ارزیابی تغییرات جمعیت میکروبی بیماریزا در طول دوره رسیدگی پنیر سنتی کردی

سید علی مرتضوی[1]، مرضیه معین فرد[2] و الناز میلانی[3*]

1- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

2- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

3- استادیار پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت:1392/2/11 تاریخ پذیرش: 1392/8/9

چکیده

پنیر محلی حاصل از شیر خام یکی از پرمصرف ترین پنیرهای موجود در دنیا می باشد. با این حال، موضوع انتقال برخی باکتری های بیماریزا در این فرآورده، از دیدگاه سلامت عمومی بسیار قابل اهمیت است. برخی گزارشات در خصوص شیوع عفونت غذایی ناشی از مصرف پنیر و حضور ارگانیسم های بیماریزا داخل آن می باشد. پنیر کردی، نوعی پنیر نیمه سخت بوده و بصورت سنتی در نواحی شرق ایران از شیر خام گوسفندو گاو تولید می شود. این پنیر دوره رسیدگی خود را داخل مشک می‌گذراند، در نتیجه اغلب مجموعه ای از واریته های گوناگون میکروارگانیسم بوده و دارابودن ویژگی های حسی منحصر به فرد، این نمونه پنیر را ممتاز ساخته است. هدف از این مطالعه، بررسی میکروارگانیسم های آلوده کننده پنیر در 4 دوره زمانی 0، 20، 40 و 60 روز دوره رسیدگی، در شرایط سنتی بود. شمارش کل باکتری های مزوفیل، کلی فرم، اشرشیاکلی، کپک، مخمر، سالمونلا و استافیلوکووس اورئوس مطابق روش های استاندارد ملی ایران انجام شد.نتایج نشان داد، شمارش میکروارگانیزم‌ها پس از گذشت 20 روز به حداکثر میزان خود رسید که از این میان کلی فرم ها و اشریشیاکلی مهمترین گروه بودند. ولی با گذشت زمان تعداد آن‌ها کاهش یافت و در پایان دوره رسیدگی هیچ کلی‌فرم و اشرشیاکلی در نمونه‌ها مشاهده نشد. میانگین شمارش کپک ومخمر مربوط به 2 نمونه پنیر در روز اول معادل 4×10^5 CFU/ml بود امادر 20 روز بعد از تولید به شکل قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت ولی تا پایان دوره رسیدگی روند کاهشی را طی کرد. بررسی‌های انجام شده حاکی از عدم حضور سالمونلا و استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت طی دوره نگهداری بود. در طول دوره رسیدگی پنیر، pH نمونه‌ها به آهستگی کاهش یافت. مطابق نتایج این پژوهش؛ حضور مقادیر بالااز میکروفلور بیماریزا در نمونه های پنیر در اولین روزهای تولید بیانگر عدم رعایت پروسه بهداشتی در حین مراحل انتقال و تولید پنیر سنتی بود. اما زمان بهینه مصرف پنیر کردی محلی در انتهای دوره رسیدگی 60 روزه و بواسطه کاهش میکروفلور نامطلوب، کاهش pH و افزایش جمعیت میکروفلور مفید اسید لاکتیک باکتریها می باشد.

واژه های کلیدی: پنیرسنتی کردی، کلی‌فرم، کپک و مخمر، استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت و سالمونلا.

* مسوول مکاتبات : e_milani81@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

1- مقدمه

ارزش تغذیه‌ای فراورده‌های لبنی به شدت تحت تاثیر کیفیت شیر خام اولیه قرار دارد. در ایران تولید پنیراز گذشته معمول بوده، به طوریکه بر اساس آمارهای موجود حدود 20 درصد شیر تولیدی در کشور در بخش صنایع لبنی به پنیر تبدیل می‌شود؛ از این مقدار سهم تولید پنیر سنتی حدود 80 درصد را تشکیل می‌دهد(2 و13). افزون بر توسعه کارخانجات پنیرسازی، بسیاری از تولید کنندگان در سراسر دنیا علاقه دارند روش‌های تولید سنتی خود را حفظ نمایند. به طوریکه در حال حاضر انواع پنیر صنعتی کمتر از پنیرهای سنتی می‌باشد. در ایران انواع مختلفی از پنیرها به طرق سنتی تولید می‌شود، به عنوان مثال در نواحی غربی پنیر لیقوان و پنیر کوزه و در نواحی شرقی نیز پنیر کردی به دلیل عطر و طعم مطلوب خود از معروف‌ترین و پرطرفداران محصولات می‌باشند(13 و21). روش تولید پنیر کردی بدین صورت است که، ابتدا شیر تازه گوسفند بلافاصله پس از دوشش تا دمای 45-43 درجه سانتی گراد گرم شده و قرص پنیر حاصل از کپک آسپرژیلوس نیجر اضافه می شود، سپس ظرف ها برای 1 ساعت در دمای 40 درجه سانتی گراد قرار می گیرند. پس از انعقاد، نمک به مقدار مساوی بر روی دلمه ها ریخته شده و پس از برش زدن، 15 دقیقه به حال خود رها می شوند. پس از این مرحله به منظور خروج آب اضافی، دلمه ها در داخل پارچه قرار گرفته و تحت فشار، به مدت یک ساعت در داخل یخچال نگهداری می شوند. سپس دلمه ها از پارچه خارج شده و درون آب نمک 12 درصد قرار می گیرند. دلمه های تولید شده به مدت 2 هفته داخل یخچال باقی مانده وسپس درون پوست بزغاله و آب نمک 12 درصد، در دمای یخچال نگهداری می شوند. لازم به ذکر است؛ پوست بزغاله قبل از استفاده کاملا تمیز و درآب جوش قرار گرفته و سپس نمک زنی و خشک می گردد. در زمان استفاده، پوست مجددا توسط آب شسته و منافذ آن (قسمت های پا و دست) توسط نخ بسته می شود. از میان پنیرهای سنتی که در سایر کشورها تولید می‌شود می توان به پنیرگیبنابایدا[1](20)، پنیرآفوئگال پیتو[2](19)، پنیرآرمادا[3] (33)، پنیرگنستوسو(15) و پنیرترکی(31) اشاره کرد.

علی رغم برتری حسی پنیرهای سنتی به پنیرهای صنعتی، مسئله مهم در تولید این فراورده لبنی، استفاده از شیر خام بوده و به دلیل آلوده شدن شیر در مراحل تولید و پس از دوشش احتمال آلودگی پنیرهای تولید شده از این شیر به انواع میکروب‌های بیماری‌زا وجود دارد(11، 12 و13). عامل بسیاری از بیماری‌های ناشی از مواد غذایی مانند فراورده‌های لبنی از جمله پنیر، گونه‌های سالمونلا و استافیلوکوک می‌باشند که امروزه به یک نگرانی در صنعت لبنیات تبدیل شده است. حجم انبوهی از میکروارگانیسم‌ها طی دوره رسیدگی در پنیر یافت می‌شوند که هر کدام از آن‌ها نقش بسزایی در ویژگی های فراورده نهایی ایفا می‌کنند(15 و19). میان این گروه عظیم میکروارگانیسم‌ها برهمکنش‌های متعددی رخ می‌دهد؛ به عنوان مثال برخی از آن‌ها با تجزیه پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و ویتامین‌ها، ترکیباتی را تولید می‌کنند که برای رشد دسته دیگری از میکروارگانیسم‌ها ضروری است(15 و17).

ماسدو[4] و همکاران(1995)، میکروفلور پنیر سِرا[5] را طی 35 روز رسیدگی و در سه بازه متفاوت در دوره شیردهی مورد بررسی قرار دادند. بعد از گذشت 7 روز، میزان میکروارگانیسم‌ها به حداکثر خود رسید و باکتری‌های اسیدلاکتیک و کلی‌فرم‌ها انواع غالب بودند(24).

آقازاده مشگی(1386)، خصوصیات میکروبیولوژی پنیر کوزه آذربایجان غربی را مورد مطالعه قرار داد. نتایج نشان دهنده وجود میکروارگانیسم‌هایی مثل اشرشیاکی و استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت در پنیرهایی بود که مدت زمان زیادی از رساندن آن‌ها نگذشته بود در حالیکه در پنیرهایی با بیش از 1 سال دوره رسیدگی، باکتری‌های بیماری‌زا یافت نشدند(1).

نجفی و همکاران(1387)، ویژگی‌های میکروبیولوژیکی پنیر پوستی و تاثیر فرایند رسیدن بر آن را طی 90 روز مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان دادند که طی دوره رسیدن، کلی‌فرم و استافیلوکوکوس اورئوس مهار شده و تعداد آن‌ها کاهش یافته و در پایان ماه سوم رسیدن هیچ کلی‌فرمی از پنیر ایزوله نشد. تعداد کپک و مخمر روند افزایشی کندی داشت (12).

پنیر کردی، از انواع پنیرهای سنتی است که در محدوده کلات و قوچان از شیر گوسفند، گاو و یا مخلوط هردو تولید

1- Gibana Bayda
2- Afuega'l Pitu
3- Armada
4- Macedo
5- Serra

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود؛ بافتی سفت داشته و دوره رسیدگی خود را داخل مشک می‌گذراند و بنابراین چنین شرایط نامتعارفی می‌تواند روی بار میکروبی محصول، بسیار تأثیرگذار باشد. در ایران تمایل به مصرف پنیرهای سنتی هنوز وجود دارد و از آنجا که این قبیل فراورده‌های لبنی، از شیر خام تهیه شده به دلیل حضور میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، امکان بروز انواع مسمومیت‌ها وجود دارد. بنابراین مطالعه تغییرات جمعیتی انواع میکروارگانیزم‌ها در طول دوره رسیدگی دپنیر محلی کردی به منظور تعیین میزان سلامت محصول نهایی امری ضروری است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- نمونه برداری و تهیه رقت ها

به منظورارزیابی تغییرات جمعیت میکروبی بیماری زای پنیر کردی، نمونه برداری بصورت تصادفی از نقاط مختلف منطقه کرمانج کلات، انجام گرفت. نحوه انتخاب مکان براساس بیشترین میزان دام و بیشترین میزان تولید پنیر کردی در میان افراد منطقه صورت گرفت. 2 نمونه پنیر، هریک به وزن 1 کیلوگرم داخل پوست و تحت شرایط دمای یخچال (4°C) جهت ارزیابی فلور میکروبی بیماری‌زا شامل شمارش کلی، کپک و مخمر، کلی فرم، اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا، در 4 بازه زمانی 0، 20، 40 و 60 روز پس از تولید، به آزمایشگاه منتقل شد. در این پژوهش، بررسی در 6 رقت و در 3 تکرار انجام شد (10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6}، 10^{-7}، 10^{-8}). بدین منظور جهت تهیه سوسپانسیونی همگن، 25گرم نمونه پنیر، داخل بگ‌های استریل حاوی 225 میلی‌لیتر محلول استریل سیترات سدیم منتقل گردید و توسط دستگاه استومکر (Stomacher 400 Circulator)

جدول1- مشخصات محیط کشت و شرایط گرمخانه گذاری برای تشخیص و شمارش باکتری ها

زمان گرمخانه گذاری	دمای گرمخانه گذاری(°C)	محیط کشت	میکروارگانیسم
72 ساعت	30	پلیت کانت آگار	شمارش کلی
48-24 ساعت	30	ویولت رد بایل لاکتوز آگار	کلی‌فرم
24 ساعت	30	لاکتوز برلیان گرین براث استریل حاوی لوله دورهام	کلی‌فرم (آزمون تاییدی)
24 ساعت	37	آبگوشت لوریل سولفات تریپتوز با غلظت مضاعف و معمولی حاوی لوله دورهام	اشرشیاکلی
24 ساعت	45	آبگوشتEC که حاوی لوله دورهام	اشرشیاکلی
48 ساعت	حمام آب 44 °C	آب تریپتونه	اشرشیاکلی(آزمون تاییدی)
24 ساعت	37	آزمون IMVIC	اشرشیاکلی(آزمون تاییدی)
5 روز	25	YGC	کپک و مخمر
20 ساعت	37	محیط پیش غنی کننده آب پپتون بافره	سالمونلا
24-18 ساعت	44	محیط غنی‌کننده تتراتیونات	سالمونلا
24 ساعت	37	بیسموت سولفیت آگار(BSA)	سالمونلا
24-18 ساعت	37	نوترینت آگار	سالمونلا
24 ساعت	37	(آزمون های سه قندی، اوره آگار، لیزین دکربوکسیه شونده، وگوس پروسکوئرو ایندول)	سالمونلا (آزمون تاییدی)
24 ساعت	37	برد پارکر آگار+تلوریت پتاسیم+امولسیون زرده تخم مرغ	استافیلوکوک‌های گواگولاز+
24 ساعت	37	آبگوشت عصاره مغز و قلب(BHIB) و پلاسمای خرگوش	استافیلوکوک‌های گواگولاز + (آزمون تاییدی)

www.SID.ir

ساخت انگلستان بطور کامل هموژن و سپس فیلتر شد تا ذرات معلق آن حذف شود به این ترتیب اولین رقت 10^{-1}، تهیه شد. برای انجام پژوهش، سایر رقت‌ها از این رقت تهیه شدند(16، 21، 30، 32و33).

2-2- آزمون های میکروبی

درکلیه آزمون ها پس از کشت در محیط های اختصاصی مطابق جدول1، شمارش پرگنه های تشکیل شده توسط دستگاه پرگنه شمار انجام شد(5، 6، 7، 8، 9و10). لازم به ذکر است کلیه محیط کشت های مصرفی، ساخت شرکت مرک آلمان بود.

2-3- آزمون های شیمیایی

pH نمونه های پنیر براساس روش AOAC، با استفاده از pH سنج دیجیتالی(Microprocessor, model 537) تعیین گردید و تمام محیط کشت‌های مورد استفاده ساخت شرکت مرک آلمان بودند(1 و12).

2-4- روش تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل و انجام آنالیز واریانس داده ها از نرم‌افزار Minitab ver 13.1 با سطح اطمینان 95% و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار Mstatc و آزمون چنددامنه ای دانکن استفاده شد. برازش خطوط و ترسیم منحنی‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزارهای Slide Write و Excel 2007 انجام شد.

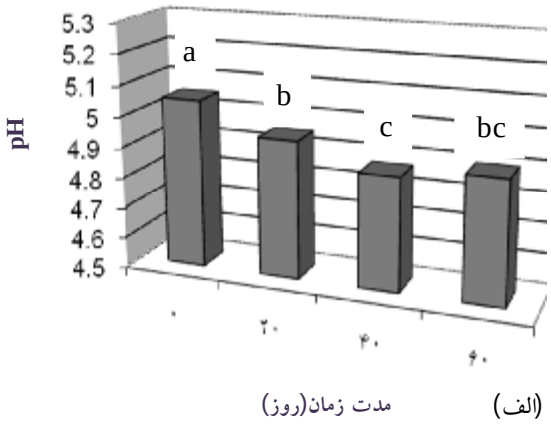
3- نتایج و بحث

3-1- اثر زمان رسیدن برتغییرات pH طی دوره رسیدگی

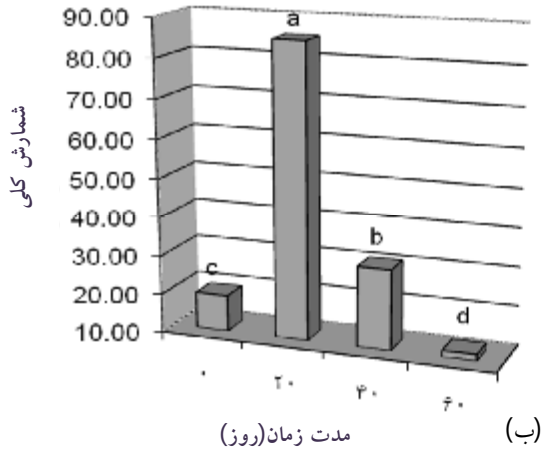
چنانکه در شکل1- الف، مشاهده می شود، pH نمونه‌ها در روز تولید 5/05 گزارش شد؛ طی دوره رسیدگی مورد بررسی، پس از گذشت 40روز، pH پنیر کردی، از لحاظ آماری کاهش معنی داری داشت($p<0.05$). این پدیده بواسطه مجموعه فرایندهای متابولیکی باکتری های اسید لاکتیک و تولید اسیدهای ارگانیک بویژه اسید لاکتیک، قابل توجیه است. البته باید توجه داشت که pH پنیر تنها به میزان اسیدلاکتیک تولید شده توسط فلور میکروبی وابسته نیست، بلکه ظرفیت بافری دلمه که خود ناشی از میزان کازئین، سیترات و فسفات است نیز در آن نقش دارد. با این حال با گذشت 60 روز رسیدگی، pH نمونه‌ها به تدریج افزایش یافت و به4/90 رسید. افزایش pH در انتهای دوره رسیدگی ناشی از تاثیر میکروفلور سطح پنیر نظیر ژئوتریکوم کاندیدوم و پنی سیلیوم کاممبرتی بود که به سرعت سبب اکسیداسیون لاکتات به CO_2و H_2O شده، از این رو سبب خنثی نمودن طبیعت اسیدی فراورده می گردد. همچنین مصرف اسید لاکتیک سبب تشکیل محصولات غیر اسیدی و آزادسازی فراورده های الکلی حاصل از پروتئولیز می شود. در انتهای دوره رسیدگی نیز، فعالیت پروتئولتیکی، سبب تولید آمونیوم و افزایش pH می گردد(15).

3-2- اثر زمان رسیدن بر شمارش کلی باکتری‌ها

شکل 1-ب، اثر زمان رسیدن را بر شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها به همراه مقایسه میانگین ها نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که بعد از گذشت 20 روز از شروع دوره رسیدگی تعداد میکروارگانیسم‌ها به حداکثر خود افزایش یافت و بعد از آن و تا پایان دوره با کاهش تدریجی آن مواجه شدیم که احتمالا به



(الف)



(ب)

شکل 1- اثر زمان رسیدن بر تغییرات pH طی دوره رسیدگی (الف) و اثر زمان رسیدن بر شمارش کلی باکتری‌ها (ب)

Archive of SID

www.SID.ir

دلیل کاهش pH و ایجاد شرایط مطلوب برای باکتری‌های اسید لاکتیک است. شمارش بالای میکروارگانیسم‌ها در روز اول نسبت به روزهای 40 و 60 نیز احتمالا به دلیل میزان بالای کلی‌فرم در روز اول مربوط می‌شود(30 و32).

نتایج تحقیقات انجام شده توسط تورنادیجو[1] و همکاران(1995)، نیز نشان داد که اغلب گروه‌های میکروبی خصوصاً شمارش کلی میکروارگانیسم‌های هوازی مزوفیل در هفته اول رسیدگی به بالاترین حد خود رسید که احتمالاً به دلیل افت pH در هفته اول باشد که محیط را برای رشد انواع باکتری‌های اسید لاکتیک مناسب کرده است و بعد از آن و تا رسیدن به پایان دوره نگهداری، شمارش میکروبی تدریجاً کاهش یافت(31). محققین دیگری نیزنشان دادند که شمارش کلی باکتری‌ها برای پنیر آفونگال پیتو که سه روز از تولید آن می‌گذشت Log cfu/ml 0/56±9/26 و در پنیری که 60 روز از تولید آن می‌گذشت Log cfu/ml 0/47±8/06 بود که بیانگر کاهش شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها طی دوره رسیدگی است(28). نتایج تحقیق انر و همکاران (2006)، روی پنیر سفید ترکی نشان داد که میزان باکتری‌های مزوفیل هوازی در روز اول بیشترین مقدار را داشته سپس تا رسیدن به روز 105 به تدریج کاهش یافت(29). اونی[2] و همکاران(2008)، نیز نشان دادند که شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در پنیر سنتی گیبنا بایدا تا روز 60 افزایش یافت ولی بعد از آن و تا رسیدن به روز 240 شمارش باکتری‌ها روند کاهشی تدریجی را نشان می‌داد. افزایش شمارش کلی باکتری‌ها احتمالاً به رشد سریع میکروارگانیسم‌ها در طی مراحل اولیه انبارداری مربوط می‌شود(28). با این حال بعد از 60 روز نگهداری شمارش کلی کاهش یافت که احتمالاً به دلیل افزایش میزان اسید لاکتیک در محیط می‌باشد که می‌تواند مانع از رشد میکروارگانیسم‌ها شود (19،20و32) شمارش بالای میکروارگانیسم‌ها تا روز 20 نیز احتمالاً به دلیل حضور مقادیر بالای کلی‌فرم در پنیر بیان شده است(20).

3-3- اثر زمان رسیدن بر کلی‌فرم‌ها و اشرشیاکلی

شکل2-الف و جدول2 به ترتیب اثر زمان رسیدن را بر شمارش کلی‌فرم‌ها و اشرشیاکلی نشان می‌دهد. براین اساس، با گذشت زمان، تعداد کلی‌فرم‌ها و اشرشیاکلی کاهش یافت. استثنائا در روز 40افزایش میزان کلی‌فرم‌ها مشاهده شد. از آنجاکه نمونه‌گیری از نقاط مختلف صورت پذیرفت، ممکن است نمونه مورد نظر در این زمان با پوست تماس بیشتری داشته و کاهش بار میکروبی آن در زمان دیرتری نسبت به سایر نقاط صورت گرفته باشد؛ ولی در روز60، حذف کلی این دسته از میکروارگانیسم‌ها در نمونه پنیر مشاهده شد. افزایش جمعیت باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و کاهش pH، آنتاگونسیم ایجاد شده توسط سایر فراورده‌های متابولیکی تولیدی و کاهش مواد مغذی از دلایل کاهش این گروه از میکروارگانیسم‌ها است(1).

تاثیر فرایند رسیدن پنیر بر کاهش باکتری‌های کلی‌فرمی توسط سایر محققین نیز گزارش شده است(2 و33). مطابق نتایج پژوهشی در پنیر پوستی تولوم میزان کلی‌فرم‌ها طی دوره رسیدن کاهش یافته و بعد از 150 روز رسیدن کاملاً از بین رفتند(23). تحقیقات گواریس[3] و همکاران (2002) نشان داد که اشرشیاکلی بعد از 40 روز رسیدن در پنیر فتا و تلمز[4] قابل جداسازی نبود(19). محققین دیگر نیز گزارش کردند، در پنیر سنتی کاشار[5]، به ترتیب بعد از 30 و60 روز دوره رسیدن، هیچ گونه کلی‌فرمی قابل جداسازی نبود (13،14،16،22،24). نتایج نجفی و همکاران (1387)، نشان داد که در نمونه‌های کشت شده از پنیر پوستی تازه، کلی‌فرمی رشد نکرد ولی بعد از 30 روز نگهداری درون پوست، تعداد کلی‌فرم‌ها افزایش یافته و به بیشتر از حد استاندارد رسید(12و14). آلودگی پوست بز، آلودگی دست، هنگام انتقال پنیر به درون پوست یا آلودگی محیط کار از عوامل این افزایش به شمار می روند. نتایج پژوهش نشان داد؛ میزان کلی‌فرم‌ها طی دوره رسیدن کاهش یافته و در روز 90 به صفر رسیدند(13).

جدول 2- بررسی جمعیت اشرشیاکلی در 2 نمونه پنیر کردی طی دوره رسیدگی

	زمان رسیدن (روز)			
	1	20	40	60
تعداد میکروارگانیسم‌ها (cfu/gr)	$1/87\times10^5$	$1/25\times10^5$	2×10^3	منفی

1- Tornadijo
2- Owni
3- Govaris
4- Telemes
5- Kashar

Archive of SID

www.SID.ir

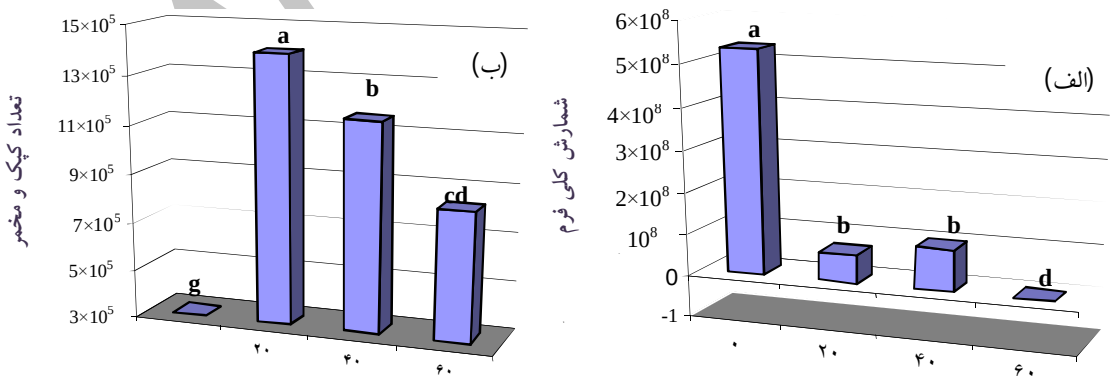
نتایج تحقیقی دیگر بر تغییرات میکروبی و بیوشیمیایی پنیر گریک گریور[1] طی 6 ماه رسیدگی نیز بیانگر حضور انتروکوکسی‌ها و کلی‌فرم‌ها در پنیر تازه بود ولی بعد از اتمام دوره نگهداری، این میکروارگانیسم‌ها به کلی از بین رفتند(31). نتایج محققین، حضور انتروکوکسی‌ها را به میزان زیادی در پنیر آرمادای تازه نشان‌داد به طوری که در طی دوره رسیدگی کاهش یافته و از بین رفتند(29). نتایج بررسی دیگر نشان داد؛ میزان انتروباکترها در پنیر سنتی گنستوسو طی دو روز رسیدگی به حداکثر خود رسید و بعد از آن شروع به کاهش نمود. بطوریکه بعد از 60 روز هیچ اثری از این باکتری‌ها در پنیر رسیده یافت نشد(15). نتایج تحقیق اونی(2008)، نشان داد که میزان کلی‌فرم از روز اول تولید پنیر گیبنا باید تا روز 60 کاهش یافته، به طوریکه در روز 280 هیچ کلی‌فرم در نمونه‌ها مشاهده نشد. میزان اشرشیاکلی نیز در پنیر به طور ناگهانی در روز 60 کاهش یافت به طوری که در روز 180 و240 هیچ اشرشیاکلی در نمونه‌ها مشاهده نشد(28).

طی عملیات رساندن رشد پاتوژن‌ها توسط فعالیت باکتری‌های اسیدلاکتیک متوقف می‌شود. اخیرا نیز ثابت شده است که سوش‌های لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی از طریق تولید باکتریوسین اثر آنتاگونیستی شدیدی علیه اشرشیاکلی اعمال می‌کنند. فاکتورهای متعددی در کاهش میزان کلی‌فرم‌ها در طی دوره رسیدگی نقش دارند که از این میان می‌توان به افزایش غلظت نمک، فعالیت باکتری‌های اسید لاکتیک و کاهش pH و نگهداری در دمای پایین اشاره نمود(30).

3-4- اثر زمان رسیدن بر شمارش کپک و مخمر

شکل 2-ب اثر زمان رسیدن را بر شمارش کپک ومخمر نشان می‌دهد. نتایج نشان دادند که میزان کپک و مخمر از روز 20 تا روز 60 کاهش یافت. در مقالات متعددی به کاهش تعداد مخمرها و کپک‌ها طی دوره رسیدگی اشاره شده است ولی به دلیل مقاومتی که این گروه از میکروارگانیسم‌ها در مقابل کاهش رطوبت و افت pH دارند (به دلیل قدرت تجزیه اسید توسط آن‌ها) می‌توانند زنده مانده و رشد کنند(1 و29) بررسی نتایج آقازاده مشگی (1386)، بیانگر این مطلب بود که کپک‌ها و مخمرها با تعداد بسیار بالا در نمونه‌های پنیرکوزه حضور داشتند. بالا بودن تعداد آن‌ها می‌تواند نشان دهنده آلودگی اولیه بالا با منشاء محیطی یا دست آلوده افراد تهیه کننده پنیر باشد(1).

زرفیریدیس و همکاران (1984)، نشان دادند که در برخی از پنیرهای تازه گریک گریور مخمر وجود داشت. مخمرها تا روز 15 افزایش داشته و به 10^4 CFU/gr رسیدند و در روز 45 به 10^3 CFU/gr کاهش یافتند و سپس تا پایان 6 ماه رسیدگی در همین محدوده باقی ماندند(31). در نتایج به دست آمده از مطالعات کِویستا(1996)، تعداد مخمرها، با گذشت 3روز از تولید پنیر آفوئگال پیتو، به میزان 2 سیکل لگاریتمی افزایش یافت؛ اما پس از 30 روز و تا رسیدن به روز 60 تعداد مخمرها کاهش یافت. کپک‌ها نیز روندی مانند مخمرها را در طی دوره رسیدگی نشان دادند، با این تفاوت که در شیر مورد استفاده جهت تهیه پنیر و دلمه تولیدی از آن، هیچ گونه کپکی مشاهده نشد(18).



شکل 2- اثر زمان رسیدن برشمارش کلی فرم (الف) و کپک و مخمر (ب)، طی دوره رسیدگی

[1]- Greek Gruyere

Archive of SID

www.SID.ir

با این حال نتایج اونر و همکاران(2006)، نشان داد؛ میزان کپک و مخمر طی 105 روز رسیدگی پنیر سفید ترکی کاهش قابل توجهی نداشته است(28). لیپولیتیکی این دسته از میکروارگانیسم‌ها است.

حضور مخمرها در پنیر طی دوره رسیدگی ناشی از قدرت متابولیزه کردن اسید و نیز فعالیت پروتئولیتیکی و در سطح بسیاری از پنیرهای نرم و نیمه نرم رسیده، مقادیر زیادی مخمر مشاهده می‌شود که منشا آن‌ها غالبا تجهیزات و محیط اطراف می‌باشد. البته یک عامل مهم در افزایش میزان مخمرها، آب نمک مورد استفاده در فرایند تولید می‌باشد. با این وجود این نکته را نیز باید در نظر گرفت که میزان مخمرها از یک واحد تولیدی به واحد دیگر و حتی در یک واحد تولیدی یکسان، در روزهای مختلف تولید می تواند متفاوت باشد. این اختلاف می‌تواند به کارایی پاستوریزاسیون، اختلاف در غلظت آب نمک و دمای مورد استفاده و همچنین آلودگی‌های ناخواسته به مخمرها در طی فرایند تولید مربوط باشد (30).

3-5- اثر زمان رسیدن بر استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت

نتایج آزمایشات، بیانگر عدم حضور استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت در نمونه پنیر کردی است. این نتایج در تحقیق‌های انجام شده توسط برخی دانشمندان دیگر نیز یافت شده است. تحقیق کِویستا و همکاران (1996)، بر روی پنیر آفوئگال پیتو نیز نشان داد اغلب آلودگی ناشی از حضور میکروکوک‌ها بوده است و نشانی از آلودگی با پاتوژن‌هایی از قبیل استافیلوکوک‌ها یافت نشد(18). با این وجود تحقیقات انجام شده نشان می‌دهند که در صورت بروز آلودگی، این میکروارگانیسم طی دوره رسیدن کاهش خواهد یافت. نگرانی در رابطه با وجود استافیلوکوکوس اورئوس در شیر خام، ناشی از انتقال این میکروارگانیسم از طریق شیر خام به فراورده‌های لبنی بوده و در نیتجه سبب بروز مسمومیت غذایی در مصرف کنندگان می گردد. بر اساس گزارشی در نروژ، 38-20 درصد از فراورده‌های لبنی حاصل از شیر خام به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده می‌باشند(25). نتایج حاصل از تحقیق آقازاده مشگی (1386)، نشان داد که با توجه به مدت رسیدن پنیرها، باکتری‌های بیماری‌زا و مسمومیت‌زا در هیچ یک از نمونه‌هایی که بیش از یک سال دوره رسیدن را طی کرده بودند یافت نشد که علت این پدیده می‌تواند کاهش رطوبت، کاهش pH و افزایش اسیدیته باشد که شرایط را برای ادامه حیات این گروه از باکتری‌ها نامساعد کرده است. اگر چه استافیلوکوک‌ها قابلیت تحمل نمک را دارند ولی به خاطر اثرات ممانعت کنندگی ترکیبی pH و نمک، رشد آن‌ها در پنیری که رسیده است اتفاق نمی‌افتد(1). نجفی و همکاران (1387)، نشان دادند که در نمونه‌های پنیر پوستی تازه، و قبل از انتقال به درون پوست، استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نشد. اما پس از چنگ زدن و انتقال به درون پوست و طی 30 روز رسیدن، تعداد آن‌ها افزایش یافت که دلیل آن را می‌توان مربوط به آلودگی ثانویه ناشی از پوست بز یا دست هنگام چنگ زدن و انتقال به درون پوست دانست. ولی در ادامه دوره رسیدن، استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌ها مشاهده نشد(12). در بررسی انجام شده توسط اونی و همکاران (2008) روی پنیر گیبنابایدا (Gibna Bayda) که از شیر خام تهیه می شود، شمارش استافیلوکوکوس اورئوس در روز تولید معادل Log CFU /ml 3/02±0/2 بود و پس از 240 روز هیچ استافیلوکوکی در نمونه ها مشاهده نشد(28). افزایش فعالیت آغازگرها، رقابت میکروبی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک، کاهش pH، تولید آب اکسیژنه توسط سیستم لاکتوز پراکسیداز، رقابت بر سر تامین مواد غذایی، ازدیاد مواد دفعی، دمای ذخیره‌سازی پنیر، افزایش غلظت نمک و حتی تولید مواد آنتی بیوتیکی مثل نایسین از دلایل کاهش تعداد یا حذف استافیلوکوکوس اورئوس در پایان دوره رسیدن به شمار می‌روند(1 و 25). البته لازم به ذکر است که اگر چه استافیلوکوکوس اورئوس با گذشت زمان از بین می رود ولی انتروتوکسین تولید شده از آن می‌تواند فعالیت بیولوژیکی خود را همچنان حفظ کند. بنابراین عدم حضور باکتری به منزله ایمنی کامل محصول نیست و احتمال مسمومیت غذایی وجود دارد. بنابراین اگر قرار باشد نمونه پنیر از لحاظ حضور این میکروارگانیسم بررسی شود، آزمون باید بلافاصله بعد از تولید پنیر انجام شود (مطابق بررسی انجام شده در این مقاله) تا مشخص شود آیا میزان باکتری در محدوده تولید انتروتوکسین است یا خیر(26 و 24).

Archive of SID

www.SID.ir

3-6- اثر زمان رسیدن بر سالمونلا

نتایج بیانگر عدم حضور سالمونلا در نمونه پنیر کردی بود. نتایج آزمون‌های تاییدی به منظور شناسایی سالمونلا در جدول 3 نشان داده شده است. طبق این نتایج در هیچ یک از بازه‌های زمانی، سالمونلا یافت نشد. فاکتورهایی که در پنیر بر رشد و بقای گونه‌های سالمونلا تاثیر می‌گذارند، هنوز به طور کامل مشخص نشده است. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آب و اسیدتیه پائین در بقای این میکروارگانیسم اثر مساعدی داشته باشد. تحقیقات نشان دادند که در صورت آلودگی شیر به گونه‌های سالمونلا بعد از انجام فرایند پاستوریزاسیون، این میکروارگانیسم قادر است در طی پروسه تولید پنیر، بقای خود را حفظ کند و برای ماه‌ها در پنیر باقی بماند. با این حال مشخص است که بقای گونه‌های سالمونلا در پنیرهای مختلف، متفاوت می‌باشد و بیانگر این مطلب است که وضعیت فیزیولوژیکی و نیز سوش‌های مختلف این میکروارگانیسم، روی بقای آن تاثیر گذار می‌باشند. مشخص شده است که گونه‌های سالمونلا قادرند با تنش‌های مختلف موجود در محیط خود را تطبیق دهند. به عنوان مثال سازگاری با اسید، نمک‌ها و دما که تمامی این موارد می‌تواند به افزایش بقای آن‌ها در محیط کمک کند(26 و31).

نتایج محققی نشان داد، سالمونلا در 65 نمونه پنیر چدار بین 9-2 ماه باقی مانده است و عوامل اصلی که بقای آن‌ها را تحت تاثیر قرار داده بودند pH، نوع و میزان باکتری‌های آغازگر بود(21). لیر[1] و همکاران(1992)، به منظور بررسی بقای سالمونلای سازگاروغیرسازگار با اسید تحقیقی انجام داد؛ بر این اساس، تولید اسید توسط آغازگرها فاکتور اصلی در کنترل تعداد سوش‌های سالمونلا در طی تولید و رسیدن پنیر بود(24). پنیرهایی که به دلیل آغازگرهای نامناسب، pH نسبتاً بالایی داشته باشند، فعالیت بازدارندگی کمتری روی گونه‌های سالمونلا خواهند داشت ولی به نظر می‌رسد pH حدود 5/3-5/2 برای مرگ انواع سالمونلا کافی باشد. در تحقیقی، قبل از افزودن آغازگرها، شیر را با اسید استیک و اسید لاکتیک تا حدی اسیدی کرده و سپس آغازگر به آن اضافه نمودند و مشخص شد که آغازگر به آرامی رشد کرده و بعد از 3 ماه پنیر حالت گازدار به خود گرفت. در این شرایط مرگ سالمونلا نیز با آرامی انجام شد. این تحقیق ارزش فعالیت مناسب آغازگرها و تولید اسید توسط آن‌ها را در جلوگیری از بقای پاتوژن‌ها به خوبی نشان داد(23 و26). سالک مقدم(1380)، در بررسی خود، از هیچ یک از نمونه‌های پنیر غیرپاستوریزه مورد آزمون، باکتری سالمونلا به دست نیاورد و در اغلب نومنه ها، آلودگی به اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شد(3).

4- نتیجه گیری

بررسی‌های میکروبی نشان دادند که پنیر کردی تازه و رسیده به دلیل فعالیت باکتری‌های اسید لاکتیک، کاهش pH، تولید مواد آنتی بیوتیکی مثل نایسین، افزایش غلظت نمک و نگهداری در دمای پایین، فاقد استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت و سالمونلا می‌باشد. با این وجود در زمان‌های مختلف و بسته به شرایط تولید نتایج متفاوتی را در این زمینه می‌توان انتظار داشت. پنیر تازه دارای کلی‌فرم واشرشیاکلی بوده که بیانگر بار میکروبی بالای شیر مورد استفاده برای تولید این پنیر سنتی است؛ بنابراین مصرف این محصول در زمان تولید نادرست می‌باشد. اماتاکید بر طی شدن کامل زمان رسیدن به منظور کاهش pH و افزایش بار میکروبی مفید طی این دوره خطر آلودگی را کاهش می‌دهد.

جدول 3- آزمون‌های تاییدی انجام شده به منظور شناسایی سالمونلا

زمان رسیدن (روز)	آزمون سه قندی		آزمون اوره	آزمون لیزین دکربوکسیله شونده	آزمون ایندول	آزمون VP
	کشت عمقی	کشت شیب‌دار				
1	H_2S منفی/تولید گاز/ زرد رنگ	H_2S منفی/تولید گاز/ زرد رنگ	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
20	H_2S منفی/تولید گاز/ زرد رنگ	H_2S منفی/تولید گاز/ زرد تا قرمز	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
40	H_2S منفی/تولید گاز/ زرد تا قرمز	H_2S منفی/تولید گاز/ زرد تا قرمز	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
60	H_2S منفی/تولید گاز/ زرد رنگ	H_2S منفی/تولید گاز/ زرد رنگ	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت

1- Leyer

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس نتایج حاصله از این پژوهش، زمان مصرف پنیر کردی تولیدی از شیر خام، پس از حداقل 60 روز رسیدگی پیشنهاد می‌شود.

5- منابع

1- آقازاده مشگی، م. 1386. بررسی پاره ای از خصوصیات میکروبیولوژیکی و شیمیایی پنیر کوزه در آذربایجان غربی. *مجله ی علوم غذایی و تغذیه*. 4(3):80-87.

2- خمیری، م. قاسمیان فرد، م. 1385. مقایسه وضعیت میکروبی شیر خام تولید شده در دامداری‌های سنتی و صنعتی شهر گرگان و حومه. مجموعه *مقالات شانزدهمین کنگره ملی صنایع غذایی*، گرگان.

3- سالک مقدم، ع. فرهوش تهرانی، ه. انصاری، ح. روادگر، ب. نورانی وطنی، ا. و قاسمی، م. 1380. بررسی آلودگی میکروبی در نمونه‌های پنیر غیر پاستوریزه در مقایسه با پنیرهای پاستوریزه و تاثیر مقادیر مختلف نمک اضافه شده به پنیر بر روی باکتری‌های بیماری‌زای آلوده کننده. مجله ی *دانشگاه علوم پزشکی ایران*. (8)25: 293-299.

4- مرحمتی‌زاده، م. کریم، گ. نیک افروز، ر. پیکر، ج. 1385. بررسی آلودگی پنیر سنتی به استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت در شهرستان کازرون. مجموعه *مقالات شانزدهمین کنگره ملی صنایع غذایی*، گرگان.

5- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1381. شیر و فرآورده‌های آن - روش شمارش کلی پرگنه‌های میکروارگانیسم‌ها در 30درجه سلسیوس. استاندارد ملی ایران، شماره 5484.

6- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1381. شیر و فرآورده های آن - شمارش کلی فرم ها قسمت دوم - روش شمارش بیشترین تعداد احتمالی 30 درجه سیلسیوس. استاندارد ملی ایران، شماره 2-5486.

7- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، .1379. شیر و فرآورده‌های آن – شمارش اشریشیا کلی– روش بیشترین تعداد احتمالی (MPN) . استاندارد ملی ایران، شماره 5234.

8- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1386. شیر و فراورده های آن-شمارش واحدهای تشکیل دهنده کلنی کپک و یا مخمر-شمارش کلنی در پلیت در دمای 25 درجه سیلسیوس. استاندارد ملی ایران، شماره 10154.

9- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1388. شیر و فراورده های آن- جستجو و شناسایی سالمونلا. استاندارد ملی ایران، شماره 4413.

10- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1385. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه ها) . استاندارد ملی ایران، شماره 3-8606.

11- نجفی، ع.. ضیابخش دیلمی، م. کریمیان، ح. عابدی نیا، ا. 1390. بررسی تغییرات میکروبی پنیر پوستی طی دوره رسیدن. مجله ی *علوم غذایی و تغذیه*، 8(2):91-85.

12- Akgun, S. Yogurt kulturu kullanarak. 1982. inek sutu ile kasar peyniri yapim tekniginin gelistirilmesi uzerinded arasturmalar. Docentlike Tezi. Ankara Universiti Veteriner Fakultesi, Ankara, Turkiye.

13- Arenas, R., Gonz_alez, L., Bernardo, A., Fresno, J.M., Tornadijo. M.E. 2004. Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. *Food Control*, 15:271–279.

14- Atamer, M.,Yamaner, N., Odabasi, S., Tamucay, B., Cimer, A. 1997. Laktoperoksidaz/tiyosiyanat/hidrojen peroksit (LP) sisteminin aktivasyonuyla korunmus sutler ile bunlardan uretilen teleme ve kashar peynirlerinin mikrobiolojik ozellikleri. *Gida Derg*, 22:317-325.

15- Boddy, L., Wimpenny, J. W. T. 1992. Ecological concepts in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, 73:23–38.

16- Buffa, M., Guamis, B., Royo, C., Trujillo, A. J. 2001. Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high pressure treat milk. *Food Micribiology*. 18:45-51.

17- Cogan, T. M. 2000. Cheese microbiology. In P. F. Fox, T. Guinee, T. M. Cogan, & P. L. H. McSweeney (Eds.), Fundamentals of cheese science. Gaitherburg: Aspen Publishers.

18- Cuesta, P., Fernández-Garcìa, E., González de Llano, D., Montilla, A., Rodríguez, A. 1996. Evolution of the Microbiological and Biochemical Characteristics of Afuega'l Pitu

Archive of SID

www.SID.ir

ripening. *International Journal of Food Microbiology*. 82(2): 153-161.

26- Mirzaei, H., Ghiasi Khosroshahi, A., Karim, G. 2008. The microbiological and chemical quality of Lighvan cheese (White Cheese in Brine) produced in Tabriz, Iran. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(12):1594-1599.

27- Oner, Z., Gul Karahan, A., Aloglu, H. 2006. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening. *LWT* 39: 449–454.

28- Owni, EI, Osman, A.O., Hamid, Omer, I.A. 2008. Effect of storage period on weight loss, chemical composition, microbiological composition and sensory characteristics of Sudanese White Cheese (Gibna Bayda). *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(1):75-80.

29- Shakeel-Ur Rehman, J. M., Banks, P., Mcsweeney and P. Fox, 2000. Effect of ripening temperature on the growth of and significance of non starter lactic acid bacteria in cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Int. Dairy J*. 10:45-53.

30- Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., Bernardo, A., Martfn Sarmiento, R., Carballo, J. 1995. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of Spanish goatls raw milk cheese (Armada variety). *Lait*, 75:551-570.

31- Zerfiridis, G. K.,Vafopoulou-Mastrogiannaki, A., Litopoulou-Tzanetaki, E. 1984. Changes during Ripening of Commercial Gruyere Cheese, *J Dairy Sci*, 67:1397-1405.

Cheese During Ripening. *Journal of Dairy Science*. 79(10): 1693-1698.

19- Govaris, A., Papageorgiou, D. K., Papatheodorou, K. 2002. Behavior of Escherichia coli 0157:H7 during the manufacture and after. *Journal of Food Protection*, 65:609-615.

20- Hargrove, R. E., F. E. McDonough, and W. A. Mattingly. 1969. Factors affecting survival of Salmonella in cheddar and Colby cheese. *J. Milk Food Technol*. 32:480-484.

21- Hayaloglu, A. A., Cakmakci, S., Brechany, E. Y., Deegan, K. C. McSweeney, P. L. H. 2007. Microbiology, Biochemistry, and Volatile composition of Tulum Cheese Ripened in Goat's Skin or Plastic Bags, *Journal of Dairy Science* ,90(3):1102-1121.

22- Jorgensen, H. J., Mork, T., Rorvik, L. M. 2005. The Occurrence of Staphylococcus aureus on a Farm with Small-Scale Production of Raw Milk Cheese. *J. Dairy Sci*. 88:3810–3817.

23- Leyer, G. J., Johnson, E. A. 1992. Acid Adaptation Promotes Survival of Salmonella spp. in Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* ,58(6):2075-2080.

24- Macedo, A. C., Malcata, F. X. 1995. Microbiological profile in Serra ewes' cheese during ripening. *Journal of Applied Microbiology*. 79:1, Pages 1–11.

25- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis I.G. Anifantakis, E. M. 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and

Archive of SID

www.SID.ir