بررسی آلودگی به آفلاتوکسین M_1 در پنیر سفید ایرانی به روش الایزا و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

عصمت خوری[1*]، علی محمدی ثانی[2]، مرضیه خوری[3]

۱- دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان، قوچان، ایران.
۲- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران
۳- فارغ التحصیل دکترای دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۵ /۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۷/۱۱)

چکیده

آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه کپک‌ها هستند که بوسیله گونه‌های کپک آسپرژیلوس تولید می‌شوند. آفلاتوکسین یکی از شایع‌ترین سموم قارچی است که غالبا در شیر و فرآورده‌های شیری یافت می‌شود و عوارض خطرناکی را به همراه دارد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی آلودگی به آفلاتوکسین در پنیر سفید ایرانی به روش الایزا و HPLC است. در این پژوهش مقطعی، تعداد ۱۲۹ نمونه پنیر سفید تولید شده از کارخانه فراورده‌های لبنی شهر مشهد در فصل تابستان ۱۳۹۵ جمع‌آوری و تعداد ۸۲ نمونه از نظر وجود آفلاتوکسین M_1 با استفاده ازروش الایزا و ٤٧ نمونه نیز با استفاده از روش HPLC در خصوص وجود آفلاتوکسین M_1 بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS/22 و آزمون‌های آماری T-student مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مطابق نتایج بدست آمده درصد آلودگی در نمونه پنیرهای مورد آزمون مطابق روش الایزا و HPLC به ترتیب ٦٨/٢٢ درصد و ٦٤/٥٨ درصد بود که تفاوت آماری معنی‌داری (P>0/05) بین درصد آلودگی نمونه مورد آزمون به دو روش الایزا و HPLC مشاهده نشد. در ٣٣/٥٦ درصد نمونه‌ها آلودگی به آفلاتوکسین کمتر از حد مجاز و ۳۱/۱۷ درصد نمونه‌ها آلودگی به آفلاتوکسین M_1 بیش از حد مجاز مطابق استاندارد کمیته اروپایی و غذایی کدکس بود. میزان بالای آفلاتوکسین در نمونه‌های پنیر سفید ایرانی ممکن است سلامت عموم جامعه را تهدید کند که بایستی این مشکل با نظارت بیشتر بر خوراک دام و شرکت‌های تولید کننده فرآورده‌های شیری تا حدی کنترل گردد.

کلید واژگان: آفلاتوکسین M_1، پنیر سفید ایرانی، روش الایزا، HPLC

* مسئول مکاتبات: khoorie1@thums.ac.ir

۱- مقدمه

قارچ‌ها قادر هستند طی مدت رشد خود بر روی مواد غذایی، علاوه بر کاهش ارزش غذایی، متابولیت‌های ثانویه‌ای به نام سم قارچی تولید کنند که بسیار خطرناک بوده و می‌تواند در صورت دریافت این سم توسط موجود زنده، اثرات سمی، سرطان‌زایی، ناقص‌الخلقه زایی، کاهش رشد و اثرات جهش‌زایی از خود برجا بگذارند [۱ و ۲].

آفلاتوکسین‌ها گروهی از مایکوتوکسین‌ها هستند که به وسیله کپک‌هایی مانند *آسپرژیلوس فلاووس*[1]، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*[2] و *آسپرژیلوس نومینوس*[3] تولید می‌شوند. چهار تیپ عمده آن را آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 تشکیل می‌دهند که در بین آنها آفلاتوکسین B_1 از همه خطرناک‌تر می‌باشد. وجود آفلاتوکسین در خوراک منجر به بروز علایمی از قبیل آسیب کبدی، سیروز کبدی، ایجاد تومور، جهش‌زایی و ناقص‌الخلقه بودن در حیوانات می‌شود. همچنین عوارضی از قبیل تضعیف سیستم ایمنی، کاهش رشد و کاهش مصرف خوراک، کاهش تولید شیر و اختلالاتی در تولید مثل گاوهای شیرده از قبیل سقط جنین را به دنبال دارد [۳ و ٤].

اگر آفلاتوکسین B_1 به تنهایی یا همراه با آفلاتوکسین‌های دیگر در خوراک دام به وسیله حیوانات خورده شود به توکسین‌های دیگر در ترشحات و بافت‌های آنها تبدیل می‌شود. دو توکسین در شیر حیوانات مشخص گردیده است و تحت عنوان توکسین‌های شیر یا اصطلاحاً آفلاتوکسین‌های M_1 و M_2 نامیده می‌شود [۵ و ٦]. زمانی‌که حیوانات جیره غذایی[4] آلوده به آفلاتوکسین B_1 را مصرف کنند، این توکسین در کبد متابولیزه شده و به‌صورت آفلاتوکسین M_1 از شیر و ادرار و مدفوع ترشح می‌شود [۷]. طبق پژوهش‌های صورت گرفته میزان تبدیل آفلاتوکسین B_1 موجود در جیره به آفلاتوکسین M_1 بین ٤-۱ درصد اعلام شده است [۸ و ۹]. ولی نسبت‌های تبدیل حتی تا ٦ درصد نیز در مصارف بالا روزانه سم آفلاتوکسین B_1 گزارش شده است [۱۰]. اگر شیر خام به آفلاتوکسین M_1 آلوده باشد در پنیر تولید شده از این شیر نیز آفلاتوکسین M_1 باقی خواهد ماند [۱]. میزان آفلاتوکسین M_1 در پنیر حدود ٤ برابر بیشتر از ماده اولیه آن یعنی شیر می‌باشد [۱۱]. میزان توزیع آفلاتوکسین در پنیر و آب پنیر به عوامل زیادی از جمله درجه آلودگی شیر، کیفیت شیر و پروسه تولید پنیر بستگی دارد [۱۲ و ۱۳].

طبق استاندارد FDA آمریکا و نیز استاندارد Codex Alimentarius حداکثر مجاز باقیمانده آفلاتوکسین M_1 در شیر 0.5 ppb می‌باشد [۷]. کمیته اروپایی و غذایی کدکس، حداکثر حد مجاز غلظت آفلاتوکسین M_1 شیر خام مایع و سایر محصولات شیری را ۵۰ نانوگرم در کیلوگرم (0.05µg/l) تعیین کرده‌اند. همچنین ماکزیمم میزان آفلاتوکسین M_1 در پنیر نیز ۲۵۰ نانوگرم در کیلوگرم (0.25µg/l) یعنی حدود ۵ برابر شیر در نظر گرفته شده است [١٤ و ١٥]. استاندارد ملی ایران بالاتر ین حد مجاز آفلاتوکسین M_1 در شیر خام و سایر محصولا ت لبنی را ۱۰۰ نانوگرم در لیتر تعیین کرده است [١٦].

روشهای متعدد ایمونواسی و اندازه‌گیری کمی برای سنجش آفلاتوکسین M_1 وجود دارد؛ از جمله این روش‌ها می‌توان به کروماتوگرافی لایه نازک[5] [۱۷]، کروماتوگرافی مایع [۱۸] و روش الایزا[6] و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[7] [۱۵ و ۱۸] اشاره نمود. استفاده از روش‌های ایمونواسی مانند ELISA برای انجام آزمون‌های غربالگری و نیز پایش در زمینه شیر و فرآورده‌های آن در سطح کارخانجات توصیه می‌شود. در صورت استفاده از روش‌های ایمونواسی، به منظور تایید آزمون استفاده از روش‌های اندازه‌گیری کمی مانند کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نیز صورت می‌پذیرد [۱۵ و ۱۸].

فلاح و همکاران (۲۰۰۹) میزان آلودگی به آفلاتوکسین M_1 را در ۲۱۰ نمونه پنیر (۱۱٦ نمونه پنیر سفید ایرانی و ۹٤ نمونه پنیر خامه‌ای) عرضه شده در استان‌های اصفهان و یزد به روش الایزا بررسی کردند که در ١٦١ نمونه (۸۰/۱ درصد نمونه‌های پنیر سفید و ۷۲/۳ درصد نمونه‌های پنیر خامه‌ای) وجود مقادیر بیشتر از ۲۰۰ نانوگرم در کیلوگرم تایید شد و غلظت آفلاتوکسین M_1 در ٢٤/٢ درصد نمونه‌ها بیش از حد استاندارد گزارش گردید [۲۲]. توکلی و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای آلودگی به آفلاتوکسین M_1 در

1. *Aspergillus flavus*
2. *Aspergillus parasiticus*
3. *Aspergillus numinus*
4. Feed stuff

5. Thin-layer chromatography (TLC)
6. Enzyme-linked Immunosorbent Aassay (ELISA)
7. High-performance liquid chromatography (HPLC)

پنیر پاستوریزه عرضه شده دو کارخانه تولید کننده فرآورده‌های لبنی در شهر تهران را به روش الایزا بررسی کردند. مطابق نتایج ٦٢ درصد از نمونه‌های پنیر عرضه شده دو کارخانه تولید کننده محصولات لبنی به مقادیری از آفلاتوکسین آلوده بودند و ٦ نمونه (۹/۳ درصد موارد مثبت) آلودگی بیش از حد استاندارد گزارش شد [۲۰]. کرمییر و همکاران (۱۹۷۷) میزان آلودگی ۱۹۷ نمونه پنیر پاستوریزه کشور آلمان به آفلاتوکسین M_1 را مورد بررسی قرار دادند و مطابق نتایج بدست آمده در مطالعه آن‌ها در ١٣٦ (٦٩ درصد) آلودگی به آفلاتوکسین M_1 اعلام شد [٢٤]. پرادو و همکاران (۲۰۰۰) میزان آلودگی ۷۵ نمونه پنیر به آفلاتوکسین M_1 را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که ٧٤/٧ درصد از نمونه‌ها با غلظت ٦٩٢-٢٠٠ نانوگرم در کیلوگرم به آفلاتوکسین M_1 آلوده بودند [۲۷].

شیر و محصولات آن را می‌توان به عنوان بخش مهمی از تغذیه در سبد خانوارهای ایرانی در نظر گرفت. بنابراین نه تنها سنجش سطوح آفلاتوکسین M_1 در شیر و محصولات شیری بسیار حایز اهمیت است بلکه این عمل می‌بایستی به شکل منظم در کلیه اقلام غذایی انجام پذیرد. هدف این پژوهش، غربالگری میزان سم آفلاتوکسین M_1 در پنیر به روش‌های الایزا و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا می‌باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- آماده سازی و تهیه نمونه‌ها

در این پژوهش مقطعی تعداد ۱۲۹ نمونه پنیر سفید تولید شده از کارخانه فرآورده‌های لبنی شهر مشهد در فصل تابستان ۱۳۹۵ جمع‌آوری و تعداد ۸۲ نمونه از نظر وجود آفلاتوکسین M_1 با استفاده ازروش الایزا و ٤٧ نمونه نیز با استفاده از روش HPLC در خصوص وجود آفلاتوکسین M_1 مورد آزمایش قرار گرفتند.

۲-۲- روش‌ها

- روش الایزا

میزان آفلاتوکسین M_1 موجود در نمونه‌ها با روش الایزا و با استفاده از کیت آفلاتوکسین AFM1 (Aflatoxin M1-R-Biopham, Germany-kit) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده کیت طی مراحل زیر صورت گرفت؛

دو گرم از هر نمونه به دقت وزن و به بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ٤٠ میلی‌لیتر دی کلرومتان اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد. در ادامه، سوسپانسیون حاصل با استفاده از سرنگ-های فیلتردار، فیلتر و ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره حاصل در دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد باقی‌مانده عصاره در ترکیبی شامل نیم میلی‌لیتر متانول ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=7.2) و ۱ میلی‌لیتر هپتان حل شد. ترکیبات به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه و حداکثر در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و با دور۲۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و سپس فاز رویی (لایه هپتان) به طور کامل تخلیه شد. در پایان ۱۰۰ میکرولیتر از فاز زیری (لایه متانول) جداسازی و با ٤٠٠ میکرولیتر بافر فسفات رقیق شد. ۱۰۰میکرولیتر از محلول‌های استاندارد آفلاتوکسین M_1 از نمونه‌های پنیر آماده-سازی شده به کمک سمپلر ۱۰ میکرولیتری به حفره‌های میکروپلیت اضافه شده و سپس به مدت یک ساعت به دور از نور و در درجه حرارت ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مایع موجود در میکروپلیت خارج شده و با ضربه زدن ملایم به میکروپلیت و قرار دادن آن به شکل وارونه بر روی کاغذهای جاذب الرطوبه مایع موجود در حفره‌ها به طور کامل تخلیه شد، همه حفره‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص شستشو، شسته شد و عمل شستشو دوبار تکرار گردید. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول آفلاتوکسین مزدوج شده (کانژوگه) با آنزیم به حفر ه‌ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت یک ساعت دیگر در گرمخانه ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از این زمان مایع موجود در حفره‌ها به طور کامل تخلیه شد، سپس عمل شستشو دوبار تکرار گردید.۵۰ میکرولیتر سوبسترا و۵۰ میکرولیتر کروموژن به هر حفره اضافه شد و میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت برای اتمام واکنش، ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف-کننده افزوده شد و میزان جذب هر نمونه با قرائت‌کننده الایزا در طول موج ٤٥٠ نانومتر قرائت گردید.

- روش HPLC

سیستم HPLC مورد استفاده:

1- Column: C18 column, 5 µm, 4.6 mm,250 mm
2- Guard Column: Guard Column Novapak C18 Waters
3- Fluorescence detector: Waters 474 fluorescence detector
4- HPLC system, Waters 616 HPLC pump
• Waters column heater
• Waters 717 plus auto sampler
• Waters Detector Status
• Waters 600S Controller
• Waters Millennium software

۱۰گرم سلیت ، ۱۰ گرم پنیر و ۸۰ میلی‌لیتر دی کلرومتان را درون یک ظرف در پیچ‌دار ریخته، توسط دستگاه اولترا توراکس به مدت سه دقیقه در ۲٤۰۰ دور در دقیقه به خوبی مخلوط گردید. به منظور جلوگیری از تبخیر حلال ، مخلوط سریعاً از کاغذ صافی عبور داده شد. ٤٥ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده در تبخیرکننده چرخان تحت خلا خشک گردید. عصاره خشک شده در مخلوط متانول- هگزان- آب به نسبت ۱:۵۰:۳۰ مجدداً حل گردید. جهت انحلال بهتر عصاره خشک شده از حمام التراسونیک استفاده و سپس با استفاده از ورتکس از انحلال کامل عصاره اطمینان حاصل شد. دو فاز آلی و آبی عصاره در داخل دکانتور از یکدیگر تفکیک و فاز آبی جهت خالص‌سازی جدا گردید. در دو مرحله دیگر هم ۱۰ میلی‌لیتر آب داخل دکانتور ریخته فاز آبی جدا گردید. سپس میلی‌لیتر از محتویات ظرف (فاز آبی) حاصل از مرحله استخراج پنیر از ستون ایمونوافینیتی عبور داده شد پس از خارج شدن آخرین قطره عصاره از ستون با عبور ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دو مرحله ستون شستشو گردید. ۲/۵ میلی‌لیتر استونیتریل را در دو مرحله از ستون عبور داده تا آنتی‌ژن متصل به آنتی‌بادی از ستون جدا و درون ویال جمع‌آوری گردد. محتویات ویال در بن ماری ٤٥ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. پس از خشک شدن کامل ۱ میلی‌لیتر فاز متحرک به ویال اضافه کرده و سپس با استفاده از حمام التراسونیک و ورتکس از انحلال کامل در فاز متحرک اطمینان حاصل گردید [۱۹]. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره حل شده در فاز متحرک به دستگاه HPLC تزریق گردید. شرایط تزریق Flow Rate برابر ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، حجم تزریق برابر ۲۰۰ میکرولیتر و نسبت حلال‌ها در شرایط ایزو کراتیک ۸۰ به ۵۰ بود.

۲-۳- طرح آماری و روش آنالیز نتایج

نمونه‌ها پس از تعیین غلظت در هر روش (دو روش الایزا و HPLC) به طور جداگانه با استفاده از نرم افزار SPSS/22 مورد تجزیه و تحلیل آماری آنوا قرار گرفتند. همچنین برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف ($P\geq0.05$) بین میانگین مقدار آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌های آنالیز شده به روش الایزا و HPLC از آزمون T-student استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

در این مطالعه، میزان آفلاتوکسین M_1 در پنیر سفید ایرانی که بیشترین و معمولی‌ترین نوع پنیر مصرف شده در ایران می‌باشد مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، که مجموعاً ۱۲۹ نمونه پنیر سفید تولید شده از سطح کارخانه فرآورده‌های لبنی شهر مشهد جمع‌آوری گردید، تعداد ۸۲ نمونه توسط روش الایزا و ٤۷ نمونه نیز به روش HPLC مورد غربالگری قرار گرفتند. در این مرحله در نمونه‌هایی که به روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفتند میانگین آفلاتوکسین M_1 برابر ۲٦۰/۸۹ نانوگرم در کیلوگرم و در محدوده بین ۸۰ تا ٤٥۰ نانوگرم در کیلوگرم و طبق روش HPLC برابر ۲۳۲/۳۳ بر حسب نانوگرم در کیلوگرم و در محدوده بین ۷۰ تا ۳۱۰ نانوگرم بر کیلوگرم مطابق جدول ۲ مشخص گردید. درصد آلودگی در نمونه پنیرهای مورد آزمون مطابق روش الایزا و HPLC به ترتیب ٦۸/۲۲ درصد و ٦٤/۵۸ درصد بود که تفاوت آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ($P>0/05$) بین درصد آلودگی نمونه مورد آزمون به دو روش الایزا و HPLC مشاهده نشد. که طبق نتایج بدست آمده در هر دو روش بیش از ٦۰ درصد از نمونه‌های بررسی شده حاوی آفلاتوکسین M_1 بوده‌اند (جدول ۱)

Table 1 Distribution of Aflatoxin M_1 in Iranian White Cheese

Method	Number of samples	Percent of contamination	Percent of positive cases the limit	Percent of negative cases the limit	Mean AFM1 concentration (ng/kg)	Range AFM1 concentration (ng/kg)	SD	SE
ELISA	82	68.22	35.3	31.70	260.89	80-450	98.28	13.13
HPLC	47	64.58	27.03	35.41	232.33	70-310	57.70	10.53
Total	129	66.4	31.17	33.56	246.61	70-450	77.99	11.83

Table 2 Level of Aflatoxin M_1 in Iranian White Cheese

Method	Aflatoxin M_1 Concentration (ng/kg)			
	< 50	50-100	100-250	> 250
ELISA	26	5	22	29
HPLC	17	1	16	13
Total	43	6	38	42

همانطور که در جدول ۲ نیز مشاهده می‌شود طبق روش الایزا در ۲۶ نمونه آلودگی به آفلاتوکسین M_1 کمتر از ۵۰ ng/kg و در ۵ نمونه آلودگی در محدوده بین ۱۰۰–۵۰ ng/kg ، در ۲۲ نمونه آلودگی در محدوده بین ۲۵۰–۱۰۰ ng/kg و در ۲۹ نمونه آلودگی بیشتر از ۲۵۰ ng/kg یعنی بیش از حد مجاز طبق کمیته اروپایی و غذایی کدکس (۲۵۰ ng/kg) تعیین گردید [۱۴ و ۱۵].

مطابق روش HPLC نیز در ۱۷ نمونه آلودگی به کمتر از ۵۰ ng/kg و یک نمونه آلودگی در محدوده بین ۱۰۰–۵۰ ng/kg ، ۱۶ نمونه آلودگی در محدوده بین ۲۵۰–۱۰۰ ng/kg و ۱۳ نمونه آلودگی بیشتر از ۲۵۰ ng/kg یعنی بیش از حد مجاز طبق مورد پذیرش برخی کشورهای اروپایی (۲۵۰ ng/kg) بود (جدول ۲).

در مجموع مطابق هر دو روش ۴۳ نمونه آلودگی به آفلاتوکسین M_1 کمتر از ۵۰ ng/kg و ۶ نمونه آلودگی در محدوده بین ۱۰۰–۵۰ ng/kg ، ۳۸ نمونه آلودگی در محدوده بین ۲۵۰–۱۰۰ ng/kg و در ۴۲ نمونه آلودگی بیشتر از ۲۵۰ ng/kg یعنی بیش از حد مجاز طبق کمیته اروپایی و غذایی کدکس (۲۵۰ ng/kg) تعیین شد، به عبارت دیگر ۳۳/۵۶ درصد نمونه‌ها آلودگی کمتر از حد مجاز و ۳۱/۱۷ درصد نمونه‌ها آلودگی به آفلاتوکسین M_1 بیش از حد مجاز مطابق استاندارد کمیته اروپایی و غذایی کدکس بود (جدول ۱ و ۲).

در مطالعه حاضر درصد آلودگی به آفلاتوکسین M_1 در پنیرهای مورد آزمایش مطابق روش الایزا و HPLC به ترتیب ۶۸/۲۲ درصد و ۶۴/۵۸ درصد بود که نتایج بدست آمده در این پژوهش با نتایج توکلی و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد، آن‌ها در مطالعه‌ای آلودگی به آفلاتوکسین M_1 در پنیر پاستوریزه عرضه شده دو کارخانه تولید کننده فرآورده‌های لبنی در شهر تهران را به روش الایزا بررسی کردند و نتایج بدست آمده را اینگونه اعلام کردند که ۶۲ درصد از نمونه‌های پنیر عرضه شده دو کارخانه تولید کننده محصولات لبنی به مقادیری از آفلاتوکسین آلوده هستند و ۶ نمونه (۹/۳ درصد موارد مثبت) آلودگی بیش از حد استاندارد گزارش شد. همچنین متوسط میزان آفلاتوکسین M_1 در نمونه پنیر ۵۳/۳۹ نانوگرم در کیلوگرم تعیین شد طوری‌که این میزان آلودگی نشان‌دهنده آلوده بودن شیر اولیه مورد استفاده کارخانجات مورد آزمون بود [۲۰].

سایر محققان (۲۰۰۷) در پژوهشی میزان آفلاتوکسین موجود در پنیرهای سفید عرضه شده توسط کارخانجات مختلف استان تهران را بررسی کردند که مطابق نتایج اعلامی از ۸۰ نمونه مورد بررسی، وجود آفلاتوکسین M_1 در ۸۳/۳ درصد نمونه‌ها مورد تایید قرار گرفت که در مقایسه با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر میزان آلودگی بیشتر بود [۲۱].

نتایج مطالعه فلاح و همکاران (۲۰۰۹) و کریم و همکاران (۲۰۰۸) که میزان آلودگی آفلاتوکسین M_1 در پنیرهای سفید و خامه‌ای ایران را به روش الایزا بررسی کردند که با نتایج ما در این پژوهش همخوانی و مطابقت دارد. روش مورد استفاده در مطالعه آن‌ها نیز روش الایزا بود که نشان می‌دهد این روش از روش‌های

معتبر در تعیین میزان آلودگی با آفلاتوکسین M_1 می‌باشد [۲۲ و ۲۳].

در مطالعه فلاح و همکاران (۲۰۰۹) که در ۲۱۰ نمونه پنیر (۱۱۶ نمونه پنیر سفید ایرانی و ۹۴ نمونه پنیر خامه‌ای) عرضه شده در استان‌های اصفهان و یزد میزان آلودگی به آفلاتوکسین M_1 به روش الایزا بررسی شد که در ۱۶۱ نمونه (۸۰/۱ درصد نمونه‌های پنیر سفید و ۷۲/۳ درصد نمونه‌های پنیر خامه‌ای) وجود مقادیر بیشتر از ۲۰۰ نانوگرم در کیلوگرم تایید شد و غلظت آفلاتوکسین M_1 در ۲۴/۲ درصد نمونه‌ها بیش از حد استاندارد گزارش گردید [۲۲].

کرمییر و همکاران (۱۹۷۷) میزان آلودگی ۱۹۷ نمونه پنیر پاستوریزه کشور آلمان به آفلاتوکسین M_1 را مورد بررسی قرار دادند و مطابق نتایج بدست آمده در مطالعه آن‌ها در ۱۳۶ (۶۹ درصد) آلودگی به آفلاتوکسین M_1 اعلام شد [۲۴].

آتاندا و همکاران (۲۰۰۷) در پژوهشی میزان آلودگی به آفلاتوکسین M_1 بر روی نوعی پنیر محلی در ایالات اوگان نیجریه را بررسی کردند که نتایج اعلام شده توسط آن‌ها با نتایج بدست آمده در این مطالعه مطابقت دارد [۲۵].

در مطالعه توکار و همکاران (۲۰۰۸) در اسلوونی نیز اعلام کردند که میزان آلودگی به آفلاتوکسین M_1 در ۱۵ درصد نمونه‌های مورد آزمایش وجود داشت [۲۶].

پرادو و همکاران (۲۰۰۰) در پژوهشی میزان آلودگی پنیر به آفلاتوکسین M_1 را مورد بررسی قرار دادند. آنها ۷۵ نمونه پنیر جمع‌آوری شده از منطقه میناسگرایس[8] در برزیل مورد آزمون قرار دادند که نتایج نشان داد که ۷۴/۷ درصد از نمونه‌ها با غلظت ۶۹۲-۲۰۰ نانوگرم در کیلوگرم آلوده به آفلاتوکسین M_1 بود [۲۷].

همچنین محققان دیگر در سال ۲۰۰۶ میزان آلودگی به آفلاتوکسین M_1 در ۲۸/۲ درصد از نمونه‌های مورد مطالعه در کشور ترکیه را تایید نمودند [۲۸].

۴- نتیجه‌گیری

طبق نتایج بدست آمده از این پژوهش، هر دو روش مورد استفاده جهت اندازه‌گیری میزان آلودگی بر بالا بودن میزان آفلاتوکسین M_1 در پنیر سفید ایرانی دلالت دارد. با توجه به اثرات زیانبار آفلاتوکسین، در صورت عدم کنترل آن در محصولات لبنی، تهدیدکننده سلامتی مصرف‌کنندگان خواهد بود. با توجه به اینکه آفلاتوکسین M_1 متابولیت آفلاتوکسین B_1 موجود در جیره غذایی دام است که در شیر دفع می‌شود، یکی از موثرترین روش‌ها، کاهش سطح آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام است که بدینوسیله حیوان آفلاتوکسین کمتری را دریافت می‌کند و نتیجه آن کاهش غلظت آفلاتوکسین M_1 در شیر و فرآورده‌های آن مانند پنیر می‌باشد. بنابراین کنترل آلودگی جیره غذایی دام‌های شیری و استفاده از غذاهای سالم و فاقد آلودگی برای دام می‌تواند در به حداقل رساندن آلودگی شیر و فرآورده‌های شیری کمک نماید. همچنین آموزش دامداران به منظور عدم استفاده از علوفه ناسالم در تغذیه دام‌های شیری و کنترل و نظارت بیشتر بر مراکز دریافت شیر خام و کارخانجات تولیدکننده محصولات لبنی می‌تواند در کاهش آلودگی شیر و محصولات شیری به ویژه پنیر موثر واقع گردد.

۵- منابع

[1] Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G., and Coton, E. 2014. Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13, 437-456.

[2] Kocabas, C. N., and Sekerel, B. E. 2003. Does systemic exposure to aflatoxin B1 cause allergic sensitization? Allergy, 58, 363.

[3] Bbosa, G. S., Kitya, D., Lubega, A., Ogwal-Okeng, J., Anokbonggo, W. W., AND Kyegombe, D. B. 2014. Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems Agricultural and Biological Sciences. In M. Razzaghi-Abyaneh (Ed.), Aflatoxins -Recent Advances and Future Prospects, 1sr ed., 321-326.

[4] Zain, M. E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society, 15(2), 129–144.

[5] Mohammadi, H. 2011. A Review of Aflatoxin M1, Milk, and Milk Products, Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology, Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez (Ed.), ISBN: 978-953-307-395. Available from: www.intechopen.com)

[6] Creppy, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters, 127, 19-28.

[7] Lopez, C., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L., and Perez, J. 2001. Distribution of aflatoxin

8. Minasgerais

M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. International Journal of Food Microbiology, 64, 211-215.
[8] Chopra, R.C., Chhabra, A., Parsad, K.S.N., Dudhe, A., Hurthy, T.N., and Pprasad, T. 1999. Carryover of aflatoxin M1 in milk of cows fed aflatoxin B1 contaminated ration. Indian Journal of Animal Nutrition, 16, 103-106.
[9] Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Fusconi, G., and Galvano, M. 1996. Reduction of carryover of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbon. Journal of Food Protection, 59, 551-554.
[10] Trucksess, M.W., and Pohland, A.E. 2000. Mycotoxin protocols, Series: Methods in molecular biology, 157. Humana press.
[11] Van Egmond, H.P. 1983. Mycotoxins in dairy products. Food Chemistry, 11, 289-307.
[12] Chavarría, G., Granados-Chinchilla, F., Alfaro-Cascante, M., & Molina, A. (2015). Aflatoxin M1 Presence in milk, cheese and sour cream samples commercially available in Costa Rica using enzyme-assisted extraction and HPLC. Food Additives and Contaminants: Part B: Surveillance, 8(2), 128-135.
[13] Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., D' Arco, G., Passini, C., and Giraudi, G. 2012. Occurrence of aflatoxin M1 in Italian cheese: Results of a su r1v8e1y conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, m i1lk8i2ng animals, and maturation of cheese. Food Control, 25, 125–130. 183
[14] Commission of European Communities. 2010. Commission Regulation (EC) No. 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Official Journal of the European Communities, L 50: 8-12.
[15] Rastogi, S., Dwivedi, D.P., Khanna, K.S., and Das, M. 2004. Detection of aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. Food Control, 15, 287-90.
[16] Institute of standards and Industrial Research of Iran. Food & Feed-Mycotoxins-Maximum tolerated level; NO.5925. 1th ed. Tehran: ISIRI, 2002. (In Persian).
[17] Kamkar, A., Karim, G., Shojaee, Aliabadi, F., and Khaksar, R. 2008. Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. Food and Chemical Toxicology, 46, 2236-2238.
[18] Rodriguesz, M.L., Velasco, M.M., Calonge, D., and Ordonez Escudero, D. 2003. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk. Food Additive Contamination, 20, 276-80.
[19] Dragacci, S. 2001. Immunoaffmity column clean up with liquid chromatography for determination of aflatoxin Ml in liquid milk: collaborative study. Journal of AOAC international, 84(2) 437-443.
[20] Tavakoli, H.R., Riazipour, M., Rafati, H., Naghavi, S., Rostami, H., and Saghazadeh, M. 2011. Aflatoxin M1 Contamination of Pasteurized Cheese Produced by Two Dairy Factories in Tehran, Assessed by ELISA Technique. Hakim Research Journal, 13(4): 219- 225. (In Persian).
[21] Kamkar, A., Jahed Khaniki, G., Bokaie, S., and Hosseiny, H. 2006. Aflatoxin M1 and Iranian white cheese. Journal of the Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, 61, 201-206. (In Persian).
[22] Fallah, A.A, Jafari, T., Fallah, A., and Rahnama, M. 2009. Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. Food Chem Toxicol, 47(8):1872-5.
[23] Karim, G., Kamkar, A., Aliabadi, F.S., and Khaksar, R. 2008. Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. Food Chem Toxicol, 46(6):2236–38.
[24] Kiermeier, F., Weiß, G., Behringer, G., and Miller, M. 1977. On the presence and the content of aflatoxin M in commercial cheese samples Z Lebensm Unters Forsch, 163(4):268-71. (Article in German).
[25] Atanda, O.O., Oguntubo, A., Adejumo, O., Ikeorah, H., and Akpan, I. 2007. Aflatoxin M1 contamination of milk and ice cream in Abeokuta and Odeda local governments of Ogun State, Nigeria. Chemosphere, 68:1455–8.
[26] Tokar, K.G., and Vengust, A. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. Food Control, 19:570-7.
[27] Prado, G., Oliveira, M.S., Pereira, M.L., Abrantes, F.M., Santos, L.G, and Veloso, T. 2000. Aflatoxin M1 in samples of "Minas" cheese commercialized in the city of Belo Horizonte-Minas Gerais/Brazil. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 20(3):398–400.
[28] Gurbay, A., Engin, A.B., Caglayan, A., and Shahin, G. 2006. Aflatoxin M1 levels in commonly consumed cheese and yogurt samples in Ankara, Turkey. Ecology of Food and Nutrition , 45(6):449-59.

A Survey of Aflatoxin M_1 Contamination in Iranian White Cheese by ELISA Technique and HPLC

Khoori, E. [1*], Mohammadi Sani, A. [2], Khoori, M. [3]

1. Ph.D Student Food Science and Agricultural Engineering, Azad University of Ghochan, Ghochan, Iran.
2. Young Researchers and Elite Club, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
Iran.
3. Veterinary Medicine Doctor Graduate, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(Received: 2017/03/12 Accepted: 2017/10/03)

Aflatoxins are mold secondary metabolites produced by species of Aspergillus. Aflatoxin M_1 (AFM1) in one of the most common fungous toxins that can often be found in dairy products and has some serious complications. The aim of this study was to assess AFM1 contamination in Iranian white cheese by ELISA technique and HPLC. In this cross-sectional study, 129 samples of Iranian white cheese were gathered by ELISA technique and HPLC for AFM1 contamination. Data were analyzed by SPSS/22 using T-student tests.

AFM1 was found by ELISA technique in 68.22% and by HPLC 64.58 of examined samples (P>0.05). AFM1 contamination 33.56% cases of lower and 31.17% cases, being also higher than European Community and Codex standard (250 ng/kg). The finding of this study showed that samples were considered to be possible hazards for public health. Better control of animal feeding and dairy factories can reduce AFM1 contamination in dairy products.

Keywords: Aflatoxin M_1, Iranian white cheese, ELISA, HPLC.

* Corresponding Author E-Mail Addtress : khoorie1@thums.ac.ir