

باکتریهای کلی فرم و میزان پایداری آنها در طی رسانیدن پنیر سفید آب - نمکی ایرانی

محمد رضا احسانی، ثریا آذرنیا، جلیل وند یوسفی و کیانا کازرونی
بترتیب دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران،
کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات دامپروی کشور - کرج، عضو هیات علمی مؤسسه
تحقیقات سرم سازی رازی و کارشناس مؤسسه تحقیقات دامپروی

تاریخ پذیرش مقاله ۷۴/۱۱/۲۵

خلاصه

در این تحقیق میزان پایداری باکتریهای کلی فرم در لخته و آب نمک در مدت ۹۰ روز نگهداری در آب نمک ۱۱ درصد بررسی گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که جمعیت این باکتری در طی دوره رسیدن به شدت کاهش می یابد به طوری که در شصتین روز نگهداری، محیط از اینگونه میکروبیها به طور خود به خود پاکسازی می گردد. نوع کلی فرمهای موجود در لخته و آب نمک مورد شناسایی قرار گرفت و در نتیجه وجود اشریشیاکلی تیپ II، و کلبسیلا آئروژنازه هم در لخته و هم در آب نمک مشخص گردید. لخته ها از شیر پاستوریزه تهیه شدند که بعد از فرآیند به آنها باکتریهای لاکتیکی آغازگر اضافه شده بود. دامنه صدمات وارده به محصول، جدی بودن آلودگی های بعد از پاستوریزاسیون را ثابت نمود. پدیده ای که میتواند کل عملیات پنیر سازی را در مخاطره قرار دهد.

مقدمه

یکی از انواع پنیرهایی که در تولید جهانی این فرآورده جای مهمی را به خود اختصاص داده پنیرهای آب نمکی^۱ می باشد. تولید و مصرف این گونه محصولات که عمدتاً مربوط به کشورهای مشرق زمین می باشند در دو دهه گذشته روند صعودی داشته است. ضمناً نقش این نوع محصولات در تجارت جهانی نیز رو به افزایش است به طوری که بیش از ۱/۳ کل تولید کشور دانمارک را به خود اختصاص داده که عمدتاً به کشورهای در حال توسعه به خصوص ایران و مصر صادر شده است (۸).

مرحله رسیدن^۲ پنیر از مهمترین مرحله تولید آن می باشد که گذراندن این مرحله جهت ایجاد عطر، طعم، بافت و سایر ویژگیهای تکنولوژیکی در فرآورده نهایی ضروری است (۶، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۶ و ۱۹). از ویژگیهای عمومی پنیرهای آب نمکی این است

که رسیدن آنها در آب نمک انجام می شود و این دوره از چند هفته تا چند ماه به طول می انجامد، در واقع مرحله اساسی شکل گیری خواص پنیر در آب نمک انجام می پذیرد. از عیوب بزرگی که در پنیرهای آب نمکی در طی مرحله رسیدن ایجاد می شود باد کردن ظروف نگهداری اینگونه پنیرها می باشد که این نقص خصوصاً در پنیرهای تهیه شده از شیر خام مشاهده می شود، البته در شیرهای پاستوریزه شده نیز که به علت عدم رعایت ضوابط بهداشتی آلوده می شوند^۳ امکان فعالیت این نوع میکروبیها وجود دارد. در اثر تخمیر شدید سوراخهای حاوی گاز ایجاد شده که این پدیده سبب باد کردن حلبها می گردد و موجب ایجاد بافت اسفنجی در پنیر می شود. یکی از عوامل اساسی در بروز این نقص وجود باکتریهای کلی فرم^۴ خصوصاً باکتری آئروباکتر آئروژنازه^۵ می باشد که تولید عطر و طعم نامطلوب در محصول نهایی نیز مربوط به اثر متابولیسم اینگونه میکروارگانیسمها می باشد.

1- Brine Cheeses

2- Ripening

3- Post Pasteurization Contamination

4 - Coliform bacteria

5- Aerobacter aerogenes

با توجه به اینکه قسمت اعظم پنیرهای تولیدی کشور ما را چه به صورت سنتی و چه به شکل صنعتی، پنیرهای آب نمکی تشکیل می‌دهد و از مشکلات موجود در کارخانجات و کارگاههای تولید این فرآورده در کشور، آلودگیهای میکروبی و عواقب ناشی از آن می‌باشد در این مطالعه تلاش شد که تحولات جمعیت باکتریهای کلی فرم به عنوان یکی از عوامل مهم و موثر در کیفیت نهایی فرآورده مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

۱- روش رایج تهیه پنیر آب نمکی در کارخانجات پنیرسازی ایران در کارخانجات و کارگاههای پنیرسازی ایران برای تهیه پنیر معمولاً از شیر گاو استفاده می‌شود. شکل شماره ۱ مراحل کلی تهیه پنیر آب نمکی را به صورت صنعتی در کشور نشان می‌دهد.

۲- روشهای نمونه برداری

۱-۲ - نمونه برداری از حلب‌های پنیر

در این بررسی نمونه‌ها از کارگاه پنیرسازی ۲۰۰ تنی کارخانه شیر پاستوریزه تهران تهیه گردید. ۳۰ حلب پنیر ۱۷ کیلویی از یک نوبت کاری به طور کاملاً تصادفی انتخاب شد. نمونه‌های انتخاب شده تحت شرایط همان کارخانه به مدت ۹۰ روز نگهداری شدند و در هر بار نمونه برداری ۳ حلب به طور کاملاً تصادفی انتخاب شد و سپس آزمایشات مورد نظر بر روی نمونه‌های مزبور انجام گرفت.

۲-۲ - نمونه برداری از پنیر و آب نمک

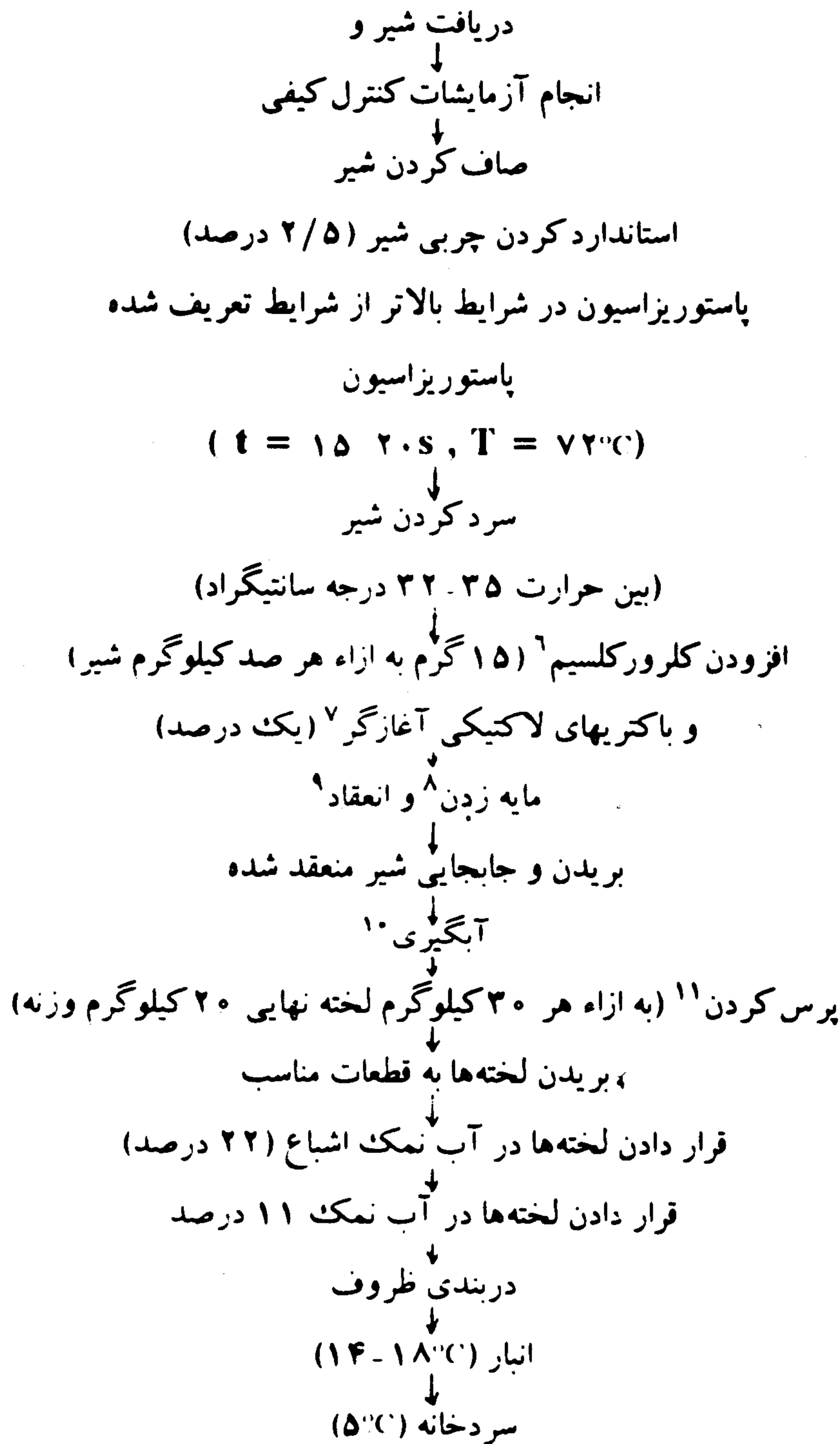
نمونه برداری از پنیر و آب نمک تحت شرایط کاملاً استریل و براساس روش استاندارد آ-آ-۱-آ-س^۱ به شماره ردیف ۱۶/۰۱۶ و ۱۶/۰۱۵ و استانداردهای ایران به شماره ۳۲۶ و ۴۱۹ انجام گرفت.

۳- بررسی وضعیت کلی فرمها

۱-۳ - ارزیابی وجود یا عدم وجود کلی فرمها

ابتدا سوسپانسیونی^۲ جداگانه از نمونه‌های پنیر و آب نمک در محلول رقیق کننده لاکتوز برات^۳ تهیه گردید و سپس نمونه‌های رقیق شده در محیط کشت مک کانکی آگار^۴ کشت داده شدند.

آزمایشات مطابق با دستورالعمل مرک^۵ به شماره کاتالوگ



شکل ۱- مراحل کلی تهیه پنیر آب نمکی به صورت صنعتی در ایران

۱۹۵۴۶۵ صورت گرفت. این آزمایش بمدت ۹۰ روز و به فاصله هر ۱۵ روز یکبار انجام گرفت و میزان پایداری باکتریهای کلی فرم در نمونه‌های پنیر و آب نمک ارزیابی شد.

۲-۳ - تایید و تعیین نوع کلی فرم

به منظور تشخیص کلی فرمها از سالمونلا^{۱۲}، از محیط کشت تراتیونات برات^{۱۳} (مرک) و سلنیت برات^{۱۴} (دیفکو)^{۱۵} استفاده شد. بعد از کشت در محیط‌های فوق الذکر و طی زمان انکوباسیون^{۱۶} مجدداً

1- A.O.A.C	2- Suspension	3- Lactose broth	4- Mac Conkey Agar	5- Merk	6- Calcium chloride
7 - starter culture	8- Renneting	9- Coagulation	10- Drainage	11- Pressing	
12 - Salmonella	13- Tetrathionate Broth Base	14- Selenite Broth	15- Difco	16- Incubation	

انکوباسیون وضعیت ظاهری محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت.
تست اوره آز^{۱۵}:

برای این منظور از محیط کشت پایه‌ای اوره آگار^{۱۶} (مرک) استفاده شد. آزمایش مطابق با دستورالعمل مرک به شماره کاتالوگ ۸۴۹۲ انجام گرفت (۵، ۱۸ و ۲۰).

- آزمایش فنیل آلانین دز آمیناز^{۱۷}:

برای انجام این آزمایش از محیط کشت فنیل آلانین^{۱۸} (مرک) استفاده شد. (۵، ۱۸)

- تست ژلاتین، تست مالونات^{۱۹}: از محیط کشت سدیم مالونات برات^{۲۰} برای انجام آزمایش مزبور استفاده شد (۱۷)

- تست بیوشیمیایی تخمیر قندها (فرمانتاسیون)^{۲۱}:

به منظور انجام این آزمایش از محیط کشت پایه قندی همراه با قندهای مورد نظر استفاده شد. محیط کشت پایه قندی مورد استفاده حاوی باکتوپیتون^{۲۲}، کلرورسدیم^{۲۳}، بیف اکس تراکت^{۲۴} و معرف بروموتیمول آبی^{۲۵} بود (۵). در این آزمایش از قندهای گلوکز^{۲۶}، لاکتوز، ساکاروز^{۲۷}، مانیتول^{۲۸}، دولسیتول^{۲۹}، سالیسین^{۳۰}، آدونیتول^{۳۱} و اینوزیتول^{۳۲} استفاده شد.

نتایج

۱- نتایج حاصل از بررسی میزان پایداری باکتریهای کلی فرم در لخته و آب نمک نگهداری آن در طی دوره رسیدن در جدول شماره (۱) نشان داده شده است. نتایج مندرج در جدول نشان می‌دهد که کلی فرمها در شصتمین روز نگهداری لخته در آب نمک کاملاً از بین می‌روند به طوری که بر روی محیط کشت مک کانکی آگار هیچ گونه رشدی در روز شصتم و از آن به بعد مشاهده نمی‌شود.

۲- تایید و تعیین نوع کلی فرمها

نمونه‌های پنیر و آب نمک بعد از آماده‌سازی بر روی محیط کشت اختصاصی مک کانکی آگار کشت داده شدند. بعد از انکوباسیون سه کلنی در روی محیط مزبور با مشخصات ظاهری زیر مشاهده گردید:

تست‌های افتراقی جهت تایید و یا عدم تایید کلی فرمها در محیط انجام گرفت.

۱-۲-۳- جدا کردن و شناسایی اشریشیا کلی^۱

نوع کلنی‌های^۲ ایزوله شده بر روی محیط کشت مک کانکی آگار مورد بررسی قرار گرفت و براساس وضعیت ظاهری کلنی‌ها، شناسایی مقدماتی انجام شد. به منظور جدا کردن اشریشیا کلی از محیط کشت بریلین گرین برات^۳ استفاده شد (۱۹). آزمایش مطابق با روش مکنزی^۴ با کاربرد سه لوله صورت گرفت. جهت شناسایی نوع اشریشیا کلی آزمایشات افتراقی به شرح زیر انجام شد.

الف - تست ایمویک^۵ (شامل چهار آزمایش اندول^۶، متیل رد^۷، وی - پی^۸، سیمون سترات^۹)

ب - تست ژلاتین^{۱۰}: جهت بررسی وجود یا عدم وجود آنزیم ژلاتیناز^{۱۱} در ساختمان سلولی میکروارگانیسمها از تست ژلاتین استفاده می‌شود. در صورت وجود این آنزیم و هیدرولیز ژلاتین، محیط کشت از حالت آگار بسته به صورت ذوب شده در می‌آید که این حالت بیانگر مثبت بودن واکنش می‌باشد. (۵، ۱۸)

ج - آزمایش ایجک من^{۱۲}: از این آزمایش جهت تعیین آنروپاتوژنیک^{۱۳} بودن سروتیپ‌های مختلف اشریشیا کلی استفاده می‌شود. برای آزمایش مزبور از محیط کشت لاکتوز برات استفاده شد. (۴) نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی انجام شده جهت تشخیص نوع میکروارگانیسم با نتایج مندرج در جدول استاندارد تطبیق داده شد و براساس ویژگیهای بدست آمده میکروارگانیسم مورد مطالعه شناسایی گردید (۷ و ۱۷).

۲-۲-۳- جدا کردن و تشخیص سایر کلی فرمها

جهت تعیین و تشخیص سایر کلی فرمها، شناسایی مقدماتی انجام گرفت و سپس به منظور تایید نتایج بدست آمده، از آزمایشات افتراقی زیر استفاده گردید:

- تست ایمویک - تست حرکت^{۱۴}: برای این آزمایش از محیط کشت تست حرکت (مرک) استفاده شد. میکروارگانیسم مورد نظرازیک طرف لوله U شکل محتوی محیط جامد تلقیح گردید بعد از

1 - Escherichia coli 2- Colonies 3- Brilliant-green bile broth 4- Mackenzie 5- I.M.V.I.C 6- Indol 7- Methyl Red
8 - Voges-Proskauer 9- Simmons Citrate 10 - Gelatin 11- Gelatinase enzyme 12- Eijkman 13- Entropathogenic
14- Mobility test 15 - Urease test 16- Urea Agar Base 17- Phenilalanine deaminase test 18- Phenilalanine medium
19- Malonate test 20 - Malonate broth 21- Fermentation 22-sodium chloride 23- Bacto pepton 24- Beef extract
25-Bromothymol blue 26-Glucose 27-Sucrose 28-Mannitol 29-Dulcitol 30-Salicylin 31- Adonitol 32- Inositol

۱- کلنی‌های درشت - صورتی رنگ - موکوئید^۱

۲- کلنی‌های درشت - قرمز - با هاله تیره رنگ

۳- کلنی‌های ریز - صورتی رنگ

نتایج حاصل از کشت جداگانه کلنی‌های مزبور بر روی محیط‌های اختصاصی و انجام تست‌های افتراقی نشان داد که باکتری‌های ایزوله شده از نمونه‌های مورد نظر، سالمونلا نمی‌باشند.

۱-۲- جدا کردن و تشخیص اشریشیا کلی

کلنی‌های درشت، قرمز رنگ با هاله‌ای تیره که از نمونه‌های مورد مطالعه جدا شده بود با مشخصات کلنی‌های موجود در جدول‌های استاندارد مقایسه گردید و وجود اشریشیا کلی در نمونه‌ها تایید شد. نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی انجام شده جهت شناسایی اشریشیا کلی در جدول (۲) آورده شده است. مقایسه نتایج مندرج در جدول مزبور با جدول‌های استاندارد نشان داد که اشریشیا کلی جدا شده از لخته و آب نمک E.Coli II (اندول منفی) می‌باشد.

۲-۲- جدا کردن و تشخیص کلی فرمهای دیگر

نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی و افتراقی انجام شده جهت شناسایی کلی فرمهای دیگر در لخته و آب نمک در جدول‌های (۳ و ۴) آورده شده است. مقایسه نتایج بدست آمده از تست‌های بیوشیمیایی انجام شده با نتایج جدول‌های استاندارد منجر به شناسایی کلبسیلا آئروژناز^۲ (۱) در نمونه‌های مورد نظر شد. باکتری مزبور بروش گرم رنگ آمیزی شد و تصویر میکروسکوپی از آن تهیه گردید.

بحث

مطالعات تجربی بررسی بقای کلی فرمها در لخته و آب نمک در طی دوره رسیدن پنیر نشان داد که جمعیت این میکروبها در طی دوره نگهداری به شدت کاهش می‌یابد. نتایج بدست آمده نشان دهنده این نکته بود که تا روز چهارم و پنجم، هم در لخته و هم در آب نمک کلی فرم وجود داشته اما از روز ششم به بعد محیط از اینگونه

جدول ۱- بررسی وجود یا عدم وجود کلی فرمها در پنیر و آب نمک در طی دوره رسیدن پنیر

زمان نگهداری (روز)	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰	۷۵	۹۰
نمونه‌ها						
پنیر	+	+	+	-	-	-
آب نمک	+	+	+	-	-	-

+ : بیانگر وجود کلی فرمها - : بیانگر عدم وجود کلی فرمها

جدول ۲- نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی انجام شده جهت شناسایی E.coli

واکنش I.M.VI.C						
تست بیوشیمیایی	اندول	متیل رد	VP	سیترات	ژلاتین	EIJKman
نتیجه	-	+	-	-	-	-

نامطلوب مواد دیگر در طی دوره نگهداری پنیر در آب نمک اضافه می‌شود (۲۱ و ۷،۳،۲)

گزارشات برخی کارخانجات صنعتی نیز که با شیوه فوق پنیر تولید می‌کنند نشان می‌دهد که در صورت عدم اجرای موازین بهداشتی در کلیه سطوح، تعداد جلب‌های باد کرده آن‌قدر بالاست که عملکرد اقتصادی واحد تولیدی را در مخاطره قرار می‌دهد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از موسسه تحقیقات دامپروری کشور به خاطر فراهم نمودن کلیه امکانات در جهت اجرای این تحقیق، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. از همکاری و مساعدتی که موسسه تحقیقات سرم‌سازی رازی و کارخانجات شیر پاستوریزه تهران در به انجام رسیدن این پژوهش نمودند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

- ۱- خسروشاهی، الف. وح. لامع، (۱۳۵۷). بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف آب نمک و طول مدت رسیدن پنیرهای ایرانی بر روی باکتریهای کلی فرم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
- 2- Abd El-Salam, M.H. 1987. In: P.F. FOX (ed.) *Cheese: Chemistry Physics and Microbiology - Major Cheese Groups*, vol.2, Elsevier Applied Science, London, UK, pp.277-309.
- 3- Anifantakis, E.M. 1991. In: P.K. Robinson and A.Y. Tamime (ed.) *Feta and Related Cheese*. Ellis Horwood Limited, London, UK, P. 49.
- 4- Bailey, W.K. & Scott, E. 1974. *Diagnostic Microbiology*. 4 ed., The C.V. MOSBY Company, P, 379.
- 5- Baron, H.J. & Finegold, S.M. 1990. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. The C.V. Mosby Company, Toronto, U.S.A.
- 6- Bhowmik, T. et al. 1990.: A review. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening *J. Dairy Sci.* Vol: 73, 859.
- 7- Buchanan, R.E. et al. 1975. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Waverly Press, INC.
- 8- Curic, M. 1987. In: P.F. Fox (ed.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology - Major Cheese Groups*, vol. 2, Elsevier Applied Science, London, UK, PP. 257-279.
- 9- Chapman, H.R. & Sharpe, M.E. 1990. In: P.K. Robinson (ed.) *Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk Products*, vol. 2, Elsevier Applied Science, London, UK, P. 203.
- 10- Desnouveaux, R. et al. 1985. *Les Enzymes Non Coagulantes Dans LA Filière Lait: Ministere I' Agriculture, Edition Apria*, N° 37, P.23
- 11- Eck, A. 1987. *Le Fromage*, 2e ed, Tec et Doc, Paris.
- 12- Furtado, M.M. et al. 1988. *Characterization of Nitrogen Fractions during Ripening of a Soft Cheese Made from Ultrafiltration Retentates*. *J. Dairy Sci* Vol: 71, 2877-2884.
- 13- Helrich, K. 1990. *Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed., published by the AOAC, vol. 2, U.S.A.
- 14- Kosikowski, F.V. 1982. *Cheese and Fermented Milk Foods*. 2nd Edn, F.V. Kosikowski and Associates, New York, U.S.A.
- 15- Law, B.A. 1982. In: P.F. Fox and J.J. Condon (ed.) *Food Proteins*. Applied Science Publishers LTD, UK, P. 307.
- 16- Law, B.A. et al. 1992. *Proteolysis and Flavour Development in Cheddar Cheese Made with the Single Starter Strains Lactococcus lactis spp. lactis UC 317 or lactococcus lactis spp. cremoris HPJ*. *Dairy .Sci*, Vol: 75, 1173.
- 17- Macfaddin, J.F. et al. 1983. *Biochemical Tests of Identification of Medical Bacteria*. Second Edition, Williams and Wilkins, London, UK.
- 18- Mackie and McCartney, et al. (1989) *Practical Medical Microbiology*. Thirteenth Edition, Churchill Living stone, London, UK.
- 19- Meyer, L.H. 1987. *Food Chemistry*. C.B.S. Publishers and Distributors, India, P. 306.
- 20- *Microbiology Manual Merk* 1990. E. Merk, P.O.B. 4119, Frankfurter Strasse 250, Darmstadt 1.
- 21- Varnam, A.H. and Evans, M.C. 1991. *Food borne Pathogens, An Illustrated Text*. Wolfe Publishing Ltd.

Coliform Bacteria and Their Resistance During Ripening of Iranian White Brined Cheese

M.R. EHSANI, S. AZARNIA, J.W.YOSEFI AND K.KAZERONI

Associate Professor, Department of Food Technology, College of Agriculture , University of Tehran , Karaj , Iran , Animal Husbandry Research Institute (M.S.C),Karaj-Iran, Razi Institute, Karaj , Iran. and Animal Research Institute ,Karaj,Iran.

Accepted 14 Feb.1996

Summary

In this research, the resistance of coliform bacteria in the curd and brine was studied during 90 days of storage. It was observed that total population of this group of bacteria made a decreasing trend during ripening period. The observations showed that after 60 days of ripening there was not any coliform bacteria in the medium. The types of coliform bacteria in the curd and brine were identified. The results indicated the presence of E.Coli type II (Indole negative) and Klebsiella aerogenes in both of them. The curds were manufactured from pasteurized milk, cultured by additional of Lactic acid bacteria. The extension of damages . approved the seriousness of post pasteurization contamination which could jeopardize all process of brine cheese manufacturing.