دانشگاه فردوسی مشهد
دانشکده کشاورزی
رساله دکتری

تعیین گونه های غالب قارچهای مولد آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در فلفل قرمز (ادویه بومی استان خراسان) و بررسی تاثیر شرایط مختلف نگهداری و روشهای مختلف آلودگی زدایی بر میزان این مایکوتوکسین ها

روزیتا سالاری

استادان راهنما
دکتر محمد باقر حبیبی نجفی – دکتر محمد طاهر بروشکی
استادان مشاور
دکتر سید علی مرتضوی – دکتر محسن فتحی نجفی

بهمن ۱۳۹۱

چکیده

این مطالعه با هدف ارایه اطلاعات مفید در مورد میزان آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در فلفل قرمز (ادویه بومی استان خراسان) به منظور ارزیابی خطر مصرف این محصول و همچنین مطالعه بهترین شرایط نگهداری محصول و انتخاب بهترین روش آلودگی زدایی آن قبل از عرضه انجام شده است. نتایج نشان داد که تمامی نمونه های فلفل قرمز مورد بررسی در این مطالعه به گونه های قارچی و باکتریایی آلوده بودند. فلور کپکی نمونه، براساس روشهای مبتنی بر کشت، در محدوده $۲/۴\times۱۰^{۳}$ cfu/g تا $۴/۶\times۱۰^{۶}$ cfu/g شمارش گردید. مطالعات میکروسکوپی کلنی های کپکی نشان داد که ۹۱ در صد از نمونه های فلفل قرمز آلوده به جنس آسپرژیلوس، ۵۸ درصد آلوده به جنس پنی سیلیوم، ۳۳ درصد آلوده به جنس رایزوپوس و۳۳ درصد آلوده به جنس آلترناریا بودند. با استفاده از روش PCR و انجام عمل توالی یابی بر روی DNA کلنی های آسپرژیلوس و پنی سیلیوم ایزوله شده از نمونه ها، گونه های *Aspergillus flavus*، *Aspergillus tubingensis* و *Penicillium chrysogenum* شناسایی گردید. نتایج حاصل از انجام کروماتوگرافی TLC نشان داد که در بین سوش های ایزوله شده، ۸۰٪ از سوش های *Aspergillus flavus* قادر به تولید آفلاتوکسین B1 و ۵٪ از سوش های *Aspergillus tubingensis* قادر به تولید اکراتوکسین A بودند و سایر گونه های آسپرژیلوس و همچنین جنس های پنی سیلیوم، آلترناریا و رایزوپوس توانایی تولید آفلاتوکسین B1 یا اکراتوکسین A را نداشتند. ۶۹/۴ و ۱۶/۷ درصد از نمونه های فلفل قرمز به ترتیب توسط آفلا توکسین B1 و اکراتوکسین A در سطوح مقادیر ۱۵/۶-۰/۴ میکروگرم بر کیلوگرم و ۲/۱۷-۰/۷۴ میکروگرم بر کیلوگرم آلوده بودند. بین روش ELISA و HPLC در تعیین میزان آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A، همبستگی خوبی مشاهده گردید (r^2=0/979 و r^2=0/947). بررسی تاثیر شرایط دمایی و رطوبتی در دوره نگهداری نشان داد که دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۹۵ درصد، بهترین شرایط برای تولید آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A می باشد و با کاهش رطوبت نسبی و دمای نگهداری به پایین تر از ۷۵ درصد و ۱۰ درجه سانتی گراد، می توان به جلوگیری از تولید این سموم و آلودگی محصول به آنها در دوره نگهداری کمک کرد. مقایسه نتایج بدست آمده در زمینه تاثیر روشهای مختلف آلودگی زدایی بر میزان مایکوتوکسین ها، ویژگی های فیزیکوشیمیایی و ویژگی های میکروبی نشان می دهد که در روش پرتودهی گاما، علاوه بر اینکه میزان آلودگی میکروبی و میزان آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A بطور محسوسی در محصول کاهش پیدا می کند، کمترین تاثیر منفی در ویژگیهای فیزیکو شیمیایی محصول مشاهده می گردد.

کلید واژه ها: آفلاتوکسین B1، اکراتوکسین A ، روشهای آلودگی زدایی، شرایط نگهداری، فلفل قرمز

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول- مقدمه..... ۱
۱-۱- اهداف طرح ۵

فصل دوم- بررسی منابع ۷
۲-۱- تعریف ادویه ۷
۲-۲- ادویه فلفل قرمز ۱۰
۲-۲-۱- تاریخچه ۱۰
۲-۲-۲- ریشه شناسی لغت ۱۱
۲-۲-۳- گیاه شناسی فلفل ۱۲
۲-۲-۴- شرح ریخت شناسی ۱۲
۲-۲-۵- ترکیبات گیاه ۱۳
۲-۲-۶- خواص دارویی فلفل قرمز ۱۵
۲-۲-۷- شرایط آب وهوایی و رشد گیاه ۱۶
۲-۳- مایکوتوکسین ها ۱۷
۲-۳-۱- تعریف مایکوتوکسین ها ۱۷
۲-۳-۲- طبقه بندی مایکوتوکسین ها ۱۸
۲-۳-۳- خواص عمومی مایکوتوکسین ها ۱۹
۲-۳-۴- قارچهای مولد مایکوتوکسین ۲۰
۲-۳-۵- عوامل مهم در رشد کپک های مولد مایکوتوکسین ۲۲
۲-۳-۵-۱- دما ۲۲
۲-۳-۵-۲- رطوبت ۲۲
۲-۳-۵-۳- آفات ۲۲
۲-۳-۵-۴- شکستگی و صدمات مکانیکی ۲۳
۲-۳-۵-۵- نسبت گازها در هوا ۲۳
۲-۳-۶- آفلا توکسین ۲۳
۲-۳-۷- اکراتوکسین ۲۵

۲-۳-۸- مسیرهای قرار گیری انسان در معرض مایکوتوکسین ها ۲۷
۲-۳-۹- اثرات بیولوژیک مایکوتوکسین ها ۲۹
۲-۳-۱۰- مکانسیم اثر مایکوتوکسین ها ۲۹
۲-۳-۱۰-۱- تداخل با مولکول DNA ۳۰
۲-۳-۱۰-۲- مهار فرایندهای همانند سازی، نسخه برداری و ترجمه ۳۰
۲-۳-۱۰-۳- تاثیر بر غشای سلولی و متابولسیم انرژی ۳۱
۲-۳-۱۱- مراحل کنترل مایکوتوکسین ها و نقاط کنترل بحرانی ۳۲
۲-۳-۱۱-۱- کنترل پیش از برداشت (Pre – harvest) ۳۲
۲-۳-۱۱-۲- کنترل حین برداشت (Harvest) ۳۳
۲-۳-۱۱-۳- کنترل پس از برداشت (Post – harvest) ۳۳
۲-۳-۱۲- شیوه های حذف مایکوتوکسین ها از مواد غذایی ۳۴
۲-۳-۱۲-۱- روشهای حذف آفلاتوکسین ۳۶
۲-۳-۱۲-۲- روشهای غیرفعال سازی آفلاتوکسین ۳۶
۲-۳-۱۳- روشهای شناسایی و اندازه گیری مایکوتوکسین ها ۳۷
۲-۳-۱۳-۱- کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) ۳۸
۲-۳-۱۳-۲- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ۳۹
۲-۳-۱۳-۳- آزمون الیزا (ELISA) ۴۲
۲-۳-۱۴- میزان مجاز مایکوتوکسین ها و مقررات مربوطه ۴۵

فصل سوم- مواد و روش ها ۴۹
۳-۱- ارزیابی کیفیت فیزیکوشیمیایی و میکروبی فلفل قرمز ایرانی ۴۹
۳-۱-۱- نمونه گیری ۴۹
۳-۱-۱- آماده سازی نمونه ها ۴۹
۳-۱-۲- آزمایش های میکروبی ۵۰
۳-۱-۲-۱- شمارش کلی میکروارگانیسم ها ۵۱
۳-۱-۲-۲- شمارش کلی فرم ها ۵۱

۳-۱-۲-۳- جستجوی اشرشیا کلی ۵۲
۳-۱-۲-۴- جستجوی کلستریدیوم پرفرانژنس ۵۲
۳-۱-۲-۵- شمارش کپک ۵۳

۳-۲- شناسایی مورفولو ژیکی و مولکولی فلور قارچی فلفل قرمز و بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در آنها ۵۳
۳-۲-۱- نمونه گیری ۵۳
۳-۲-۲- تهیه جدایه کپک ها ۵۴
۳-۲-۳- شناسایی جنس و گونه کپک ها بر پایه مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی ۵۴
۳-۲-۴- تایید جنس کپک های شناسایی شده با استفاده از روش PCR ۵۵
۳-۲-۴-۱- جداسازی DNA از کپک ۵۵
۳-۲-۴-۲- کنترل کمیت و کیفیت DNA مورد آزمون ۵۶
۳-۲-۴-۲-۱- الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۵۶
۳-۲-۴-۲-۲- تعیین کمیت DNA ۵۷
۳-۲-۴-۳- مطالعات بیو انفور ماتیک و طراحی پرایمرهای اختصاصی ۵۷
۳-۲-۴-۳-۱- تهیه پرایمر ۵۷
۳-۲-۴-۴- روش PCR ۵۸
۳-۲-۴-۴-۱- تکثیر DNA توسط PCR ۵۸
۳-۲-۴-۴-۲- برنامه دستگاه ترموسایکلر برای PCR ۵۸
۳-۲-۵- شناسایی جدایه های آسپرژیلوس و پنی سیلیوم در حد گونه از طریق توالی یابی محصولات PCR ۵۹
۳-۲-۵-۱- تخلیص DNA از ژل ۵۹
۳-۲-۶- تعیین توانایی تولید آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A توسط جنس های قارچی شناسایی شده با استفاده از روش TLC ۶۰

۳-۳- اندازه گیری میزان آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در ادویه فلفل قرمز ایرانی با دو روش ELISA و HPLC و مقایسه نتایج ۶۱

۳-۳-۱- نمونه گیری ۶۱
۳-۳-۲- استاندارد ها و معرف ها ۶۲
۳-۳-۳- آنالیز آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A توسط HPLC ۶۳
۳-۳-۳-۱- آماده سازی نمونه ها ۶۳
۳-۳-۳-۱-۱- استخراج و خالص سازی آفلاتوکسین ۶۳
۳-۳-۳-۱-۲- استخراج و خالص سازی اکراتوکسین A ۶۴
۳-۳-۳-۲- اندازه گیری آفلاتوکسین و اکراتوکسین با استفاده از HPLC ۶۴
۳-۳-۳-۳- درجه بندی ۶۵
۳-۳-۳-۴- حد تشخیص و حد تعیین مقدار ۶۶
۳-۳-۳-۵- اعتبار سنجی ۶۶
۳-۳-۴- آنالیز آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A توسط ELISA ۶۷
۳-۳-۴-۱- آماده سازی نمونه ۶۷
۳-۳-۴-۱-۱- استخراج آفلاتوکسین B1 ..... ۶۷
۳-۳-۴-۱-۲- استخراج اکراتوکسین A ۶۷
۳-۳-۴-۲- دستور کار آزمون ELISA برای AFB1 ..... ۶۸
۳-۳-۴-۳- دستور کار آزمون ELISA برای OTA ۶۸

۳-۴- تاثیر شرایط نگهداری در دوره انبارداری بر میزان آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A موجود در فلفل قرمز ۶۹
۳-۴-۱- نمونه گیری ۶۹
۳-۴-۲- استاندارد ها، معرف ها و تجهیزات ۶۹
۳-۴-۳- آماده سازی نمونه ها و شرایط آزمون ۶۹

۳-۵- بررسی تاثیر روشهای مختلف آلودگی زدایی بر میزان کاهش آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A فلفل قرمز ۷۰
۳-۵-۱- نمونه گیری ۷۰
۳-۵-۲- آماده سازی نمونه ها ۷۰

۳-۵-۳- روش های آلودگی زدایی ۷۱
۳-۵-۳-۱- روشهای فیزیکی ۷۱
۳-۵-۳-۲- روشهای شیمیایی ۷۲
۳-۵-۴- آزمونهای فیزیکو شیمیایی ۷۳
۳-۵-۴-۱- اندازه گیری رطوبت ۷۳
۳-۵-۴-۲- اندازه گیری خاکستر کل (بر اساس ماده خشک) ۷۴
۳-۵-۴-۳- اندازه گیری عصاره اتری غیر فرار ۷۵
۳-۵-۴-۴- میزان رنگ طبیعی (کاپسانتین) ۷۶
۳-۵-۴-۵- میزان کاپسائیسین (تندی) ۷۷
۳-۵-۴-۶- روغنهای فرار ۷۹
۳-۵-۵- آزمونهای میکروبی ۸۰
۳-۵-۶- اندازه گیری آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A ۸۱

۳-۶- تجزیه و تحلیل آماری ۸۱

فصل چهارم- نتایج و بحث ۸۳
۴-۱- ارزیابی کیفیت فیزیکوشیمیایی و میکروبی فلفل قرمز ایرانی ۸۳
۴-۱-۱- شمارش کلی میکروارگانیسمها (TAM) ۸۳
۴-۱-۲- کلی فرم ۸۷
۴-۱-۳- اشرشیا کلی ۸۷
۴-۱-۴- کلستریدیوم احیاکننده سولفیت (SRC) ۸۷
۴-۱-۵- کپک ها ۸۸
۴-۱-۶- نتیجه گیری ۸۹

۴-۲- شناسایی مورفولو ژیکی و مولکولی فلور قارچی فلفل قرمز و بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در آنها ۹۰
۴-۲-۱- شناسایی میکروسکوپی کپک ها ۹۰

۴-۲-۲- تایید شناسایی جنس های کپکی با استفاده از روش PCR ۹۴
٤-۲-۲-۱- نتایج مطالعات بیو انفور ماتیک و طراحی پرایمر ها ۹۵
۴-۲-۲-۲- نتایج PCR ۹۶
۴-۲-۳- تعیین گونه آسپرژیلوس و پنی سیلیوم از طریق Sequencing ۹۷
۴-۲-۴- بررسی توانایی تولید آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A ۱۰۷
۴-۲-۵- نتیجه گیری ۱۰۹

۴-۳- اندازه گیری میزان آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در ادویه فلفل قرمز ایرانی با دو روش ELISA و HPLC و مقایسه نتایج ۱۰۹
۴-۳-۱- ارزیابی روش آزمون HPLC ۱۰۹
۴-۳-۲- نتایج آزمون HPLC ۱۱۳
۴-۳-۲-۱- آفلاتوکسین ها ۱۱۳
۴-۳-۲-۲- اکراتوکسین A ۱۱۶
۴-۳-۳- نتایج آزمون ELISA ۱۱۶
۴-۳-۴- مقایسه دو روش ELISA و HPLC ۱۱۷
۴-۳-۵- نتیجه گیری ۱۲۲

۴-۴- تاثیر شرایط نگهداری در دوره انبارداری بر میزان آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A موجود در فلفل قرمز ۱۲۳
۴-۴-۱- تاثیر دما و رطوبت نسبی محیط بر میزان تغییرات آفلاتوکسین B1 ..... ۱۲۴
۴-۴-۲- تاثیر دما و رطوبت نسبی محیط بر میزان تغییرات اکراتوکسین A ۱۲۷
۴-۴- ۳- نتیجه گیری ۱۳۲

۴-۵- بررسی تاثیر روشهای مختلف آلودگی زدایی بر میزان کاهش آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در فلفل قرمز ۱۳۶
۴-۵-۱- تاثیر روشهای آلودگی زدایی در تغییرات میزان آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A ۱۴۰
۴-۵-۲- تاثیر روشهای آلودگی زدایی در تغییرات ویژگی های فیزیکوشیمیایی ۱۴۸

۴-۵-۳- تاثیر روشهای آلودگی زدایی در تغییرات ویژگی های میکروبی ۱۵۳
۴-۵-۴- نتیجه گیری ۱۵۷

۵- نتیجه گیری نهایی و پیشنهادات ۱۵۹
منابع ۱۶۳
فهرست اسامی لاتین ۱۷۹

فهرست شکل ها

عنوان شکل **صفحه**

شکل ۱-۱. فلفل قرمز سبزوار ۵

شکل ۲-۱. ساختار گیاهی فلفل قرمز ۱۴

شکل ۳-۱. نمونه هایی از کلنی های کپک ایزوله شده از فلفل قرمز بر روی محیط کشت..... .....۵۴

شکل ۳-۲. کاربرد اشعه UV در مایکوتوکسین زدایی پودر فلفل قرمز ۷۱

شکل ۳-۳. تجهیزات تولید وتزریق گاز ازن ۷۲

شکل ۳-٤. سوزاندن پودر گوگرد و تولید گاز SO2 .....۷۲

شکل ٤-۱. تصویر کلونی های کپک (سمت چپ) و تصویر میکروسکوپی کپک های ایزوله شده (سمت راست) الف، ب و ج: آسپرژیلوس - د: پنی سیلیوم - و: آلترناریا - ن: رایزوپوس ۹۲

شکل ٤-۲. فراوانی جنسهای قارچی شناسایی شده در نمونه فلفل قرمز سبزوار ۹۴

شکل ٤-۳. الکتروفورز محصول ژن FUF و ASP به ترتیب با استفاده از جفت آغازگرهای FUF1/FUR1 و ASP1/ASP2 بر روی ژل آگارز یک درصد. (M: نشانگر، شماره های ۱ تا ۵ : باندهای مربوط به محصول PCR نمونه ها در محدوده bp ۱۱۶۱، شماره های ۶ تا ۱۰ : باندهای مربوط به محصول PCR نمونه ها در محدوده bp ۳۶۲) ۹۷

شکل ٤-٤. نمونه توالی حاصل از خوانش نوکلئوتیدهای رشته DNA در عمل sequencing ۹۸

شکل ٤-۵. نمایی از blast نمونه ها در سایت NCBI ۱۰۱

شکل ٤-٦. نمونه بلاست توالی های بدست آمده از مرحله توالی یابی . (الف : بلاست توالی کلونی 4B، ب : بلاست توالی کلونی 6A، ج : بلاست توالی کلونی 5A) ۱۰۵

شکل ٤-۷. درصد همخوانی نوکلئوتیدهای موجود در توالی کلونی 6A با توالی آسپرژیلوس توبینجنسیس ۱۰۵

شکل ٤-۸. اختلاف نوکلئوتیدها در Alignment توالی های 6A و 7A و 9D ۱۰۶

شکل ٤-۹. تشکیل باند به رنگ آبی در دستگاه UV دتکتور و شناسایی تولید مایکوتوکسین بر روی کاغذ TLC . الف: استاندارد آفلاتوکسین(سمت راست) و استاندارد اکراتوکسین (سمت چپ)، ب: نمونه های آفلاتوکسیژنیک (به همراه استاندارد آفلاتوکسین در سمت چپ)، ج: نمونه اکراتوکسیژنیک

(به همراه استاندارد اکراتوکسین در سمت راست) ۱۰۸
شکل ٤-١٠. کروماتوگرام های HPLC آفلاتوکسین. (الف) کروماتوگرام استاندارد آفلاتوکسین ها (زمان رانش تزریق: ۱۱ دقیقه ، زمان بازداری: برای AFG2 :۶/۳۲ دقیقه ، برای AFG1 :۷/۳۳ دقیقه ، برای AFB2 :۸/۳۴ دقیقه ، برای AFB1 : ۹/۸۴ دقیقه). (ب) کروماتوگرام نمونه فلفل قرمز آلوده به آفلاتوکسین B1 ..... ۱۱۱
شکل ٤-١١. کروماتوگرام های HPLC اکراتوکسین A. (الف) کروماتوگرام استاندارد اکراتوکسین A (زمان رانش تزریق : ۱۱ دقیقه ، زمان بازداری OTA : ۸/۲۸ دقیقه). (ب) کروماتوگرام نمونه فلفل قرمز آلوده به اکراتوکسین A ۱۱۲
شکل ٤-١٢. همبستگی روشهای HPLC و ELISA در آنالیز آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A ۱۲۰
شکل ٤-١٣. تاثیر متقابل دما و رطوبت نسبی بر تغییرات میزان آفلاتوکسین B1. (الف: پس از گذشت ۳۰ روز نگهداری – ب: پس از گذشت ۶۰ روز نگهداری) ۱۳۲
شکل ٤-١٤. تاثیر متقابل دما و رطوبت نسبی بر تغییرات میزان اکراتوکسین A . (الف: پس از گذشت ۳۰ روز نگهداری – ب: پس از گذشت ۶۰ روز نگهداری) ۱۳۳

فهرست جدول ها

عنوان جدول **صفحه**

جدول ۲-۱. طبقه بندی ادویه ها ۷

جدول ۲-۲. طبقه بندی ادویه ها از نظر عطر و طعم ۸

جدول ۲-۳. ترکیبات اصلی معطر در ادویه ها ۸

جدول ۲-٤. ترکیبات آنتی اکسیدانی در ادویه ها ۱۰

جدول ۲-۵. اختلالات ناشی از مایکوتوکسین ها در انسان ۲۸

جدول ۲-٦. مهار تولید DNA و RNA و پروتئین به وسیله مایکوتوکسین ها ۳۱

جدول ٤-۱. آلودگی میکروبی نمونه های فلفل قرمز ایران ۸۴

جدول ٤-۲. توزیع سطوح آلودگی در نمونه های فلفل قرمز ۸۵

جدول ٤-۳. کیفیت میکروبیولوژیکی ادویه فلفل قرمز ایران ۸۶

جدول ٤-٤. تعداد و درصد سوشهای ایزوله شده از نمونه فلفل قرمز سبزوار ۹۳

جدول ٤-۵. توالی نوکلئوتیدی جفت آغازگرهای مورد استفاده در شناسایی جنسهای آسپرژیلوس و پنی سیلیوم ۹۵

جدول ٤-٦. توانایی تولید آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A توسط جنس های کپکی ایزوله شده از نمونه های فلفل قرمز ۱۰۸

جدول ٤-۷. اعتبار سنجی مقادیر آفلاتوکسین و اکراتوکسین حاصله در HPLC ۱۱۰

جدول ٤-۸. حدود مقادیر آفلاتوکسین و اکراتوکسین در نمونه های حاوی سم (نمونه های مثبت) ۱۱۴

جدول ٤-۹. میزان وقوع آفلاتوکسین ها و اکراتوکسین A در ۳۶ نمونه از یک نوع فلفل قرمز ایرانی ۱۱۵

جدول ٤-۱۰. مقادیر غلظت آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در نمونه های مثبت حاصل از HPLC و ELISA ۱۱۸

جدول ٤-۱۱. محدوده آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A حاصل از HPLC و ELISA در ۳۶ نمونه مورد آزمون ۱۱۹

جدول ٤-۱۲. توزیع آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A حاصل از HPLC و ELISA در ۳۶ نمونه مورد آزمون ۱۱۹

جدول ٤-۱۳. میزان آفلاتوکسین B1 تولید شده در دمای ۱۵ درجه، در رطوبت های نسبی

مختلف و طی ۶۰ روز نگهداری ۱۲۵
جدول ٤-١٤. میزان آفلاتوکسین B1 تولید شده در دمای ۲۵ درجه، در رطوبت های نسبی
مختلف و طی ۶۰ روز نگهداری ۱۲۵
جدول ٤-١٥. میزان آفلاتوکسین B1 تولید شده در دمای ۳۵ درجه، در رطوبت های نسبی
مختلف و طی ۶۰ روز نگهداری ۱۲۶
جدول ٤-١٦. میزان اکراتوکسین A تولید شده در دمای ۱۵ درجه، در رطوبت های نسبی
مختلف و طی ۶۰ روز نگهداری ۱۲۸
جدول ٤-١٧. میزان اکراتوکسین A تولید شده در دمای ۲۵ درجه، در رطوبت های نسبی
مختلف و طی ۶۰ روز نگهداری ۱۲۸
جدول ٤-١٨. میزان اکراتوکسین A تولید شده در دمای ۳۵ درجه، در رطوبت های نسبی
مختلف و طی ۶۰ روز نگهداری ۱۲۹
جدول ٤-١٩. تاثیر دوزهای مختلف اشعه گاما بر تغییرات غلظت آفلاتوکسین B1 و
اکراتوکسین A ۱۴۲
جدول ٤-٢٠. تاثیر شرایط مختلف پرتودهی UV (از نظر فاصله با لامپ و مدت زمان پرتودهی)
در تغییرات غلظت آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A ۱۴۳
جدول ٤-٢١. تاثیر شرایط مختلف استفاده از گاز ازن (از نظر غلظت ازن و مدت زمان تماس)
در تغییرات غلظت آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A ۱۴۵
جدول ٤-٢٢. تاثیر شرایط مختلف گازدهی با SO2 (از نظر میزان گوگرد سوزاندنی و مدت
زمان گازدهی) در تغییرات غلظت آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A ۱۴۶
جدول ٤-٢٣. تاثیر دوزهای مختلف اشعه گاما بر تغییرات ویژگیهای فیزیکوشیمیایی ۱۴۹
جدول ٤-٢٤. تاثیر شرایط مختلف پرتودهی UV (از نظر فاصله با لامپ و مدت زمان پرتودهی)
در تغییرات ویژگیهای فیزیکوشیمیایی ۱۵۰
جدول ٤-٢٥. تاثیر شرایط مختلف استفاده از گاز ازن (از نظر غلظت ازن و مدت زمان تماس)
در تغییرات ویژگیهای فیزیکوشیمیایی ۱۵۱
جدول ٤-٢٦. تاثیر شرایط مختلف گازدهی با SO2 (از نظر میزان گوگرد سوزاندنی و مدت
زمان گازدهی) در تغییرات ویژگیهای فیزیکوشیمیایی ۱۵۲
جدول ٤-٢٧. تاثیر دوزهای مختلف اشعه گاما بر تغییرات ویژگیهای میکروبی ۱۵۳

جدول ٤-٢٨. تاثیر شرایط مختلف پرتودهی UV (از نظر فاصله با لامپ و مدت زمان پرتودهی) در تغییرات ویژگیهای میکروبی ۱۵۴
جدول ٤-٢٩. تاثیر شرایط مختلف استفاده از گاز ازن (از نظر غلظت ازن و مدت زمان تماس) در تغییرات ویژگیهای میکروبی ۱۵۵
جدول ٤-٣٠. تاثیر شرایط مختلف گازدهی با SO2 (از نظر میزان گوگرد سوزاندنی و مدت زمان گازدهی) در تغییرات ویژگیهای میکروبی ۱۵۶

فهرست علائم و اختصارات

معادل فارسی	معادل لاتین	علامت اختصاری
ابزار جستجو تراز پایه	Basic Local Alignment Search Tool	BLAST
الایزا	Enzyme linked immunosorbent assay	ELISA
کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا	High performance liquid chromatography	HPLC
واکنش زنجیره ای پلیمراز	Polymerase chain reaction	PCR
مرکزاطلاعات بیوتکنولوژي	National Center for Biotechnology Information	NCBI
کروماتوگرافی لایه نازک	Thin layer chromatography	TLC

فصل اول- مقدمه

واژه‌های ادویه[1] و چاشنی به آن دسته از فراورده‌های طبیعی گیاهی اطلاق می شود که به صورت گوناگون (کامل و سائیده) از اندامهای مختلف گیاه به منظور افزایش عطر و طعم، تندی و چاشنی درفراورده‌های خوراکی استفاده می شود. ادویه ها به طور کلی جایگاه ویژه ای در سبد خانوار دارا هستند به نحوی که بسیاری از آنها همراه با غذا و بسیاری دیگر بدون فرآوری و به صورت مستقیم مورد مصرف قرار می گیرند. همچنین بسیاری از ادویه ها نیز در تولید سایر فراورده های غذایی به عنوان چاشنی افزوده می گردند. بنابراین با توجه به حجم بالای مصرف آنها، توجه به تولید محصول مطابق با استانداردهای بین المللی، حفظ کیفیت و رعایت نکات بهداشتی در آنها ضروری به نظر می رسد.

از طرفی، بخش کشاورزی از دیرباز به عنوان یکی از مهم ترین بخشهای اقتصادی کشور مطرح بوده است. در دنیای امروز، صنایع تبدیلی و تکمیلی کشاورزی به لحاظ ارزش افزوده بالایی که ایجاد می کنند از اهمیت خاصی برخوردارند. در کشورهایی که به لحاظ نوع اقلیم پتانسیل تولید محصولات کشاورزی از قبیل انواع ادویه وجود دارد، بستر مناسبی برای صادرات محصولات و رشد اقتصادی فراهم می باشد. تولید ادویه به جهت استفاده از تکنولوژی ساده و کم هزینه می تواند منتهی به سودآوری کلان خصوصا در بخش صادرات

[1] Spice

باشد. بنابراین به لحاظ اهمیت کیفیت محصولات صادراتی درجریان رقابت با محصولات دیگر کشورها ، بررسی و توجه به دلایل افت کیفیت ضروری می باشد.

ادویه ها همانند بسیاری از محصولات کشاورزی ممکن است در معرض طیف گسترده ای از آلودگی های میکروبی، قبل ، حین و بعد از برداشت قرار گیرند (مک کی، ۱۹۹۵). ادویه ها اگر چه به مقدار کم استفاده می شوند، به عنوان حامل های قابل توجهی از آلودگی میکروبی خصوصاً قارچهای انباری و برخی از باکتری ها عنوان شده اند (دیمیک و همکاران، ۲۰۰۰؛ روماگنولی و همکاران، ۲۰۰۷). ادویه ها در مناطق گرمسیری با استفاده از روش های سنتی برداشت می گردند بنابراین قبل از اینکه برای جلوگیری از رشد میکروبی به اندازه کافی خشک شوند، از طریق خاک و هوا آلوده می شوند، همچنین امکان آلوده شدن آنها در طول برداشت، حمل و نقل و بسته بندی وجود دارد (نیفل و برگر، ۱۹۹۴).

بسیاری از ادویه ها ماده اولیه مناسبی برای رشدکپک ها بوده و یکی از عمده ترین گروه های مواد غذایی مستعد به آلودگی با مایکوتوکسینها[۲] به ویژه آفلاتوکسین[۳] و اکراتوکسین[۴] (قوی ترین و خطرناک ترین سموم قارچی) می باشند به گونه ای که منابع علمی متعددی در این زمینه وجود دارد .

شایعترین آلودگی قارچی ادویه ها شامل جنسهای آسپرژیلوس و پنی سیلیوم است (سیلیکر و همکاران، ۱۹۹۲ ؛ دیمیک و رینیار، ۱۹۹۵). برخی از گونه هایی که متعلق به این جنس ها هستند، به عنوان تولید کنندگان بالقوه ترکیبات مختلف سمی مانند آفلاتوکسین ها، اکراتوکسین ها و استریگماتوکسین ها شناخته شده اند. این مایکوتوکسینها، اثرات موتاژن، تراتوژن و سرطان زا در انسان و حیوانات بجا می گذارند (فریسواد و همکاران،

[2] Mycotoxins

[3] Aflatoxin

[4] Ochratoxin

۲۰۰۵ ؛ زینـدین و همکـاران، ۲۰۰۶). بنـابراین، آلـودگی ادویـه هـا بـا مایکوتوکسـینها و قـارچ هـای مولـد مایکوتوکسـین، نشـان دهنـده یـک خطـر خـاص اسـت و حضـور طبیعـی آفلاتوکسـین، اکراتوکسـین A و استریگماتوکسین در ادویه ها به عنوان نگرانی اصلی توسط محققین مختلف بیان شده است (عبداله و همکـاران، ۲۰۰۱ ؛ هیتوکوتو و همکاران، ۱۹۷۸ ؛ روی و همکاران، ۱۹۸۸).

از طرف دیگر، ادویه های تجاری به طور فزاینده ای در طیف گسترده ای از وعده های غـذایی تهیـه شـده توسط مصرف کنندگان به منظور ارتقاء طعم و عطر و ایجاد تنوع در آشپزخانه گنجانده شده انـد کـه مـی تواننـد منبع انتقال آلودگی مایکوتوکسین ها به انسان باشند زیرا معمولا یـا بـه صـورت خـام مصـرف مـی شـوند و یـا بـه غذاهای آماده مصرف اضافه می گردند (پافومی، ۱۹۸۶ و لولین و همکاران، ۱۹۹۲). در سال هـای اخیـر محققـان مختلفی حضور آفلاتوکسین و اکراتوکسین در ادویه ها را مورد مطالعه قرار داده انـد. مشـکل آلـودگی ادویـه بـا قارچهای میکروسکوپی مولد سم خصوصا در کشورهای در حال توسعه خیلـی بـارز اسـت و افـزایش نگرانـی در مورد سطوح مایکوتوکسین در غذای انسان هم با منشا گیاهی و هم دامی وجود دارد.

مایکوتوکسینها ترکیباتی با ساختمانهای شیمیایی متفاوت و وزن مولکولی کوچک می باشندکه متابولیت ثانویه کپک ها بوده و بر روی محصولات کشاورزی قبل یا بعد از برداشت، طی حمل ونقل و نگهداری رشد می کنند. این سموم قارچی نظر به ماهیت و ویژگی های فیزیکی و شیمیایی انواع محصولات ادویه می توانند در آنها تولید شده و سلامت مصرف کننده را به خطر بیندازند (گاریدو و همکاران، ۱۹۹۲). در ایـن راسـتا اسـتانداردهای بین المللی مواد غذایی[5]، قوانین و مقرراتی را برای حدود مجاز میزان انواع مایکوتوکسین ها تعیین نمـوده اسـت که نظر به افزایش تولید و صادرات این محصولات رعایت این استانداردها و قوانین ضـروری بـه نظـر مـی رسـد.

[5] CODEX

حدود قابل قبول آفلاتوکسین در ادویه در کشورهای مختلف متفاوت است. در اتحادیه اروپا، سطوح قابل قبول آفلا توکسین در ادویه ها ، ۵ میکروگرم بر کیلوگرم برای آفلاتوکسین B1 و ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم برای آفلا توکسین کل تنظیم شده است. اگرچه اتحادیه اروپا مقررات خاصی در مورد اکراتوکسین A[۶] در ادویه ها به طور عمومی و یا در فلفل قرمز به طور خاص ندارد ولیکن با توجه به حد قابل تحمل مصرف روزانه برای OTA می توان حداکثر میزان بین ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم را در این مورد در نظر گرفت که در واقع، این حدود در تجارت بین المللی ادویه پذیرفته شده است.

تولید مایکوتوکسین ها یک مشکل جهانی محسوب می شود و مطابق با آمار سازمان غذا وکشاورزی سازمان ملل متحد (WHO)[۷] تقریبا ۲۵ درصد دانه های زراعی جهان آلوده به مایکوتوکسین ها هستند و طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (FAO)[۸] مایکوتوکسین ها به ویژه آفلاتوکسین و اکراتوکسین یکی از عوامل موثر در بروز بیماریهای ناشی از غذا گزارش شده اند. تولید سم توسط کپک ها منجر به ایجاد نوعی بیماری به نام مایکوتوکسیکوزیز می گردد . در جهت سم زدایی مایکوتوکسینها، روشهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی مطرح هستند.

فلفل قرمز، یکی از عمده ترین ادویه های بومی استان خراسان است که در منطقه داورزن سبزوار کشت داده شده و در اواخر تابستان و اوایل پاییز برداشت می شود(شکل ۱-۱). طبق آمار سازمان جهاد کشاورزی خراسان رضوی، منطقه داورزن سبزوار از لحاظ سطح زیرکشت فلفل قرمز و عملکرد در واحد سطح، مقام اول را

[6] OTA : Ochratoxin A

[7] World Health Organization

[8] Food and Agriculture Organization

در استان خراسان و همچنین در کشور دارد. این ادویه به طور وسیعی در بازارهای مصرف داخلی توزیع می گردد و گاها به کشورهای حاشیه خلیج فارس، پاکستان و هندوستان نیز صادر می شود.

شکل ۱-۱. فلفل قرمز سبزوار (کامل و برش خورده)

فلفل قرمز علاوه بر اینکه به طور وسیعی به صورت مستقیم و همراه با غذا توسط مصرف کننده استفاده می شود، کاربرد وسیعی نیز در تولید فراورده های غذایی از قبیل فراورده های گوشتی و گوشت های فرآوری شده، کنسروهای غذایی ، سوپ های نیمه آماده و ... دارد. بنابراین توجه به کیفیت آن و میزان حضور سموم قارچی در آن به منظور مطابقت با استانداردهای حدود مجاز مایکوتوکسین ها ضروری به نظر می رسد.

۱-۱- اهداف طرح

الف – تعیین میزان آلودگی میکروبی و کپکی فلفل قرمز

ب – تعیین میزان آلودگی به آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در نمونه با استفاده از روشهای کروماتوگرافی و ایمونولوژیکی