Archive of SID

# اثر ضد آفلاتوکسین زایی عصاره آویشن شیرازی *(Zataria)multiflora* در مغز پسته پوشش یافته با کنسانتره پروتئینی آب پنیر ( WPC)

حمید توکلی پور[۱]*، مجید جوانمرد[۲]، لیلا زیرجانی[۳]

۱- عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار ، خراسان رضوی
۲- پژوهشکده شیمی و صنایع غذایی، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران
۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار
**(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۵)**

## چکیده

برای پوشش دهی خوراکی مغز پسته رقم اکبری دامغان از پلیمر طبیعی بر پایه کنسانتره پروتئین آب پنیر همراه با عصاره آویشن شیرازی ( *Zataria multiflora*) استفاده گردید. غلظت کمینه ممانعت کنندگی و غلظت کمینه کشندگی اسانس آویشن شیرازی بر علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس با بررسی مهار رشد قارچ در سطح محیط کشت از طریق تاثیر عصاره به طور مستقیم (روش چاهک) انجام شد. برای مطالعه تاثیر اسانس آویشن شیرازی بر روی آسپرژیلوس فلاووس در مغز پسته از مقادیر ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰، ۳۰۰۰، ۳۵۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۵۵۰۰ پی پی ام عصاره در ترکیب پوشش خوراکی مغز پسته استفاده شد و میزان مهار گسترش رشد دیسک تلقیح شده حاوی کشت نه روزه قارچ بر روی پسته های پوشش دیده اندازه گیری گردید.نتایج نشان داد که آسپرژیلوس فلاووس در غلظت های کمتر از ۴۰۰۰ پی پی ام عصاره الکلی آویشن شیرازی رشد نمود. افزایش میزان غلظت عصاره در پوشش منجر به کاهش معنی دار رشد قارچ تلقیح شده گردید. در ادامه میزان بازدارندگی غلظت های مختلف اسانس آویشن شیرازی در ترکیب پوشش مغز پسته بر روی تولید سموم آفلاتوکسین های $B_1$، $B_2$، $G_1$ و $G_2$ توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) بررسی و نتایج نشان داد که مقادیر بالاتر از ۴۰۰۰ ppm عصاره آویشن شیرازی در پوشش خوراکی کنسانتره پروتئینی آب پنیر باعث جلوگیری از تولید آفلاتوکسین در مغز پسته گردید.

**کلید واژگان:** آفلاتوکسین، آسپرژیلوس فلاووس، آویشن شیرازی، مغز پسته، پوشش خوراکی.

* مسئول مکاتبات: h.tavakolipour@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

## ۱- مقدمه

درخت پسته از گیاهان خانواده آناکاردیاسه است که در مناطق نیمه گرمسیری رشد می کند و کشت و کار آن در ایران سابقه تاریخی دارد. تولید جهانی پسته ۵۵۰۰۰۰ تن برآورد می شود که ایران با تولید ۳۰۰۰۰۰ تن در حال حاضر بزرگترین تولیدکننده پسته در جهان به شمار می رود [۱]. در سال ۱۳۷۶ خورشیدی که اتحادیه اروپا پسته 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 و پژوهش های دامنه داری در این زمینه توسط دانشگاهها و مراکز پژوهشی تعریف گردید. مغزهای خوراکی ممکن است در حین برداشت، حمل و نقل و فراوری 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 متابولیت های ثانویه از جمله مایکوتوکسین ها می گردد. آفلاتوکسین ها ترکیبات سمی از دسته مایکوتوکسین ها هستند که توسط قارچهایی مانند آسپرژیلوس فلاووس[1]، آ. پارازیتیکوس[2] و آ.نومییوس[3] تولید می‌شوند و باعث بروز بیماریهای خطرناکی در انسان مانند سرطان کبد می شود.

مجتهدی و همکاران گزارش کردند که برای آلودگی پسته به سم آفلاتوکسین در حین انبارمانی، حداقل رطوبت نسبی ۸۵٪ و دامنه درجه حرارت ۲۰ تا۲۷ درجه سانتی گراد لازم است. تحت این شرایط کمترین زمان لازم برای تولید سم بین ۷ تا ۱۰ روز بسته به دمای انبار است [۲]. احتمال آلودگی پسته به قارچهای آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس و تولید سم آفلاتوکسین درهنگامیکه پسته ها بر روی درخت هستند ممکن است در اثر آسیب های مختلف بویژه ناشی از پرندگان و نیزشرایط آب و هوایی منطقه کشت و به ویژه افزایش رطوبت نسبی هوا در هنگام برداشت باشد[۳]. برای جلوگیری از رشد قارچ و تولید سم روش های مختلفی ارائه شده است ولی یکی از از روشهای موثر می تواند استفاده از بسته بندی های بر پایه پوشش خوراکی و حاوی ترکیبات ضد میکربی برای نگهداری مغزها از جمله پسته باشد.

آب پنیر یکی از فرآورده های جانبی فرآورش و تولید پنیر محسوب می کردد که به عنوان یک فرآورده با ارزش کاربردهای زیادی در فن آوری غذایی و سایر صنایع پیدا کرده است ولی بخش قابل توجهی از آن دفع و به عنوان پساب موجب آلودگی محیط زیست می شود. افزایش مصرف اکسیژن زیستی (BOD) و سایر مشکلات زیست محیطی، فراوری یا دفع آب پنیر را به یکی از دغدغه های صنایع لبنیات تبدیل کرده است.از سوی دیگر دارا بودن مقادیر بالای پروتئین، مواد معدنی و سایر ریزمغذی ها، آب پنیر را در زمره یکی از با ارزش ترین ضایعات صنایع غذایی تبدیل نموده است. هرگونه استفاده از این ماده و استفاده از آن در صنایع غذایی و بسته بندی علاوه بر ایجاد ارزش افزوده مشکلات زیست محیطی ناشی از دفع آنرا نیز مرتفع می سازد. در سالهای اخیر امکان استفاده از پروتئین آب پنیر در ساخت پوشش های خوراکی موضوع پژوهشهای بسیاری بوده است.پایه فیلمهای خوراکی می تواند یکی از چهار ترکیب اصلی یعنی لیپیدها، رزین ها، پلی ساکارید ها و پروتئین ها باشد. انتخاب نهایی بر مبنای خواص بازدارندگی فیلم مانند نفوذ رطوبت، انتقال گازها به ویژه اکسیژن و نگهداری ترکیبات موجد طعم و بو در مواد غذایی انجام می گیرد. بسته بندی ضد میکربی[4] نوعی بسته بندی فعال[5] محسوب می شود که مدت زمان ماندگاری محصولات غذایی را افزایش و ایمنی مواد خوراکی را از نظر میکربی تامین می کند و باعث کاهش، مهار و یا به تعویق انداختن رشد میکرو ارگانیسم ها در مواد غذایی می گردد [۴ ].

گرایش فزاینده جهانی در راستای استفاده از ترکیبات طبیعی به جای نگهدارنده های شیمیایی موجب مطالعات زیادی در قلمرو گیاهان دارویی و جستجوی انواع عصاره‌ها و اسانس های گیاهی شده است. آویشن شیرازی از دیر باز در طب سنتی ایران برای درمان بیماریهای دستگاه تنفس و گوارشی، تسکین درد مفاصل و درمان سرماخوردگی و نیز به عنوان طعم دهنده مواد غذایی به ویژه ماست استفاده می شود. یکی از روشهای کنترل میکروارگانیسم های نامطلوب در مواد غذایی، افزودن ترکیبات ضد میکربی مانند عصاره های روغنی گیاهی[6]

1. Aspergillus flavus
2. Aspergillus parasiticus
3. Aspergillus nomius

4. Antimicrobial Packaging
5. Active Packaging
6. Essential oils

www.SID.ir

Archive of SID

در پلیمرهایی مثل کنسانتره پروتئینی آب پنیر است که در واقع به عنوان حامل مواد ضد میکربی عمل می نماید. سیدیم و ساریکوس اثرات ضد میکربی پوشش ایزوله پروتئینی آب پنیر همراه با اسانس های پونه، رزماری و سیر را بر روی میکروارگانیسمهای مختلف مانند سالمونلا و لیستریا مو نو سیتوژنز بررسی نمودند [۶].

محققین تاثیر ضد میکربی پوشش خوراکی بر پایه آب پنیر را برای مغز پسته در برابر رشد آسپرژیلوس فلاووس و نیز تاثیر ضد میکربی فیلمهای خوراکی بر پایه کیتوزان محتوی اسانس های آویشن و میخک را بر روی پنج باکتری گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند[ ۷و۶]. پژوهشهای متعددی نیز برای بررسی اثرات ضد میکربی اسانس آویشن شیرازی انجام یافته است که در ادامه به برخی از آنها اشاره می شود. گندمی نصرآبادی وهمکاران به بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی روی آسپرژیلوس فلاووس پرداختند. نتایج حاصل از این بررسی بیانگر اثرات بازدارندگی این اسانس روی کپک ها بوده و این اسانس را به عنوان جایگزینی به جای نگهدارنده های شیمیایی به صنعت غذایی معرفی می‌نماید [۸] . آخوند زاده بستی و همکاران به ترتیب احتمال رشد سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوک طلایی و باسیلوس سرئوس در محیط آبگوشت قلب و مغز متأثر از غلظتهای مختلف اسانس آویشن شیرازی را مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که درصد احتمال رشد باکتری های مورد آزمون با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی کاهش می یابد[ ۱۱و۱۰و۹]. در تحقیقی دیگر آخوند زاده بستی و همکاران اثر اسانس آویشن شیرازی را بر روی میزان رشد استافیلوکوکوس اورئوس در سوپ تجارتی مورد بررسی قرار داد و نتایج حاکی از آن بود که اسانس گیاه آویشن شیرازی می تواند به عنوان یک نگه دارنده طبیعی در برخی مواد غذایی مد نظر قرار گیرد [۱۲]

علی رغم پژوهش های متعددی که درباره اثر بازدارندگی اسانس های گیاهی بر روی رشد میکروارگانیسم های مختلف در محیط های کشت یا بر روی مواد غذایی با یا بدون پوشش انجام گرفته است که در بالا به برخی از آنها اشاره شد ولی سابقه قبلی در ارتباط با اثر بازدارندگی اسانس های گیاهی در سیستم های غذایی پوشش یافته خوراکی در برابر تولید سموم آفلاتوکسین پیدا نگردید.

اهداف اصلی این پژوهش بررسی اثرات ضد قارچی پوشش کنسانتره پروتئینی آب پنیر و عصاره آویشن، ارزیابی تاثیر پوشش مذکور بر روی مغز پسته تلقیح داده شده با آسپرژیلوس فلاووس در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۹ روز ، بررسی و اندازه گیری توانایی تولید آفلاتوکسین در مغز پسته تلقیح شده با قارچ آسپرژیلوس فلاووس و پوشش داده شده با کنسانتره پروتئینی آب پنیر و عصاره آویشن شیرازی بودند.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- مواد

پستهٔ خشک با رطوبت در مبنای تر ۴٪ و دهان بسته رقم اکبری دامغان از بازار محلی دامغان خریداری گردید.علت انتخاب پسته های دهان بسته اطمینان از عدم آلودگی قبلی پسته به قارچهای مولّد آفلاتوکسین بود. کنسانتره پروتئینی ۸۵٪ آب پنیر از شرکت آرلا فودز دانمارک،گلیسرول ۸۷٪ از شرکت مرک آلمان، محیط های کشت SDA و SDB از شرکت HEMEDIA (M063, RM027-500G)، اتانول ۹۶٪ از شرکت بیدستان، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)مورد نیاز از گروه گیاهان دارویی پژوهشکده صنایع شیمیایی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و قارچ آسپرژیلوس فلاووس (PTCC5006) از مرکز کلکسیون قارچ های سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری گردید.

### ۲-۲- تجهیزات

دستگاههای مورد استفاده شامل انکو باتور لرزشی مدل 4330 INNOVA ساخت ایالات متحده آمریکا ، اتو کلاو مدل SANYO LABO ساخت ژاپن، هود بیولوژیک مدل BEASAT BSC 126 ساخت ایران، تبخیر کننده 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 عالی (HPLC) مدل واترز مجهز به آشکارساز فلورسانس، ساخت ایالات متحده آمریکا.

www.SID.ir

Archive of SID

## ۲-۳- روشها

### ۲-۳-۱- ساخت پوشش خوراکی

ابتدا یک محلول ۱۰٪ از کنسانتره پروتئین آب پنیر در آب مقطر تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد تا پروتئین های آن دناتوره شوند و سپس تا دمای اتاق خنک و بوسیله سود ۱ نرمال pH آن روی ۷ تنظیم گردید. پس از آن گلیسرول به محلول پوشش به گونه ای اضافه شد که نسبت گلیسرول به پروتئین برابر ۰/۶ (وزنی/وزنی) باشد. برای بررسی اثر بازدارندگی عصاره آویشن شیرازی در مغز پسته، تیمارهایی از امولسیون پوشش خوراکی ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰، ۳۰۰۰، ۳۵۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۵۵۰۰ پی پی ام از عصاره الکلی آویشن شیرازی با غلظت ۴۸٪ تهیه شدند. مغزهای پسته که به مدت ۲۴ ساعت تحت پرتو فرابنفش سترون شده بودند به مدت ۳۰ ثانیه در امولسیون پوشش خوراکی فروبری و سپس به مدت ۱۰ ثانیه در آون ۶۰ درجه سانتیگراد برای تثبیت پوشش قرار داده شدند [۶]. مغز پسته بدون پوشش و مغز پسته پوشش یافته ولی فاقد عصاره آویشن شیرازی گروه های شاهد را تشکیل می دهند.

### ۲-۳-۲- استخراج اسانس

برای تهیه عصاره الکلی، آویشن شیرازی با آسیاب پودر و سپس به نسبت ۱ به ۶ با حلال الکلی مخلوط شد. حلال مورد استفاده مخلوطی از اتا نول ۹۶٪ وآب مقطر به نسبت ۷۵٪ الکل انتخاب شد. فرایند استخراج به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم ارتعاشی در دمای $45^{\circ}C$ انجام و سپس با استفاده از فیلتر خلاء عصاره حاصل صاف گردید. عصاره رقیق به دست آمده برای تغلیظ به یک تبخیر کننده گردان تحت خلا فرستاده شد تا حلال(الکل) آن جدا گردد و در نهایت اسانس حاصل را مجدداً با حلال الکلی مخلوط کرده تا عصاره الکلی آویشن شیرازی با غلظت ۴۸٪ حاصل شود و تا انجام آزمایشات بعدی در یخچال نگهداری شد[۱۳].

### ۲-۳-۳- کشت میکربی

پس از تهیه محلول پوشش ضد میکروبی و پوشش دادن مغز پسته با آن و خشک کردن نمونه ها در رطوبت و دمای مناسب ، مغز های پسته در پلیت های استریل با قطر۹۰ میلی متر گذاشته و در زیر هود بیولوژیک 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 میلی متر است از کشت ۷ روزه تهیه شده از آسپرژیلوس فلاووس دایره های ۵ میلی متری تهیه کرده و در مرکز هندسی پلیتی که پسته‌ها در آن قرار دارند و قبلا با خط کش مشخص شده گذاشته می شود. بعد از اتمام کلیه مراحل، پلیت هایی که حاوی پسته‌ها و قارچ آسپرژیلوس فلاووس است در کیسه های پلاستیکی زیپ دار قرار داده می شود.

قارچ آسپرژیلوس فلاووس پس از تطبیق شرایط خود با محیط پس از سپری شدن یکروز و برحسب غلظت های مختلف عصاره شروع به رشد می‌نماید. توسط کولیس قطر پرگنه در هر روز اندازه گیری می شود، چون ممکن است رشد آسپرژیلوس فلاووس به شکل یک دایره کامل نباشد در دو جهت قائم و افقی، شعاع پرگنه قارچی را اندازه گیری کرده سپس حاصل جمع شعاع ها را از قطر آسپرژیلوس تلقیح شده اولیه که ۵ میلی متر است کم کرده و به صورت روزانه تا ۹ روز یادداشت می شود [۱۴].

مدل رشد میکربی قارچ آسپرژیلوس فلاووس با استفاده از روش‌های رگرسیون به دست آمد که می توان از آن برای محاسبه میزان روزانه رشد میکروب در غلظت های مختلف عصا ره الکلی آویشن شیرازی استفاده نمود. کلیه تیمارها در چهار تکرار انجام گرفت.

### ۲-۳-۴- اندازه گیری آفلاتوکسین

از نمونه‌هایی که عصاره از رشد قارچ آسپرژیلوس بر روی مغز پسته پوشش دیده با کنسانتره پروتئین آب پنیر جلوگیری کرده بود برای ارزیابی میزان آفلاتوکسین تولید شده جهت آزمون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد[۱۵].

سم آفلاتوکسین با استفاده از حلال متانول و آب (به نسبت ۸:۲ ) از نمونه ها استخراج و به کمک هگزان چربی آن جدا شد.سپس عصاره بدست آمده با حجم مشخصی از آب رقیق شده وعصاره رقیق شده از ستون های ایمونوافینیتی دارای آنتی بادی های ویژه آفلاتوکسین های گروه های B وG عبور داده شد. با عبور عصاره رقیق شده از ستون، سم موجود در عصاره (آنتی ژن) به آنتی بادی های درون ستون متصل می گردد . سم متصل شده به آنتی بادی در درون ستون توسط عبور متانول از داخل ستون، شسته می شود و درون ویال جمع آوری و با آب رقیق می گردد. تعیین مقدار با استفاده از روش فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا که مجهز به مشتق ساز پس ستون است انجام شد . مشتق ساز پس ستون،

www.SID.ir

Archive of SID

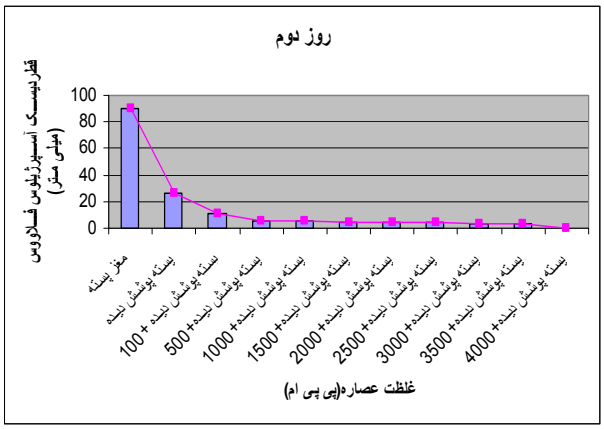
آفلاتوکسین های $B_1$ و $G_1$ را برمینه نموده و آنها را به ترتیب به دو ترکیب $B_2a$ و $G_2a$ تبدیل می کند که این دو ترکیب شدت فلورسانس بیشتری را نسبت به سموم $B_1$ و $G_1$ دارا بوده، لذا پیک هاقابل رویت می گردند .تعیین مقدار از مقایسه سطح زیر منحنی و یا ارتفاع منحنی های استاندارد با نمونه مجهول ، با احتساب ضریب رقت محاسبه می گردد.

## ۳- نتایج و بحث

نتایج رشد دیسک آسپرژیلوس فلاووس پس از هر ۲۴ ساعت تا زمانی که به رشد کامل خود برسند و همه فضای پلیت را پر کنند در طی نه روز پس از تلقیح بررسی شد که برای اجتناب از افزایش حجم مقاله فقط روزهای زوج ارائه شده اند.

### ۳-۱- روز دوم پس از تلقیح

نتایج نشان داد که تیمار بدون پوشش و بدون عصاره (مغزپسته) نسبت به سایر تیمارها دارای افزایش معنی داری در قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس در هر دو سطح مورد آزمون ($p\leq$ ۰/۰۱) و ($p\leq$ ۰/۰۵) بوده است. در صورتیکه با اعمال پوشش و همینطور افزودن عصاره ضد میکروبی آویشن شیرازی میزان قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس تلقیحی بصورت معناداری تا سطح ۵۰۰ قسمت در میلیون کاهش می یابد. بین غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ قسمت در میلیون هم اختلاف معناداری در کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس در روز دوم ملاحظه نگردیده است. از غلظت ۱۰۰۰ تا ۳۵۰۰ قسمت در میلیون عصاره الکلی آویشن شیرازی که در مغز پسته پوشش دیده است نیز اختلاف معناداری در کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس در این روز از خود نشان نداده اند.همانطور که در شکل ۱ دیده می شود، غلظت ۴۰۰۰ قسمت در میلیون عصاره الکلی آویشن شیرازی نسبت به کلیه تیمارها دارای اثر معناداری در مهار رشد دیسک آسپرژیلوس فلاووس بوده است(شکل ۱).




**شکل ۱** اثر عصاره الکلی آویشن شیرازی روی رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس تلقیح شده در پلیت های استریل پسته

### ۳-۲- روز چهارم پس از تلقیح

بین تیمارهای مغز پسته، پسته پوشش داده بدون عصاره و پسته‌های پوشش داده که حاوی ۱۰۰ تا ۵۰۰ قسمت در میلیون عصاره الکلی آویشن شیرازی تفاوت معنی داری در هر دو سطح ($p\leq$ ۰/۰۱) و ($p\leq$ ۰/۰۵) در کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس وجود ندارد، اما بین غلظت ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ قسمت در میلیون عصاره الکلی آویشن شیرازی کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس در هر دو سطح ($p\leq$ ۰/۰۱) و ($p\leq$ ۰/۰۵) تفاوت معنادار است، ولی در بین غلظت های ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ قسمت در میلیون عصاره الکلی آویشن شیرازی نیز تفاوت معناداری در کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس مشاهده نمی شود. همین شرایط نیز بین غلظت ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ قسمت در میلیون عصاره الکلی آویشن شیرازی وجود دارد. اما در سطح ($p\leq$ ۰/۰۵) کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس بین غلظت ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ قسمت در میلیون معنی‌دار شده است. اما در سطح ($p\leq$ ۰/۰۱) کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس بین غلظت ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ قسمت در میلیون معنی دار نیست. اما بین غلظت های ۲۵۰۰ تا ۴۰۰۰ قسمت در میلیون کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس با افزایش غلظت عصاره الکلی آویشن شیرازی معنی دار شده است و به تدریج کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس با افزایش غلظت عصاره کاهش می یابد. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در غلظت ۴۰۰۰ قسمت در میلیون عصاره در پوشش پروتئینی که از کنساتره پروتئین آب پنیر است هیچ رشدی صورت نگرفته است.

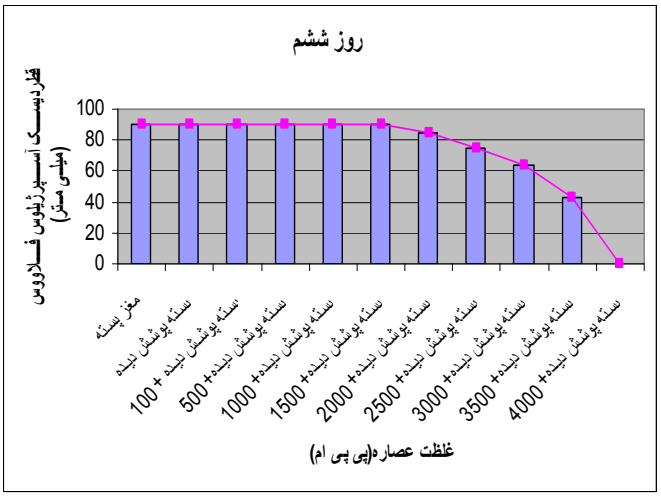
www.SID.ir

Archive of SID

**شکل ۲** اثر عصاره الکلی آویشن شیرازی روی رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس تلقیح شده در پلیت های استریل پسته

## ۳-۳- روز ششم پس از تلقیح

بین مغز پسته و پسته پوشش داده که حاوی ۱۵۰۰ عصاره الکلی آویشن شیرازی است تفاوت معناداری در کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس در هر دو سطح ($p \leq ۰/۰۱$) و ($p \leq ۰/۰۵$) وجود ندارد. اما از غلظت ۱۵۰۰ تا ۴۰۰۰ قسمت در میلیون با افزایش غلظت عصاره الکلی آویشن شیرازی کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس در هر دو سطح ($p \leq ۰/۰۱$) و ($p \leq ۰/۰۵$) به‌طور معناداری کاهش یافته است (شکل ۳).




**شکل ۳** اثر عصاره الکلی آویشن شیرازی روی رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس تلقیح شده در پلیت های استریل پسته

## ۳-۴- روز هشتم پس از تلقیح

بین تیمارهای مغز پسته تا پسته پوشش داده که حاوی ۳۰۰۰ قسمت در میلیون عصاره الکلی آویشن شیرازی است در هر دو سطح($p \leq ۰/۰۱$) و ($p \leq ۰/۰۵$) تفاوت معنی داری در کاهش قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس دیده نشده است اما بین غلظت ۳۰۰۰ تا ۴۰۰۰ پی پی ام عصاره الکلی آویشن شیرازی با افزایش غلظت عصاره قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس به‌طور معناداری کاهش یافته است، به‌طوری که در تیمارپسته پوشش داده که ۴۰۰۰ قسمت در میلیون عصاره الکلی آویشن شیرازی وجود دارد هنوز هیچ گونه رشدی دیده نشده است که این نشاندهنده اثر ضد میکروبی (ضد قارچی) عصاره آویشن شیرازی در این غلظت بر قارچ آسپرژیلوس فلاووس در پوشش خوراکی مغز پسته است(شکل ۴).

**شکل ۴** اثر عصاره الکلی آویشن شیرازی روی رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس تلقیح شده در پلیت های استریل پسته

## ۳-۵- مدل رشد میکروبی

در مدل های رشد میکروبی که به شکل معادلات ریاضی است، غلظت عصاره الکلی آویشن شیرازی یا (x)، به عنوان متغیر مستقل بوده و قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس هم به عنوان متغیر وابسته ( y ) می‌باشد. با قراردادن مقادیر مختلف غلظت عصاره الکلی آویشن شیرازی می توان قطر دیسک آسپرژیلوس فلاووس را در هر روز محاسبه کرد . قابل ذکر است که تا روز ششم رشد قارچ از روند خاصی برخوردار بوده است که در جدول ۱ مدل ریاضی پیشنهادی که از رگرسیون داده ها توسط نرم افزار SPSS Ver.11 به دست آمده ارائه شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

**جدول ۱** مدل های رشد قارچ آسپرژیلوس بر روی پسته‌ها تا روز ششم

| روز | مدل | ضریب همبستگی |
|---|---|---|
| روز دوم | $y = 28.198 - 3.235\ LN(x)$ | 0.96 |
| روز سوم | $y = 101.805 - 10.637\ LN(x)$ | 0.93 |
| روز چهارم | $y = 94.571\ (e^{-0.0004x})$ | 0.94 |
| روز پنجم | $y = 90.806 + 0.0023\ x - 0.000006\ x^2$ | 0.98 |
| روز ششم | $y = 89.82 + 0.0009\ x - 0.0000013\ x^2$ | 0.99 |

## ۳-۶- تاثیر عصاره‌آویشن شیرازی بر مهار آفلاتوکسین در مغز پسته

نتایج آزمون اندازه گیری آفلاتوکسین بوسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با راندمان عالی (HPLC) در نمونه شاهد و نمونه‌هایی که از عصاره آویشن شیرازی در فرمولاسیون پوشش خوراکی آنها استفاده شده بود، در جدول ۲ ارائه شده است.

**جدول ۲** مقادیر آفلاتوکسین کل (AFT) و $B_1$ (AFB1) در مغز پسته پوشش یافته با کنسانتره پروتئینی آب پنیر (WPC) و غلظت های مختلف اسانس آویشن شیرازی

| غلظت عصاره آویشن شیرازی (ppm) | آفلاتوکسین کل (ppb) AFT | آفلاتوکسین B1 (ppb) AFB1 |
|---|---|---|
| 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 | ۰ | ۰ |
| ۵۵۰۰ | ۰ | ۰ |

همانطور که از این جدول استنباط می شود تا غلظت عصاره آویشن ۳۵۰۰ پی پی ام ، حداکثر حد مجاز آفلاتوکسین کل و نیز آفلاتوکسین $B_1$ 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 بالاتر از ۴۰۰۰ پی پی ام رشد قارچ و تولید سموم آفلاتوکسین متوقف شده است. پژوهشهای سایر محققین نیز نتایج فوق الذکر را تایید می کنند برای مثال در پژوهشی 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 برای بازدارندگی تولید آفلاتوکسین روشن است که غلظت عصاره گیاهی مورد نیاز بالاتر خواهد بود که با نتایج به دست آمده همخوانی دارد [۶]. 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 پائینتر است. برای مثال در یک تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس آویشن شیرازی بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط PDA، ۴۰۰ پی پی ام و حداقل غلظت کشندگی را معادل ۱۰۰۰ پی پی ام به دست آوردند که به مراتب کمتر از میزان به دست آمده در این پژوهش است[۸] . علی رغم جستجوهای 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.

## ۴- منابع


[1] Tavakolipour ,H. and Kalbasi Ashtari,A.2008.Estimation of moisture sorption isotherms in Kerman pistachio nuts. Journal of Food Process Engineering,31: 564-582.

[2] Mojtahedi, H. et al.1980. Store Relative Humidity at Rafsanjan and Study on Possibility of Pistachio Pollution to Aflatoxin after Harvest. Journal of Plant Disease 16:1-4.

[3] 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.

[4] Embuscado, M. E. and Huber, K. C.2009. Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer,416p.

[5] 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.


www.SID.ir

Archive of SID

[6] Javanmard,M. and Ramadan,I.2009.Use of edible film including Zataria multiflora on inhibiting of Aspergillus flavus growth in pistachio kernel. J. of Medicinal Plants,30: 61-70.
[7] Hosseini, M., Razavi,H. and Mosavi,M.2008.Physicomechanical and antimicrobial properties of edible film produced from chitosan including thyme and clove essences. Quarterly of Food Science and Technology,5:41-49.
[8] Gandomi Nasrabady,H. et al.2008. Effects of Zataria multiflora essence on Aspergillus flavus. J. of Medicinal Plants, 27:45-51.
[9] Akhondzadeh Basti,A. et al.2004.Effect of Zataria multiflora essence on S.aureus growth probability in heart and brain culture broth. J. of Medicinal Plants, 3(10):53-60.
[10] Akhondzadeh Basti,A. et al.2003.Effect of Zataria multiflora essence on S.thiphy murium growth probability in heart and brain culture broth. J. of Medicinal Plants, 3(9):85-92.
[11] Akhondzadeh Basti,A. et al.2005.Effect of Zataria multiflora essence on S.aureus growth probability in heart and brain culture broth. J. of Medicinal Plants, 4(16):48-55.
[12] Akhondzadeh Basti,A. et al.2007.Effect of Zataria multiflora essence on S.aureus growth probability in commercial soup. J. of Medicinal Plants, 6(22):91-98.
[13] Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey, J.B., Webby, R.F., Mitchell, K.A., Foo, L.Y. and Perry, N.B.2007.Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (Salvia officinalis) using ethanol – water mixtures. Food Chemistry, 101: 1417 - 1424.
[14] Bluma, R.V. and Etcheverry ,M.G.2007. Application of essential oils in maize grain: Impact on Aspergillus section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. Food Microbiology , 25 (2): 324 -334.
[15] Institute of standard and industrial research of Iran.2007. Food products - Determination of aflatoxin B1 and total aflatoxins using HPLC and immunoaffinity column – Test method,1st revision. ISIRI No.6872.

www.SID.ir

Archive of SID

# Antiaflatoxigenic activity of pistachio kernel coated by whey protein based edible film incorporated with zataria multiflura essential oil

**Tavakolipour, H .[1 *], Javanmard, M. [2], Zirjany, L. [3]**

1-Assistant Professor of Food Process Engineering , Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar,Iran.
2-Iran Research Organization of Science and Technology (IROST), Chemical and Food Technology Department
3-Formerly MSc Student of Food Engineering, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar,Iran.
**(Received:89/5/18 Accepted:89/11/5)**

Pistachio kernel Akbari variety cultivated at damghan coated by whey protein based edible film incorporated with zataria multiflura essential oil. Minimum inhibition concentration and minimum lethal concentration of zataria multiflora essential oil against Aspergilus flavus were determined by inspection of mould growth inhibition on culture surface by direct method. Different concentrations 100,500,1000,1500,2000,2500,3000,3500,4000,5000 and 5500 ppm of zataria multiflura essential oil were used in edible coating composition of pistachio kernel for measuring extension inhibition of inoculated disk growth including nine days mould culture in coated pistachio. Results shown that in essential oil concentrations lower than 4000 ppm, A.flavus grown in samples. With increasing essential oil concentration, inoculated mould growth reduced significantly . Afterward inhibition of above mentioned concentrations of zataria multiflura essential oil in pistachio kernel coated by whey protein based edible film incorporated with different concentrations on production aflatoxins B1,B2,G1 and G2 were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) ,results shown that concentrations higher than 4000ppm could inhibited aflatoxin production in pistachio kernel.

**Keywords:** Aflatoxin , Aspergilus flavus, Zataria multiflora, Pistachio kernel, Edible film.

* Corresponding Author E-Mail address: h.tavakolipour@gmail.com

www.SID.ir