

## تأثیر عصاره‌های مختلف گیاه دارویی تشنه‌داری (*Scrophularia striata*) در کاهش آفلاتوکسین B1 قارچ (*Aspergillus flavus*) روی مغز پسته

۱. لیلا مرادی؛ ۲. زهره جعفری؛ ۳. محسن فرزانه\*

۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار زیست‌شناسی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۳. استادیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین-تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۲۵)

### چکیده

امروزه استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهان دارویی به دلیل داشتن خواص دارویی، ضدقارچی، ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی در صنایع دارویی و غذایی رو به پیشرفت است. در این راستا پژوهشی به منظور ارزیابی عصاره‌های مختلف گیاه دارویی تشنه‌داری (*Scrophularia striata*) در جلوگیری از رشد میسلیومی و کاهش آفلاتوکسین *Aspergillus flavus* در محیط کشت مایع سیب‌زمینی-دکستروز (PDB) و همچنین مغز پسته انجام شد. میزان آفلاتوکسین B1 با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC) ارزیابی شد. کاربرد عصاره‌ها در چند غلظت (۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در محیط PDB نشان داد که تنها عصاره آبی در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از قابلیت قابل توجه مهار قارچ (۴۱/۰۲ درصد کاهش وزن خشک قارچ) برخوردار بوده و سه عصاره اتیل استاتی، متانولی و آبی تأثیر شگفت‌آوری (۱۰۰-۹۲ درصد) در مهار تولید توکسین داشتند. نتایج تجزیه آفلاتوکسین نشان داد که عصاره‌های آبی و متانولی به ترتیب باعث ۳۳/۷ و ۲۹/۲ درصد تجزیه آفلاتوکسین شدند. نتایج روی پسته نشان داد تنها عصاره آبی در غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش معنی‌دار (۳۷/۱۴-۵۸/۹۱ درصد) اسپورزایی قارچ شد درحالی‌که عصاره‌های متانولی و آبی بیشترین تأثیر را در کاهش تولید توکسین نشان دادند و به ترتیب باعث ۹۶/۸۵ و ۷۵/۴۸ درصد کاهش آفلاتوکسین B1 شدند. در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تنها عصاره متانولی قادر به کاهش ۴۰/۳۵ درصدی آفلاتوکسین B1 روی پسته شد. در مجموع، کاربرد عصاره گیاه تشنه‌داری می‌تواند احتمالاً جهت مهار آفلاتوکسین روی محصولات کشاورزی مؤثر واقع شود.

کلیدواژه‌گان: آسپرژیلوس فلاووس، عصاره گیاه تشنه‌داری، زهرابه قارچی، پسته.

## Effects of various extractions of *Scrophularia striata* to reduce Aflatoxin B1 from *Aspergillus flavus* on pistachio nut

Leila Moradi<sup>1</sup>, Zohreh Jafari<sup>2</sup> and Mohsen Farzaneh<sup>3\*</sup>

1, 2. MSc. Student and Assistant Professor, Department of Biology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

3. Assistant Professor, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, GC. Evin, Iran

(Received: Apr. 22, 2016 - Accepted: Aug. 15, 2016)

### ABSTRACT

Today, the use of essential oils and extracts of medicinal plants in food and pharmaceutical industries is growing because of their medicinal, antifungal, antibacterial and antioxidant properties. In this way, the effects of various extracts of *Scrophularia striata*, a medicine plant, were studied for inhibiting *Aspergillus flavus* mycelial growth and reducing aflatoxin B1-level in culture liquid potato-dextrose (PDB) as well as the pistachio nut. Aflatoxin B1 (AFB1) was evaluated by high performance thin layer chromatography (HPTLC) method. Application of different concentrations of the extracts (250, 500, 1000, 2000 mg/L) in order to inhibit the growth of *Aspergillus flavus* and also Aflatoxin B1 production in PDB medium demonstrated that the aqueous extract at a concentration of 2000 mg/L could significantly inhibit the *A. flavus* growth (41.02% loss in dried weight). Ethyl acetate, methanol and aqueous extracts had amazing effect (92-100%) to inhibit toxin production. The results of AFB1 degradation assay indicated that the application of aqueous and methanolic extracts led to significant degradation of aflatoxin by 33.7 and 29.2%, respectively. It is shown that only aqueous extract at concentrations of 2000 and 4000 mg/L could significantly inhibit (37.14- 58.91%) fungal sporulation on pistachio nuts, while both methanol and aqueous extracts showed the strongest impact on inhibiting toxin production and caused a reduction of 96.85% and 75.48%, respectively, in AFB1 content. At the concentration of 2000 mg/L only methanol extract was able to reduce AFB1 (40.35%) on the pistachio nuts. Finally, the use of *Scrophularia striata* can possibly inhibit the aflatoxin contamination on agricultural products.

**Keywords:** *Asergillus flavus*, mycotoxin reduction, pistachio, plant extract, *Scrophularia striata*.

## مقدمه

کپک‌های قارچی مولد زهرابه‌های قارچی (میکوتوکسین‌ها) با رشد روی برخی محصولات کشاورزی در مزرعه و طی مراحل برداشت، پس‌از برداشت، فرآوری و انبارداری باعث آلودگی محصول به آفلاتوکسین می‌شوند. میکوتوکسین‌ها اثرات زیان‌آور مختلف از جمله سمیت‌های مزمن و حاد اولیه، توده‌زایی، سرطان‌زایی، ناقص‌الخلقه‌زایی، سقط جنین و سرکوب سیستم ایمنی بدن را در انسان و حیوان سبب می‌شوند (Coulombe 1993).

زهرابه‌های آفلاتوکسین متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که عمدتاً توسط قارچ‌های *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* روی طیف‌وسپیدی از حبوبات، غلات، میوه‌جات و محصولات غذایی تولید می‌شوند (Shephard 2003). آفلاتوکسین‌ها، به عنوان قوی‌ترین زهرابه‌های قارچی، از خطرناک‌ترین آلاینده‌های غذای انسان و خوراک دام محسوب شده که منجر به سرطان و سرکوب سیستم ایمنی در انسان و حیوانات می‌شوند (Coulombe 1993, Guengerich et al. 1996, Liu and Wu 2010). تاکنون بیست نوع آفلاتوکسین شناخته شده که عمده‌ترین آن‌ها، آفلاتوکسین نوع B1، نوع B2، نوع G1، نوع G2 و نوع M1 می‌باشد. از آنجا که آفلاتوکسین‌ها سمی و سرطان‌زا هستند مقدار آن‌ها در خوراک دام و محصولات مختلف غذایی انسان به‌دقت پایش شده و در اغلب کشورها حد مجاز آن‌ها مشخص شده است. اغلب کشورها این مقدار مجاز را در حد چند پی‌پی‌بی مشخص کرده‌اند و پایش مقدار مجاز آفلاتوکسین در کشورهای مختلف نشان از اهمیت فوق‌العاده این موضوع دارد.

کنترل قارچ‌های خطرناک فوق در محصولات کشاورزی و غذایی معمولاً با استفاده از ترکیبات سنتزی شیمیایی انجام می‌شود که در این ترکیبات نیز اثرات جانبی مثل سرطان‌زایی و توده‌زایی گزارش شده است (Stenersen 2004). لذا جهت رفع این مشکل، استفاده از منابع طبیعی از جمله گیاهان و میکروارگانیسم‌های مفید و متابولیت‌های تولیدشده از آنها به‌عنوان روش‌هایی ایمن و زیست‌فناور، بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته‌اند.

از آنجا که معمولاً آلودگی برخی محصولات

کشاورزی و غذایی به آفلاتوکسین اجتناب‌ناپذیر است، چندین استراتژی برای سم‌زدایی و غیرفعال کردن آن نیز پیشنهاد شده است که شامل روش‌های فیزیکی، بیولوژیکی و شیمیایی است (Park 1993). به هر حال محدودیت‌های روش‌های پاکسازی فیزیکی و شیمیایی از قبیل کاهش کیفیت و خواص تغذیه‌ای محصول، اثرات نامطلوب روی سلامت انسان و محیط زیست و گرانی تجهیزات مورد نیاز، توجه محققین را به سمت روش‌های طبیعی و بیولوژیکی سوق داده است (Philips et al. 1994). از بین عوامل طبیعی، گیاهان دارویی به‌خاطر موقعیت سالم، توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌اند.

در سال‌های اخیر گیاهان دارویی و ادویه‌ای در زمینه‌های مختلف چون صنایع دارویی، آرایشی بهداشتی و نیز صنایع غذایی استفاده روزافزون داشته‌اند. استفاده از گیاهان دارویی در صنایع غذایی چه به‌صورت عوامل غذا دارو<sup>۱</sup> و مکمل‌های غذایی و چه به‌عنوان عوامل طبیعی نگهدارنده مواد غذایی، گسترش بسیار زیادی یافته است (Shetty and Labbe 1998, Tajkarimi et al. 2010). بنابراین، انگیزه و تمایل زیادی در کشف خواص بیولوژیکی ناشناخته گیاهان دارویی مهم برای استفاده بهتر از آنها وجود دارد. در سال‌های اخیر برخی تحقیقات روی کاربرد گیاهان دارویی بویژه اسانس و عصاره‌های آنها جهت جلوگیری از رشد قارچ‌ها و ممانعت از تولید توکسین متمرکز شده است (Basilico 1999, Jayashree and Subramanyam 1999, Razzaghi-Abyaneh et al. 2008, Gorran et al. 2013).

در کاهش آلودگی آفلاتوکسین B1 (AFB1) و کنترل رشد *Aspergillus flavus*، توانایی گونه‌های گیاهی متعلق به خانواده *Scrophulariaceae* شناخته نشده است. بنابراین، اهداف این تحقیق شامل: (۱) ارزیابی قابلیت پیکره رویشی گیاه تشنه‌داری (*S. striata*) به‌عنوان قارچ‌کش علیه قارچ *A. flavus*؛ (۲) دستیابی به نوع عصاره مؤثر از پیکره رویشی گیاه تشنه‌داری به‌عنوان مهارکننده تولید آفلاتوکسین B1 در قارچ، (۳) ارزیابی قابلیت عصاره‌های گیاه تشنه‌داری در تجزیه آفلاتوکسین B1 و (۴) کنترل رشد کپک اسپرژیلوس و کاهش آلودگی پسته به آفلاتوکسین B1 می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه زادمایه قارچ

جدایه *A. flavus* R5 که توکسین‌زایی آن قبلاً اثبات شده بود (Alibakhshi et al. 2011) از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. جهت تهیه زادمایه قارچ، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق اسپور قارچ در آب مقطر سترون، روی محیط غذایی مورب PDA داخل ویال‌های اپندورف ۲ میلی‌لیتری کشت داده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی به مدت یک هفته نگهداری شدند. هنگام انجام آزمایش، یک میلی‌لیتر از محلول ۰/۱۵ مولار نمک طعام حاوی ۰/۰۵ درصد tween 80 به هر ویال اضافه شده و به آرامی تکان داده شد تا سوسپانسیون اسپور تهیه شود. در پایان جمعیت اسپور در میلی‌لیتر سوسپانسیون با استفاده از لام هموسیتمتر تعیین شد.

### تهیه گیاه

پیکره رویش گیاه تشنه‌داری از مناطق ارکوازی ایلام تهیه شد. گیاه مورد نظر توسط پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تایید شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت در سایه خشک گردید و تا زمان انجام آزمایش در محل خشک و خنک نگهداری شدند.

### تهیه عصاره

۵۰ گرم از نمونه گیاهی را به کمک آسیاب پودر کرده، سپس با کمک دو الک با اندازه مش ۱۶ و ۲۰، ذرات با اندازه‌های بین ۱/۱۹ - ۰/۸۴۱ میلی‌متر برای عصاره‌گیری بهتر انتخاب شدند. عصاره‌گیری به منظور تعیین بهترین فاز استخراج با چهار حلال ان-هگزان، اتیل‌استات، متانول و آب به ترتیب قطبیت از غیرقطبی به قطبی به روش خیساندن<sup>۱</sup> انجام گرفت. به‌طور خلاصه برای تهیه عصاره ان-هگزان از گیاه، ۳۰ گرم از پودر اندام هوایی خشک شده را با نسبت ۱ به ۱۰ (گیاه به حلال) در ارلن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر ان-هگزان در دمای ۳۵ درجه سلسیوس مخلوط کرده و به مدت ۳ ساعت روی شیکر دورانی با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه

در شرایط تاریکی قرار گرفت. این عمل سه مرتبه تکرار شد و هر بار به مدت ۳ ساعت انجام شد.

بعد از هگزان به ترتیب از حلال‌های اتیل‌استات، متانول و آب با همان روش بالا استفاده شد. عصاره‌های هگزان، اتیل‌استات، متانول و آب از فیلترهای کاغذی ۰/۴۵ میکرون به کمک پمپ خلا عبور داده شدند. حلال‌های هگزان، اتیل‌استات و متانول موجود در هر عصاره توسط دستگاه روتاری در دمای ۴۵ درجه سلسیوس تبخیر شد. باقیمانده حلال آب نیز به کمک دستگاه فریزداری به مدت ۲۴ ساعت جدا شد. در نهایت ماده خشک حاصل در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

### بررسی تأثیر عصاره در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ

در این آزمایش از هر عصاره خشک‌شده مقادیر ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم پودر خشک‌شده در یک میلی‌لیتر حلال دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) به عنوان حلال مناسب حل شد. سپس یک میلی‌لیتر DMSO حاوی عصاره به ۴۸ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB درون فلاکس‌های ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری اضافه شد تا غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم عصاره در لیتر محیط کشت تهیه شود. در مورد شاهد نیز از DMSO به تنهایی داخل محیط کشت استفاده شد. سپس بلافاصله یک میلی‌لیتر سوسپانسیون  $1 \times 10^4$  قارچ اسپور در میلی‌لیتر به محیط مایع درون ارلن اضافه شد و به مدت ۷ روز در شیکر انکوباتور با دور ۱۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. توده‌های میسلیم به کمک کاغذ صافی واتمن از محیط کشت جدا شد و در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک شدند. سپس وزن خشک میسلیم محاسبه شد. در نهایت میزان آفلاتوکسین B1 موجود استخراج و تعیین گردید (Gorran et al. 2013). میزان بازداری از تولید آفلاتوکسین B1 در تیمارهای مختلف با استفاده از نسبت میزان توکسین تولیدشده در تیمارها به میزان توکسین تولیدشده در شاهد و کاستن آن از عدد ۱ محاسبه شد (Gorran et al. 2013).

جداکننده<sup>۱</sup> (دکانتور) ریخته شد. سپس عصاره محیط کشت و کلروفرم با هم‌زدن به خوبی مخلوط شدند و بعد از دو فاز شدن، فاز بالایی (کلروفرم) که حاوی آفلاتوکسین بود در ظرفی شیشه‌ای ریخته شدند. سپس کلروفرم در دمای ۶۰ درجه سلسیوس با استفاده از دستگاه روتاری تبخیر شد. در نهایت نمونه‌های حاصل در یک میلی‌لیتر متانول حل شده و حداکثر به مدت دو هفته تا انجام آنالیزهای کروماتوگرافی در دمای ۴ درجه سلسیوس درون یخچال نگهداری شدند. جهت استخراج آفلاتوکسین از بستر پسته از ستون‌های ایمونوفینیتری (Puri-Fast AFLA BG IAC, LIBIOS Co., France) استفاده شد. به‌طور خلاصه، ده گرم پسته خرد و آسیاب شده و میزان آفلاتوکسین آن به کمک ستون ایمونوفینیتری و طبق روش استروکا و همکاران استخراج شد (Stroka et al. 2000). جهت انجام کروماتوگرافی و اندازه‌گیری آفلاتوکسین از دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا<sup>۲</sup> (HPTLC) استفاده شد. ابتدا هر نمونه در یک میلی‌لیتر کلروفرم به کمک دستگاه تولیدکننده امواج ماورای صوت، التراسونیک<sup>۳</sup>، کاملاً حل شد. سپس نمونه‌ها روی صفحه سلیکاژلی (TLC Silica) فاصله مناسب لکه‌گذاری شدند. سپس صفحات لکه‌گذاری شده در حلال کلروفرم-استون (به نسبت ۹ به ۱) قرار گرفته و عمل جداسازی آفلاتوکسین صورت گرفت. پس از جداسازی، صفحات مذکور درون قسمت آنالیز دستگاه HPTLC قرار گرفته و با استفاده از نرم‌افزار (CAMAG VideoScan TLC/HPTLC) Evaluation Software V. 1.01 به‌صورت کمی و کیفی در طول موج برانگیختگی ۳۶۵ نانومتر و نشر ۴۲۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. برای تجزیه داده‌ها از دو نرم‌افزار به تفکیک کارهای مورد نیاز بهره‌برده شد. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار Mini-tab مشخص شد.

### بررسی تأثیر عصاره در تجزیه آفلاتوکسین B1

یک میلی‌گرم در لیتر آفلاتوکسین B1 را به ویال‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی غلظت یک میلی‌گرم عصاره افزوده و روی شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از مدت ۲۴ ساعت مقادیر توکسین موجود ارزیابی شد (Gorran et al. 2013).

### بررسی تأثیر عصاره منتخب در مهار رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین B1 روی پسته

پسته‌های رسیده و سالم رقم اوحدی که پوسته سبز آن‌ها به پوسته استخوانی نچسبیده بود، از باغ‌های منطقه رفسنجان جمع‌آوری شد و پس از حذف پوسته سبز، پسته‌های خندان‌شده از پسته‌های خندان‌نشده تفکیک شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. جهت انجام آزمایش ابتدا با استفاده از اسکالپل سترون، روی مغز پسته‌ها در طول درز پوسته استخوانی با کمک سوزن سترون، زخمی به عمق ۲ و عرض ۱ میلی‌متر ایجاد شد (Farzaneh et al. 2012). سپس ۲۰ گرم پسته زخمی (۱۰ عدد) با غلظت ۲ و ۴ در هزار عصاره (۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم عصاره خشک در میلی‌لیتر آب مقطر سترون) به‌طور جداگانه به مدت ۱۵ دقیقه به‌روش غوطه‌ورسازی تیمار شد و درون تشتک‌های پتری ۹ سانتی متری منتقل شدند. پس از خشک شدن سطحی، به میزان ۲۰ میکرولیتر از زادمایه  $5 \times 10^5$  اسپور قارچ *A. flavus* R5، به محل زخم هر پسته مایه‌زنی شد. پسته‌های مایه‌زنی شده به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شد. جمعیت اسپور قارچ در گرم پسته محاسبه و میزان آفلاتوکسین نمونه‌ها، پس از استخراج، تعیین شد.

### استخراج و اندازه‌گیری آفلاتوکسین

استخراج آفلاتوکسین B1 موجود در محیط کشت مایع سه مرتبه طبق روش تنیولا و همکاران انجام شد (Teniola et al. 2005). به این صورت که عصاره محیط کشت همراه با ۱۰ سی‌سی کلروفرم به درون قیف

1. Separatory Funnel  
2. High performance tin layer chromatography  
3. Ultra sonic

سه غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به میزان ۱۰۰ درصد از تولید توکسین ممانعت کرد. در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیز با ۹۸/۷۲ درصد کاهش در میزان تولید آفلاتوکسین، تفاوت معنی‌داری با سایر غلظت‌ها مشاهده نشد. با افزایش غلظت عصاره میزان رشد قارچ و سطح آفلاتوکسین تولیدی کاهش یافت به طوری که در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از عصاره‌متانولی به ترتیب، ۳۵/۱۵، ۳۶/۴۴، ۳۷/۵۱ درصد کاهش در وزن خشک قارچ و ۱۰۰ درصد کاهش در میزان آفلاتوکسین تولیدی مشاهده شد.

بر اساس نتایج جدول ۱ عصاره آبی گیاه تشنه‌داری بالاترین تأثیر در بازدارندگی از رشد قارچ نشان می‌دهد. با کاربرد حداکثر غلظت کاربردی (۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) عصاره آبی گیاه تشنه‌داری، وزن خشک قارچ به میزان ۴۱/۰۲ درصد کاهش نشان داد که نسبت به بقیه عصاره‌ها از خاصیت ضد قارچی بالاتری برخوردار بود و از طرفی باعث کاهش ۱۰۰ درصدی میزان آفلاتوکسین تولیدی شد. با کاهش غلظت عصاره آبی، میزان رشد قارچ و سطح مهار آفلاتوکسین تولیدی کاهش یافت به طوری که در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر از عصاره آبی به ترتیب ۳۴/۵۸، ۳۳/۵۲، ۳۲/۷۹ درصد کاهش در وزن خشک قارچ و به ترتیب ۱۰۰، ۹۷/۲۴ و ۹۴/۰۷ درصد کاهش در میزان آفلاتوکسین تولیدی مشاهده شد.

#### اثر عصاره‌های مختلف گیاه تشنه‌داری در تجزیه آفلاتوکسین

بر اساس نتایج شکل ۱ بین عصاره‌های مختلف در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت بسیار معنی‌داری در تجزیه آفلاتوکسین B1 مشاهده شد. عصاره آبی با ۳۳/۷ درصد تجزیه آفلاتوکسین B1، مؤثرترین بود (شکل ۱، a). عصاره متانولی با ۲۹/۲ درصد تجزیه آفلاتوکسین، در مرتبه بعدی قرار گرفت (شکل ۱، b). عصاره‌های اتیل‌استاتی و ان-هگزانی به ترتیب با ۴/۱ و ۲/۲ درصد تجزیه با شاهد تفاوت معنی‌دار نداشتند و قادر به تجزیه معنی‌دار آفلاتوکسین بودند.

برای تجزیه واریانس از نرم‌افزار SAS و به روش GLM استفاده شد. پس از تجزیه واریانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ یا ۵٪ مقایسه شدند.

#### نتایج

اثر عصاره‌های مختلف گیاه تشنه‌داری در بازدارندگی از رشد میسلیمی و کاهش آفلاتوکسین قارچ *A. flavus* بین غلظت‌های مختلف چهار نوع عصاره گیاه تشنه‌داری از نظر توانایی در جلوگیری از رشد قارچ و همچنین کاهش آفلاتوکسین B1 تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱).

از نظر مهار رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین، عصاره ان-هگزانی کمترین تأثیر را نشان داد. با افزایش غلظت عصاره ان-هگزانی (به ترتیب ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) میزان رشد قارچ به ترتیب ۱۰/۴۹، ۱۴/۱۸، ۱۹/۸، ۲۰/۰۳ درصد کاهش یافت اما تأثیر عصاره در کاهش میزان آفلاتوکسین تولیدی مشهودتر بود، به طوری که به ترتیب ۲۶/۲۸، ۴۴/۵۲، ۶۸/۵۲، ۷۹/۰۹ درصد کاهش در میزان آفلاتوکسین تولیدی مشاهده شد.

عصاره اتیل‌استاتی نیز تأثیر قابل قبولی در مهار رشد قارچ نشان نداد اما به طور شگفت‌آوری از تولید توکسین توسط قارچ جلوگیری کرد (جدول ۱). بین غلظت‌های مختلف عصاره اتیل‌استاتی گیاه تشنه‌داری از نظر کاهش آفلاتوکسین تولیدی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در کمترین غلظت کاربردی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر، ۹۲/۹۳ درصد کاهش تولید آفلاتوکسین مشاهده شد. با افزایش غلظت عصاره به ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۲۶/۹۸، ۲۷/۱۳، ۳۲/۹۲ درصد کاهش در وزن خشک قارچ و ۹۴/۷۱، ۹۶/۵۷، ۹۷/۸۶ درصد کاهش در میزان آفلاتوکسین تولیدی مشاهده شد. به عبارت دیگر هرچند عصاره اتیل‌استاتی تأثیر چشمگیری در جلوگیری از رشد قارچ نشان نداد اما در ممانعت از تولید توکسین بسیار مؤثر بود.

عصاره متانولی گیاه تشنه‌داری در مهار رشد قارچ تأثیر قابل توجهی نداشت اما در همه غلظت‌ها تأثیر قابل توجهی در مهار تولید توکسین نشان داد به طوری که در

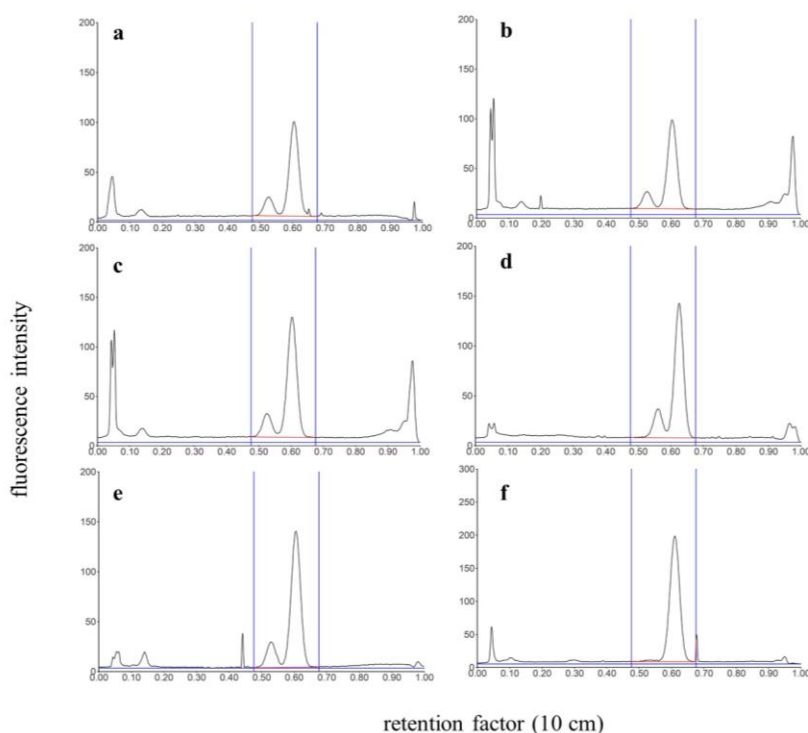
جدول ۱. بررسی تأثیر عصاره‌های مختلف گیاه تشنه‌داری در مهار رشد میسلیمی و تولید آفلاتوکسین در محیط PDB پس از هفت روز نگهداری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی

Table 1. The inhibitory effect of various extracts of *Scrophularia striata* against *A. flavus* growth and AFB1-production in PDB medium after seven days' incubation at 30 °C in darkness

Solvent	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )	Inhibition %	
		Mycelial growth	AFB1 production
N-hexane	250	10.49 ± 0.48 h	26.28 ± 2.62 f
	500	14.18 ± 0.97 g	44.52 ± 1.25 e
	1000	19.80 ± 0.89 f	68.52 ± 2.73 d
	2000	20.03 ± 1.01 f	79.09 ± 1.25 c
	250	24.62 ± 1.48 e	92.93 ± 1.12 b
Ethyl acetate	500	26.98 ± 0.89 de	94.70 ± 2.18 ab
	1000	27.13 ± 0.75 d	96.57 ± 3.83 ab
	2000	32.92 ± 1.33 bc	97.86 ± 2.14 a
	250	31.79 ± 1.61 c	98.73 ± 1.28 a
Methanol	500	35.15 ± 1.47 b	100.00 <sup>nd</sup> ± 0.00 a
	1000	36.44 ± 2.18 b	100.00 <sup>nd</sup> ± 0.00 a
	2000	37.51 ± 0.93 b	100.00 <sup>nd</sup> ± 0.00 a
	250	32.79 ± 1.22 bc	94.07 ± 3.39 ab
Water	500	33.52 ± 2.29 bc	97.24 ± 1.31 ab
	1000	34.58 ± 1.78 b	100.00 <sup>nd</sup> ± 0.00 a
	2000	41.02 ± 1.53 a	100.00 <sup>nd</sup> ± 0.00 a

\* The results are the mean of three replicates ± standard error.

\* نتایج حاصل از میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد.



شکل ۱. کروماتوگرام HPTLC تأثیر غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌های آبی (a)، متانولی (b)، اتیل‌استاتی (c) و ان-هگزانی (d) اندام هوایی گیاه تشنه‌داری در میزان تجزیه ۱۰۰۰ پی‌پی‌بی آفلاتوکسین B1 در محلول ۵٪ دی‌متیل‌سولفوکساید پس از نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و تاریکی. تیمار شاهد فاقد عصاره (e) و تیمار استاندارد ۱۰۰۰ پی‌پی‌بی آفلاتوکسین B1 (f) نیز مشاهده می‌شود. محور افقی نشان‌دهنده فاکتور بازداری<sup>۱</sup> و محور عمودی نشان‌دهنده شدت میزان فلورسنت ناشی از آفلاتوکسین B1 می‌باشد.

Figure 1. HPTLC-chromatogram of Aflatoxin B1 (1000 ng. mL<sup>-1</sup>)-degradation in the presence of e, 5% dimethyl-sulfoxide in deionized water (DMSO 5%); a, aqueous extract of *Scrophularia striata*; b, methanolic extract; c, ethyl acetate extract and d, N-hexane extract at the concentration 1000 mg.L<sup>-1</sup> DMSO 5% , after 24 h incubation at 30 °C in darkness. The HPTLC-chromatogram of AFB1 standard was shown in part (f).

تعداد اسپور در گرم مغز پسته) شد اما بین سه عصاره دیگر (در هر سه غلظت) با شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. عصاره آبی در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش ۳۷/۱۴ درصدی میزان اسپور تولیدی شد و با افزایش غلظت عصاره به ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، میزان ۵۸/۹۱ درصد کاهش در جمعیت اسپور قارچ روی پسته مشاهده شد.

پتانسیل عصاره‌های مختلف گیاه تشنه‌داری در مهار رشد قارچ *A. flavus* و آفلاتوکسین روی پسته میزان اسپور قارچ در تیمار شاهد آلوده برابر با  $10^7 \times 8/7$  اسپور در گرم مغز پسته بود. بر اساس نتایج جدول ۲، غوطه‌وری پسته‌ها در عصاره آبی گیاه تشنه‌داری (غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث کاهش معنی‌دار در میزان جمعیت قارچ *A. flavus*

جدول ۲. بررسی تأثیر عصاره‌های مختلف گیاه تشنه‌داری در بازدارندگی از کلینزاسیون (تشکیل اسپور) و تولید آفلاتوکسین B1 قارچ *A. flavus* روی پسته پس از هفت روز نگهداری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی

Table 2. The inhibitory effect of various extracts of *Scrophularia striata* against *A. flavus* colonization and AFB1-production on pistachio after seven days' incubation at 30 °C in darkness

Solvent	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )	Inhibition %	
		Spore formation	AFB1 formation
N-hexane	2000	2.88 ± 0.35 c	4.31 ± 0.77 e
	4000	3.42 ± 0.49 c	55.82 ± 1.59 c
Ethyl acetate	2000	1.87 ± 0.18 c	3.84 ± 0.63 e
	4000	2.16 ± 0.39 c	58.90 ± 2.23 c
Methanol	2000	1.05* ± 0.24 c	40.35 ± 2.05 d
	4000	3.12 ± 0.67 c	96.85 ± 1.37 a
Water	2000	37.14 ± 1.67 b	5.14 ± 0.76 e
	4000	58.91 ± 2.04 a	75.48 ± 2.85 b

\* The results are the mean of three replicates ± standard error.

\* نتایج حاصل از میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد.

(Buchanan 1987, Razzaghi-Abyaneh et al. 2006b). محدودیت‌های استفاده از مواد شیمیایی از قبیل سمیت برای انسان و حیوانات، مقاوم شدن قارچ به سم، و اثرات نامطلوب بر اکوسیستم باعث شد که در این تحقیق به منابع طبیعی رجوع کرده و قابلیت گیاه تشنه‌داری در مهار رشد قارچ و بیوسنتز آفلاتوکسین بررسی شود. گیاه تشنه‌داری از گیاهان دارویی ارزشمند است که در طب سنتی در درمان بیماری‌ها به کار برده می‌شود و تحقیقات آزمایشگاهی متعددی، خواص درمانی آن را اثبات کرده‌اند. اثرات گیاه تشنه‌داری در طب سنتی شامل بهبود زخم، تسکین درد، خواص ضداکسیدانی، ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد درد می‌باشد (Amin 1999).

در تحقیق حاضر فعالیت بازدارندگی چهار نوع عصاره گیاه تشنه‌داری، شامل عصاره ان-هگزانی، اتیل استاتی، متانولی و آبی از رشد قارچ *A. flavus* و کاهش آفلاتوکسین قارچ مطالعه شد و سازوکارهای احتمالی چهار نوع عصاره از قبیل بازدارندگی از رشد قارچ، مهار تولید آفلاتوکسین در قارچ و پاکسازی زیستی آفلاتوکسین بررسی شد. از نظر میزان مهار رشد قارچ،

نتایج میزان آفلاتوکسین موجود در پسته‌ها نشان داد که هر چهار عصاره در غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش معنی‌دار میزان آفلاتوکسین تولیدی شدند. میزان آفلاتوکسین B1 تولیدی در تیمار شاهد برابر با ۲۵۵۲۰ نانوگرم در گرم پسته بود. بیشترین قابلیت در مهار تولید آفلاتوکسین در حضور غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره متانولی اتفاق افتاد که میزان آفلاتوکسین B1 به ۸۰۲ نانوگرم در گرم تقلیل یافت. عصاره‌های آبی، اتیل استاتی و ان-هگزانی نیز در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب باعث ۷۵/۴۸، ۵۸/۹۰ و ۵۵/۸۲ درصد کاهش در میزان آفلاتوکسین تولیدی روی پسته شدند. در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تنها عصاره متانولی قادر به کاهش قابل توجه (۴۰/۳۵٪) آفلاتوکسین B1 روی پسته شد و مابقی عصاره‌ها تأثیر معنی‌دار نداشتند.

### بحث و نتیجه‌گیری

از زمان کشف آفلاتوکسین B1 در اوایل دهه ۱۹۶۰، تعداد زیادی از مواد ترکیبات شیمیایی با هدف مهار بیوسنتز آفلاتوکسین B1 غربالگری شده‌اند ( Zaika and

از آنجا که آلودگی به آفلاتوکسین اجتناب‌ناپذیر است چندین استراتژی برای سم‌زدایی و غیرفعال کردن آن پیشنهاد شده‌است که شامل روش‌های فیزیکی، بیولوژیکی و شیمیایی است (Park 1993). به هر حال محدودیت‌های روش‌های پاکسازی فیزیکی و شیمیایی از قبیل کاهش کیفیت و خواص تغذیه‌ای محصول، اثرات نامطلوب روی سلامت انسان و محیط زیست و گرانی تجهیزات مورد نیاز، توجه محققین را به سمت روش‌های بیولوژیکی سوق داده‌است (Samarajeeva et al. 1990, Philips et al. 1994). گزارش‌هایی در مورد کاهش آفلاتوکسین به‌وسیله میکروارگانسیم‌ها و به ویژه باکتری‌ها به چاپ رسیده است (El-Nezami et al. 1998, D'Souza and Brackett 2001, Peltonen et al. 2001, Hormisch et al. 2004, Gratz et al. 2005, Reddy et al. 2009). تأثیر شگفت‌انگیز تعداد معدودی گیاه دارویی شامل عصاره آبی آویشن‌دنبایی و مرزه خوزستانی در تجزیه آفلاتوکسین مشاهده شده است (Gorran et al. 2013). در تحقیق ما عصاره‌های آبی و متانولی تشنه‌داری تأثیر معنی‌داری در تجزیه آفلاتوکسین B1 نشان دادند اما قادر به تجزیه چشمگیر آفلاتوکسین B1 نبودند.

تیمار پسته‌ها با عصاره آبی گیاه تشنه‌داری باعث کاهش معنی‌دار در میزان کلنیزاسیون قارچ *A. flavus* روی پسته شد اما هر چهار عصاره و به ویژه عصاره‌های متانولی و آبی باعث کاهش درخورد توجه میزان آفلاتوکسین تولیدی روی پسته شدند. در پایان پیشنهاد می‌شود که ترکیبات مؤثر موجود در عصاره متانولی و آبی گیاه تشنه‌داری را شناسایی نمود و با تعیین و شناسایی ژن‌های کدکننده ترکیبات مهارکننده تولید آفلاتوکسین و در صورت امکان کلون‌سازی و انتقال ژن‌های اثربخش به گیاهانی که محصول آنها بستری مناسب برای تولید آفلاتوکسین توسط قارچ است، آلودگی به آفلاتوکسین را در محصولات گیاهی حساس کاهش داد.

### سپاسگزاری

بودجه و امکانات این تحقیق از محل دانشگاه شهید بهشتی تأمین شده است که بدینوسیله نگارندگان مراتب تشکر خود را ابراز می‌دارند.

عصاره آبی تشنه‌داری نسبت به مابقی عصاره‌ها مؤثرتر بود. در کاهش آلودگی AFB1 و مهار رشد *A. flavus* توانایی تعداد معدودی از گونه‌های گیاهی متعلق به خانواده Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae و Myrtaceae شناخته شده است (Atanda et al. 2007, Bluma et al. 2008, Gorran et al. 2013, Rasooli and Abyaneh 2004).

به دلیل اهمیت آفلاتوکسین‌ها به ویژه AFB1، تأثیر عصاره‌های گیاه تشنه‌داری در مهار زیست‌ساخت آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیق حاضر مشخص شد که هر چهار عصاره و به ویژه عصاره‌های متانولی و آبی گیاه تشنه‌داری به‌طور شگفت‌آوری سطح تولید آفلاتوکسین قابل ردیابی را بین ۹۰-۱۰۰ درصد کاهش دادند. اثرات مهارکنندگی اسانس‌ها و عصاره‌های برخی گیاهان دارویی در تولید AFB1 توسط قارچ‌های *A. parasiticus* و *A. flavus* (Viuda-Martos et al. 2008, Razzaghi-Abyaneh et al. 2009, Deabes et al. 2011). تأثیر عصاره‌های برخی گیاهان دارویی از قبیل چریش (*Azadirachta indica*)، زردچوبه (*Curcuma longa*)، سیر (*Allium sativum*) و ریحان (*Ocimum sanctum*) در کاهش آفلاتوکسین به اثبات رسیده که این کاهش اساساً به دلیل جلوگیری از رشد قارچ و ممانعت از بیوسنتز آفلاتوکسین بوده است (Zeringue and Bhatnagar 1990, Reddy et al. 2009).

در تحقیق حاضر این مقدار چشمگیر کاهش در میزان آفلاتوکسین تولیدی ممکن است در اثر وجود ترکیباتی در عصاره‌های گیاه تشنه‌داری باشد که در الگوی بیان ژن‌های درگیر سنتز آفلاتوکسین اختلال ایجاد می‌کند. جهت بررسی دقیق اثر عصاره گیاه تشنه‌داری در ممانعت از تولید آفلاتوکسین، پایش الگوی بیان ژن‌های درگیر سنتز آفلاتوکسین در همکنش عصاره-قارچ به کمک تکنیک‌های Real time (RT)-PCR و microarray ضروری بوده و دستیابی به نتیجه نهایی را امکان‌پذیر می‌نماید. برای مثال هو و همکاران بر اساس تکنیک RT-PCR و میزان بین ژن‌های FUM1 و FUM8 (درگیر در سنتز فومینوزین) گزارش کردند که فنجایسین باکتری، تولید میکوتوکسین فومینوزین در میسلیم‌های قارچ *F. verticillioides* را کاهش می‌دهد (Hu et al. 2009).



## REFERENCES

- Alibakhshi R, Javan-Nikkhah M, Fotouhifar KhB, Khosravi V, Zamani, E, Ghazanfari K** (2011). Study on effect of hyphal anastomosis between aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* isolated from pistachio on reduction of aflatoxin production and analysis of produced heterokaryons using rep-PCR. *Iranian Journal of Plant Pathology* 47(2): 121-133.
- Amin G** (1999). Popular medicinal plants of Iran (Vol. 1). Research Deputy of Health Ministry, Tehran.
- Atanda O, Akpan I, Oluwafemi F** (2007). The potential of some spice essential oils in the control of *Aspergillus parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control* 18: 601-607.
- Basilico MZ, Basilico JC** (1999). Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 317 growth and Ochratoxin A production. *Letters in Applied Microbiology* 29: 238-41.
- Coulombe RA** (1993). Biological action of mycotoxins. *Journal Dairy Science* 76: 880-891.
- Deabes M, El-Soud N, El-Kassem L** (2011). In vitro Inhibition of growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* strain (ATCC 16872) by various medicinal plant essential oils. *Macedonian Journal of Medical Sciences* 4: 345-350.
- D'Souza DH, Brackett RE** (2001). Aflatoxin B1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum* in the presence of reducing conditions and seryl and sulfhydryl group inhibitors. *Journal of Food Protection* 64: 268-271.
- El-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J** (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, Aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology* 36: 326-361.
- Farzaneh M, Shi ZQ, Ghassempour A, Sedaghat N, Ahmadzadeh M, Mirabolfathy M, Javan-Nikkhah M** (2012). Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. *Food Control* 23(1): 100-106.
- Gorran A, Farzaneh M, Shivazad, M, Rezaiean M, Ghassempour A** (2013). Aflatoxin B1-reduction of *Aspergillus flavus* by three medicinal plants (Lamiaceae). *Food Control* 31: 218-223.
- Gratz S, Mykkanen H, El-Nezami H** (2005). Aflatoxin B1 binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: in vitro versus ex vivo. *Journal of Food Protection* 68: 2470-2474.
- Guengerich FP, Johnson WW, Ueng YF, Yamazaki H, Shimada T** (1996). Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environmental Health Perspectives* 104 (SUPPL. 3): 557-562.
- Hormisch D, Brost I, Kohring GW, Giffhorn F, Kroppensted RM, Stackebrandt E, Färber P, Holzapfel WH** (2004). *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. Nov, a fluoranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 653-660.
- Liu Y, Wu F** (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: A risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 118(6): 818-824.
- Park DL** (1993). Controlling aflatoxin in food and feeds. *Food Technology* 47: 92-96.
- Peltonen K, El-Nezami H, Haskard C, Ahokas J, Salminen S** (2001). Aflatoxin B1 binding by dairystrains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* 84: 2152-2156.
- Philips TD, Clement BA, Park DL** (1994). Approaches to reduction. The toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance, In: Eaton D, Groopman JD (ed.), *The toxicology of aflatoxins-human health. Veterinary and Agricultural Significance*, San Diego, CA, Academic Press. PP. 383- 406.
- Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Eslamifar A, Schmidt OJ, Gharebaghi R, Karimian M, Naseri A, Sheikhi M** (2006b). Inhibitory effects of Akacid® plus on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 161: 245-249.
- Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee MB, Sakuda S** (2009). Natural aflatoxin inhibitors from medicinal plants, In: Rai M, Varma A(ed.), *Mycotoxins. food in feed and bioweapons*. Springer Berlin Heidelberg. PP. 329-352.
- Reddy KRN, Reddy CS, Muralidharan K** (2009). Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control* 20(2): 173-178.
- Samarajeewa U, Sen AC, Cohen MD, Wei CI** (1990). Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *Food Protection* 53: 489-501.
- Shephard GS** (2003). Aflatoxin and food safety: recent African perspectives. *Toxin Reviews* 22: 267-286.
- Stenersen J** (2004). *Chemical pesticides. Mode of action and toxicology*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Stroka J, Anklam E, Jörissen U, Gilbert J** (2000). Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. *Journal of AOAC International* 83: 320-340.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-López J, Perez-Álvarez J** (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.) mandarin (*Citrus reticulata* L.) grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 19: 1130-1138.
- Zaika LL, Buchanan RL** (1987). Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. *Journal of Food Protection* 50: 691-708.
- Zeringue JRHJ, Bhatnagar D** (1990). Inhibition of aflatoxin production in *Aspergillus flavus* infected cotton bolls after treatment with neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67: 215-216.