Journal of Food Hygiene, Vol. 9, No. 36, Winter 2020

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2020.671221**

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 B_1 (AFB_1), aflatoxin B_2 (AFB_2), aflatoxin G_1 (AFG_1 and aflatoxin G_2 (AFG_2) were investigated. Analysis of variance showed significant ($P<0.05$) effects of irradiation, calcium oxide and their interactions. *Aspergillus flavus* and AFB_1 and AFB_2 toxins decreased with increasing irradiation. Further reduction of AFB_1 and AFB_2 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*. AFG_1 and AFG_2 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

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2020.671221

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 B_1 (AFB_1)، آفلاتوکسین B_2 (AFB_2)، آفلاتوکسین G_1 (AFG_1) و آفلاتوکسین G_2 (AFG_2) بررسی گردید. آنالیز تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از معنی‌داری اثر مجزای پرتودهی و اکسید کلسیم و اثر متقابل آن‌ها بود ($P<۰/۰۵$)؛ به‌طوری‌که با افزایش پرتودهی میزان *آسپرژیلوس فلاووس* و سموم AFB_1 و AFB_2 کاهش یافت. کاهش بیشتر سموم AFB_1 و AFB_2 طی به‌کارگیری ۰/۵٪ اکسید کلسیم به همراه پرتودهی بسیار مشهود بود. این در حالی است که به‌کارگیری هم‌زمان ۱٪ اکسید کلسیم به همراه پرتودهی باعث جلوگیری و کاهش بیشتر *آسپرژیلوس فلاووس* گردید. طی بررسی نمونه‌ها، سموم AFG_1 و AFG_2 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.

واژهای کلیدی: پرتودهی، اکسید کلسیم، *آسپرژیلوس فلاووس*، آفلاتوکسین، دانه ذرت

مقدمه

در طول تاریخ ذرت یکی از مهم‌ترین منابع غذایی برای تأمین خوراک انسان بوده است که به دلیل شرایط نامطلوب نگهداری رطوبتی و دمایی به‌سرعت دچار آلودگی با کپک *آسپرژیلوس فلاووس* می‌گردد و منجر به تولید سموم آفلاتوکسینB_1، B_2، G_1 و G_2 می‌شود (Whitaker, 2003). این سموم باعث تخریب حاد کبد، ایجاد سیروز کبد، القای توموری و تأثیرات تراتوژنیک و سرطان‌زایی می‌شوند (IARC, 2012). لذا به‌منظور آلودگی‌زدایی دانه‌های ذرت از کپک *آسپرژیلوس فلاووس* و سموم آفلاتوکسین روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی ارائه شده است (Deberghes *et al.*, 1995). در تحقیقی مجاورت ذرت‌های آلوده با ۰/۱٪ آمونیاک باعث تخریب ۹۸ درصد هر چهار نوع آفلاتوکسین شد (King and Prudente Jr, 2005). هم‌چنین ترکیبات آمونیوم دار ۲٪، غلظت آفلاتوکسین‌های B_1, B_2 G_1,G_2 را به‌ترتیب 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٪ AFB_1 و AFB_2 در دانه‌های ذرت گردیده است (Méndez-Albores *et al.*, 2008). بعضی از مواد شیمیایی شامل آمونیوم پرسولفات (Burgos-Hernandez *et al.*, 2001)، هیدروکسید کلسیم (Elias-Orozco *et al.*, 2002)، بی‌کربنات سدیم و کربنات پتاسیم (Amézqueta *et al.*, 2008)، بی‌سولفیت سدیم در از بین بردن سموم آفلاتوکسین و دیگر مایکوتوکسین‌ها و هم‌چنین استفاده هم‌زمان ترکیب سوربات پتاسیم و پرتودهی (Al-Kuraieef *et al.*, 2019) و به‌کارگیری هم‌زمان اتمسفر کنترل شده و پرتودهی در افزایش ماندگاری میوه‌جات (Waghmare and Annapure, 2018) مورد آزمایش قرارگرفته است.

در بین روش‌های کنترل و کاهش تولید سموم قارچی، پرتودهی با اشعه گاما نیز می‌تواند مورداستفاده قرار گیرد. در پژوهشی کاهش جمعیت کپک به‌میزان بیش از ۹۹٪ در نمونه‌های پرتو تابی شده ذرت در دز ۱۰ کیلوگری گزارش شد (Aquino *et al.*, 2005). هم‌چنین 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). ازآنجایی‌که برای از بین بردن کامل یا تجزیه سموم آفلاتوکسین با توجه به مقاومت آن‌ها به پرتو گاما نیاز به میزان بالایی از دز پرتو می‌باشد و از طرفی مقدار بالای پرتو باعث تجزیه ترکیبات مختلف غذایی در دانه‌های غلات می‌گردد (Siddhuraju *et al.*, 2002). لذا لزوم ارائه روش‌ها یا استفاده از مواد کمکی برای کاهش شدت پرتوتابی توصیه می‌گردد (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 می‌نماید که در کشورهایی چون مکزیک در فرآوری و پوست‌گیری ذرت به‌همراه حرارت (معروف به فرایند Nixtamalization) استفاده می‌شود و باعث کاهش قابل‌توجه مایکوتوکسین‌ها می‌گردد (Schaarschmidt and Fauhl-Hassek, 2019). اما باوجود تحقیقات جداگانه‌ای که بر تأثیر اکسیدکلسیم و پرتوتابی برای تجزیه سموم قارچی در غلات صورت پذیرفته است، در خصوص تأثیر هم‌زمان اکسیدکلسیم و پرتو تابی در غلات به‌منظور کاهش رشد کپک *آسپرژیلوس فلاووس* و تجزیه سموم AFB_1 و AFB_2

گزارشی ارائه نگردیده است. ازاین‌رو هدف از این تحقیق علاوه بر شناسایی اثر اشعه گاما و اکسیدکلسیم در کاهش جمعیت *آسپرژیلوس فلاووس* و کاهش غلظت سموم آفلاتوکسین در دانه‌های ذرت امکان کاهش دز تابشی اشعه گاما نیز موردبررسی 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 ۷۰٤ با تأیید عدم وجود آفلاتوکسین از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان (گرگان، ایران) تهیه‌شده و در کیسه‌های پلاستیکی استریل به آزمایشگاه انتقال‌داده شدند. سپس استریل کردن اولیه نمونه‌ها با غوطه‌وری در آب‌اکسیژنه ۵٪ به‌مدت 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

به‌منظور آغشته سازی نمونه‌ها با کلنی‌های قارچ *Aspergillus flavus* (PTCC5004) از کلنی‌های ۷ روزه آن‌ها که تولیدکننده سم آفلاتوکسین هستند استفاده شد. بدین منظور سوش موردنظر از انستیتو پاستور ایران خریداری و در داخل پلیت حاوی محیط سابارو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) جهت تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ احیا گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل به پلیت حاوی کلنی‌های قارچ مذکور اضافه و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰ rpm بر روی شیکر روتاتور (VDRL, Bazianlab, Iran) مخلوط گردید. با استفاده از لام Hemosytometric سوسپانسیون 10^{6} کونیدی قارچ در هر میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی برای تلقیح تهیه گردید. سپس برای تلقیح نمونه‌ها به هر ارلن حاوی ۲۰۰ گرم ذرت ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت 10^{6} اسپور در هر میلی‌لیتر اسپری گردید. در نهایت رطوبت نمونه‌ها به ۲۵٪ تنظیم گردیده و به‌مدت ۱۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور یخچال دار (Agualytic, Fks-1802, Germany) و رطوبت نسبی(RH) ۹۷ تا ۹۸ درصد انکوباسیون گردید (Refai *et al.*, 1996).

- پرتو تابی نمونه‌ها

تیمارهای تلقیح شده با اسپور *آسپرژیلوس فلاووس*، پس از گذشت دوره ۱۵ روزه، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت دزهای مختلف ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ کیلوگری اشعه گاما با چشمه کبالت۶۰ اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۲۳٪ 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 *آسپرژیلوس فلاووس*

این آزمایش بر اساس روش شمارش کپک‌های خشکی دوست انجام گرفت (ISO, 2008/2-215278). بدین ترتیب که نمونه‌های ده گرمی به‌خوبی با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شدند. مقدار اسپورها با استفاده از روش شمارش پلیت در محیط کشت انتخابی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (محیط کشت سابورو دکسترو آگار) بعد از انکوباسیون به‌مدت هفت روز و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سوپانسیون‌های با سری رقت‌های 10^{-1} الی 10^{-6} شمارش شد. قارچ‌ها

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 ٤٪ 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 ۳٦۲ نانومتر و طول موج نشر آفلاتوکسین B_1و B_2 ٤۲٦ نانومتر و طول موج نشر آفلاتوکسین G_1 و G_2 ٤٦٥ نانومتر است. درجه حرارت ستون ٤۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت جریان ml/min ۲ و از ستون کرومولیت با ابعاد ٤/٦ mm×۱۰cm (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 AFB_1، AFB_2، AFG_1 و AFG_2) با نرم‌افزار Design-Expert v. 10 صورت پذیرفت.

یافته‌ها

میانگین نتایج به‌دست‌آمده در جدول (۱) نشان داده شده است و حروف متفاوت دانکن بیانگر وجود تفاوت‌های معنی‌دار در برخی از تیمارها است. در خصوص جمعیت کپک‌ها، نمونه پرتودهی نشده حاوی ۰/۵ درصد اکسیدکلسیم دارای بالاترین میزان کپک *آسپرژیلوس فلاووس* (۳۷۲۰۰۰CFU/g) و نمونه پرتودهی شده به میزان ۲۰ کیلوگری حاوی ۱٪ اکسیدکلسیم واجد کمترین محتوی کپک *آسپرژیلوس فلاووس* (۲۱٦۰۰ CFU/g) بود که حاکی از کاهش جمعیت کپک ۹۳/۹۷٪ را داشت (جدول ۱). از طرفی بیشترین میزان سم AFB_1 به میزان ppb ۹٦۰٦/٦ در نمونه پرتودهی نشده حاوی ۱٪ اکسیدکلسیم بود. این در حالی است که کمترین محتوی سم AFB_1 (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 AFB_2 بالاترین میزان مربوط به نمونه پرتودهی نشده حاوی ۱٪ اکسیدکلسیم بود و کمترین محتوی سم AFB_2 (٤۳/۳ ppb) در نمونه پرتودهی شده با دز ۲۰ کیلوگری حاوی ۰/۵٪ اکسیدکلسیم شناسایی شد که کاهش ۸٤/۵٪ در غلظت سم را داشت (جدول ۱). سموم AFG_1 و AFG_2 در هیچ‌کدام از تیمارها شناسایی نگردید. با وجود آن‌که میزان ۰/۵٪ اکسیدکلسیم در نمونه‌ها باعث افزایش اندک

رشد کپک گردید (۸/۱۲٪) اما تولید سموم AFB_1 و AFB_2 کاهش بسیار قابل‌توجهی یافت (به‌ترتیب ۴۰/۶۷٪ و۴۸/۵۶٪). این پدیده در غلظت ۱٪ اکسیدکلسیم روند معکوسی داشت بدین ترتیب که هم‌زمان با کاهش رشد کپک به میزان ۲۴/۹۸٪، تولیدAFB_1 و AFB_2 به‌ترتیب 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 به‌دست‌آمده در جدول (۲) آورده شده است. یافته‌ها از معنی‌داری تأثیر اکسیدکلسیم بر هر سه متغیر وابسته کپک *آسپرژیلوس فلاووس* (P<۰/۰۵)، آفلاتوکسین B1 (P<۰/۰۵) و آفلاتوکسین B_2 (P<۰/۰۰۱) حکایت دارد. هم‌چنین در خصوص فرایند پرتودهی، تأثیر بسیار معنی‌دار آن بر میزان رشد قارچ یا تعداد اسپورهای قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (P<۰/۰۵) ، آفلاتوکسین B_1 (P<۰/۰۰۱) و آفلاتوکسین B_2 (P<۰/۰۵) مشخص شد. در این آزمون آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر متقابل اکسیدکلسیم و پرتودهی روی تعداد اسپورهای قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*، مقادیر AFB_1 و AFB_2 تأثیر بسیار معنی‌داری (P<۰/۰۵) دارد.

جدول (۱)- مقادیر میانگین و انحراف معیار جمعیت کپک *آسپرژیلوس فلاوس*، غلظت‌های سموم و در دانه‌های گندم. مقادیر افت بر مبنای مقدار اولیه در نمونه شاهد محاسبه‌شده است (0% CaO, 0 KGy)

متغیرهای مستقل		Asp. Flavus (cfu/g)†	Asp. Flavus کاهش (%)	AFB_1 (ppb)†	AFB_1 افت (%)	AFB_2 (ppb)†	AFB_2 افت (%)
CaO (%)	شدت پرتودهی (KGy)						
۰	۰	۳۵۶۰۰۰±۳۱۷۴۹^{a}	۰	۷۶۰۰±۵۰^{b}	۰	۲۸۱/۶±۱۱/۶^{c}	۰
۰	۵	۲۲۶۶۶۶۶±۱۲۵۸۳^{c}	۳۵/۸	۳۸۵۰±۵۰^{e}	۴۹/۳۳	۲۴۳±۲۲/۶^{d}	۱۳/۴۳
۰	۱۰	۱۲۶۳۳۳/۳±۱۵۱۷۶/۷^{ef}	۶۴/۱	۳۵۴۰±۴۰^{f}	۵۳/۴	۲۰۱/۳±۱۸^{e}	۲۸/۲۷
۰	۱۵	۶۷۳۳۳/۳±۱۴۰۴۷/۵^{h}	۸۰/۷	۳۴۱۰±۲۰^{g}	۵۵/۱۳	۱۷۰/۶±۵/۱^{g}	۳۹/۳
۰	۲۰	۴۶۳۳۳/۳±۶۵۰۶/۴	۸۶/۸	۳۲۸۰±۲۰^{h}	۵۶/۸۳	۱۴۲±۹/۱^{h}	۴۹/۴۳
میانگین (نمونه ۱ الی ۵)			۵۳/۴۹		۴۲/۹۴		۲۶/۰۸
۰/۵	۰	۳۷۲۰۰۰±۲۶۰۰۰^{a}	-۴/۶	۲۱۲۰±۲۰i	۷۲/۱	۱۲۲/۳±۱۱/۷^{i}	۵۶/۰۴
۰/۵	۵	۲۶۱۶۶۶/۶±۲۳۵۴۴/۳^{b}	۲۶/۴	۱۳۳۶/۶±۹۶/۱^{j}	۸۲/۴۳	۷۹/۶±۵/۵^{j}	۷۱/۶
۰/۵	۱۰	۱۴۵۰۰۰±۱۳۲۲۸/۷^{de}	۵۹/۲	۱۰۴۲/۶±۸/۳^{k}	۸۶/۲۷	۶۰/۶±۳^{k}	۷۸/۴۳
۰/۵	۱۵	۱۰۴۳۳۳/۳±۱۱۰۱۵/۱^{f}	۷۰/۴	۸۹۳/۳±۵۵/۱^{l}	۸۸/۲۳	۵۰±۲/۶^{l}	۸۲/۲۳
۰/۵	۲۰	۸۶۳۳۳/۳±۸۰۸۲/۹^{g}	۷۵/۴۷	۸۳۳/۳±۶۶/۶^{m}	۸۹/۰۳	۴۳/۳±۴/۵^{m}	۸۴/۵
میانگین (نمونه ۶ الی ۱۰)			۴۵/۳۷		۸۳/۶۱		۷۴/۶۴
۱	۰	۱۶۵۰۰۰±۱۵۰۰۰^{d}	۵۳/۶	۹۶۰۶/۶±۳۰/۵^{a}	-۲۶/۴	۵۰۸/۳±۱۲/۶^{a}	-۸۰/۷۶
۱	۵	۹۷۰۰۰±۱۳۵۲۷/۷^{fg}	۷۲/۴	۴۸۳۶/۶±۷۷/۷^{c}	۳۶/۳۶	۳۶۳±۹/۸^{b}	-۲۸/۹۳
۱	۱۰	۶۱۶۶۶/۶±۱۸۱۳۲/۹^{h}	۸۲/۳	۴۰۶۳/۳±۱۰۰/۱^{d}	۴۶/۵۳	۲۵۱/۳±۱۰/۲^{d}	۱۰/۶
۱	۱۵	۳۵۰۰۰±۹۵۳۹/۴^{i}	۹۰/۰۶	۳۳۹۰±۴۵/۸^{g}	۵۵/۳۷	۱۸۳/۳±۶/۶^{f}	۳۴/۸۳
۱	۲۰	۲۱۶۰۰±۴۶۱۳^{j}	۹۳/۹۷	۲۸۰۸/۳±۱۴۴/۶^{h}	۶۳/۰۳	۱۳۲±۱۰/۶^{hi}	۵۳/۱
میانگین (نمونه ۱۱ الی ۱۵)		۳۵۶۰۰۰±۳۱۷۴۹^{a}	۷۸/۴۷		۳۴/۹۸		-۲/۲۳
میانگین (نمونه ۶ الی ۱۵)		۲۲۶۶۶۶۶±۱۲۵۸۳^{c}	۶۱/۹۲		۵۹/۲۹		۳۶/۲۷
میانگین (نمونه ۱ الی ۱۵)		۱۲۶۳۳۳/۳±۱۵۱۷۶/۷^{ef}	۵۹/۱۱		۵۳/۸		۳۲/۸۳۳

† 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 معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) دارند.

بحث و نتیجه‌گیری

در خصوص تأثیر اکسیدکلسیم و پرتودهی بر رشد کپک *آسپرژیلوس فلاووس* مشخص شد که تأثیر اکسیدکلسیم بر مقادیر کپک *آسپرژیلوس فلاووس* با توجه به میزان مقدار افزوده شده آن متفاوت است. بدین ترتیب که در نمونه فاقد پرتودهی دارای ۰/۵ درصد اکسیدکلسیم در مقایسه با نمونه شاهد جمعیت کپک *آسپرژیلوس فلاووس* ۴۶/۴٪ افزایش داشت که این امر می‌تواند به دلیل نقش کلسیم در بهبود متابولیسم و تأمین کلسیم موردنیاز باشد (Viquez *et al.*, 1994) اما در غلظت ۱٪ کاهش ۵۳/۶٪ (در مقایسه با نمونه شاهد) مشاهده شد. به نظر می‌رسد این کاهش به دلیل افزایش غلظت یون‌های کلسیم در سیتوسل‌ها باشد که برای قارچ‌ها سمی است. به‌طور مثال برای جلوگیری از رشد

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

هم‌چنین در خصوص فرایند پرتودهی، با افزایش شدت پرتودهی جمعیت کپک کاهش یافت به‌طوری‌که 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 به‌طوری‌که 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 به‌ترتیب 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 کی‌لیت کننده یا تولید آن‌ها توسط کپک در مقاومت کپک به پرتوگاما نقش دارند.

در خصوص بررسی تأثیر اکسیدکلسیم و پرتودهی بر تولید سم آفلاتوکسین B_1 نقش متفاوت اکسیدکلسیم بر مقادیر تولید سم آفلاتوکسین B_1 مشهود بود زیرا که هم باعث افزایش و هم باعث کاهش سم AFB_1 گردید. بدین ترتیب که در نمونه فاقد پرتودهی دارای ۰/۵ درصد اکسیدکلسیم در مقایسه با نمونه فاقد اکسیدکلسیم، غلظت سم آفلاتوکسین B_1 ۷۲/۱٪ کاهش یافت ولی در غلظت ۱٪ اکسیدکلسیم غلظت سم AFB_1 به‌میزان ۲۶/۴٪ افزایش می‌یابد. از طرفی مشخص شده است که در نمونه پرتودهی نشده حاوی ۰/۵٪ اکسیدکلسیم، باوجود بیشترین جمعیت کپک *آسپرژیلوس فلاووس*، کمترین غلظت سم AFB_1 مشاهده می‌شود ولی در غلظت ۱٪ اکسیدکلسیم جمعیت کپک *آسپرژیلوس فلاووس* کاهش یافته، غلظت سم AFB_1 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 درنتیجه تولید متابولیک‌های ثانویه ازجمله تولید سم AFB_1 می‌گردد (Jay *et al.*, 2005). اهمیت ترکیب کلسیم-کالمودولین (Calmodulin-Ca^{2+}) 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 AFB_1، تأثیر بسیار معنی‌داری داشت به‌طوری‌که با افزایش شدت پرتودهی میزان سم AFB_1 کاهش میابد. تجزیه آفلاتوکسین توسط اشعه گاما در نتیجه اثرات غیرمستقیم رادیکال‌های آزاد شده توسط رادیولیز آب یا دیگر ترکیبات است که این رادیکال‌ها به‌سادگی به حلقه فوران انتهایی AFB_1 حمله می‌نماید که منجر به کاهش

فعالیت زیستی آن می‌گردد (Rustom, 1997). میزان میانگین تخریب AFB_1 در این تحقیق (با میزان غلظت اولیه ppb ۷۶۰۰) در دز ۵ و ۱۰ کیلوگری به‌ترتیب ۵۶/۰۴٪ و ۶۲/۰۶٪ بود (داده‌ها نشان داده نشده است). این نتایج نزدیک به نتایج حاصل از تخریب AFB_1 (با میزان غلظت اولیه ppb ۵۰) در نمونه‌های خوراک دام و ذرت پرتودهی شده بود که تخریب ۶۰٪ و ۸۵٪ به‌ترتیب در دز ۵ و ۱۰ کیلوگری را گزارش نمود (Markov *et al.*, 2015). در تحقیق دیگری دز ۱۰ کیلوگری اشعه گاما باعث تخریب کامل AFB_1 (با میزان غلظت اولیه ppb ۲۵۹۷) در دانه‌های ذرت گردید (Aquino *et al.*, 2005). علت مقاومت متفاوت AFB_1 حتی در نمونه‌های مشابه می‌تواند به غلظت اولیه سم، میزان رطوبت نمونه‌ها، محتوی چربی و پروتئین بسته به رقم محصول متفاوت باشد.

در خصوص نقش ترکیبی اکسیدکلسیم و شدت پرتو، با در نظر داشتن این نکته که در نمونه‌های کنترل حداکثر اثر تخریبی پرتودهی با ۲۰ کیلوگری روی AFB_1 به میزان ۵۶/۸۳٪ است. این میزان در غلظت ۰/۵ درصد اکسیدکلسیم به بیشترین میزان افت (۸۹/۰۳٪) می‌رسد. این در حالی است که در غلظت ۱٪ آن، این ترکیب نه‌تنها نقش کمکی برای پرتودهی نداشت بلکه ممانعت کننده نیز بود. مشابه غلظت ۰/۵ درصد اکسیدکلسیم در این تحقیق غلظت ۲٪ اکسیدکلسیم (محلول هیدروکسید کلسیم) به همراه حرارت در فراوری ذرت به کار گرفته شد که نتایج حاکی از کاهش ۴۰٪ AFB_1 بود و افزایش غلظت اکسیدکلسیم نه‌تنها کاهش قابل‌ملاحظه‌ای در غلظت سم ایجاد نکرد بلکه منجر به تغییرات نامطلوب طعمی در فراورده گردید (Abbas *et al.*, 1988).

در بررسی تأثیر اکسیدکلسیم و پرتودهی بر تولید سم آفلاتوکسین B_2 تأثیر متفاوت اکسید کلسیم بر تولید AFB_2 مشخص گردید. درحالی‌که غلظت ۰/۵٪ آن به‌تنهایی منجر به کاهش ۵۶/۰۴٪ AFB_2 شد اما در غلظت ۱٪ آن، افزایش ۸۰/۷۶٪ AFB_2 مشاهده گردید. در این خصوص گزارش‌های متفاوتی ارائه‌شده است. درحالی‌که 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 تفاوت‌ها می‌تواند به نوع کپک، نوع محیط کشت، شرایط محیطی رشد(Jay *et al.*, 2005) ارتباط داشته باشد.

در این تحقیق نقش پرتودهی در کاهش AFB_2 بسیار مشهود بود. به‌طوری‌که با افزایش شدت پرتودهی مقادیر AFB_2 کاهش یافت. بیشترین مقدار کاهش AFB_2 در نمونه‌های فاقد کلسیم حاوی ۲۰ کیلوگری 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 AFB_2 با شدت ۱۰ کیلوگری در نمونه‌های ذرت (Aquino *et al.*, 2005) (با غلظت اولیه ppb ۵۷۱/۱) و دانه‌های نیلوفر آبی (Bhat R *et al.*, 2010) بوده است درحالی‌که برای از بین بردن کامل سموم آفلاتوکسین آرد بادام تنها ۱/۵ کیلوگری پرتو لازم بود (Lanza *et al.*, 2013).

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 ۲۶/۰۸٪ است. این میزان در غلظت ۰/۵٪ اکسیدکلسیم به بیشترین میزان افت یعنی ۷٤/٦٤٪ و در غلظت ۱٪ اکسیدکلسیم بالعکس منجر به افزایش غلظت سم به میزان ۲/۲۳٪ می‌رسد. در تحقیقی غلظت ۲٪ اکسیدکلسیم (محلول هیدروکسید کلسیم) به همراه حرارت در فراوری ذرت به کار گرفته شد که نتایج حاکی از کاهش 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 باوجود 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 کیلوگری 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 مختلف پرتودهی تیمار شدند باوجود افزایش اندک رشد کپک، افت AFB_1 وAFB_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 ppb ۲ و مجموع غلظت آفلاتوکسین‌ها ٤ppb) 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 کیلوگری است (CODEX, 2003)، لذا در پایان پیشنهاد می‌شود اضافه نمودن ۰/۵٪ اکسیدکلسیم به دانه‌های ذرت قبل ذخیره‌سازی (به‌منظور کنترل تولید سموم AFB_1و AFB_2) و اعمال پرتودهی گاما با شدت ۱۰ کیلوگری 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.

تعارض منافع

نویســـندگان 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 Belkhoudja, 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 Annapure, 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.