



بررسی کینتیک جوانه‌زنی و رشد شعاعی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جدا شده از کیک روغنی تحت شرایط مختلف فعالیت آبی و دما

حسن نخچیان^۱، فریده طباطبایی یزدی^{۲*}، سید علی مرتضوی^۲، محبت محبی^۲

۱- دکتری گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۰۹

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۲۶

کلمات کلیدی:

جوانه‌زنی،

فعالیت آبی،

کپک،

کیک،

مدل‌سازی.

DOI: 10.52547/fsct.18.05.24

* مسئول مکاتبات:

tabatabai@um.ac.ir

در این پژوهش اثر فعالیت آبی (۰/۹-۰/۶۵) و دما (۳۰-۱۵ درجه سانتی گراد) و اثر متقابل این دو بر کینتیک سرعت جوانه‌زنی و رشد شعاعی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جدا شده از کیک روغنی صنعتی در محیط کشت عصاره مخمر گلوکز کلرامفنی کول آگار طی ۶۰ روز و همچنین قابلیت مدل‌های گومپرتز و لوجستیک برای برازش داده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. به طوری که افزایش فعالیت آبی در محدوده مورد بررسی و دما (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی و رشد شعاعی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* شد ($P < 0/05$). در a_w ثابت، افزایش درجه حرارت از دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد باعث کاهش معنی‌دار این دو پارامتر شد ($P < 0/05$). کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در فعالیت آبی ۰/۶۵ وارد مرحله جوانه‌زنی نشد. در فعالیت آبی ۰/۷ و ۰/۷۵ نیز تنها در دمای ۱۵ و ۲۵ درجه سانتی گراد جوانه‌زنی رخ داد اما رشد شعاعی میسلیم مشاهده نشد. در فعالیت آبی ۰/۸ نیز با وجود این که سرعت جوانه‌زنی نسبتاً بالا بود اما رشد میسلیم به مقدار بسیار محدودی مشاهده شد. بیشترین میزان جوانه‌زنی و همچنین رشد شعاعی مربوط به فعالیت آبی ۰/۸۵ و ۰/۹ و دمای ۱۵ و ۲۵ درجه سانتی گراد بود ($P < 0/05$). بنابراین بهینه رشد کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و فعالیت آبی ۰/۹ مشاهده شد. با توجه به بسته‌بندی کیک که نسبت به رطوبت محیط نفوذناپذیر است بهترین زمان ماندگاری کیک در a_w برابر ۰/۷ توصیه می‌شود. برازش منحنی‌های رشد نیز نشان داد که پارامترهای به دست آمده از مدل لوجستیک دقیق‌تر از پارامترهای مدل گومپرتز است.

۱- مقدمه

بشر در گذشته دانه‌های غلات را با آب و سایر مواد مخلوط می‌کرد و با پختن آن‌ها ماده غذایی با بافت یکنواخت، نیمه جامد و خوش طعمی به وجود می‌آورد [۱]. بسته به نوع آرد، محتوای پروتئین، چربی، شکر و سایر ترکیبات افزودنی، می‌توان فرآورده‌های مختلفی از قبیل انواع نان‌ها، کلوچه‌ها، کراکرها و کیک‌ها را تولید کرد. از میان فرآورده‌های شیرین، کیک‌ها و مافین‌ها فروش بسیار بالایی را به خود اختصاص داده‌اند. در ایران نیز افزایش قابل ملاحظه‌ای در مصرف کیک طی سال‌های اخیر گزارش شده به طوری که در سال ۱۳۹۵ میزان سرانه مصرف کیک، کلوچه، بیسکویت و ویفر ۱۰ کیلوگرم به ازای هر نفر ارزیابی شده است [۴].

افزایش مدت زمان ماندگاری کیک‌ها و سایر فرآورده‌های پخت اهمیت قابل ملاحظه‌ای در صنعت دارد. امروزه مصرف‌کنندگان تمایل به استفاده از مواد غذایی دارند که فاقد مواد افزودنی و نگهدارنده‌های شیمیایی است، اما حذف این ترکیبات ممکن است باعث افزایش فسادپذیری مواد غذایی گردد. کیک هادر زمره محصولات با محتوای رطوبت متوسط (فعالیت آبی ۰/۷۵-۰/۹۰) و pH کمی بازی هستند و بنابراین عمده‌ترین کپک‌ها و مخمرهای خشکی‌دوست روی آن‌ها رشد می‌کنند [۵-۸]. مخمرها نیز ممکن است در کیک رشد کرده و منجر به فساد تخمیری کیک شوند [۹]. در این خصوص متداول‌ترین گونه‌های مخمر عبارتند از *Candida guilliermondii*، *Pichia burtonii*، *Hansenula anomala* و *Debaryomyces hansenii* [۱۰]. اما رشد کپک‌ها در کیک طی انبارداری منجر به ضرر و زیان‌های اقتصادی زیادی می‌گردد. آمارهای جهانی حاکی از آن است که سالانه بیش از ۹۰ میلیون کیلوگرم از این محصولات در نتیجه آلودگی کپکی از بین می‌روند. [۱۱].

مهم‌ترین کپک‌های عامل فساد در کیک شامل *یوروتیوم*، *پنی‌سیلیوم* و *آسپرژیلوس* می‌باشند [۱۲]. طی فرآیند پخت اغلب کپک‌ها در اثر درجه حرارت اعمال شده از بین می‌روند، اما در مراحل سردکردن و بسته‌بندی، در صورتی که شرایط بهداشتی رعایت نشود آلودگی ثانویه رخ داده که طی انبارداری ظاهر می‌گردد. تاکنون اقدامات زیادی جهت کنترل

شرایط بهداشتی و بسته‌بندی کیک صورت گرفته است از قبیل استفاده از اتمسفر کنترل شده و بسته‌بندی‌های فعال [۱۳-۱۵]، استفاده از روش تشعشع برای کنترل ارگانیسم‌های سطحی شامل اشعه فرابنفش [۱۶]، اشعه مادون قرمز [۱۷]، اشعه مایکروویو با فرکانس بالا [۱۸] و روش پالس نوری [۱۹]. تمامی این روش‌ها در کنترل رشد کپک‌ها موثر بوده‌اند اما قیمت، عدم استفاده از مواد بسته‌بندی زیست تخریب‌پذیر و اثر منفی بر کیفیت فرآورده، استفاده از آن‌ها را محدود ساخته است.

امروزه از بکارگیری روش‌های ترکیبی سالم تر، موثرتر و اقتصادی تر است. [۲۰]. این روش‌ها شامل استفاده همزمان از درجه حرارت، فعالیت آبی، pH، باریکروبی یا افزودن نگهدارنده‌ها است [۲۱]. فعالیت آبی مهم‌ترین فاکتور موثر بر جوانه‌زنی و رشد کپک‌ها است. با کاهش فعالیت آبی، تعداد گروه‌هایی از میکروارگانیسم‌ها که قادر به رشد هستند کاهش می‌یابد [۲۲]. اگرچه در تحقیقاتی که تاکنون انجام شده به حداقل فعالیت آبی برای رشد نسبت به حداقل فعالیت آبی برای جوانه‌زنی توجه کمتری شده است اما این مساله اهمیت بیشتری دارد، زیرا حداقل فعالیت آبی برای رشد یک کپک، بیانگر شرایطی است که می‌تواند منجر به فساد در ماده غذایی شود [۲۳]. محدوده فعالیت آبی برای جوانه‌زنی اسپورها در دمای بهینه وسیع‌تر است اما جهت تشکیل اسپور به فعالیت آبی بیشتری نیاز است. به علاوه حداقل فعالیت آبی برای رشد، پایین‌تر از فعالیت آبی برای تولید مایکوتوکسین می‌باشد [۲۴]. کپک‌ها از نظر درجه حرارت مناسب برای رشد، معمولاً مزوفیل هستند ولی تعدادی از آن‌ها مانند *آسپرژیلوس*‌ها سرماگرا هستند و در دمای ۵- تا ۱۰- درجه سانتی‌گراد نیز رشد می‌کنند [۲۵]. اثر متقابل پارامترهای فعالیت آبی و دما در تعیین نوع فساد احتمالی در ماده غذایی حائز اهمیت است. مگن و لیس (۱۹۸۸) اظهار کردند که زمان‌های تأخیری رشد، سرعت جوانه‌زنی و ایجاد لوله جوانه^۶ عوامل مهمی برای مقایسه قابلیت اسپورهای قارچی مختلف برای ایجاد کلنی تحت شرایط مختلف فعالیت آبی هستند [۲۶]. بنابراین هدف از این پژوهش مطالعه اثر فعالیت آبی، درجه حرارت و اثر متقابل این دو بر سرعت جوانه‌زنی، فاز تأخیری و همچنین

1. *Candida guilliermondii*
2. *Pichia burtonii*
3. *Hansenula anomala*
4. *Debaryomyces hansenii*
5. *Eurotium*

6. Germ tube

الگوی رشد میسلیمی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جدا شده^۷ از کیک روغنی تولید شده در کارخانه است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

آرد گندم با درجه استخراج ۷۷٪، ۱۴٪ درصد رطوبت، ۱۱٪ پروتئین، ۵٪ خاکستر و ۲۸٪ گلو تن مرطوب از کارخانه آرد رضا (قوچان، ایران) خریداری شد. شکر از شرکت قند شیرین (مشهد، ایران)، روغن مایع از شرکت بهشهر (بهشهر، ایران) و بکینگ پودر از شرکت هورخش (نیشابور، ایران) تهیه شدند. تخم مرغ از شرکت سیمرخ (قوچان، ایران)، شربت اینورت از شرکت بابانا (مشهد، ایران)، شربت گلوکز از شرکت نمونه توس (مشهد، ایران)، ژل کیک از شرکت آذرنوش شکوفه (تهران، ایران)، اسانس وانیل از شرکت IFF (دانمارک)، محیط کشت عصاره مخمر گلوکز کلرامفنیکول آگار^۸ از شرکت مرک (آلمان)، گلیسرین از شرکت کارگیل (مالزی) خریداری شد. جهت انجام آزمون میکروبی، نمونه‌های کیک به صورت تصادفی از خط تولید کارخانه‌ای واقع در شهرک صنعتی توس (مشهد، ایران) از انبار محصول جمع‌آوری شدند.

۲-۲- آماده‌سازی سوسپانسیون اولیه و خالص سازی

۱۰ گرم از نمونه کیک توسط آسیاب (مولینکس، مدل LM24214A، فرانسه) تحت شرایط اسپتیک هوموژن و به ۹۰ میلی‌لیتر پیتون واتر استریل ۰/۱٪ اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه با شدت ۱۰۰ دور بر دقیقه (یونیمکس ۱۰۱۰، هیدولف، آلمان) هم‌زده شد. رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ این محلول به روش سطحی روی محیط کشت عصاره مخمر گلوکز کلرامفنیکول آگار کشت داده شد و به مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری گردید [۲۷-۲۹]. به منظور خالص سازی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* از روش تک اسپور کردن^۹ استفاده شد. به این صورت که توسط آنس مقدار کمی از اسپور قارچ را به لوله محتوی آب مقطر استریل منتقل

و سپس توسط لام توما^{۱۰} رقت آن محاسبه گردید. پس از به دست آوردن رقتی مناسب، قطره ای از سوسپانسیون به محیط کشت واتر آگار حاوی کلرامفنیکل انتقال داده شد. پس از گذشت زمان لازم، مقداری از کلنی رشد یافته به محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار در ۳ نقطه انتقال داده شد و به مدت ۷-۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری گردید [۳۰].

شناسایی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* از یکدیگر و تعیین هویت آن‌ها به کمک ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی‌ها انجام شد. تشخیص اولیه کپک‌ها با استفاده از ویژگی‌های ماکروسکوپی شامل رنگ سطح و پشت پرگنه، داشتن خطوط شعاعی و یا دایره متحدالمرکز روی آن، صاف یا چین دار بودن سطح کلنی، داشتن حالت پرزی، پودری، پنبه‌ای، مخملی و... انجام شد. سپس به منظور مقایسه دقیق‌تر، بررسی میکروسکوپی کپک‌ها به کمک روش «کشت روی لام»^{۱۱} انجام شد [۳۱].

۲-۳- تهیه محیط کشت

جهت تنظیم a_w محیط کشت در آب مقطر حاوی درصد‌های مختلف گلیسرول [۳۲] حل و مقدار آن توسط دستگاه a_w متر (نوازینا، لب مستر استاندارد، سویس) با دقت ± 0.03 بررسی شد [۳۳]. ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل شده (دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) درون پلیت‌های استریل با قطر ۸ سانتی متر ریخته شد.

۲-۴- آماده‌سازی محلول تلقیح

به منظور تهیه محیط‌های غنی از اسپور، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جدا شده از کیک به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار رشد داده شد. پس از آن سطح محیط کشت توسط یک اسپاتول استریل برداشته شد و اسپورها به سرم فیزیولوژی استریل حاوی ۰/۵ درصد (حجمی/حجمی) توئین ۸۰ اضافه شدند. به منظور حذف ذرات اضافی و قطعات هافنی، سوسپانسیون حاصله از چهار لایه تنظیف استریل عبور داده شد و در نهایت غلظت اسپور به کمک شمارشگر نوبار^{۱۲} ارزیابی شد [۳۴].

10. Thoma slide

11. Slide culture

12. Neubauer counting chamber

7. extracted

8. Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC)

9. Single spore

۲-۵- انکوباسیون

پس از تلقیح درب پلیت‌ها با پارافیلیم، بسته و درون ظرف پلاستیکی قرار داده شد تا از تبادل هوا جلوگیری شود. جهت متعادل نگه داشتن رطوبت نسبی محیط طی انکوباسیون، حجم نسبتاً زیادی از محلول گلیسرول (با a_w برابر با محیط کشت) همراه با پلیت‌های محیط کشت درون ظرف پلاستیکی قرار داده شد. سپس ظرف حاوی محیط‌های کشت جهت گرمخانه‌گذاری به انکوباتورهای ۱۵، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط ایزوترمال ($\pm 0.2^\circ\text{C}$) با فواصل ۵ سانتی‌متری (۲۰ پلیت در هر درجه حرارت) منتقل شدند [۳۵-۳۶].

۲-۶- بررسی جوانه‌زنی

جوانه‌زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با مشاهدات میکروسکوپی کلنی‌ها توسط میکروسکوپ نوری (ویرسام ساینتیفیک، آفریقا) مجهز به دوربین دینو و نرم‌افزار دینو کپچر (ژئیس، آلمان) انجام شد. پلیت‌ها جهت تعیین درصد اسپوره‌های جوانه‌زده به طور منظم مورد بررسی قرار گرفتند. طبق تعریف مارین و همکاران (۱۹۹۸)، اسپور جوانه‌زده به اسپوری اطلاق شد که طول لوله جوانه بزرگ‌تر یا مساوی قطر بزرگ‌ترین ابعاد اسپور موجود باشد [۳۷]. درصد اسپور جوانه‌زده به صورت معادله ذیل محاسبه شد:

(۱)

$100 \times (\text{تعداد کل اسپور} / \text{تعداد اسپور جوانه زده}) = \text{درصد جوانه زنی}$
از مدل‌های گومپرتز^{۱۳} (معادله ۲) و لوجستیک^{۱۴} (معادله ۳) به عنوان معادلات برازش استفاده شد [۳۸ و ۳۹].

(۲)

$$\text{درصد جوانه زنی} = A \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{P_{\max}}{A} (\lambda_g - t) \right] + 1 \right\}$$

$$\text{درصد جوانه زنی} = \frac{P_{\max}}{1 + \exp[k(t - t_0)]}$$

(۳)

که در آن‌ها A و $P_{\max}$ حداکثر درصد جوانه‌زنی (در اغلب مواقع ۱۰۰٪ است)؛ λ_g و k ماکزیمم سرعت

جوانه‌زنی (d^{-1}) که توسط شیب منحنی زمانی که اسپورها به طور نمایی رشد می‌کنند به دست می‌آید؛ λ_g فاز تأخیری (d)؛ t زمان (d) در نقطه $P = P_{\max}$ ؛ t زمان (d) و $e = \exp(I)$ می‌باشد.

۲-۷- بررسی رشد شعاعی

پلیت‌ها (با قطر ۸۰ میلی‌متر) طی انکوباسیون در فواصل مشخص مورد بررسی قرار گرفتند و شعاع کلنی آن‌ها محاسبه شد. ماکزیمم سرعت رشد شعاعی (میلی‌متر در روز) و مدت زمان فاز تأخیری ظاهری^{۱۵} (روز) با رگرسیون خطی بخش خطی منحنی زمانی رشد و طبق معادله ۴ به دست آمد [۴۰]:

$$R_t = \mu_m (t - \lambda_m) \quad (4)$$

که در آن t زمان (روز)، R_t شعاع کلنی در زمان t (میلی‌متر)، μ_m شیب خط رگرسیون (ماکزیمم سرعت رشد) و λ_m زمان فاز تأخیری ظاهری برای رشد (روز) است.
زمان قابل مشاهده رشد (t_{vg}) بر اساس احتمال مشاهده کلنی‌ها در یک ماده غذایی به عنوان زمانی که قطر کلنی ۳ میلی‌متر است تعریف شد [۴۱]:

$$t_{vg} = \lambda_m + 1.0 / \mu_m \quad (5)$$

که در آن λ_m و μ_m بر اساس رگرسیون خطی تخمین زده می‌شوند.

۲-۸- آنالیز آماری

محاسبات آماری تحلیل واریانس توسط نرم‌افزار Minitab انجام شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی و در سطح معنی‌داری ۰.۰۵ بررسی شد و نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل رسم گردید. متغیرهای اندازه‌گیری شده شامل درصد جوانه‌زنی و رشد شعاعی میسلیم در تیمارهای مختلف دما و فعالیت آبی در برابر زمان بودند. برازش منحنی‌های جوانه‌زنی بر اساس مدل‌های گومپرتز و لوجستیک توسط نرم‌افزار curveexpert professional (نسخه ۲.۵.۳) و منحنی‌های رشد توسط نرم‌افزار اکسل ترسیم شد. ارزیابی مدل‌های برازش شده توسط ریشه میانگین مربعات خطا (R^2) تخمین زده شد.

15. Apparent lag time

13. Gompertz
14. Logistic

۳-نتایج و بحث

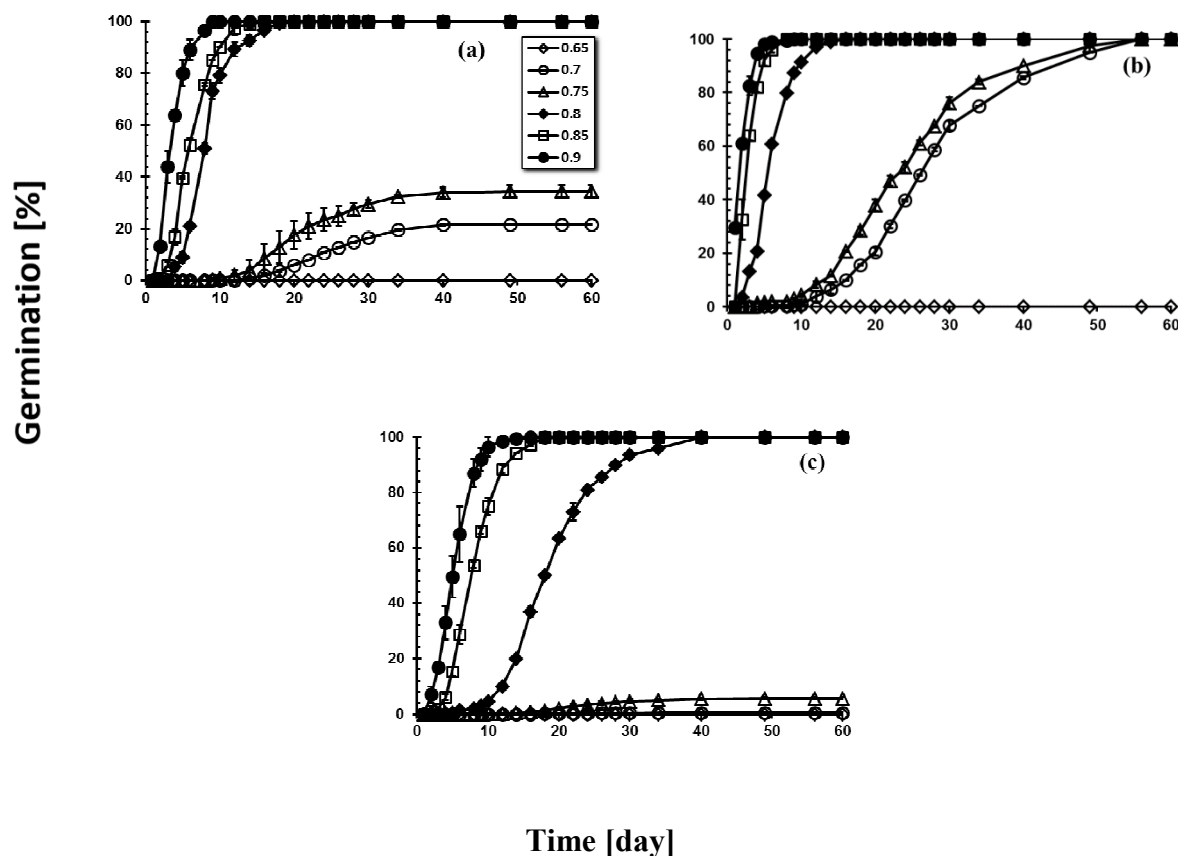
۳-۱- اثر فعالیت آبی و دما بر پروفایل جوانه‌زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس*

Fig 1 Germination of *Aspergillus fumigatus* as a function of a_w at: (a) 15, (b) 25 and (c) 30 °C

متفاوت است [۴۲]، در این پژوهش بهینه دما در تمامی فعالیت‌های آبی محیط کشت دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بود. نتایج تحلیل واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین فعالیت آبی و درجه حرارت و اثر متقابل این دو بر سرعت جوانه‌زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* وجود دارد ($P < 0.05$). در کلیه درجه حرارت‌های مورد آزمایش سرعت جوانه‌زنی ابتدا افزایش یافته که مربوط به ابتدای فاز لگاریتمی است و سپس در انتهای فاز لگاریتمی به تدریج کاهش می‌یابد تا این که در فاز سکون به مقدار ثابتی می‌رسد. همان طور که قبلاً نیز بدان اشاره شد بالاترین سرعت جوانه‌زنی در فعالیت آبی ۰/۹ اتفاق افتاد. در مقایسه درجه حرارت نیز دمای ۲۵ درجه سانتی گراد مناسب‌ترین دما برای افزایش سرعت جوانه‌زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بود.

شکل ۱، نشان می‌دهد که دما، فعالیت آبی و اثر متقابل این دو بر پروفایل جوانه‌زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* معنی‌دار بود ($P < 0.05$). به طور کلی در درجه حرارت ثابت با افزایش a_w مدت زمان فاز تأخیری کاهش و سرعت جوانه‌زنی در فاز لگاریتمی افزایش یافت. اما در کلیه درجه حرارت‌های مورد آزمایش، جوانه‌زنی در $a_w = 0.65$ طی ۶۰ روز مشاهده نشد. جوانه‌زنی در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد و $a_w = 0.7-0.75$ با شیب بسیار ملایمی افزایش پیدا کرد و نهایتاً به حد ۲۱/۶ الی ۳۴/۴ درصد رسید.

شکل ۲، سرعت جوانه‌زنی را در درجه حرارت ۱۵ تا ۳۷ و فعالیت آبی ۰/۶۵ تا ۰/۹ نشان می‌دهد. علی‌رغم گزارشات گوک و همکاران (۲۰۰۳) که عنوان کرده بودند درجه حرارت بهینه برای جوانه‌زنی اسپور متناسب با تغییر فعالیت آبی

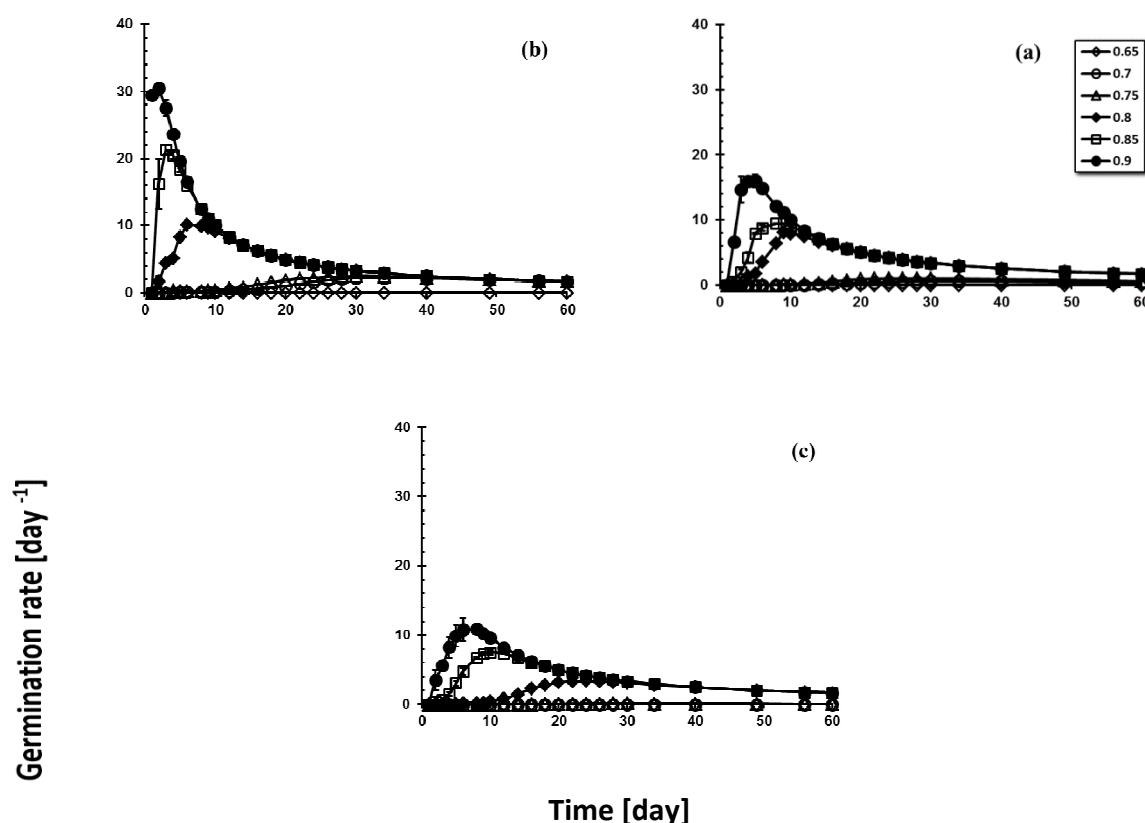


Fig 2 Germination rate of *Aspergillus fumigatus* as a function of a_w at: (a) 15, (b) 25 and (c) 30°C

شکل ۳، نشان می‌دهد که شرایط مختلف دما و فعالیت آبی و اثر متقابل این دو به طور معنی‌داری باعث تغییر در مدت زمان فاز تأخیری (روز) جوانه‌زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* شد ($P < 0.05$). به طور کلی در هر درجه حرارت ثابت با افزایش فعالیت آبی مدت زمان فاز تأخیری به طور چشمگیری کاهش پیدا کرد که نشان‌دهنده مساعد بودن جوانه‌زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در a_w بالا است [۳۷]. همچنین در a_w یکسان، کوتاه‌ترین مدت زمان فاز تأخیری دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و بالاترین آن دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بود. به طوری که در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و $a_w = 0.9$ فاز تأخیری بسیار کوتاه بود و کپک‌ها به سرعت وارد فاز لگاریتمی شدند. بالعکس در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و $a_w = 0.7$ فاز تأخیری جوانه‌زنی تقریباً ۱۶ روز به طول انجامید. همان‌طور که قبلاً اشاره شد $a_w = 0.65$ در کلیه درجه حرارت‌ها مانع از جوانه‌زنی و رشد کپک بود.

۳-۲- پیش بینی فاز تأخیری برای جوانه‌زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* تحت شرایط مختلف حرارت و فعالیت آبی

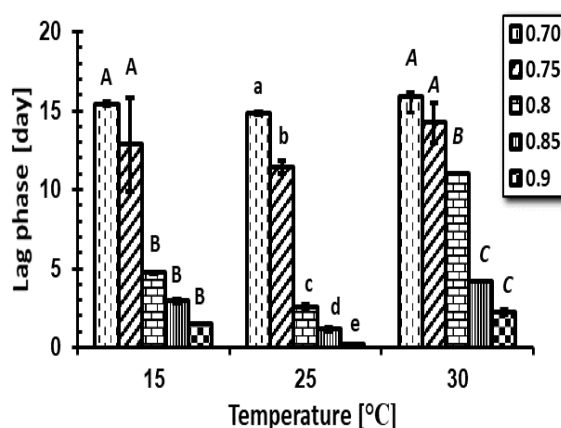


Fig 3 Lag phase for germination of *Aspergillus fumigatus* base on Gompertz model as a function of a_w and temperature. Letters indicate significant changes within each temperature ($P < 0.05$)

۳-۳- اثر متقابل فعالیت آبی و دما بر رشد

میسلیوم کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس*

شکل ۴، اثر فعالیت آبی را بر رشد میسلیوم *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در درجه حرارت‌های مختلف نشان می‌دهد ($P < 0.05$). همان طور که مشاهده می‌شود رشد شعاعی تنها در $a_w = 0.8-0.9$ مشاهده شد به طوری که در این بازه با افزایش a_w شیب رشد شعاعی افزایش پیدا کرد.

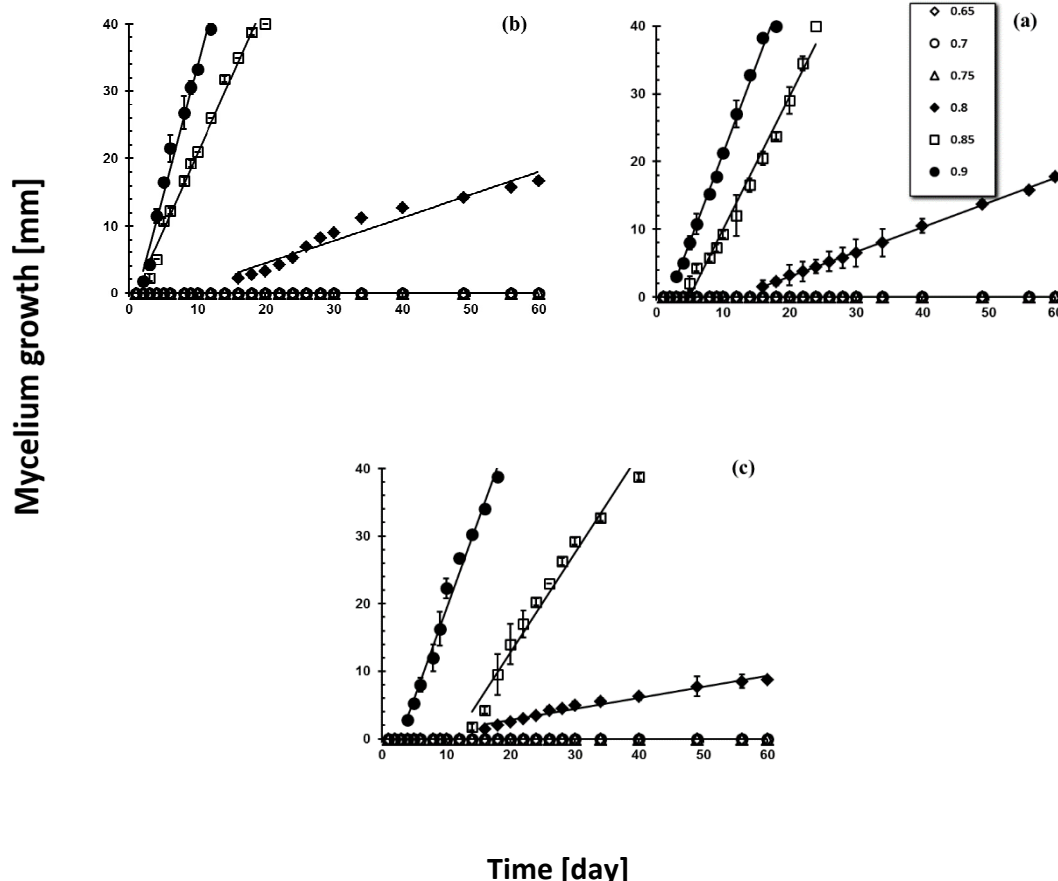


Fig 4 Effect of a_w and temperature on the logarithmic phase of radii growth of *Aspergillus fumigatus* at: (a) 15, (b) 25 and (c) 30°C

شرایط فاز تأخیری برای جوانه زدن حداقل ۱۲ تا ۱۶ روز به طول انجامید. اما با افزایش دما تا ۳۰ درجه سانتی گراد نیاز به a_w برای جوانه زنی افزایش پیدا کرد (۰/۸). به این معنی که افزایش دما اثر منفی بر جوانه زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* داشت. اما حداقل a_w مورد نیاز برای رشد کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در کلیه درجه حرارت‌ها (۱۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد) برابر با ۰/۸ بود که این عدد با نتایج به دست آمده از سایر پژوهشگران مطابقت دارد [۴۳ و ۴۴].

جدول ۱، حداقل فعالیت آبی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* برای جوانه زنی و رشد در درجه حرارت‌های ۱۵ تا ۳۰ نشان می‌دهد. همان طور که مارین و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کرده‌اند معمولاً حداقل a_w مورد نیاز برای جوانه زنی کمتر از حداقل a_w مورد نیاز برای رشد است و این مقادیر وابسته به درجه حرارت می‌باشد [۳۷]. حداقل a_w مورد نیاز برای جوانه زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در بازه دمایی ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی گراد برابر با ۰/۷ بود (جدول ۱). تحت این

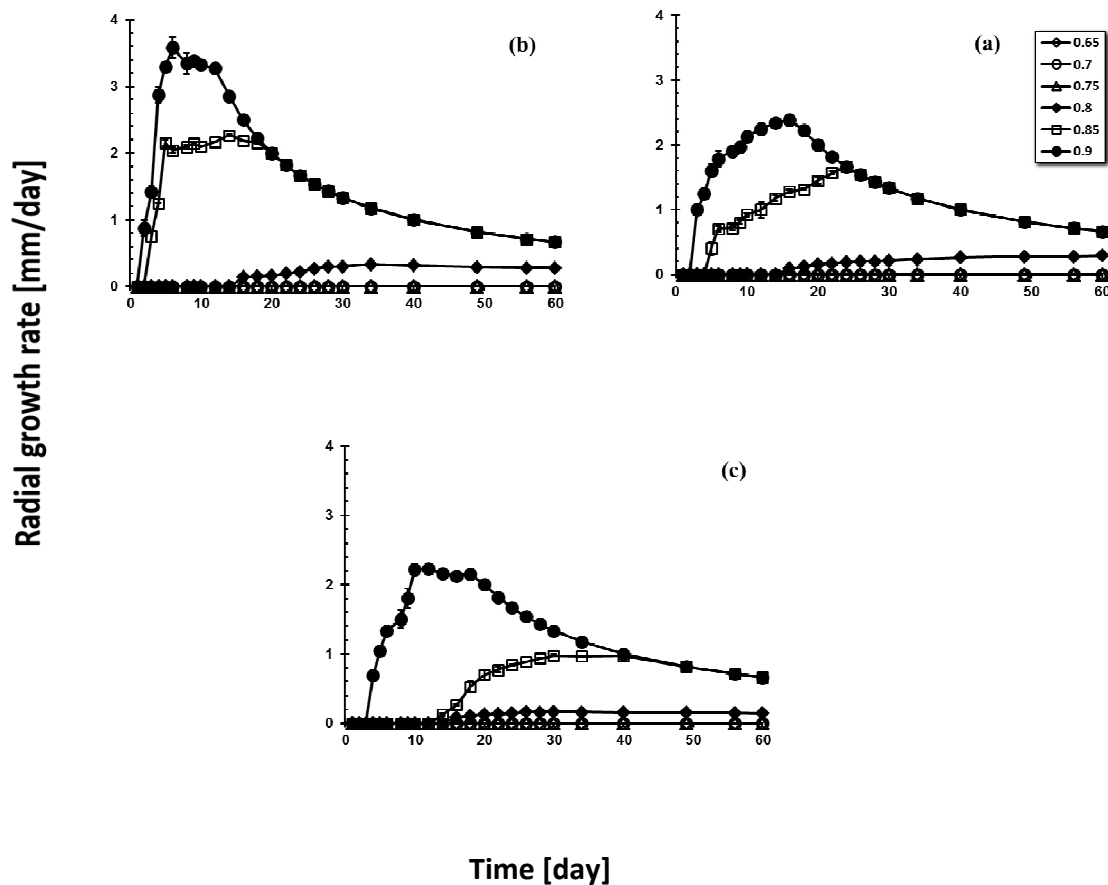


Fig 4 Growth rate of *Aspergillus fumigatus* as a function of a_w at: (a) 15, (b) 25 and (c) 30°C

Table 1 the minimum a_w for germination and growth of *Aspergillus fumigatus* at different temperature

Temperature [°C]	15	25	30
Minimum a_w for germination	0.7	0.7	0.8
Minimum a_w for growth	0.8	0.8	0.8

Table 2 Parameters estimates of the Gompertz model for the germination data of *A. fumigatus*

Temp (°C)	a_w	A(%)			$\mu_g(d^{-1})$			$\lambda_g(d)$			t(d)		P(t)(%)	R ²
		Value	t	95%CI	Value	t	95%CI	Value	t	95%CI	Value	95%CI		
15	0.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.70	22.1	134.6	21.7-224	13	43.1	12-13	154	796	150-158	21.9	21.6-22.1	8.11	0.999
	0.75	34.6	177.8	34.1-352	24	45.5	23-25	129	788	124-133	184	122-245	12.74	0.999
	0.80	99.8	192.1	98.7-100.8	168	270	155-18.1	4.7	394	4.5-50	69	6.6-72	36.7	0.998
	0.85	100.1	301.3	99.3-100.8	173	41.2	162-182	2.9	409	28-3.1	5.1	4.9-5.3	36.8	0.998
	0.90	100.0	291.1	99.2-100.7	270	31.2	25.1-28.9	1.5	232	1.4-1.6	2.9	2.6-3.1	36.8	0.997
25	0.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.70	100.7	122.3	98.6-102.7	44	48.0	42-46	149	708	143-154	23.3	23.3	37.0	0.998
	0.75	101.0	109.2	99.0-102.9	43	44.0	4.1-4.5	11.4	468	10.9-11.9	20.1	19.6-20.5	37.1	0.999
	0.80	100.0	286.6	99.3-100.8	173	38.5	16.4-18.2	2.6	34.6	2.4-2.7	4.7	4.6-4.9	36.8	0.999
	0.85	99.9	298.6	99.1-100.6	35.5	27.5	32.7-38.3	1.2	21.0	1.0-1.3	2.2	1.9-2.5	36.7	0.996
	0.90	100.1	438.6	99.6-100.5	34.8	35.2	32.7-36.8	0.2	3.7	0.1-0.3	1.2	1.2-1.3	36.8	0.996
30	0.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.70	0.5	144.0	0.48-0.5	0.03	43.6	0.03	159	900	15.5-16.3	21.6	20.4-22.9	0.2	0.998
	0.75	5.70	229.6	5.6-5.7	0.3	70.3	0.3-0.4	14.3	122.7	14.0-14.5	20.4	17.8-23.0	2.1	1
	0.80	99.9	210.4	98.9-100.9	72	56.1	6.9-7.5	11.0	86.2	10.7-11.3	16.2	15.9-16.4	36.8	0.999
	0.85	100.3	567.3	99.9-100.6	13.9	88.2	13.5-14.2	4.2	98.0	4.1-4.3	6.9	6.9	36.9	1
	0.90	100.3	322.2	99.7-101.0	18.5	41.8	17.6-19.5	2.2	33.8	2.1-2.4	4.3	3.5-5.0	36.9	0.999

Table 3 Parameters estimates of the Lojestic model for the germination data of *A. fumigatus*

Temp(°C)	a_w	$P_{max}(\%)$			$k(d^1)$			$t(d)$			$P(t)(\%)$	R^2
		Value	t	95%CI	Value	t	95%CI	Value	t	95%CI		
15	0.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.70	21.6	98.7	21.1-22.0	0.3	26.9	0.2-0.3	24.4	134.3	24.1-24.8	108	0.998
	0.75	33.9	87.3	33.0-34.9	0.3	19.5	0.26-0.33	20.6	94.0	20.1-21.1	170	0.995
	0.80	99.1	169.3	97.8-100.3	0.7	21.1	0.6-0.8	7.9	100.5	7.7-8.1	49.5	0.997
	0.85	99.6	132.6	98.0-101.1	0.7	17.1	0.6-0.8	6.1	57.6	5.8-6.3	49.8	0.994
	0.90	99.7	154.0	98.3-101.0	1.1	15.3	0.9-1.2	3.5	50.9	3.3-3.6	49.8	0.991
25	0.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.70	96.6	69.9	93.8-99.5	0.2	21.3	0.18-0.22	26.2	90.3	25.6-26.8	48.3	0.996
	0.75	97.4	71.0	94.5-100.2	0.2	22.7	0.17-0.21	23.2	78.9	22.5-23.8	48.7	0.995
	0.80	99.4	164.8	98.2-100.7	0.7	20.3	0.6-0.8	5.7	68.4	5.5-5.8	49.7	0.996
	0.85	99.6	154.8	98.2-100.9	1.4	13.2	1.2-1.6	2.7	43.9	2.5-2.8	49.8	0.987
	0.90	99.9	476.8	99.5-100.4	1.2	34.8	1.2-1.3	1.7	75.2	1.6-1.7	50.0	0.997
30	0.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.70	0.5	69.1	0.46-0.49	0.3	17.9	0.2-0.3	23.9	97.1	23.4-24.5	0.2	0.994
	0.75	5.6	85.5	5.4-5.7	0.3	22.6	0.2-0.3	22.8	108.1	22.3-23.2	2.8	0.997
	0.80	97.8	98.9	95.8-99.9	0.3	22.3	0.27-0.33	18.2	98.7	17.9-18.6	48.9	0.997
	0.85	99.6	186.7	98.5-100.7	0.6	25.8	0.5-0.6	8.0	103.3	7.9-8.2	49.8	0.998
	0.90	99.8	275.9	99.0-100.6	0.8	31.8	0.7-0.8	5.2	109.9	5.1-5.2	49.9	0.998

۳-۴- مقایسه مدل ها

پارامترهای تخمین زده شده فرآیند جوانه زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بر اساس مدل های گومپرتز و لوجستیک در جدول ۲ و ۳ نشان داده شده اند. توانایی این مدل ها برای توصیف جوانه زنی اسپور قارچ های مختلف به اثبات رسیده است [۳۷]. هر دو مدل تخمین صحیحی از A (حداکثر درصد جوانه زنی) را ارائه داده اند زیرا در هر دو مورد ۹۵ درصد فاصله اطمینان (CI) کمتر از ۱۰۰ درصد است. از طرفی هرچه عدد t بیشتر و فاصله اطمینان کمتر باشد تخمین دقیق تر است [۳۹]. میانگین عدد t برای λ_g (۴۸/۳۰) کمتر از میانگین عدد t برای τ (۷۲/۸۵) است. بنابراین به طور کلی پارامترهای به دست آمده از مدل لوجستیک تخمین دقیق تری نسبت به مدل گومپرتز هستند.

نقطه عطف معادله گومپرتز بر اساس معادله $t_i = \lambda_g + A / (\mu_m \times e(1))$ محاسبه شد و با نقطه عطف معادله لوجستیک (τ) مقایسه گردید. در تمامی موارد t_i کمتر از τ بود. زمانی که تمام اسپورها قابل مشاهده بودند، درصد جوانه زنی $P(t_i)$ و $P(\tau)$ در نقطه عطف به ترتیب برابر با تقریباً ۳۷ درصد در مدل گومپرتز و ۵۰٪ در مدل لوجستیک بود.

۴- نتیجه گیری

کپک روغنی به دلیل غنی بودن از مواد مغذی و رطوبت بالا در معرض فساد توسط کپک و مخمرها است. فعالیت آبی و درجه حرارت دو عامل کلیدی در کنترل میزان آلودگی این فرآورده به شمار می رود. در این پژوهش شرایط جوانه زنی کونیدیوسپورها و رشد شعاعی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جدا شده از کپک روغنی تحت تاثیر درجه حرارت و فعالیت آبی محیط کشت YGC مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دما، فعالیت آبی و اثر متقابل این دو به طور معنی داری باعث تغییر در سرعت جوانه زنی و رشد میسلیم کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* می شوند. فاز تأخیری جوانه زنی نیز به میزان قابل ملاحظه ای متأثر از درجه حرارت و فعالیت آبی محیط کشت بود. به این ترتیب که در دمای ثابت، با کاهش فعالیت آبی، مدت زمان فاز تأخیری جوانه زنی افزایش یافت. همچنین در فعالیت آبی ثابت، کوتاه ترین زمان فاز تأخیری مربوط به دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بود. همین شرایط در خصوص سرعت جوانه زنی و رشد شعاعی مشاهده شد. به طور کلی مشخص شد که در فعالیت آبی ۰/۶۵ کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* تحت هیچ شرایطی جوانه نمی زند. در مقایسه مدل های گومپرتز و لوجستیک برای جوانه زنی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس* مشخص شد که مدل گومپرتز تخمین دقیق تری ارائه می دهد.

Journal of Applied Bacteriology, 70, 361–371.

- [10] Kerr, W.L., Kerr, C.A. 2015. Electrostatic spraying of potassium sorbate for the reduction of yeast and molds on cakes, International journal of food processing and preservation, 39, 2171-2179.
- [11] Alipoor, M., Mehdizadeh, M. 1377. Bacterial and fungal contamination of food, Arkan press, Isfahan, Iran.
- [12] Abellana, M., Torres, L., Sanchis V. and Ramos, A.J. 1997. Caracterización de diferentes productos de bollería industrial. II. Estudio de la micoflora. Alimentaria 287, 51–56.
- [13] Poonnakasem, N. 2016. Effect of HPMC Addition and Modified Atmosphere Packaging on the Qualities of Chilled Pound Cake, Journal of culinary science and technology, 1-11.
- [14] Robertson, G.L. 2013. Modified atmosphere packaging. In Food Packaging: Principles and Practice, 3rd Ed., pp. 429–443, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [15] Janjarasskul, T., Tananuwong, K., Kongpensook, V., Tantratian, S., Kokpol, S. "Shelf life extension of sponge cake by active packaging as an alternative to direct addition of chemical preservatives." LWT-Food Science and Technology 72 (2016): 166-174.
- [16] BINTSIS, T., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. and ROBINSON, R.K. 2000. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80(6), 637–645.
- [17] Lakins, D.G., Echeverry, A., Alvarado, C.Z., Brooks, J.C., Brashears, M.T. and Brashears, M.M. 2008. Quality of and mold growth on white enriched bread for military rations following directional microwave treatment. Journal of Food Science. 73(3), M99–M103.
- [18] Seiler, D.A.L. 1968. Prolonging the shelf life of cake. Br. Baker 156, 25–26.
- [19] Oms-Oliu, G., Martin-Belloso, O. and Soliva-Fortuny, R. 2010. Pulsed light treatments for food preservation. Food and Bioprocess Technology. 3, 13–23.
- [20] Gould, G.W. (1995) New Methods of Food Preservation. London: Chapman & Hall.

۵- سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از رساله دکتری با کد ۲۶۳۳۱/۳ می‌باشد، نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل حمایت‌های مالی پژوهش تشکر می‌نمایند. همچنین از شرکت شهر بابانا (تولید کننده کیک) جهت همکاری در نمونه برداری ها و برخی آزمایشات و شرکت شهاب کیا آرمان (آزمایشگاه همکار موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی) جهت انجام تمامی آزمایشات، قدردانی می‌گردد.

۶- منابع

- [1] Smith, J.P., Daifas, D.P., El-Khoury, W., Koukoutsis, J. and El-Khoury, A. 2004. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 44, 19–55.
- [2] Beckett, A. 2012. Bread and baked goods: Executive summary. Mintel Group Ltd. Retrieved November 11, 2013 Mintel Reports database.
- [3] Bakeries: Industry Snapshot." Center for Economic Vitality. Western Washington University College of Business and Economics, June 2011. Web. 15 Oct. 2012.
- [4] Fatemi Amin, S.R., Mortezaei, A. 1392. Supply chain strategy for food products Strategic, a plan for industry, mining and trade. Iranian Academic center for education, culture and research, Tehran, Iran.
- [5] Seiler, D., 1988. Microbiological problems associated with cereal based foods. Food and Science Technology Today, 2, 37–41.
- [6] Beuchat, L.R., Hocking, A.D. 1990. Some consideration when analyzing foods for the presence of xerophilic fungi, Journal of Food Protection, 53 (11), 984–989.
- [7] Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. Fungi and Food Spoilage, 2nd ed. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, USA.
- [8] Fustier, P., Lafond, A., Champagne, C.P., Lamarche, F., 1998. Effect of inoculation techniques and relative humidity on the growth of moulds on the surfaces on yellow layer cakes. Applied and Environmental Microbiology, 64(1), 192–196.
- [9] Legan, J. D., & Voysey, P. A. 1991. Yeast spoilage of bakery products and ingredients.

- [32] Hocking, A.D., Pitt, J.I., 1980. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Applied Environmental Microbiology*. 39, 488–492.
- [33] Marín, S., Maganb, N., Abellanaa, M., Canelac, R., Ramosa, A. J. and Sanchis, V. 2000. Selective effect of propionates and water activity on maize mycoflora and impact on fumonisin B1 accumulation. *Journal of Stored Products Research*. 36: 203-214.
- [34] Gougouli, M., Koutsoumanis, K. P. 2010. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions, *International Journal of Food Microbiology* 140: 254–262
- [35] Gougouli, M., Kalantzi, K., Beletsiotis, E., Koutsoumanis, K. P. 2011. Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production, *Food Microbiology* 28:1453-1462
- [36] Baert K., Valero A., De Meulenaer B., Samapundo S., Morshed Ahmed M., Bo L., Debevere J., Devlieghere F., (2007), Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples, *International Journal of Food Microbiology*, 118: 139–150.
- [37] Marin, S., Sanchis, V., Sáenz, R., Ramos, A.J., Vinas, I. and Magan, N. 1998. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *Journal of Applied Microbiology* 84, 25–36.
- [38] Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and Van't Riet, K. 1990. Modelling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875–1881.
- [39] Dantigny, P., Marin, S., Beyer, M., Magan, N. 2007. Mould germination: Data treatment and modelling, *International Journal of Food Microbiology* 114: 17–24.
- [40] Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M., 2005. Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*. 100(1-3), 187-196.
- [41] Gougouli, M., Koutsoumanis, K.P., 2013. Relation between germination and mycelium
- [21] Abellana, M., Benedi, V., Sanchis, V. and Ramos, A.J. 1999. Water activity and temperature effects on germination and growth of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* isolates from bakery products. *Journal of Applied Microbiology*. 87: 371-380.
- [22] Lahlahi, R., Serrhini, M.N., Friel, D., Jijakli, M.H. 2007. Predictive modeling of temperature and water activity (solutes) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinera*, Pers. *International Journal of Food Microbiology*. 114(1):1-9.
- [23] Wheeler, K.A. and Hocking, A.D. 1988. Water relations of *Paecilomyces variotii*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus candidus* and *Aspergillus sydowii*, xerophilic fungi isolated from Indonesian dried fish. *International Journal of Food Microbiology*, 7, 73–78.
- [24] Beuchat, L.R. 1983. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. *Journal of Food Protection* 46, 135–141.
- [25] Prescott L. M. ,Harley J. P. ,Klein D. A. , 2004, *Microbiology*, McGraw-Hill Science, Engineering, Math; 6 edition.
- [26] Magan, N. and Lacey, J. 1988. Ecological determinants of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology*, 7, 245–256.
- [27] Almeida, A. P., correa, B., M. A. B. Mallozzi, E. Sawazaki and L. M. ValenteSoares. 2000. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31.321-326.
- [28] Idress, H. A., Laith, K. T. A., Muftah, A. N., Ibrahim, A. A. B., Maziah, Z., Saad, S. M., Maraghy, E. L. and Razaul, S. M. K. 2010. Screening of Fungi Associated with Commercial Grains and Animal Feed in Al_Bayda Governorate Libiya . *World Applied Sciences Journal*. 9(7):746-756.
- [29] Harrigan, W., 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 359–375.
- [30] Choi, Y., Hyde, M. K. D. and Ho, W. H. 1999. Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity*, 3: 29-38.
- [31] Fisher, F., Cook, N. B. *Fundamentals of diagnostic mycology*. Philadelphia: Saunders WB.; 1998.

- [45] Huang, Y., Begum, M., Chapman, B., Hocking, A.D., 2010. Effect of reduced water activity and reduced matrix potential on the germination and growth of xerophilic and non-xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 1–5.
- [46] Judet, D., Bensoussan, M., Perrier-Cornet, J.M., Dantigny, P., 2008. Distributions of the growth rate of the germ tubes and germination time of *Penicillium chrysogenum* conidia depend on water activity. *Food Microbiology*, 25, 902–907.
- [47] Schubert, M., Mourad, S., Schwarze, F.W.M.R., 2010. Statistical approach to determine the effect of combined environmental parameters on conidial development of *Trichoderma atroviride* (T-15603.1). *Journal of Basic Microbiology*, 50, 1–11.
- growth of individual fungal spores, *International Journal of Food Microbiology*, 161, 231–239.
- [42] Gock, M. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I., Poulos, P. G. 2003. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi, *International journal of food microbiology*, 81 (1): 11–19.
- [43] Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 419–431.
- [44] Holmquist, G.U., Walker, H.W., Stahr, H.M., 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Food Science*, 48, 778–782.



Investigating the germination and growth kinetic of *Aspergillus fumigatus* isolated from cake under different conditions of a_w and temperature

Nakhchian, H. ¹, Tabatabaee Yazdi, F. ², Mortazavi, S. A. ², Mohebbi, M. ²

1. Ph.D, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received 2019/ 12/ 30 Accepted 2020/ 02/ 15 Keywords: Germination, Water activity, Mold, cake, Modelling. DOI: 10.52547/fsct.18.05.24 *Corresponding Author E-Mail: tabatabai@um.ac.ir	The impact of a_w (0.65-0.9), temperature (15-30°C) and their interaction on the germination and radius growth of <i>Aspergillus fumigatus</i> isolated from cake was surveyed on Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC-Agar) during 60 days as well as the capabilities of Gompertz and Logistic models for fitting data were explored. Rising a_w (from 0.65 to 0.9) and temperature (from 15 to 25°C) caused significant enhancing of germination and growth rate of <i>A. fumigatus</i> ($P < 0.05$). However, in constant a_ws, further increasing of temperature (up to 30°C) led to meaningful decreasing of these parameters ($P < 0.05$). <i>A. fumigatus</i> did not germinate at a_w 0.65. In addition, germination was observed at a_w 0.7 and 0.75 only when the temperature was 15 and 25°C while the mycelium growth was not occurred at these conditions. Although the germination rate was relatively high at a_w 0.8, the mycelium growth was very limited. The most amount of germination and radius growth was for a_w 0.85 -0.9 and temperature 15-25°C ($P < 0.05$). Consequently, the optimum growth of <i>A. fumigatus</i> was seen at a_w 0.9 and temperature 25°C and the best shelf life of cake proved at $a_w < 0.7$. Furthermore, fitting the growth curves demonstrated the more accuracy of Logistic model rather than Gomperts model.