

(مقاله پژوهشی)

## تأثیر فرآیند تولید پنیر سفید ایرانی در تفکیک و زنده‌مانی ویروس‌های روده‌ای در دلمه و آب‌پنیر با استفاده از باکتریوفاژ MS2

سمیه اقحوانی شجری<sup>۱</sup>، مسعود یاورمنش<sup>۲\*</sup>، محمدباقر حبیبی نجفی<sup>۳</sup>

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲-دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۳-استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۱

### چکیده

امروزه نگرانی درباره انتقال بعضی از ویروس‌های گوارشی از طریق حیوانات و مصرف فرآورده‌های آن‌ها، آب‌های آلوده و مواد غذایی در حال افزایش است. لذا باید از روش‌های مناسبی در جهت کنترل این ویروس‌ها استفاده کرد. هدف از این پژوهش بررسی بقای ویروس‌های روده‌ای در فرآیند تولید پنیر بر مبنای شاخص باکتریوفاژ MS2 می‌باشد. بر این اساس نقش درصد چربی پنیر (۱/۵٪، ۲/۵٪ و ۳/۲٪) تلخیص باکتریوفاژ MS2 ( $10^6$ ،  $10^4$ ،  $10^2$ ،  $10^0$  pfu.ml<sup>-1</sup>) در تفکیک ویروس‌های روده‌ای در دلمه و آب‌پنیر باقی‌مانده، تاثیر پارامترهای شیمیایی (pH و اسیدیته) روی زنده‌مانی ویروس‌های روده‌ای و میزان تبادل ویروس‌های روده‌ای بین پنیر و آب نمک نگهداری در زمان فراوری پنیر مورد بررسی قرار گرفت. میزان زنده‌مانی باکتریوفاژ MS2 با استفاده از روش کشت دولابه ارزیابی و داده‌ها بر اساس طرح آماری کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل در سه تکرار بررسی شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان بازیافت باکتریوفاژ MS2 برابر با لگاریتم ۴/۶۷ مربوط به آب پنیر حاصل از فرآیند پرس در سطح چربی ۳/۲٪ و تلخیص  $10^6$  بود. همچنین در بررسی بیشترین بازیافت باکتریوفاژ در دلمه، بیشترین مقدار مربوط به سطح چربی ۳/۲٪ بود. در فرآیند آب نمک‌گذاری (آب پنیر نمکی) نیز بیشترین میزان بازیافت مربوط به آب پنیر در سطح چربی ۳/۲٪ و تلخیص  $10^6$  بود. براساس یافته‌ها، نرخ زنده‌مانی باکتریوفاژ MS2 در آب پنیر بیشتر از دلمه و پنیر گزارش شد.

**واژه‌های کلیدی:** پنیر سفید ایرانی، ویروس‌های روده‌ای، باکتریوفاژ MS2، دلمه پنیر، آب پنیر.

## ۱- مقدمه

امروزه در جهان، یکی از مهمترین مشکلات سلامت انسان، بیماری‌های حاصله از مصرف غذا بر اثر آلودگی مواد غذایی با ویروس‌هاست که بر اثر دفع افراد آلوده از طریق ادرار و مدفوع وارد فاضلاب شهری می‌شوند (۱۴۵). عامل انتقال آلودگی ویروس می‌تواند آب آبیاری، استفاده از کودهای طبیعی و یا فرآوری مواد غذایی باشد (۲،۶،۷). مهمترین ویروس‌هایی که از طریق غذا منتقل می‌شوند ویروس‌های روده‌ای هستند که تا حدودی در محیط خارج از بدن پایدارند (۷). با مطالعاتی که در سال ۲۰۰۲ انجام شد مشخص شد که ویروس‌های روده‌ای در شرایط محیطی و نسبت به آنزیم‌ها مقاوم هستند و توانایی مقاومت در برابر بسیاری از شرایط نگهداری و فرآیندهای غذایی را دارند که می‌توانند با تعداد کمتر از ده عدد ویروس انسان را از طریق ماده غذایی بیمار کند (۶). بقای حرارتی ویروس‌های روده‌ای از باکتری‌های کلی فرم (شاخص آلودگی مدفوعی) بیشتر است و میکروارگانسیم‌های قدیمی شاخص مانند کلی فرم‌های مدفوعی برای ویروس‌های روده‌ای شاخص ضعیفی هستند اما باکتریوفاژهای Male Specific F-RNA به علت شباهت مورفولوژیکی و بقاء در شناسایی ویروس‌های روده‌ای کاربردی ترند. بنابراین فاژها به عنوان شاخص‌های شناسایی ویروس‌های روده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند، فاژها شاخص‌های قابل اطمینانی از ویروس‌های روده‌ای انسانی در غذاهای دریایی و آب مورد استفاده در پرورش صدف می‌باشند (۲۸، ۲۳، ۲۲، ۱۹، ۹، ۴). فاژها عبارتند از ویروس‌هایی که باعث انتقال آلودگی به باکتری‌ها می‌شوند (۱۰). شواهدی از حضور ویروس‌های روده‌ای در شیر پاستوریزه و دیگر محصولات لبنی مانند ماست و پنیر گزارش شد که ویروس‌های اکو می‌توانند به مدت ۱۲۰ روز در دمای یخچال در شیر خام زنده بمانند (۱۰). در سال ۲۰۰۴ محققان گزارش کردند که در شیر پاستوریزه و جوشیده، پلیو ویروس و کوکساکسی ویروس B5 در ۴ °C به مدت حداقل ۹۰ روز و

در ۲۵ °C هر ویروس به ترتیب ۱۵ و ۳۰ روز بقای خود را حفظ کردند و پلیو ویروس و کوکساکسی ویروس B5 در ماست نگهداری شده در ۴ °C، به مدت ۹۰ روز و اکو ویروس تا ۱۲۰ روز و در پنیر کاتیج هر ویروس تا ۱۲۰ روز زنده ماندند (۲۶). در مطالعه دیگری بقا پلیو ویروس در ماست (۳/۵٪ چربی و با pH=۴) بعد از ۲۴ روز نگهداری در دمای درجه سانتی گراد ۴ مشاهده شد (۳۰). محققان غیرفعال سازی حرارتی HAV<sup>۱</sup> را در شیر پس چرخ شده استریل (با چربی ۰٪)، شیر هموژنیزه ۳/۵٪ چربی) و خامه (۱۸٪ چربی) بررسی کردند و مشاهده کردند که برای کاهش یک سیکل لگاریتمی HAV در شیر پس چرخ، شیر هموژنیزه و خامه در دمای ۷۱ °C به ترتیب به ۰/۱۶، ۰/۱۸ و ۰/۵۲ دقیقه و برای کاهش ۴ سیکل لگاریتمی به ترتیب ۶/۵۵، ۸/۳۱ و ۱۲/۶۷ دقیقه نیاز است (۳). در دهه اخیر بیماری‌های التهابی سیستم گوارشی ناشی از ویروس‌ها در کشورهای در حال توسعه رو به افزایش بوده و انتقال ویروس‌ها به انسان از طریق مصرف مواد غذایی آلوده به ویروس از جمله آب، فرآورده‌های دریایی، میوه‌ها و فرآورده‌های لبنی به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل انتقال عفونت شناخته شده است (۲۶، ۲۹). لذا بر حسب ضرورت در این پژوهش نقش درصد چربی پنیر (۱/۵٪، ۲/۵٪ و ۳/۲٪)، سطوح تلقیح باکتریوفاژ  $MS2$  ( $pfu.ml^{-1}$ )  $10^1$ ،  $10^4$ ،  $10^6$ ،  $10^8$  در تفکیک ویروس‌های روده‌ای در دلمه و آب‌پنیر باقیمانده و ارزیابی زنده‌مانی ویروس‌های روده‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- آماده‌سازی باکتری میزبان

باکتری میزبان *E. coli famp* (ATCC700891) و باکتریوفاژ *MS2* (ATCC#15597-B1) طبق روش استاندارد سازمان حفاظت محیط زیست ایالات متحده آمریکا به ترتیب زیر آماده شد (۳۳).

**۲-۲- آماده‌سازی باکتریوفاژ MS2**

جهت آماده‌سازی باکتریوفاژ MS2 یک عدد ویال حاوی کشت خالص باکتریوفاژ MS2 استفاده شد. ابتدا به ویال حاوی کشت خالص باکتریوفاژ MS2 آب مقطر اضافه شد. سپس ۳۰ میلی‌لیتر از محیط کشت TSB حاوی باکتری میزبان اشرشیاکلی اف امپ دارای رشد لگاریتمی را آماده و به مدت ۲ ساعت در دمای  $20 \pm 36/5$  °C گرمخانه گذاری شد. سپس باکتریوفاژ خالص به میزان یک میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای  $20 \pm 36/5$  °C گرمخانه گذاری شد و در نهایت محیط کشت را از میان یک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده و محلول عبوری فیلتر به عنوان محلول حاوی باکتریوفاژ MS2 فعال نگهداری شد (۳۳).

**۳-۲- روش تهیه آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و آمپی‌سیلین**  
۰/۱۵ میلی‌گرم از پودر استرپتومایسین سولفات و ۰/۱۵ میلی‌گرم از پودر آمپی‌سیلین سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل و از فیلتر ۰/۲۲ μm عبور داده و در میکروتیوب استریل توزیع و در فریزر ۱۸- نگهداری شد (۳۳).

**۲-۴- آماده‌سازی کشت آغازگر**

طبق دستورالعمل شرکت سازنده (هر بسته آغازگر ۵۰U برابر با ۱۸ گرم) در یک لیتر شیرسترون شده حل شد. محلول حاصله به مدت یک ساعت برای فعال شدن میکروارگانیسم‌ها در دمای یخچال نگهداری و سپس تلقیح به میزان ۴ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر انجام شد.

**۲-۵- تهیه پنیر**

پنیر طبق روش مددلو و خسروشاهی (۲۰) تهیه شد. طبق این روش مراحل اصلی تولید پنیر عبارتند از:

**۲-۵-۱- آماده‌سازی شیر و عملیات حرارتی**

ابتدا شیر پاستوریزه با سه درصد چربی (۱/۵٪، ۲/۵٪ و ۳/۲٪) تهیه و سپس حرارت  $35^{\circ}\text{C}$  اعمال گردید و سه رقت از

باکتریوفاژ MS2 ( $10^6$ ،  $10^4$ ،  $10^2$ ) به شیر تلقیح و یک نمونه هم به عنوان شاهد بدون تلقیح در نظر گرفته شد.

**۲-۵-۲- افزودن آغازگر و مایه زنی**

سپس آغازگر موردنظر طبق دستور شرکت سازنده به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۵۵ دقیقه در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه کلرید کلسیم به میزان ۱۵ گرم در ۱۰۰ لیتر شیر افزوده گردید و بعد از رسیدن pH پنیر به ۵/۶ مایه پنیر Meito محصول شرکت ژاپن به میزان ۱ گرم در ۲۵ لیتر اضافه گردید. در نهایت مخلوط فوق به مدت ۱/۵-۲ ساعت در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت تا به pH = ۴/۶ رسیده و دلمه تشکیل شد.

**۲-۵-۳- برش لخته و پرس**

دلمه به صورت مکعب‌های  $1\text{cm}^3$  برش خورده و به مدت ۱۰ دقیقه رها و به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی هم زده شد تا خروج آب آسان شود، سپس تحت فرآیند پرس قرار گرفته و بعد از خروج آب پنیر لخته‌ها برش خوردند.

**۲-۵-۴- نمک‌زنی**

برای تولید پنیر سفید ایرانی از روشی که توسط مددلو و خسروشاهی (۲۰) مورد استفاده قرار گرفته است استفاده شد. پنیر از شیر پاستوریزه با سه سطح چربی (۱/۵٪، ۲/۵٪ و ۳/۲٪) آماده شد. شیر تا  $35^{\circ}\text{C}$  حرارت دیده و سه رقت از باکتریوفاژ ( $10^6$ ،  $10^4$ ،  $10^2$ ) به آن تلقیح شد. سپس کلرید کلسیم به میزان ۱۵ گرم در ۱۰۰ لیتر بعد از بیست دقیقه اضافه گردید. وقتی pH به ۵/۶ رسید، کشت میکروبی پنیر ( $1\text{gr.}25\text{L}^{-1}$  milk) افزوده شد. سپس در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  به مدت یک ساعت و نیم نگهداری شد تا pH به ۴/۶ رسیده و لخته تشکیل شود. در نهایت لخته برش خورده و پرس می‌شود تا آب اضافی خارج شود. بعد در آب نمک ۲۲٪ قرار گرفته به مدت ۱۶ ساعت. سپس به آب نمک ۱۳٪ منتقل می‌شود.

۳/۲٪ بود و همچنین در تمامی سطوح چربی میزان بازیافت باکتریوفاژ در آب پنیر نسبت به دلمه از میزان بیشتری برخوردار بود. در فرایند آب نمک گذاری (آب پنیر نمکی) هم بیشترین میزان بازیافت باکتریوفاژ در پنیر آب نمکی ۲۲٪ در سطح چربی ۳/۲٪ مشاهده گردید و در تمامی سطوح میزان ورود باکتریوفاژ به آب پنیر بیشتر از پنیر نمکی بود (جدول ۱). چربی یکی از اجزای شیر است که عمدتاً در ساختار دلمه شرکت می‌کند و مقدار کمی از آن به آب پنیر راه می‌یابد (۲۵). کمترین سطح pH مربوط به دلمه با سطح چربی ۱/۵٪ بود. مرحله پرس یا آبگیری یک مرحله مهم در تهیه پنیر است. pH آب پنیر مرتبط با pH دلمه پنیر است و معمولاً pH دلمه کمی پایین‌تر از pH آب پنیر می‌باشد (۱۳). در تحقیقات آذربایجان و همکارانش کاهش مقدار چربی باعث کاهش pH و افزایش اسیدیته بین دو نمونه پنیر پرچرب و پنیر کم‌چرب شد. افزایش کیموزین باعث تشدید پروتئولیز و آزاد شدن گروه‌های کربوکسیل اسیدی، در نتیجه کاهش pH و افزایش اسیدیته می‌شود (۱). میزان اسیدیته در سطح چربی ۱/۵٪ در دلمه (جدول ۱) از میزان بیشتری برخوردار بود زیرا با افزایش چربی شیر، میزان رطوبت، کاهش و در نتیجه لیپولیز کاهش می‌یابد (۱۶). افزایش مقدار چربی باعث افزایش مقدار چربی پنیر و در کل افزایش ماده جامد آن می‌شود. کاهش چربی شیر در پنیرسازی باعث افزایش نسبی مقدار پروتئین در ترکیب پنیر می‌شود که در این حالت، ظرفیت جذب آب ماتریکس در پنیرهایی با چربی کمتر افزایش و مقدار رطوبت بیشتر و لیپولیز در پنیرهایی با درصد چربی کمتر افزایش می‌یابد (۱۷).

سپس پنیر به مدت ۱۶ ساعت در آب نمک ۲۲٪ قرار گرفت و بعد به آب نمک ۱۳٪ منتقل گردید. (آب نمک قبل از مصرف در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه و خنک شد).

## ۶-۲- آنالیز میکروبی

شمارش باکتریوفاژ  $MS2$  ( $\text{pfu.gr}^{-1}$ ) با استفاده از روش کشت دولایه آگار (۳۳) انجام شد.

## ۷-۲- آنالیز شیمیایی

نمونه های پنیر از لحاظ pH و اسیدیته بررسی شدند (۱۵).

## ۸-۲- طرح آماری

در این پژوهش از طرح آماری کاملات صادفی در قالب فاکتوریل در سه تکرار با هدف ارزیابی اثر سطوح تلقیح ویروس ( $10^2$ ،  $10^4$ ،  $10^6$   $\text{pfu.ml}^{-1}$ )، درصد چربی (۱/۵٪، ۲/۵٪ و ۳/۲٪) در تفکیک باکتریوفاژ  $MS2$  در فرآوری پنیر استفاده شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۹۵٪ انجام شد. آنالیز داده ها و مقایسه میانگین ها با نرم افزار Minitab انجام و نمودارها به کمک نرم افزار Excel رسم گردیدند.

## ۳- نتایج

### ۳-۱- اثر سطوح چربی روی بازیافت باکتریوفاژ $MS2$ در فرایند تولید پنیر (دلمه و آب پنیر در فرایند پرس و آب پنیر نمکی)

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش سطوح چربی، pH روندی افزایشی در پیش گرفت که در فرایند پرس، بیشترین بازیافت باکتریوفاژ  $MS2$  در دلمه، مربوط به سطح چربی

جدول ۱- نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح چربی در تفکیک باکتریوفاژ MS2 در پنیر و آب پنیر در فرایند پرس و آب پنیر

نمکی									
شمارش باکتریوفاژ MS2			آب پنیر نمکی		آب پنیر		پنیر		درصد
آب پنیر نمکی (pfu.ml <sup>-1</sup> )	آب پنیر (pfu.ml <sup>-1</sup> )	پنیر (pfu.g <sup>-1</sup> )	اسیدیته	pH	اسیدیته	pH	اسیدیته	pH	چربی پنیر
۱/۶۲ <sup>c</sup>	۱/۷۴ <sup>c</sup>	۱/۵۶ <sup>c</sup>	۱/۲۶ <sup>a</sup>	۵/۴۷ <sup>c</sup>	۰/۸۴ <sup>a</sup>	۴/۶۲ <sup>c</sup>	۱/۷۷ <sup>a</sup>	۴/۴۷ <sup>c</sup>	٪ ۱/۵
۲/۱۰ <sup>b</sup>	۲/۲۹ <sup>b</sup>	۲/۱۲ <sup>b</sup>	۱/۱۵ <sup>b</sup>	۵/۶۰ <sup>b</sup>	۰/۷۸ <sup>b</sup>	۴/۶۷ <sup>b</sup>	۱/۶۶ <sup>b</sup>	۴/۵۸ <sup>b</sup>	٪ ۲/۵
۲/۳۰ <sup>a</sup>	۲/۵۹ <sup>a</sup>	۲/۳۱ <sup>a</sup>	۰/۹۵ <sup>c</sup>	۵/۷۰ <sup>a</sup>	۰/۶۳ <sup>c</sup>	۴/۷۱ <sup>a</sup>	۱/۵۱ <sup>c</sup>	۴/۶۵ <sup>a</sup>	٪ ۳/۲

\* اعداد هر ستون که دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح ۹۵٪ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

\* این اعداد لگاریتمی هستند.

تلقیح  $6 \log_{10}$  بیشترین میزان را به خود اختصاص داد. در تمامی سطوح تلقیح میزان بازیافت باکتریوفاژ در آب پنیر بیشتر از پنیر بود. همچنین در فرایند نمک گذاری در پنیر نمکی و آب پنیر نیز بالاترین سطح بازیافت ب سطح تلقیح  $6 \log_{10}$  تعلق گرفت (جدول ۲).

### ۳-۲- اثر سطوح تلقیح باکتریوفاژ روی بازیافت باکتریوفاژ MS2 در فرایند تولید پنیر (دلمه و آب پنیر در فرایند پرس و آب پنیر نمکی)

نتایج اثر سطوح تلقیح حاکی از روند افزایشی میزان بازیافت باکتریوفاژ در سطح تلقیح  $0 \log_{10}$  تا سطح  $6 \log_{10}$  طی فرایند پرس می‌باشد. همچنین این میزان در آب پنیر و دلمه در سطح

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح تلقیح در تفکیک باکتریوفاژ MS2 در پنیر و آب پنیر در فرایند پرس و آب پنیر

نمکی									
شمارش باکتریوفاژ MS2			آب پنیر نمکی		آب پنیر		پنیر		سطوح تلقیح
آب پنیر نمکی (pfu.ml <sup>-1</sup> )	آب پنیر (pfu.ml <sup>-1</sup> )	پنیر (pfu.g <sup>-1</sup> )	اسیدیته	pH	اسیدیته	pH	اسیدیته	pH	
۰/۰۰ <sup>d</sup>	۰/۰۰ <sup>d</sup>	۰/۰۰ <sup>d</sup>	۱/۱۲ <sup>c</sup>	۵/۶۰ <sup>b</sup>	۰/۷۵۰ <sup>b</sup>	۴/۶۷ <sup>b</sup>	۱/۶۵ <sup>a</sup>	۴/۵۷ <sup>b</sup>	$0 \log_{10}$
۱/۲۰ <sup>c</sup>	۱/۴۰ <sup>c</sup>	۱/۲۹ <sup>c</sup>	۱/۱۴ <sup>a</sup>	۵/۵۷ <sup>d</sup>	۰/۷۵۸ <sup>a</sup>	۴/۶۶ <sup>b</sup>	۱/۶۵ <sup>a</sup>	۴/۵۵ <sup>c</sup>	$2 \log_{10}$
۲/۶۷ <sup>b</sup>	۳/۰۶ <sup>b</sup>	۲/۷۲ <sup>b</sup>	۱/۰۹ <sup>d</sup>	۵/۶۱ <sup>a</sup>	۰/۷۵۰ <sup>b</sup>	۴/۶۸ <sup>a</sup>	۱/۶۴ <sup>b</sup>	۴/۵۸ <sup>a</sup>	$4 \log_{10}$
۴/۱۶ <sup>a</sup>	۴/۳۶ <sup>a</sup>	۳/۹۸ <sup>a</sup>	۱/۱۳ <sup>b</sup>	۵/۵۹ <sup>c</sup>	۰/۷۵۶ <sup>b</sup>	۴/۶۶ <sup>c</sup>	۱/۶۵ <sup>a</sup>	۴/۵۶ <sup>c</sup>	$6 \log_{10}$

\* اعداد هر ستون که دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح ۹۵٪ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

\* این اعداد لگاریتمی هستند.

ویروس‌های باند شده به کلوئیدها در محیط آبی باقی می‌مانند که باعث کاهش ویروس‌ها بخصوص در قدرت یونی بالا و pH پایین می‌شود که باعث غلظت‌های پایین‌تر ویروس و کاهش بازیافت می‌شود. در حضور کلوئیدها بخشی از ویروس‌ها با کلوئیدها منتقل شده و این بخش با افزایش غلظت

بیشترین بازیافت باکتریوفاژ در مرحله پرس در دلمه و آب پنیر مربوط به سطح تلقیح  $10^6$  بود که در این بین بالاترین میزان مربوط به آب پنیر بود. غلظت بالای کلوئیدی و قدرت یونی بالامیزان اتصال ویروس را به محیط آبی و کلوئیدها افزایش می‌دهد. اگر کلوئیدهای معدنی به محیط آبی متصل باشند

فاضلاب نشان داد که MS2 در شرایط اسیدی بهتر از شرایط قلیایی باقی می ماند. سرعت غیرفعال سازی باکتریوفاژها در دامنه ۶-۸ pH و دامنه دمایی ۳۵-۵ درجه سانتی گراد پایین ترین بود. سرعت غیرفعال سازی هر دو باکتریوفاژ با رسیدن pH به زیر ۶ کاهش یافت و یا با رسیدن به بیشتر از ۸ افزایش یافت. سرعت غیرفعال سازی با انحراف pH از شرایط خنثی افزایش یافت. خارج از محیط تقریباً خنثی، MS2 در pH اسیدی نسبت به PH قلیایی در دامنه دمایی ۳۵-۵ درجه سانتی گراد بقا بیشتری داشت. pH باعث یونیزه شدن مواد شیمیایی می شود. در pH های بالا، غلظت بالای یون هیدروژن و هیدروکسیل موجود در آب نسبت به غلظت رادیکال های آزاد واکنشی بیشتر است و در نتیجه بر مکانیزم های غیرفعال سازی ویروسی غلبه می کند. این رادیکال های واکنشی می توانند مواد را در محیط های آبی اکسید کنند. در pH های خنثی یا کمی اسیدی یا قلیایی پوشش پروتئینی ویروس ممکن است با حذف، دفرمه شدن یا دناتوراسیون مکان های خاص تحت تاثیر قرار بگیرد. ممکن است با از بین رفتن پوشش پروتئینی، هیدرولیز RNA درون یا بیرون ذره ویروس رخ دهد که باعث کاهش عفونت زایی می شود. در مواقعی که pH بالاست ممکن است سطوح ویروس (کپسید، فیبرهای دم و ...) از طریق مکانیزم اکسیداسیون مستقیم مورد حمله واقع شوند و در نتیجه تجزیه کپسید رخ دهد (۱۰). براساس تحقیق اوربی و همکاران، pH و اسیدیته نمونه پنیر روی بازیافت باکتریوفاژ MS2 موثر بود یعنی با کاهش pH بازیافت باکتریوفاژ کاهش یافت. ویروس ها دارای نقطه ایزوالکتریک مشخص ۳/۹ می باشند (۲۴). تغییرات pH محیط دارای ویروس در محدوده نقطه ایزوالکتریک و پایین تر از آن موجب تاثیر روی ساختار و در نتیجه کاهش بازیافت می شود (۱۸، ۲۷، ۳۵). نتایج این آزمایش حاکی از بازیافت بیشتر باکتریوفاژ MS2 در نمونه پنیر با درصد چربی بیشتر و در نتیجه کاهش تولید اسید و صدمه کمتر به کپسید می باشد (جدول ۱).

کلونیدی، قدرت یونی، سرعت جریان، کاهش pH و مواد آلی محلول افزایش می یابد. هرچه مواد آلی محلول بالاتر باشد اتصال ویروس به محیط آبی و کلونیدها کاهش می یابد، از آن جا که مواد آلی محلول، انتقال ویروس های آزاد ( فیلتر شده) را افزایش می دهد باعث افزایش غلظت و بازیافت و انتقال سریع تر ویروس می شود. در نتیجه بهترین شرایط برای انتقال ویروس ها در محیط آبی غیریکنواخت در حضور کلونیدهای معدنی عبارت از سرعت جریان بالا، مقدار بالای مواد آلی محلول، pH بالا و قدرت یونی پایین می باشد (۳۴). نتایج آزمایش کنونی حاکی از بیشتر بودن تعداد باکتریوفاژ MS2 در آب پنیر نسبت به دلمه در حین پرس است که می تواند به علت سرعت بیشتر خروج آب در آب پنیر و خارج شدن باکتریوفاژ همراه با آن باشد. علاوه بر این، از آن جا که pH دلمه پایین تر از آب پنیر است اکثر MS2 وارد آب پنیر می شود و آب پنیر حاوی کلونیدهای معدنی می باشد که اتصال ویروس به آن افزایش می یابد زیرا بر طبق یافته های تانگ و همکاران (۳۲) کاهش pH محلول یا افزایش قدرت یونی محلول، رسوب ویروس را در محیط آبی افزایش می دهد در حالی که افزایش سرعت جریان و غلظت ماده آلی محلول مقدار رسوب ویروس را کاهش می دهد.

### ۳-۳- اثر متقابل سطوح چربی و تلقیح روی بازیافت باکتریوفاژ MS2 در فرایند تولید پنیر (دلمه و آب پنیر در فرایند پرس و آب پنیر نمکی)

در بررسی اثر متقابل سطوح چربی و تلقیح، بیشترین بازیافت باکتریوفاژ در پنیر با سطح چربی ۳/۲٪ در تلقیح  $6 \log_{10}$  مشاهده شد. همچنین این سطح بالاترین میزان بازیافت باکتریوفاژ را در پنیر و آب پنیر حاصل از مرحله نمک گذاری به خود اختصاص داد؛ از طرفی در تمامی سطوح، میزان بازیافت در آب پنیر به دست آمده از پرس نسبت به پنیر بیشتر بود (جدول ۳). استفاده از باکتریوفاژ های F-specific RNA، MS2 و QB به عنوان شاخص های ویروس در آب و

با توجه به این که عفونت ویروس‌های روده‌ای بسیار بیشتر از باکتری‌های روده‌ای است و امکان عفونی شدن بعد از فروردن یک ذره ویروس بیشتر از احتمال یک ذره باکتری است (۱۲) و همچنین ویروس‌ها (۸۰-۲۳ nm) بسیار کوچکتر از باکتری‌ها (۳-۰/۵ mm) و پارازیت‌های پروتوزان (۴-۱۵ mm) هستند بنابراین ذرات ویروسی می‌توانند در گستره وسیعی از شبکه‌های متخلخل در محیط‌های آبی در مقایسه با باکتری‌های پروتوزاها وارد شوند. با افزایش سرعت نقش توزیع در انتقال فاز MS2 تسریع یافته و ذرات فاز عمدتاً از طریق کانال‌هایی با منافذ بزرگ در محیط آبی یعنی جایی که بیشترین سرعت وجود داشته باشد، حرکت می‌کنند. کاهش pH محلول یا افزایش قدرت یونی محلول رسوب ویروس را در محیط آبی افزایش می‌دهد در حالی که افزایش سرعت جریان و غلظت ماده آلی محلول مقدار رسوب ویروس را کاهش می‌دهد (۳۱).

بعد از این که دلمه‌ها در آب نمک ۲۲٪ به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شدند نتایج نشان داد که میزان pH و میزان بازیافت باکتیوفاژ در پنیر حاصل از نمک‌گذاری بالاتر از دلمه حاصل از پرس در تمامی سطوح چربی و تلقیح بوده (جدول ۱) که افزایش سطح نمک ارتباط مستقیم با افزایش pH دارد که می‌تواند در نتیجه کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه کاهش اسیدلاکتیک تولیدی در غلظت‌های بالای نمک باشد (۲۱) میزان پروتئولیز در نمونه‌های پنیر رسیده در غلظت‌های متفاوت آب‌نمک تحت تاثیر غلظت نمک قرار می‌گیرد به طوری که با کاهش غلظت آب‌نمک، میزان پروتئولیز افزایش می‌یابد (۱۱). همچنین می‌توان از NaCl در مقادیر بالاتر از ۱۰٪ در تهیه سنتی یک نوع صدف به نام Eoriguljeot به عنوان آنتی‌ویروس استفاده کرد؛ زیرا HAV کاملاً با ۱۰٪ NaCl غیرفعال شده (۹۹٪) و نورویروس‌های تیپ مبتلا کننده موش تحت این شرایط ۶٪ بقا دارند (۸).

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح چربی و تلقیح در تفکیک باکتیوفاژ MS2 در پنیر و آب‌پنیر در فرایند پرس و آب‌پنیر نمکی

شمارش باکتیوفاژ MS2		آب‌پنیر نمکی		آب‌پنیر		پنیر		درصد چربی سطوح تلقیح	
آب‌پنیر نمکی (pfu.ml <sup>-1</sup> )	آب‌پنیر (pfu.ml <sup>-1</sup> )	پنیر (pfu.g <sup>-1</sup> )	pH اسیدیته	pH اسیدیته	pH اسیدیته	pH اسیدیته			
۰/۰ <sup>h</sup>	۰/۰ <sup>i</sup>	۰/۰ <sup>i</sup>	۱/۳۶ <sup>c</sup>	۵/۵ <sup>h</sup>	۰/۸۴ <sup>c</sup>	۴/۶۳ <sup>g</sup>	۱/۷۵ <sup>c</sup>	۴/۵۰ <sup>d</sup>	۰log <sub>10</sub> -۱/۵
۰/۰ <sup>h</sup>	۰/۰ <sup>i</sup>	۰/۰ <sup>i</sup>	۱/۳۶ <sup>a</sup>	۵/۴۰ <sup>j</sup>	۰/۸۶ <sup>a</sup>	۴/۵۹ <sup>i</sup>	۱/۸۰ <sup>a</sup>	۴/۴۲ <sup>f</sup>	۲log <sub>10</sub> -۱/۵
۲/۴۳ <sup>e</sup>	۲/۸۰ <sup>f</sup>	۲/۵۱ <sup>f</sup>	۱/۱۸ <sup>d</sup>	۵/۵۴ <sup>g</sup>	۰/۸۳ <sup>d</sup>	۴/۶۵ <sup>f</sup>	۱/۷۵ <sup>c</sup>	۴/۵۱ <sup>d</sup>	۴log <sub>10</sub> -۱/۵
۴/۰۴ <sup>b</sup>	۴/۱۶ <sup>c</sup>	۳/۷۶ <sup>c</sup>	۱/۲۸ <sup>b</sup>	۵/۴۶ <sup>i</sup>	۰/۸۵ <sup>b</sup>	۴/۶۱ <sup>h</sup>	۱/۷۸ <sup>b</sup>	۴/۴۶ <sup>e</sup>	۶log <sub>10</sub> -۱/۵
۰/۰ <sup>h</sup>	۰/۰ <sup>i</sup>	۰/۰ <sup>i</sup>	۱/۱۵ <sup>f</sup>	۵/۶۲ <sup>d</sup>	۰/۷۸ <sup>f</sup>	۴/۶۷ <sup>d</sup>	۱/۶۸ <sup>d</sup>	۴/۵۸ <sup>bc</sup>	۰log <sub>10</sub> -۱/۵
۱/۶۶ <sup>g</sup>	۱/۹۶ <sup>h</sup>	۱/۷۸ <sup>h</sup>	۱/۱۶ <sup>e</sup>	۵/۶۰ <sup>f</sup>	۰/۷۷ <sup>g</sup>	۴/۶۹ <sup>c</sup>	۱/۶۶ <sup>e</sup>	۴/۵۹ <sup>b</sup>	۲log <sub>10</sub> -۲/۵
۲/۵۵ <sup>d</sup>	۲/۹۵ <sup>e</sup>	۲/۷۴ <sup>e</sup>	۱/۱۶ <sup>e</sup>	۵/۶۰ <sup>f</sup>	۰/۷۸ <sup>f</sup>	۴/۶۷ <sup>d</sup>	۱/۶۷ <sup>de</sup>	۴/۵۸ <sup>bc</sup>	۴log <sub>10</sub> -۲/۵
۴/۱۹ <sup>a</sup>	۴/۲۶ <sup>b</sup>	۳/۹۶ <sup>b</sup>	۱/۱۵ <sup>f</sup>	۵/۶۱ <sup>f</sup>	۰/۷۹ <sup>e</sup>	۴/۶۶ <sup>e</sup>	۱/۶۶ <sup>e</sup>	۴/۵۷ <sup>c</sup>	۶log <sub>10</sub> -۲/۵
۰/۰ <sup>h</sup>	۰/۰ <sup>i</sup>	۰/۰ <sup>i</sup>	۰/۹۵ <sup>h</sup>	۵/۷۰ <sup>c</sup>	۰/۶۳ <sup>i</sup>	۴/۷۱ <sup>b</sup>	۱/۵۲ <sup>f</sup>	۴/۶۵ <sup>a</sup>	۰log <sub>10</sub> -۳/۲
۱/۹۵ <sup>f</sup>	۲/۲۶ <sup>g</sup>	۲/۱۱ <sup>g</sup>	۰/۹۶ <sup>g</sup>	۵/۷۲ <sup>a</sup>	۰/۶۴ <sup>h</sup>	۴/۷۲ <sup>a</sup>	۰/۷۲ <sup>f</sup>	۴/۶۶ <sup>a</sup>	۲log <sub>10</sub> -۳/۲
۳/۰۳ <sup>c</sup>	۳/۴۳ <sup>d</sup>	۲/۹۲ <sup>d</sup>	۰/۹۵ <sup>h</sup>	۵/۷۱ <sup>b</sup>	۰/۶۴ <sup>h</sup>	۴/۷۲ <sup>a</sup>	۱/۵۱ <sup>fg</sup>	۴/۶۶ <sup>a</sup>	۴log <sub>10</sub> -۳/۲
۴/۲۴ <sup>a</sup>	۴/۶۷ <sup>a</sup>	۴/۲۱ <sup>a</sup>	۰/۹۶ <sup>g</sup>	۵/۷۰ <sup>c</sup>	۰/۶۳ <sup>i</sup>	۴/۷۱ <sup>b</sup>	۱/۵۲ <sup>f</sup>	۴/۶۵ <sup>a</sup>	۶log <sub>10</sub> -۳/۲

\* اعداد هر ستون که دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح ۹۵٪ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

\* این اعداد لگاریتمی هستند.

7. Cheong, S., Lee, C., Song, S.W., Choi, W. C., Lee, C. H. and Kim, S.J. 2009. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24): 7745-7751.
8. Cruz-Romero, M., Kelly, A. L. and Kerry, J. P. 2007. Effects of high-pressure and heat treatments on physical and biochemical characteristics of oysters (*Crassostrea gigas*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(1): 30-38.
9. DePaola, A., Jones, J. L., Woods, J., Burkhardt, W., Calci, K. R., Krantz, J. A., et al. 2010. Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9): 2754-2768.
10. Feng, Y.Y., Ong, S. L., Hu, J.Y., Tan, X. L. and Ng, W. J. 2003. Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Q $\beta$ . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(9): 549-552.
11. Foruzan, S., Khosroshahi asl, A., Taslimi, A., Madadadloo, A. and Mashayekh, M. 2009. Study of the effects of microbial, recombinant and animal rennets on some of the qualitative and quantitative properties of Iranian white cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 6(3): 63-72.
12. Gerba, C.P. and Smith, J. E. 2005. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *Journal of Environmental Quality*, 34(1): 42-48.
13. Holmes, D. G., Duersch, J.W. and Ernstrom, C. A. 1977. Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during cheddar cheese making<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*, 60(6): 862-869.
14. Horm K. M. Survival of human Norovirus surrogates in juices and their inactivation using novel methods. 2011.
15. Horwitz, W. 2010. Official methods of analysis of AOAC International. Volume I, agricultural chemicals,

#### ۴-نتیجه گیری

نتایج تاثیر تلقیح باکتریوفاز MS2 در چهار سطح ( $10^6$ ،  $10^4$ ،  $10^2$ ،  $10^0$ ) و سه سطح چربی (۱/۵، ۲/۵، ۳/۲٪) در فرآوری پنیر حین پرس و آب نمک گذاری در جداول ۱، ۲ و ۳ گزارش شده است. براساس نتایج بدست آمده در جدول ۱ و ۳، با افزایش سطوح چربی، pH روندی افزایشی داشت که همزمان با این افزایش بیشترین شمارش باکتریوفاز MS2 در دلمه مربوط به سطح چربی ۳/۲٪ بود.

#### ۵-منابع

1. Azarnia, S., Ehsani, M.R. and Mirhadi, S.A. 1997. Evaluation of the physico-chemical characteristics of the curd during the ripening of Iranian brine cheese. *International Dairy Journal*, 7(6-7): 473-488.
2. Barrabeig, I., Fabregat, I., Rovira, A., Buesa, J., Bartolomé, R., Pintó Solé, R.M., Puellezo, H. and Domínguez García, À. 2010. Foodborne norovirus outbreak: the role of an asymptomatic food handler. *BMC Infectious Diseases*, 10: 269.
3. Bidawid, S., Farber, J. M., Sattar, S. A. and Hayward, S. 2000. Heat inactivation of hepatitis a virus in dairy foods. *Journal of Food Protection*, 63(4): 522-528.
4. Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L. and Perelle, S. 2010. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis a virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control. *Journal of Virological Methods*, 166(1-2): 48-53.
5. Cantalupo, P.G., Calgua, B., Zhao, G., Hundesa, A., Wier, A.D., Katz, J.P. and et al. 2011. Raw sewage harbors diverse viral populations. *Microbiology*, 2(5):e00180-11.
6. Carter, M. J. 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6): 1354-1380.



24. Overby, L. R., Barlow, G. H., Doi, R. H., Jacob, M. and Spiegelman, S. 1966. Comparison of two serologically distinct ribonucleic acid bacteriophages I. Properties of the viral particles. *Journal of Bacteriology*, 91(1): 442-448.
25. Rashidi, H., Mazaheri-Tehrani, M., Razavi, S. M. A. and Ghods-Rohany, M. 2012. Determination of coagulation and chemical characteristics of UFFeta cheese made from retentate powder in different levels of fat and CaCl<sub>2</sub>. *Journal of Food Science and Technology*, 35(9): 25-34.
26. Rzeżutka, A. and Cook, N. 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4): 441-453.
27. Salo, R. J. and Cliver, D. O. 1976. Effect of acid pH, salts, and temperature on the infectivity and physical integrity of enteroviruses. *Archives of Virology*, 52(4): 269-282.
28. Serracca, L., Verani, M., Battistini, R., Rossini, I., Carducci, A. and Ercolini, C. 2010. Evaluation of Adenovirus and E. coli as indicators for human enteric viruses presence in mussels produced in La Spezia Gulf (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, 50(5): 462-467.
29. Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E. and Uyttendaele, M. 2012. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2): 1-9.
30. Strazynski, M., Krämer, J. and Becker, B. 2002. Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2): 73-78.
31. Sugiyama, T., Hebert, R.R. and Hartman, K. A. 1967. Ribonucleoprotein complexes formed between bacteriophage MS2 RNA and MS2 protein in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 25(3): 455-463.
32. Tong, M., Shen, Y., Yang, H., Kim, H. 2012. Deposition kinetics of MS2 bacteriophages on clay mineral surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 92:340-347.
- contaminants, drugs/edited by William Horwitz. Gaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997.
16. Katsiari, M. C., Alichanidis, E., Voutsinas, L. P., Roussis, I.G. 2001. Proteolysis in reduced sodium Kefalograviera cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. *Food Chem*. 73(1):31-43.
17. Koca, N., Metin, M. 2004. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *Int Dairy J*. 14(4):365-73.
18. Kukavica-Ibrulj, I., Darveau, A., Jean, J. and Fliss, I. 2004. Hepatitis a virus attachment to agri-food surfaces using immunological, virological and thermodynamic assays. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5): 923-934.
19. Law, B. A. and Kolstad, J. 1983. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49(3): 225-245.
20. Madadlou, A., Khosroshahi, A., Mousavi, S. M. and Djome, Z. E. 2006. Microstructure and rheological properties of Iranian white cheese coagulated at various temperatures. *Journal of Dairy Science*, 89(7): 2359-2364.
21. Madadlou, A., Mousavi, M. E. and Farmani, J. 2007. The influence of brine concentration on chemical composition and texture of Iranian white cheese. *Journal of Food Engineering*, 81(2): 330-335.
22. Meschke, J. S. and Sobsey, M. D. 2003. Comparative reduction of Norwalk virus, poliovirus type 1, F+ RNA coliphage MS2 and Escherichia coli in miniature soil columns. *Water Science and Technology*, 47(3): 85-90.
23. Mocé-Llivina, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F. and Jofre, J. 2003. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3): 1452-1456.

- transport of MS2 bacteriophages with kaolinite in gravel aquifer media. *Water Research*, 44(4): 1255-1269.
35. Zerda, K.S. and Gerba, C.P. 1984. Agarose isoelectrofocusing of intact virions. *Journal of Virological Methods*, 9(1):1-6.
33. US Environmental Protection Agency. Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by single agar layer (SAL) procedure. Method. 2001.
34. Walshe, G.E., Pang, L., Flury, M., Close, M. E. and Flintoft, M. 2010. Effects of pH, ionic strength, dissolved organic matter, and flow rate on the co-

(Original Research Paper)  
**The Effect of Iranian White Brine Cheese Processing on  
Partitioning and Survival of Enteric Viruses in Curd and Whey  
Using MS2 Bacteriophage**

Somayyeh Aghhavany Shajary<sup>1</sup>, Masoud Yavarmanesh<sup>2\*</sup>, Mohammad Bagher Habibi Najafi<sup>3</sup>

1-MSc Graduated of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3-Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received:31/05/2020

Accepted:29/12/2020

**Abstract**

There are increasing concerns about transmission of some enteric viruses which are closely related to human-pathogenic strains via animals and their products, contaminated water and foods. Therefore, the use of appropriate processing methods to control these viruses is essential. The aim of this study was to assess the survival of enteric viruses in cheese processing. The role of fat content of cheese (1.5, 2.5 and 3.2%), MS2 bacteriophage spiked levels ( $10^0$ ,  $10^2$ ,  $10^4$  and  $10^6$ ) in separation of enteric viruses in curd and whey in the press process, the effect of chemical parameters (acidity and pH) on the exchange of enteric viruses in cheese and salt water in processing time were evaluated. MS2 survival was studied by double layer agar and data were assessed in complete randomized design in triplicates. According to the results, it was concluded that MS2 bacteriophage had the maximum survival in whey at fat content of 3.2% and spiked level of 6 log<sub>10</sub> in which it was 4/67 based on the logarithmic scale. Also, the maximum survival in curd was at fat content of 3.2%. In brine process, the most survival of bacteriophages in cheese and whey was at fat content of 3.2% and spiked level of 6 log<sub>10</sub>. In general, MS2 bacteriophage had the most survival in brine than curd.

**Keywords:** Iranian White Cheese, Enteric Viruses, MS2 Bacteriophages, Curd, Whey.

---

\*Corresponding Author: [yavarmanesh@um.ac.ir](mailto:yavarmanesh@um.ac.ir)