

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

سید علی مرتضوی¹، مرضیه معین فرد² 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 پذیرش: 1392/8/9

تاریخ دریافت: 1392/2/11

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 گوسفند و گاو تولید می شود. این پنیر دوره رسیدگی خود را داخل مشک می گذرانند، 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 استافیلوکوکوس اورئوس مطابق روش های استاندارد ملی ایران انجام شد. نتایج نشان داد، شمارش میکروارگانیسم ها پس از گذشت 20 روز به حداکثر میزان خود رسید که از این میان کلی فرم ها و اشرشیاکلی مهمترین گروه بودند. ولی با گذشت زمان تعداد آن ها کاهش یافت و در پایان دوره رسیدگی هیچ کلی فرم و اشرشیاکلی در نمونه ها مشاهده نشد. میانگین شمارش کپک و مخمر مربوط به 2 نمونه پنیر در روز اول معادل 4×10^5 CFU/ml بود اما در 20 روز بعد از تولید به شکل قابل ملاحظه ای افزایش یافت ولی تا پایان دوره رسیدگی روند کاهشی را طی کرد. بررسی های انجام شده حاکی از عدم حضور سالمونلا و استافیلوکوک های کوآگولاز مثبت طی دوره نگهداری بود. در طول دوره رسیدگی پنیر، pH نمونه ها به آهستگی کاهش یافت. مطابق نتایج این پژوهش؛ حضور مقادیر بالای 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: پنیر سنتی کردی، کلی فرم، کپک و مخمر، استافیلوکوک های کوآگولاز مثبت و سالمونلا.

1- مقدمه

ارزش تغذیه‌ای فراورده‌های لبنی به شدت تحت تاثیر کیفیت شیر خام اولیه قرار دارد. در ایران تولید پنیر از 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 و 13). 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 ليقوان و پنیر کوزه و در نواحی شرقی نیز پنیر کردی به دلیل عطر و طعم مطلوب خود از معروف‌ترین و پرطرفداران محصولات می‌باشند (13 و 21). 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 می‌شود، سپس ظرف‌ها برای 1 ساعت در دمای 40 درجه سانتی گراد قرار می‌گیرند. پس از انعقاد، نمک به مقدار مساوی بر روی دلمه‌ها ریخته شده و پس از برش زدن، 15 دقیقه به حال خود رها می‌شوند. پس از این مرحله به منظور خروج آب اضافی، دلمه‌ها در داخل پارچه قرار گرفته و تحت فشار، به مدت یک ساعت در داخل یخچال نگهداری می‌شوند. سپس دلمه‌ها از پارچه خارج شده و درون آب نمک 12 درصد قرار می‌گیرند. دلمه‌های تولید شده به مدت 2 هفته داخل یخچال باقی مانده و سپس درون پوست بزغاله و آب نمک 12 درصد، در دمای یخچال نگهداری می‌شوند. لازم به ذکر است؛ پوست بزغاله قبل از استفاده کاملاً تمیز و در آب جوش قرار گرفته و سپس نمک زنی و خشک می‌گردد. در زمان استفاده، پوست مجدداً توسط آب شسته و منافذ آن (قسمت‌های پا و دست) توسط نخ بسته می‌شود. از میان پنیرهای سنتی که در سایر کشورها تولید می‌شود می‌توان به پنیر گینابایدا¹ (20)، پنیر آفونگال پیتو² (19)، پنیر آرمادا³ (33)، پنیر گنستوسو (15) و پنیر ترکی (31) اشاره کرد.

علی‌رغم 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 و 13). 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 ویژگی‌های فراورده نهایی ایفا می‌کنند (15 و 19). 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 و 17).

ماسدو⁴ و همکاران (1995)، میکروفلور پنیر سِرا⁵ 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- Afuegal Pitu

3- Armada

4- Macedo

5- Serra

کردی، نمونه برداری بصورت تصادفی از نقاط مختلف منطقه کرمانج کلات، انجام گرفت. نحوه انتخاب مکان براساس بیشترین میزان دام و بیشترین میزان تولید پنیتر کردی در میان افراد منطقه صورت گرفت. 2 نمونه پنیتر، 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، اشیشیاکلی، 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 سوسپانسیون همگن، 25 گرم نمونه پنیتر، داخل بگ‌های استریل حاوی 225 میلی لیتر محلول استریل سیترات سدیم منتقل گردید و توسط دستگاه استومکر (Stomacher 400 Circulator)

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

2- مواد و روش‌ها

2-1- نمونه برداری و تهیه رقت‌ها

به منظور ارزیابی تغییرات جمعیت میکروبی بیماری‌زای پنیتر

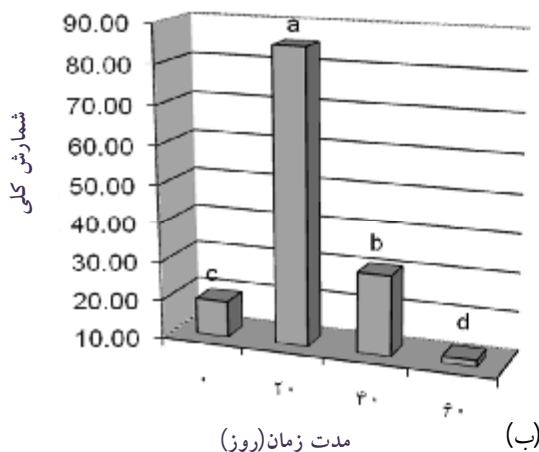
جدول 1- مشخصات محیط کشت و شرایط گرمخانه گذاری برای تشخیص و شمارش باکتری‌ها

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

چنانکه در شکل 1- الف، مشاهده می شود، pH نمونه‌ها در روز تولید 5/05 گزارش شد؛ طی دوره رسیدگی مورد بررسی، پس از گذشت 40 روز، 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 توجه 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 کازنین، سیترات و فسفات است نیز در آن نقش دارد. با این حال با گذشت 60 روز رسیدگی، pH نمونه‌ها به تدریج افزایش یافت و به 4/90 رسید. افزایش pH در انتهای دوره رسیدگی ناشی از تاثیر میکروفلور سطح پنیر نظیر ژئوتریکوم کاندیدوم و پنی سیلیوم کاممرتی بود که به سرعت سبب اکسیداسیون لاکتات به CO_2 و H_2O شده، از این رو سبب خنثی نمودن طبیعت اسیدی فرآورده می گردد. همچنین مصرف اسید لاکتیک سبب تشکیل محصولات غیر اسیدی و آزادسازی فرآورده های الکلی حاصل از پروتئولیز می شود. در انتهای دوره رسیدگی نیز، فعالیت پروتئولیکی، سبب تولید آمونیم و افزایش pH می گردد (15).

2-3- اثر زمان رسیدن بر شمارش کلی باکتری‌ها

شکل 1-ب، اثر زمان رسیدن را بر شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها به همراه مقایسه میانگین‌ها 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 احتمالاً به



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

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، 32 و 33).

2-2- آزمون های میکروبی

در کلیه آزمون‌ها پس از کشت در محیط‌های اختصاصی مطابق جدول 1، شمارش پرگنه‌های تشکیل شده توسط دستگاه پرگنه شمار انجام شد (5، 6، 7، 8، 9 و 10). لازم به ذکر است کلیه محیط کشت‌های مصرفی، ساخت شرکت مرک آلمان بود.

2-3- آزمون های شیمیایی

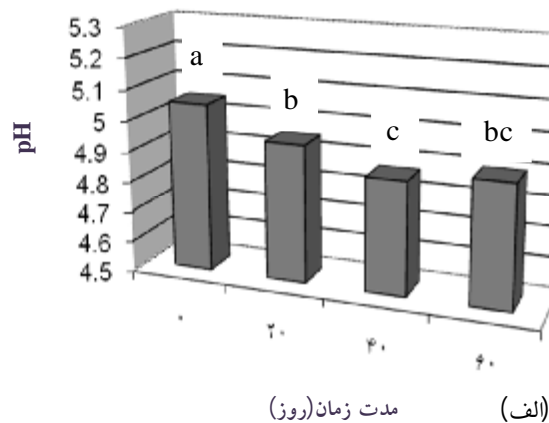
pH نمونه‌های پنیر براساس روش AOAC، با استفاده از pH سنج دیجیتالی (Microprocessor, model 537) تعیین گردید و تمام محیط کشت‌های مورد استفاده ساخت شرکت مرک آلمان بودند (1 و 12).

2-4- روش تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل و انجام آنالیز واریانس داده‌ها از نرم‌افزار Minitab ver 13.1 با سطح اطمینان 95% و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار Mstac 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 بر تغییرات pH طی دوره رسیدگی



3-3- اثر زمان رسیدن بر کلی فرم‌ها و اشرشیاکلی

شکل 2- الف و جدول 2 به ترتیب اثر زمان رسیدن را بر شمارش کلی فرم‌ها و اشرشیاکلی نشان می‌دهد. براین اساس، با گذشت زمان، تعداد کلی فرم‌ها و اشرشیاکلی کاهش یافت. استثناً در روز 40 افزایش میزان کلی فرم‌ها مشاهده شد. از آنجا که 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 روز 60، حذف کلی این دسته از میکروارگانیسم‌ها در نمونه پنیر مشاهده شد. افزایش جمعیت باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و کاهش pH، آنتاگونیسم ایجاد شده توسط سایر فراورده‌های متابولیکی تولیدی و کاهش مواد مغذی از دلایل کاهش این گروه از میکروارگانیسم‌ها است (1).

تأثیر فرایند رسیدن پنیر بر کاهش باکتری‌های کلی فرمی توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (2 و 33). مطابق نتایج پژوهشی در پنیر پوستی تولوم میزان کلی فرم‌ها طی دوره رسیدن کاهش یافته و بعد از 150 روز رسیدن کاملاً از بین رفتند (23). تحقیقات گواریس³ و همکاران (2002) نشان داد که اشرشیاکلی بعد از 40 روز رسیدن در پنیر فتا و تلمز⁴ قابل جداسازی نبود (19). محققین دیگر نیز گزارش کردند، در پنیر سنتی کاشار⁵، به ترتیب بعد از 30 و 60 روز دوره رسیدن، هیچ گونه کلی فرمی قابل جداسازی نبود (13، 14، 16، 22، 24). نتایج نجفی و همکاران (1387)، نشان داد که در نمونه‌های کشت شده از پنیر پوستی تازه، کلی فرمی رشد نکرد ولی بعد از 30 روز نگهداری درون پوست، تعداد کلی فرم‌ها افزایش یافته و به بیشتر از حد استاندارد رسید (12 و 14). آلودگی پوست بز، آلودگی دست، هنگام انتقال پنیر به درون پوست یا آلودگی محیط کار از عوامل این افزایش به شمار می‌روند. نتایج پژوهش نشان داد؛ میزان کلی فرم‌ها طی دوره رسیدن کاهش یافته و در روز 90 به صفر رسیدند (13).

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 احتمالاً به دلیل میزان بالای کلی فرم در روز اول مربوط می‌شود (30 و 32).

نتایج تحقیقات انجام شده توسط تورنادیجو¹ 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 نیز نشان دادند که شمارش کلی باکتری‌ها برای پنیر آفونگال پیتو که سه روز از تولید آن می‌گذشت $9/26 \pm 0/56$ Log cfu/ml و در پنیری که 60 روز از تولید آن می‌گذشت Log cfu/ml $8/06 \pm 0/47$ بود که بیانگر کاهش شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها طی دوره رسیدگی است (28). نتایج تحقیق انز 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). اونی² و همکاران (2008)، نیز نشان دادند که شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در پنیر سنتی گینا 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، 20، 32) شمارش بالای میکروارگانیسم‌ها تا روز 20 نیز احتمالاً به دلیل حضور مقادیر بالای کلی فرم در پنیر بیان شده است (20).

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

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

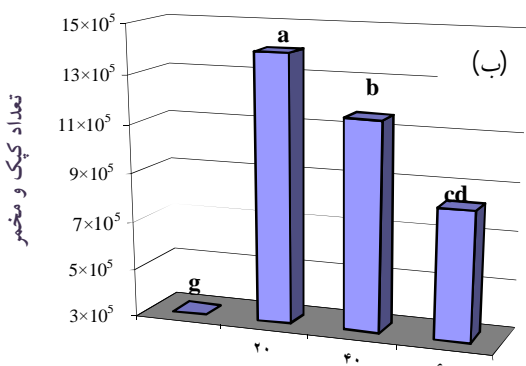
3- Govaris
4- Telemes
5- Kashar

1- Tornadijo
2- Owni

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

شکل 2-ب اثر زمان رسیدن را بر شمارش کپک و مخمر 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 و 29) بررسی نتایج آفازاده مشگی (1386)، بیانگر این مطلب بود که کپک‌ها و مخمرها با تعداد بسیار بالا در نمونه‌های پنیر کوزه حضور داشتند. بالا بودن تعداد آن‌ها می‌تواند نشان دهنده آلودگی اولیه بالا با مشاء محیطی یا دست آلوده افراد تهیه کننده پنیر باشد (1).

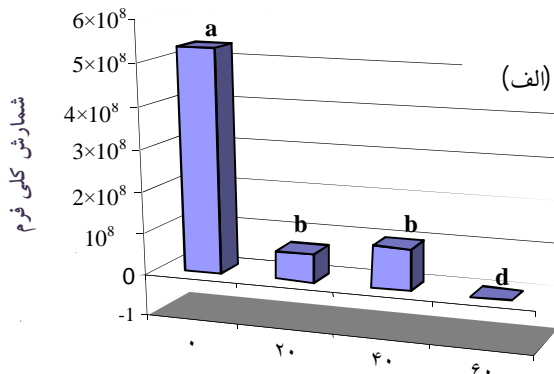
زرفریدیس و همکاران (1984)، نشان دادند که در برخی از پنیرهای تازه گریک گریور مخمر وجود داشت. مخمرها تا روز 15 افزایش داشته و به 10^4 CFU/gr رسیدند و در روز 45 به 10^3 CFU/gr کاهش یافتند و سپس تا پایان 6 ماه رسیدگی در همین محدوده باقی ماندند (31). در نتایج به دست آمده از مطالعات کویستا (1996)، تعداد مخمرها، با گذشت 3 روز از تولید پنیر آفونگال 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- الف) و کپک و مخمر (ب)، طی دوره رسیدگی

نتایج تحقیقی دیگر بر تغییرات میکروبی و بیوشیمیایی پنیر گریک گریور¹ 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 نشان داد 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 گینا 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 و 240 هیچ اشرشیاکلی در نمونه‌ها مشاهده نشد (28).

طی عملیات رساندن رشد پاتوژن‌ها توسط فعالیت باکتری‌های اسیدلاکتیک متوقف می‌شود. اخیراً 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 اسیدلاکتیک و کاهش pH و نگهداری در دمای پایین اشاره نمود (30).



¹ - Greek Gruyere

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 ممانعت‌کنندگی 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 گینابایدا (Gibna Bayda) که از شیر خام تهیه می‌شود، شمارش استافیلوکوکوس اورئوس در روز تولید معادل Log CFU/ml $3/02 \pm 0/2$ بود و پس از 240 روز هیچ استافیلوکوکی در نمونه‌ها 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 آنتی‌بیوتیکی 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 می‌رود 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).

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 غالباً 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 می‌تواند 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 کویستا و همکاران (1996)، بر روی پنیر آفونگال 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 نتیجه سبب بروز مسمومیت غذایی در مصرف‌کنندگان می‌گردد. بر اساس گزارشی در نروژ، 20-38 درصد از فراورده‌های لبنی حاصل از شیر خام به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده می‌باشند (25). نتایج حاصل از تحقیق آفازاده 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

6-3- 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 اسید تیه 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 سوس‌های 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 و 31).

نتایج محققان نشان داد، سالمونلا در 65 نمونه پنیر چدار بین 2-9 ماه باقی مانده است و عوامل اصلی که بقای آن‌ها را تحت تاثیر قرار داده بودند pH، نوع و میزان باکتری‌های آغازگر بود (21). لیر¹ و همکاران (1992)، به منظور بررسی بقای سالمونلای سازگار و غیرسازگار با اسید تحقیقی انجام داد؛ بر این اساس، تولید اسید توسط آغازگرها فاکتور اصلی در کنترل تعداد سوس‌های 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 5/2-5/3 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 و 26). سالک مقدم (1380)، در بررسی خود، از هیچ یک از نمونه‌های پنیر غیرپاستوریزه مورد آزمون، باکتری سالمونلا به دست نیاورد و در اغلب نمونه‌ها، 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 کوآگولاز 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 کلی فرم و اشرشیاکلی بوده که بیانگر بار میکروبی بالای شیر مورد استفاده برای تولید این پنیر سنتی است؛ بنابراین مصرف این محصول در زمان تولید نادرست می‌باشد. اما تاکید 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

آزمون	آزمون	آزمون لیزین	آزمون	آزمون سه قندی		زمان رسیدن (روز)
				کشت عمقی	کشت شیب‌دار	
VP	ایندول	دکربوکسیله شونده	اوره	H ₂ S منفی / تولید گاز / زرد رنگ	H ₂ S منفی / تولید گاز / زرد رنگ	1
مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	H ₂ S منفی / تولید گاز / زرد تا قرمز	H ₂ S منفی / تولید گاز / زرد رنگ	20
مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	H ₂ S منفی / تولید گاز / زرد تا قرمز	H ₂ S منفی / تولید گاز / زرد تا قرمز	40
مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	H ₂ S منفی / تولید گاز / زرد رنگ	H ₂ S منفی / تولید گاز / زرد رنگ	60

کپک و یا مخمر-شمارش کلنی در پلیت در دمای 25 درجه سلسیوس. 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 کوآگولاز 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/tiyosiyonat/hidrojen peroksid (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-García, E., González de Llano, D., Montilla, A., Rodríguez, A. 1996. Evolution of the Microbiological and Biochemical Characteristics of Afuega'l Pitu

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

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 دامداری های 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 نمونه های پنیر غیر پاستوریزه در مقایسه با پنیرهای پاستوریزه و تاثیر مقادیر مختلف نمک اضافه شده به پنیر بر روی باکتری های بیماریزای آلوده کننده. *مجله ی دانشگاه علوم پزشکی ایران*. 8(25):293-299.

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

5- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1381. شیر و فرآورده های آن - روش شمارش کلی پرگنه های میکروارگانسیم ها در 30 درجه 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 سلسیوس. استاندارد ملی ایران، شماره 2-5486.

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

8- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1386. شیر و فرآورده های آن-شمارش واحدهای تشکیل دهنده کلنی

- 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 goats 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