مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

جداسازی و شناسایی کپک‌های آلوده‌کننده پنیرهای فراپالایشی در شهرستان فسا

درنوش جعفرپور[1]*، پریسا عطایی[2]

۱ استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد فسا، دانشگاه آزاد اسلامی، فسا، ایران.

۲ دانش آموخته کارشناسی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فسا، فسا، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۳

کلمات کلیدی:

آلودگی کپکی،

پنیر فراپالایشی،

جداسازی،

شناسایی.

DOI: 10.52547/fsct.18.121.9

DOR:20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9

* مسئول مکاتبات:

d.jafarpour84@yahoo.com

چکیده

پنیر یکی از فرآورده‌های شیری با ارزش به شمار می‌آید که نقش پررنگی در تغذیه بیشتر افراد جامعه دارد. در خلال فرایند تولید یا پس از آن ممکن است پنیر دچار آلودگی کپکی شود که این رویداد سبب به خطر افتادن سلامتی محصول و کاهش بازارپسندی آن می‌شود. پنیر از جمله مواد غذایی است که شرایط مناسب برای رشد قارچ‌ها را داراست. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی کپک‌های آلوده کننده پنیرهای فراپالایشی عرضه شده در شهرستان فسا بوده است. بدین منظور به طور تصادفی ۱۱۰ نمونه از قوطی‌های پنیر کارخانه‌های مختلف از بازار جمع‌آوری و به دو صورت در باز و در بسته نگهداری شدند. پس از رشد، شناسایی کپک‌ها به دو روش ریخت‌شناسی و مولکولی انجام پذیرفت. نتایج نشان دادند که بیشترین میزان آلودگی پنیرهای در باز مربوط به کپک ***Penicillium*** بوده و بعد از آن ***Aspergillus***، ***Paecilomyces*** و ***Trichoderma*** قرار دارند. در پنیرهای در بسته نیز کپک ***Byssochlamys spectabilis*** بیشترین آلودگی را به خود اختصاص داد که در طی این تحقیق برای اولین بار در ایران این نوع قارچ جداسازی و شناسایی شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-14]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9]

[DOI: 10.52547/fsct.18.121.9]

۱- مقدمه

پنیر یکی از فرآورده‌های لبنی ارزشمند به شمار می‌رود که در تغذیه‌ی بسیاری از اقشار جامعه نقش پررنگی دارد [۳-۱]. در سال‌های گذشته میزان تولید پنیر در ایران افزایش چشمگیری داشته است به‌طوری که در سال ۱۳۹۰ تولید پنیر ایران به بیش از ۲۵۰ هزار تن رسیده است. اما در دو دهه اخیر و با روی کار آمدن فناوری فراپالایش و کابرد آن در صنایع شیر، نحوه تولید پنیر در ایران تغییر قابل توجهی داشته است و هم اکنون عمده پنیر تولیدی در کشور به روش فراپالایش فرآوری می‌گردد. روش فراپالایش یک روش مداوم و کارآمد جهت تغلیظ شیر و جداسازی آب و مولکول‌های کوچک تشکیل-دهنده شیر می‌باشد. کاربرد این روش سبب تولید پنیر با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاصی می‌گردد که عمر نگهداری و ماندگاری این پنیرها را تحت تاثیر قرار می‌دهد [٤].

در میان فرآورده‌های شیری، پنیر تنها فرآورده ایست که حساسیت زیادی به فساد قارچی دارد [٥]. رشد کپک‌ها از مهم‌ترین عواملی است که سبب کاهش زمان ماندگاری و سلامت پنیرهای فراپالایشی می‌گردد. از نقطه نظر اقتصادی رشد کپک که عمدتا هم بر روی سطح پنیر صورت می‌گیرد سبب ایجاد مزه و نمای نامناسب و کاهش پذیرش پنیر از سوی مصرف‌کنندگان می‌گردد، اما از دیدگاه بهداشتی، رشد و توکسین‌زایی کپک‌ها بر روی پنیر می‌تواند سبب به خطر انداختن سلامت مصرف‌کنندگان گردد. حال با توجه به تولید انبوه و مصرف گسترده این ماده غذایی، آلودگی پنیر به مایکوتوکسین‌ها می‌تواند سلامت بخش قابل توجهی از افراد جامعه را به چالش بکشد [٨-٦]. مایکوتوکسین‌ها متابولیت-های ثانویه قارچی هستند که ویژگی‌های جهش‌زایی و سرطان‌زایی بسیاری از آن‌ها به اثبات رسیده است [٦و٩].

هاگ کپک‌ها قادر است به سادگی از طریق جریان هوا به نقاط مختلف منتقل و موجب آلودگی مواد غذایی مختلف شود. تحقیقات نشان داده است که هوای سالن تولید مهم‌ترین منشا آلودگی کپکی در تولید پنیر صنعتی محسوب می‌شود [١٠]. از مهم‌ترین فاکتورهای موثر بر رشد و فسادزایی کپک‌ها در پنیر می‌توان به مواردی همچون توانایی رشد کپک‌ها در دمای یخچال، رشد کپک‌ها در غلظت‌های پایین اکسیژن، مقاومت در برابر فعالیت ضد میکروبی اسیدهای چرب آزاد و رشد در فعالیت آبی پایین اشاره کرد [١١].

به علت رشد کند و توان رقابتی کمتر نسبت به باکتری‌ها، کپک‌ها و مخمرها اغلب درون و یا روی غذاهایی که برای رشد باکتری‌ها نامناسبند، رشد می‌کنند [١٥-١٢]. با توجه به ویژگی‌های پنیر سفید فراپالایشی و بر طبق استاندارد ایران pH این پنیر حداکثر به ۵/۲ می‌رسد که در این pH رشد بیشتر باکتری‌های فسادزا و بیماری‌زا متوقف می‌گردد اما کپک-ها قادرند در این وضعیت به خوبی رشد و تولید توکسین نمایند [١٦]. آگاهی از فلور کپکی پنیر می‌تواند در سامان دادن روش‌هایی برای پیشگیری و یا کاهش میزان آلودگی در این فرآورده‌ی ارزشمند کاربرد داشته باشد [١٦و١٧]. از این رو پژوهش‌های گسترده‌ای در نقاط مختلف، جهت آگاهی از این موضوع صورت پذیرفته است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که عموما کپک‌های آلوده‌کننده پنیر بیشتر شامل جنس-های *Penicillium*، *Aspergillus*، *Cladosporium*، *Geotrichum*، *Mucor*، *Trichoderma* می‌باشد [١٨ و ١٩]. Bullerman در بررسی خود، کپک *Penicillium* را به عنوان متداول‌ترین قارچ آلوده‌کننده پنیر و دیگر محصولات لبنی تخمیری معرفی کرد [٢٠]. در تحقیقی که Hocking و Feado بر روی پنیر چدار استرالیایی انجام دادند، ۱۹۵ نمونه قارچ جدا شد که ٤٤٪ آن *Cladosporium*، ٢٧٪ آن *Penicillium* و ١٩٪ آن مخمر بود [٢١]. در تحقیقی که Hocking روی پنیرهای بسته‌بندی شده در اروپا انجام داد، عامل اصلی فساد را *Penicillium commune* گزارش کرد [٢٢]. در مجموع جنس *Penicillium* مهم‌ترین جنس کپکی آلاینده پنیر در سراسر دنیا محسوب می‌گردد که توان تولید برخی از مایکوتوکوسین‌ها از جمله اوکراتوکسین A، پاتولین، سیترینین و پنی‌سیلینیک اسید را دارد [٢٣].

اگرچه مشکل رشد کپک در سال‌های گذشته در بسیاری از پنیرهای تولیدی در کشور وجود داشته است اما توجه کمتری به جداسازی و شناسایی این عوامل آلاینده میکروبی شده است، به طوری‌که مستندات علمی که نشانگر این موضوع باشد در دست نیست. از این‌رو با توجه به اهمیت اقتصادی و بهداشتی آلودگی کپکی پنیرهای فراپالایشی، هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی کپک‌های آلاینده پنیرهای فراپالایشی موجود در سطح عرضه در شهرستان فسا می‌باشد. علاوه بر آن کپک‌های آلاینده این نمونه از پنیرها، پس از باز شدن بسته بندی و نگهداری نمونه‌ها در یخچال نیز ارزیابی شدند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.9]

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها

در این پژوهش به منظور ارزیابی میزان آلودگی کپکی پنیرها و جداسازی و شناسایی کپک‌های آلاینده، تعداد ۱۱۰ نمونه پنیر سفید فراپالایشی تولید شده توسط کارخانجات موجود در شهرستان فسا و پنیرهای موجود در سوپرمارکت‌های شهرستان، به شکل تصادفی از بازار جمع‌آوری و تحت شرایط بهداشتی به منظور جلوگیری از آلودگی ثانویه به آزمایشگاه منتقل شد. با توجه به عمر ماندگاری شصت روزه این نمونه پنیرها، تمامی نمونه‌ها تا یک هفته پیش از پایان عمر نگهداری (به مدت ۵۳ روز) در یخچال با دمای ۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند و سپس عملیات جداسازی کپک بر روی آن‌ها صورت گرفت. هم‌چنین به منظور جداسازی کپک‌های متداول آلوده‌کننده پنیرهای فراپالوده تعدادی از قوطی‌های پنیر نیز به صورت کاملا در باز در یخچال‌های متفاوت قرار داده شد و تا ظهور نشانه‌های رشد کپک توسط مشاهده چشمی نگهداری شدند، و سپس مورد آزمون قرار گرفتند.

۲-۲- جداسازی کپک‌های فسادزا

پنیرهای دربسته‌ای که هیچ نشانه‌ای از رشد کپک بر روی آن‌ها مشاهده نشد از زنجیره آزمون ما حذف شدند. پنیرهای در-بسته‌ای که به هنگام بازکردن دربشان، بر روی آن‌ها کپک مشاهده شد و نیز پنیرهایی که به صورت درباز در یخچال نگهداری شده بودند و کپک بر روی آن‌ها مشاهده شد، به عنوان پنیر آلوده به ثبت رسیده و مورد آزمون قرار گرفتند. به منظور جداسازی کپک‌ها با سوزنی سترون به اندازه یک بلوک (مربع 1cm×1cm) از کپک برداشته و بر روی محیط کشت(Potato Dextrose Agar (PDA (مرک، آلمان) قرار داده شد. پتری دیش‌ها در دمای ۲۵ °C گرم‌خانه‌گذاری شدند تا کپک‌ها به اندازه کافی رشد کنند.

۲-۳- خالص‌سازی کپک‌ها

جهت خالص‌سازی کپک‌ها به شیوه Mundkur از روش کشت انتهایی ریسه استفاده شد. بدین منظور ابتدا قارچ جداسازی شده با سوزن سترون برداشته و بر روی محیط Water Agar (WA) کشت داده شد. سپس پتری دیش‌ها در گرم‌خانه در دمای ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا رشد لازم انجام شود. بسته به نوع قارچ پس از حدود ۲ تا ۳ روز در زیر بینوکولار با سوزن استریل یک بلوک از انتهایی ریسه کپک برداشته و در کنار شعله به محیط PDA جدید اضافه شد. مجددا پتری دیش‌ها گرم‌خانه‌گذاری شدند تا کپک‌ها رشد کنند [۲٤].

۲-٤- شناسایی کپک‌ها

به منظور شناسایی کپک‌های جداسازی شده از دو روش ریخت‌شناسی و مولکولی استفاده شد. ریخت‌شناسی کپک‌ها به دو روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی انجام پذیرفت. در روش ماکروسکوپی، کپک‌هایی که در روش قبل خالص‌سازی شده و بر روی محیط کشت PDA رشد کرده بودند، از نظر رنگ سطح و پشت کلنی‌ها، منظره سطح کلنی‌ها از نظر داشتن چین و شکن، خطوط شعاعی و یا دوایر متحدالمرکز، صاف یا چین‌دار بودن سطح کلونی و همچنین حالت سطح کلونی‌ها مانند داشتن حالت پرزی، پودری، پنبه‌ای، مخملی و ... مورد بررسی قرار گرفتند [۵]. به منظور بررسی میکروسکوپی کپک‌ها از روش اسلاید کالچر استفاده شد [۲۵]. بدین صورت که از قارچ موردنظر یک اسلاید تهیه شد و در زیر میکروسکوپ با بررسی مشخصات پرگنه و رنگ‌آمیزی اندام‌های زایشی و با استفاده از کلید شناسایی قارچ‌های ناقص، جنس کپک تشخیص داده شد [۲٦].

شناسایی مولکولی کپک‌ها طبق روش مستوفی زاده و همکارانش انجام پذیرفت [۲۷]. به منظور استخراج DNA کپک‌ها می‌بایست ابتدا جدایه‌ها آماده‌سازی شده و عصاره یاخته از آن‌ها تهیه شود. از نمونه‌های جداسازی و خالص سازی شده سه بلوک جدا و به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر عصاره سترون شده‌ی سیب‌زمینی منتقل شد. فلاسک‌ها به مدت ده روز در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند. پس از ده روز محتویات هر فلاسک در تشتک‌های پتری سترون خالی و پرگنه‌ها با استفاده از آب مقطر سترون شسته شدند. میسلیوم‌ها با استفاده از سوزن‌های سترون از قطعات محیط کشت آگاردار جدا شده، داخل میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفته و پس از یخ زدن به کمک ازت مایع، میکروتیوپ‌ها به مدت ۲٤ ساعت سرما خشک شدند [۲۷].

جهت تهیه عصاره یاخته به پنج میلی‌گرم از میسلیوم سرما خشک شده‌ی هر جدایه، ۱۸۰ میکرولیتر از بافر استخراج محتوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (۲/۵٪ CTAB، ۲٪ 2- mercaptoethanol، ۲۰ EDTA میلی‌مولار، NaCl ۱/٤ مولار و Tris-HCl ۱۰میلی‌مولار با pH=۸) حاوی ۰/۲ درصد proteinase K (فرمنتاز، لیتوانی) افزوده شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.9]

میسلیوم‌ها با استفاده از هموژنایزر و چند دانه ماسه‌ی سترون به خوبی ساییده شدند. عصاره به دست آمده به مدت یک ساعت در ۶۵°C قرار داده شد. سپس به مدت ده دقیقه در میکروفیوژ و در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ (Centric250IVD، DOMEL، آلمان) گردید و مایع رویی برداشته شد. استخراج DNA از ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی یاخته به دست آمده، با استفاده از کیت DNA™-PLUS (سیناژن، ایران) انجام پذیرفت [۲۷].

برای تشخیص کپک‌های جداسازی شده از روش PCR و با استفاده از دستگاه ترموسیکلر (Peltier thermocycler، انگلستان) انجام شد. در این روش با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و به کار بردن یک جفت پرایمر ITS_1 و ITS_4 قطعه‌ای از ناحیه بین ژنی تکثیر شد. منطقه ITS شامل ژن ۵/۸S از rDNA با طول ۶۰۰ bp می‌باشد، که توسط دو پرایمر مذکور تکثیر و توالی‌یابی شد. در جدول ۱ مشخصات پرایمرهای عمومی به کار رفته برای تکثیر DNA در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آورده شده است. واکنش PCR با استفاده از جفت پرایمر مذکور با یک برنامه حرارتی شامل یک مرحله ۱۲۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۵°C و سپس ۳۰ چرخه متوالی شامل برنامه زمانی: ۹۵ °C برای ۲۰ ثانیه، ۵۵ °C برای ۲۵ ثانیه و ۷۲ °C برای ۵۰ ثانیه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ °C برای ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

پس از اتمام PCR، محصولات بدست آمده خالص‌سازی شده و برای توالی‌خوانی فرستاده شدند. نتایج توالی‌یابی ابتدا با استفاده از برنامه DNATAR تجزیه و تحلیل شده و سپس با توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI مقایسه و مورد ارزیابی قرار گرفتند.

Table 1 Specifications of general primers used for DNA

Primer	Position	Primer sequence	Primer designer	Target DNA	Primer melting point (°C)	GC percent	Duplicate piece size
ITS1[1]	Forward	5' TCC GTA GGT	White et al, 1990	ITS	55.7	47.6	600- 650 bp
ITS4	Reverse	TGA TAT GC 3'	White et al, 1990		55.3	45	

1. Internal transcribed spacers 1, 2 and 5.8S gene of rDNA .

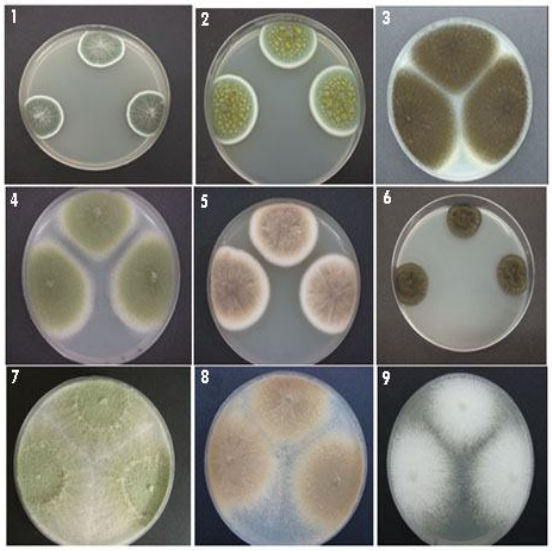

Fig 1 Macroscopic images of moulds isolated from UF cheeses on PDA medium. 1: *Penicillium commune*, 2: *Penicillium Chrysogenum*, 3: *Aspergillus niger*, 4: *Aspergillus oryza*, 5: Sexual form of *Aspergillus* (*Emericella nidulans*), 6: *Cladosporium cladosporioes*, 7. *Trichoderma harizanum,* 8: *Paecilomyces variotii* 9: *Byssochlamys spectabilis*

۳- نتایج

۳-۱- شناسایی ریخت‌شناسی کپک‌ها

در مجموع کپک‌هایی که از پنیرهای آلوده جداسازی شد متعلق به جنس‌های *Aspergillus* spp.، *Penicillium* spp.، *Byssochlamys* spp.، *Cladosporium* spp. و *Trichoderma* spp. بودند. با استفاده از کلیدهای شناسایی گونه‌های *آسپرژیلوس* [۲۸]، *پنی‌سیلیوم* [۲۹]، *کلادوسپوریوم* [۳۰]، *تریکودرما* [۳۱]، *پسیلومایسس* [۳۲] و *بیسوکلامیس* [۳۳] شناسایی شدند که تصاویر ماکروسکوپی تعدادی از آن‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.9]

۳-۲- شناسایی مولکـــولی کپک‌ها

جهت تشـخیص تکمیلـی و تأیید نتـایج حاصـل از شناسـایی ریخـت‌شناسـی کپـک‌هـای ایزولـه شـده آزمـایش PCR بـا پرایمرهای ITS_1 و ITS_4 انجام گردید و قطعه ژن هدف برای کلیه ایزوله‌ها با موفقیت تقویت شـد (شـکل۲). نتـایج تعیـین توالی با DNAهای موجود در بانک ژنـی (Gene Bank) از طریق سایت online (NCBI) با کمک نـرم‌افـزار BLAST برای جدایه‌ها تطبیق داده شد که با نتایج آزمون‌هـای ریخـت-شناسی ۱۰۰درصـد مطابقـت داشـت. در جـدول ۲ گونـه‌هـای کپک‌های جدا شده از پنیرهای فراپالایشی مورد بررسـی آورده شده است.

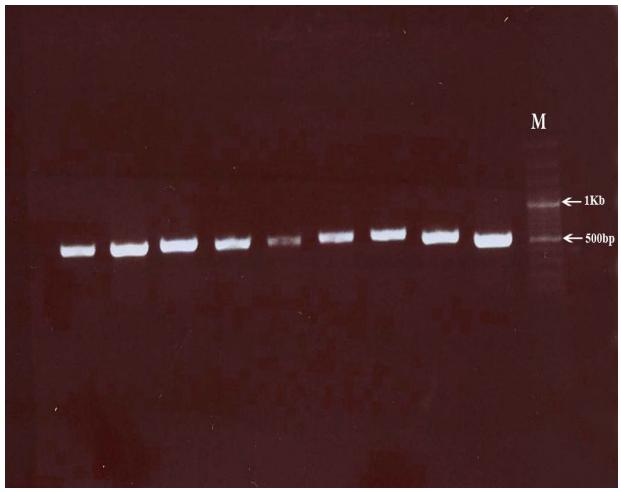

Fig 2 Electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) products of mould samples after purification

Table 2 Types of moulds isolated from contaminated UF cheeses

Moulds name
Aspergillus oryza
Aspergillus niger
Emericella nidulans (Sexual form of Aspergillus)
Trichoderma harizanum
Paecilomyces variotii
Byssochlamys spectabilis
Penicillium commune
Penicillium crustosum
Penicillium chrysogenum
Cladosporium cladosporioides

۳-۳- فراوانی کپک‌های جداسازی شده

از ۹۰ نمونه پنیر در بسته، ۱۹ عدد از آن‌هـا (۲۱/۱ ٪) آلـودگی بـه کپـک را نـشان دادنـد، کـه از ۱۹ پنیـر آلـوده، کپـک *Byssochlamys spectabilis* بـا میـزان ۵۲/۷٪ بیـشترین آلودگی را به خود اختـصاص داد. بعـد از آن *Aspergillus oryza* بـــــه میـــــزان ۲۱٪ ، *Cladosporium cladosporioides* بـه میـزان ۱۵/۷۸٪ و *Aspergillus niger* به میزان ۱۰/۵۲٪ قرار دارند. نتایج نـشان دادنـد کـه از ۲۰ نمونه پنیری که به صورت در بـاز نگهـداری شـده بودنـد، همه آن‌ها آلوده به کپک بوده به نحـوی کـه در ایـن نمونـه‌هـا قارچ *Penicillium* با ٤٥٪ فراوانی، بیشترین عامـل آلـودگی بـــوده اســـت. قـــارچ *Aspergillus* بـــا ۳۰٪ فراوانـــی، *Paecilomyces* با ۱۵٪ و *Trichoderma* با ۱۰٪ فراوانـی در ردیف‌های بعدی قرار دارند.

در مجمـوع از کـل نمونـه‌هـای پنیـر آلـوده، ۱۰ نـوع کپـک جداسازی شد که انواع کپک‌های جداسـازی شـده در جـدول (۲) آورده شده‌اند.

کپک‌ها به طور وسیعی در محیط پراکنده‌اند و از آن جا که پنیر محیطی مناسب برای رشد آن‌ها است به راحتـی مـی‌توانـد در معرض فساد قرار گیرد. با توجه به اینکه قارچ‌ها می‌تواننـد در دمای یخچال، در غلظت کم اکسیژن و در فعالیـت آبـی پـایین رشد کنند و به دلیل دارا بودن فعالیت لیپولیتیکی و مقاومت بـه نگهدارنده‌ها و اسـیدهای چـرب آزاد، در فـساد پنیرهـا نقـش موثری را بر عهده دارند.

در این تحقیق، ۱۱۰ نمونه پنیر جمع‌آوری شد که ۹۰ نمونه به صورت در بسته و ۲۰ نمونه بـه صـورت در بـاز نگهـداری و جداسـازی کپـک از روی آن‌هـا انجـام پـذیرفت. کپـک‌هـای جداسـازی شـده بـه دو صـورت مولکـولی و ریخـت‌شناسـی شناسایی شدند که نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده با نتایج شناسایی ریخت‌شناسـی بـا استفاده از کلیدهای شناسایی مطابقت داشت.

در مجموع از ۲۰ نمونه پنیر نگهداری شده به صورت در بـاز، همه آن‌ها آلوده به کپک بوده به نحـوی کـه در ایـن نمونـه‌هـا کپک *Penicillium* با ٤٥٪ فراوانی بیـشترین عامـل آلـودگی بود. از ۹۰ نمونه پنیر نگهداری شده بـه صـورت در بـسته، ۱۹ عـدد از آن‌هـا آلـودگی بـه کپـک را نـشان دادنـد کـه کپـک *Byssochlamys* (۵۲/٦٪ فراوانـــی) بیـــشترین آلـــودگی را تشکیل داد. از ۱۰ جدایه‌ای که شناسایی شدند ٤ عدد از آن‌هـا (*Aspergillus oryza*، *Aspergillus niger*،

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.9]

Cladosporium cladosporioides و *Byssochlamys spectabilis*) مربوط به پنیرهای در بسته و ۸ عدد از آن‌ها (*Aspergillus oryza*، *Aspergillus niger*، *Emericella nidulans*، *Trichoderma harizanum*، *Paecilomyces variotii*، *Penicillium commune*، *Penicillium crustosum* و *Penicillium chrysogenum*) مربوط به پنیرهای در باز بودند. در تحقیقی که Ledenbach و Marshall در سال ۲۰۱۰ و Hocking وFaedo در سال ۱۹۹۲ بر روی کپک‌های آلوده کننده محصولات لبنی انجام دادند، جنس‌های *پنی‌سیلیوم* و*کلادوسپوریوم* را از جنس‌های شایع گزارش کردند. آن‌ها دسترسی قارچ به اکسیژن (هوادهی سطحی) در سطح نمونه و اسیدیته پایین را از عوامل رشد کپک بیان کردند [۳٤ و ۲۱].

Sengun و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی مایکوتوکسین‌ها و کپک‌های موجود در پنیر پرداختند و قارچ‌های *پنی‌سیلیوم*، *آسپرژیلوس*، *کلادوسپوریوم*، *ژئوتریکوم*، *موکور* و *تریکودرما* را شناسایی و کپک *پنی‌سیلیوم* را به عنوان بیشترین فراوانی کپکی گزارش کردند. آن‌ها در بررسی خود، آلودگی کپکی محصولات لبنی را به دو دسته مستقیم و غیرمستقیم تقسیم‌بندی کردند. آلودگی مستقیم به طور تصادفی و اتفاقی به وجود می‌آید مانند آلودگی ناشی از عدم رعایت بهداشت در فرآیند تولید و عرضه و در نوع غیر مستقیم آلودگی از طریق علوفه دامی کپک زده یا حاوی اسپور قارچ به حیوان و سپس از طریق شیر به فرآورده‌های دامی منتقل می‌شود. آن‌ها عنوان کردند که بهترین راه برای جلوگیری از تولید مایکوتوکسین‌ها در پنیر جلوگیری از رشد قارچ است [۳۵].

در طی تحقیق حاضر، کپک *A.niger*، ۱۵٪ کپک‌ها در پنیرهای در باز و ۱۰/۵۲٪ کپک‌ها در پنیرهای دربسته را تشکیل می‌داد. *آسپرژیلوس* در مواردی عامل مولد سم اکراتوکسین بوده که می‌تواند باعث صدمات کلیوی در انسان شود [۳٦]. Kalhotka و همکاران در مطالعه‌ای بر روی شیر و پنیر، قارچ *آسپرژیلوس* را جداسازی کردند و اسیدیته پایین را علت اصلی فساد در محصولات لبنی عنوان کردند که شرایط مناسبی را برای رشد کپک و مخمر فراهم می‌کند [۳۷].

کپک *Cladosporium cladosporioides*، ۱۵/۷۸٪ قارچ موجود در پنیرهای در بسته را تشکیل می‌داد که این قارچ نیز می‌تواند عفونت‌های چشمی و آبسه مغزی در انسان را به همراه داشته باشد. در سال ۱۹۹۲ Feado و Hocking کپک *Cladosporium* را از پنیر چدار جدا نمودند [۲۱].

کپک *Penicillium* بیشترین آلودگی در پنیرهای در باز را به خود اختصاص داد که گونه‌های مختلف این قارچ شامل: *P. commune* با ۱۵٪، *P. crustosum* با ۱۰٪ و *P. chrysogenum* با ۲۰٪ فراوانی در آلودگی پنیرها نقش داشتند. در سال ۱۹۹۲ Feado و Hocking این قارچ را از پنیر چدار جدا نمودند [۲۱]. در سال ۲۰۰۱، Basilico و همکارانش گزارش کردند که عامل آلودگی اکثر پنیرهای سخت در طی رسیدن، گونه‌های مختلف قارچ *Penicillium* می‌باشد که این قارچ از محیط‌هایی مانند هوا، مواد بسته‌بندی و مواد خام می‌تواند وارد فضای کارخانه شود [۳۸]. انواع گونه‌های *Penicillium* مولد توکسین می‌توانند باعث به مخاطره انداختن سلامت مصرف‌کنندگان شوند و برای جلوگیری از این آلودگی، اقدامات جدی ضروری به نظر می‌رسد [۲۱].

کپک *Trichoderma harizanum* ۱۰٪ کپک‌های جداسازی شده از پنیرهای در باز را تشکیل می‌دهد. این قارچ می‌تواند عفونت‌های دستگاه گوارش را به همراه داشته و وارد شدن اسپور آن به مجاری تنفسی مشکلاتی را ایجاد کند [۳٦].

کپک *Paecilomyces* ۱۵٪ قارچ‌های موجود در پنیرهای در باز را تشکیل می‌دهد که می‌تواند در بیماران با نقص ایمنی باعث بیماری‌های قارچی کشنده شود مثل بیماری اندو کاردیت که در انسان‌های بدون نقص ایمنی در بعضی موارد باعث عفونت‌های پوستی می‌شود [۳٦].

کپک *Byssochlamys* بیشترین آلودگی پنیرهای در بسته را تشکیل می‌دهد که برای اولین بار در ایران در طی این تحقیق جداسازی و شناسایی شد. این نوع قارچ به حرارت بسیار مقاوم بوده به نحوی که در شیر خام وجود داشته و به راحتی دمای پاستوریزاسیون را تحمل و در مواد غذایی تولید سم پاتولین می‌کند [۲۳]. این آلودگی قارچی می‌تواند هم از طریق شیر آلوده و هم به طور غیر مستقیم از طریق محیط

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.9]

آلوده، وسایل و لباس کارگران آلوده به محصول در مسیرهای مختلف تولید وارد شده و با توجه به مقاوم بودن نسبت به حرارت پاستوریزاسیون توانسته است در محصول باقی بماند.

Table 3 Contamination percentage of fungal species isolated from UF cheeses

Types of isolated moulds		Percentage of contamination in UF cheeses	
		Number (%) of isolates in packaged cheeses	Number (%) of isolates in opened package cheeses
***Penicillium* sp.**	*P. commune*	-	3 (15 %)
	P. crustosum	-	2 (10 %)
	P. chrysogenum	-	4 (20 %)
***Aspergillus* sp.**	*A. niger*	2 (10.52 %)	3 (15 %)
	A. oryza	4 (21 %)	2 (10 %)
	Emericella nidulans	-	1 (5 %)
Cladosporium cladosporioides		3 (15.78 %)	-
Trichoderma harizanum		-	2 (10 %)
Paecilomyces variotii		-	3 (15 %)
Byssochlamys spectabilis		10 (52.6 %)	-

٤- نتیجه گیری

با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده چنین می‌توان استنتاج کرد که علت آلودگی پنیرها می‌تواند چند فاکتوری باشد. با توجه به پاستوریزه شدن شیر ورودی و اعمال حرارت بر روی شیر خام به نظر می‌رسد که تمام اسپورهای موجود در آن از بین می‌رود اما اسپور قارچ *Byssochlamys* توانایی تحمل دمای پاستوریزاسیون را داشته و می‌تواند در فرآورده نهایی رشد و تولید سم کند که با توجه به درصد بالای آلودگی پنیرهای در بسته به این قارچ، این مسئله باید به دقت بررسی گردد. اما بیشترین منبع آلودگی در مرحله ساخت پنیر می‌باشد، از این موارد می‌توان به مواد افزودنی مانند آنتی‌فوم، آنتی‌استیک که به منظور عدم چسبندگی به ظرف اضافه می‌شود، مایه پنیر، آب مصرفی و ظروف مورد استفاده اشاره کرد. هم‌چنین هوای کارخانه نیز می‌تواند مهم‌ترین عامل آلودگی به حساب آید. بدین منظور باید از فیلترهای مخصوص جهت استریل کردن هوا استفاده شود و هر از چند وقت یکبار از درست کار کردن آن‌ها اطمینان حاصل شود. استفاده از علوفه دامی سالم و بدون آلودگی قارچی (که در اثر انبارداری و تهویه نامناسب ایجاد می‌شود) برای تامین نیاز غذایی دام به شکل ریشه‌ای و اساسی در جلوگیری از ورود، نفوذ و نشر آلودگی به اندام‌های حیوان و متعاقب آن تاثیرگذاری از طریق مایکوتوکسین‌های تولید شده در شیر می‌تواند در بهبود و افزایش کیفیت شیر و محصولات لبنی نقش به سزایی داشته باشد. هم‌چنین در تامین غذای دام باید دقت لازم انجام شود که از علوفه دامی سالم و بدون آلودگی قارچی استفاده شده تا از ورود آلودگی به بدن حیوان و به دنبال آن نشر مایکوتوکسین‌های قارچی در شیر جلوگیری به عمل آید. یکی از راهکارهای موثر پیاده‌سازی سیستم HACCP و اجباری کردن آن در کارخانجات تولید کننده مواد غذایی بوده که از طریق ارگان‌های نظارتی می‌تواند صورت گرفته و گامی بزرگ در راستای بهبود مدیریت کیفیت و حمایت از مصرف‌کننده انجام پذیرد.

٥- منابع

[1] FAO. (2013). Milk and dairy products in human nutrition. Accessed June. 24, 2014.

[2] Jafarpour, D., Amirzadeh, A., Maleki, M. & Mahmoudi, M. R. (2017). Comparison of physicochemical properties and general acceptance of flavored drinking yogurt containing date and fig syrups. Foods and Raw materials, 5(2).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-14]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9]

[DOI: 10.52547/fsct.18.121.9]

[3] Hashemi, S. M. B. & Jafarpour, D. (2021). Bioactive edible film based on Konjac glucomannan and probiotic Lactobacillus plantarum strains: Physicochemical properties and shelf life of fresh-cut kiwis. Journal of Food Science, 86(2), 513-522.

[4] Garem, A., Schuck, P. & Maubois, J. L. (2000). Cheese making properties of a new dairy- based powder made by a combination of microfiltration and ultrafiltration. Le Lait 80, 25-32.

[5] Fallahi, F. & Madani, M. (2014). Study of contamination of different dairy products distributed in Isfahan to saprophytic fungi. Biological Journal of Microorganism, 3(11), p63-75

[6] Dalie, D., Deschamps, A. M. & Richord–Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and Mycotoxins. Food Control, 21, 370-380.

[7] Eghbali, M., & Jafarpour, D. (2021). Study the prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 contamination in traditional and handmade ice-cream in ice-cream supplier trade units of Bandar Abbas and evaluating the efficiency of chromogenic media compared to the standard media for its detection. Journal of food science and technology (Iran), 18(118), 79-91. [in Persian]

[8] Jafarpour, D., Hashemi, S. M. B. & Ghaedi, A. (2021). Study the antibacterial properties of different parts of saffron extract and their application in cream. Food Science and Technology, 18(115), 339-349. [in Persian]

[9] Khadijeh, A., Dornoush, J. & Shahram, S. S. (2018). Effects of in-package pasteurization on preventing spoilage in emulsion vacuum packaged sausages during refrigerated storage. Foods and Raw materials, 6(1).

[10] Kure, C. F., Borch, E., Karlsson, I., Homleid, J. P. & Langsrud, S. (2008). Use of the selective agar medium CREAD for monitoring the level of airborne spoilage moulds in cheese production. International Journal of Food Microbiology, 122(1-2), 29–34.

[11] Kure, C., Skaar, I. & Brendehaug, J. (2004). Mould contamination in production of semi-hard cheese. International Journal of Food Microbiology, 93(1), 41-49.

[12] Hashemi, S. M. B. & Jafarpour, D. (2020). Ultrasound and malic acid treatment of sweet lemon juice: Microbial inactivation and quality changes. Journal of Food Processing and Preservation, 44(11), e14866.

[13] Hashemi, S. M. B. & Jafarpour, D. (2020). Synergistic properties of *Eucalyptus caesia* and *Dracocephalum multicaule* Montbr & Auch essential oils: Antimicrobial activity against food borne pathogens and antioxidant activity in pear slices. Journal of Food Processing and Preservation, 44(9), e14651.

[14] Jafarpour, D., Shekarforoush, S. S., Ghaisari, H. R., Nazifi, S. & Sajedianfard, J. (2015). Impact of synbiotic diets including inulin, *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on intestinal microbiota of rat exposed to cadmium and mercury. Veterinary Science Development, *5*(2).

[15] Sayadi, M., Mojaddar Langroodi, A. & Jafarpour, D. (2021). Impact of zein coating impregnated with ginger extract and *Pimpinella anisum* essential oil on the shelf life of bovine meat packaged in modified atmosphere. Journal of Food Measurement and Characterization, 1-14.

[16] Alizadeh, M., Hamedi, M. & Khosroshahi, A. (2006). Modeling of proteolysis and lipolysis in Iranian white brine cheese, Food Chemistry, 97(2), 294-301.

[17] Hashemi, S. M. B. & Jafarpour, D. (2020). The efficacy of edible film from Konjac glucomannan and saffron petal extract to improve shelf life of fresh-cut cucumber. Food Science & Nutrition, 8(7), 3128-3137.

[18] Taniwaki, M. H. & Van Dender, A. G. F. (1992). Occurrence of toxigenic molds in Brazilian cheese. Journal of Food Protection, 55, 187-191.

[19] Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I. & Fleet, G. H. (2001). Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. International Journal of Food Microbiology, 68, 125-133.

[20] Bullerman, L. B. (1981). Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. Journal of Dairy Science, 64, 2439-2452.

[21] Hocking, A. D. & Feado, M. (1992).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-14]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9]

[DOI: 10.52547/fsct.18.121.9]

Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packaged cheddar cheese during maturation. International Journal of Food Microbiology, 16, 123-130.

[22] Hocking, A. D. (1997). Understanding and controlling mould spoilage in cheese. Australin Journal of Dairy Technology, 52, 123-124.

[23] Kure, C. & Skaar, I. (2000). Mould growth on the Norwegian semi-hard cheeses Norvegia and Jarlsberg. International Journal of Food Microbiology, 62, 133-137.

[24] Mundkur, B. B. (1959). Fungi and plant diseases. Macmillan & Co. Ltd, London. P. 246.

[25] Fisher, F. & Cook, N. B. (1998). Fundarmentals of diagnostic mycology. Philadelphia: WB Saunders.

[26] Barnett, B. & Hunter, H. (1998). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed., APS press. p. 218.

[27] Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Jamali, S. & Banihashemi, Z. (2010). Molecular phylogeny of three desert truffles from Iran based on ribosomal genome. Rostaniha, 11, 151-162.

[28] Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J. & Samson, R. A. (2007). The current status of species recognition and identification in Aspergillus. Studies in mycology, 59, 1-10.

[29] Frisvad, J. & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. Studies in Mycology, 49, 1-174.

[30] Crous, P. W., Braun, U., Schubert, K. & Groenewald, J. Z. (2007). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. Studies in Mycology, 58, 33–56.

[31] Rahman, A., Begum, M. F. & Rahman, M. (2011). Isolation and identification of Trichoderma species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste. Turk Journal of Biology, 35, 183-194.

[32] Liu, K., Howell, D.N., Perfect, J. R & Schell, W. A. (1998). Morphologic criteria for the preliminary identification of Fusarium, *Paecilomyces*, and Acremonium species by histopathology. American Journal of Clinical Pathology, 109(1), 45-54.

[33] Put, H. M. C. (1964). A selective method for cultivation heat resistant moulds, particularly those of the genus *Byssochlamys*, and their presence in Dutch soil. Journal of Applied Bacteriology, 27(1), 59-64.

[34] Ledenbach, L.H. & Marshall, R. T. (2010). Microbiological spoilage of dairy products.In: Sperber WH, Doyle MP, editor.Compendium of microbiological spoilage of foods and beverage. USA: Springer. P 41-67 .

[35] Sengun, I. Y., Yaman, D. B. & Gonul, S. A. (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese. World Mycotoxin Journal; 1(3), 291- 8.

[36] Razavilor, V. (1999). Pathogenic Microorganism in Food and Epidemiology of food poisoning. Tehran: Tehran University, Institute of Publishing and Printing.

[37] Kalhotka, L., Šustov, á. K., Hůlov, á. M. & Přichystalov, á. J. (2013). Important Groups of microorganism in raw goat milk and freash goat cheese determined during lactation. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences; 2 (5), 2314-17.

[38] Basilico, J. C., De basilica, M. Z., Chierizatti, C. & Vinderola, C. G. (2001). Characterization and Control of Thread Mould in cheese. Letters in Applied Microbiology, 32, 419-423.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.9]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Isolation and identification of mould contaminating UF cheeses in Fasa city

Jafarpour, D.[1*], Ataei, P.[2]

1. Assistant professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Fasa Branch, Islamic Azad University, Fasa, Iran
2. BSc. Department of Food Science and Technology, Fasa University, Fasa, Iran

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2019/ 04/ 18
Accepted 2021/ 09/ 04

Keywords:

Mould contamination,
UF cheese,
Isolation,
Identification.

DOI: 10.52547/fsct.18.121.9

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9

*Corresponding Author E-Mail:
d.jafarpour84@yahoo.com

ABSTRACT

Cheese is one of the valuable dairy products that has a significant role in feeding most people in society. During or after the production process, cheeses may become contaminated with moulds, which can endanger the health of the product and reduce its marketability. Cheese is one of the foods that has the suitable conditions for the growth of fungi. The purpose of this study was to isolate and identify the contaminants of ultrafiltration (UF) cheeses offered in Fasa city. For this purpose, 110 samples of cheese cans from different factories were randomly collected from the market and kept both open and closed. After growth, moulds were identified morphologically and molecularly. The results showed that the highest contamination of open cheeses was related to *Penicillium*, followed by *Aspergillus*, *Paecilomyces* and *Trichoderma*. In closed cheeses, *Byssochlamys spectabilis* was the most contaminated mould. During this study, for the first time in Iran, this type of fungus was isolated and identified.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-14]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.25.9]
[DOI: 10.52547/fsct.18.121.9]