

بررسی میزان آفاتوکسین 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 تراژنیک 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 حداکثر حد 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 می باشد.

کلید واژگان: آفاتوکسین M_1 ، پنیر، الیزا

1- مقدمه

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 تراژنیک 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 کشورهای اروپایی حداکثر حد تحمل¹ پارازیتیکوس و آسپرژیلوس نومیوس، افلاتوکسین

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 می گردند. 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 مرسوم ترین انواع افلاتوکسین هستند که از مواد غذایی یا خوراک دام آلوده جدا شده اند [2]. آسپرژیلوس فلاووس، افلاتوکسین B را تولید می کند، در حالیکه آسپرژیلوس

* مسئول مکاتبات: ali_heshmaati@yahoo.com

1. Maximum tolerance limit

برای آفلاتوکسین 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 آفلاتوکسین ها در پنیر عبارت است از 1- آلودگی شیر مورد استفاده برای تولید پنیر به آفلاتوکسین M_1 که علت اصلی می باشد، 2- رشد کپک بر روی پنیر و تولید آفلاتوکسین و 3- استفاده از شیر خشک آلوده به آفلاتوکسین برای تولید پنیر [8].

اگرچه در خصوص آلودگی پنیر به آفلاتوکسین M_1 در کشور های مختلف مطالعات متعددی صورت گرفته است (جدول 1) اما در مورد میزان آلودگی به آفلاتوکسین 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 آفلاتوکسین M_1 در سطح عرضه پنیر سفید ایرانی در فصل تابستان و زمستان است.

جدول 1 بررسی میزان آفلاتوکسین M_1 در پنیر در کشورهای مختلف

منبع	محدوده غلظت آفلاتوکسین (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 188 نمونه پنیر سفید ایرانی (94 نمونه در زمستان 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 مرک¹، میکروتیتر پوشاننده با آنتی بادی، محلول های استاندارد آفلاتوکسین (0، 5، 10، 20، 40 و 80 نانوگرم بر لیتر)، آنزیم، سوبسترا، کروموژن، محلول توقف و بافر فسفات از شرکت ار- بیوفارم² آلمان تهیه شد.

2-3- آماده سازی نمونه

100 گرم 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 $\times g$ 2700 فاز بالایی جدا شد و 100 میکرولیتر از فاز پایینی با 400 میکرولیتر بافر فسفات رقیق شد.

2-4- اندازه گیری مقدار آفلاتوکسین

روش اندازه گیری مقدار آفلاتوکسین مطابق با مطالعات گورس و ستون در سال 2004 انجام شد [9]. ابتدا 100 میکرولیتر از رقیق شده فوق یا استاندارد های آفلاتوکسین 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 گرمخانه گذاری شد. پس از سه مرتبه شستشو با 250 میکرولیتر آب مقطر، 50 میکرولیتر سوبسترا و 50

1. Merck
2. R-biopharm

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 $100-50 \text{ ng/kg}$ و 28 نمونه آلودگی در محدوده $100-250 \text{ ng/kg}$ داشتند و در 16 نمونه 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 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 410 ng/kg بود و در $60/60\%$ نمونه های آلوده مقدار آلودگی 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 در ماه 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 کرده اند مغایرت دارد [12-18]. این اختلافات بدلیل تفاوت در میزان افلاتوکسین شیر مورد استفاده برای تولید پنیر ، روش آنالیز افلاتوکسین و تکنولوژی تولید پنیر می باشد [8].

میکرولیتر کروموزن 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 و 80 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 دوبار¹ انجام شد و میانگین آن دو در نظر گرفته شد. مطابق دستورالعمل کیت الیزا کمترین حد قابل تعیین افلاتوکسین 50 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 نمونه های تابستان با زمستان از آزمون تی - استیودنت² استفاده شد.

3- نتایج

از 188 نمونه که به منظور بررسی آلودگی به افلاتوکسین 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 $100-50 \text{ ng/kg}$ بود ، در حالیکه 30 نمونه آلودگی در محدوده $100-250 \text{ ng/kg}$ داشتند. و در 52 نمونه آلودگی بیش از حد مجاز مورد پذیرش

1. Duplicate
2. T-student

محصول تهدیدی برای سلامتی مصرف کننده گان خواهد بود. از آنجائیکه آفلاتوکسین M_1 متابولیت آفلاتوکسین B_1 موجود در جیره غذایی دام می باشد که در شیر دفع می گردد.

یافته های این مطالعه نشان می دهد که میزان شیوع آلودگی پنیر سفید ایرانی به آفلاتوکسین M_1 زیاد می باشد. با توجه به اثرات زیانبار آفلاتوکسین به نظر می رسد در صورتی که برای کاهش سطح آن در پنیر چاره ای اتخاذ نشود مصرف این

جدول 2 توزیع فراوانی آفلاتوکسین M_1 در پنیر فتا

فصل	تعداد نمونه های آنالیز شده	تعداد نمونه های آلوده (درصد)	میانگین غلظت آفلاتوکسین (ng/kg)	محدوده غلظت آفلاتوکسین 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 آفلاتوکسین M_1 در پنیر فتا

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

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., Sarimehmetoglu, 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.

موثر ترین روش کاهش سطح آفلاتوکسین M_1 در پنیر کاهش سطح آفلاتوکسین B_1 در خوراک دام می باشد تا از این طریق حیوان آفلاتوکسین کمتری دریافت کرده و در نتیجه غلظت آفلاتوکسین در شیر و فرآورده های آن مثل پنیر کاهش یابد. برای این منظور لازم بوده در زمان تولید علوفه و خوراک دام شیوه ساخت مناسب¹ رعایت گردد و در شرایط مناسب دمایی و رطوبتی نگهداری شوند تا امکان رشد کپک در آنها میسر نشود و در نتیجه آلوده به آفلاتوکسین نگردند.

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

1. Good manufacturing practice(GMP)

- [13] Trucksess, M.W., Page, S.W. (1896). Examination of imported cheese for aflatoxin M₁. *Journal of Food Protection*, 49, 632–633.
- [14] Minervini, F., Visconti, A., Bottalico, A., Montagna, M.T., (2001). On the occurrence of aflatoxin M₁ 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 M₁ du lout et des produits laitiers en France. *Lait*, 61, 481–483.
- [18] Karaioannoglu, P.G., Mantia, A., Koufidia, D., Koidia, P., Triantafillou, J. (1989). Occurrence of aflatoxin M₁ in raw and pasteurized milk and in Feta and Teleme cheese samples. *Milchwissenschaft*, 44, 746–748.
- [7] Sarimehmetoglu, B., Kuplulu, O., Celik, T.H. (2004). Detection of aflatoxin M₁ in cheese samples by ELISA. *Food Control*, 15, 287–290.
- [8] Kamkar, A. (2006). A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian Feta cheese. *Food Control*, 17, 768–775.
- [9] Güress, M., çetün, B. (2004). Occurrence of aflatoxin M₁ 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 M₁ 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 M₁ 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 M₁ occurrence in dairy products marketed in Italy. *Food Additives and Contaminants*, 5, 133–139.

Occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian white cheese

Heshmati, A.*

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

(Received: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 B₁ aflatoxin-contaminated feed transmit the toxin, as the metabolic form aflatoxin M₁ (AFM₁) to the milk. When cheese is made from AFM₁ 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 AFM₁ levels were determined by ELISA method. AFM₁ was found in 133 (70.7%) samples. The mean of AFM₁ concentration was 343 ng / kg. AFM₁ levels in 68 samples (36.2%) exceeded the maximum tolerance limit accepted by some European countries. Statistical analysis showed that concentration of AFM₁ 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 AFM₁ was high among cheese samples what must be regarded as a health concern for consumers.

Keywords: Aflatoxin M₁, Cheese, ELISA

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