بررسی میزان آفلاتوکسین M_1 در پنیر سفید ایرانی

علی حشمتی*

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: 87/2/10 تاریخ پذیرش:87/4/20)

چکیده

افلاتوکسین ها متابولیت ثانویه کپک ها هستند که بوسیله گونه های کپک *آسپرژیلوس* تولید می گردند. افلاتوکسین ها منجر به مسمومیت حاد و/ یا مزمن شده و دارای اثرات کارسینوژنیک ، موتاژنیک و تراتوژنیک هستند. افلاتوکسین M_1 متابولیت افلاتوکسین B_1 است و همراه با شیر حیوانات شیرده که با علوفه آلوده به افلاتوکسین B_1 تغذیه شده اند دفع می گردد. وجود افلاتوکسین M_1 در پنیر ناشی از تولید این فرآورده لبنی از شیرهای آلوده به افلاتوکسین M_1 می باشد. در این مطالعه مقطعی 188 نمونه پنیر سفید ایرانی در فصول زمستان و تابستان از سطح عرضه نمونه برداری شد و مقدار افلاتوکسین آنها با روش الیزا تعیین شد.133 نمونه(70/7%) آلوده بودند . میانگین غلظت افلاتوکسین M_1 در نمونه ها 343 ng/kg بود و در 68 نمونه (36/2%) آلودگی بیشتر از حداکثرحد تحمل (250 ng/kg) پذیرفته شده بوسیله بعضی از کشورهای اروپایی بود. میانگین غلظت افلاتوکسین در فصل زمستان (495 ng/kg) بطور معنی داری ($p < 0/05$) از فصل تابستان (191 ng/kg) بیشتر بود . نتیجه گرفته شد که میزان شیوع آلودگی پنیر با افلاتوکسین M_1 زیاد بوده که از نقطه نظر سلامتی قابل توجه می‌باشد.

کلید واژگان: آفلاتوکسین M_1 ، پنیر ، الیزا

1- مقدمه

افلاتوکسین ها گروهی از مایکوتوکسین ها هستند که بوسیله گونه های کپک *آسپرژیلوس* یعنی *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *آسپرژیلوس نومیوس* که در خوراک دام یا مواد غذایی رشد می کنند، تولید می‌گردند. شرایط نامناسب دمایی و رطوبتی طی رشد ، برداشت و انبارداری ماده غذایی یا خوراک دام موجب رشد کپک در آنها و در نتیجه آلودگی با افلاتوکسین می شود [1]. افلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 و متابولیت های آنها یعنی M_1 و M_2 مرسوم‌ترین انواع افلاتوکسین هستند که از مواد غذایی یا خوراک دام آلوده جدا شده اند [2]. *آسپرژیلوس فلاووس*، افلاتوکسین B را تولید می‌کند، در حالیکه *آسپرژیلوس* B و G را تولید می کنند [3]. چنانچه حیوان شیرده از خوراک دام آلوده به افلاتوکسین B_1 تغذیه کند، آنزیم های موجود در کبد حیوان آن را به افلاتوکسین M_1 تبدیل می کنند که در نهایت در شیر و ادرار دفع می شود [4]. افلاتوکسین ها در انسان موجب مسمومیت حاد و یا مزمن می شوند. آنها دارای اثرات کارسینوژنیک، موتاژنیک و تراتوژنیک هستند. اصلی ترین اثرات مزمن افلاتوکسین ها ایجاد انواع سرطان بویژه سرطان کبد می باشد [5]. با توجه به عوارض زیانبار افلاتوکسین ها حد تحمل برای آنها در مواد غذایی مختلف تعیین گردیده است. خیلی از کشور های اروپایی حداکثر حد تحمل[1] *پارازیتیکوس* و *آسپرژیلوس نومیوس*، افلاتوکسین

* مسئول مکاتبات: ali_heshmaati@yahoo.com

1. Maximum tolerance limit

برای افلاتوکسین M_1 در شیر 50 نانو گرم در لیتر(ng/l) و در پنیر 250 نانوگرم در کیلوگرم (ng/kg) تعیین کرده اند [6 و 7] اما در برخی از کشورها از جمله ایران حدی در این زمینه تعیین نشده است.

سه علت برای وجود افلاتوکسین ها در پنیر عبارت است از 1- آلودگی شیر مورد استفاده برای تولید پنیر به افلاتوکسین M_1 که علت اصلی می باشد، 2- رشد کپک بر روی پنیر و تولید افلاتوکسین و3- استفاده از شیر خشک آلوده به افلاتوکسین برای تولید پنیر[8] .

اگرچه در خصوص آلودگی پنیر به افلاتوکسین M_1 در کشور های مختلف مطالعات متعددی صورت گرفته است (جدول 1) اما در مورد میزان آلودگی به افلاتوکسین M_1 در پنیر سفید ایرانی ، یکی از انواع پنیر های نرم که تولید و مصرف آن در کشور رو به افزایش است ، مطالعات کمی انجام گرفته است و اطلاعات ناچیزی در این زمینه وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی مقدار افلاتوکسین M_1 در سطح عرضه پنیر سفید ایرانی در فصل تابستان و زمستان است.

جدول 1 بررسی میزان افلاتوکسین M_1 در پنیر در کشور های مختلف

منبع	محدوده غلظت افلاتوکسین (ng/kg)	درصد نمونه های آلوده	تعداد نمونه آنالیز شده	کشور
12	200-1200	14/5	303	آلمان
13	100-1000	6/8	118	ایالات متحده آمریکا
14	50-540	19/2	317	ایتالیا
15	-	0	50	ترکیه
16	200-1200	14/5	303	ژاپن
17	NR* -520	29/73	343	فرانسه
18	1-100	6/7	118	یونان

* not reported

2- مواد و روش کار

2-1- نمونه پنیر

در این مطالعه مقطعی تعداد 188نمونه پنیر سفید ایرانی (94 نمونه درزمستان 1385 و 94 نمونه در تابستان 1386) دارای پروانه ساخت از وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی به وزن 400 – 350 گرم از فروشگاه های سطح عرضه شهر همدان خریداری و در دمای پایین به آزمایشگاه منتقل شد.

2-2- مواد شیمیایی

دی کلرو متان، کلروفرم، متانول وهپتان از شرکت مرک[1]، میکروتیتر پوشانده با آنتی بادی ، محلول های استاندارد افلاتوکسین (0، 5، 10، 20، 40 و 80 نانوگرم بر لیتر)، آنزیم، سوبسترا، کروموژن، محلول توقف و بافر فسفات از شرکت ار- بیوفارم[2] آلمان تهیه شد.

2-3- آماده سازی نمونه

100گرم از هر نمونه آسیاب شد و به 2 گرم آن 40 میلی لیتر دی کلرومتان اضافه و برای 15 دقیقه همزده شد پس از صاف کردن 10 میلی لیتر از نمونه صاف شده در دمایی 60 درجه سانتیگراد تحت جریان گاز نیتروژن خشک شد. باقیمانده در 0/5 میلی لیتر متانول ، 0/5 میلی لیتر بافر فسفات و 1 میلی لیتر هپتان حل شد و پس از 15 دقیقه سانتریفوژ در g × 2700 فاز بالایی جدا شد و 100 میکرولیتر از فاز پایینی با 400 میکرولیتر بافر فسفات رقیق شد.

2-4- اندازه گیری مقدار افلاتوکسین

روش اندازه گیری مقدار افلاتوکسین مطابق با مطالعات گورس و ستون در سال 2004 انجام شد [9] . ابتدا 100 میکرولیتر از رقیق شده فوق یا استاندارد های افلاتوکسین به چاهک های میکروتیتر اضافه و برای 60 دقیقه گرمخانه گذاری شد. سپس با 250 میکرولیتر آب مقطر شستشو داده شد. 100 میکرولیتر از آنزیم اضافه و 60 دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی گرمخانه‌گذاری شد. پس از سه مرتبه شستشو با 250 میکرولیتر آب مقطر، 50 میکرولیتر سوبسترا و 50

1. Merck
2. R-biopharm

میکرولیتر کروموژن اضافه و 30 دقیقه گرمخانه گذاری شد. پس از اضافه کردن معرف متوقف کننده رنگ و همزدن جذب با دستگاه الیزا در طول موج 450 نانومتر قرائت شد.

با استفاده از محلول های استاندارد و با غلظت های مختلف (0، 5، 10، 20، 40 و80 نانوگرم بر لیتر) منحنی کالیبراسیون جذب نوری برحسب غلظت افلاتوکسین رسم شد. مقدار افلاتوکسین نمونه ها با استفاده از این منحنی و جذب نوری قرائت شده و ضرب در فاکتور رقت 10 بدست آمد. به منظور اطمینان اندازه گیری مقدار افلاتوکسین هر نمونه دوبار[1] انجام شد و میانگین آن دو در نظر گرفته شد. مطابق دستورالعمل کیت الیزا کمترین حد قابل تعیین افلاتوکسین50 نانوگرم بر کیلوگرم و میزان بازیافت و ضریب واریانس به ترتیب 102% و 11% است.

2-5- آنالیز آماری

آنالیز آماری با نرم افزار SPSS نسخه 11/5 انجام گرفت. برای بررسی معنی دار بودن اختلاف ($p< 0/05$) بین میانگین مقدار افلاتوکسین نمونه‌های تابستان با زمستان از آزمون تی- استیودنت[2] استفاده شد.

3- نتایج

از 188 نمونه که به منظور بررسی آلودگی به آفلاتوکسین مورد آنالیز قرار گرفتند 133 نمونه (70/7%) آلوده بودند و در 68 نمونه (36/2%) آلودگی بیشتر از 250 ng/kg بود. میانگین غلظت افلاتوکسین نمونه ها 343 ng/kg بود. نتایج نشان داد در فصل زمستان از 94 نمونه 87 نمونه(92/6%) آلوده به افلاتوکسین بوده ، در حالیکه از 94 نمونه در فصل تابستان 46 نمونه(48/9%) آلوده به افلاتوکسین می باشند. میانگین غلظت افلاتوکسین در فصل زمستان (495 ng/k) بطور معنی داری ($p < 0/05$) از فصل تابستان (191 ng/kg) بیشتر بود (جدول 2).

در فصل زمستان در 7 نمونه آلودگی کمتر از 50 ng/kg و در 5 نمونه آلودگی در محدوده 100-50 ng/kg بود ، در حالیکه 30 نمونه آلودگی در محدوده 250-100 ng/kg داشتند. و در 52 نمونه آلودگی بیش از حد مجاز مورد پذیرش بعضی از کشورهای اروپایی (250 ng/kg) تعیین شد (جدول 3).

در فصل تابستان 48 نمونه آلودگی کمتر از 50 ng/kg ، 2 نمونه آلودگی در محدوده 100-50 ng/kg و 28 نمونه آلودگی در محدوده 250-100 ng/kg داشتند و در 16نمونه آلودگی بیش از حد مجاز مورد پذیرش بعضی از کشورهای اروپایی (250 ng/kg) بود (جدول 3).

4- بحث

جدول 2 نمایانگر شیوع بالایی آلودگی به افلاتوکسین M_1(70/74%) در پنیر های آنالیز شده ، می باشد که این نتایج دلالت بر تولید پنیر از شیر حیواناتی که با علوفه آلوده به افلاتوکسین B_1 تغذیه شده اند، دارد . بالاتر بودن مقدار افلاتوکسین نمونه های پنیر در فصل زمستان بخاطر تغذیه حیوان از کنسانتره و علوفه انبارشده آلوده می باشد ، در حالیکه در تابستان حیوان از علوفه سبز و تازه بیشتر استفاده می کند که آلودگی کمتری دارند. تغییرات فصلی افلاتوکسین در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است [10 و 11].

در مطالعه اخیر شدت آلودگی به افلاتوکسین M_1 (70/7%) و میانگین غلظت آن (343 ng/kg) و همچنین نمونه های آلوده (51/1%) با میزان آلودگی بالاتر از از حد 250 ng/kg در مقایسه با نتایج گزارش شده بوسیله کامکار کمتر بود. کامکار در سال 2006 میزان آلودگی 80 نمونه پنیر فتا تولید شده در چهار کارخانه لبنی استان تهران به افلاتوکسین M_1 مورد بررسی قرار داد. این محقق گزارش کرد 82/5 % نمونه های پنیر آلوده به افلاتوکسین هستند که میانگین غلظت افلاتوکسین 410ng/kg بود و در 60/60% نمونه های آلوده مقدارآلودگی از حد مجاز (250 ng/kg) بیشتر است. ایشان اشاره کرد که غلظت افلاتوکسین در طی ماههای مختلف متفاوت می باشد که بیشترین مقدار آن در ماه فوریه (520 ng/kg) و کمترین مقدار آن درماه اوت (350 ng/kg) می باشد [8].

نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق سایر محققین در کشورهای دیگر (جدول 1) که مقادیر آلودگی را ناچیز یا صفر گزارش کرده‌اند مغایرت دارد [18-12]. این اختلافات بدلیل تفاوت در میزان افلاتوکسین شیر مورد استفاده برای تولید پنیر ، روش آنالیز افلاتوکسین و تکنولوژی تولید پنیر می باشد [8].

1. Duplicate
2. T-student

یافته های این مطالعه نشان می دهد که میزان شیوع آلودگی پنیر سفید ایرانی به افلاتوکسین M_1 زیاد می باشد. با توجه به اثرات زیانبار افلاتوکسین به نظر می رسد در صورتی که برای کاهش سطح آن در پنیر چاره ای اتخاذ نشود مصرف این محصول تهدیدی برای سلامتی مصرف کننده گان خواهد بود. از آنجائیکه افلاتوکسین M_1 متابولیت افلاتوکسین B_1 موجود در جیره غذایی دام می باشد که در شیر دفع می گردد.

جدول 2 توزیع فراوانی افلاتوکسین M_1 در پنیر فتا

فصل	تعداد نمونه های آنالیز شده	تعداد نمونه های آلوده (درصد)	میانگین غلظت افلاتوکسین (ng/kg)	محدوده غلظت افلاتوکسین در نمونه های آلوده (ng/kg)	انحراف معیار
زمستان	94	87 (%92/6)	495	67-1993	517
تابستان	94	46 (%48/9)	191	85-1700	339
جمع	188	133 (%70/7)	343	67-1993	328

جدول 3 توزیع فراوانی میزان شیوع افلاتوکسین M_1 در پنیر فتا

فصل	غلظت افلاتوکسین (ng/kg)			
	< 50	50-100	100-250	> 250
زمستان	7	5	30	52
تابستان	48	2	28	16
جمع	55	7	58	68

موثر ترین روش کاهش سطح افلاتوکسین M_1 در پنیر کاهش سطح افلاتوکسین B_1 در خوراک دام می باشد تا از این طریق حیوان افلاتوکسین کمتری دریافت کرده و در نتیجه غلظت افلاتوکسین در شیر و فرآورده های آن مثل پنیرکاهش یابد . برای این منظور لازم بوده در زمان تولید علوفه و خوراک دام شیوه ساخت مناسب [1] رعایت گردد و در شرایط مناسب دمایی و رطوبتی نگهداری شوند تا امکان رشد کپک در آنها میسر نشود و در نتیجه آلوده به افلاتوکسین نگردند.

پیشنهاد می گردد برای حداکثر حد تحمل افلاتوکسین در فرآورده های لبنی استاندارد کشوری تدوین شود و به اطلاع وازرت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی برای اقدام مقتضی رسانیده شود و واحدهای تولیدی لبنی ملزم به اندازه گیری افلاتوکسین و رعایت این حد تحمل در محصولات خود شوند.

5- منابع

[1] Creppy, E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters 127, 19–28.

[2] Çelik, T.H., Sarımehmetoglu, B., Küplülü, Ö. (2005). Aflatoxin M_1 contamination in pasteurised milk.Veterinarski Arhiv, 75 (1), 57-65.

[3] Van Egmond, H.P., Leussink, A.B., Paulsch, V.E. (1986). The determination of aflatoxin M_1 in milk and milk powder. Bulletin of the International Dairy Fed (IDF), 207, 150–179.

[4] Bakirci, I. (2001). A study on the occurrence of aflatoxin M_1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. Food Control, 12, 47–51.

[5] Ricordy, R., Cacci, E., Augusti Tocco G. (2005). Review in food and nutrition toxicity.4th ed.London: CRC Press, 213-231.

[6] Anonymous. (2000). European community comments for the codex committee on food additives and contaminants, CL 1999/13-GENCX 0016 FAC-Agenda item 16a, 2000.

1. Good manufacturing practice(GMP)

[7] Sarimehmetoglu, B., Kuplulu, O., Celik, T.H. (2004). Detection of aflatoxin M_1 in cheese samples by ELISA. Food Control, 15, 287–290.
[8] Kamkar, A. (2006). A study on the occurrence of aflatoxin M_1 in Iranian Feta cheese. Food Control, 17, 768–775.
[9] Güress, M., çetün, B. (2004). Occurrence of aflatoxin M_1 in some cheese types sold in Erzurum, Turkey. Turkish Journal Veterinary Animal Science, 28, 527-530.
[10] Ghiasian, S.A., Maghsood, A.M., Neyestani, T.R., Mirhendi, S.H. (2007). Occurrence of aflatoxin M_1 in raw milk during the summer and winter seasons in hamedan, Iran. Journal of Food Safety, 27, 188–198.
[11] Bachner, U., Martlbauer, E., Terblan, G. (1998). Detecting aflatoxin M_1 in milk from selected parts of Bavaria by using and ELISA. German Federal Republic. On Dairy Science Abstract, 52, 901
[12] Piva, G, Pietri A, Galazzi L, Curto, O. (1987). Aflatoxin M_1 occurrence in dairy products marketed in Italy. Food Additives and Contaminants, 5, 133–139.
[13] Trucksess, M.W., Page, S.W. (1896). Examination of imported cheese for aflatoxin M_1. Journal of Food Protection, 49, 632–633.
[14] Minervini, F., Visconti, A., Bottalico, A., Montagna, M.T., (2001). On the occurrence of aflatoxin M_1 in cheeses in some southern Italian areas. Industrie, Alimentari, 40(403), 513–516.
[15] Kivanc, M. (1990). Mold growth and presence of aflatoxin in some Turkish cheeses. Journal of Food Safety, 10, 287–294.
[16] Tabata, S., Kamimura, H., Tamura, T., Yasuda, K., Ushiyama, H., Hashimoto, H., et al. (1987). Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs. Journal of Food Hygiene and Society of Japan, 28, 395–401.
[17] Blanc, M., & Karleskind, A. (1981). Donnees sur la contamination par l_ aflatoxin M_1 du lout et des produis laitiers en France. Lait, 61, 481–483.
[18] Karaioannoglu, P.G., Mantia, A., Koufidia, D., Koidia, P., Triantafillou, J. (1989). Occurrence of aflatoxin M_1 in raw and pasteurized milk and in Feta and Teleme cheese samples. Milchwissenschaft, 44, 746–748.

Occurrence of aflatoxin M_1 in Iranian white cheese

Heshmati, A.*

MSc. in Food Engineering and Science, Agriculture Faculty, Tehran University

(Receved:87/2/10 Accept:87/4/20)

Aflatoxins are mold secondary metabolites produced by species of Aspergillus. Aflatoxin causes acute and/or chronic poisoning and exhibits carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects. Lactating cows fed with B_1 aflatoxin-contaminated feed transmit the toxin, as the metabolic form aflatoxin M_1 (AFM_1) to the milk. When cheese is made from AFM_1 contaminated milk, the toxin can be carried over to cheese. In this cross - sectional study, 188 samples were obtained from market in summer and winter and AFM_1 levels were determined by ELISA method. AFM_1 was found in 133 (70.7%) samples. The mean of AFM_1 concentration was 343 ng / kg. AFM_1 levels in 68 samples (36.2%) exceeded the maximum tolerance limit accepted by some European countries. Statistical analysis showed that concentration of AFM_1 in cheese samples taken in winter (495 ng/kg) were significantly ($p < 0.05$) higher than those taken in summer (191 ng/kg). In conclusion, incidence of AFM_1 was high among cheese samples what must be regarded as a health concern for consumers.

Keywords: Aflatoxin M_1, Cheese, ELISA

*Corresponding Author E-mail address: ali_heshmaati@yahoo.com