Journal of Food Hygiene, Vol. 9, No. 35 Autumn 2019

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2019.669310**

Effect of season and farming system on aflatoxin M_1 content and raw milk quality

Jalili, M.[1*], Kiani, F.[2]

1. Associated Professor, Department of Food, Faculty of Food Industries and Agriculture, Standard Research Institute (SRI), Iranian National Standard Organization, Karaj, Iran
2. Quality Control Manager, Kimia Laban Factory, Khorramabad, Iran
[*]Corresponding Author: Jalili@standard.ac.ir
(Received: 209/4/14 Accepted: 2019/9/22)

Abstract

The quality of raw milk plays an important role in the quality of dairy products. The current study was aimed to investigate the effect of season and farming system on aflatoxin M_1 content and raw milk quality. For this reason, 600 samples were collected from 5 industrial farms and 5 milk collection centers of Khorramabad city during the summer and winter of 2017 (300 samples in each season). The contamination level of aflatoxin M_1 was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) in 40 samples (4 samples from each farm). All samples were investigated in terms of acidity, density, protein, water percent, protein, fat and total bacterial count. The results showed the aflatoxin M_1 in 5 samples (12.5%), was higher than the permitted level of National Standard (50 ng / ml). The amount of fat, protein, and density of samples collected in the winter was higher than those collected in the summer ($P< 0.05$). There was no significant difference between the aflatoxin M_1 level in milk samples of industrial farms and milk collection centers. Moreover, the total bacterial count of 93% and 100% of the samples collected during summer and winter has exceeded the permissible limit specified in the National Standard, respectively, It could be concluded that in order to reduce the microbial load of raw milk, appropriate methods should be applied and the livestock breeders should be provided with the necessary training on how to milk and feed the animal. Moreover, the raw milk delivered to dairy factories should also be considered for aflatoxin M_1.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Aflatoxin M_1, raw milk, chemical characteristics, microbial characteristics, livestock

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2019.669310

بررسی اثر فصل و نوع دامداری بر مقدار آفلاتوکسین M_1 و کیفیت شیر خام

مریم جلیلی[۱*]، فلور کیانی[۲]

۱. استادیار، گروه مواد غذایی، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، سازمان ملی استاندارد، کرج، ایران
۲. کارشناس صنایع غذایی، مدیر کنترل کیفیت کارخانه کیمیا لبن، خرم‌آباد، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: Jalili@standard.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۸/۱/۲۵ پذیرش نهایی: ۹۸/۶/۳۱)

چکیده

کیفیت شیر خام بر کیفیت فرآورده‌های آن تأثیر دارد. هدف این مطالعه بررسی در این بررسی تعداد ۶۰۰ نمونه شیر خام از ۵ دامداری صنعتی و ۵ مرکز جمع‌آوری شیر (در طی دو فصل تابستان و زمستان) در شهرستان خرم‌آباد در سال ۱۳۹۶ آباد تهیه شد. مقدار آفلاتوکسین M_1 با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) در ۴۰ نمونه (از هر دامداری در هر فصل دو نمونه) اندازه‌گیری گردید. همه نمونه‌ها ازنظر آزمون‌های اسیدیته، دانسیته، پروتئین، درصد آب، پروتئین، چربی و شمارش کلی میکروبی ارزیابی شدند. نتایج نشان داد مقدار آفلاتوکسین M_1 در شیرهای فصل زمستان اندکی بالاتر از فصل تابستان بود گرچه این اختلاف معنی‌دار نبود. از بین ۴۰ نمونه موردبررسی، در ۵ نمونه (۱۲/۵ درصد) آفلاتوکسین M_1 از حد مجاز تعیین شده در استاندارد ملی ایران (۵۰ ng/ml) بالاتر بود. مقدار چربی، پروتئین و دانسیته در نمونه‌های شیر فصل زمستان بیشتر از فصل تابستان بود ($P<0/05$)، اما اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های شیر دامداری‌های صنعتی و مراکز جمع‌آوری شیر وجود نداشت. تعداد ۹۳ درصد نمونه‌ها در فصل زمستان و ۱۰۰ درصد نمونه‌ها در فصل تابستان، آلودگی بیش‌ازحد مجاز تعیین شده در استاندارد ملی داشتند. با توجه به نتایج این بررسی، برای کاهش بار میکروبی شیر خام باید روش‌های مناسبی به‌کار گرفته شده و به دامداران آموزش‌های لازم در خصوص نحوه دوشش و نوع تغذیه دام ارائه شود و علاوه بر آن نمونه‌های شیر حتماً باید ازنظر مقدار آفلاتوکسین M_1 نیز موردبررسی قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین M_1، شیر خام، ویژگی‌های شیمیایی، ویژگی‌های میکروبی، دامداری

مقدمه

شیر یکی از مواد غذایی، با خواص و ارزش تغذیه‌ای قابل‌ملاحظه است که برای تمامی گروه‌های سنی از کودکی تا کهن‌سالی مناسب بوده و از سوی دیگر محیط مساعدی برای رشد انواع میکروارگانیسم‌ها محسوب می‌شود (Kędzierska-Matysek *et al.*, 2011). شیر حاوی ترکیبات غذایی متفاوتی است که از آن جمله می‌توان به چربی، پروتئین، لاکتوز، کلسیم، آهن، پتاسیم و ویتامین‌های آ، ث و گروه ب اشاره نمود (Medhammar *et al.*, 2012). تغییرات فصلی بر کیفیت شیر و فرآورده‌های آن اثر می‌گذارد و کیفیت شیر نیز به‌نوبه خود تحت تأثیر عوامل مختلفی ازجمله آب‌وهوا، نژاد، سن دام، مرحله شیردهی، رژیم غذایی دام و نوع سیستم دامداری قرار داد (Jensen *et al.*, 2002). نژاد دام و سیستم‌های دامداری نیز عوامل دیگری هستند که سبب ایجاد تغییر در ترکیبات شیر در کشورهای مختلف و یا حتی مناطق مختلف در یک کشور می‌شوند (Schönfeldt *et al.*, 2012). کیفیت فرآورده حاصل از شیر خام که به‌دست مصرف‌کننده می‌رسد، بسیار وابسته به کیفیت شیر خام است. از سوی دیگر تغییر در ترکیبات شیر برای دامداران ازنظر اقتصادی اهمیت دارد، چراکه قیمت‌گذاری شیر بر اساس برخی ترکیبات آن ازجمله چربی انجام می‌شود. (Auldist *et al.*, 2002). چربی و پروتئین شیر بیش از سایر ترکیبات شیر تحت تأثیر تغییرات رژیم غذایی دام قرار می‌گیرند (Looper, 1994). تغییرات فصلی بر روی تغذیه قابل‌دسترس دام اثر می‌گذارد و ارتباط قابل‌توجهی بین فصل و راندمان شیر و مقدار ترکیبات آن وجود دارد (Quist *et al.*, 2008). علاوه بر آن، برخی دامداری‌ها و یا تولیدکنندگان نیز با اهدافی مانند پوشاندن عیوب شیر، دستیابی به سود بیشتر و غیره به تقلباتی دست‌زده و سبب بروز تغییر در ترکیبات شیر می‌شوند. به همین دلیل نهادهای ملی و بین‌المللی استانداردسازی اقدام به تدوین استانداردهایی برای ویژگی‌های شیر خام نموده‌اند که حدود اجزاء و ترکیبات شیر (مانند چربی، پروتئین، رطوبت، دانسیته، pH و ...) را تعیین می‌نمایند. یکی دیگر از عوامل بسیار مهم در کیفیت شیر، میکروارگانیسم‌ها هستند که ممکن است از منابع متعددی مانند هوا، تجهیزات شیردوشی، خاک، دست کارگر و غیره حاصل شوند (Kędzierska-Matysek *et al.*, 2011). بار میکروبی و نوع میکروارگانیسم‌هایی که بلافاصله پس از دوشش شیر سبب آلودگی آن می‌شوند بستگی به عواملی مانند تمیزی تجهیزات، فصل، دمای محیط، انبارداری، سلامت و بهداشت کارکنان، بهداشت و نظافت دام دارد که همه این عوامل نیز وابسته به مدیریت و سیستم دامداری هستند. بنابراین در یک‌فصل سال، شیر تولیدی یک دامداری می‌تواند ازنظر بار میکروبی با شیر دامداری دیگر در همان منطقه متفاوت باشد (Lues *et al.*, 2010). ازجمله سایر آلودگی‌های غیر مطلوب و نامناسب می‌توان به آفلاتوکسین‌ها اشاره نمود. آفلاتوکسین‌ها مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه قارچی هستند که از بین آن‌ها، چهار نوع B_1، B_2، G_1 و G_2 در مواد غذایی با منشأ گیاهی تشکیل می‌شوند. خطرناک‌ترین آن‌ها نوع B_1 است که خاصیت سرطان‌زایی و جهش‌زایی آن به اثبات رسیده است. اگر غذای دام به آفلاتوکسین B_1 آلوده باشد، این سم در بدن حیوان تبدیل به متابولیت‌های دیگری ازجمله آفلاتوکسین M_1 شده و از طریق شیر دام وارد بدن انسان

می‌شود. سمیت حاد M_1 و تأثیر آن در ممانعت از رونویسی و سنتز پروتئین‌ها درست به اندازه B_1 است اما قدرت سرطان‌زایی آن از B_1 کمتر و قدرت جهش‌زایی آن تا حدی مشابه B_1 است. این سم معمولاً نسبت به فرآیندهای دمایی مانند پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون مقاوم است (Jalili and Scotter, 2015).

هدف از این بررسی تعیین اثر فصل (زمستان و تابستان) و نوع دام‌داری (صنعتی و مرکز جمع‌آوری شیر) بر مقدار آفلاتوکسین M_1، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی (چربی، پروتئین، رطوبت، دانسیته، pH) و بار میکروبی (شمارش کلی) در شیر خام تولیدی در شهرستان خرم‌آباد است.

مواد و روش‌ها

- تهیه نمونه

نمونه‌های موردبررسی از شیر خام خریداری شده توسط کارخانه کیمیا لبن در شهرستان خرم‌آباد و در طی دو فصل تابستان و زمستان به‌دست آمد. در ابتدا شیر تعدادی از دامداری‌ها که آزمون افزودنی‌ها و یا تست الکل در مورد آن‌ها مثبت بود به این معنی که کیفیت شیر آن‌ها نامناسب تشخیص داده شده عودت داده شد و دامداری مذکور نیز از این بررسی حذف گردید. درنهایت، این بررسی روی ۱۰ دام‌داری مختلف انجام شد که شامل ۵ دام‌داری صنعتی و ۵ مرکز جمع‌آوری شیر بودند. شیر هرروز از دامداری‌های موردبررسی خریداری می‌شد اما هر دو تا سه روز یک‌بار نمونه آن برای آزمون به آزمایشگاه منتقل می‌شد. در طی این بررسی تعداد ۳۰۰ نمونه شیر خام در طی فصل تابستان و ۳۰۰ نمونه نیز در طی فصل زمستان ازنظر آزمون‌های اسیدیته، دانسیته، پروتئین، درصد آب، پروتئین، چربی و شمارش کلی میکروبی و آفلاتوکسین M_1 ارزیابی شدند. ویژگی‌های میکروبی تمامی نمونه‌ها با استاندارد ملی ۲۴۰۶ مقایسه شد. در هر دامداری چهار نمونه شیر (هر فصل دو نمونه) و در کل در ۴۰ نمونه شیر مقدار آفلاتوکسین M_1 اندازه‌گیری شد.

- اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1

اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌های شیر خام بر اساس روش ارائه شده در استاندارد ملی ایران و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع (Waters 600, USA) فاز معکوس انجام شد (ISIRI. 7133/ 2016). به‌طور خلاصه، ۵۰ گرم از نمونه شیر وزن و ۱۰۰ میلی‌لیتر مخلوط متانول (Merck, Germany) و آب و ۱۰۰ میلی‌لیتر هگزان نرمال (Sigma-Aldrich, Germany) به آن اضافه و از کاغذ صافی واتمن (Dassel, Germany) شماره ۱۳ عبور داده شد. محلول صاف شده از ستون ایمونوافینیتی (VICAM, USA) عبور داده شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد. دستگاه HPLC مجهز به شناساگر فلورسنس (Waters 2475, Milford, MA, USA) با طول‌موج تحریک ۳۶۰ نانومتر و نشر ۴۴۰ نانومتر بود. ستون کروماتوگرافی از نوع ODS Spherisorb به ابعاد (Waters, USA) ۲۵۰ × ۴/۶ mm و فاز متحرک شامل مخلوط یک حجم استونیتریل، یک حجم متانول و سه حجم آب بود که با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه از ستون عبور داده شد. درنهایت سطح زیر پیک با منحنی استاندارد مقایسه و غلظت آفلاتوکسین در نمونه تعیین شد.

- معتبر سازی روش اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1

برای تعیین خطی بودن روش، یک منحنی استاندارد ٦ نقطه‌ای (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۵ ng/ml) رسم و مقدار R^2 آن اندازه‌گیری شد. به‌منظور اطمینان از درستی روش، مقدار بازیافت در دو غلظت مختلف در شیر اندازه‌گیری شد. ابتدا به دو نمونه شیر مقدار مشخصی از آفلاتوکسین M_1 (Supelco, USA) اضافه شد به‌طوری‌که غلظت آن در نمونه‌ها به ۲۵ و ۷۵ نانوگرم در میلی‌لیتر رسید. سپس آفلاتوکسین به روش فوق استخراج و به دستگاه تزریق شد. مقدار بازیافت با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازیافت} = \frac{\text{میزان به دست آمده}}{\text{میزان قابل انتظار}} * ۱۰۰$$

- اندازه‌گیری ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی

اندازه‌گیری اسیدیته قابل تیتر برحسب درجه دورنیک با روش تیتراسیون با سود انجام شد. مقدار چربی شیر خام به روش ژربر (برحسب گرم چربی در ۱۰۰ گرم شیر) و مقدار پروتئین به‌روش ماکروکلدال و وزن مخصوص یا دانسیته شیر خام در دمای ۱۵ درجه سلسیوس با استفاده از دانسیتومتر انجام شد. برای آزمون الکل از الکل ٦٨ درجه (وزنی/وزنی) استفاده شد که شیر می‌بایست پایدار بوده و لخته تشکیل نمی‌داد. تعیین شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها نیز به‌روش شمارش پرگنه‌های ایجاد شده میکروارگانیسم بر روی محیط پلیت کانت آگار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انجام شد. درصد آب از طریق اندازه‌گیری نقطه انجماد و به روش ترمیستورکریوسکوپ تعیین شد. کلیه آزمون‌های شیمیایی و میکروبی بر اساس استانداردهای ملی ایران (ISIRI. 164/ 2017; ISIRI. 2406/ 2017) انجام شد.

- ارزیابی آماری

نتایج آزمون‌ها جمع‌آوری و به‌منظور بررسی اثر دو متغیر مستقل شامل نوع دام‌داری در دو سطح (مرکز جمع‌آوری شیر و دامداری صنعتی) و فصل دوشش دام در دو سطح (تابستان و زمستان) بر روی متغیرهای وابسته شامل مقدار آفلاتوکسین M_1، ویژگی‌های شیمیایی (اسیدیته، دانسیته، پروتئین، درصد آب، پروتئین، چربی) و شمارش کلی بار میکروبی) از روش آنالیز و واریانس (ANOVA) و آزمون توکی با حدود اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. آزمون توصیفی برای تعیین میانگین، انحراف از استاندارد، حداقل و حداکثر نمونه‌ها انجام شد. برای بررسی ارتباط بین بار میکروبی و ویژگی‌هایی مانند اسیدیته و مقدار پروتئین، از روش‌های رگرسیون خطی، تحلیل همبستگی و محاسبه ضریب همبستگی استفاده شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۷ انجام شد.

یافته‌ها

ضریب همبستگی (R^2) در منحنی کالیبراسیون که برای اندازه‌گیری M_1 رسم شده بود، ۰/۹۹۳ بود و مقدار بازیافت نمونه برای دو غلظت ۲۵ و ۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۱/۵±۸۱/۷ و ۲/۱±۸۵/۷ درصد به‌دست آمد. نتایج اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1 در ٤٠ نمونه شیر خام موردبررسی در جدول (۱) نشان داده شده است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری آفلاتوکسین

در ٤٠ نمونه در جدول (۱) نشان داده شده است. مقدار M_1 در شیرهای فصل زمستان اندکی بالاتر از فصل تابستان بود گرچه این اختلاف معنی‌دار نبود. از بین ٤٠ نمونه موردبررسی، در ۵ نمونه (۱۲/۵ درصد) مقدار M_1 از حد مجاز تعیین شده در استاندارد ملی ایران (۵۰ng/ml) بالاتر بود.

جدول (۱)- آفلاتوکسین M_1 در ٤٠ نمونه شیر خام تهیه شده از دامداری‌های صنعتی و مراکز جمع‌آوری شیر، در دو فصل تابستان و زمستان

فصل - دامداری	تعداد نمونه	آفلاتوکسین M_1 (ng/g)			
		تعداد (درصد) نمونه مثبت	میانگین ± انحراف معیار	دامنه	آلودگی بیشتر از ۵۰ (درصد)
تابستان- صنعتی	۱۰	(٤٠) ٤	۱٤/۸ ±۱۹/۷	nd - ٤٤	۰
زمستان- صنعتی	۱۰	(۵۰) ۵	۱٦/۲±۱۸/۹	nd -۵۳	(۱۰) ۱
تابستان- مرکز جمع‌آوری	۱۰	(٦۰) ٦	۲٦/۳±۲۵/۹	nd-٦۸	(۲۰) ۲
زمستان- مرکز جمع‌آوری	۱۰	(٦۰) ٦	۳٤±۲۳/۵	nd - ٦۰	(۲۰) ۲
جمع کل	٤۰	(۵۲/۵) ۲۱	۲۰/۳±۲۱/۹	nd-٦۸	(۱۲/۵) ۵

nd= غیرقابل تشخیص

میانگین، انحراف از استاندارد، حداقل، حداکثر و میانه مقادیر مربوط به فاکتورهای شیمیایی اندازه‌گیری شده (چربی، پروتئین، اسیدیته، دانسیته، آب اضافه شده) و ویژگی‌های میکروبی (شمارش کلی) که برای ٦۰۰ نمونه شیر خام جمع‌آوری شده در دو فصل تابستان و زمستان و در دو نوع دامداری صنعتی و مراکز جمع‌آوری شیر به‌دست آمد، در جدول (۲) نشان داده شده است. چنان‌که مشاهده می‌شود مقدار چربی در ٦۰۰ نمونه موردبررسی از ۲ تا ٤ درصد متغیر بود. اختلاف معنی‌داری بین مقدار چربی نمونه‌های شیر به‌دست آمده از مراکز جمع‌آوری شیر و دامداری‌های صنعتی معنی‌دار نبود. گرچه اثر فصل بر روی مقدار چربی معنی‌دار نشان داده شد ($P<۰/۰۵$) و نمونه‌های فصل زمستان دارای چربی بیشتری بودند. درمجموع از بین ٦۰۰ نمونه، در ۳۱۰ نمونه (۵۱/۷ درصد) مقدار چربی از حداقل تعیین شده در استاندارد ملی ایران (۳/۲ درصد) کم‌تر بود و بیشترین تعداد آن‌ها در فصل تابستان از دامداری صنعتی دریافت شده بود (جدول ۲).

مقدار پروتئین در نمونه‌ها از ۲/۹۳ ±۰/۲۹ (نمونه‌های به‌دست آمده از مراکز جمع‌آوری شیر و در فصل تابستان) تا ۳/۱٤ ±۰/۲۳ (نمونه‌های مراکز جمع‌آوری شیر و در فصل زمستان) متغیر بود. در مورد پروتئین نیز مانند چربی، اثر فصل معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بود و نمونه‌های جمع‌آوری شده در فصل زمستان دارای پروتئین بیشتری نسبت به فصل تابستان بودند درحالی‌که اثر نوع دامداری معنی‌دار نبود. درمجموع از بین ٦۰۰ نمونه برداشته شده، در ۱۵۷ نمونه (۲٦/۲ درصد) مقدار پروتئین از حداقل تعیین شده در استاندارد ملی (۳ درصد) کم‌تر بود. دانسیته نمونه‌های جمع‌آوری شده بین ۱/۰۲۷ تا ۱/۰۳۱۲ متغیر بود و از

بین آن‌ها ۱۱۵ نمونه (۱۹/۲ درصد) دانسیته کم‌تر از حداقل تعیین شده در استاندارد ملی (۱/۰۲۹) را دارا بودند. دانسیته هیچ‌یک از نمونه‌ها از حد استاندارد بالاتر نبود. از بین ٦۰۰ نمونه جمع‌آوری شده، به ۲٦۵ نمونه (٤٤/۲ درصد) آب اضافه شده بود که مقدار آن بین ۰/۱۲ تا ۸/۸٤ درصد متفاوت بود. بار میکروبی نمونه‌های جمع‌آوری شده در فصل تابستان بیشتر از نمونه‌های فصل زمستان بود (P<۰/۰۵). این در حالی بود که نوع دامداری اثر معنی‌داری ایجاد نکرده بود. لگاریتم بار میکروبی نمونه‌ها از ۵/۰۸ تا ٦/۹۵ در میلی‌لیتر متغیر بود که به‌ترتیب مربوط به نمونه‌های شیر به‌دست آمده از دامداری صنعتی در فصل زمستان و مرکز جمع‌آوری شیر در فصل تابستان بود.

جدول ۲- نتایج آنالیزهای آماری ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی نمونه‌های شیر خام آزمون شده در دو فصل تابستان و زمستان

دامداری	تابستان						زمستان					
	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد	بیشینه	کمینه	میانه	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد	بیشینه	کمینه	میانه
اسیدیته												
صنعتی	۱۵۰	۱٦/۵۰۳	۰/۹۵۹	۱۸/۵۰۰	۱٤/۰۰۰	۱٦/٤۵۰	۱۵۰	۱۵/۰۵۷	۰/۹٦۰	۱۸/۰۰۰	۱۳/۲۷۰	۱۵/۰۰۰
مرکز	۱۵۰	۱۷/۲۰٤	۰/۸۵۱	۱۸/٤۵۰	۱۵/۰۰۰	۱۷/٤۷۰	۱۵۰	۱۵/۰۰۷	۱/۰۱۵	۱۸/۲۱۰	۱۳/۰۰۰	۱۵/۰۰۰
چربی												
صنعتی	۱۵۰	۲/۸۹	۰/۳۳	۳/٤۰	۲/۱۰	۳/۱۰	۱۵۰	۳/۲۳	۰/۲۷	۳/۹۰	۲/۷٤	۳/۲
مرکز	۱۵۰	۲/۹۹	۰/۳۹	۳/٦۵	۲/۰۰	۳/٦۵	۱۵۰	۳/۲٤	۰/۳۲	٤/۰۰	۲/۰۰	۳/۲۵
پروتئین												
صنعتی	۱۵۰	۲/۹۸	۰/۳۳	٤/۱۰	۲/۱۹	۳/۱۱	۱۵۰	۳/۰٦	۰/٤۱	٤/۱۵	۲/۱٤	۳/۲۰
مرکز	۱۵۰	۲/۹۳	۰/۲۹	۳/۵۵	۲/۲۰	۳/۰۰	۱۵۰	۳/۱٤	۰/۲۳	۳/٦۰	۲/۱۵	۳/۱۸
دانسیته												
صنعتی	۱۵۰	۲۹/۱۹۳	۰/۵۲٦	۳۱/۰۰۰	۲۸/۰۰۰	۲۹/۰۰۰	۱۵۰	۳۰/۰۲۱	۰/٦٤۹	۳۱/۲۰۰	۲۹/۰۰۰	۳۰
مرکز	۱۵۰	۲۸/۸۲۳	۰/۷۹۲	۳۱/۰۰۰	۲۷/۰۰۰	۲۹/۰۰۰	۱۵۰	۲۹/۸۹٦	۰/۷۰۷	۳۱/۲۰۰	۲۸/۰۰۰	۳۰
آب												
صنعتی	۱۵۰	۰/۹۳۹	۱/۳٤۷	٦/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰٦۰	۱۵۰	۰/٤۵۲٤	۱/۰۳۰۸	٦/۵۵۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
مرکز	۱۵۰	۱/٤۳٤	۱/۹٦۹	۸/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۱۲۵	۱۵۰	۱/۹۵۸	۲/۳۳۳	۸/۸٤۰	۰/۰۰۰	۱/۲۵۰
بار میکروبی ($Log_{10}CFU/ml$)												
صنعتی	۱۵۰	٦/۷	٦/۱۷	٦/۹٤	۷/۱۱	٦/۷۰	۱۵۰	٦/۵٦	٦/۱٦	٦/۹۱	۵/۰۸	٦/۵٤
مرکز	۱۵۰	٦/۷٦	٦/۰۷	٦/۹۵	٦/۳	٦/۷٦	۱۵۰	٦/۵٤	٦/۱۰	٦/۸۸	٦/۰۷	٦/۵٤

مرکز- مرکز جمع‌آوری شیر

نتایج به‌دست آمده برای ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی به‌ترتیب با استانداردهای ملی مقایسه شدند. میزان انطباق نمونه‌ها با این ویژگی‌ها به‌ترتیب در جداول (۳ و ٤) نشان داده شده است (ISIRI 164, 2017; ISIRI 2406, 2017).

جدول (۳)- تعداد نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از دامداری‌های صنعتی و سنتی و در فصل تابستان و زمستان که ویژگی‌های موردبررسی در آن‌ها با استاندارد ملی مربوطه مطابقت دارد.

نوع شیر	ویژگی و حد مجاز – تعداد (درصد)					
	تعداد نمونه	چربی حداقل ۳/۲٪	پروتئین حداقل ۳٪	اسیدیته ۱۶-۱۴	دانسیته ۱/۰۳۲-۱/۰۲۹	بدون آب
تابستان – صنعتی	۱۵۰	۴۹ (۳۲/۷)	۱۰۳ (۶۸/۷)	۶۳ (۴۲)	۱۰۸ (۷۲)	۷۵ (۵۰)
زمستان–صنعتی	۱۵۰	۸۳ (۵۵/۳)	۱۱۳ (۷۵/۳)	۱۳۲ (۸۸)	۱۴۵ (۹۶/۷)	۱۱۵ (۷۶/۷)
تابستان– مرکز جمع‌آوری	۱۵۰	۵۲ (۳۴/۷)	۹۱ (۶۰/۷)	۲۹ (۱۹/۳)	۸۵ (۵۶/۷)	۷۳ (۴۸/۷)
زمستان– مرکز جمع‌آوری	۱۵۰	۱۰۶ (۷۰/۷)	۱۳۶ (۹۰/۷)	۱۲۱ (۸۰/۷)	۱۴۱ (۹۴)	۷۰ (۴۶/۷)

جدول (٤)- نتایج درجه‌بندی شیر خام جمع‌آوری شده از مرکز جمع‌آوری شیر و دامداری صنعتی در دو فصل تابستان و زمستان بر اساس بار میکروبی مطابق با استاندارد ملی (ISIRI 2406, 2017)

فصل–دامداری	تعداد نمونه	درجه کیفی شیر (تعداد (درصد))				
		ممتاز (کمتر از ۳×۱۰^{۴})	درجه‌یک (۳×۱۰^{۴} تا $۱۰^{۵}$)	درجه‌دو ($۱۰^{۵}$تا	درجه ۳ (۵×۱۰^{۵} تا $۱۰^{۶}$)	بیشتر از $۱۰^{۶}$
تابستان– صنعتی	۱۵۰	۰	۰	۰	۰	۱۵۰ (۱۰۰)
زمستان– صنعتی	۱۵۰	۰	۰	٦ (٤)	۹ (٦)	۱۳۵ (۹۰)
تابستان– مرکز	۱۵۰	۰	۰	۰	۰	۱۵۰(۱۰۰)
زمستان مرکز	۱۵۰	۰	۰	۰	٦ (٤)	۱٤٤ (۹٦)
جمع کل	٦۰۰	۰	۰	٦ (۱)	۱۵ (۲/۵)	۵۷۹ (۹٦/۵)

بحث و نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد ازنظر مقدار آفلاتوکسین، اختلافی بین نمونه‌هایی که در فصل تابستان یا زمستان جمع‌آوری شده بود و هم‌چنین نمونه‌هایی که از مراکز جمع‌آوری شیر و دام‌داری صنعتی تهیه شده بود، وجود نداشت. در تحقیق مشابهی که در ۱٤ استان ایران انجام شد، مقدار آفلاتوکسین M_1 در ۳۱۹ نمونه اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد میزان آلودگی در شیرهای جمع‌آوری شده از مراکز جمع‌آوری شیر و دام‌داری صنعتی تفاوتی نداشت اما میزان آلودگی در فصل زمستان به‌طور معنی‌داری ($\alpha<$ ۰/۱) از فصل تابستان بالاتر بود (Tajkarimi *et al.*, 2008). نتایج

ایشان با آنچه در این بررسی به‌دست آمد تا حدی متفاوت بود. در تحقیق حاضر نیز گرچه شیر جمع‌آوری شده در زمستان مقدار آفلاتوکسین بیشتری نسبت به تابستان داشت، اما تفاوت معنی‌دار نبود. این اختلاف ممکن است ناشی از تعداد نمونه باشد که در پژوهش حاضر بسیار کم‌تر بود. در مطالعه دیگری در شهرستان قزوین، تعداد ۱۷۰ نمونه شیر خام (از تانکرهای حمل شیر کارخانجات لبنی، دامداری‌های صنعتی و مراکز جمع‌آوری شیر) در فصل زمستان ازنظر مقدار M_1 موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در تعداد ۵۷ نمونه (۳۳/۵۲ درصد) آلودگی به M_1 بیش‌ازحد استاندارد بود. این محققین گزارش نمودند که میزان آلودگی ناشی از عدم ذخیره مناسب خوراک دام در فصل زمستان می‌باشد (Norian *et al.*, 2015). به نظر می‌رسد برای اثبات اثر نوع فصل بر میزان آلودگی به آفلاتوکسین باید تحقیقات بیشتری و با تعداد نمونه زیاد انجام شود.

تحقیق حاضر نشان داد بیش از ۵۰ درصد نمونه‌ها حاوی آفلاکسین بوده و در ۱۲/۵ درصد نمونه‌ها آفلاتوکسین از حد مجاز استاندارد ملی بالاتر بود. این نتایج نیز تا حدی با نتایج سایر محققین متفاوت بود. در یک بررسی در سنندج، مقدار M_1 در ۲۷۲ نمونه شیر خام و شیر پاستوریزه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد در ۹٤/۵ درصد آن‌ها آفلاتوکسین وجود داشت و در ٤/٤ درصد از آن‌ها مقدار آن از حد مجاز استاندارد بالاتر بود (Mohammadian *et al.*, 2010).

در شهر تبریز نیز ۱۰۰ درصد نمونه‌های شیر خام (۹۰ نمونه) که از مراکز جمع‌آوری شیر اطراف شهر، از تیرماه تا شهریورماه، تهیه شده بودند، به M_1 آلوده بودند و میانگین آلودگی در آن‌ها ۱٤۸/۳۷±۱۹/۲۷ نانوگرم در لیتر گزارش شد و در ٤۸ درصد نمونه‌ها میزان آلودگی از حد مجاز استاندارد ملی (۵۰ ng/ml) بالاتر بود (Movassagh and Adinehvand, 2013). به نظر می‌رسد شیرهای خام باید به‌طور مرتب ازنظر میزان آفلاتوکسین مورد پایش قرار گیرند.

از نظر ویژگی‌های شیمیایی به‌طورکلی، چربی، پروتئین و دانسیته سه شاخص مهم در ارزیابی کیفیت و سلامت شیر محسوب می‌شوند. بررسی‌های آماری نشان داد که اثر فصل بر روی سه ویژگی پروتئین، چربی و دانسیته شیر معنی‌دار بود اما نوع دام‌داری اثر معنی‌داری بر ویژگی‌های ذکر شده نداشت. نتایج این بررسی با تحقیق مشابهی که بر روی نمونه‌های شیر خام از سال ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۳ در کشور مصر انجام شد، مطابقت داشت. محققین گزارش نمودند که در فصل تابستان مقدار چربی و دانسیته و مواد جامد بدون چربی کمتر از فصل زمستان بود (Kabil *et al.*, 2015). در تحقیق دیگری در کشور رومانی، در طی سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۱، شیر دوشیده شده از ۳۵۰ گاو در یک مزرعه بررسی و نتایج نشان داد که مقدار چربی و پروتئین آن‌ها در طی فصل زمستان بیشتر از فصل تابستان بود (Neciu *et al.*, 2012). هرچند نتایج متناقضی در بررسی انجام شده در قزوین گزارش شده است. به این معنی که مقدار چربی و پروتئین در شیرهای فصل تابستان بیشتر از فصل زمستان بوده و علاوه بر آن بار میکروبی نیز در تابستان کمتر از زمستان بوده و به‌طورکلی کیفیت شیر خام در تابستان بهتر از زمستان بوده است (Nateghi *et al.*, 2014).

از بین ٦٠٠ نمونه جمع‌آوری شده، به ٢٦٥ نمونه (٤٤/٢ درصد) آب اضافه شده بود که مقدار آن بین ٠/١٢ تا ٨/٨٤ درصد متفاوت بود. بر اساس استانداردهای ملی و بین‌المللی نباید به شیر خام آب اضافه شود. آب افزوده به شیر می‌تواند چندین مشکل مهم را ایجاد کند که از آن جمله می‌توان به زیان‌های اقتصادی، فساد محصول نهایی و خطر ایمنی برای مصرف‌کنندگان اشاره نمود. از سوی دیگر این آب با رقیق کردن پروتئین و سایر اجزای شیر، سبب افت ارزش غذایی شیر شده و به آن یک طعم خنثی می‌دهد.

میزان اسیدیته نیز در تعداد ٢٥٥ نمونه در حد استاندارد نبود که از بین آن‌ها ٢٤٥ نمونه اسیدیته بیشتر از ١٦و تعداد ١٠ نمونه اسیدیته کمتر از ١٤ درجه درنیک داشتند که هر دو خارج از حدود استاندارد (١٦-١٤ درجه درنیک) بود. معمولاً افزایش اسیدیته در شیر خام نشانه آلودگی میکروبی و کاهش آن نشانه وجود سلول‌های سوماتیک در شیر است. بیشترین نمونه‌هایی که اسیدیته آن‌ها از حد استاندارد بیشتر بود در فصل تابستان و از مراکز جمع‌آوری شیر برداشته شده بودند. گرچه اختلاف معنی‌داری بین اسیدیته نمونه‌ها در مرکز جمع‌آوری شیر و دامداری صنعتی وجود نداشت درحالی‌که اثر نوع فصل معنی‌دار ($P<٠/٠٥$) بود.

از بین ٦٠٠ نمونه موردبررسی حدود ٩٦/٥ درصد دارای بار میکروبی بیش‌ازحد استاندارد بودند. نتایج این بررسی و مقایسه آن‌ها با استاندارد ملی شیر خام نشان داد که در شیرهای خام تحویلی به کارخانجات میزان آلودگی میکروبی در هر دو فصل تابستان و زمستان از حدود تعیین شده در این استاندارد بالاتر است. چنان‌که در جدول (٤) مشاهده می‌شود، ٩٣ درصد نمونه‌ها در فصل زمستان و ١٠٠ درصد نمونه‌ها در فصل تابستان، آلودگی بیش از $١٠^{٦}$ CFU/ml داشتند و بایستی توسط مراجع ذی‌صلاح تعیین تکلیف گردند. با توجه به دمای هوا در فصل تابستان، این نتیجه دور از انتظار نبود.

نتایج این تحقیق هم‌چنین نشان داد با افزایش بار میکروبی، مقدار اسیدیته افزایش می‌یابد. برای بررسی ارتباط بین بار میکروبی و اسیدیته ٦٠٠ نمونه شیر خام از روش‌های رگرسیون خطی، تحلیل همبستگی و محاسبه ضریب همبستگی استفاده شد و معادله رگرسیونی زیر به‌دست آمد:

$$Y = 3.998X - 11.04$$

در این معادله، Y اسیدیته شیر و X لگاریتم تعداد شمارش کلی نمونه شیر می‌باشد. ضریب تعیین (R^2) برای این معادله ٠/٣٥٥ به‌دست آمد که نشان می‌داد تنها در ٣٥/٥ درصد موارد تغییرات Y می‌تواند از طریق ارتباط خطی بین X و Y تعریف شود (از طریق معادله رگرسیون به‌دست آمده) که درصد مناسبی نیست و به‌عبارت دیگر از روی میزان اسیدیته نمی‌توان بار میکروبی را تخمین زد. این موضوع احتمالاً ناشی از این است که علاوه بر بار میکروبی عوامل دیگری نیز بر روی اسیدیته اثر می‌گذارند و از سوی دیگر دامداران نیز با کاربرد انواع مواد قلیایی تلاش می‌کنند، اسیدیته شیر را کاهش دهند. در تحقیق مشابهی (Fazlara *et al.*, 2013)، ارتباط قوی بین اسیدیته و بار میکروبی در نمونه‌های شیر خام و پاستوریزه به‌دست آمد و ضریب تعیین (R^2) در آن‌ها به‌ترتیب ٠/٩٤١٤ و ٠/٩٣٢٧ بود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نداشت.

ارتباط خطی بین اسیدیته و پروتئین نیز بررسی شد. ضریب تعیین (R^2) برای معادله خطی این دو ویژگی حدود ٥٤/٤ درصد به‌دست آمد که نشان‌دهنده عدم وجود ارتباط خطی قابل‌قبول بین اسیدیته و مقدار پروتئین است. در حالی‌که در بررسی دیگری محققین نشان دادند با افزایش مقدار پروتئین، اسیدیته افزایش می‌یابد و با افزایش شمار باکتری‌ها، اسیدیته از حد قابل‌قبول (۱۷ درصد) بیشتر می‌شد. هم‌چنین اندازه‌گیری اسیدیته می‌تواند به‌عنوان یک روش معتبر برای ارزیابی کیفیت شیر خام است محسوب گردد، هرچند اسیدیته می‌تواند تحت تأثیر محتوای پروتئین قرار گیرد (Zajác *et al.*, 2015). به‌نظر می‌رسد اختلاف بین نتایج بررسی حاضر و سایرین ناشی از تفاوت در روش‌های آزمون یا تعداد نمونه باشد.

نتایج بررسی حاضر نشان داد که شیرهایی که در فصل زمستان تولید می‌شوند نسبت به نمونه‌های فصل تابستان از چربی و پروتئین بیشتری برخوردار بوده و بار میکروبی آن‌ها کمتر است. گرچه تعداد قابل‌توجهی از نمونه‌ها در ویژگی‌های موردبررسی با استانداردهای ملی مربوطه مطابقت نداشتند. کیفیت نمونه‌های جمع‌آوری شده در شیرهای به‌دست آمده در دامداری‌های صنعتی (ازنظر بار میکروبی و ویژگی‌های شیمیایی) بهتر از مرکز جمع‌آوری شیر بود اما این تفاوت معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد شیرهای تولیدی حتی در دامداری‌های صنعتی نیز ازنظر بار میکروبی با استانداردهای ملی و بین‌المللی فاصله داشته و باید برنامه‌های مختلف در خصوص بهبود کیفیت شیر طراحی و اجرا گردد. در تعدادی از نمونه‌ها آفلاتوکسین M_1 در شیر خام از حد مجاز بیشتر بود. بنابراین، باید نمونه‌های شیر تحویل داده شده به کارخانجات ازنظر مقدار آفلاتوکسین M_1 نیز موردبررسی قرار گیرند. علاوه بر آن، در حال حاضر تعیین قیمت شیری که توسط دامداران تولید می‌شود بر اساس میزان چربی آن انجام می‌شود که این روش، چندان روش مناسبی برای درجه‌بندی و قیمت‌گذاری برای شیر محسوب نمی‌شود. زیرا با اجرای انواع تقلب‌ها می‌توان مقدار چربی را افزایش داد. از سوی دیگر در این روش دو شیر که مقدار چربی یکسانی دارند اما یکی بار میکروبی بیشتر و دیگری بار میکروبی کمتری دارند هر دو به یک قیمت خریداری می‌شوند. بنابراین به پیشنهاد می‌شود سیستم دیگری برای درجه‌بندی و تعیین قیمت شیری که در کارخانه تحویل گرفته می‌شود ایجاد گردد، به‌نحوی‌که سایر شاخص‌ها مانند بار میکروبی، مقدار آفلاتوکسین، مقدار پروتئین و غیره نیز در آن لحاظ گردد. تا از این طریق علاوه بر تولید محصول با کیفیت بهتر، دامداران به اعمال شرایط بهداشتی و کنترل کیفیت بهتر شیر، تشویق شوند. علاوه بر آن، دامداران باید در مورد خطرات ناشی از شیرهای غیربهداشتی، نحوه تولید آفلاتوکسین در شیر دام و عوارض ناشی از ورود آن‌ها در بدن انسان و تغذیه صحیح دام آموزش‌های لازم را طی نمایند.

سپاسگزاری

نویسندگان از کارخانه کیمیا لبن به‌خاطر تأمین امکانات پژوهش تشکر و سپاسگزاری می‌کنند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Auldist, M., Mullins C., O Brien, B., O Kennedy, B.T. and Guinee, T. (2002). Effect of cowbreed on milk coagulation properties. Milchwissenschaft. 57(3): 140–143.
- Fazlara, A., Zareie, M. and Mottaghian, N. (2013). Survey of predictive model for microbial load in raw and pasteurized milk with measuring electrical resistance (Impedance-Splitting Method) and it's correlation with milk titrable acidity. Iranian Veterinary Journal. 9(2): 97-105. [In Persian]
- Iranian National Standardization Organization. (ISIRI), (2017). Microbiology of milk and milk products – Specifications and test methods, 3rd Revision. ISIRI No.2406. [In Persian]
- Iranian National Standardization Organization. (ISIRI), (2017). Raw milk – specification and test methods, 3rd Revision. ISIRI No. 164. [In Persian]
- Iranian National Standardization Organization. (ISIRI), (2016). Milk and milk prouducts. Determination of aflatoxin M1 by HPLC method and immunoaffinity column clean up-test method, 1st Revision. ISIRI No.7133. [In Persian]
- Jalili, M. and Scotter, M. (2015). A review of aflatoxin M_1 in liquid milk. Iranian Journal of Health, Safety & Environment. 2(2): 283-295.
- Jensen, R. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. Journal of Dairy Science. 85(2):295–350.
- Kabil, O.I., Ibrahim, E.A., El Barbary, H.A. and Ali, M.A. (2015). Effect of seasonal variation on chemical composition of Cow's milk. Benha Veterinary Medical Journal. 28(1): 150-154.
- Kędzierska-Matysek, M., Litwińczuk, Z., Florek, M., and Barłowska, J. (2011). The effects of breed and other factors on the composition and freezing point of cow’s milk in Poland. International Journal of Dairy Technology. 64(3): 336-342.
- Looper, M. (1994). Factors affecting milk composition of lactating cows. Division of Agriculture Research and Extension University of Arkansas System. (Available at https://www.uaex.edu/publications/pdf/FSA-4014.pdf)
- Lues, J.F.R., De Beer, H., Jacoby, A., Jansen, K.E. and Shale, K. (2010). Microbial quality of milk, produced by small scale farmers in a peri-urban area in South Africa. African Journal of Microbiology Research. 4(17): 1823-1330.
- Medhammar, E., Wijesinha-Bettoni, R., Stadlmayr, B., Nilsson, E., Charrondiere, U.R. and Burlingame, B. (2012). Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. Journal of the Science of Food and Agriculture. 92(3): 445–474.
- Movassagh, M.H. and Adinehvand, S. (2013). Study of aflatoxin M_1 level in the collected raw cow milk from milk collection centers in Tabriz. Food Hygiene. 2(10): 63-70. [In Persian]
- Mohammadian, B., Khezri, M., Ghasemipour, N., Mafakheri, S. and Poorghafour Langroudi, P. (2010). Aflatoxin M_1 contamination of raw and pasteurized milk produced in Sanandaj, Iran. Archives of Razi Institut. 65(2): 99-104. [In Persian]
- Nateghi, L., Yousefi, M., Zamani, E., Gholamian, M. and Mohammadzadeh, M. (2014). The effect of different seasons on the milk quality. European Journal of Experimental Biology. 4(1): 550-552.
- Neciu, F.C., Cziszter, L.T., Neamţ, R.I., Ilie, D.F. and Costin, L. (2012). Influence of season on raw milk yield and quality in a dairy farm. Lucrări Ştiinţifice-Seria Zootehnie, 58: 269-272.
- Norian, R., Pourfarzaneh, A.R. and Mashatian, F. (2015). Determination of aflatoxin M_1 in raw milk produced in Qazvin province by ELISA and HPLC. Journal of Food Microbiology. 1(3): 7-13. [In Persian]

- Quist, M.A., Blanc, S.J., Hand, K.J., Lazenby, D. and Rangel, A.H.N. (2008). Influência do estágio de lactação sobre a composição do leite de búfala. Acta Veterinaria Brasilica. 5(3): 306-310.
- Schennink, A., Stoop, W.M., Visker, M.H.P.W., Heck, J.M.L., Bovenhuis, H., Van Der Poel, J.J. et al. (2007). DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. Animal Genetics. 38(5): 467–473.
- Schönfeldt H.C., Hall N.G. and Smit L.E. (2012). The need for country specific composition data on milk. Food Research International. 47(2): 207–209.
- Tajkarimi, M., Aliabadi-Sh, F., Salah Nejad, A., Poursoltani, H., Motallebi, A. A. and Mahdavi, H. (2008). Aflatoxin M_1 contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. Food Control. 19(11): 1033–1036.
- Zajác,P., Čapla, J., Vietoris,V., Zubrická,S. and Čurlej, J. (2015). Effects of storage on the major constituents of raw milk. Potravin a rstvo Scientific Journal for Food Industry. 9(1): 375-381.