

[10.30495/JFH.2020.671221](https://doi.org/10.30495/JFH.2020.671221)

(مقاله پژوهشی)

تأثیر اکسید کلسیم و پرتودهی بر جمعیت آسپرژیلوس فلاووس و میزان آفلاتوکسین‌های تولید شده در دانه ذرت

اسماعیل بایگانه^۱، ابوالفضل فدوی^{۲*}، هادی کوهساری^۳

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

۲. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

۳. استادیار گروه علوم پایه، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: Fadavi.ac.ir@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۸/۸/۱۷ پذیرش نهایی: ۹۸/۱۱/۲۳)

چکیده

کپک آسپرژیلوس فلاووس یکی از قارچ‌های مهم خطرناک است که در زمان انبارمانی در شرایط نامناسب پدیدار می‌شود. این کپک سموم آفلاتوکسین‌ها را در دانه‌های ذرت تولید می‌کند. لذا بررسی امکان کاهش غلظت این کپک و سموم تولیدی آن مهم به نظر می‌رسد. در این تحقیق تأثیر اکسید کلسیم (۰، ۰/۵ و ۱ درصد) و میزان پرتوگاما (۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ کیلوگری) بر رشد کپک آسپرژیلوس فلاووس و میزان سموم آفلاتوکسین B₁ (AFB₁)، آفلاتوکسین B₂ (AFB₂)، آفلاتوکسین G₁ (AFG₁) و آفلاتوکسین G₂ (AFG₂) بررسی گردید. آنالیز تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از معنی‌داری اثر مجزای پرتودهی و اکسید کلسیم و اثر متقابل آن‌ها بود ($P < 0/05$)؛ به طوری که با افزایش پرتودهی میزان آسپرژیلوس فلاووس و سموم AFB₁ و AFB₂ کاهش یافت. کاهش بیشتر سموم AFB₁ و AFB₂ طی به کارگیری ۰/۵٪ اکسید کلسیم به همراه پرتودهی بسیار مشهود بود. این در حالی است که به کارگیری هم‌زمان ۱٪ اکسید کلسیم به همراه پرتودهی باعث جلوگیری و کاهش بیشتر آسپرژیلوس فلاووس گردید. طی بررسی نمونه‌ها، سموم AFG₁ و AFG₂ در هیچ‌کدام از آن‌ها مشاهده نگردید. لذا با توجه به استاندارد حد مجاز پرتودهی حداکثر ۱۰ کیلوگری برای مواد غذایی، پیشنهاد می‌شود از غلظت ۰/۵٪ اکسید کلسیم قبل از ذخیره‌سازی و اعمال شدت پرتوی ۱۰ کیلوگری پس از ذخیره‌سازی جهت کنترل رشد کپک و تولید سموم آفلاتوکسین در دانه‌های ذرت استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پرتودهی، اکسید کلسیم، آسپرژیلوس فلاووس، آفلاتوکسین، دانه ذرت

مقدمه

پرتو دهی در افزایش ماندگاری میوه جات (Waghmare and Annapure, 2018) مورد آزمایش قرار گرفته است. در بین روش های کنترل و کاهش تولید سموم قارچی، پرتو دهی با اشعه گاما نیز می تواند مورداستفاده قرار گیرد. در پژوهشی کاهش جمعیت کپک به میزان بیش از ۹۹٪ در نمونه های پرتو تابی شده ذرت در دز ۱۰ کیلوگری گزارش شد (Aquino et al., 2005). هم چنین مقدار دز پرتو دهی ۵ کیلوگری باعث جلوگیری از اسپورزایی، جوانه زدن و رشد آسپرژیلوس فلاووس در نمونه های ذرت و خوراک دام گردید (Markov et al., 2015). از آنجایی که برای از بین بردن کامل یا تجزیه سموم آفلاتوکسین با توجه به مقاومت آن ها به پرتو گاما نیاز به میزان بالایی از دز پرتو می باشد و از طرفی مقدار بالای پرتو باعث تجزیه ترکیبات مختلف غذایی در دانه های غلات می گردد (Siddhuraju et al., 2002). لذا لزوم ارائه روش ها یا استفاده از مواد کمکی برای کاهش شدت پرتو تابی توصیه می گردد (Pankaj et al., 2018). از طرفی یکی از ترکیبات مهم مورداستفاده در فرایندهای غذایی اکسید کلسیم است. واکنش این ماده با آب تولید هیدروکسید کلسیم می نماید که در کشورهایی چون مکزیک در فرآوری و پوست گیری ذرت به همراه حرارت (معروف به فرایند Nixtamalization) استفاده می شود و باعث کاهش قابل توجه میکوتوکسین ها می گردد (Schaarschmidt and Fauhl-Hassek, 2019). اما با وجود تحقیقات جداگانه ای که بر تأثیر اکسید کلسیم و پرتو تابی برای تجزیه سموم قارچی در غلات صورت پذیرفته است، در خصوص تأثیر هم زمان اکسید کلسیم و پرتو تابی در غلات به منظور کاهش رشد کپک آسپرژیلوس فلاووس و تجزیه سموم AFB₁ و AFB₂

در طول تاریخ ذرت یکی از مهم ترین منابع غذایی برای تأمین خوراک انسان بوده است که به دلیل شرایط نامطلوب نگهداری رطوبتی و دمایی به سرعت دچار آلودگی با کپک آسپرژیلوس فلاووس می گردد و منجر به تولید سموم آفلاتوکسین B₁, B₂, G₁ و G₂ می شود (Whitaker, 2003). این سموم باعث تخریب حاد کبد، ایجاد سیروز کبد، القای توموری و تأثیرات تراتوژنیک و سرطان زایی می شوند (IARC, 2012). لذا به منظور آلودگی زدایی دانه های ذرت از کپک آسپرژیلوس فلاووس و سموم آفلاتوکسین روش های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی ارائه شده است (Deberghes et al., 1995). در تحقیقی مجاورت ذرت های آلوده با ۰/۱٪ آمونیاک باعث تخریب ۹۸ درصد هر چهار نوع آفلاتوکسین شد (King and Prudente Jr, 2005). هم چنین ترکیبات آمونیوم دار ۲٪، غلظت آفلاتوکسین های G₁, G₂, B₁, B₂ را به ترتیب به میزان ۸۸±۱، ۸۵±۱/۳، ۹۸/۰۶، ۹۳±۰/۸ کاهش داده است (Nyandieka et al., 2009). اسید سیتریک باعث کاهش ۹۶/۷٪ AFB₁ و AFB₂ در دانه های ذرت گردیده است (Méndez-Albores et al., 2008). بعضی از مواد شیمیایی شامل آمونیوم پرسولفات (-Burgos Elias) (Hernandez et al., 2001)، هیدروکسید کلسیم (-Elias Orozco et al., 2002)، بی کربنات سدیم و کربنات پتاسیم (Amézqueta et al., 2008)، بی سولفیت سدیم در از بین بردن سموم آفلاتوکسین و دیگر میکوتوکسین ها و هم چنین استفاده هم زمان ترکیب سوربات پتاسیم و پرتو دهی (Al-Kuraieef et al., 2019) و به کارگیری هم زمان اتمسفر کنترل شده و

Iran) مخلوط گردید. با استفاده از لام Hemo cytometric سوسپانسیون 10^6 کونیدی قارچ در هر میلی لیتر سرم فیزیولوژی برای تلقیح تهیه گردید. سپس برای تلقیح نمونه‌ها به هر ارلن حاوی ۲۰۰ گرم ذرت ۲ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی لیتر اسپری گردید. در نهایت رطوبت نمونه‌ها به ۲۵٪ تنظیم گردیده و به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در انکوباتور یخچال دار (-Fks, Agalytic, 1802, Germany) و رطوبت نسبی (RH) ۹۷ تا ۹۸ درصد انکوباسیون گردید (Refai et al., 1996).

- پرتو تابی نمونه‌ها

تیمارهای تلقیح شده با اسپور *Aspergillus flavus* پس از گذشت دوره ۱۵ روزه، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تحت دزهای مختلف ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ کیلوگری اشعه گاما با چشمه کبالت 60 اکتیویته 2500 کوری و نرخ دز 23 ٪ گری در سازمان انرژی اتمی ایران در بخش کشاورزی و پزشکی هسته‌ای کرج پرتو تابی شدند. سیستم پرتو تابی (Px30, Russia) و مدل دستگاه گاماسل GC220، ساخت شرکت نوردیون، کانادا بود.

- شمارش جمعیت اسپور *Aspergillus flavus* فلاووس

این آزمایش بر اساس روش شمارش کپک‌های خشکی دوست انجام گرفت (ISO, 2008/2-215278). بدین ترتیب که نمونه‌های ده گرمی به خوبی با 90 میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط شدند. مقدار اسپورها با استفاده از روش شمارش پلیت در محیط کشت انتخابی قارچ *Aspergillus flavus* (محیط کشت سابورو دکسترو آگار) بعد از انکوباسیون به مدت هفت روز و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در سوسپانسیون‌های با سری رقت‌های 10^{-1} الی 10^{-6} شمارش شد. قارچ‌ها

گزارشی ارائه نگردیده است. از این رو هدف از این تحقیق علاوه بر شناسایی اثر اشعه گاما و اکسیدکلسیم در کاهش جمعیت *Aspergillus flavus* فلاووس و کاهش غلظت سموم آفلاتوکسین در دانه‌های ذرت امکان کاهش دز تابشی اشعه گاما نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

- آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های ذرت تازه، سالم و عاری از هرگونه آفت و کپک‌زدگی از نوع کشت آبی از رقم سینگل کراس ۷۰۴ با تأیید عدم وجود آفلاتوکسین از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان (گرگان، ایران) تهیه شده و در کیسه‌های پلاستیکی استریل به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس استریل کردن اولیه نمونه‌ها با غوطه‌وری در آب اکسیژنه ۰.۵٪ به مدت ۵ دقیقه و بعد ۳ بار عمل شستشو با آب مقطر استریل انجام شد و در نهایت رطوبت نمونه‌ها به ۲۵٪ تنظیم گردید.

-تهیه جدایه قارچ و کشت آن در محیط کشت، شمارش و تلقیح

به منظور آغشته سازی نمونه‌ها با کلنی‌های قارچ *Aspergillus flavus* (PTCC5004) از کلنی‌های ۷ روزه آن‌ها که تولیدکننده سم آفلاتوکسین هستند استفاده شد. بدین منظور سوش مورد نظر از انستیتو پاستور ایران خریداری و در داخل پلیت حاوی محیط سابورو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) جهت تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ احیا گردید. سپس ۵ میلی لیتر نرمال سالین استریل به پلیت حاوی کلنی‌های قارچ مذکور اضافه و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت 100 rpm بر روی شیکر روتاتور (VDRL, Bazianlab,)

Design- با نرم‌افزار- (AFG₂ و AFG₁, AFB₂, AFB₁)
Expert v. 10 صورت پذیرفت.

یافته‌ها

میانگین نتایج به دست آمده در جدول (۱) نشان داده شده است و حروف متفاوت دانکن بیانگر وجود تفاوت‌های معنی دار در برخی از تیمارها است. در خصوص جمعیت کپک‌ها، نمونه پرتودهی نشده حاوی ۰/۵ درصد اکسیدکلسیم دارای بالاترین میزان کپک آسپرژیلوس فلاووس (۳۷۲۰۰۰ CFU/g) و نمونه پرتودهی شده به میزان ۲۰ کیلوگری حاوی ۰/۱ اکسیدکلسیم واجد کمترین محتوی کپک آسپرژیلوس فلاووس (۲۱۶۰۰ CFU/g) بود که حاکی از کاهش جمعیت کپک ۹۳/۹۷٪ را داشت (جدول ۱). از طرفی بیشترین میزان سم AFB₁ به میزان ۹۶۰۶/۶ ppb در نمونه پرتودهی نشده حاوی ۰/۱ اکسیدکلسیم بود. این در حالی است که کمترین محتوی سم AFB₁ (ppb) ۸۳۳/۳ در نمونه حاوی ۰/۵ اکسیدکلسیم و پرتودهی شده با دز ۲۰ کیلوگری وجود داشت که نسبت به نمونه شاهد کاهش ۸۹/۰۳٪ غلظت سم را نشان داد. در خصوص محتوی سم AFB₂ بالاترین میزان مربوط به نمونه پرتودهی نشده حاوی ۰/۱ اکسیدکلسیم بود و کمترین محتوی سم AFB₂ (ppb) ۴۳/۳ در نمونه پرتودهی شده با دز ۲۰ کیلوگری حاوی ۰/۵ اکسیدکلسیم شناسایی شد که کاهش ۸۴/۵٪ در غلظت سم را داشت (جدول ۱). سموم AFG₁ و AFG₂ در هیچ کدام از تیمارها شناسایی نگردید. با وجود آن که میزان ۰/۵٪ اکسیدکلسیم در نمونه‌ها باعث افزایش اندک

به صورت کلنی‌های زرد یا سبز بر روی پلیت‌ها ظاهر شدند.

- تعیین میزان تولید سموم آفلاتوکسین

مقدار ۲۵ گرم از هر نمونه با استفاده از مخلوطکن پودر گردیده (Myson, model MJE, 900, Korea) با متانول حاوی ۴٪ KCl (Merck, Germany) عصاره گیری گردید. عصاره‌ها با استفاده از محلول آمونیوم ۳۰٪ صاف شدند و سپس آفلاتوکسین با اضافه کردن کلروفرم استخراج شد. شناسایی و تعیین اندازه سم نیز با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Waters E2695 with 2475 multiwavelength Fluorescence Detector, USA) که مجهز به مشتق ساز پس ستون است انجام گرفت. طول موج برانگیختن دتکتور فلورسانس ۳۶۲ نانومتر و طول موج نشر آفلاتوکسین B₁ و B₂ ۴۲۶ نانومتر و طول موج نشر آفلاتوکسین G₁ و G₂ ۴۶۵ نانومتر است. درجه حرارت ستون ۴۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت جریان ۲ ml/min و از ستون کرومولیت با ابعاد ۱۰cm×۶ mm (Phenomenex Inc., USA) استفاده گردید. از مقایسه سطح زیر منحنی و یا ارتفاع منحنی‌های استاندارد با نمونه مجهول و با احتساب ضریب رقت، مقدار آفلاتوکسین‌ها محاسبه شد (ISO, 2003/16050).

- تجزیه و تحلیل

در تجزیه و تحلیل داده از طرح آزمایشی فاکتوریل ۵ × ۳ استفاده گردید و میانگین نتایج حاصل از ۳ تکرار، آنالیز تجزیه واریانس آن‌ها و هم‌چنین تأثیر مجزا و متقابل اکسیدکلسیم و پرتودهی بر متغیرهای مستقل (جمعیت کپک آسپرژیلوس فلاووس و غلظت سموم

آسپرژیلوس فلاووس ($P < 0/05$)، آفلاتوکسین B₁ ($P < 0/05$) و آفلاتوکسین B₂ ($P < 0/001$) حکایت دارد. همچنین در خصوص فرایند پرتودهی، تأثیر بسیار معنی دار آن بر میزان رشد قارچ یا تعداد اسپورهای قارچ آسپرژیلوس فلاووس ($P < 0/05$)، آفلاتوکسین B₁ ($P < 0/001$) و آفلاتوکسین B₂ ($P < 0/05$) مشخص شد. در این آزمون آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر متقابل اکسیدکلسیم و پرتودهی روی تعداد اسپورهای قارچ آسپرژیلوس فلاووس، مقادیر AFB₁ و AFB₂ تأثیر بسیار معنی داری ($P < 0/05$) دارد.

رشد کپک گردید (۸/۱۲٪) اما تولید سموم AFB₁ و AFB₂ کاهش بسیار قابل توجهی یافت (به ترتیب ۴۰/۶۷٪ و ۴۸/۵۶٪). این پدیده در غلظت ۱٪ اکسیدکلسیم روند معکوسی داشت بدین ترتیب که هم‌زمان با کاهش رشد کپک به میزان ۲۴/۹۸٪، تولید AFB₁ و AFB₂ به ترتیب ۷/۹۶٪ و ۲۸/۳۱٪ افزایش یافت (داده‌ها نشان داده نشده است).

در خصوص تأثیری گذاری متغیرهای مستقل اکسیدکلسیم و پرتودهی بر متغیرهای وابسته مورد آزمون، آنالیز تجزیه واریانس یافته‌های خام به دست آمده در جدول (۲) آورده شده است. یافته‌ها از معنی داری تأثیر اکسیدکلسیم بر هر سه متغیر وابسته کپک

جدول (۱) - مقادیر میانگین و انحراف معیار جمعیت کپک آسپیرژیلوس فلاوس، غلظت های سموم و در دانه های گندم. مقادیر افت بر مبنای مقدار اولیه در نمونه شاهد محاسبه شده است (%0 CaO, 0 KGy)

افت AFB ₂ (%)	AFB ₂ (ppb) [†]	افت AFB ₁ (%)	AFB ₁ (ppb) [†]	Asp. Flavus (% کاهش)	Asp. Flavus (cfu/g) [†]	متغیرهای مستقل	
						شدت پرتو دهی (KGy)	CaO (%)
۰	۲۸۱/۶±۱۱/۶ ^c	۰	۷۶۰۰±۵۰ ^b	۰	۳۵۶۰۰±۳۱۷۴۹ ^a	۰	۰
۱۳/۴۳	۲۴۳±۲۲/۶ ^d	۴۹/۳۳	۳۸۵۰±۵۰ ^e	۳۵/۸	۲۲۶۶۶۶±۱۲۵۸۳ ^c	۵	۰
۲۸/۲۷	۲۰۱/۳±۱۸ ^e	۵۳/۴	۳۵۴۰±۴۰ ^f	۶۴/۱	۱۲۶۳۳۳/۳±۱۵۱۷۶۷ ^{ef}	۱۰	۰
۳۹/۳	۱۷۰/۶±۵/۱ ^g	۵۵/۱۳	۳۴۱۰±۲۰ ^g	۸۰/۷	۶۷۳۳۳/۳±۱۴۰۴۷/۵ ^h	۱۵	۰
۴۹/۴۳	۱۴۲±۹/۱ ^h	۵۶/۸۳	۳۲۸۰±۲۰ ^h	۸۶/۸	۴۶۳۳۳/۳±۶۵۰۶/۴	۲۰	۰
۲۶/۰۸		۴۲/۹۴		۵۳/۴۹		میانگین (نمونه ۱ الی ۵)	
۵۶/۰۴	۱۲۲/۳±۱۱/۷ ⁱ	۷۲/۱	۲۱۲۰±۲۰ ⁱ	-۴/۶	۳۷۲۰۰±۲۶۰۰۰ ^a	۰	۰/۵
۷۱/۶	۷۹/۶±۵/۵ ^j	۸۲/۴۳	۱۳۳۶/۶±۹۶/۱ ^j	۲۶/۴	۲۶۱۶۶۶/۶±۲۳۵۴۴/۳ ^b	۵	۰/۵
۷۸/۴۳	۶۰/۶±۳ ^k	۸۶/۲۷	۱۰۴۲/۶±۸/۳ ^k	۵۹/۲	۱۴۵۰۰±۱۳۲۲۸/۷ ^{de}	۱۰	۰/۵
۸۲/۲۳	۵۰±۲/۶ ^l	۸۸/۲۳	۸۹۳/۳±۵۵/۱ ^l	۷۰/۴	۱۰۴۳۳۳/۳±۱۱۰۱۵/۱ ^f	۱۵	۰/۵
۸۴/۵	۴۳/۳±۴/۵ ^m	۸۹/۰۳	۸۳۳/۳±۶۶/۶ ^m	۷۵/۴۷	۸۶۳۳۳/۳±۸۰۸۲/۹ ^g	۲۰	۰/۵
۷۴/۶۴		۸۳/۶۱		۴۵/۳۷		میانگین (نمونه ۶ الی ۱۰)	
-۸۰/۷۶	۵۰۸/۳±۱۲/۶ ^a	-۲۶/۴	۹۶۰/۶±۳۰/۵ ^a	۵۳/۶	۱۶۵۰۰±۱۵۰۰۰ ^d	۰	۱
-۲۸/۹۳	۳۶۳±۹/۸ ^b	۳۶/۳۶	۴۸۳۶/۶±۷۷/۷ ^c	۷۲/۴	۹۷۰۰±۱۳۵۲۷/۷ ^g	۵	۱
۱۰/۶	۲۵۱/۳±۱۰/۲ ^d	۴۶/۵۳	۴۰۶۳/۳±۱۰۰/۱ ^d	۸۲/۳	۶۱۶۶۶/۶±۱۸۱۳۲/۹ ^h	۱۰	۱
۳۴/۸۳	۱۸۳/۳±۶/۶ ^f	۵۵/۳۷	۳۳۹۰±۴۵/۸ ^g	۹۰/۰۶	۳۵۰۰±۹۵۳۹/۴ ⁱ	۱۵	۱
۵۳/۱	۱۳۲±۱۰/۶ ^{hi}	۶۳/۰۳	۲۸۰۸/۳±۱۴۴/۶ ^h	۹۳/۹۷	۲۱۶۰۰±۴۶۱۳ ^j	۲۰	۱
-۲/۲۳		۳۴/۹۸		۷۸/۴۷	۳۵۶۰۰±۳۱۷۴۹ ^a	میانگین (نمونه ۱۱ الی ۱۵)	
۳۶/۲۷		۵۹/۲۹		۶۱/۹۲	۲۲۶۶۶۶±۱۲۵۸۳ ^c	میانگین (نمونه ۶ الی ۱۵)	
۳۲/۸۳۳		۵۳/۸		۵۹/۱۱	۱۲۶۳۳۳/۳±۱۵۱۷۶۷ ^{ef}	میانگین (نمونه ۱ الی ۱۵)	

† مقادیر ذکر شده میانگین حاصل از ۳ تکرار هستند. ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,k,l,m} مقادیر دارای حروف متفاوت دانکن باهم تفاوت معنی دار (P<۰/۰۵) دارند.

بحث و نتیجه گیری

آسپیرژیلوس فلاووس ۴/۶٪ افزایش داشت که این امر می تواند به دلیل نقش کلسیم در بهبود متابولیسم و تأمین کلسیم مورد نیاز باشد (Viquez et al., 1994) اما در غلظت ۱٪ کاهش ۵۳/۶٪ (در مقایسه با نمونه شاهد) مشاهده شد. به نظر می رسد این کاهش به دلیل افزایش غلظت یون های کلسیم در سیتوسل ها باشد که برای قارچ ها سمی است. به طور مثال برای جلوگیری از رشد

در خصوص تأثیر اکسید کلسیم و پرتو دهی بر رشد کپک آسپیرژیلوس فلاووس مشخص شد که تأثیر اکسید کلسیم بر مقادیر کپک آسپیرژیلوس فلاووس با توجه به میزان مقدار افزوده شده آن متفاوت است. بدین ترتیب که در نمونه فاقد پرتو دهی دارای ۰/۵ درصد اکسید کلسیم در مقایسه با نمونه شاهد جمعیت کپک

باعث افزایش و هم باعث کاهش سم AFB₁ گردید. بدین ترتیب که در نمونه فاقد پرتودهی دارای ۰/۵ درصد اکسیدکلسیم در مقایسه با نمونه فاقد اکسیدکلسیم، غلظت سم آفلاتوکسین B₁ ۷۲/۱٪ کاهش یافت ولی در غلظت ۱٪ اکسیدکلسیم غلظت سم AFB₁ به میزان ۲۶/۴٪ افزایش می‌یابد. از طرفی مشخص شده است که در نمونه پرتودهی نشده حاوی ۰/۵٪ اکسیدکلسیم، با وجود بیشترین جمعیت کپک آسپرژیلوس فلاووس، کمترین غلظت سم AFB₁ مشاهده می‌شود ولی در غلظت ۱٪ اکسیدکلسیم جمعیت کپک آسپرژیلوس فلاووس کاهش یافته، غلظت سم AFB₁ بیشتر (۲۶/۴٪) می‌شود. به نظر می‌رسد افزایش غلظت اکسیدکلسیم به سطح ۱٪ منجر به تغییر فاز رشد کپک از مرحله لگاریتمی به مرحله سکون و در نتیجه تولید متابولیک‌های ثانویه از جمله تولید سم AFB₁ می‌گردد (Jay et al., 2005). اهمیت ترکیب کلسیم-کالمودولین (Calmodulin-Ca²⁺) و نقش آن در فسفرزایی یا فسفرزدایی پروتئین‌ها (phosphorylation/dephosphorylation) برای تولید آفلاتوکسین توسط کپک آسپرژیلوس پارازیتیکوس گزارش شده است (Jayashree et al., 2000).

مشابه تأثیر اکسیدکلسیم، پرتودهی بر مقادیر AFB₁، تأثیر بسیار معنی‌داری داشت به طوری که با افزایش شدت پرتودهی میزان سم AFB₁ کاهش می‌یابد. تجزیه آفلاتوکسین توسط اشعه گاما در نتیجه اثرات غیرمستقیم رادیکال‌های آزاد شده توسط رادیولیز آب یا دیگر ترکیبات است که این رادیکال‌ها به سادگی به حلقه فوران انتهایی AFB₁ حمله می‌نمایند که منجر به کاهش

کپک بوتریتیس سینرا (Botrytis cinerea) میزان ۳۰۰ ppm کلرید کلسیم کافی است (Boumaaza et al., 2015).

هم‌چنین در خصوص فرایند پرتودهی، با افزایش شدت پرتودهی جمعیت کپک کاهش یافت به طوری که در هر سطح از اکسیدکلسیم بیشترین درصد کاهش جمعیت کپک در شدت پرتوی ۲۰ کیلوگری مشاهده گردید. تحقیقات مختلف نتایج متفاوتی را بر اساس درصد کاهش جمعیت و شدت دز پرتو در نمونه‌های غذایی گزارش نموده‌اند. در تحقیق آکوینو حساسیت کپک آسپرژیلوس فلاووس بسیار بیشتر از تحقیق ما بود به طوری که کاهش جمعیت کپک به میزان بیش از ۹۹٪ در نمونه‌های پرتو تابی شده ذرت در دز ۱۰ کیلوگری اتفاق افتاد (Aquino et al., 2005). نصف این مقدار دز پرتودهی (۵ کیلوگری) باعث جلوگیری از اسپورزایی، جوانه زدن و رشد آسپرژیلوس فلاووس در نمونه‌های ذرت و خوراک دام گردید (Markov et al., 2015). در تحقیق حامد و البازا، D_{value} آسپرژیلوس فلاووس را در نمونه‌های بافر سالین و شاه ماهی دودی شده به ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۵ کیلوگری گزارش نمودند (Hammad and El-Bazza, 1988) که بسیار کمتر از نتایج ما (حدود ۲۰ کیلوگری) بود. به نظر می‌رسد علاوه بر شدت پرتو، عوامل دیگری از قبیل جمعیت اولیه کپک، شرایط محیط کشت، حضور ترکیبات کی‌لیت‌کننده یا تولید آن‌ها توسط کپک در مقاومت کپک به پرتوگاما نقش دارند.

در خصوص بررسی تأثیر اکسیدکلسیم و پرتودهی بر تولید سم آفلاتوکسین B₁ نقش متفاوت اکسیدکلسیم بر مقادیر تولید سم آفلاتوکسین B₁ مشهود بود زیرا که هم

منجر به تغییرات نامطلوب طعمی در فراورده گردید (Abbas *et al.*, 1988).

در بررسی تأثیر اکسید کلسیم و پرتو دهی بر تولید سم آفلاتوکسین B₂ تأثیر متفاوت اکسید کلسیم بر تولید AFB₂ مشخص گردید. در حالی که غلظت ۰/۵٪ آن به تنهایی منجر به کاهش ۰/۵٪ AFB₂ شد اما در غلظت ۱٪ آن، افزایش ۸۰/۷۶٪ AFB₂ مشاهده گردید. در این خصوص گزارش های متفاوتی ارائه شده است. در حالی که نقش ضعیف کلسیم در تولید آفلاتوکسین توسط برخی از محققان گزارش شده است (Rao and Subramanyam, 1999; Tulpule, 1969)، تحقیق دیگری مشخص نمود که فقدان کلسیم منجر به کاهش تولید آفلاتوکسین شده است (Maggon *et al.*, 1977). علت این تفاوت ها می تواند به نوع کپک، نوع محیط کشت، شرایط محیطی رشد (Jay *et al.*, 2005) ارتباط داشته باشد.

در این تحقیق نقش پرتو دهی در کاهش AFB₂ بسیار مشهود بود. به طوری که با افزایش شدت پرتو دهی مقادیر AFB₂ کاهش یافت. بیشترین مقدار کاهش AFB₂ در نمونه های فاقد کلسیم حاوی ۲۰ کیلوگرمی به میزان ۴۹/۴۳٪ بوده است که بیانگر مقاومت این سم به پرتو است. برخلاف این نتایج، گزارشات سایر محققان با تأکید بر تخریب کامل AFB₂ با شدت ۱۰ کیلوگرمی در نمونه های ذرت (Aquino *et al.*, 2005) (با غلظت اولیه ۵۷۱/۱ ppb) و دانه های نیلوفر آبی (Bhat R *et al.*, 2010) بوده است در حالی که برای از بین بردن کامل سموم آفلاتوکسین آرد بادام تنها ۱/۵ کیلوگرمی پرتو لازم بود (Lanza *et al.*, 2013).

فعالیت زیستی آن می گردد (Rustom, 1997). میزان میانگین تخریب AFB₁ در این تحقیق (با میزان غلظت اولیه ۷۶۰۰ ppb) در دز ۵ و ۱۰ کیلوگرمی به ترتیب ۵۶/۰۴٪ و ۶۲/۰۶٪ بود (داده ها نشان داده نشده است). این نتایج نزدیک به نتایج حاصل از تخریب AFB₁ (با میزان غلظت اولیه ۵۰ ppb) در نمونه های خوراک دام و ذرت پرتو دهی شده بود که تخریب ۶۰٪ و ۸۵٪ به ترتیب در دز ۵ و ۱۰ کیلوگرمی را گزارش نمود (Markov *et al.*, 2015). در تحقیق دیگری دز ۱۰ کیلوگرمی اشعه گاما باعث تخریب کامل AFB₁ (با میزان غلظت اولیه ۲۵۹۷ ppb) در دانه های ذرت گردید (Aquino *et al.*, 2005). علت مقاومت متفاوت AFB₁ حتی در نمونه های مشابه می تواند به غلظت اولیه سم، میزان رطوبت نمونه ها، محتوی چربی و پروتئین بسته به رقم محصول متفاوت باشد.

در خصوص نقش ترکیبی اکسید کلسیم و شدت پرتو، با در نظر داشتن این نکته که در نمونه های کنترل حداکثر اثر تخریبی پرتو دهی با ۲۰ کیلوگرمی روی AFB₁ به میزان ۵۶/۸۳٪ است. این میزان در غلظت ۰/۵ درصد اکسید کلسیم به بیشترین میزان افت (۸۹/۰۳٪) می رسد. این در حالی است که در غلظت ۱٪ آن، این ترکیب نه تنها نقش کمکی برای پرتو دهی نداشته بلکه ممانعت کننده نیز بود. مشابه غلظت ۰/۵ درصد اکسید کلسیم در این تحقیق غلظت ۲٪ اکسید کلسیم (محلول هیدروکسید کلسیم) به همراه حرارت در فراوری ذرت به کار گرفته شد که نتایج حاکی از کاهش ۴۰٪ AFB₁ بود و افزایش غلظت اکسید کلسیم نه تنها کاهش قابل ملاحظه ای در غلظت سم ایجاد نکرد بلکه

مختلف پرتودهی تیمار شدند با وجود افزایش اندک رشد کپک، افت AFB_1 و AFB_2 بسیار بالاتری داشت؛ اما با توجه به حضور غلظت اولیه بالای سموم و آلودگی شدید دانه‌های ذرت، بازهم باقی‌مانده سموم بسیار بیشتر از حد مجاز یاد شده استاندارد اتحادیه اروپا (حداکثر غلظت AFB_1 ۲ ppb و مجموع غلظت آفلاتوکسین‌ها ۵ ppb) است (EU, 2006). لذا کارایی این دو مکانیسم در مراحل آلودگی شدید به‌منظور سم‌زدایی دانه‌های ذرت کافی نمی‌باشد. لذا با توجه به این‌که حد مجاز پرتوی جذب شده برای مواد غذایی حداکثر ۱۰ کیلوگرم است (CODEX, 2003)، لذا در پایان پیشنهاد می‌شود اضافه نمودن ۰/۵٪ اکسیدکلسیم به دانه‌های ذرت قبل ذخیره‌سازی (به‌منظور کنترل تولید سموم AFB_1 و AFB_2) و اعمال پرتودهی گاما با شدت ۱۰ کیلوگرم پس از ذخیره‌سازی و قبل از رسیدن به مراحل آلودگی شدید (به‌منظور از بین بردن کپک/آسپرژیلوس فلاووس و تخریب سموم آن) می‌تواند مناسب باشد.

سپاسگزاری

مؤلفان بر خود وظیفه می‌دانند از مجموعه دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر در استان گلستان که امکانات دستگاهی و مواد آزمایشگاهی را در اختیار اینجانبان قرار داده و هم‌چنین کارکنان سازمان انرژی اتمی ایران و متخصصین آزمایشگاه فاروق تهران در بخش آنالیز سموم، کمال سپاس و قدردانی را داشته باشند.

یکی از اهداف این تحقیق دانستن نقش اکسیدکلسیم در کاهش شدت پرتودهی بوده است که در آزمون آنالیز تجزیه واریانس، به‌روشنی افزایش تجزیه AFB_2 در غلظت ۰/۵٪ اکسیدکلسیم هم‌زمان با افزایش نرخ پرتودهی را نشان داد.

در این میان تنها غلظت ۰/۵٪ اکسیدکلسیم مؤثرتر از پرتودهی بود؛ زیرا درحالی‌که میانگین اثر تخریبی پرتودهی به‌تنهایی روی AFB_2 به میزان ۰/۲۶٪ است. این میزان در غلظت ۰/۵٪ اکسیدکلسیم به بیشترین میزان افت یعنی ۰/۷۴٪ و در غلظت ۱٪ اکسیدکلسیم بالعکس منجر به افزایش غلظت سم به میزان ۰/۲۳٪ می‌رسد. در تحقیقی غلظت ۲٪ اکسیدکلسیم (محلول هیدروکسید کلسیم) به همراه حرارت در فرآوری ذرت به کار گرفته شد که نتایج حاکی از کاهش ۰/۲۸٪ سم AFB_2 بود (Abbas et al., 1988).

سم‌زدایی از محصولات کشاورزی که تحت تأثیر آلودگی‌های کپکی قرار گرفته‌اند یکی از موضوعات مهم در بحث سلامت غذایی به شمار می‌آید؛ اما با وجود این‌که امروزه پرتودهی با اشعه گاما یکی از روش‌های مسلم در آلودگی زایی محصولات کشاورزی می‌باشد و حد مجاز پرتوی جذب شده برای مواد غذایی حداکثر ۱۰ کیلوگرم در نظر گرفته شده است (CODEX, 2003)، زیرا اثرات شدت‌های بالاتر پرتو، می‌تواند تأثیرات نامطلوبی در ماده غذایی برجا بگذارد. در این تحقیق مشخص شد که اکسیدکلسیم در کمک به فرایند پرتودهی در آلودگی‌زدایی دانه‌های ذرت تأثیر بسزایی دارد و این ترکیب در غلظت ۰/۵٪ در مقایسه با تمامی نمونه‌های شاهد بدون اکسیدکلسیم که با شدت‌های

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله عدم تعارض منافع خود را از چاپ این مقاله اعلام می‌دارند.

منابع

- Abbas, H.K., Mirocha, C., Rosiles, R. and Carvajal, M. (1988). Effect of tortilla-preparation process on aflatoxins B1 and B2 in corn. *Mycotoxin research*, 4(1): 33-36.
 - Al-Kuraieef, A.N., Alshawi, A.H. and Alsuhaibani, A.M. (2019). Effect of the combined action of potassium sorbate and irradiation on the quality-maintenance of strawberries. *Journal of food science and technology*, 56(7): 3374-3379.
 - Amézqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Lizarraga, T., Murillo-Arbizu, M. and De Cerain, A.L. (2008). A simple chemical method reduces ochratoxin A in contaminated cocoa shells. *Journal of food protection*, 71(7): 1422-1426.
 - Aquino, S., Ferreira, F., Ribeiro, D.H.B., Corrêa, B., Greiner, R. and Villavicencio, A.L.C.H. (2005). Evaluation of viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxins degradation in irradiated samples of maize. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(4): 352-356.
 - Bhat R, Sridhar K and Karim A. (2010). Microbial quality evaluation and effective decontamination of nutraceutically valued lotus seeds by electron beams and gamma irradiation *Radiation Physics and Chemistry* 76(9): 976-981.
 - Boumaaza, B., Benkhelifa, M. and Belkhouja, M. (2015). Effects of Two Salts Compounds on Mycelial Growth, Sporulation, and Spore Germination of Six Isolates of *Botrytis cinerea* in the Western North of Algeria. *International Journal of Microbiology*, Volume 2015 (Article ID 572626): 8.
 - Burgos-Hernandez, A., Lopez-Garcia, R., Njapau, H. and Park, D.L. (2001). Anti-mutagenic compounds from corn. *Food additives and contaminants*, 18(9): 797-809.
 - CODEX, S. (2003). STAN 106-1983 (Rev. 1–2003). General standard for irradiated foods. Rome: FAO/WHO Codex Alimentarius Commission.
 - Deberghes, P., Betbeder, A., Boisard, F., Blanc, R., Delaby, J., Krivobok, S., et al. (1995). Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. *Mycotoxin research*, 11(1): 37-47.
 - Elias-Orozco, R., Castellanos-Nava, A., Gaytan-Martinez, M., Figueroa-Cárdenas, J. and Loarca-Pina, G. (2002). Comparison of nixtamalization and extrusion processes for a reduction in aflatoxin content. *Food Additives & Contaminants*, 19(9): 878-885.
 - EU, C.r.o. 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (pp. 4-24): Official Journal of the European Union.
- Hammad, A. and El-Bazza, Z. (1988). Moulds contaminating smoked herring and their control by gamma irradiation. *Azerbaijan Journal of Microbiology*, 4: 10-18.
- Review of Human Carcinogens: Chemical Agents and Related Occupations, 9283213238 C.F.R. (2012).
 - International Organization for Standardization (ISO).(2003). Foodstuffs–determination of aflatoxin B1, and the total content of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereals, nuts and derived products–high-performance liquid chromatographic method: European Committee for Standardization Geneva. ISO. No. 16050 . [In persian]
 - International Organization for Standardization (ISO) (2008). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds: Part 2: Colony Count Technique in Products with Water Activity Less Than or Equal to 0.95. ISO. NO. 21527-2. [In persian]

- Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. (2005). Modern food microbiology 7th ed. In Heldman, D.R. (Ed.), *Chapter 30* (pp. 709-715). United state of America: Springer.
- Jayashree, T., Praveen Rao, J. and Subramanyam, C. (2000). Regulation of aflatoxin production by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphorylation and dephosphorylation. *FEMS microbiology letters*, 183(2): 215-219.
- King, J.M. and Prudente Jr, A.D. (2005). Chemical detoxification of aflatoxins in food and feeds. *Aflatoxin and Food Safety* (pp. 546-556): CRC Press.
- Lanza, C., Mazzaglia, A., Paladino, R., Auditore, L., Barnà, R. and Loria, D. (2013). Characterization of peeled and unpeeled almond (*Prunus amygdalus*) flour after electron beam processing. *Radiation Physics and Chemistry*, 86: 140-144.
- Maggon, K., Gupta, S. and Venkitasubramanian, T. (1977). Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriological Reviews*, 41(4): 822- 855.
- Markov, K., Mihaljević, B., Domijan, A.-M., Pleadin, J., Delaš, F. and Frece, J. (2015). Inactivation of aflatoxigenic fungi and the reduction of aflatoxin B1 in vitro and in situ using gamma irradiation. *Food control*, 54:79-85.
- Méndez-Albores, A., Martínez-Bustos, F., Gaytán-Martínez, M. and Moreno-Martínez, E. (2008). Effect of lactic and citric acid on the stability of B-aflatoxins in extrusion-cooked sorghum. *Letters in applied microbiology*, 47(1): 1-7.
- Nyandieka, H., Maina, J. and Nyamwange, C. (2009). Detoxification of aflatoxin in artificially contaminated maize crop by ammoniation procedures. *Discovery and Innovation*, 21(1): 77-79 .
- Pankaj, S., Shi, H. and Keener, K.M. (2018). A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. *Trends in Food Science & Technology*, 71: 73-83.
- Rao, J.P. and Subramanyam, C. (1999). Requirement of Ca^{2+} for aflatoxin production: inhibitory effect of Ca^{2+} channel blockers on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Letters in applied microbiology*, 28(1): 85-88.
- Refai, M., Aziz, N., El-Far, F. and Hassan, A. (1996). Detection of ochratoxin produced by *A. ochraceus* in feedstuffs and its control by γ radiation. *Applied Radiation and Isotopes*, 47(7): 617-621.
- Rustom, I.Y. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59(1): 57-67.
- Schaarschmidt, S. and Fauhl-Hassek, C. (2019). Mycotoxins during the Processes of Nixtamalization and Tortilla Production. *Toxins*, 11(4): 227-253.
- Siddhuraju, P., Makkar, H. and Becker, K. (2002). The effect of ionising radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. *Food Chemistry*, 78(2): 187-205.
- Tulpule, P. (1969). Aflatoxicosis. *Indian Journal of Medical Research*, 57(8 Suppl.): 102-114.
- Viquez, O.M., Castell-Perez, M.E., Shelby, R.A. and Brown, G. (1994). Aflatoxin contamination in corn samples due to environmental conditions, aflatoxin-producing strains, and nutrients in grain grown in Costa Rica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(11): 2551-2555.
- Waghmare, R.B. and Annature, U.S. (2018). Integrated effect of radiation processing and modified atmosphere packaging (MAP) on shelf life of fresh fig. *Journal of food science and technology*, 55(6): 1993-2002.
- Whitaker, T.B. (2003). Detecting mycotoxins in agricultural commodities. *Molecular Biotechnology*, 23(1): 61-71.



Effects of Calcium Oxide and Radiation on *Aspergillus flavus* Population and Aflatoxins Concentrations in Corn Grains

Baigane, E.¹, Fadavi, A.^{2*}, Kohsari, H.³

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran
2. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran
3. Assistant professor, Department of Basic Science, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

*Corresponding author: fadavi.ac.ir@gmail.com

(Received: 2019/11/8 Accepted: 2020/2/12)

Abstract

Aspergillus flavus is one of the hazardous fungi which appear in poor storage conditions. This mold produces dangerous toxins of aflatoxins in corn grains. Hence the investigation of the reduction possibility of its growth and toxins is important. In this research the effects of calcium oxide (0, %0.5 and %1) and gamma ray (0, 5, 10, 15 and 20 KGy) on growth of *Aspergillus flavus* and levels of aflatoxin B₁ (AFB₁), aflatoxin B₂ (AFB₂), aflatoxin G₁ (AFG₁) and aflatoxin G₂ (AFG₂) were investigated. Analysis of variance showed significant (P<0.05) effects of irradiation, calcium oxide and their interactions. *Aspergillus flavus* and AFB₁ and AFB₂ toxins decreased with increasing irradiation. Further reduction of AFB₁ and AFB₂ toxins was observed during accompaniment of 0.5% calcium oxide with irradiation. However, simultaneous application of 1% calcium oxide with radiation prevented and reduced more *Aspergillus flavus*. AFG₁ and AFG₂ toxins were not detected in any of the samples. Consequently, with considering 10 KGy standard food irradiation limits, it is recommended that 0.5% calcium oxide concentration before storage and irradiation intensity of 10 KGy after storage were applied to corn grains to control mold growth and production of aflatoxin toxins.

Conflict of interest: None declared.

Key words: Irradiation, calcium oxide, *Aspergillus flavus*, Aflatoxin, corn grains