نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۰۲-۳۹۴

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 394-402

بررسی تاثیر تلقیح کپک *Aspergillus flavus* بر تغییرات میزان اسیدهای چرب، اندیس پراکسید و تولید آفلاتوکسین در چهار واریته رایج بادام زمینی برداشت شده از سطح مزارع استان گلستان

مریم ابراهیمی[۱]، مرتضی خمیری[۲*]، یحیی مقصودلو[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۷/۱۲

چکیده

بادام‌زمینی یکی از حساس‌ترین محصولات کشاورزی در برابر هجوم *A. flavus* و متعاقبا آلودگی به آفلاتوکسین محسوب می‌شود. در این پژوهش پس از جداسازی و تائید شناسایی *A. flavus* از نمونه‌های بادام‌زمینی آلوده شده به این کپک، مقادیر مشخصی از آن به چهار واریته بادام‌زمینی رایج استان گلستان به نام‌های گلی، محلی، چینی و هندی که در شرایط مناسب خشک و پوست‌گیری شدند تلقیح گردید. سپس تاثیر تلقیح کپک مذکور (پس از یک هفته رشد در دمای ۲۶ °C) بر روی تغییرات اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک، اندیس پراکسید و تولید آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفت. بمنظور ارزیابی تغییرات اسیدهای چرب از کروماتوگرافی گازی و جهت بررسی میزان آفلاتوکسین B_1 از الایزای رقابتی مستقیم استفاده شد. جهت ارزیابی میزان حساسیت ارقام بادام‌زمینی به رشد *A. flavus* آفلاتوکسین‌زا نیز میزان تشکیل پرگنه کپک بر روی مغز بادام‌زمینی و میزان اسپور تولیدی محاسبه گردید. نتایج حاصل، نشان داد که در بین واریته‌های مختلف، واریته گلی و واریته هندی به ترتیب کمترین و بیشترین حساسیت را به رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین B_1 دارا بودند. همچنین با رشد *A. flavus* بر روی مغز بادام‌زمینی، بطور معنی‌داری (α = ٪۵) میزان اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک، کاهش و اندیس پراکسید افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: بادام‌زمینی، *Aspergillus flavus*، الایزای رقابتی مستقیم، کروماتوگرافی گازی، آفلاتوکسین B_1

مقدمه

بادام‌زمینی با نام علمی *آراچیس هیپوجیا*[۴] یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی در سراسر جهان به شمار می‌آید. منشأ این گیاه، آمریکای جنوبی است و در مناطقی که میانگین بارندگی ۱۲۰۰- ۵۰۰ میلی‌متر و متوسط دمای روزانه بالاتر از ۲۰°C دارند، کشت می‌شود (Brown, 2012، ؛ Danehowe,2012). حدود ۵۸٪ از سطح زیر کشت و ۶۷٪ از کل تولید جهانی بادام‌زمینی مربوط به آسیا است (ICRISAT, 2004). طبق آخرین آمار وزارت جهاد کشاورزی (اداره کل آمار و اطلاع‌رسانی)، سطح زیر کشت بادام‌زمینی در ایران معادل ۳۱۰۹۰۰ هکتار بوده است (سال زراعی،۱۳۸۶). قارچ‌های توکسین‌زا بصورت گسترده‌ای در محصولات کشاورزی به ویژه در دانه‌های روغنی، غلات و میوه‌های خشک شده رشد می‌کنند (Cunningham و همکاران، ۲۰۰۶). اگرچه واریته‌های مختلفی از کپک‌ها توانایی تولید این سموم را دارند ولی تولید آن‌ها در این محصولات تنها به چند جنس محدود مربوط می‌شود (Cunningham و همکاران، ۲۰۰۶؛ Rai و همکاران، ۲۰۱۲).

از مهم‌ترین توکسین‌های تولید شده در دانه‌های روغنی مخصوصا بادام زمینی می‌توان به آفلاتوکسین B_1 اشاره کرد (Cunningham و همکاران، ۲۰۰۶). آفلاتوکسین توسط گونه‌هایی از *Aspergillus* تولید می‌شود که می‌توانند قبل از برداشت یا در حین نگهداری، دانه-های روغنی را آلوده نمایند.

سازمان بهداشت جهانی[۵] در سال ۱۹۹۳، آفلاتوکسین را جزء ترکیبات سرطان‌زا برای انسان قرار داد (Li و همکاران، ۲۰۰۹). در اکثر نقاط دنیا تحقیقات گسترده‌ای با هدف شناسایی ارقام مقاوم

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
(* - نویسنده مسئول: Email: mkhomeiri@yahoo.com)

4 *Arachis hypogaea*

5 World Health Organization

محصولات مختلف غذایی نسبت به *A. flavus* آفلاتوکسین‌زا صورت گرفته و نتایج موفقیت‌آمیزی از آن‌ها گزارش شده است. در ایران، بیشتر مطالعات بر روی پسته متمرکز شده و در خصوص بادام‌زمینی، تحقیقات چندانی بمنظور شناسایی واریته مقاوم‌تر صورت نگرفته است. با توجه به اینکه ترکیبات تشکیل‌دهنده مغز بادام‌زمینی به خصوص پروتئین، از مهم‌ترین عوامل موثر بر رشد کپک و تولید آفلاتوکسین بشمار می‌آیند و از طرفی تفاوت در ترکیبات شیمیایی ارقام مختلف یک محصول می‌تواند مبنای حساسیت یا مقاومت آن نسبت به رشد کپک و تولید آفلاتوکسین باشد. از این رو این تحقیق با فرض اینکه حساسیت ارقام مختلف بادام‌زمینی نسبت به حضور کپک‌های تولید کننده آفلاتوکسین و مقدار آن متفاوت است و بین تولید آفلاتوکسین و تغییرات اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک ارتباط معنی‌داری وجود دارد، جهت دستیابی به اهداف زیر انجام شده است:

۱) تعیین مقاوم‌ترین واریته رایج بادام زمینی در استان گلستان نسبت به رشد کپک *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین

۲) بررسی ارتباط بین رشد کپک *A. flavus* و آفلاتوکسین تولیدی آن با میانگین درصد ترکیبات بادام‌زمینی

۳)بررسی ارتباط بین رشد کپک *A. flavus* و میزان تولید آفلاتوکسین و تغییرات اسیدهای چرب اولئیک، لینولئیک و عدد پراکسید.

مواد و روش‌ها

انتخاب و جمع‌آوری ارقام مختلف بادام زمینی

در این پژوهش، عملیات برداشت ۴ واریته رایج بادام‌زمینی کشت شده در سطح استان گلستان به نام‌های گلی و محلی (واریته‌های ایرانی)، چینی و هندی (واریته‌های وارداتی) از مزارع شهرستان‌های کلاله و مینودشت در تاریخ ۱۷ مهر ماه توسط کارشناسان اداره جهاد کشاورزی استان گلستان مطابق با استاندارد ملی ایران (شماره ۲۵۸۱) انجام شد و پس از آن، نمونه‌های مذکور در شرایط مطلوب، خشک و تحت خلاء به کمک دستگاه وکیوم، بسته‌بندی و تا زمان انجام آزمایش‌های لازم در یخچال نگهداری شدند(لازم به ذکر است که زمان کشت این محصول از پانزدهم فروردین آغاز و زمان برداشت آن از اوایل مهر ماه تا اواخر آبان ماه ادامه دارد).

جداسازی و تایید شناسایی کپک *A. flavus* و بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین B_1 توسط آن

پس از جداسازی کپک *A. flavus* از نمونه‌های بادام‌زمینی آلوده و رشد و اسپورزایی آن در سطح محیط کشت Agar Malt Extract (مرک، آلمان)، خصوصیات مورفولوژیکی همچون شکل، تعداد ردیف استریگما، کونیدی و سایر خصوصیات کپک مورد بررسی قرار گرفت (Klich و همکاران، ۲۰۰۶). برای بررسی خاصیت آفلاتوکسین‌زایی جدایه کپک و اطمینان از تولید آفلاتوکسین B_1، از محیط کشت مایع Sucrose Low Salts Medium (مرک، آلمان) استفاده شد. در پایان یک هفته از رشد قارچ در این محیط کشت، توده میسیلیومی آن جدا و سپس آفلاتوکسین به روش BF[1] استخراج گردید (Arrus و همکاران، ۲۰۰۵). در نهایت نوع و میزان آفلاتوکسین B_1 توسط کیت الایزای تهیه شده از شرکت روکت اینترنشنال (آلمان) به روش الایزای رقابتی مستقیم (واکنش رقابتی بین آنتی ژن نمونه با آنتی ژن نشان‌دار شده در اتصال به آنتی‌بادی اختصاصی) و دستگاه الایزاریدر S-2000 (آلمان)، مورد بررسی قرار گرفت (Wen sun, 2008؛Leszczynska و همکاران،۲۰۰۱). مواد و وسایل موجود در کیت الایزا شامل پلیت مخصوص ۹۶ خانه‌ای پوشش داده شده با سرم آلبومین گاوی، استاندارد آفلاتوکسین B1، محلول کونژوگه (AFB_1-BSA) نشاندار شده با آنزیم پراکسیداز)، آنتی‌سرم آفلاتوکسین، محلول کروموژن p- نیتروفنل فسفات، محلول اسید سولفوریک ۱ نرمال و بافر شستشوی فسفات سالین۰/۱ مولار حاوی ۰/۰۵ ٪ تویین ۲۰ بود.

اندازه‌گیری ترکیبات مغز ارقام بادام زمینی

میزان چربی موجود در مغز نمونه‌های بادام‌زمینی قبل از تلقیح با کپک به روش سوکسله (AOAC[2]، ۲۰۰۰)، پروتئین به روش کلدال (AOAC، ۲۰۰۰)، خاکستر به کمک حرارت (AOAC، ۲۰۰۰)، رطوبت به روش حرارت بالا در دستگاه آون (AOAC، ۲۰۰۰)، قند احیاء کننده به روش حجمی لین- آینون (AOAC، ۲۰۰۰)، پراکسید به روش لی (AOAC، ۲۰۰۰) و میزان اسیدهای چرب با کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی (Wen Sun، ۲۰۰۸) اندازه گیری شد. دستگاه کروماتوگرافی گازی بکار رفته در این پژوهش، ساخته شرکت واریان[3]، مدل سی- پی ۳۸۰۰[4] (آمریکا) بود. گاز حامل آن، نیتروژن با جریان ۲۵ میلی‌لیتر در دقیقه، سوخت گاز هیدروژن با جریان ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه و جریان هوا با سرعت ۳۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه، ستون مویینه با نام دی- بی- واکس[5] با طول ۵۰ متر، قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲ میکرومتر، برنامه دمایی ایزوترمال با دمای ۲۲۰°C در طول آنالیز، آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای[6] با دمای ۲۸۰°C، دمای تزریق نمونه ۲۲۰°C، زمان نگهداری ۳۰ دقیقه

1 Best food method
2 Association of official analytical chemist
3Varian
4 CP-3800
5 DB-WAX
6 Flame ionization detector

و روش آنالیز نرمال کردن پیک کروماتوگرام بود (Zamora و همکاران، ۲۰۰۴).

بررسی تاثیر تلقیح کپک *A. flavus* بر تغییرات میزان اسیدهای چرب، اندیس پراکسید و تولید آفلاتوکسین B_1 و شناسایی رقم مقاوم

بمنظور محاسبه میزان رشد و تشکیل پرگنه قارچ، مقدار ۲۰ گرم مغز بادام‌زمینی از هر واریته با کمک هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی سطحی شد و سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون قارچ (با غلظت ۲×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی‌لیتر) به نمونه‌ها تلقیح گردیده و به مدت یک هفته در دمای ۲۶ °C نگهداری شدند (Hoskisson و همکاران، ۲۰۰۰؛ Nagarajan و همکاران، ۱۹۹۲).

هشت روز پس از تلقیح، میانگین درصد رشد قارچ بر اساس پوشش سطح بادام‌زمینی، مقدار اسپور تولیدی با کمک لام هموسایتومتر، آفلاتوکسین B_1 تولید شده با کمک کیت الایزا، تاثیر تشکیل پرگنه قارچ بر روی هیدرولیز اسیدهای چرب و عدد پراکسید (در دو حالت همراه با ریسه‌های کپک و پس از جداسازی ریسه‌های کپک) مورد بررسی قرار گرفت.

برای جداسازی ریسه‌های کپک، ۸ روز بعد از تلقیح، مغزهای بادام زمینی به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی آب مقطر استریل منتقل و بر روی شیکر قرار گرفتند. در صورت باقی‌ماندن مقداری میسیلیوم بر روی مغز، توسط پنس به طور کامل از سطح بادام‌زمینی جدا و سپس مغزهای شسته شده در آون خشک گردیدند تا از تولید بیشترآفلاتوکسین جلوگیری شود.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار و در قالب طرح پایه کاملا تصادفی انجام شد. داده‌های به دست آمده نیز توسط نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح α=۵٪ انجام شد (SAS، ۲۰۰۳).

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی ارقام ختلف بادام زمینی قبل از تلقیح با کپک

بر اساس نتایج بدست آمده، واریته‌های هندی و محلی به ترتیب با ۵۱/۲۶ و ۴۴/۷۷ میانگین درصد چربی دارای بیشترین و کمترین میزان چربی و واریته‌های محلی و هندی با ۲۴/۲۸ و ۲۰/۰۲ میانگین درصد به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار پروتئین بودند. همچنین مقادیر قند احیاء کننده ۴/۵۳- ۳/۵۶ میانگین درصد، خاکستر ۲/۴۳-۱/۹۸ میانگین درصد و رطوبت ۳/۳۳ تا ۳/۵۶ میانگین درصد در واریته‌های مختلف، متغیر بودند. واریته‌های محلی و گلی به ترتیب بیشترین و واریته‌های هندی و چینی به ترتیب کمترین میزان اسید اولئیک را دارا بودند. همچنین بین واریته‌های هندی با چینی و گلی با معمولی از نظر میزان اسید چرب لینولئیک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و در مجموع واریته‌های هندی و چینی دارای بیشترین و واریته‌های گلی و معمولی دارای کمترین مقدار اسید لینولئیک بودند. (جدول ۱). این نتایج با نتایج ارائه شده توسط USDA (۲۰۰۲) و سقطی (۱۳۷۳) مطابقت دارد.

جدل ۱- مقایسه میانگین ترکیبات شیمیایی موجود در مغز واریته‌های بادام زمینی (درصد) قبل از تلقیح با کپک

واریته	چربی	پروتئین	خاکستر	رطوبت	قند احیا کننده	اسید اولئیک	اسید لینولئیک
هندی	۵۱/۲۶±۰/۰۸^{a}	۲۰/۰۲±۰/۱۹^{c}	۲/۴۳±۰/۰۴^{a}	۳/۵۶±۰/۴۷^{a}	۴/۵۳±۰/۱۷^{a}	۴۳/۱۶±۱/۲۱^{d}	۳۶/۸۴±۲/۴^{a}
چینی	۴۸/۴۶±۰/۰۵^{b}	۲۰/۵۱±۰/۳۲^{c}	۲/۳۳±۰/۰۷^{ab}	۳/۴۴±۰/۱۲^{a}	۳/۵۶±۰/۳۴^{c}	۴۵/۹۳±۰/۵۵^{c}	۳۶/۵۱±۱/۳۲^{a}
محلی	۴۴/۷۷±۰/۲۵^{d}	۲۴/۲۸±۰/۲۵^{a}	۱/۹۸±۰/۰۳^{c}	۳/۴۴±۰/۰۷^{a}	۴/۰۵±۰/۰۴^{b}	۵۹/۳۳۱±۱/۲۸^{a}	۲۵/۱۹±۱/۲۱^{b}
گلی	۴۵/۱۳±۰/۱۹^{c}	۲۳/۴۲±۰/۲۱^{b}	۲/۲۶±۰/۰۳^{b}	۳/۳۳±۰/۶۳^{b}	۴/۴۱±۰/۶^{a}	۵۸/۰۹±۲/۰۱^{b}	۲۵/۴۴±۱/۰۵^{b}

حروف مشابه در هر ستون، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

میزان حساسیت ارقام مختلف بادام‌زمینی به جدایه قارچ *A.flavus* آفلاتوکسین‌زا

برای ارزیابی حساسیت ارقام بادام زمینی به رشد *A. flavus*، میانگین درصد تشکیل پرگنه قارچ مذکور بر روی مغز نمونه‌های بادام‌زمینی بر اساس سطح پرگنه شده و میزان اسپور تولیدی در طی هشت روز پس از تلقیح مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). همانطور که مشاهده می‌شود بین میانگین درصد تشکیل پرگنه واریته‌های مختلف در پایان روز اول و دوم، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد اما در روز سوم، در واریته هندی به نحو معنی‌داری به مراتب بیشتر از واریته‌های دیگر است و در نهایت از روز چهارم، میانگین درصد تشکیل پرگنه واریته هندی به میزان ۱۰۰ درصد می‌رسد. میانگین درصد تشکیل پرگنه در واریته چینی تنها در روز سوم با واریته هندی دارای اختلاف معنی‌دار بود و در روزهای دیگر با وجود کمتر بودن میزان کلنیزاسیون واریته چینی از واریته هندی این اختلاف، معنی‌دار نبود. همچنین اختلاف در میانگین درصد تشکیل پرگنه واریته چینی با واریته‌های گلی و محلی از روز سوم به بعد کاملا معنی‌دار بود.

واریته‌های گلی و محلی در پایان روز اول تا پایان روز ششم، اختلاف معنی‌داری نداشتند و از روز هفتم این اختلاف مشاهده شد به نحوی که تشکیل پرگنه بر روی واریته محلی به طور معنی‌داری بیشتر از واریته گلی بود. در مرحله بعد، پس از رشد قارچ بر روی مغز بادام‌زمینی ارقام مختلف، میزان اسپور تولید شده هر واریته محاسبه گردید. همانطور که انتظار می‌رفت در ارقامی که *A. flavus* رشد بیشتری در سطح مغز بادام‌زمینی داشت، میزان اسپورزایی آن نیز بیشتر بود. واریته هندی بیشترین و واریته گلی کمترین میزان اسپور تولیدی را داشتند (جدول ۳). با توجه به میزان تشکیل پرگنه و تعداد اسپور تولیدی، می‌توان نتیجه گرفت که از بین واریته‌های مورد بررسی، واریته‌های گلی و محلی به ترتیب مقاوم‌ترین و واریته‌های هندی و چینی به ترتیب حساس‌ترین واریته‌های بادام زمینی در برابر هجوم *A. flavus* به شمار می‌آیند (شکل ۱). پس از محاسبه میزان اسپور تولیدی، در بخش دیگری از این پژوهش، میزان تولیدآفلاتوکسین B_1 پس از هشت روز نگهداری نیز تعیین شد (جدول۳). بر اساس نتایج بدست آمده، در رقم هندی که بالاترین میزان حساسیت به کپک *A. flavus* را داشت، بیشترین میزان آفلاتوکسین B_1 تولید شد در حالی‌که در واریته گلی که مقاوم‌ترین واریته بود کمترین میزان آفلاتوکسین تولید گردید. با توجه به اینکه *A. flavus*، طیف وسیعی از محصولات کشاورزی را مورد حمله قرار می‌دهد، یکی از موثرترین و مهم‌ترین راه‌حل‌هایی که به کمک آن می‌توان بر این معضل فائق آمد، بررسی میزان مقاومت و یا به عبارت دیگر حساسیت ارقام مختلف یک محصول و انتخاب مقاوم‌ترین ارقام نسبت به رشد این کپک و بالطبع آفلاتوکسین تولیدی ناشی از رشد آن می‌باشد (Ghewande و همکاران،۱۹۹۳). نتایج این پژوهش همانند نتایج Asis و همکاران (۲۰۰۵)، Gradziel و همکاران (۱۹۹۴)، Ghewande و همکاران (۱۹۹۳) و محمدی مقدم (۱۳۷۸) نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان رشد *A. flavus* بر روی مغز دانه‌های روغنی ارقام مختلف و اسپور تولیدی از آن‌ها وجود دارد و میانگین درصد تشکیل پرگنه بر روی ارقام مقاوم‌تر به مراتب کمتر و متعاقبا دارای اسپور و همچنین آفلاتوکسین تولیدی کمتری هستند. بر اساس نتایج جداول ۱، ۲ و ۳، واریته گلی با مقاومت بالاتر، بطور معنی‌داری دارای میزان پروتئین و اسید اولئیک بیشتر و همچنین میزان چربی و اسید لینولئیک کمتر و واریته هندی با مقاومت کمتر، دارای میزان چربی و اسید لینولئیک بیشتر و همچنین مقدار پروتئین و اسید اولئیک کمتری بود. Shi-hua و همکاران (۲۰۰۶)، نشان دادند که واریته‌های بادام‌زمینی با مقاومت بالا نسبت به رشد *A. flavus* دارای پوسته‌ای با لایه مومی ضخیم و لایه اپیدرمی یکپارچه و محکم‌تری هستند و در عوض، پوسته دانه‌های با حساسیت زیادتر دارای لایه مومی با ضخامت کمتر و لایه اپیدرمی نرم‌تری می‌باشند. این محققین در ادامه اعلام کردند که بین مواد ذخیره‌ای موجود در بادام زمینی با مقاومت آنها در برابر کپک *A. flavus* ارتباط معنی‌داری وجود دارد. بطوریکه واریته‌های با مقاومت بالاتر دارای اسید اولئیک و پروتئین بیشتری هستند و در عوض واریته‌های با حساسیت بالاتر، دارای چربی و اسید لینولئیک بیشتری هستند. Burow و همکاران (۲۰۰۰) نیز دریافتند که بادام زمینی‌های با مقاومت بالاتر نسبت به نفوذ *A. flavus*، دارای اسید اولئیک بیشتری می‌باشند، بنابراین نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابق با نتایج سایر محققین می باشد

جدول۲- مقایسه میانگین درصد تشکیل پرگنه *A. flavus* بر روی ارقام مختلف بادام‌زمینی در طی ۸ روز نگهداری

واریته	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم	روز هشتم
هندی	۲/۰۰۳±۱/۶۴^{a}	۵/۱۸±۱/۹۹^{ab}	۹۵/۹۶±۴/۹۴^{a}	۱۰۰±۰^{a}	۱۰۰±۰^{a}	۱۰۰±۰^{a}	۱۰۰±۰^{a}	۱۰۰±۰^{a}
چینی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۹/۳۱±۲/۸۱^{a}	۵۱/۰۴±۵/۸۴^{b}	۸۵/۰۳±۴/۷۲^{a}	۹۱/۵۸±۱/۲۱^{a}	۹۵/۲۱±۱/۲۱^{a}	۹۵/۲۱±۱/۲۱^{a}	۹۵/۲۱±۱/۲۱^{a}
محلی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۱/۵۵±۱/۰۷۲^{b}	۲۱/۴۸±۵/۶۸^{bc}	۵۱/۶۷±۷/۱^{b}	۶۷/۴۱±۷/۹۱^{b}	۷۸/۵۵±۶/۹۵^{b}	۸۷/۸۴±۷/۵۸^{b}	۸۹/۶۰±۷/۳^{b}
گلی	۰/۴۷±./۱۸^{a}	۲/۶۵±۲/۱۱^{b}	۱۸/۶۶±۴/۴۹^{c}	۶۶/۷±۵/۱۸^{b}	۷۴/۸۹±۶/۶۲^{b}	۷۴/۸۹±۶/۶۲^{b}	۸۰/۶۶±۶/۶۴^{c}	۸۱/۶۱±۷/۰۵^{c}

حروف مشابه در هر ستون، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

جدول۳- مقایسه میزان اسپور و آفلاتوکسین قبل از تلقیح و پس از گذشت هشت روز از تلقیح با *A. flavus* در ارقام مختلف بادام زمینی

ارقام بادام زمینی	میزان اسپور قبل از تلقیح	میزان اسپور در هر میلی لیتر بعد از تلقیح (log_{10})	میزان آفلاتوکسین قبل از تلقیح (ppb)	میزان آفلاتوکسین بعد از تلقیح (ppb)
هندی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۷/۹۷±۶/۳^{a}	۰/۰۰۰±۰^{a}	۴۴۶/۱۲±۱۹/۵۵^{a}
چینی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۷/۵۸±۶/۳۲^{b}	۰/۰۰۰±۰^{a}	۳۸۹/۹۳±۵/۶۹^{b}
محلی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۷/۰۹±۵/۹۶^{c}	۰/۰۰۰±۰^{a}	۳۵۴/۲۳±۱۰/۲^{b}
گلی	۰/۰۰۰±۰^{a}	۶/۸۲±۵/۹۲^{d}	۰/۰۰۰±۰^{a}	۲۷۴/۳±۱۶/۷۳^{c}

حروف مشابه در هر ستون، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

شکل ۱- میزان رشد کپک *A. flavus* بر روی سطح نمونه‌های بادام‌زمینی واریته‌های هندی (سمت راست) و گلی (سمت چپ) در پایان ۸ روز گرمخانه‌گذاری.

تاثیر کپک *A. flavus* بر اسیدهای چرب اولئیک، لینولئیک و عدد پراکسید روغن بادام‌زمینی

یکی از اهداف مهم این پژوهش، بررسی تاثیر رشد کپک *A. flavus* بر روی مقدار پراکسید و اسیدهای چرب روغن بادام زمینی بود. نتایج حاصل از تعیین عدد پراکسید در جدول ۴ آورده شده است. پراکسید روغن بادام‌زمینی اولیه در دامنه تعریف شده استاندارد ایران (شماره ۱۴۴) قرار داشت اما پس از تلقیح اسپور و رشد کپک، پراکسید روغن بادام‌زمینی همراه با ریسه‌های کپک بطور معنی‌داری در واریته‌های هندی و چینی افزایش یافت. در حالی‌که با جداسازی ریسه‌های کپک، میزان پراکسید در تمام واریته‌ها نسبت به زمانی که پراکسید در حضور ریسه‌های کپک اندازه‌گیری شده بود کاهش یافت. بر اساس نتایج بدست آمده با رشد کپک بر روی مغز بادام‌زمینی، اسید اولئیک و لینولئیک موجود در روغن واریته‌های مختلف به شکل معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۵). Calvo و همکاران (۱۹۹۹)، با بررسی نقش اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک در رشد *Aspergillus* دریافتند که کپک مذکور دارای ژنی است که توانایی تبدیل اسید اولئیک به اسید لینولئیک را دارد و با ایجاد جهش در آن، میزان تولید اندام‌های کپک کاهش می‌یابد. بر اساس نتایج Calvo و همکاران (۱۹۹۹)، در فیلامنت‌های کپک *Aspergillus*، مولکول‌های مشتق شده از اسید لینولئیک که فاکتورهای Psi نامیده می‌شوند تولید اندامک‌های جنسی و غیرجنسی را بر عهده دارند. فاکتورهای Psi مخلوطی از ۳ مولکول اسید هیدروپراکسی لینولئیک با نام‌های Psi $A1_{\alpha}$، Psi $B1_{\alpha}$ و Psi $C1_{\alpha}$ هستند که ترکیب اول، تولید اندامک‌های غیرجنسی و دو ترکیب دیگر تولید اندامک‌های جنسی را بر عهده دارند. Torres و همکاران (۲۰۰۰)، میسیلیوم‌های رشد یافته *A. flavus* بر روی تخم آفتابگردان را جدا کرده و پس از شستشو با حلال‌های دارای مقادیر قطبیت متفاوت، آن‌ها را در ایزواکتان حاوی اسید اولئیک و ۱- پروپانول، یا ۱- پروپانول به تنهایی به حالت سوسپانسیون در آوردند. پروپیل اولئات و پروپیل لینولئات در تمام موارد پس از ۲۴ ساعت، افزایش یافت. محققین مذکور دلیل این افزایش را حضور اسیدهای چرب روغن آفتابگردان بیان نمودند که کپک برای رشد خود از آن‌ها استفاده کرده است. این محققین اظهار داشتند که اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک پس از اکسیداسیون به شکل هیدروپراکسید توسط *A. flavus* برای تولید اندامک‌های جنسی و غیرجنسی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از طرفی Kiatsimkul و همکاران (۲۰۰۶)، نشان دادند آنزیم لیپاز به دست آمده از *Aspergillus niger* می‌تواند به‌طور انتخابی اسیدهای چرب اشباع روغن سویا را هیدرولیز کند. Sariyar و همکاران (۲۰۰۳)، با تحقیق بر روی فندق دریافتند که *A. flavus* توانایی تولید لیپاز را داشته و از طریق فعالیت لیپازی خود قادر است تری اسیل گلیسرول را هیدرولیز و اسیدچرب آزاد تولید نماید. همچنین تولید آفلاتوکسین توسط این کپک بعنوان یک کاتالیزور، موجب افزایش تولید آنزیم لیپاز می‌شود (Chaudhry، ۱۹۹۶). در این پژوهش نیز با افزایش مقدار تشکیل پرگنه در سطح مغز بادام‌زمینی، میزان پراکسید در روغن استخراج شده از بادام‌زمینی همراه با ریسه‌های کپک، افزایش و میزان اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک، کاهش یافت. از طرفی میزان پراکسید در روغن استخراج شده از بادام‌زمینی پس از جداسازی ریسه‌های کپک، کاهش پیدا کرد که می‌تواند به علت جذب ترکیبات هیدروپراکسید توسط ریسه‌های کپک برای تولید اندامک‌های جنسی و غیرجنسی باشد (Torres و همکاران، ۲۰۰۰).

جدول ٤- مقدار پراکسید تولید شده (meq/kg) در روغن نمونه‌های بادام‌زمینی همراه با ریسه‌های کپک و پس از جداسازی ریسه‌های کپک در پایان هشت روز پس از تلقیح کپک *A. flavus*

واریته	پراکسید نمونه‌های شاهد	پراکسید همراه با ریسه‌کپک	پراکسید پس از جداسازی ریسه کپک
هندی	۱/۹۹۸±۰/۰۰۲^{c}	۲۲/۱۰۵^{a}	۰/۰۴^{d}
چینی	۱/۸۸۶±۰/۰۰۸^{c}	۶/۹۳۲^{b}	۰/۰۴^{d}
گلی	۱/۸۲±۰/۰۵^{c}	۳/۸۶۸^{c}	۰/۰۰^{d}
محلی	۱/۹۲۶±۰/۰۳^{c}	۲/۹۳۸^{c}	۰/۰۰^{d}

حروف مشابه در هر ستون و همچنین حروف مشابه ستون‌های دوم با سوم (Standard Error=0.55) و ستون‌های سوم با چهارم (Standard Error=0.0291) نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

جدول۵- تاثیر تلقیح کپک *A. flavus* بر میزان اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک در پایان هشت روز پس از تلقیح کپک

اثر متقابل (واریته- اسپور)	اسید اولئیک٪	اسید لینولئیک٪
واریته محلی [۱]	۵۷/۳۹۱^{a}	۲۱/۲۰۸^{cd}
واریته گلی [۱]	۵۶/۱۸۸^{a}	۲۳/۵۰۷^{c}
واریته هندی [۱]	۴۰/۵۵۹^{de}	۳۴/۴۵۴^{a}
واریته چینی [۱]	۴۲/۶۹۱^{cd}	۳۳/۴۹۹^{ab}
واریته محلی [۲]	^{b}۵۳/۸۲	^{e}۱۵/۶۷۵
واریته گلی [۲]	^{b}۵۱/۱۹۹	^{de}۱۷/۶
واریته هندی [۲]	۳۶/۶۶۳^{e}	۲۹/۰۷۵^{b}
واریته چینی [۲]	۳۲/۰۷۶^{f}	۲۰/۹۸۷^{cd}
Standard Error = 1.304		Standard Error = 1.106

حروف مشابه در هر ستون، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد (۱= نمونه‌های شاهد و ۲= نمونه‌های تلقیح شده با اسپور).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تلقیح *A. flavus* به واریته‌های رایج بادام‌زمینی استان گلستان، منجر به تغییر میزان اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک و همچنین اندیس پراکسید می‌گردد. به نحوی که با افزایش میزان کلنیزاسیون این کپک در سطح مغز بادام‌زمینی، میزان پراکسید در روغن استخراج شده از آن، افزایش و میزان اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک، کاهش یافت. همچنین در بین واریته‌های بادام‌زمینی مورد بررسی در این پژوهش، واریته گلی و واریته هندی به ترتیب کمترین و بیشترین حساسیت را به *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین B_1 دارا بودند. علاوه بر این، واریته گلی با مقاومت بالاتر، بطور معنی‌داری دارای میزان پروتئین واسید اولئیک بیشتر و همچنین میزان چربی و اسید لینولئیک کمتر و واریته هندی با مقاومت کمتر، دارای میزان چربی و اسید لینولئیک بیشتر و همچنین مقدار پروتئین و اسید اولئیک کمتری بود.

منابع

AOAC. 2000. Official methods of analysis, Association of official analytical chemist. EUA.

Asis, R., Barrionuevo, D. L., Giorda, L. M., Nores, M. L., & Aldao, M. A. 2005, Aflatoxin production in six peanut genotypes infected with A. flavus and A. parasiticus, isolated from peanut production area of Cordoba Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9274-9280.

Brown, A. 2012, Situation and outlook. In: 2012 Peanut Information, Borth Carolina State University Coop. Ext. Ser. *Publication* AG-331, pp. 4-5.

Calvo, A. M., Hinze, L. L., Garner, H. W., & Keller, N. P. 1999, Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of Aspergillus spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3668-3673.

Calvo, A. M., Garner, H. W., & Keller, N. P. 2001, Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in Aspergillus nidulans. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 25766-25774.

Cunningham, S. C., Vasavada, P. C., Deak, T., & Fung, D. 2006. Rapid detection of mycotoxigenic molds and mycotoxins in fruit juice. J. ARI The Bulletin of the Istanbul Technical University, 54(4), 28-38.

Chaudhry, Z. 1996, Effect of aflatoxicosis on chich muscle, fat and bone growth and possible reversal of aflotoxicosis

by nandrolome decanoate. PhD Thesis. Punjab university.
Danehower, D., & York, A. C. 2012, Interactions of agrochemicals applied to peanut; part 2: Effects on fungicides. *Journal of Crop Protection*, 41,143-149.
Ghewande, M. P., Nagaraj, G., Desai, S., & Narayan, P. 1993, Screening of groundnuts bold seeded genotypes for resistance to A. flavus seed colonization and less aflatoxin production. *Seed Science and Technology*, 21, 45-51.
Gradziel, T. M., & Wang, D. 1994, Susceptibility of California almond cultivars to aflatoxigenic Aspergillus flavus. *Hort Science*, 29, 33-35.
Hoskisson, P. A., Hobbs, G., & Sharples, G. P. 2000, Response of Micromonospora (NCIMB 12744) spores to heat treatment with evidence of a heat activation phenomenon. *Letters Applied Microbiology*, 30, 114-117.
International Crops Research Instiute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). 2004.
Institute of standards and industrial research of Iran. 1983. Hydrogeneated vegetable oils. Revised 5th Edition. *ISIR number*: 144.
Institute of standards and industrial research of Iran. 2008. Foods and agricultural products Method of sampling for official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. ISIR number: 12004.
Islamic republic of Iran ministry of agriculture-jahad. Department of Statistics and Information, 2007.
Kiatsimkul, P. P., Sutterlin, W. R., & Suppes, G. J. 2006, Selective hydrolysis of epoxidized soybean oil by commercially available lipases: effect of epoxy group on the enzymatic hydrolysis. *Molecular Catalysis* B: enzymatic, 41(1-2), 55-60.
Klich, M. A., Samson, R. A., & members of the international commission on Penicillium and Aspergillus. 2006, Aspergillus reference cultures.
Leszczynska, J., Maslowska, J., Owczarek, A., & Kucharska, A. 2001, Determination of aflatoxins in food products by ELISA method. *Journal of Food Science*, 19(1), 8-12.
Li, P., Zhang, Q., & Zhang, W. 2009, Immunoassays for aflatoxins. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(9), 1115-1126.
Mohammadi Moghadam, M. 1999. Assessment of Sensitivity Level of Pistachio Cultivars To aflatoxigenic Aspergillus Flavus and evaluation of amount of aflatoxin B1 production. *Master's thesis,* Tarbiat Modarres University, 144 pp.
Nagarajan, V., & Remesh, V. B. 1992, Aflatoxin production in peanut varieties by A.flavus link and A.parasiticus speare. *Journal of Applied Microbiology*, 25(2), 319-321.
Rai, M. K., Bonde, S. R., Ingle, A. P., & Gade, A. K., 2012, Mycotoxin: rapid detection, differentiation and safety. Pharmaceutical Education and Research, 3(1), 22-34.
Shi-hua, S., Hai-xia, W., Chun-juan, L., Shu-bo, W., Hong-tao, L., & Guo-young, J. 2006, Research of seed testa structure and storage material of peanut germplasm with different resistance to A.flavus. *Agricultural Sciences in China*, 5(6):478-482.
Sariyar, L., & Heperkan, D. 2003, The role of A. flavus and A. niger in the hydrolysis of hazelnut fat. *Journal of Food science & Technology*, 38(4), 487-492.
SAS. 2003, SAS User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition.SAS Institute, Cary, NC, USA.
Torres, M., Emerson, B., Loscos, V., & canela, R. 2000, Lipase activity of resting cells of Aspergillus from endogenous substrate arising from the original growth medium. *Biotechnology Letters*, 22(15), 1265-1268.
Seghti, M. 1994, Evaluation of food and Medicinal value of a variety of peanuts in the Iran market. *Master's thesis*, Tarbiat Modarres University, 132pp.
United States Department of Agriculture (USDA) 2002, Aflatoxin handbook. USDA nutrient data base for standard reference.
Wen Sun, D. 2008, Modern techniques for food authentication. University College Dublin. P: 476-520.
Zamora, R., & Hidalgo, F. 2004, Fatty acids, In: Food Analysis. Eds. Nalet, L. M. L. CRC press. P: 221-261.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 394-402

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۰۲-۳۹۴

Evaluation of the effect of *Aspergillus flavus* inoculation on fatty acids, proxide value and aflatoxin production in four common varieties of peanut cultivated in Golestan province

M. Ebrahimi[1]- M. Khomeiri[2*]- Y. Maghsodlo[3]

Received: 2014.04.13
Accepted: 2014.10.04

Introduction: Toxigenic fungi such as *A. flavus* grow widely in peanut and produce aflatoxins, a group of carcinogenic metabolites. Aflatoxin produced in peanut differed from the genetic variety of plant. The high humidity and moderate temperatures in the subtropical Caspian littoral of northern Iran could increase the growth of *A. flavus* and the production of aflatoxin. The objectives of this study were 1) to determine the chemical composition of peanut cultivars grown in Golestan Province, Iran, 2)to select resistant variety of peanut to aflaoxigenic *A. flavus growth* and 3) to evaluate relationship between *A. flavus* growth and changes in oleic and linoleic acid content and peroxide value.

Materials and method: Peanut samples were used from four important varieties of peanut, Goli, Mahalli, China and India. those have been harvested from farms in Golestan province, Iran. Fat, protein, ash, moisture, reducing sugar, AFB_1 content and peroxide value in each sample were measured by the standard method of AOAC. Fatty acids of the peanut seed oil were analyzed using gas chromatography (GC, Varian CP-3800 model) with a flame ionization detector (FID) and a DB-WAX column (50 m × 0.32 mm ×0.2 µm). To study the effects of *A. flavus* on peanut varieties, they were sterilized with 0.5% NaClO solution and then one ml of *A. flavus* spore suspension was added to every 20gr disinfected peanut and was placed in the incubator for eight days at 26°C. After incubation, the number of seeds colonized by fungi, spore production, AFB_1 production, the association between colonization rate of hydrolysis of fatty acids and peroxide value were determined.

Results and Discussion: The results showed that there were significant differences ($P<0.05$) in the oil, moisture, protein, ash, reducing sugar, oleic acid and linoleic acid content between peanut varieties. Average values for the main constituents of peanuts are the following: (oil: 44.77-51.26% , moisture: 3.33-3.56%, protein: 20.02-24.28%, Ash: 1.98-2.43%, reducing sugar: 3.56-4.53%, oleic acid: 43.16-59.33% and linoleic acid: 25.19-36.84%).

In order to study the susceptibility of peanut varieties to aflatoxigenic, *A.flavus* growth, colonization rate, aflatoxin B_1 and spore production on peanut kernels were evaluated at the end of 8 days of incubation. The results showed that there were also significant differences ($P<0.05$) between the colonization rates for different peanut varieties at the eighth day of inoculation. The India and China varieties had the highest colonization rates, at 100 and 95.21%, respectively. The Goli and Mahali varieties had the lowest colonization rates, at 81.61 and 89.6%, respectively. Furthermore, at the end of the eighth day of inoculation, *A. flavus* had covered the India and China varieties completely, but had covered the Goli and Mahali varieties only slightly. For this reason, additional experiments evaluated the content of spore production with a haemocytometer. It was observed that the Goli variety had the minimum spore production, and the India variety had the maximum spore production. Therefore, it can be said that the India variety was most susceptible to the *A. flavus*, followed by (in descending order) the China, Goli and Mahali varieties. Dissimilarity in host resistance to aflatoxigenic *A. flavus* is due to difference in host genotype. One of the strategies to decrease the risk of aflatoxin contamination is the cultivation of genotypes with resistance to *Aspergillus* infection. Some factors found to be associated with resistance to seed colonization by aflatoxigenic *A. flavus* are cell structure, cell arrangement, permeability, wax layer and tannin content, fatty acid and amino-acid peanut components.

In another part of the study, the production of aflatoxin was assessed. Results indicated that the India (highest sensitivity to mold) and Goli (least sensitivity to mold) varieties were contained the maximum and minimum aflatoxin content, respectively. Results also showed that growth of *A. flavus* on peanut increased the proxide

1- PhD student, Department of Food Science and Technology, Agriculture Science and Natural Resources university of Gorgan, Gorgan, Iran.
2- Associated Professor, Department of Food Science and Technology, Agriculture Science and Natural Resources university of Gorgan, Gorgan, Iran.
3- Professor, Department of Food Science and Technology, Agriculture Science and Natural Resources university of Gorgan, Gorgan, Iran.
(*Corresponding Author Email: mkhomeiri@yahoo.com)

value whereas decreased oleic and linoleic acid content. *A. flavus* hydrolyzes oil when grown on the oil medium and produces free fatty acid. *Aspergillus* uses of free fatty acid (oleic and linoleic acid) in form of hydroperoxy for production of sexual and asexual bodies. Therefore with production of hydroperoxy molecules increase proxide value and decreased oleic and linoleic acid content in the oil peanut that extracted of peanut with mycelium.

Conclusion: Linoleic acid and fat content had significant relationship with *A. flavus* growth and AFB1 production. it seems, it is possible to control the *A. flavus* growth and AFB_1 production by Choosing varieties that have less acid linoleic and fat content.

Keywords: *Aspergillus flavus*, Direct competitive ELISA, Gas chromatography, Aflatoxin B_1.