(مقاله پژوهشی)

تأثیر فرآیند تولید پنیر سفید ایرانی در تفکیک و زنده‌مانی ویروس‌های روده‌ای در دلمه و آب‌پنیر با استفاده از باکتریوفاژMS2

سمیه اقحوانی شجری[۱]، مسعود یاورمنش[۲*]، محمدباقر حبیبی نجفی[۳]

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 فردوسی‌مشهد، مشهد

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

تاریخ دریافت« ۱۳۹۹/۰۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۹

چکیده

امروزه نگرانی درباره انتقال بعضی از ویروس‌های گوارشی‌از طریق حیوانات و مصرف فرآورده‌های آن‌ها، آب‌های آلوده و موادغذایی 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 فرایند تولید پنیر بر مبنای شاخص باکتریوفاژ MS2 می باشد. بر این اساس نقش درصد چربی پنیر (۱/۵ ٪، ۲/۵ ٪ و ۳/۲ ٪)سطوح تلقیح *باکتریوفاژ*MS2 (10^{2}،10^{4}،10^{6} $pfu.ml^{-1}$) 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 دولایه ارزیابی و داده‌ها بر اساس طرح آماری کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل در سه تکرار بررسی شد. نتایج نشان دادبیشترین میزان بازیافت باکتریوفاژ MS2 برابر با لگاریتم ۴/۶۷ مربوط به آب پنیر حاصل از فرایند پرس در سطح چربی ۳/۲ ٪ و تلقیح ۶log۱۰ بود.همچنین در بررسی بیشترین بازیافت باکتریوفاژ در دلمه، بیشترین مقدار مربوط به سطح چربی ۳/۲ ٪ بود. در فرایند آب نمک‌گذاری (آب پنیر نمکی) نیز بیشترین میزان بازیافت مربوط به آب پنیر در سطح چربی ۳/۲ ٪ و تلقیح۶log۱۰ بود. براساس یافته‌ها، نرخ زنده‌مانی باکتریوفاژ MS2 در آب پنیر بیشتر از دلمه و پنیر گزارش شد.

واژه های کلیدی: پنیرسفید ایرانی، ویروس‌های روده‌ای، *باکتریوفاژ*MS2، دلمه پنیر، آب پنیر.

*مسئول مکاتبات: yavarmanesh@um.ac.ir

۱-مقدمه

امروزه در جهان، یکی از مهمترین مشکلات سلامت انسان، بیماری‌های حاصله از مصرف غذا بر اثر آلودگی موادغذایی باویروس‌هاست که بر اثر دفع افراد آلوده از طریق ادرار و مدفوع وارد فاضلاب شهری می‌شوند(۵و۱۴). عامل‌انتقال آلودگی‌ویروس‌می‌تواندآب‌آبیاری، استفاده از کودهای طبیعی و یا فرآوری موادغذایی باشد (۲،۶،۷). مهمترین ویروس‌هایی که از طریق غذا منتقل می‌شوند ویروس‌های روده‌ای هستند که تاحدودی 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 باکتری‌های‌کلی فرم (شاخص آلودگی مدفوعی) بیشتر است ومیکروارگانیسم‌های قدیمی شاخص مانند کلی فرم‌های مدفوعی برای ویروس‌های روده‌ای شاخص‌ضعیفی‌هستنداما باکتریوفاژهایMaleSpecificF-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(۴،۹،۱۹،۲۲،۲۳،۲۸).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 کوکساکی 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 پولیوویروس و کوکساکی ویروس B5 در ماست نگهداری شده در ۴ °C، به مدت ۹۰ روز و اکوویروس تا ۱۲۰ روز و در پنیر کاتیج هر ویروس تا ۱۲۰ روز زنده ماندند(۲۶). در مطالعه دیگری بقا پلیوویروس در ماست (۳/۵٪ چربی و با pH =۴) بعد از ۲۴ روز نگهداری در دمای درجه سانتی‌گراد ۴ مشاهده شد (۳۰). محققان غیرفعال سازی حرارتیHAV[1]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 لگاریتمیHAV 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 موادغذایی‌آلوده به ویروس از جمله آب، فرآورده‌های دریایی، میوه ها و فرآورده‌های لبنی به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل انتقال عفونت شناخته شده است (۲۶،۲۹). لذابرحسب ضرورت در این پژوهش نقش درصد چربی پنیر (۱/۵ ٪، ۲/۵ ٪ و ۳/۲ ٪) ، سطوح تلقیح باکتریوفاژ*MS2*(pfu.ml^{-1} ۱۰،۱۰^{۲}،۱۰^{۴}،۱۰^{۶}) 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) طبق‌روش استاندارد سازمان حفاظت محیط زیست ایالات متحده آمریکا به ترتیب زیر آماده شد (۳۳).

1-*Hepatitis A virus*

۲-۲- آماده‌سازی باکتریوفاژ *MS2*

جهت‌آماده‌سازی باکتریوفاژ *MS2* یک عدد ویال حاوی کشت خالص باکتریوفاژ *MS2* استفاده شد. ابتدا به ویال حاوی کشت خالص *باکتریوفاژMS2* 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 $۳۶/۵\pm۲^{o}C$ گرمخانه گذاری شد. سپس باکتریوفاژ خالص به میزان یک میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای $۳۶/۵\pm۲^{o}C$ گرمخانه‌گذاری شد و در نهایت محیط کشت را از میان یک فیلتر۰/۲۲ میکرومتر عبور داده و محلول عبوری فیلتر به عنوان محلول حاوی باکتریوفاژ*MS2* فعال نگهداری شد (۳۳).

۲-۳-روش‌تهیه آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و آمپی‌سیلین

۰/۱۵میلی‌گرم‌ازپودر استرپتومایسین سولفات و ۰/۱۵میلی‌گرم از پودرآمپی‌سیلین‌سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل و از فیلتر ۰/۲۲μM عبور داده و در میکروتیوب استریل توزیع و در فریزر ۱۸- نگهداری شد(۳۳).

۲-٤- آماده‌سازی کشت آغازگر

طبق دستورالعمل شرکت سازنده (هر بسته آغازگر ۵۰U برابر با ۱۸گرم) در یک لیترشیرسترون 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 $۳۵C^{o}$ اعمال گردید و سه رقت از باکتریوفاژ *MS2* ($۱۰^{۶}$ pfu.ml^{-1}، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۲}$،$۱۰^{۰}$) به شیر تلقیح و یک نمونه هم به عنوان شاهد بدون تلقیح در نظر گرفته شد.

۲-۵-۲- افزودن آغازگر و مایه زنی

سپس‌آغازگر موردنظر طبق دستور شرکت سازنده به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۵۵ دقیقه در دمای$۳۵^{o}C$ 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 $۳۵^{o}C$ قرار گرفت تا به pH =۴/۶ رسیده و دلمه تشکیل شد.

۲-۵-۳- برش لخته و پرس

دلمه به صورت مکعب های$۱cm^{3}$ برش خورده و به مدت۱۰ 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 آب‌پنیر لخته‌ها برش خوردند.

۲-۵-٤- 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 $۳۵^{o}C$ حرارت دیده و سه رقت از باکتریوفاژ($۱۰^{۲}$،$۱۰^{۰}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۶}$pfu.ml^{-1}) به آن تلقیح شد. سپس کلریدکلسیم به میزان ۱۵گرم در ۱۰۰ لیتر بعد از بیست دقیقه اضافه گردید. وقتی pH به ۵.۶ رسید، کشت میکروبی پنیر (1gr.25L^{-1} milk) افزوده شد. سپس در دمای $۳۵^{o}C$ 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 می شود تا آب اضافی خارج شود. بعد در آب نمک ۲۲٪ قرار گرفته به مدت ۱۶ساعت. سپس به آب نمک ۱۳٪ منتقل می شود.

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 $80^{o}C$ به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه و خنک شد).

۲-۶- آنالیز میکروبی

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

۲-۷- آنالیز شیمیایی

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

۲-۸- 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^{3}، 10^{4}، 10^{6} $pfu.ml^{-1}$)، 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 میانگین‌ها با نرم افزار Minitab انجام و نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel رسم گردیدند.

۳-نتایج

۳-۱-اثرسطوح چربی روی بازیافت باکتریوفاژMS2 در فرایند تولید پنیر(دلمه و آب‌پنیر در فرایند پرس و آب پنیر نمکی)

نتایج مقایسه‌میانگین 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 ۳/۲ ٪ بود و همچنین در تمامی سطوح چربی میزان بازیافت باکتریوفاژ در آب‌پنیر 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 (جدول۱). چربی یکی از اجزای شیر است که عمدتا در ساختار دلمه شرکت می‌کند و مقدار کمی از آن به آب‌پنیر 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 معمولا pH دلمه کمی‌پایین‌تر ازpH آب‌پنیر می‌باشد (۱۳). در تحقیقات آذرنیا 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 آزادشدن گروه‌های کربوکسیل اسیدی، درنتیجه 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 می شود. کاهش چربی شیردر پنیرسازی باعث افزایش نسبی مقدار پروتئین در ترکیب پنیر می شود 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 می یابد (۱۷).

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

درصد چربی پنیر	پنیر		آب‌پنیر		آب‌پنیر نمکی		شمارش باکتریوفاژ *MS2*	
	pH	اسیدیته	pH	اسیدیته	pH	اسیدیته	پنیر ($pfu.g^{-1}$)	آب‌پنیر ($pfu.ml^{-1}$)	آب‌پنیر نمکی ($pfu.ml^{-1}$)
٪ ۱/۵	٤/٤٧^{c}	۱/۷۷^{a}	٤/٦۲^{c}	۰/۸٤^{a}	۵/٤۷^{c}	۱/۲٦^{a}	۱/۵٦^{c}	۱/۷٤^{c}	۱/٦۲^{c}
٪ ۲/۵	٤/۵۸^{b}	۱/٦٦^{b}	٤/٦۷^{b}	۰/۷۸^{b}	۵/٦۰^{b}	۱/۱۵^{b}	۲/۱۲^{b}	۲/۲۹^{b}	۲/۱۰^{b}
٪ ۳/۲	٤/٦۵^{a}	۱/۵۱^{c}	٤/۷۱^{a}	۰/٦۳^{c}	۵/۷۰^{a}	۰/۹۵^{c}	۲/۳۱^{a}	۲/۵۹^{a}	۲/۳۰^{a}

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

*این اعداد لگاریتمی هستند.

۳-۲-اثر سطوح تلقیح باکتریوفاژ روی بازیافت *باکتریوفاژMS2* در فرایند تولید پنیر(دلمه و آب‌پنیر در فرایند پرس و آب پنیر نمکی)

نتایج اثر سطوح تلقیح حاکی از روند افزایشی میزان بازیافت باکتریوفاژ در سطح تلقیح ۰log۱۰ تا سطح ۶log۱۰ طی فرایند پرس می‌باشد. همچنین این میزان در آب‌پنیر و دلمه در سطح تلقیح ۶log۱۰ بیشترین میزان را به خود اختصاص داد. در تمامی سطوح تلقیح میزان بازیافت باکتریوفاژ در آب‌پنیر بیشتر از پنیر بود. همچنین در فرایند نمک گذاری در پنیر نمکی و آب پنیر نیز بالاترین سطح بازیافتب ەسطح تلقیح۶log۱۰ تعلق گرفت(جدول ۲).

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

سطوح تلقیح	پنیر		آب‌پنیر		آب‌پنیر نمکی		شمارش باکتریوفاژ *MS2*	
	pH	اسیدیته	pH	اسیدیته	pH	اسیدیته	پنیر ($pfu.g^{-1}$)	آب‌پنیر ($pfu.ml^{-1}$)	آب‌پنیر نمکی ($pfu.ml^{-1}$)
۰log۱۰	٤/۵۷^{b}	۱/٦۵^{a}	٤/٦۷^{b}	۰/۷۵۰^{b}	۵/٦۰^{b}	۱/۱۲^{c}	۰/۰۰^{d}	۰/۰۰^{d}	۰/۰۰^{d}
۲log۱۰	٤/۵۵^{c}	۱/٦۵^{a}	٤/٦٦^{b}	۰/۷۵۸^{a}	۵/۵۷^{d}	۱/۱٤^{a}	۱/۲۹^{c}	۱/٤۰^{c}	۱/۲۰^{c}
٤log۱۰	٤/۵۸^{a}	۱/٦٤^{b}	٤/٦۸^{a}	۰/۷۵۰^{b}	۵/٦۱^{a}	۱/۰۹^{d}	۲/۷۲^{b}	۳/۰٦^{b}	۲/٦۷^{b}
٦log۱۰	٤/۵٦^{c}	۱/٦۵^{a}	٤/٦٦^{c}	۰/۷۵٦^{b}	۵/۵۹^{c}	۱/۱۳^{b}	۳/۹۸^{a}	٤/۳٦^{a}	٤/۱٦^{a}

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

*این اعداد لگاریتمی هستند.

بیشترین بازیافت باکتریوفاژ در مرحله پرس در دلمه و آب پنیر مربوط به سطح تلقیح$^{۱۰^{۶}}$ 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 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

کلوئیدی ، قدرت یونی، سرعت جریان، کاهش pH و مواد آلی محلول افزایش می‌یابد. هرچه مواد آلی محلول بالاتر باشد اتصال ویروس به محیط آبی و کلوئیدها کاهش می‌یابد، از آن‌جا که مواد آلی محلول، انتقال ویروس‌های آزاد (فیلتر شده) را افزایش می‌دهد باعث افزایش غلظت و بازیافت و انتقال سریع‌تر ویروس می‌شود. در نتیجه بهترین شرایط برای انتقال ویروس‌ها در محیط آبی غیریکنواخت در حضور کلوئیدهای معدنی عبارت از سرعت جریان بالا، مقدار بالای مواد آلی محلول، pH بالا و قدرت یونی پایین می‌باشد (۳۴). نتایج آزمایش کنونی حاکی از بیشتر بودن تعداد *باکتریوفاژMS2* در آب‌پنیر نسبت به دلمه در حین پرس است که می‌تواند به علت سرعت بیشتر خروج آب در آب‌پنیر و خارج‌شدن باکتریوفاژ همراه با آن باشد. علاوه بر این، از آن جا که pH دلمه پایین‌تر از آب پنیراست اکثر *MS2* وارد آب‌پنیر می‌شود و آب‌پنیر حاوی کلوئیدهای معدنی می‌باشد که اتصال ویروس به آن افزایش می‌یابد 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- اثرمتقابل‌سطوح چربی و تلقیح روی بازیافت *باکتریوفاژMS2* در فرایند تولید پنیر(دلمه وآب‌پنیر 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 آب‌پنیر حاصل از مرحله نمک‌گذاری به خود اختصاص داد؛ از طرفی در تمامی سطوح، میزان بازیافت در آب‌پنیربه دست‌آمده از پرس نسبت به پنیر بیشتر بود (جدول ۳). استفاده از باکتریوفاژ های F-specific RNA *MS2*، و QB به عنوان شاخص‌های ویروس در آب و فاضلاب نشان داد که *MS2* در شرایط اسیدی بهتر از شرایط قلیایی باقی می‌ماند. سرعت غیرفعال‌سازیی باکتریوفاژ ها در دامنه ۸-۶ =pH و دامنه دمای ۳۵-۵ درجه سانتی‌گراد پایین‌ترین بود. سرعت غیرفعال سازی هر دو باکتریوفاژ با رسیدنpH به زیر ۶ کاهش یافت و یا با رسیدن به بیشتر از ۸ افزایش یافت.سرعت غیرفعال‌سازی با انحرافpH از شرایط خنثی افزایش یافت. خارج از محیط تقریبا خنثی، *MS2* در pH اسیدی نسبت به PH قلیایی در دامنه دمایی ۳۵-۵ درجه سانتی‌گراد بقا بیشتری داشت. pH باعث یونیزه شدن مواد شیمیایی می‌شود. در pH های بالا، غلظت بالای یون هیدروژن و هیدروکسیل موجود در آب نسبت به غلظت رادیکال‌های آزاد واکنشی بیشتر است و در نتیجه بر مکانیزم‌های غیرفعال‌سازی ویروسی غلبه می‌کند. این رادیکال‌های واکنشی می‌توانند مواد را در محیط‌های آبی اکسید کنند. در pH های خنثی یا کمی اسیدی یا قلیایی پوشش پروتئینی ویروس ممکن است با حذف، دفورمه شدن یا دناتوراسیون مکان‌های 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 عفونت‌زایی 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 *باکتریوفاژMS2* موثر بود یعنی با کاهشpH بازیافت باکتریوفاژ کاهش یافت. ویروس‌ها دارای نقطه ایزوالکتریک مشخص ۳/۹ می باشند (۲۴) . تغییرات pH محیط دارای ویروس در محدوده نقطه ایزوالکتریک و پایین‌تر از آن موجب تاثیر روی ساختار و در نتیجه کاهش بازیافت می‌شود (۱۸،۲۷،۳۵). نتایج این آزمایش حاکی از بازیافت بیشتر *باکتریوفاژMS2* در نمونه پنیر با درصد چربی بیشتر و در نتیجه کاهش تولید اسید و صدمه کمتر به کپسیدمی‌باشد (جدول ۱).

بعد از این که دلمه ها در آب نمک ۲۲٪ به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شدند نتایج نشان داد که میزان pH و میزان بازیافت باکتریوفاژ در پنیر حاصل از نمک‌گذاری بالاتر از دلمه حاصل از پرس در تمامی سطوح چربی و تلقیح بوده (جدول۱) 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 به‌طوری‌که باکاهش غلظت آب‌نمک، میزان پروتئولیز افزایش می‌یابد (۱۱). همچنین می‌توان ازNaCl در مقادیر بالاتر از ۱۰٪ در تهیه سنتی یک نوع صدف به نام Eoriguljeot به عنوان آنتی‌ویروس استفاده کرد؛ زیرا HAV کاملا با ۱۰٪ NaCl غیرفعال شده(۹۹٪) ونورویروس‌های تیپ مبتلا کننده موش تحت این شرایط ۶٪ بقا دارند (۸).

با توجه به این که عفونت ویروس‌های روده‌ای بسیار بیشتر از باکتری‌های روده‌ای است و امکان عفونی‌شدن بعد از فروبردن یک ذره ویروس بیشتر از احتمال یک ذره باکتری است (۱۲) و همچنین ویروس‌ها (۲۳-۸۰nm) بسیار کوچکتر از باکتری‌ها (۰/۵-۳mm) و پارازیت‌های پروتوزوان (۴-۱۵mm) هستند بنابراین ذرات ویروسی می‌توانند درگستره وسیعی از شبکه‌های متخلخل در محیط‌های آبی در مقایسه با باکتری‌های پروتوزا ها وارد شوند. با افزایش سرعت نقش توزیع در انتقال فاژ *MS2* تسریع یافته و ذرات فاژ عمدتا از طریق کانال هایی 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).

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

درصد چربی / سطوح تلقیح	پنیر		آب‌پنیر		آب‌پنیر نمکی		شمارش باکتریوفاژ *MS2*		
	pH	اسیدیته	pH	اسیدیته	pH	اسیدیته	پنیر ($pfu.g^{-1}$)	آب‌پنیر ($pfu.ml^{-1}$)	آب‌پنیر نمکی ($pfu.ml^{-1}$)
۰log۱۰-۱/۵	٤/٥٠^{d}	۱/۷٥^{c}	٤/٦۳^{g}	۰/۸٤^{c}	٥/٥۰^{h}	۱/۲٦^{c}	۰/۰۰^{i}	۰/۰۰^{i}	۰/۰۰^{h}
۲log۱۰-۱/۵	٤/٤۲^{f}	۱/۸۰^{a}	٤/٥۹^{i}	۰/۸٦^{a}	٥/٤۰^{j}	۱/۳۲^{a}	۰/۰۰^{i}	۰/۰۰^{i}	۰/۰۰^{h}
٤log۱۰-۱/۵	٤/٥۱^{d}	۱/۷٥^{c}	٤/٦٥^{f}	۰/۸۳^{d}	٥/٥٤^{g}	۱/۱۸^{d}	۲/٥۱^{f}	۲/۸۰^{f}	۲/٤۳^{e}
٦log۱۰-۱/۵	٤/٤٦^{e}	۱/۷۸^{b}	٤/٦۱^{h}	۰/۸٥^{b}	٥/٤٦^{i}	۱/۲۸^{b}	۳/۷٦^{c}	٤/۱٦^{c}	٤/۰٤^{b}
۰log۱۰-۱/۵	٤/٥۸^{bc}	۱/٦۸^{d}	٤/٦۷^{d}	۰/۷۸^{f}	٥/٦۲^{d}	۱/۱٥^{f}	۰/۰۰^{i}	۰/۰۰^{i}	۰/۰۰^{h}
۲log۱۰-۲/۵	٤/٥۹^{b}	۱/٦٦^{e}	٤/٦۹^{c}	۰/۷۷^{g}	٥/٦۰^{f}	۱/۱٦^{e}	۱/۷۸^{h}	۱/۹٦^{h}	۱/٦٦^{g}
٤log۱۰-۲/۵	٤/٥۷^{c}	۱/٦٦^{de}	٤/٦۷^{d}	۰/۷۸^{f}	٥/٦۰^{f}	۱/۱٦^{e}	۲/۷٤^{e}	۲/۹٥^{e}	۲/٥٥^{d}
٦log۱۰-۲/۵	٤/٥۷^{c}	۱/٦٦^{e}	٤/٦٦^{e}	۰/۷۹^{e}	٥/٦۱^{f}	۱/۱٥^{f}	۳/۹٦^{b}	٤/۲٦^{b}	٤/۱۹^{a}
۰log۱۰-۳/۲	٤/٦٥^{a}	۱/٥۲^{f}	٤/۷۱^{b}	۰/٦۳^{i}	٥/۷۰^{c}	۰/۹٥^{h}	۰/۰۰^{i}	۰/۰۰^{i}	۰/۰۰^{h}
۲log۱۰-۳/۲	٤/٦٦^{a}	۰/۷۲^{f}	٤/۷۲^{a}	۰/٦٤^{h}	٥/۷۲^{a}	۰/۹٦^{g}	۲/۱۱^{g}	۲/۲٦^{g}	۱/۹٥^{f}
٤log۱۰-۳/۲	٤/٦٦^{a}	۱/٥۱^{fg}	٤/۷۲^{a}	۰/٦٤^{h}	٥/۷۱^{b}	۰/۹٥^{h}	۲/۹۲^{d}	۳/٤۳^{d}	۳/۰۳^{c}
٦log۱۰-۳/۲	٤/٦٥^{a}	۱/٥۲^{f}	٤/۷۱^{b}	۰/٦۳^{i}	٥/۷۰^{c}	۰/۹٦^{g}	٤/۲۱^{a}	٤/٦۷^{a}	٤/۲٤^{a}

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

*این اعداد لگاریتمی هستند.

٤-نتیجه‌گیری

نتایج تاثیر تلقیح باکتریوفاژMS2 در چهار سطح ($pfu.ml^{-1}$ 10^{6}،10^{4}،10^{2}،۱۰) و سه سطح چربی (۱/۵ ٪، ۲/۵ ٪، ۳/۲ ٪) در فرآوری پنیر حین پرس و آب‌نمک‌گذاری 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 باکتریوفاژ *MS2* در دلمه مربوط به سطح چربی ۳/۲ ٪ بود.

٥-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., Prellezo, 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.
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 Qβ. *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 making1. *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,

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.
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 CaCl2. *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.

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-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.

(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[1], Masoud Yavarmanesh[2*], Mohammad Bagher Habibi Najafi[3]

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 log10in 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 fatcontent of 3.2% and spiked level of 6 log10. 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