ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، میکروبیولوژیکی و تعیین میزان آفلاتوکسین نمونه‌های تخم خام هندوانه در استان خراسان رضوی در سال ۱۳۸۹

جواد فیضی[1*]، حامد رضا بهشتی[1]، غزال هرویان[1]، نیلوفر خوشبخت فهیم[1]

[1] آزمایشگاه کنترل کیفی تستا ، شهرک فناوری صنایع غذایی و بیوتکنولوژی شمال شرق کشور، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۱۰

چکیده

در این تحقیق ، میزان آفلاتوکسین، ویژگی های فیزیکوشیمیایی و میکروبیولوژیکی ۷۳ نمونه تخم خام هندوانه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ، نشان داد از مجموع ۷۳ نمونه، ۳۰ نمونه حاوی آفلاتوکسین B_1 با میانگین ۱۲/٤۳ نانوگرم بر گرم بود که از این تعداد ۱۳ نمونه ، دارای آفلاتوکسین بیش تر از حد مجاز پذیرفته شده توسط استاندارد ملی ایران می‌باشد. همچنین مشخص شد ٤۲/۸ و ٦۰ درصد از نمونه‌های مورد ارزیابی به ترتیب دارای مقدار اسیدیته و اندیس پروکسید بیش تر از ۱ (درصد وزنی بر حسب اسید اولئیک) و ۲ (میلی اکی‌والان در کیلوگرم) بودند. در ارزیابی میکروبیولوژیکی، ۱۰۰٪ نمونه‌های مورد ارزیابی از لحاظ شاخص کلی‌فرم و ٦۷٪ نمونه‌ها از لحاظ شاخص کپک در محدوده‌ای خارج از حد مجاز میکروبی اعلام شده توسط وزارت بهداشت و درمان قرار گرفتند. شاخص اشریشیاکلی نیز در ۸۹٪ نمونه‌ها مثبت ارزیابی گردید.

واژه‌های کلیدی: تخم خام هندوانه، میکروبیولوژی، فیزیکوشیمیایی، آفلاتوکسین، استان خراسان.

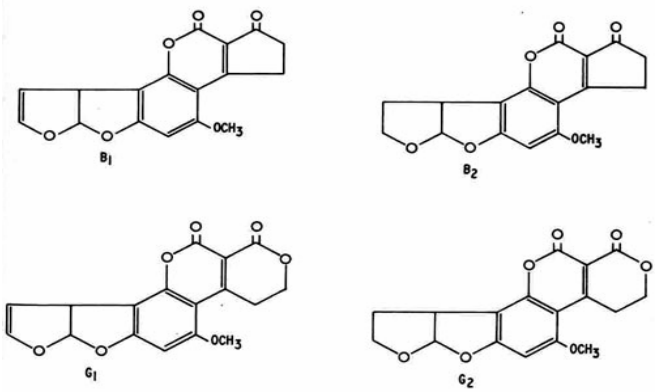
---

* مسوول مکاتبه : feizy.j@gmail.com

۱- مقدمه

تخم هندوانه (Colocynthis citrullus L.) ، یکی از دانه‌های غنی از پروتئین و چربی می‌باشد که به طور وسیعی در شرق آفریقا تولید و مصرف می‌شود (۱). در کشورهای آسیایی از جمله ایران، تخم هندوانه را بو داده و به عنوان تنقلات مصرف می‌کنند، حتی در برخی مناطق از آن در تهیه ی نان نیز استفاده می‌کنند. در هندوستان اغلب به عنوان جانشین مغز بادام و پسته در شیرینی‌ها و همچنین به عنوان چاشنی غذا کاربرد دارد (۱۸). روغن تخم هندوانه از نظر خواص شیمیایی شبیه به روغن بادام است (٤). از این محصول به عنوان یک منبع روغنی در کشور نیجریه استفاده می‌شود که شامل ۵۰٪ وزنی روغن، ۲۸/٤٪ وزنی پروتئین، ۲/۷٪ وزنی فیبر، ۳/٦٪ وزنی خاکستر و ۸/۲٪ وزنی کربوهیدرات می‌باشد (۱۹). از طرفی منبع خوبی از آمینو اسیدهای ضروری است (١٦). کائور[1] و همکاران (۱۹۸۸) نیز داده‌هایی در مورد ترکیب آمینواسید پروتئین تخم هندوانه‌های مصر و هندوستان گزارش کرده‌اند و این حقیقت مسلم است که ترکیب روغن دانه‌ها بستگی به شرایط آب و هوایی که میوه در آن پرورش می‌یابد دارد (۱۳ و ١٤).

تخم هندوانه در شرایط محیطی مساعد، از قبیل دما و رطوبت بالا، شدیداً مستعد آلودگی قارچی است. بعضی از این قارچ‌ها متابولیت‌های سمی خصوصاً آفلاتوکسین تولید می‌کنند. آسپرژیلوس فلاووس یکی از فراوان‌ترین کپک‌های شناخته شده است که تخم هندوانه را در هنگام برداشت آلوده می‌کند (۲). آفلاتوکسین تولیدی توسط سوش‌های آسپرژیلوس فلاووس[2] و آسپرژیلوس پارازیتیکوس[3] ایجاد سرطان کبد کرده و جهش‌زا هستند و از طرفی مرتبط با کاهش رشد و وزن و تغییر عملکرد سیستم ایمنی در کودکان افریقایی می‌باشد (۵). اوگانسانو[4] (۱۹۸۹) آلودگی نوعی محصول برشته شده در روغن تخم هندوانه (اسنک تخم هندوانه) جمع آوری شده از سوپرمارکت-ها را به آفلاتوکسین گزارش داد (۱۷). دیپروسیمو[5] و مالک[6] (۱۹۹٦) آلودگی برخی محموله‌های تخم هندوانه صادر شده از افریقا را گزارش دادند (۳). شکل (۱) ساختار شیمیایی آفلاتوکسین‌های گروه B و G را نشان می‌دهد.



شکل ۱- ساختار شیمیایی آفلاتوکسین ها های گروه B و G

به خاطر مقاوم به حرارت بودن و حلالیت در محیط‌های نسبتاً قطبی، حذف آفلاتوکسین از مواد غذایی مشکل است اگر چه تلاش‌های زیادی برای سم‌زدایی آفلاتوکسین به روش‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی انجام گرفته است. بنابراین ، ارزیابی تخم هندوانه خصوصاً در مبادی ورودی به عنوان یکی از مهم ترین نقاط کنترل می‌تواند نقش بسزایی در تامین سلامت مصرف کنندگان ایفا نماید.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- روش نمونه‌گیری

در تابستان سال ۱۳۸۹ تعداد ۷۳ نمونه تخم هندوانه از فروشگاه های سطح عرضه شهر مشهد هر کدام به وزن ۲-۳ کیلوگرم بر اساس روش نمونه‌گیری تصادفی ساده جمع آوری و در دمای پایین به آزمایشگاه منتقل شد.

۲-۲- مواد شیمیایی

متانول و استونیتریل با درجه ی خلوص کروماتوگرافی و محیط کشت های Dichloran Glycerol (DG18) Agar، Violet Red Bile Agar Base و Lauryl Sulfate broth از شرکت مرک مورد استفاده قرار گرفتند. استانداردهای آفلاتوکسین از شرکت سیگما تهیه گردید. سایر محیط کشت‌ها و دیگر مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه ی خلوص تجزیه-ای از شرکت‌های مرک و شارلو مورد استفاده قرار گرفتند.

1- Kaur
2-Aspergillus flavu
3-Aspergillus parasiticus
4- Ogunsanwo
5- Diprossimo
6- Malek

۲-۳- تجهیزات

در این تحقیق از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا از شرکت Sykam (آلمان) مجهز به پمپ دو پیستونی S1122 و ستون کروماتوگرافی Genesis C_{18} به طول ۲۵ سانتی متر، قطر داخلی ٤/٦ میلی متر و مواد پر شده ۵ میکرومتری استفاده شد. از آشکارساز فلورسانس RF-10AXL با طول موج تهییج ۳٦۵ و نشر ٤٤۵ نانومتر استفاده گردید. تنظیم دمای ستون با استفاده از آون ستون S4011 انجام گردید. مشتق سازی آفلاتوکسین با استفاده از محلول اشباع ید توسط پمپ ثانویه S11200 در قطعه ی T شکل و در دمای ۷۰ درجه ی سانتیگراد انجام گردید. جهت تهیه ی آب مقطر خلوص کروماتوگرافی از دستگاه آب مقطر SG استفاده گردید. آون و انکوباتورهای مورد استفاده از شرکت Memert تهیه گردیدند. اتوکلاو از شرکت Systec GmbH و کلنی‌کانتر از شرکت BZG30 تهیه گردید. اندازه‌گیری رطوبت با دستگاه مادون قرمز Sartorius MA 100 انجام گردید. از دستگاه روتاری هایدولف جهت تبخیر حلال استفاده گردید.

۲-٤- روش کار

۲-٤-۱- آزمون های میکروبیولوژیکی

شمارش کپک، شمارش کلی‌فرم و جست و جوی اشریشیاکلی به ترتیب بر اساس استانداردهای ملی ایرن به شماره‌های ۲- ۱۰۸۹۹، ۹۲٦۳، و ۲۹٤٦ انجام گردید (۹، ۱۰، ۱۱).

۲-٤-۲- اندازه‌گیری آفلاتوکسین

جهت آنالیز آفلاتوکسین از روش ارائه شده در استاندارد ملی ایران به شماره ی ٦۸۷۲ استفاده گردید (۸).

۲-٤-۳- آزمون‌های فیزیکوشیمیایی

اندازه گیری رطوبت، اسیدیته و پروکسید روغن استخراجی به ترتیب بر اساس استانداردهای ملی ایرن به شماره های ٦۷۲، ٤۱۷۸ و ٤۱۷۹ انجام گردید (٦ ، ۷ و ۱۲).

۲-٤-٤- تجزیه و تحلیل آماری

در این بررسی ، تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم افزار Excel انجام شد. جهت ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و اندازه‌گیری آفلاتوکسین، میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۵ با یکدیگر مقایسه شدند (P-Value<۰/۰۵).

۳- نتایج و بحث

نتایج کلی ارزیابی برخی از ویژگی‌های میکروبیولوژیکی، فیزیکوشیمیایی و میزان آفلاتوکسین نمونه‌های تخم خام هندوانه در این تحقیق ، به طور کلی بیانگر موارد ذیل می‌باشد:

۳-۱- ویژگی های میکروبیولوژیکی

در بررسی میکروبیولوژیکی، تخم‌های هندوانه از نظر اشریشیاکلی، شمارش کپک و کلی‌فرم مورد ارزیابی قرار گرفت. در شمارش تعداد کپک از مجموع ۷۳ نمونه، ٤۹ نمونه (٦۷٪) از حداکثر مجاز تعریف شده توسط وزارت بهداشت و درمان (۵۰۰ CFU/g) بیش تر بوده و آلودگی به اشریشیاکلی در ٦۵ نمونه (۸۹٪) که آلودگی به کلی‌فرم هم داشته‌اند مشاهده گردید. تمامی نمونه های مورد بررسی از نظر باکتری کلی فرم با حد مجاز اعلام شده توسط وزارت بهداشت و درمان (حداکثر مجاز CFU/g ۱۰۰) تطابق نداشتند. نتایج این بررسی در جدول ۱ نشان داده شده است .

۳-۲- ویژگی های فیزیکوشیمیایی

نتایج حاصل از آنالیز خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های تخم هندوانه در جدول ۲ نشان داده شده است.

۳-۳- اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها

در این مطالعه ، ۷۳ نمونه تخم هندوانه برای ارزیابی میزان آفلاتوکسین مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج این مطالعه از حیث آلودگی آفلاتوکسین در جدول ۳ نشان داده شده است.

متداول ترین تعریف کیفی پذیرفته شده برای حد تشخیص ، عبارت است از حداقل غلظت یا وزن آنالیت که می‌تواند با درجه ی اطمینان معلومی آشکارسازی شود. بر اساس روش ارائه شده توسط رودریگز و همکاران (۲۰) حد تشخیص آفلاتوکسین های B_1، B_2، G_1 و G_2 محاسبه گردید. همان طور که نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد حد تشخیص آفلاتوکسین های B_1، B_2، G_1 و G_2 به ترتیب ۰/۹۲، ۰/۱٤، ۰/۸۳ و ۰/۱٦ نانوگرم بر گرم می‌باشد.

جدول۱ - نتایج حاصل از آنالیز خصوصیات میکروبیولوژیکی نمونه‌های تخم هندوانه

شاخص آلودگی	تعداد نمونه	تعداد در محدوده ۰ -۵۰۰ CFU/g	تعداد در محدوده ۵۰۰-۱۰۰۰ CFU/g	تعداد در محدوده بیشتر از ۱۰۰۰ CFU/g	تعداد عدم تطابق	درصد عدم تطابق	حد مجاز اعلام شده توسط وزارت بهداشت و درمان (CFU/g)
کلی‌فرم	۷۳	۳	۲	٦۸	۷۳	۱۰۰	۱۰۰
کپک	۷۳	۲٤	۱٤	۳۵	٤۹	٦۷	۵۰۰
اشرشیاکلی	۷۳	تعداد نمونه های منفی		تعداد نمونه های مثبت		۸۹	منفی
		۸		٦۵			

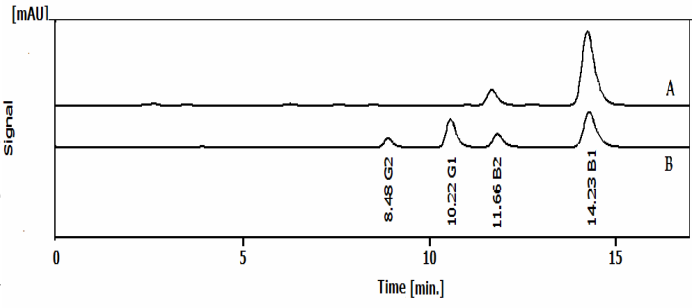
جدول ۲- نتایج حاصل از آنالیز خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های تخم هندوانه

نوع آزمون	تعداد نمونه	میانگین	میانه	کمینه	بیشینه	انحراف استاندارد
رطوبت (درصد وزنی)	۷۳	۷/۳۲	۷/۵۵	۰/٦۰	۱۲/۰٦	۱/۹۰
اسیدیته ی روغن استخراجی (درصد وزنی بر حسب اولئیک اسید)	۷۳	۱/۱۸	۰/۷۸	۰/۲٦	۳/۵۰	۰/۸٦
پروکسید روغن استخراجی (میلی اکی والان در کیلوگرم)	۷۳	۳/۹٤	۲/۷۹	۰/۲۳	۲۰	۳/۸۳

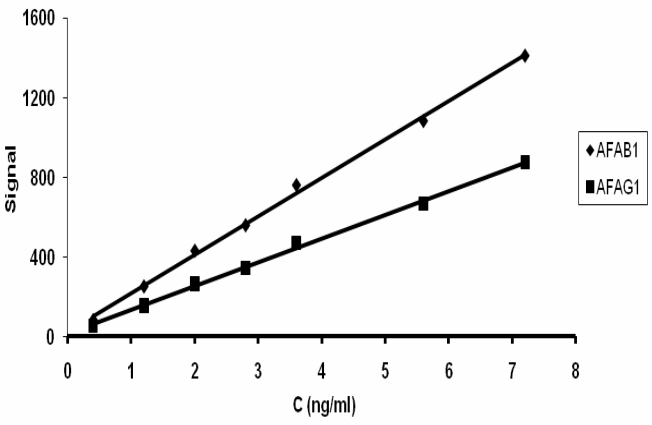
جدول ۳- نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین (نانوگرم بر گرم) نمونه‌های تخم هندوانه

آفلاتوکسین	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های غیر قابل تشخیص	تعداد نمونه های مثبت	میانگین	میانه	بیشینه	کمینه	انحراف استاندارد	حد تشخیص (نانوگرم بر گرم)
B_1	۷۳	٤۳	۳۰	۱۲/٤۳	۳/٦٦	۷۵/۱۰	۰/۹۳	۱۷/٦۱	۰/۹۲
B_2	۷۳	۵۱	۲۲	۲/۳۰	۰/۹۹	۲۰/۱	۰/۱۵	٤/۲٤	۰/۱٤
G_1	۷۳	٦۹	٤	۳/۷۵	۲/۹٤	۷/۵۲	۱/٦٤	۲/۵۸	۰/۸۳
G_2	۷۳	٦۹	٤	۰/٤۲	۰/٤۰	۰/٦۵	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۱٦

شکل ۲ ، کروماتوگرام مربوط به یک نمونه تخم هندوانه را که شامل آفلاتوکسین های B_2 و B_1 می‌باشد در مقایسه با کروماتوگرام استاندارد آفلاتوکسین با غلظت ۷/۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر نشان می‌دهد. ترتیب خروج آفلاتوکسین‌ها به صورت G_2، G_1، B_2 و B_1 می‌باشد که به ترتیب در زمان‌های ۸/٤۸، ۱۰/۲۲، ۱۱/٦٦ و ۱٤/۲۳ دقیقه می‌باشد. زمان بازداری پیک‌های آفلاتوکسین در نمونه ی تخم هندوانه با مقایسه آن با زمان بازداری پیک‌های استاندارد شناسایی می‌شوند.



شکل ۲- کروماتوگرام نمونه ی تخم هندوانه(A) در مقایسه با کروماتوگرام استاندارد آفلاتوکسین (B)



شکل ٤- منحنی کالیبراسیون آفلاتوکسین های B_1 و G_1

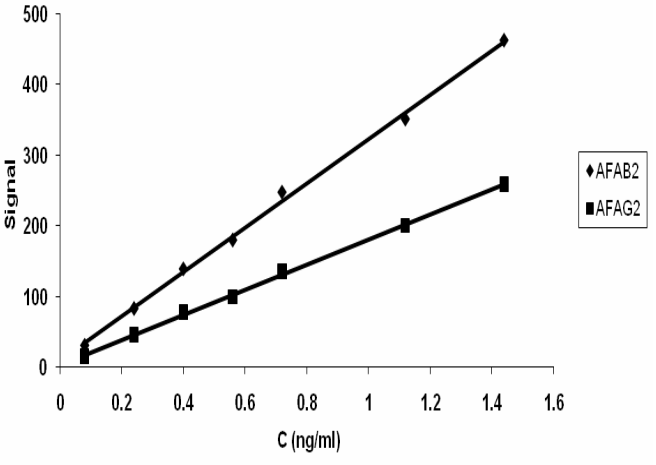
منحنی‌های کالیبراسیون آفلاتوکسین های B و G نیز در شکل ۳ و ٤ نشان داده شده است.همان طور که شکل‌ها نشان می‌دهد بین غلظت و سطح زیر پیک آفلاتوکسین های B و G توافق خوبی برقرار است به طوری که ضریب همبستگی برای آفلاتوکسین های B_1، B_2، G_1 و G_2 به ترتیب ۰/۹۹۷۷، ۰/۹۹۷۸، ۰/۹۹۷۷ و ۰/۹۹۸۸ می‌باشد.

به منظور بررسی صحت روش، یک نمونه تخم هندوانه ی شاهد و فاقد آلودگی آفلاتوکسین با مقدار مشخصی از سم آفلاتوکسین با غلظت معین آلوده و تحت فرآیند استخراج و آماده‌سازی قرار گرفت. جدول ۵ درصد بازیافت به دست آمده برای ٤ نوع آفلاتوکسین را نشان می‌دهد.

جدول ٤- میانگین درصد بازیافت نمونه‌های تخم هندوانه ی آلوده شده با ۱۰ نانوگرم بر گرم آفلاتوکسین B_1 و G_1 و ۲ نانوگرم بر گرم آفلاتوکسین B_2 و G_2

نمونه	آفلاتوکسین (نانوگرم بر گرم)			
	B_1	B_2	G_1	G_2
تخم هندوانه	۹۱/۳٦	۸٦/۳٦	۸۸/۹۸	۷٦/۲۸
انحراف استاندارد نسبی (۷ تکرار)	۳/۸٤	۳/۰٦	۳/٥٤	۳/۹۳

همان طور که نتایج جدول نشان می‌دهد درصد بازیافت‌های به دست آمده برای ٤ نوع آفلاتوکسین در محدوده ی درصد بازیافت مورد تایید مراجع معتبر ملی، ۷۰-۱۱۰٪، (۸) قرار دارد و این ، نشان دهنده ی صحت روش می‌باشد.



شکل ۳- منحنی کالیبراسیون آفلاتوکسین های B_2 و G_2.

٤- نتیجه‌گیری

مطالعات اندکی در ارتباط با ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، میکروبیولوژیکی و میزان آفلاتوکسین تخم هندوانه صورت گرفته است. بنکول[1] (۲) و همکارانش در تحقیقی درصد رطوبت، میزان کپک و آفلاتوکسین B_1 را در ۱۳۷ نمونه تخم هندوانه جمع آوری شده از نواحی جنگلی و بیابانی نیجریه بررسی کردند. نتایج این بررسی نشان داد که میزان رطوبت در نمونه‌های نواحی جنگلی ۱۰/٤-۵/۳٪ و در نمونه‌های نواحی بیابانی ۹/۵-٤/٦٪ بود. شاخص کپک در همه ی نمونه‌ها مثبت بود. آفلاتوکسین B_1 نیز در ۳۲٪ نمونه‌های جنگلی با میانگین ١٤/٨ نانوگرم بر گرم و در ۲۱٪ نمونه‌های بیابانی با میانگین ۱۱/۳ نانوگرم بر گرم ارزیابی گردید.

در مطالعه ی دیگری ، تخم هندوانه‌های کشت شده در نواحی شمال برزیل توسط ملو[2] (۱۵) و همکارانش جهت اندازه‌گیری چربی، پروتئین، عدد اسیدی، پروکسید، اندیس یدی و اندیس صابونی مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق مطالعات صورت گرفته در این تحقیق ، نمونه‌های مورد ارزیابی دارای درصد بالایی از چربی (۳۰/۸٪) و پروتئین (١٤/۹٪) بود. عدد اسیدی، پروکسید، اندیس یدی و اندیس صابونی نیز به ترتیب ۲/۰٦، ٤/۹٦، ۱۱۱/۸ و ۲۱۰/٦ ارزیابی گردید.

نتایج به دست آمده از این تحقیق در مورد آزمون های میکروبیولوژیکی نشان داد که در ارزیابی فلور میکربی نمونه‌ها و مقایسه با حدود مجاز میکربی در دستورالعمل وزارت بهداشت، عدم تطابق در ۷۳ نمونه (در ۱۰۰٪ موارد) به یک یا هر سه ویژگی مورد ارزیابی مشاهده گردید که با توجه به ماهیت نمونه‌ها و فرآوری حرارتی تا استحصال فرآورده نهایی، این حدود مجاز اعلام شده جای بررسی بیش تر دارد.

با توجه به عدم وجود استاندارد ملی جهت مقایسه ی خصوصیات فیزیکوشیمیایی تخم هندوانه، اظهار نظر در مورد خصوصیات مورد ارزیابی امکان پذیر نیست ولی نتایج به دست آمده نشان می‌دهد ٤۲/۸ درصد نمونه‌ها دارای مقدار اسیدیته بیش تر از ۱ و ٦۰٪ نمونه‌ها دارای اندیس پروکسید بیش تر از ۲ بودند.

آنالیز آفلاتوکسین نمونه‌های مورد ارزیابی نیز نشان داد که از ۷۳ نمونه تخم هندوانه، ۳۰ نمونه شامل آفلاتوکسین B_1 با میانگین ۱۲/٤۳ نانوگرم بر گرم، ۲۲ نمونه شامل آفلاتوکسین B_2 با میانگین ۲/۳۰ نانوگرم بر گرم، ٤ نمونه شامل آفلاتوکسین G_1 با میانگین ۳/۷۵ نانوگرم بر گرم و ٤ نمونه شامل آفلاتوکسین G_2با میانگین ۰/٤۲ نانوگرم بر گرم بود. بر اساس نتایج به دست آمده، ٤۳/۳٪ نمونه‌های دارای آفلاتوکسین B_1 دارای مقادیری بیش تر از مقدار پذیرفته شده در استاندارد ملی ایران به شماره ی ۵۹۲۵ یعنی ۵ نانوگرم بر گرم می‌باشد. بنابراین ، مقدار این آفلاتوکسین در این سطح می‌تواند خطرات جدی برای سلامتی انسان داشته باشد.

اگر چه کنترل آلودگی آفلاتوکسین مشکل است ولی به نظر می‌رسد آنالیز مداوم و روتین تخم هندوانه جهت کنترل آلودگی آفلاتوکسین اقدام موثری جهت کنترل این سم خطرناک باشد. بنابر آنچه ذکر گردید در حال حاضر پیشگیری وخنثی کردن این سموم در خوراک دام و انسان از مسائل مهمی است که صنایع غذائی دنیا با آن روبرو است و باید جهت حفظ بهداشت و سلامتی افراد جامعه با برنامه‌ریزی های دقیق نسبت به حذف آن ها از مواد غذائی اقدام نمود.

۵- منابع

1- Abaelu, A. M. Makinde, M. A. and Akinrimisi, E. O. 1979. Melon (egusi) seed protein 1: study of amino acid composition of defatted meal. *Nutr Rep Int*, 20: 605–613.

2- Bankole, S. A. Ogunsanwo, B. M. Osho, A. and Adewuyi, G. O. 2006. Fungal contamination and aflatoxin B_1 of 'egusi' melon seeds in Nigeria. *Food Control,* 17(10): 814-818.

3- Diprossimo, V. P. and Malek, E. G. 1996. Comparison of three methods for determining aflatoxins in melon seeds. *Journal of AOAC International,* 79(6): 1330- 1335.

4- Ghadiri, E. 2009. All things about watermelon. Available at: http://chele.persianblog.ir/post/16 (accessed: 2010).

5- Gong, Y. Y. and Egal, S. 2003. Determinants of aflatoxin exposure in young children from benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. *International journal of Epidemiology*, 32(4): 556-562.

6- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Animal and vegetable fats and oils- Determination of peroxide value - Iodometric

1-Bankole
2-Melo

(visual) endpoint determination, 1st Revision, ISIRI; 4179 [in Persian].
7- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Determination of moisture in dried fruit. 5th Edition, ISIRI; 672 [in Persian].
8- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Food products - Determination of aflatoxin B1 and total aflatoxins using HPLC and immunoaffinity column – Test method, 1st Revision, ISIRI; 6872 [in Persian].
9- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 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, 1st Revision, ISIRI; 10899-2 [in Persian].
10- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique, 1st Revision, ISIRI; 9263 [in Persian].
11- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Microbiology of food and animal feeding stuffs- Detection and enumeration of presumptive Escherichia coli-Most probable number technique, 2nd Revision, ISIRI; 2946 [in Persian].
12- Institute of Standards and Industrial Research of Iran,determination of acid value and acidity in edible oils and fats, 1st Revision, ISIRI; 4178 [in Persian].
13- Kaur, M. and Mann, S. K. 1988. Effect of musk melon (cucumis melo) seed supplementation on the nutritive value of wheat chapati. *Journal of Food Science and Technology*, 25: 263-266.
14- Madaan, T. R. and Lai, B. M. 1984. Some studies on the chemical composition of Cucurbit kernels and their seed coats. *Plant Foods Human Nutrition,* 34: 81-86.
15- Melo, D. S. M. L. Narain, N. and Bora, P. S. 2000. Characterisation of some nutritional constituents of melon (Cucumis melo hybrid AF-522) seeds. *Food Chemistry*, 68(4): 411-414.
16- Nwokolo, E. and Sim, J. S. 1987. Nutritional assessment of defatted seed meal of melon (Colocynthis citrullus L.) and fluted pumpkin (Telfaria occidentales Hook) by chick assay. *J. Sci Food Agric,* 8:237–246.
17- Ogunsanwo, B. M. and Faboya, O. O. 1989. The fate of aflatoxin during the production of 'ogiri' a West African fermented melon seed condiment from artificially contaminated seeds. Die Nahrung, 33: 983-988.
18- Oyenuga, V. A. 1968. Nigeria food and feedstuffs- Their chemistry and nutritional value. 3rd edition. University of Ibadan press, Ibadan. Nigeria.
19- Oyenuga, V. A. and Fetuga, B. A. 1975. Some aspects of biochemistry and nutritional value of watermelon. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 26(6): 843–854.
20- Rodriguez, L.C. CampaTa, A.G. Linares, C.J. and Ceba, M.R. 1993. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters,* 26(6): 1243-1258.