کارآیی آزمایش انعقاد الکل در ارزیابی شیر مخلوط گاو

دکتر سید شهرام شکرفروش[1*] دکتر مهدی زارعی[2] دکتر مهدی محبی فانی[1]

دریافت مقاله: ۵ آذر ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۳ خرداد ماه ۱۳۸۲

هدف: درمراکزجمع آوری شیر و کارخانه های شیرپاستوریزه کشور به منظور شناسایی شیرهای خام با اسیدیته بالا، شیرهای با بارمیکروبی بالا، شیرهای ورم پستانی و شیرهای ناپایدار در برابرحرارت استرلیزاسیون از آزمایشی بنام"تست الکل" استفاده می شود. بعضی از پژوهشها، همبستگی بین ناپایداری شیر در برابر اتانول و موارد فوق الذکر را تأیید، و بعضی آن را رد نموده اند. این تحقیق با هدف ارزیابی کارآیی تست الکل جهت شناسایی شیرهای با اسیدیته بالا، شیرهای با بارمیکروبی بیش از حد مجاز و شیرهای ورم پستانی صورت گرفت.

روش: روی صد و چهل نمونه شیرمخلوط گاو(Bulk milk) ،آزمایشهای اسیدیته قابل تیتر، شمارش کلی باکتریها، CMT و تست الکل ۶۸ درصد یک حجم و دو حجم انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: به منظورتعیین میزان همبستگی نتایج حاصل از تست الکل با سایر آزمایشها از آزمون همبستگی رتبه ای اسپرمن استفاده شد. همچنین حساسیت و ویژگی تست الکل درموارد مختلف با استفاده از معادله های مربوطه محاسبه گردید.

نتایج: همبستگی بین نتیجه تست الکل یک حجم و دوحجم و آزمایش CMT و بارمیکروبی معنی دار نبود (P>۰/۱). همبستگی بین نتیجه تست الکل یک حجم با اسیدیته معنی دار ولی بسیارضعیف بود (P< ۰/۰۵ ، r =۰/۱۸). همبستگی بین نتیجه تست الکل دوحجم با اسیدیته معنی دارنبود (P>۰/۱). حساسیت و ویژگی تست الکل برای تفکیک شیرهای با اسیدیته طبیعی از شیرهای با اسیدیته بالاتر از حد استاندارد برای اتانول یک حجم به ترتیب ۴۵/۷ و ۶۲/۷ درصد و برای اتانول دوحجم ۵۵/۵ و ۴۹/۲ درصد بود. حساسیت و ویژگی تست الکل برای تفکیک شیرهای با بارمیکروبی قابل قبول ازشیرهای با بارمیکروبی بالاتر ازحد استاندارد برای اتانول یک حجم به ترتیب ۴۱/۳ و ۶۲/۵ درصد و برای اتانول دوحجم ۵۳/۳ و ۴۸/۵ درصد بود. حساسیت و ویژگی تست الکل جهت تفکیک شیرهای نرمال از شیرهای CMT مثبت برای اتانول یک حجم به ترتیب ۵۲/۶ و ۵۹/۵ درصد و برای اتانول دوحجم ۶۳/۲ و ۴۷/۰ درصد بود.

نتیجه گیری: با توجه به همبستگی ضعیف و یا بدون معنای تست الکل با فاکتورهای بالا و حساسیت و ویژگی بسیارکم این تست می توان نتیجه گرفت که تست الکل ملاک و معیار قابل قبولی برای ارزیابی شیرگاو ازنظراسیدیته، بارمیکروبی و تعداد سلولهای سوماتیک شیرنیست. پیشنهاد می شود در مراکز جمع آوری شیر و کارخانه هایی که امکان انجام آزمایشها با ارزش و معتبر مثل اندازه گیری اسیدیته قابل تیتر، شمارش سلولهای سوماتیک شیر و شمارش باکتریهای شیر وجود دارد، از این آزمایش استفاده نشود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۲، ۱۷۵-۱۶۹.

واژه های کلیدی: تست الکل، شیر، اسیدیته، بارمیکروبی، تورم پستان.

Efficacy of alcohol coagulation test for evaluation of bulk milk quality

Shekarforoush, S.S.,[1] Zareie, M.,[2] Mohebbi Fani, M.[1]

[1]*Department of Food Hygiene Faculty of Veterinary Medicine, University of Shiraz, Shiraz - Iran.* [2]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Shiraz, Shiraz - Iran.*

Objective: Evaluation of efficacy of alcohol test to differentiate between acceptable and unacceptable bulk milk.

Procedure: One hundred fourty bulk milk samples from milk collection centers around Shiraz were examined for titrable acidity, aerobic plate count (APC), California Mastitis Test (CMT) and alcohol test with single and double volumes of 68° ethanol.

Statistical analysis: Correlation coefficients between alcohol stability and acidity, microbial quality and mastitic milk were measured and sensitivity and specifity of alcohol test for evaluation of acidity, microbial quality and mastitic milk were calculated.

Results: No significant correlation was observed between alcohol test (single and double volumes), CMT and the APC. Correlation coefficient between single volume alcohol test and acidity was 0.18 ($p<0.05$). No significant correlation was detected between double volume alcohol test and acidity. The sensitivity of single and double volume alcohol tests for differentiation between high acid milk (more than 16° Dornic) and normal milk (less than 16° Dornic) were 45.7% and 55.5%, respectively; and their specificity were 62.7% and 49.2%. Regarding microbial quality, sensitivity of single and double volume alcohol tests for differentiation between acceptable ($APC<10^6$ CFU/ml) and unacceptable milk ($APC>10^6$ CFU/ml) were 41.3% and 53.3%, and their specifity were 62.5% and 48.5%. The sensitivity of single and double volume alcohol tests for differentiation between normal milk (CMT negative) and mastitic milk (CMT positive) were 52.6%. and 63.2%, and their specificity were 59.5% and 47.0%, respectively.

Conclusion: It is concluded from the results that alcohol test is not a confidential test to evaluate the quality of bulk cow's milk. It is suggested that this test to be removed from routine evaluation tests in milk collection centers and industrial dairy plants. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 2: 169-175, 2003.***

Key words: Alcohol stability test, Milk quality, CMT, Acidity.

corresponding author email:shekar@shirazu.ac.ir

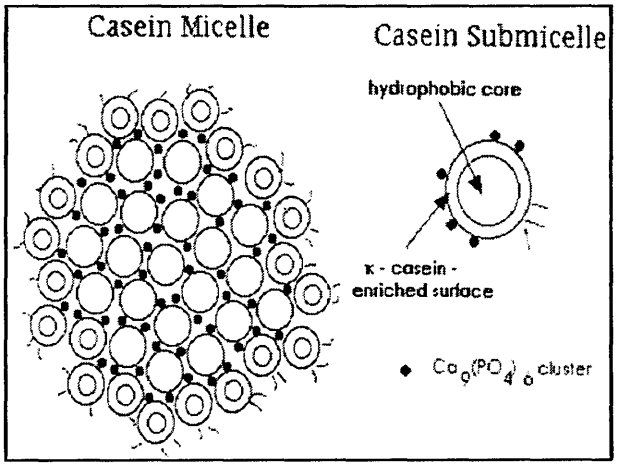
براساس آمار سال ۱۳۷۵ میزان تولید شیردرایران حدود ۵/۵ میلیون تن بوده است (۳). در سال ۱۳۸۰ شرکت سهامی صنایع شیر ایران موفق به دریافت و فرآوری حدود یک میلیون تن شیرشده است. هرچند که این مقداردریافت و فرآوری بهداشتی و بهینه شیرنقطه عطفی درتاریخ صنایع غذایی کشوربوده است، اما بین توان تولید شیردرکشور و مقداردریافت شیرتوسط شرکت سهامی صنایع شیر و دیگر کارخانه های فرآوری شیر فاصله زیادی وجود دارد. این مسأله موجب تأثیر منفی برتولید شیر و نارضایتی بسیاری از دامداران و تولید کنندگان شیر شده است. در این راستا یکی از دلایل عدم دریافت شیر از سوی کارخانه های مختلف بویژه کارخانه های وابسته به شرکت سهامی صنایع شیر ایران، ناپایداری شیردر برابر الکل می باشد. براساس بعضی از پژوهشها شیرهای ورم پستانی، شیرهایی که اسیدیته بالایی دارند (شیرهای مانده)، شیرهایی که بار میکروبی بالایی دارند و شیرهای ناپایدار در برابرحرارت استریلیزاسیون نسبت به تست الکل حساس هستند و در واقع از این آزمایش به عنوان یک آزمایش غربالگر جهت تشخیص و انتخاب شیرهای سالم و مناسب برای تولید فرآورده های مختلف لبنی استفاده می شود (۳۶،۳۰،۱۹،۱۶،۱۴،۱۳).

۱) گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.
*) نویسنده مسئول shekar@shirazu.ac.ir

اولین مطالب درمورد تست پایداری دربرابر الکل (Alcohol stability test) در مقالات علمی حدود یک قرن پیش آمده است. از این تست بویژه در اروپای مرکزی به عنوان وسیله ای جهت ارزیابی کیفیت شیر استفاده شده است. درسال ۱۹۱۵ در ایالات متحده آمریکا اولین کارها برای ارزیابی تست الکل به وسیله Ayers و Johnson صورت گرفت (۸) و از سال ۱۹۳۰ این تست به عنوان یک شاخص جهت تعیین شیرهایی که به سمت ترش شدن می روند، یا شیرهایی که حاوی کلستروم هستند و یا شیرهای ورم پستانی به کار گرفته شد (۳۳). در اوایل قرن بیستم در صنعت فرآوری شیر بویژه درآمریکا از تست الکل و اسیدیته قابل تیتراسیون به عنوان شاخصهایی برای تشخیص شیرهای قابل استریلیزاسیون استفاده می شد. نتایج اولیه دراین مورد مطلوب و قابل قبول بود، به طوری که از تحقیقات Danhlberg و Garner چنین برمی آمد که تست الکل یک تست عملی و قابل اعتماد جهت تعیین کیفیت شیرهایی است که برای استریل کردن و کندانسه کردن استفاده می شوند (۱۱). اما بتدریج اشکالاتی درخصوص نتایج این تست مشاهده شد و حدود ده سال بعد Ramsdell و همکاران در سال ۱۹۳۱ نشان دادند که حساسیت این تست جهت درجه بندی شیر برای استریلیزاسیون کافی نیست (۳۴). چندین سال بعد همین نتایج به وسیله White و Davies به دست آمد. آنها دریافتند که هیچ ارتباطی بین حساسیت شیرنسبت به الکل و پایداری حرارتی آن وجود ندارد (۴۰) به همین دلیل ازآن پس انجام این تست درآمریکا متوقف شد (۳۶).

پروتئینهای شیر به دوگروه تقسیم می شود یکی کازئین که حدود ۷۸ درصد مجموع پروتئینهای شیر را تشکیل می دهند و دیگری پروتئینهای سرم شیر که حدود ۱۷ درصد پروتئین شیر را تشکیل می دهند (۱). کازئین شیر برمبنای بارالکتریکی خود به انواع آلفا- بتا، گاما و کاپا تقسیم می شود (۲۶). در شیرکازئین به صورت میسل های (Casein micelle) کلوئیدی کروی بزرگ همراه با فسفات کلسیم با قطری بین ۱۰ تا ۲۰۰ نانومتر درشیرمعلق است. میسل های کازئین شامل حدود ۹۳ درصد کازئین و حدود ۷ درصد فسفات کلسیم هستند. درواقع هر میسل کازئین از تعدادی میسل کوچک (Submicelle) به قطر ۱۰ تا ۲۰ نانومتر تشکیل شده است. هر میسل کوچک از ۲۵ تا ۳۰ واحد کازئین های آلفا، بتا، گاما و کاپا درست شده است. بخشهای آب گریز کازئین ها هسته مرکزی میسل کوچک (Hydrophobic core) و بخشهای آب دوست آنها بویژه بخش گلیکوپروتئینی کاپا کازئین لایه سطحی آن را تشکیل می دهند. فسفات کلسیم با ایجاد اتصال بین میسل های کوچک نقش مهمی در پیوستن آنها به یکدیگر و ایجاد میسل کازئین را دارد. میسل های کوچک به گونه ای به هم متصل می شوند که میسل کروی و بزرگ ایجاد شده دارای سطحی بسیار آب دوست و سرشار ازکاپا کازئین باشد. درچنین حالتی میسل درمحیط آبی شیربه صورت معلق باقی می ماند (۲۶،۳۹). در تصویر ۱ ساختمان شماتیک میسل کازئین نشان داده شده است.

میسل های کازئین درpH طبیعی شیردارای بار منفی می باشند و یکدیگر را دفع می کنند و درمحلول آبی شیر پایدار می مانند. بار الکتریکی سطح میسل ها تحت تأثیر یونهای موجود در محیط است (۲۰). با افزایش اسیدیته شیر غلظت یون هیدروژن افزایش یافته، موجب خنثی شدن بارهای منفی سطح میسل می شود تاحدی که تعداد بارهای مثبت و منفی میسل با هم برابر و بار الکتریکی پروتئین صفرمی شود و اصطلاحاً پروتئین به نقطه ایزوالکتریک می رسد. در این حالت یعنی pH = ۴/۷ میسل ها به هم متصل شده توده بزرگی را تشکیل می دهند و کازئین شیررسوب می کند (۴).



تصویر ۱ - ساختمان شماتیک میسل کازئین (برگرفته از سایت اینترنتی دانشگاه گولف).

درمورد نقش الکل و اینکه چرا بعضی شیرها در برابر الکل ناپایدار و بعضی پایدارند، نظریه های مختلفی بیان شده است. یکی از نظریه هایی که ازپایه و اساس بیوشیمیایی قویتری برخوردار است و طرفداران بیشتری دارد درسال ۱۹۸۱ توسط Horne و Parker ارایه شد. این دو دانشمند بیان کردند که با افزودن الکل به شیر، ثابت دی الکتریک (Dielectric constant) مخلوط کاهش می یابد. با کاهش ثابت دی الکتریک که در واقع نشان دهنده نیروی جاذبه بین ملکولها است، نیروی دافعه بین میسل های کازئین کاهش می یابد. به دنبال آن کازئین تجمع یافته و رسوب می کند. آنها همچنین به نقش یونهای کلسیم و منیزیم شیر در ارتباط با ناپایداری نسبت به الکل اشاره نموده چنین بیان داشتند که افزایش این یونها باعث افزایش اتصال آنها به سطح میسل های کازئین و درنتیجه کاهش بارالکتریکی آنها می شود. بنابراین نیروی دافعه بین میسل ها کم می شود و سپس با کاهش ثابت دی الکتریک محلول توسط الکل، میسل ها تجمع یافته رسوب می نمایند (۲۱).

این پژوهش با هدف ارزیابی کارآیی تست الکل جهت شناسایی شیرهای با اسیدیته بالا، شیرهای با بارمیکروبی بیش از حد مجاز و شیرهای ورم پستانی صورت گرفت.

مواد و روش کار

دراین مطالعه ۱۴۰ نمونه شیرمخلوط گاو از مراکز جمع آوری شیر اطراف شیراز به طور ساده تصادفی (Simple random sampling) تهیه شد. از هرمحموله شیر دریافتی ۱۰۰ میلی لیتر در ظروف استریل ریخته می شد و تا زمان آزمایش که حداکثر ۲ساعت پس از نمونه گیری بود درمجاورت یخ نگهداری می شد. بر روی نمونه ها آزمایشهای زیر صورت پذیرفت:

۱- اندازه گیری میزان چربی، پروتئین، ماده خشک غیرچرب (Solid non fat)، وزن مخصوص و نقطه انجماد شیربا دستگاه اکومیلک (Ekomilk, KAM-98).

۲- تست الکل: با توجه به اینکه درمراکز مختلف جمع آوری شیر و کارخانه های شیرایران علاوه برآزمایش الکل با اتانول ۶۸ درصد یک حجم (۲ میلی لیترشیر + ۲ میلی لیتراتانول ۶۸ درصد)، این آزمایش با اتانول ۶۸ درصد دو حجم (۲ میلی لیترشیر +۴ میلی لیتراتانول ۶۸ درصد) نیز صورت می گیرد، این آزمایش با الکل ۶۸ درصد یک حجم و دو حجم انجام شد.

۳- اندازه گیری اسیدیته قابل تیتر با استفاده ازسود دسی نرمال و محاسبه مقدار آن برحسب درجه درنیک: نظربه اینکه براساس استاندارد

ایران حداکثراسیدیته قابل قبول شیرخام۱۶ درجه درنیک است (۵) درمحاسبات مرز قبول اسیدیته ۱۶ درجه درنیک درنظرگرفته شده است.

۴- آزمایش ورم پستان کالیفرنیا (California mastitis test CMT):

این آزمایش به منظور ارزیابی تعداد سلولهای سوماتیک شیر انجام شد. تعداد سلولهای سوماتیک شیرهای CMT منفی کمتر از پانصد هزار در هر میلی لیتر و تعداد سلولهای سوماتیک شیرهای یک مثبت تا سه مثبت بین یک میلیون تا چهار میلیون درمیلی لیترمی باشد (۶). دراین تحقیق شیرهای CMT منفی به عنوان شیرهای قابل قبول و شیرهای یک مثبت تا سه مثبت به عنوان شیرهای با تعداد سلول سوماتیک بالا و غیرقابل قبول دسته بندی شدند.

۵- شمارش کلی باکتریها (Standard plate count) به روش ماروین:

این آزمایش برای ارزیابی کیفیت میکروبی شیر یا اصطلاحاً بار میکروبی شیر انجام شد. نظر به اینکه براساس استاندارد ایران باید تعداد باکتریهای هوازی درشیر درجه یک حداکثر ۵×۱۰^{۵} درمیلی لیتر و درشیردرجه دو حداکثر ۱×۱۰^{۶} در میلی لیتر باشد (۵) مرز قبول شمارش باکتریهای هوازی ۱×۱۰^{۶} در میلی لیتر درنظرگرفته شده است (۲۸).

به منظورتعیین میزان همبستگی نتایج حاصل از تست الکل با سایر آزمایشها از آزمون همبستگی رتبه‌ای اسپرمن (Spearman's rank correlation coeficient) استفاده شد. حساسیت، ویژگی، ارزش پیشگویی مثبت و ارزش پیشگویی منفی تست الکل درموارد مختلف با استفاده از معادله های مربوطه محاسبه گردید.

نتایج

میانگین و انحراف معیار اسیدیته ۱۴۰ نمونه شیر ۳/۲ ± ۱۶/۵ بود و حداقل اسیدیته ۱۱/۳ و حداکثرآن ۳۶/۰ بود . تعداد ۸۱ نمونه (۵۷/۹ درصد) اسیدیته ای بیش ازحد استاندارد و ۵۹ نمونه (۴۲/۱ درصد) اسیدیته ای درحد استاندارد داشتند. از مجموع ۱۴۰ نمونه شیرتعداد ۵۹ نمونه (۴۲/۱ درصد) تست الکل یک حجم مثبت و ۸۱ نمونه (۵۷/۹ درصد) تست الکل منفی داشتند. حساسیت و ویژگی تست الکل یک حجم برای تفکیک شیرهای با اسیدیته درحد استاندارد و بالاتر از حد استاندارد به ترتیب ۴۵/۷ درصد و ۶۲/۷ درصد بود. موارد مثبت کاذب ۳۷/۳ درصد، منفی کاذب ۵۴/۳ درصد، ارزش پیشگویی مثبت ۶۲/۷ درصد و ارزش پیشگویی منفی ۴۵/۷ درصد بود (نمودار ۱). ضریب همبستگی بین نتیجه تست الکل یک حجم و اسیدیته ۰/۱۸ بود (P = ۰/۰۳).

از مجموع ۱۴۰ نمونه شیرتعداد ۷۵ نمونه (۵۳/۶ درصد) تست الکل دو حجم مثبت و ۶۵ نمونه (۴۶/۴ درصد) تست الکل منفی داشتند. حساسیت و ویژگی تست الکل دو حجم برای تفکیک شیرهای با اسیدیته درحد استاندارد و بالاتر ازحد استاندارد به ترتیب ۵۵/۵ درصد و ۴۹/۲ درصد بود. موارد مثبت کاذب ۵۰/۸ درصد، منفی کاذب ۴۴/۵ درصد، ارزش پیشگویی مثبت ۶۰/۰ درصد و ارزش پیشگویی منفی ۴۴/۷ درصد بود. با دو برابر شدن حجم الکل حساسیت تست الکل ۹/۸ درصد افزایش و ویژگی آن ۱۳/۵ درصد کاهش یافت (نمودار ۱). همبستگی بین نتیجه تست الکل دو حجم و اسیدیته معنادارنبود.

میانگین و انحراف معیار تعداد باکتریهای هوازی ۱۳۶ نمونه شیرمورد آزمایش $۱/۳\times۱۰^{۸} \pm ۶/۶\times۱۰^{۷}$ حداقل بار میکروبی $۳/۶\times۱۰^{۴}$ و حداکثرآن $۵/۹\times۱۰^{۸}$ بود. بار میکروبی در ۱۰۴ نمونه (۷۶/۵ درصد) بیش ازحد استاندارد و در ۳۲ نمونه (۲۳/۵ درصد) درحد استاندارد بود. حساسیت تست الکل یک حجم جهت تفکیک شیرهای با بارمیکروبی بیش ازحد استاندارد و بارمیکروبی درحد استاندارد ۴۱/۳ درصد، ویژگی آن ۶۲/۵ درصد، مثبت کاذب ۳۷/۵ درصد، منفی کاذب ۵۸/۷ درصد، ارزش پیشگویی مثبت ۷۸/۲ درصد و ارزش پیشگویی منفی ۲۴/۷ درصد به دست آمد (نمودار۲). همبستگی بین نتیجه تست الکل یک حجم و شمارش باکتریهای هوازی معنادار نبود (P =۰/۹۸).

حساسیت تست الکل دو حجم جهت تفکیک شیرهای با بارمیکروبی بیش ازحد استاندارد و بارمیکروبی درحد استاندارد ۵۳/۳ درصد، ویژگی آن ۴۸/۵ درصد، مثبت کاذب ۵۱/۵ درصد، منفی کاذب ۴۶/۷ درصد، ارزش پیشگویی مثبت ۷۶/۴ درصد و ارزش پیشگویی منفی ۲۵/۰ درصد به دست آمد. با دو برابرشدن حجم الکل حساسیت تست الکل یک حجم ۱۲/۰ درصد افزایش و ویژگی آن ۱۴/۰ درصد کاهش یافت (نمودار۲). همبستگی بین تست الکل دو حجم و شمارش باکتریهای هوازی معنادار نبود (P =۰/۷۴).

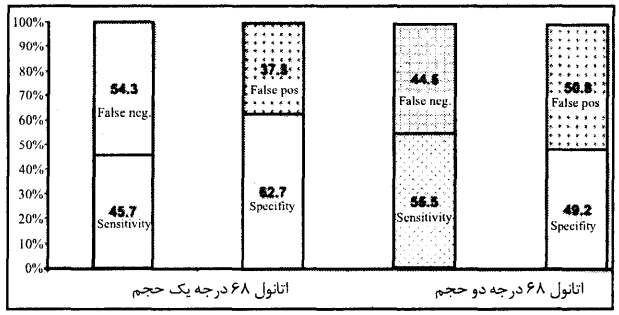
از مجموع ۱۴۰ نمونه شیر، تعداد ۱۲۱ نمونه (۸۶/۴ درصد) ازنظرCMT نرمال و تعداد ۹۱ نمونه (۱۳/۶ درصد) مثبت بودند. حساسیت تست الکل یک حجم جهت تفکیک شیرهای ورم پستانی از شیرهای نرمال ۵۲/۶ درصد، ویژگی آن ۵۹/۵ درصد، مثبت کاذب ۴۰/۵ درصد، منفی کاذب ۴۷/۴ درصد، ارزش پیشگویی مثبت ۱۶/۹ درصد و ارزش پیشگویی منفی ۸۸/۹ درصد به دست آمد (نمودار ۳). همبستگی بین نتیجه تست الکل یک حجم و CMT معنادار نبود.

میزان حساسیت تست الکل دو حجم جهت تفکیک شیرهای ورم پستانی از شیرهای نرمال ۶۳/۲ درصد، ویژگی آن ۴۷/۰ درصد، مثبت کاذب ۵۳/۰ درصد، منفی کاذب ۳۶/۸ درصد، ارزش پیشگویی مثبت ۱۵/۸ درصد و ارزش پیشگویی منفی ۸۹/۰ درصد به دست آمد. با دو برابر شدن حجم الکل حساسیت تست الکل ۱۰/۶ در صد افزایش و ویژگی آن ۱۲/۵ درصد کاهش یافت (نمودار ۳). همبستگی بین تست الکل دو حجم و CMT معنادار نبود.

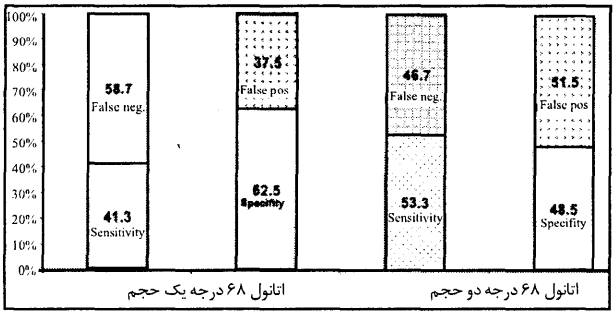
نتایج حاصل از اندازه گیری درصد چربی، درصد ماده خشک بدون چربی، وزن مخصوص، نقطه انجماد و درصد پروتئین در جدول ۱ آورده شده است. بین تست الکل یک حجم با درصد چربی، درصد ماده خشک، بدون چربی، وزن مخصوص و نقطه انجماد شیرهمبستگی معناداری مشاهده نشد. بین تست الکل یک حجم و میزان پروتئین شیرهمبستگی ضعیف اما معنی داری به میزان ۰/۱۹ مشاهده شد (P<۰/۰۳) . تست الکل دو حجم نیز فقط با میزان پروتئین شیرهمبستگی معناداری به میزان ۰/۲۲ داشت (P<۰/۰۲). به طوری که با افزایش پروتئین شیر پایداری آن در برابر الکل یک حجم و دوحجم افزایش می یافت.

جدول ۱- میانگین و انحراف ازمعیار حداقل و حداکثرفاکتورهای اندازه گیری شده درشیرهای مورد آزمایش.

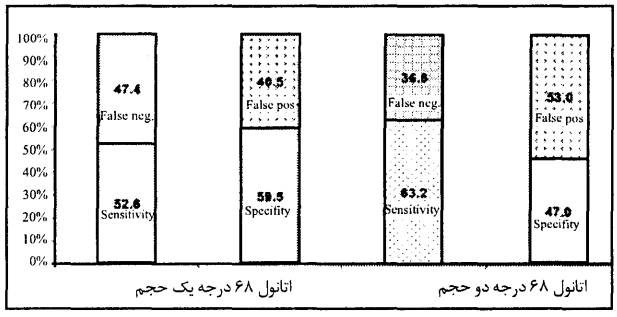
فاکتور	تعداد نمونه	میانگین ± انحراف معیار	حداقل	حداکثر
چربی (درصد)	۱۱۴	۳/۶۴ ± ۰/۴۶	۲/۵۴	۴/۴۳
ماده خشک بدون چربی (درصد)	۱۱۹	۸/۲۹ ± ۰/۴۷	۷/۲۹	۹/۲۹
وزن مخصوص	۱۱۴	۱/۰۳۱ ± ۰/۰۰۱	۱/۰۲۵	۱/۰۳۴
نقطه انجماد (درجه سانتیگراد)	۱۱۴	-۰/۵۴ ± ۰/۰۲	-۰/۳۴	-۰/۵۷
پروتئین (درصد)	۱۱۹	۳/۱۶ ± ۰/۲۶	۲/۵۲	۳/۸۱



نمودار ۱- حساسیت و ویژگی تست الکل برای تفکیک شیر از نظر اسیدیته.



نمودار ۲- حساسیت و ویژگی تست الکل برای تفکیک شیر از نظر بار میکروبی.



نمودار ۳- حساسیت و ویژگی تست الکل برای تفکیک شیرهای سالم از شیرهای ورم پستانی.

بحث

۱- ارتباط بین نتیجه تست الکل و اسیدیته شیر: با توجه به ضریب همبستگی بین نتیجه تست الکل و اسیدیته، بر اساس نتایج این تست نمی توان ارزیابی مناسبی از اسیدیته شیر به دست آورد. کم بودن میزان حساسیت و ویژگی تست الکل نیز مؤید این نکته است که این تست نمی تواند ارزیابی صحیحی درخصوص اسیدیته شیر به دست دهد (نمودار ۱).

نتایج تحقیقات مختلف در مورد تأثیراسیدیته بر روی نتیجه تست الکل متفاوت بوده است برخی از گزارشها مبین ارتباط بین پایداری شیر در برابر الکل و افزایش pH شیر است بدین معنی که با افزایش pH پایداری نسبت به الکل افزایش می یابد (۲۰). همچنین بعضی تحقیقات نشان می دهند که اگر اسیدیته شیر بیشتر از ۲۱ درجه درنیک باشد در برابر الکل ناپایدارخواهد بود (۱۳،۱۴). از سوی دیگر عده ای ازمحققین با استفاده از روشهایی مانند تبادل یونی (Ion exchange) اسیدیته شیرخام را کاهش داده اند و چنین نتیجه گرفته اند که با کاهش اسیدیته پایداری شیر درمقابل الکل افزایش می یابد (۱۲،۳۷). اما طبق نظر بسیاری از محققین هیچ ارتباطی بین حساسیت شیر به انعقاد توسط الکل و اسیدیته وجود ندارد. Danhlbert و Garner در سال ۱۹۲۱ به این نتیجه رسیدند که هیچ ارتباط مستقیمی بین حساسیت شیر به انعقاد توسط الکل و اسیدیته آن وجود ندارد (۱۱).

با افزایش اسیدیته و افزایش یونهای هیدروژن درشیر از میزان بار منفی سطح میسل های کازئین کاسته شده نیروی دافعه بین آنها کاهش می یابد و هنگام اضافه شدن الکل، به دلیل کاهش ثابت دی الکتریک شیر، میسل های کازئین تجمع یافته رسوب می کنند (۲۰). به هرحال علاوه بر اسیدیته شیر عوامل مداخله گر دیگری در ناپایداری کازئین شیردر برابر الکل مؤثر هستند که از ارزش تست الکل برای تشخیص شیرهای با اسیدیته بالا می کاهند. میزان و نوع الکترولیتهای شیر بویژه کلسیم، منیزیم، فسفات و سیترات (۱۰،۱۳،۱۴،۲۰،۲۳،۳۶) ثابت دی الکتریک شیر (۲۰)، مقدار و نوع مولکولهای کازئین (۲۲) و میزان آلبومین و گلوبولین شیر (۲۰،۳۶) ازجمله این عوامل هستند. کمیت و کیفیت این عوامل درشیر نیز تحت تأثیر شرایط گوناگونی ازجمله نژاد دام، سن دام، مرحله شیرواری، استرس، آبستنی، تغذیه، پروفایل متابولیکی گاو، سلامت پستان، سلامت گاو و خصوصیت فردی می باشد (۷،۱۰،۱۳،۲۰،۲۲).

عده ای ازمحققین در مورد "شیرهای با اسیدیته پایین و الکل مثبت" (Low acid-alcohol positive milk) تحقیقاتی انجام داده ناپایداری این شیرها دربرابر الکل را به عوامل دیگری غیر از میزان اسیدیته نسبت داده اند. Kaseda و همکارش در سال ۱۹۸۰ طی تحقیقی در کشور ژاپن علت مثبت شدن نتیجه تست الکل درشیرهای با اسیدیته پایین را سطح بالای کلسیم این شیرها ذکرکردند (۲۳). همچنین Lin و همکارش در سال ۱۹۸۷ درکشور چین به این نتیجه رسیدند که شرایط فیزیولوژیک گاو باعث مثبت شدن نتیجه آزمایش الکل شیرهای با اسیدیته پایین می شود (۲۷). برخی از محققین نقش کلسیم و منیزیم را در رابطه با نتیجه آزمایش الکل بسیار برجسته و قابل توجه می دانند. در واقع چنین گفته می شود که یکی از عوامل مهم مثبت شدن نتیجه آزمایش الکل عدم موازنه مواد معدنی شیر می باشد و در این میان نقش کلسیم و منیزیم بسیار با اهمیت است. درشیرطبیعی بین تمامی ترکیبات معدنی توازن وجود دارد و چنانچه عناصری مثل کلسیم و منیزیم افزایش یابند این تعادل به هم می خورد. بسیاری از دانشمندان براین باورندکه افزایش سطح کلسیم و منیزیم شیرعامل عمده ناپایداری این شیرها نسبت به الکل می باشد و حتی در بعضی تحقیقات نشان داده شده است که اگربه طریقی سطح کلسیم و منیزیم این گونه شیرها کاهش داده شود پایداری آنها نسبت به الکل افزایش می یابد (۲۰).

عده ای ازمحققین نیز بر این باورند که درشیر نسبتی بین مجموع کلسیم و منیزیم با مجموع سیترات و فسفات وجود دارد و درصورتی که این نسبت افزایش یابد شیرنسبت به الکل ناپایدار می شود (۱۴،۱۹،۲۰،۲۴،۳۵، ۷،۱۳). بعضی محققین دیگر، تأثیر افزایش کلسیم، منیزیم، سیترات و فسفات شیر را به صورت تجربی بررسی کرده چنین نتیجه گرفته اند که با افزایش کلسیم و منیزیم، پایداری شیر نسبت به الکل کاهش می یابد و برعکس با افزایش سیترات و فسفات، پایداری شیر نسبت به الکل بیشتر می شود. در این مورد تأثیرترکیباتی نظیرسدیم سیترات، دی سدیم فسفات و سدیم ارتوفسفات در افزایش پایداری شیر نسبت به الکل بررسی شده و نتایج مثبتی نیز به دست آمده است (۹،۱۸). Okada و همکاران در سال ۱۹۹۷ پس از تحقیقی در این زمینه بیان کردند که درگاوهایی که شیرهای الکل مثبت تولید می کنند میانگین غلظت آمونیوم و تری گلیسرید خون بالاتر ازگاوهایی با شیرالکل منفی می باشد (۳۱). همچنین Sato و همکاران در

سال ۱۹۸۲ بیان کردند که تجویز داروی منبوتن (Menbutone) به میزان ۵ گرم در روز و برای مدت دو روز به صورت خوراکی به گاوهای با شیرالکل مثبت، باعث افزایش پایداری شیرآنها نسبت به الکل می شود (۳۵). درتحقیق دیگری که به وسیله Okada و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام شد علت ناپایداری شیرنسبت به الکل، کمبود TDN بیان شد (۳۲). حال آنکه Motoi و همکاران در سال ۱۹۷۲ ناپایداری شیرنسبت به الکل را به افزایش میزان دریافتی TDN نسبت داده بودند (۲۹). Yan و همکارش در سال ۱۹۹۹ بیان کردند که درگاوهای با شیرناپایدار در برابر الکل متابولیسم قند، لیپید و پروتئین خون تغییرمی کند.این تغییر مستقیماً تحت تاثیرنوسان میزان هیدروکورتیزون خون می باشد (۴۱). Fukushima و همکاران در سال ۱۹۸۳ نیز فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (Aspartate aminotransferase) خون گاوهای الکل مثبت را بالاتر از حد طبیعی ذکرکردند (۱۵).

۲- ارتباط بین تست الکل و بار میکروبی شیر: با توجه همبستگی غیر معنادار بین نتیجه تست الکل و بار میکروبی شیر و همچنین حساسیت و ویژگی ضعیف تست الکل، این تست نمی تواند ارزیابی صحیحی از بار میکروبی شیر به دست دهد.

به دنبال آلودگی شیر در هنگام شیردوشی، حمل و نقل و نگهداری آن درشرایط نامناسب، میکروارگانیزم ها تکثیر یافته و تعداد آنها به صورت لگاریتمی افزایش می یابد. ازسوی دیگر باکتریهای تخمیرکننده لاکتوز، موجب افزایش اسیدیته شیرمی شوند (۴). در واقع به نظرمی رسد که مکانیزم اصلی تأثیر بارمیکروبی شیردرناپایداری کازئین در برابر اتانول تغییر بارهای الکتریکی کازئین و نیز افزایش اسیدیته شیر باشد. البته همان طورکه قبلاً نیزگفته شد عوامل مداخله گر بسیاری در ناپایداری کازئین دربرابر اتانول نقش دارند.

براساس مطالب موجود در بعضی کتب و مقالات چنانچه شیری بار میکروبی بالایی داشته باشد یا به عبارتی ازکیفیت بهداشتی پایینی برخوردار باشد جواب آزمایش الکل مثبت می شود(۱۳،۳۰). اما برخی از محققین بر این عقیده اند که ارتباطی بین نتیجه آزمایش الکل با بار میکروبی شیر یا به عبارتی کیفیت بهداشتی آن وجود ندارد. Waldhauer درتحقیقی که درسال ۲۰۰۰ در کشور نپال انجام داد چنین نتیجه گرفت که هیچ ارتباطی بین نتیجه آزمایش الکل و کیفیت بهداشتی شیروجود ندارد (۳۸). Alderson نیز درسال ۲۰۰۰ در طی تحقیقاتش درکشور بولیوی نشان داد که شیرهای الکل مثبت مشکلی از نظر بارمیکروبی نداشته و نرمال می باشند (۷). Gencurova و همکاران در سال ۱۹۹۳ نیز به نتایج مشابهی دراین زمینه دست یافتند (۱۷).

۳- ارتباط بین نتیجه تست الکل و تعداد سلولهای سوماتیک شیر: با توجه به همبستگی غیر معنی دار بین نتیجه تست الکل و نتیجه آزمایش CMT و حساسیت و ویژگی ضعیف تست الکل این تست نمی تواند ارزیابی صحیحی از تعداد سلولهای سوماتیک شیر به دست دهد.

درشیرگاوهای مبتلا به ورم پستان علاوه برافزایش تعداد سلولهای سوماتیک، میزان نمک و مواد معدنی شیر نیز افزایش می یابد (۲۶). به هم خوردن توازن مواد معدنی درشیر موجب تغییر بار الکتریکی میسل های کازئین شده و موجب ناپایداری آنها در برابر اتانول و در موارد پیشرفته تر تجمع میسل ها و رسوب آنها بدون حضور اتانول می شود. همچنین در ورم پستان pH مقدار و نوع پروتئین شیرتغییرمی یابد (۲) که این عوامل نیز در ناپایداری شیر در برابر اتانول تأثیر دارند.

درمورد ارتباط بین افزایش تعداد سلولهای سوماتیک شیر و نتیجه آزمایش الکل تحقیقات مختلفی صورت گرفته است. بعضی از محققین بر این عقیده اند که با افزایش تعداد سلولهای سوماتیک، شیرنسبت به الکل ناپایدارمی شود (۱۳،۱۶،۲۴) اما عده ای بر این عقیده اند که تعداد سلولهای سوماتیک شیر با نتیجه آزمایش الکل ارتباطی ندارد. Alderson نشان داد گاوهایی که شیرهای الکل مثبت تولید می کردند مشکل ورم پستان نداشته و تعداد سلولهای سوماتیک شیرآنها درحد طبیعی است (۷). Gencurova و همکاران در سال ۱۹۹۳ نیز در تحقیقی بر روی ۲۵۵۲ نمونه شیر مخلوط از گاوهای نژادهای مختلف درماه های مختلف سال نشان دادند که ناپایداری شیر در برابر الکل ارتباطی با تعداد سلولهای سوماتیک آن ندارد (۱۷).

۴- ارتباط بین تست الکل و میزان چربی، پروتئین، ماده خشک بدون چربی، وزن مخصوص و نقطه انجماد شیر: دراین تحقیق همبستگی بین نتیجه تست الکل با میزان چربی، ماده خشک بدون چربی، وزن مخصوص و نقطه انجماد شیرمعنادارنبود. بین نتیجه تست الکل یک حجم و دوحجم و میزان پروتئین شیرهمبستگی معنی دار و ضعیفی به ترتیب به میزان ۰/۱۹ و ۰/۲۲ (P<۰/۰۳) مشاهده شد. به طوری که با افزایش پروتئین شیر پایداری آن در برابر اتانول یک حجم و دو حجم افزایش می یافت.

Gencurova و همکاران در سال ۱۹۹۳بیان داشتند که پایداری شیر در برابر الکل با میزان چربی و پروتئین شیر رابطه منفی و با میزان لاکتوزو اوره شیر رابطه مثبت دارد (۱۷). نتیجه تحقیق حاضر از نظر رابطه پایداری شیر در برابر الکل با میزان چربی شیر با یافته آنها مطابقت ندارد و ز نظر رابطه تست الکل با میزان پروتئین مغایرت دارد. درخصوص مکانیزم اثرچربی بر روی نتیجه تست الکل توجیه خاصی ارایه نشده است و به نظرنمی رسد که ارتباط معناداری بین این دو وجود داشته باشد اما همان طورکه قبلاً نیز اشاره شد، میزان و نوع پروتئین بر نتیجه تست الکل تأثیردارد. هرچه میزان پروتئین شیر بیشتر باشد خاصیت بافری شیر بیشترخواهد بود و هرچه میزان کازئین و بخصوص کاپا کازئین بیشتر باشد پایداری آن در برابر اتانول افزایش می یابد(۲۰،۲۶).

با توجه به مطالعات محققین مختلف و همچنین نتایج این تحقیق می توان بیان نمود که تست الکل ملاک و معیار قابل قبولی جهت ارزیابی شیرگاو از نظرماندگی (اسیدیته بالا)، بارمیکروبی و تعداد سلولهای سوماتیک نمی باشد و همان گونه که این تست از دهه ۱۹۶۰ درآمریکا و بعد ازآن دراروپا کنارگذاشته شده است، پیشنهاد می شود در مراکز جمع آوری شیر و کارخانه هایی که امکان انجام آزمایشها با ارزش و معتبر مثل اندازه گیری اسیدیته قابل تیتر، شمارش سلولهای سوماتیک شیر و شمارش باکتریهای شیر وجود دارد، از این آزمایش استفاده نشود.

تشکرو قدردانی

بدین وسیله مراتب تشکرو قدردانی خود را از مدیریت محترم کارخانه شیرپاستوریزه شیراز، مراکزجمع آوری شیر اطراف شیراز به خاطر همکاری درتهیه نمونه و آقایان غلامعلی نیک نیا، خلیل زارع، حجت اله محمدی و فرزانه رضایی مهر به خاطر همکاری در مراحل مختلف تحقیق ابراز می نماییم.

References

۱. فاطمی، ح. (۱۳۸۰): شیمی مواد غذایی، چاپ دوم، شرکت سهامی انتشار، صفحه: ۴۵-۳۹ و ۷۸-۷۲.
۲. فرخنده، ع. (۱۳۷۰): روشهای آزمایش شیر و فرآورده های آن، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۱۹۴-۱۷۴.

۳. فرهنودی، ف. (۱۳۷۷): صنعت شیر، جلد اول، انتشارات شرکت جهاد تحقیقات و آموزش تهران، صفحه: ژ.
۴. کریم، گ. (۱۳۸۰): شیر و فرآورده های آن، چاپ دوم، مؤسسه فرهنگی هنری واقعه، نشر نیک‌خواه، صفحه: ۴۵-۵۲.
۵. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (۱۳۷۳): ویژگیهای شیرخام، چاپ سوم، شماره استاندارد ۱۶۴، صفحه: ۳-۲.
۶. وجگانی، م. و قراگزلو، ف. (۱۳۷۹): کنترل ورم پستان در گله های شیری، چاپ اول، نشرسپهر- نیکخواه، صفحه: ۱۷۹-۱۶۷.

7. Ayers, S.H. and Johnson, W.T. Jr. (1915): The alcohol test in relation to milk. US Dept. Agric. Bulletin 202, 1-50.
8. Biryukova, Z.A. and Smirnov, A.N. (1973): Effect of phosphates and citrates on heat stability of milk. USSR-LTIKP- Symposium Sovershenstvovanie tekhnologicheskikh protsessov Molochnoi-promyshlennosti, 47-51.
9. Burton, H., Pien, J. and Thieulin, G. (1965): Milk sterilization, FAO, pp: 165-176.
10. Dahlberg, A.O. and Garner, H.S. (1921): The alcohol test as a means of determining quality of milk for condenseries. US Dept. Agric. Bulletin 944, 1-50.
11. Donskaya, G.A., Potapova, M.A., chernyakova, T.G. and Popova, T. (1978): Use of ion exchangers to reduce milk acidity. Molochnaya promyshlennost, 9: 15-17.
12. Eckles, C. H., Combs, W. B. and Macy, H. (1951): Milk and Milk Products, 4th edition, McGraw- Hill Book Company, pp: 404-405.
13. FAO (1972): Payment for milk on quality, FAO, pp: 32-37.
14. Fukushima, Y., Doi, K. and Takisawa, T. (1983): Effect of Na, K and some drugs on alcohol unstable milk. J. Jap. Vet. Med. Asso., 36, 8: 440-445.
15. Gajdusek, S., Jelinek, P. and Hampl, A. (1996): Somatic cell counts in goat milk and their relationship with the composition and properties of milk. Zivocisna- Vyroba, 41, 1: 25-31.
16. Gencurova, V., Hanu, O., Beber, K., Kopecky, J. and Havlickova, K. (1993): Relationship between alcohol stability of cows milk and some components and factors of primary production. Zivocisna-Vyroba. 38,9: 837-848.
17. Hall, C.W. and Hedrick, T. I. (1971): Drying of milk and milk products, The Avi Publishing Company, Inc, pp:117-118.
18. Harding, F.(1995): Milk Quality. Blackle Academic and Professional, PP: 49-50.
19. Horne, D.S. and Fox, P.F. (1992): Advanced dairy chemistry – 1: Proteins, Elsevier Applied Science, London, pp: 621-689.
20. Horne, D.S. and Parker, T.G. (1981): Factors affecting the ethanol stability of bovine casein micelles: 3. Substitution of ethanol by other organic solvents. Int. J. Biol. Macromol. 3: 399-402.
21. Horne, D.S. and Parker, T.G. (1982): Some aspects of the ethanol stability of caprine milk. J. Dairy Res. 49: 459-68.
22. Kaseda, Y. and Kubozone, H. (1980): The relationship between cause of the low acid-alcohol positive milk and the mineral contents of milk. Jap J of Zootechnical Sci. 51, 7: 455-462.
23. Koyama, S., Suzuki, K., Hada, k. and Nakanashi, G. (1971): Studies on the heat denaturation of whey proteins and the relationship between alcohol and PL test positive milk and the component of blood serum protein. Bulletin of the college of agriculture and veterinary medicine, Nihon University, 28: 122-136.
24. Lampert, L.M. (1970): Modern dairy products, Chemical Publishing Company, Inc. PP: 35-45, 53-54.
25. Lin, C.S. and Lin, P.C. (1987): A study on so-called low acidity grade B milk and relationship of milk quality with alcohol test, acidity and CMT. J Chinese Society Vet Sci. 12, 3: 227-234.
26. Marvin, L. (1976): Compendium of methods for the microbiological examination of food. American Public Health Association, pp: 107-130.
27. Motoi, Y., Lizuka, M. and Nishimura, H. (1972): Milk quality and blood composition of cows fed different rations in the suburbs., J Jap Vet Med Asso. 25, 11: 663-668.
28. Nakazawa, Y., Sakauchi, T. and Miyazawa, T.A. (1980): study on milk deposit formaton from mastitic and second grade milk. Jap J Dairy Food Sci. 29, 2: 69-75.
29. Okada, K., Kikuchi, K., Sato, T., Morito, Y., Tako, M., Ogino, T. and Kaneda, Y. (1997): Relationship between white scour of calf and alcohol stability of milk in Japanese black cattle. J. Jap. Vet. Med. Asso. 50, 2: 74-79.
30. Okada, k., Shiga, A., Fukaya, A., Sagawa, K., Nakamoto, T., Togawa, A., Furukawa, T., Hirata, T., Shiroto, A. and Naito, Y. (2001): Changes in quantity, components, and properties of postpartum milk in Japanese black cows. J. Jap. Vet. Med. Asso. 54, 3: 185-190.
31. Padmos, W.H. (1930): On the value of the alcohol test for the appraisal of milk. J. Dairy Res.1: 201.
32. Ramsdell, G.A., Johnson, Jr., W.T. and Evans, F.R. (1931): A test for the detection of milk unstable to heat. J. Dairy Sci. 14: 93-106.
33. Sato, T., Nakano, M., Sato, M. and Kobayashi, M. (1982): Treatment with a 10-fold dilution of Menbutone to prevent alcohol unstable milk. J. Vet. Med. 730: 260-267.

34. Seehafer, M.E. (1967): The development and manufacture of sterilized milk concentrate. FAO, PP: 10-13.

35. Sokolova, L.T., Morozova, N.M. and Shanova, K.M. (1972): Changing the acidity and mineral composition of milk by treatment with anion-exchange resins to increase its heat stability. Molochnaya promshlennost. 10: 15-17.

36. Webb, B.H., Johnson, A.H. and Alford, J.A. (1974): Fundamentals of dairy chemistry, second ed., The Avi Publishing Company, Inc, PP: 92-96, 111-117.

37. White, J.C.D. and Davies, D.T. (1956): The relation between the rate of heat coagulation of milk and its protein and mineral composition. Proc. XIV Int. Dairy Congress. (Rome). 1, II: 288-301.

38. Yan, F. and Yan, F. (1999): Relationship between fluctuation of blood hydrocortisone and its metabolism in the cow with alcohol positive milk. J. Jilin Agricultural University. 16, 1: 60-63.