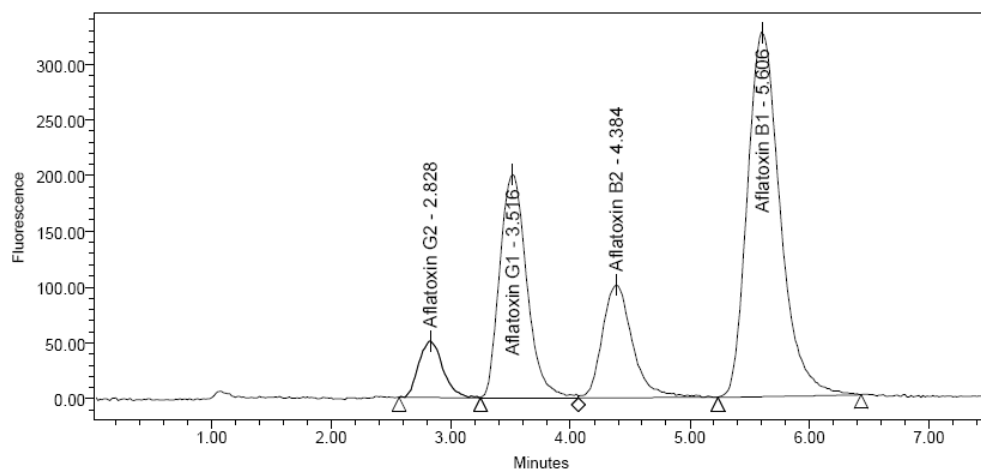
شکل ۷- کروماتوگرام آنالیز آفلاتوکسین G_2 ، G_1 ، B_2 ، B_1 در مغز پسته‌ی حاوی ۳۵۰۰ پی پی ام عصاره‌ی آویشن شیرازی



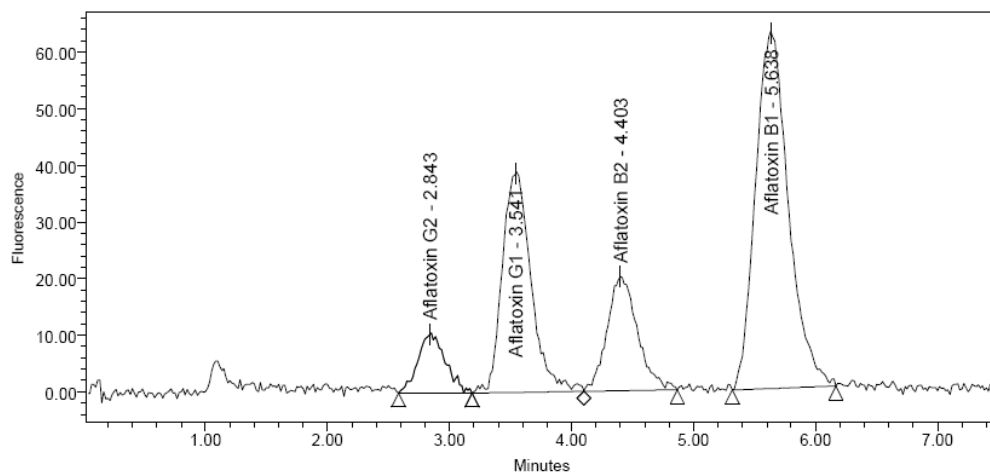
شکل ۸- کروماتوگرام آنالیز آفلاتوکسین G_2 ، G_1 ، B_2 ، B_1 در مغز پسته‌ی حاوی ۳۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی آویشن شیرازی



شکل ۹- کروماتوگرام آنالیز آفلاتوکسین G_2 ، G_1 ، B_2 ، B_1 در مغز پسته‌ی حاوی ۲۵۰۰ پی پی ام عصاره‌ی آویشن شیرازی



شکل ۱۰- کروماتوگرام آنالیز آفلاتوکسین G_1 ، G_2 ، B_1 ، B_2 در مغز پسته‌ی حاوی ۲۰۰۰ پی پی ام عصاره‌ی آویشن شیرازی



شکل ۱۱- کروماتوگرام آنالیز آفلاتوکسین G_1 ، G_2 ، B_1 ، B_2 در مغز پسته‌ی حاوی ۱۵۰۰ پی پی ام عصاره‌ی آویشن شیرازی

جدول ۱ - مقادیر آفلاتوکسین کل و B₁ در مغز پسته پوشش یافته با کنسانتره پروتئینی آب پنیر و غلظت های مختلف اسانس آویشن شیرازی

غلظت عصاره (ppm)	آفلاتوکسین کل (ppb) AFT	آفلاتوکسین B ₁ (ppb) AFB ₁
۱۵۰۰	۱۶/۴۶۷	۵/۶۳۰
۲۰۰۰	۱۶/۳۳۴	۵/۶۰۶
۲۵۰۰	۱۶/۳۱۷	۵/۶۱۵
۳۰۰۰	۱۶/۵۱۸	۵/۶۴۵
۳۵۰۰	۱۶/۳۵۰	۵/۶۰۳
۴۰۰۰	۵/۶۴۴	۵/۶۴۴
۵۰۰۰	.	.
۵۵۰۰	.	.

همان طور که در کروماتوگرام های مربوط به غلظت های ۱۵۰۰ تا ۳۵۰۰ آویشن شیرازی مشاهده می کنید ۴ پیک اصلی دیده می شود که بلندترین آن ها مربوط به آفلاتوکسین B₁ و پیک های بعدی به ترتیب مربوط به آفلاتوکسین G₁, B₂ و G₂ است. به عنوان مثال در غلظت ۳۰۰۰ پی پی ام عصاره آویشن شیرازی به ترتیب آفلاتوکسین B₁ با زمان ماندگاری ۵/۶۴۵ دقیقه، آفلاتوکسین G₁ با زمان ماندگاری ۳/۵۷۰ min، آفلاتوکسین B₂ با زمان ماندگاری ۴/۴۳۳ min و آفلاتوکسین G₂ با زمان ماندگاری ۲/۸۷۰ min استخراج شده است. اما مقدار آفلاتوکسین ها در غلظت ۳۵۰۰ پی پی ام آویشن شیرازی کم تر از غلظت های ۱۵۰۰ تا ۳۰۰۰ پی پی ام است در حالی که در این غلظت نیز آفلاتوکسین های B₁ و G₁ بیش تر از بقیه آفلاتوکسین ها هستند. نتایج حاصل از کروماتوگرام های ۶ تا ۱۳ در جدول ۱ آمده است. همان طور که از این جدول استنباط می شود تا غلظت عصاره آویشن ۳۵۰۰ پی پی ام، حداکثر حد مجاز آفلاتوکسین کل و نیز آفلاتوکسین B₁ از استاندارد ملی ایران و نیز برخی از کشورها که به ترتیب ۱۵ و ۵ پی پی بی است تجاوز می کند و در غلظت عصاره آویشن ۴۰۰۰ پی پی ام از نظر میزان آفلاتوکسین B₁ بیش از حد مجاز است. در غلظت بالاتر از ۴۰۰۰ پی پی ام مقدار هر دو آفلاتوکسین کل و B₁ کاهش چشم گیری می یابد که این امر تاثیر آنتی باکتریال آویشن را بر آسپرژیلوس فلاووس نشان می دهد.

نشان داده شد که مقادیر بالاتر از ۲۵۰۰ پی پی ام از غلظت عصاره آویشن شیرازی، باعث جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در مغز پسته می شود و بنابراین، اگر جلوگیری از تولید آفلاتوکسین نیز مد نظر باشد مسلماً غلظت عصاره بالاتر خواهد بود که با نتایج به دست آمده همخوانی دارد (۲). همچنین نتایج پژوهش حاضر، نشان می دهد که غلظت مهار کنندگی اسانس آویشن شیرازی بر روی آسپرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاهی نسبت به مدل غذایی بسیار پایین تر است. برای مثال در یک تحقیق، حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس آویشن شیرازی بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط PDA چهارصد پی پی ام و حداقل غلظت کشندگی را معادل ۱۰۰۰ پی پی ام به دست آوردند که به مراتب کم تر از میزان به دست آمده در این پژوهش است (۵). علی رغم جست و جوی های زیاد در منابع داخلی و خارجی، مقاله مشابهی در مورد تاثیر ضد آفلاتوکسینی پوشش خوراکی با روغن های اساسی برای مغز پسته یا سایر مواد غذایی برای مقایسه داده ها، یافت نگردید.

۵- نتیجه گیری

اثر بازدارندگی پوشش خوراکی مغز پسته با پایه کنسانتره پروتئینی آب پنیر و عصاره آویشن شیرازی در برابر سم آفلاتوکسین به غلظت عصاره بستگی دارد. تا غلظت عصاره آویشن ۳۵۰۰ پی پی ام، حداکثر حد مجاز آفلاتوکسین کل و نیز آفلاتوکسین B₁ از استاندارد ملی ایران و نیز برخی از کشورها که به ترتیب ۱۵ و ۵ پی پی بی است تجاوز می کند و در غلظت عصاره آویشن ۴۰۰۰ پی پی ام از نظر میزان آفلاتوکسین B₁ بیش از حد مجاز است. در غلظت بالاتر از ۴۰۰۰ پی پی ام مقدار هر دو آفلاتوکسین کل و B₁ کاهش چشم گیری می یابد که این امر تاثیر آنتی باکتریال آویشن را بر آسپرژیلوس فلاووس نشان می دهد.

۶- منابع

- ۱- استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۵. اندازه گیری آفلاتوکسین گروه های B و G در مواد غذایی مختلف . استاندارد ملی ایران، شماره ۶۸۷۲، چاپ اول.

۲- جوانمرد، م و رمضان، ی. ۱۳۸۸. به کارگیری پوشش خوراکی حاوی عصاره‌ی الکلی آویشن شیرازی در جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی مغز پسته. فصلنامه‌ی گیاهان دارویی، جلد ۸، شماره‌ی ۳۰، ۷۰-۶۱.

۳- حسینی، م، رضوی، ه. و موسوی، م. ۱۳۸۷. بررسی خواص ضد میکروبی، فیزیکی و مکانیکی فیلم های خوراکی تولید شده از کیتوزان محتوی اسانس های آویشن و میخک. فصلنامه‌ی علوم و صنایع غذایی، جلد ۵، شماره‌ی ۵، ۴۹-۴۱.

۴- مهربان، م، پورآذرننگ، ه، مرتضوی، ع، مسکوکی، ع. و گوهری، آ. ۱۳۸۴. اثر اسانس های طبیعی آویشن و زنیان بر جلوگیری از رشد آسپرژیلوس پارسازیتیکوس در پسته. پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد اول، شماره‌ی اول، ۵۱-۴۵.

۵- گندمی نصرآبادی، ح، آخوندزاده بستی، ا، خسروی، ع، بکایی، س. و عباسی فر، آ. ۱۳۸۷. اثر اسانس آویشن شیرازی روی آسپرژیلوس فلاووس. فصلنامه‌ی گیاهان دارویی، جلد ۶، شماره‌ی ۲۷، ۵۱-۴۵.

6- Bluma, R .V. and Etcheverry, M.G. 2007. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus Flavus* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*, Available at: doi:10.1016/j.fm. 2007.10.004.

7- Cheraghali, A.M.; Yazdanpanah, H.; Doraki, N.; Abouhossain, G.; Hassibi, M.; Aliabadi, S. and Zamanian, F. 2007. Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 45(5):812-816.

8- Debeaufort, F., Quezada-Gallo J.A. and Voilley, K. 1998. Edible film and coatings; tomorrows packaging a review, *Critical Reviews in Food Science*, 38, 299-313.

9- Embuscado, M. E. and Huber, K. C. 2009. Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer, Berlin, 416p.

10- Sarhang Pour, R.; Rasti, M.; Zighamian, H. and A. Daraei Garmkhani. 2010. Occurrence of aflatoxins in pistachio nuts in Esfahan province. *Journal of Food Safety*, 30(2):330-340.

11- Seydim, A.C. and Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5): 639-644.

12- Tavakolipour, H., Armin, M. and Kalbasi Ashtari, A. 2010. Storage stability of Kerman pistachio nuts (*Pistacia vera* L.). *International Journal of Food Engineering*, 6(6), Art.15.