✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۴، پاییز ۱۳۷۸

مطالعهٔ تأثیر بی‌سولفیت سدیم بر روی آفلاتوکسین M_1 در شیر

● **ابوالفضل کامکار**، عضو هیأت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
● **گیتی کریم**، استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
تاریخ دریافت: تیرماه ۱۳۷۸

چکیده
با توجه به آلودگی زیاد شیرهای خام تولیدی در اطراف تهران به آفلاتوکسین M_1، اثر بی‌سولفیت سدیم (که یکی از افزودنیهای مجاز غذایی است) در دو غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد در حدی که برای سلامتی انسان ضرری نداشته باشد بر روی آفلاتوکسین M_1 در شیرخشک اطفال (فاقد AFM1) که بصورت دستی و به میزان ۲ppb به این سم آلوده شده بود مطالعه گردید. گروههای تیمار (شامل دو گروه ۱۵ تایی) و شاهد (شامل یک گروه ۱۵ تایی) در سه آزمون جداگانه که از نظر درجه حرارت و زمان با یکدیگر تفاوت داشتند تقسیم‌بندی شدند. در آزمون‌های شماره یک، دو و سه بترتیب تمامی گروههای شاهد و تیمار در شرایط ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت، ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شده و سرانجام میزان آفلاتوکسین M_1 با استفاده از روش TLC - Scanner اندازه‌گیری شد. براساس نتایج بدست آمده، میزان کاهش سم آفلاتوکسین M_1 در گروههای شاهد آزمون‌های شماره یک، دو و سه بترتیب از راست به چپ ۲/۸۴، ۲/۷۸ و ۳/۱۴ درصد بود. باید توجه داشت که بی‌سولفیت سدیم با غلظت ۰/۲ درصد در آزمون‌های شماره یک، دو و سه بترتیب از راست به چپ باعث کاهش آفلاتوکسین M_1 به میزان ۳۸/۱۸۸، ۳۸/۱۸۰ و ۵۹/۱۲۰ درصد شد. در حالی که این ماده با غلظت ۰/۴ درصد اثر بیشتری بر کاهش سم داشته و بترتیب از راست به چپ مقدار آن را ۴۲/۲۰۰، ۴۵/۴۹۰ و ۶۱/۳۰۰ درصد پائین آورد. به طورکلی، میزان آفلاتوکسین M_1 بطور معنی‌داری ($P<0/05$) به وسیله بی‌سولفیت سدیم کاهش پیدا می‌کند که این کاهش در دمای پاستوریزاسیون بالاتر است.

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 44 PP: 112-115**

Study on the effect of sodium bisulfite on the Aflatoxin M_1 in milk.

By: Kamkar A., Karim G.; Department of Food Hygiene and Control, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.

Considering the existance and amount of aflatoxin M_1 (AFM1) in bulk cow's milk in Tehran area, the reconstituted milk was contaminated with 2ppb of aflatoxin M_1 and the effect of some food additives in safe level for human such as sodium bisulfite with two different concentrations (0.2% and 0.4%) on the degradation of AFM1 were studied. The experimental and control samples were classified into three separate groups varied in temperature, and holding time. In trials 1, 2 & 3 all of the control and experimental groups were incubated in 4°C for 12h , 4°C for 24h and 65°C for 30 min respectively and finally aflatoxin M_1 level was measured by TLC-Scanner. On the basis of the obtained results, the rate of AFM1, reduction in control groups of trials 1, 2 & 3 was 2.84%, 2.78% and 3.14% respectively. It was noticed that sodium bisulfite with 0.2% concentration in trials 1, 2 & 3 decreased AFM1 level in the rates of 38.188%, 38.180% and 59.120% respectively. Where as in the presence of 0.4% concentration of sodium bisulfite, the reduction rate was higher 42.200%, 45.490% and 61.30% in group I,II and III respectively. In general, AFM1 is significantly ($P<0.05$) degraded by some food additives such as sodium bisulfite and the degradation rate higher when was accompained by pasteurization process.

مقدمه

از جمله عوامل آلوده‌کننده شیر قارچها هستند که به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم باعث آلودگی آن می‌شوند. قارچها قادرند که در طی مدت رشد خود بر روی مواد غذایی علاوه بر کاهش ارزش غذایی آنها، متابولیت‌های ثانویه‌ای به نام سموم قارچی (Mycotoxins) تولید کنند که دارای اثرات سرطان‌زائی، جهش زائی، ناقص الخلقه‌زائی، مسمومیت و غیره می‌باشند (۲۹).

قارچهای مولد آفلاتوکسین عمدتاً مربوط به دو گروه یعنی آسپرژیلوس (Aspergillus) و پنی‌سیلیوم (Penicillium) می‌باشند که تحت شرایط خاص بیولوژیکی، شیمیائی و محیطی رشد نموده و سبب تولید آفلاتوکسین‌ها می‌شوند (۸، ۷، ۱۰، ۱۳، ۱۵، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۴، ۲۵، ۲۶ و ۲۸).

آفلاتوکسین‌ها معمولاً تا حدود زیادی در مقابل عوامل مختلف فیزیکی و شیمیائی مقام بوده (۵، ۹، ۱۴، ۲۷، ۳۰ و ۳۱) و علی‌رغم تلاشهای فراوانی که تاکنون در مورد سالمسازی شیر صورت گرفته است محققین نتوانسته‌اند یک روش کامل و اقتصادی در این مورد اعلام نمایند.

تاکنون جهت سالمسازی شیر و حذف آفلاتوکسین نوع M_1 روشهای مختلف فیزیکی، شیمیائی و بیولوژیکی مورد آزمایش و بررسی قرار گرفته است، نتایج حاصله از تحقیقات در بعضی از موارد کاملاً متفاوت و حتی متضاد بوده است. از جمله مهم‌ترین این روش‌ها می‌توان به استفاده از عوامل فیزیکی نظیر گرما، سرما، اشعه ماوراء بنفش، مواد جاذب و عوامل شیمیایی نظیر سولفیت سدیم، ریبوفلاوین، پراکسید هیدروژن و بالاخره سیستم لاکتوپراکسیداز اشاره نمود.

برخی از مطالعات نشان داده است که سولفیت‌ها می‌توانند باعث کاهش آفلاتوکسین B_1 در محلول بافر و یا در آرد ذرت بشوند (۱۱، ۱۲، ۱۷). بر پایهٔ این مشاهدات در سال ۱۹۸۲ آپله بائوم و مارت (Applebaum and Marth) احتمال استفاده از سولفیت‌ها را برای کاهش میزان AFM_1 در شیر بررسی کردند. در مطالعه آنها شیر خام آلوده که میزان آلودگی آن ۵ppb بود با مقدار ۰/۴ درصد بی‌سولفیت سدیم در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ ساعت مورد آزمایش قرار گرفت و تا ۴۵ درصد غلظت آفلاتوکسین M_1 را در شیر کاهش داد. استفاده از غلظت‌های بالاتر سولفیت اثر کمتری روی حذف میزان آفلاتوکسین M_1 در شیر داشت (۶).

بی‌سولفیت سدیم یک مادهٔ نگاهدارندهٔ غذایی مجاز بوده و کاربرد وسیعی در صنایع غذایی داشته و به عنوان متداول‌ترین ماده نگاهدارنده کمترین اثر سوء را بر ماده غذایی دارد. این نگاهدارنده از نظر شیمیائی بسیار فعال بوده و از آنجائی که دارای قدرت واکنش بالایی با انواع آفلاتوکسین‌هاست، می‌توان از آن برای حذف و کاهش سم آفلاتوکسین M_1 در شیر مورد استفاده برای تهیه پنیر و سایر فرآورده‌های شیر استفاده نمود. لذا در این

تحقیق اثر بی‌سولفیت سدیم در دو غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد روی میزان آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌های شیرخشک بازسازی شده‌ای که عمداً به آفلاتوکسین M_1 (۲ppb) آلوده شده بودند تحت شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت، ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت نگهداری شده بودند مطالعه، و میزان کاهش سم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

در این مطالعه نمونه‌های شیرخشک اطفال (بدلیل عاری بودن از آفلاتوکسین M_1) پس از بازسازی، با آفلاتوکسین M_1 به میزان ppb ۲ آلوده شده و اثر بی‌سولفیت سدیم در دو غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد روی آفلاتوکسین M_1 مورد مطالعه قرار گرفت. این تجربه شامل دو گروه تیمار (گروه اول و دوم که به گروه اول بی‌سولفیت سدیم به میزان ۰/۲ درصد و به گروه دوم بی‌سولفیت سدیم به میزان ۰/۴ درصد اضافه گردید و یک گروه شاهد که به آن بی‌سولفیت سدیم اضافه نشده بود، بود.

دستگاهها و وسایل مورد استفاده

TLS Scanner III مدل CAMAC، تغلظ کنندهٔ تبخیری مدل Buchi، صفحات کروماتوگرافی شیشه‌ای ۲۰×۲۰ سانتیمتر، سرنگ ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتری، ترازو با دقت بالا، قیف جداکننده با درب پلی‌تترافلور و اتیلن (PTFE) با ظرفیت ۲۵۰ میلی‌لیتر، ستون شیشه‌ای برای کروماتوگرافی ستونی، مخلوط کن، وسایل معمول آزمایشگاهی برای کروماتوگرافی لایهٔ نارک، لامپ فرابنفش قابل تنظیم با طول موج ۳۶۰ نانومتر، بشرهای شیشه‌ای با ظرفیت ۲۵ و ۲۵۰ میلی‌لیتر، قیف شیشه‌ای با قطر ۷ سانتی‌متر، کاغذ صافی، ارلن در سمباده‌ای، ارلن ته گرد، لوله‌های شیشه‌ای با گلو و در سمباده‌ای، وسایل مناسب برای تبخیر کلروفرم، بشقاب چینی، آون خشک‌کن، میکرو پی‌پت و بن‌ماری.

مواد مورد استفاده

کلروفرم، تولوئن، اسید استیک گلاسیال ۹۶ درصد، استونیتریل، دی‌اتیل اتر، ان‌هگزان، استن، متانول، سدیم کلراید، سدیم دودسیل سولفات، پشم شیشه، سولفات سدیم بدون آب، سلیکاژل ۶۰، بی‌سولفیت سدیم، آفلاتوکسین M_1 (با شماره کاتالوگ A-۹۲۷۶ ساخت کارخانه Sigma) و شیرخشک اطفال.

روش کار

مقدار ۵ گرم شیرخشک اطفال را با تقریب ۰/۱ گرم در یک بشر ۲۵۰ میلی‌لیتر توزین و به آهستگی به آن ۵۰ میلی‌لیتر آب با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد اضافه گردید (ماده خشک معادل ماده خشک شیر مایع). سپس با استفاده از یک میلهٔ شیشه‌ای تا زمان بدست آن مخلوط همگن در آب باقیمانده بهم زده شد. شیر بازسازی شده مایع مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس با آفلاتوکسین M_1 به میزان ppb ۲ بصورت دستی آلوده و برای مدت ۳ دقیقه خوب مخلوط گردید. لازم به ذکر است که این تحقیق روی ۴۵ نمونه شیر بازسازی شده بصورت سه آزمون که در هر آزمون دو گروه تیمار و یک گروه شاهد قرار داشت انجام گرفت که در ذیل به انها اشاره می‌گردد:

۱- در آزمون شماره یک مجموعاً تعداد ۱۵ نمونه مورد آزمایش قرار گرفتند. این مجموعه به ۳گروه تقسیم شد که در هر گروه ۵ نمونه ۱۰ میلی‌لیتری شیر مورد ارزیابی قرار گرفتند. تمامی نمونه‌های این آزمون در شرایط ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شده و سپس ازمون بازیافت نمونه‌ها از نظر میزان کاهش آفلاتوکسین M_1 صورت می‌گرفت، گروههای سه گانه بترتیب شامل:

۱-گروه اول: در این گروه به ازای هر نمونه (۱۰ میلی‌لیتر) ۰/۰۲ گرم بی‌سولفیت سدیم اضافه شده و بخوبی مخلوط گردید.

۲-گروه دوم: در این گروه به ازای هر نمونه (۱۰ میلی‌لیتر) ۰/۰۴ گرم بی‌سولفیت سدیم اضافه شده و بخوبی مخلوط گردید.

۳-گروه سوم: در این گروه که به عنوان گروه شاهد محسوب گردید بی‌سولفیت سدیم اضافه نشد.

آزمون‌های دوم و سوم از نظر مقدار کلی نمونه و تعداد گروه‌ها و تعداد نمونه‌ها در هر گروه دقیقاً مشابه آزمون اول بودند با این تفاوت که در آزمون دوم نمونه‌ها پس از آماده شدن در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند و سپس میزان آفلاتوکسین M_1 باقیمانده در آنها مورد آنالیز قرار گرفت در حالیکه در آزمون سوم نمونه‌ها پس از آماده شدن در شرایط ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند (پاستوریزاسیون کند) و سپس از نظر میزان کاهش AFM_1 آزمایش گردیدند.

جهت بررسی و تعیین میزان آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌های مورد بررسی مطابق روش ارائه شده توسط فدراسیون بین‌المللی مواد لبنی (IDF)، استخراج سم در ابتدا باکمک کلروفرم در قیف جداکننده که به آن علاوه بر نمونه مورد آزمایش ۱۰ میلی‌لیتر محلول اشباع کلرید سدیم، ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد سدیم دودسیل سولفات و ۱۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم خنک شده تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اضافه شده بود صورت گرفته، و حاصل استخراج (لایه کلروفرمی) به یک ارلن مخروطی که حاوی ۵ گرم سولفات سدیم بدون آب بود منتقل شده و پس از ۱۵ دقیقه که گاهگاهی تکان نیز داده می‌شد بوسیلهٔ کاغذ صافی، صاف شده و ۷۵ میلی‌لیتر از این محلول صاف شده در یک استوانهٔ مدرج جمع آوری شده، در مرحله بعدی عصاره بدست آمده به ستون کروماتوگرافی که حاوی پشم شیشه، ۱ گرم سولفات سدیم، ۲ گرم سیلکاژل، ۲ گرم سولفات و سدیم کلروفرم بود منتقل شده تاتحت تأثیر نیروی ثقل کامل خارج شود، در مراحل بعدی ستون به ترتیب با ۲۵ میلی‌لیتر مخلوط تولوئن + اسید استیک گلاسیال، ۲۵ میلی‌لیتر ان هگزان، ۲۵ میلی‌لتر مخلوط استونیتریل + دی اتیل اتر + ان هگزان و بالاخره ۶۰ میلی‌لیتر مخلوط کلروفرم + استن شستشو داده و حاصل شستشوی آخر جمع‌آوری گردیده و پس از خشک شدن در خشک کننده دوار و در جریان گاز خنثی در ۵۰ درجه سانتی‌گراد، میزان ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه شده و پس از مخلوط شدن به مدت ۳ دقیقه عمل لکه گذاری بر روی صفحات آماده شدهٔ TLC صورت گرفت.

صفحات حاوی کله‌ای نمونه مورد آزمایش و استاندارد AFM1 داخل تانک حلال قرار گرفته و پس از پیشرفت حلال تا ۱۴-۱۲ سانتی‌متری از لبهٔ بالائی صفحه از داخل تانک خارج و پس از خشک شدن، بوسیلهٔ دستگاه TLC-Scanner III که دارای دقت ۴-۱۰×۵ نانوگرم در مورد اخذ توکسین M_1 خالص است میزان اخذ توکسین M_1 نمونه با توجه به سطح زیر منحنی استاندارد و باکمک فرمول:

غلظت آفلاتوکسین M_1 برحسب ppb

$$\frac{100}{\text{درصد بازیافت}} \times \text{غلظت استاندارد} \times \frac{\text{سطح زیرمنحنی}}{\text{سطح زیر منحنی استاندارد}} =$$

بدست آمد. براساس تجربه انجام گرفته درصد بازیافت روش مورد استفاده ۹۸٪ بود (۱۶).

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها روشهای آماری از جمله T-test و آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید.

نتایج

براساس اطلاعات موجود در جدول شماره یک که میانگین شاخص‌های مرکزی و پراکندگی کاهش میزان آفلاتوکسین M_1 در گروههای مورد آزمایش هر آزمون بوسیله بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد و ۰/۴ درصد را نشان می‌دهد. میتوان برآورد فاصله‌ای کاهش سم آفلاتوکسین M_1 را بوسیله بی‌سولفیت سدیم در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ درصد در هر یک از آزمون‌های شماره یک (۴ درجه سانتی‌گراد ۱۲ ساعت)، شماره دو (۴ درجه سانتی‌گراد ۲۴ ساعت)، و شماره سه (۶۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ دقیقه) محاسبه نمود. برآورد فاصله‌های (μ) کاهش سم آفلاتوکسین M_1 در گروههای اول آزمون‌های شماره ۱، ۲ و ۳ به ترتیب از راست به چپ $36/40 < \mu < 35/96$، $39/17 < \mu < 36/18$ و $57/52 < \mu < 60/71$ درصد و در گروههای دوم آزمون‌های شماره ۱، ۲ و ۳ به ترتیب از راست به چپ بین $40/83 < \mu < 43/56$، $46/33 < \mu < 44/50$ و $52/88 < \mu < 59/71$ درصد می‌باشد. بنابراین در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌توان ادعا نمود که درصد کاهش سم بوسیلهٔ بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد با زمان نگهداری ۱۲ ساعت، در ۴ درجه سانتی‌گراد و زمان نگهداری ۲۴ ساعت و ۶۵ درجه سانتی‌گراد با زمان نگهداری ۳۰ دقیقه به ترتیب از راست به چپ بین ۳۵/۹۶، ۳۶/۴۰، ۳۷/۱۸، ۳۷/۵۲، ۵۷/۵۲ و ۶۰/۷۱ درصد و بوسیلهٔ بی‌سولفیت سدیم ۰/۴ درصد در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت، در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و ۶۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳۰ دقیقه به ترتیب از راست به چپ بین ۴۰/۸۳، ۴۳/۵۶، ۴۴/۵۰، ۴۶/۳۳، ۵۹/۷۱ و ۶۲/۸۸ درصد قرار دارد.

در آزمون t برای برابری میانگین‌های کاهش میزان آفلاتوکسین M_1 بوسیلهٔ هر یک از گروههای آزمایش در سه آزمون مختلف با در نظر گرفتن میزان خطای ۰/۰۵ میتوان اظهار داشت که چون سطح معنی‌دار ($P<0/05$) آزمون برابری میانگین کاهش آفلاتوکسین M_1 در هر

جدول شماره ۱ - شاخص‌های مرکزی و پراکندگی کاهش میزان آفلاتوکسین M_1 بوسیلهٔ بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ و ۰/۴ درصد به تفکیک نوع آزمون

حداقل کاهش سم AFM$_1$٪	حداکثر کاهش سم AFM$_1$٪	واریانس	خطای استاندارد	انحراف معیار	میانگین کاهش سم AFM$_1$٪	گروههای آزمایشی	آزمون
۳۵/۸۲۰	۳۶/۵۳۰	۰/۰۶۴	۰/۱۱۳	۰/۲۵۳	۳۶/۱۸۸	بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد	آزمون شماره یک
۴۰/۷۰۰	۴۴/۸۰۰	۲/۴۰۵	۰/۶۹۴	۱/۵۵۱	۴۲/۲۰۰	بی‌سولفیت سدیم ۰/۴ درصد	۴°C، ۱۲ ساعت
۳۶/۹۰۰	۳۹/۴۰۰	۱/۲۸۲	۰/۵۰۶	۱/۱۳۲	۳۸/۱۸۰	بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد	آزمون شماره دو
۴۳/۹۰۰	۳۶/۴۰۰	۱/۱۰۲	۰/۴۶۹	۱/۰۵۰	۴۵/۴۲۰	بی‌سولفیت سدیم ۰/۴ درصد	۴°C، ۲۴ ساعت
۵۸/۴۰۰	۶۰/۱۰۰	۰/۶۶۲	۰/۳۶۴	۰/۸۱۴	۵۹/۱۲۰	بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد	آزمون شماره سه
۵۹/۴۰۰	۶۳/۸۰۰	۳/۲۸۰	۰/۷۱۰	۱/۸۱۱	۶۱/۳۰۰	بی‌سولفیت سدیم ۰/۴ درصد	۶۵°C، ۰/۵ ساعت

جدول شماره ۲ - آزمون ماتریس مقایسهٔ کاهش میزان آفلاتوکسین M_1 بوسیلهٔ بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ و ۰/۴ درصد

گروهها	میانگین کاهش سم AFM$_1$ ٪	متغیر	آزمون
۱*	۳۶/۱۸۸		آزمون ۱ (۴°C، ۱۲ ساعت)
۲**	۳۸/۱۸۰	بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد	آزمون ۲ (۴°C، ۲۴ ساعت)
۳***	۵۹/۱۲۰		آزمون ۳ (۶۵°C، ۳۰ دقیقه)
۱*	۴۲/۲۰۰		آزمون ۱ (۴°C، ۱۲ ساعت)
۲**	۴۵/۴۲۰	بی‌سولفیت سدیم ۰/۴ درصد	آزمون ۲ (۴°C، ۲۴ ساعت)
۳***	۶۱/۳۰۰		آزمون ۳ (۶۵°C، ۳۰ دقیقه)

جدول شماره ۳ - آزمون t برای برابری میانگین‌های کاهش میزان آفلاتوکسین M_1 بوسیلهٔ بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ و ۰/۴ درصد به تفکیک درصد ماده افزودنی

برآورد فاصله‌ای با ۹۵٪ اطمینان	خطای استاندارد متفاوت میانگین‌ها	درجه آزادی	t محاسبه شده	متغیر	آزمون
۴۷/۲۸۹ و ۳۵/۸۶۳	۲/۷۸۸	۲۸	۱۴/۹۱	بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد	آزمون یک (۴°C، ۱۲ ساعت) آزمون دو (۴°C، ۲۲ ساعت)
۵۱۳۷۴ و ۴۲/۰۶۶	۲/۲۷۱	۲۸	۲۰/۵۷	بی‌سولفیت سدیم ۰/۴ درصد	آزمون سه (۶۵°C، نیم ساعت)

$P<$ ۰/۰۵ و ۰/۰۵ = میزان خطا

جدول شماره ۴ - آزمون t برای برابری میانگین‌های کاهش میزان آفلاتوکسین M_1 بوسیلهٔ بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ و ۰/۴ درصد به تفکیک نوع آزمون

برآورد فاصله‌ای با ۹۵٪ اطمینان	خطای استاندارد تفاوت میانگین‌ها	درجه‌آزادی	t محاسبه شده	متغیر	آزمون
۳۴/۱۰۴و۳۲/۵۹۲	۰/۳۲۸	۸	۱۰۱/۷۷	بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد	آزمون یک (۴°c، ۱۲ ساعت)
۴۱/۱۱۰و۳۷/۶۱۰	۰/۷۵۹	۸	۵۱/۸۸	بی‌سولفیت سدیم ۰/۴ درصد	
۳۷/۰۶۰و۳۳/۷۴۰	۰/۷۲۰	۸	۴۹/۲۰	بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد	آزمون دو (۴°c، ۲۴ ساعت)
۴۴/۲۴۱و۴۱/۰۳۹	۰/۶۹۴	۸	۶۱/۴۳۰	بی‌سولفیت سدیم ۰/۴ درصد	
۵۷/۲۲۴و۵۴/۷۳۶	۰/۵۳۹	۸	۱۰۳/۷۷	بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد	آزمون سه (۶۵۰، نیم ساعت)
۶۰/۲۴۲و۵۶/۰۷۸	۰/۹۰۳	۸	۶۴/۴۴	بی‌سولفیت سدیم ۰/۴ درصد	

$P<$ ۰/۰۵ و ۰/۰۵ = میزان خطا

یک از گروههای آزمایش با گروه شاهد و گروههای آزمایش در سه آزمون مختلف کوچکتر از میزان خطاست لذا فرضیهٔ برابری میانگین کاهش AFM توسط هر یک از روش‌های تیمار (بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ و ۰/۴ درصد) در سه آزمون مختلف رد می‌شود (جداول شماره ۳ و ۴).

توضیح اینکه با ۹۵ درصد اطمینان می‌توان اظهار داشت که کمترین میانگین کاهش سم در یکی از گروههای آزمایشی با بقیه تفاوت معنی‌دار دارد. به همین دلیل جهت تعیین رتبهٔ گروههایی که سبب رد فرضیه H شده‌اند از آزمون HSD استفاده شده است که براساس این آزمون ماتریس مقایسه گروه‌ها تشکیل می‌شود (جدول شماره ۲).

بنابراین با ۹۵ درصد اطمینان می‌توان میزان کاهش آفلاتوکسین M_1 بوسیله بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ و ۰/۴ درصد را در هر یک از گروه‌های آزمایشی در سه آزمون مختلف بصورت زیر اولویت‌بندی نمود:

۱- رتبه اول: گروه سوم بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد و ۰/۴ درصد (۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه)

۲- رتبه دوم: گروه دوم بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد و ۰/۴ درصد (۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت)

۳- رتبه سوم: گروه اول بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد و ۰/۴ درصد (۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت)

لازم به ذکر است که میانگین سم آفلاتوکسین M_1 در گروه شاهد آزمون اول (۱۲ ساعت و ۴ درجه سانتی‌گراد) ۲/۸۴ درصد، آزمون دوم (۲۴ ساعت و ۴ درجه سانتی‌گراد) ۲/۷۸ درصد و آزمون سوم (۰/۵ ساعت و ۶۵ درجه سانتی‌گراد) ۳/۱۴ درصد بوده است. ضمن اینکه درصدهای کاهش سم که به وسیله بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ و ۰/۴ درصد ذکر شده پس از منظور نمودن کاهش درصد سم در گروه‌های شاهد و درصدی که مربوط به دقت بازیافت روش بود محاسبه و اعلام گردیده است.

بحث

با توجه به وجود گزارشات متعدد محققین در بیشتر کشورهایی که دارای صنعت دامداری پیشرفته هستند، جهت تعیین وضعیت آلودگی شیر و فرآورده‌های آن به آفلاتوکسین M_1 تحقیقاتی را انجام داده‌اند. کشور ما نیز از این قاعده مستثنی نمی‌باشد. نتایج بدست آمده از تحقیقات انجام شده در کشور معلوم نمود که درصد بالائی از شیرهای تولیدی آلودگی به افلاتوکسین M_1 داشته ضمن اینکه در موارد متعددی میزان آلودگی شیر بالاتر از حد استانداردهای کشورهای جامعهٔ مشترک اروپا که ۵۰-۱۰ نانوگرم در لیتر می‌باشد بوده است (۱، ۲ و ۳).

لذا جهت حل این مشکل که کستردگی جهانی نیز دارد لازمست اقدامات مؤثری صورت پذیرد، ولی علی‌رغم تلاش‌های فراوانی که در زمینه آفلاتوکسین زدائی نیز صورت گرفته است تاکنون روش موثر و کاملی در این مورد ارائه نگردیده است.

تلاش محققین براین بوده است که با بکارگیری انواع روش‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی به مبارزه با این سم قارچی سرطان‌زا رفته و آن را از شیر که یک ماده غذایی با ارزش است حذف نمایند و یا میزان آنرا در حد قابل قبول و استاندارد پایین آورند.

از میان مواد نگاهدارنده برای کاهش میزان آفلاتوکسین M_1 در شیر می‌توان به بی‌سولفیت‌ها و سولفیت‌ها اشاره نمود. سولفیت‌ها و بی‌سولفیت‌ها جزو مواد افزودنی چند منظوره هستند که به مواد غذایی مختلف اضافه می‌گردند. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که سولفیت‌ها می‌توانند میزان آفلاتوکسین M_1 را در محلول بافر یا آرد ذرت پایین بیاورند (۱۱، ۱۲ و ۱۷).

در مطالعهٔ حاضر از دو غلظت ۰/۲ درصد و ۰/۴ درصد بی‌سولفیت سدیم استفاده گردید. نمونه‌های مورد آزمایش نیز به ترتیب در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. براساس نتایج بدست آمده میزان کاهش سم در نمونه‌هایی که به آنها بی‌سولفیت سدیم ۰/۲ درصد اضافه شده و در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شده بودند ۳۶/۱۸۸ درصد بود در حالیکه در نمونه‌هایی که در همان درجه حرارت ولی مدت زمان بیشتری (۲۴ ساعت) نگهداری شده بودند میزان کاهش سم آفلاتوکسین M_1 بیشتر و به طور میانگین ۳۸/۱۸۰ درصد بوده است. و در شرایط ۶۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳۰ دقیقه میانگین کاهش سم به ۵۹/۱۲۰ درصد رسید. از طرف دیگر زمانیکه غلظت بی‌سولفیت سدیم مورد استفاده به دو برابر (۰/۴ درصد) رسید میزان کاهش سم نیز بصورت قابل توجهی افزایش یافت و بترتیب به ۴۲/۲۰۰، ۴۵/۴۲۰ و بالاخره ۶۱/۳۰ درصد در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۲ ساعت، ۴ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲۴ ساعت و ۶۵ درجه سانتی‌گراد و زمان نیم‌ساعت رسید که با مطالعات Applebaum and Marth در سال ۱۹۸۲ هماهنگی دارد (۶).

نتایج بدست آمده از مطالعهٔ انجام شده نشان دهندهٔ اثر کاهش مؤثر این ماده نگهدارنده روی میزان آفلاتوکسین M_1 شیر است. با توجه به اینکه پاستوریزاسیون تأثیر چندانی روی آفلاتوکسین M_1 ندارد (۳۵). بنظر می‌رسد که استفاده از بی‌سولفیت سدیم به عنوان یک ماده نگاهدارندهٔ مجاز در کاهش میزان آفلاتوکسین M_1 مفید باشد، ضمن اینکه شرایط و زمان نگهداری شیر در این مطالعه، آن چیزی بوده که

بطور روزمره و متداول در کارخانجات شیر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

از آنجائی که مهم‌ترین منشاء آفلاتوکسین M_1 در شیر آلودگی جیره غذایی حیوان شیرده به انواع افلاتوکسین‌ها مخصوصاً آفلاتوکسین M_1 است که این آفلاتوکسین در اثر هیدروکسیلاسیون در بدن حیوان به آفلاتوکسین M_1 تبدیل می‌شود که عمدتاً از طریق شیر و ادرار دفع می‌شود. با توجه به عوارض نامطلوب آفلاتوکسین M_1 در انسان لزوم پاکسازی شیر از این ماده سمی و خطرناک تأکید می‌گردد ولی بعلت مشکلات عدیده‌ای که در ارتباط با سم زدایی شیر وجود دارد بنظر می‌رسد که توجه به مسائل مذکور در زیر می‌تواند ما را در جهت مبارزه با این سم قارچی و در نتیجه ارتقاء سطحی کیفی و بهداشتی شیر و فرآورده‌های آن یاری دهد.

۱- تلاش در جهت هماهنگ کردن مقررات مربوط به حدود مجاز آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی مورد مصرف دام، نیز عدم استفاده از ضایعات نانی کپک زده در جیرهٔ غذایی دامهای شیری.

۲- برنامه‌های مراقبتی بصورت منظم و مداوم در جهت رعایت مقررات مربوطه به حدود مجاز آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی مورد مصرف انسان و دام.

۳- منظم و متمرکز بودن برنامه‌های مراقبتی از شیر و فرآورده‌های آن در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری.

۴- استفاده از روش‌هایی که سبب از بین بردن قارچها و متابولیت‌های آنها در جیرهٔ غذایی حیوانات شیرده می‌شوند و یا از رشد قارچها و تولید آفلاتوکسین توسط آنها جلوگیری می‌نمایند.

بطورکلی میتوان با توجه به اثرات مناسب برخی از افزودنیهای مجاز غذایی نظیر بی‌سولفیت سدیم در کاهش دادن میزان آفلاتوکسین M_1 کارهای تحقیقاتی را در زمینه استفاده از این مواد متمرکز کرده و از آنها در جهت کاهش دادن میزان آفلاتوکسین M_1 در شیرهایی که میزان آلودگی آنها بالاتر از حد مجاز است استفاده نمود. ضمن اینکه با توجه به درصد بالای آلودگی شیرهای تولیدی در داخل کشور به آفلاتوکسین M_1 لزوم تهیه و تدوین استاندارد در مورد میزان انواع آفلاتوکسین‌ها در انواع مواد غذایی منجمله آفلاتوکسین M_1 در شیر و فرآورده‌های آن کاملاً احساس می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب حوزهٔ معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و با پشتیبانی آن معاونت محترم انجام گرفته است. نویسندگان مقاله وظیفه خود می‌دانند که از کمک‌های مالی و معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران سپاسگزاری نمایند. همچنین از همکاری صمیمانه بخش سم‌شناسی اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی بویژه آقای مهندس پرویز تشکر می‌گردد.

پاورقی

1- International Dairy Federation

منابع مورد استفاده

۱- پروانه، ویدا؛ شاهین، محمود؛ کریم، گیتی و کردی، جلال، ۱۳۶۰. بررسی آلودگی پنیر سفید به آفلاتوکسین. مجلّه بهداشت ایران شماره ۱۰، ۴-۱.

۲- خراسانی، اکبر، ۱۳۷۵. بررسی میزان آلودگی آفلاتوکسین M_1 در شیرهای تحویلی به کارخانه شیر پاستوریزه تهران با استفاده از روش الایزا. پایان‌نامه دکترای دامپزشکی دانشکده دامپزشکی - دانشگاه تهران، ۹۹-۸۸.

۳- کریم، گیتی؛ پروانه، ویدا و کردی، جلال، ۱۳۶۰. بررسی آلودگی شیر خام به آفلاتوکسینها در منطقه تهران. مجله بهداشت ایران شماره ۱۰، ۴-۱.

4- Aman I.M., 1995. Stability of aflatoxin M1 in milk samples. J. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., Vol. 17, No. 5-6, pp: 161-163.

5- Applebaum, R.S. and Marth, E.H., 1982a. Fate of aflatoxin M_1 in cottage cheese. J. Food Prot. 45: 752-777.

6- Applebaum R.S., Brachett R.E., Wiseman D.W. and Marth E.H., 1982. Aflatoxins: Toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products. J. Food Prot. 45: 752-777.

7- Buller R.A. and Schroeder H.W., 1974. Influence of *Aspergillus condidus* on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*. Phytopathology 64, 121.

8- Davies N.D. and Diener U.L., 1968. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon sources. Appl. Microbiol. 16: 158.

9- Destro O. and Gelosa L., 1986. Termoresistenza della aflatossina M_1 nel latte. Ind. Alim. 25: 979-980.

10- Diener U.L. and Davis N.D., 1969. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. pp: 13-54. In L.A. Goldblatt (ed.) Aflatoxin. Academic Press, New York.

10- Doyle M.P. and Marth E.H., 1978. Bisulfite degrades aflatoxin: Effect of citric acid and methanol and possible mechanism of degradation. J. Food Prot. 41, 891-6.

11- Doyle M.P. and Marth E.H., 1978. Bisulfite degrades aflatoxin: Effect of temperature and concentration of bisulfite. J. Food Prot., 41, 774-80.

12- Ellis W.O., Smith J.P., Simpson B.K. and Oldman J.H., 1991. Aflatoxins in food; occurrence, biosynthesis effects on organisms, detection and method of control. Critical Review in Food and Nut. 30(3), 403.

13- Finoli C., Vecchio A., Bellavita M. and Cerruti G., 1983. Sulla presenza di aflatossina M_1 in latte derivati. Latte 8: 611-625.

14- Hanssen E., 1968. Results of the investigation of the occurrence of aflatoxin B1 in several foodstuffs. Mitt. GDCH Fachgruppe, Lebensmitl Chem. Gerichtl. Chem. 22: 83-88.

15- International Dairy Federation (IDF), 1991. Milk and dried milk. Determination of aflatoxin M_1 content. International IDF standard: 111 A: 1991. IDF, Saure vergote 41, B - 1040.

16- Joslyn M.A. and Braverman J.D.S., 1954. The chemistry and technology of the pretreatment and preservation of fruit and vegetable products with sulfur dioxide and sulfites. Adv. Food Res., 5, 97-160.

17- Karunaratne A. and Bullerman L.B., 1990. Interactive effects of spore load and temperature on aflatoxin production. J. Food. Prot. 53: 227.

18- Kiermeier F. and Ziener E., 1975. Effect of pimaricin on moulds and their aflatoxin formation in cheese. Z. Lebensm. Unters Forsch. 157: 253-262.

19- Kulik M.M. and Holaday C.E., 1966. Aflatoxin: A metabolic product of several fungi, Mycopathol. Mycol. Appl. 30: 137-140.

20- Mitchell E.M., 1996. Survey of aflatoxin M_1 in milk powder. Food Safety Northern, Ireland, Surveillance Bulletin, No. 6, 6pp.

21- Moerck K.E., McElfresh P., Wohlman, A. and Hilton B.W., 1980. Aflatoxin destruction in corn using sodium bisulfite, sodium hydroxide, and aqueous ammonia. J. Food Prot. 45, 571-4.

22- Ruiz J.A., Bentabol A., Gallego C., Angulo R., Acosta L. and Jodral M., 1996. Aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* in the mould flora of the different green house substrates for the cultivation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). J. Food Microbiol., 29, 193-199.

23- Schroeder H.W. and Verret M.J., 1969. Production of aflatoxin by *Aspergillus wentii* Wehmer. Can. J. Microbiol. 15: 895-898.

24- Shih C.N. and Marth E.H., 1972. Production of aflatoxin in a medium fortified with sodium chloride. J. Dairy Sci. 55: 1415-1419.

25- Stoloff L., Trucksess M., Hardin N., Francis O.J., Hayes J.R., Polan C.E. and Campbell T.C., 1975. Stability of aflatoxin in M_1 milk. J. Dairy Sci. 1789-1793.

26- Taabat S.S., Kaminura H., Ibe A., Hashimoto H., Lida M., Tamura Y. and Nishima T., 1993. Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokyo: 1986- 1990. 1993. J. AOAC Int 76: 32-35.

27- Van Egmond H.P., 1989. Significance of mycotoxin in dairy production. publ. by: Elsevier London, IS BN 1-85 166-369-X, pp: 15.

28- Van Egmond H.P., Paulsch W.E., Veringa H.A. and Schuller P.L., 1977. The effect of processing on the aflatoxin M_1 content of milk and milk products. Arch. Inst. Posteur. Tunis 54: 381-390.

29- Wiseman D.W. and Marth E.H., 1983. Heat and acid stability of aflatoxin M_1 in M1M naturally and artificially contaminated milk, Milchwissenschaft 38: 464-466.