بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم و صنایع غذایی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی‌ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی

اثر عملیات فرآیند تولید پنیر UF بر حضور *باسیلوس سرئوس*

نگارش:
ژیلا مرادی خاتون آبادی

استادان راهنما:
دکتر یحیی مقصودلو
دکتر حمید عزت‌پناه

استادان مشاور:
دکتر مرتضی خمیری
دکتر مهدی امین افشار

بهار ۹۰

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان‌نامه (رساله) خود، مراتب را قبلا بطور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **ژیلا مرادی خاتون آبادی** دانشجوی رشته **علوم و صنایع غذایی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به بهترین های زندگیم

پدر و مادر مهربانم

همسر فداکارم

خواهران و برادرم

تشکر و قدردانی

سپاس فراوان به درگاه او که آفرینش را هنر است و اسرار هنرمندیش جز به مدد هدایت، بر کس آشکار نشود. او که آموزگار آموزه‌های نانوشته‌ی خویش است و آموختن جز به گوشه‌ی چشم عنایت او ممکن نیست.

خدای را شاکرم که در سایه عنایت خویش و به لطف راهنمایی‌های بی‌دریغ و خالصانه اساتید مهربانم جناب آقایان **دکتر یحیی مقصودلو** و **دکتر حمید عزت‌پناه** و روشنگری‌های اساتید معزز **جناب آقایان دکتر مرتضی خمیری، دکتر مهدی امین‌افشار، دکتر علیرضا صادقی‌ماهونک، دکتر حبیب ا... میرزایی** و سرکار خانم **دکتر بهاره شعبانپور** افق‌های جدیدی از معرفت و پژوهش را پیش روی من گشودند.

کریما خود برگرفتی و کس نگفت که بردار، اکنون که برگرفتی مگذار
و در سایه لطف خویش میدار و جز به فضل و رحمت خود مسپار.

(عارف گرانقدر خواجه عبدا... انصاری)

چکیده

کاربرد غشای اولترافیلتراسیون به منظور تهیه پنیر فتا یکی از روش‌های معمول تهیه پنیر در ایران است. *باسیلوس سرئوس* به عنوان یک باکتری گرم مثبت و اسپورزا، نه تنها در محصولات شیری مانند پنیر فتای اولترافیلتر بلکه روی سطح تجهیزات نیز می‌تواند حضور داشته باشد. از سویی سمومی مانند سرئولید، همولایزین و سرولایزین از عوامل ایجاد مسمویت این باکتری محسوب می‌گردند. هدف از مطالعه حاضر بررسی حضور احتمالی *باسیلوس سرئوس* در خط تولید پنیر فتای اولترافیلتر، تأثیر مراحل بعد از پاستوریزاسیون در آلودگی محصول و زنده مانی آن در دوره نگهداری محصول نهایی بود. نمونه‌برداری از شیرخام تا مصرف (شامل شیرخام، فاز ماندگار، لخته و پنیر) و طی فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی تجهیزات در سه کارخانه تولید پنیر اولترافیلتر در شمال ایران صورت گرفت. بعد از آزمون‌های فیزیکی و فیزیکوشیمیایی، نمونه‌ها از نظر ویژگی‌های میکروبی مانند *باسیلوس سرئوس* مورد ارزیابی قرار گرفتند. این نمونه‌ها پس از استخراج DNA، از نظر دارا بودن ژن کد کننده سموم (سرولایزین A و B و همولایزین BL) به وسیله دستگاه PCR بررسی و سپس تعیین توالی شدند. نتایج نشان داد که نسبت *باسیلوس سرئوس* به اسپورهای هوازی و نسبت اسپورهای هوازی به کل میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های شیرخام ورودی به ترتیب در کارخانه ۱، ۰/۳٦٪ و ۰/۱۱٪، در کارخانه ۲، ۰/۷٤٪ و ۰/۱۲٪ و در کارخانه ۳، ۰/۷۲٪ و ۰/۱۸٪ بود. درحالی که این نسبت‌ها به طور معنی‌داری در هر سه کارخانه بعد از مراحل اصلی تولید (پاستوریزاسیون، هموژنیزاسیون، اولترافیلتراسیون و پرکن) افزایش می‌یابد ($p<۰/۰۵$). نتایج در محصول نیز نشان داد که تعداد آنها بعد از گرمخانه‌گذاری و طی دوره ماندگاری کاهش یافت. از طرفی جداسازی این باکتری بعد از فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی نشان می‌دهد که این باکتری احتمالاً به شکل بیوفیلم در سطوح و تجهیزات تولید از جمله مخازن و پرکن حضور دارد. همچنین آلودگی بعد از توقف تولید به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p <۰/۰۵$). از سوی دیگر نتایج حاصل از PCR نشان داد که ژن کد کننده سرولایزین A در تمامی سویه‌های جدا شده، ژن کد کننده سرولایزین B و همولایزین به ترتیب در ٦٤/٥٪ و ٦٨٪ تکثیر شد. از سوی دیگر تعیین توالی ژن‌های مورد نظر مشخص کرد، علاوه بر تفاوت نمونه‌های جدا شده از شیرخام با نمونه‌های جدا شده از فرآیند تولید، سویه‌هایی در محصول نهایی وجود دارد که مشابه سویه‌های موجود در آب استریل ($^{\circ}C$ ۹۵-۹۰) بودند. در نهایت می‌توان این طور نتیجه گرفت که علاوه بر حضور *باسیلوس سرئوس* در شیرخام، حضور این باکتری در سطح تجهیزات حتی بعد از فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی نیز نقش مهمی در کاهش ایمنی و کیفیت محصول دارد.

کلمات کلیدی: پنیر فتای اولترافیلتر، *باسیلوس سرئوس*، سرولایزین، همولایزین

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱- پنیر فتا ۴

۱-۱-۱- تهیه پنیر فتا به روش اولترافیلتراسیون ۵

۱-۱-۲- مراحل تولید پنیر فتا به روش اولترافیلتراسیون در ایران ۷

۱-۲- عملیات خوب بهداشتی و تجزیه و تحلیل خطر و کنترل نقاط بحرانی در جهت تولید محصول با کیفیت و ایمن ۱۰

۱- ۲-۱- دامداری ۱۱

۱-۲-۲- فرآوری ۱۲

۱-۳- آلودگی‌های حین فرآیند ۱۳

۱-۳-۱ بیوفیلم ۱۳

۱-۳-۲- گرفتگی غشا ۱۵

۱-۴- باکتری‌های بیماری‌زا ۱۶

۱-۵- *باسیلوس سرئوس* ۱۷

۱-۶- سموم *باسیلوس سرئوس* ۱۹

۱-۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و شناسایی گونه‌ها ۲۰

۱-۸- فرضیات تحقیق ۲۲

۱-۹- اهداف ۲۲

فصل دوم: سابقه تحقیق

۲-۱- حضور *باسیلوس سرئوس* در شیرخام ۲۴

۲-۲- بررسی *باسیلوس سرئوس* در فرآیندهای مختلف تولید شیر و فرآورده‌های آن ۲۵

۲-۳- حضور *باسیلوس سرئوس* در محصولات تولیدی از شیر ۲۷

۲-۴- حضور *باسیلوس سرئوس* در پنیر ۲۸

۲-۵- *باسیلوس سرئوس* و تشکیل بیوفیلم ۲۹

۲-۶- تأثیر فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی در محل بر حضور بیوفیلم ۳۱

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- معرفی محل انجام تحقیق ۳۴

۳-۲- مواد و تجهیزات ۳۷

۳-۲-۱- مواد و ترکیبات ۳۷

۳-۲-۲- وسائل، لوازم و تجهیزات ۳۷

۳-۳- روش‌ها ۳۸

۳-۳-۱- نمونه‌برداری ۳۹

۳-۳-۱-۱- نمونه‌برداری از شیرخام ۳۹

۳-۳-۱-۲- نمونه‌برداری از فرآیند تولید ۳۹

۳-۳-۱-۳- نمونه‌برداری از محصول ۳۹

۳-۳-۱-۴- نمونه‌برداری طی فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی ۴۰

۳-۳-۲- آزمون‌های فیزیکی و فیزیکوشیمیایی ۴۱

۳-۳-۳- آزمون‌های میکروبی ۴۱

۳-۳-۴- خالص‌سازی و نگهداری نمونه‌های *باسیلوس سرئوس* جدا شده ۴۲

۳-۳-۴-۱- نگهداری کوتاه مدت ۴۲

۳-۳-۴-۲- نگهداری طولانی مدت ۴۳

۳-۳-۵- انتخاب نمونه‌های *باسیلوس سرئوس* جهت انجام آزمون های ژنتیکی ۴۳

۳-۳-۶- استخراج DNA به روش استخراج نمکی ۴۴

۳-۳-۷- تعیین کیفیت DNA ۴۶

۳-۳-۸- طراحی آغازگرها ۴۷

۳-۳-۹- بهینه‌سازی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۴۷

۳-۳-۹-۱- کنترل آلودگی PCR ۴۸

۳-۳-۹-۲- چرخه‌های حرارتی PCR ۴۸

۳-۳-۱۰- الکتروفورز ۴۸

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۳-۱۱- بررسی بیان ژن همولایزین ٤٩
۳-۳-۱۲- توالی‌یابی ٤٩
۳-۴- تجزیه و تحلیل آماری ۴۹

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- شیرخام ۵۲
۴-۲- فرآیند تولید ۶۶
۴-۲-۱- ذخیره شیرخام ٦٦
۴-۲-۲- کلاریفایر/ باکتوفیوژ ۷۰
۴-۲-۳- پاستوریزاسیون ۷۲
۴-۲-۴- ذخیره شیر پاستوریزه ۷٤
۴-۲-۵- هموژنایزر ۷۷
۴-۲-۶- پیش گرم‌کن/ پاستوریزاتور دوم ۷۸
۴-۲-۷- غشای اولترافیلتراسیون ۷۹
۴-۲-۸- مخزن فاز ماندگار ۸۲
۴-۲-۹- پرکن ۸۵
۴-۲-۱۰- تونل انعقاد ۸۵
۴-۳- محصول ۸۷
۴-۳-۱- بعد از نمک‌زنی ۸۷
۴-۳-۲- گرمخانه‌گذاری ۸۸
۴-۳-۳- از زمان مصرف تا انقضای محصول ۹۰
۴-۴- شستشو و پاکیزه سازی در محل ۱۰۳
۴-۵- آزمون‌های اولیه و انتخاب نمونه‌ها جهت بررسی ژنتیکی ۱۱۶
۴-۶- نتایج بررسی‌های ژنتیکی ۱۱۹
۴-۶-۱- استخراج DNA ۱۱۹

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۴-۶-۲- طراحی پرایمر ۱۱۹
۴-۶-۳- واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۲۰
۴-۶-۴- توالی یابی ۱۲٤
نتیجه‌گیری کلی ۱۳۲
پیشنهادات اجرایی ۱۳۴
پیشنهادات پژوهشی ۱۳۴
فهرست منابع ۱۳۶

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- اندازه تقریبی ترکیبات موجود در شیر ۵
جدول ۱-۲- اجزای شیر گاو و فاز ماندگار (برحسب درصد وزنی/ حجمی)..... ۷
جدول ۱-۳- ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی پنیر فتا ۸
جدول ۱-۴- سموم شناخته شده در *باسیلوس سرئوس* ۲۰
جدول ۳-۱- شرایط مراحل مختلف فرآیند در سه کارخانه مورد مطالعه ۳۵
جدول ۳-۲- برخی از مواد و ترکیبات بکار رفته در انجام تحقیق ۳۷
جدول ۳-۳- برخی از لوازم، وسائل و تجهیزات بکار رفته در انجام آزمون‌ها..... ۳۷
جدول۳-۴- آزمون های فیزیکی و فیزیکوشیمیایی انجام شده در تحقیق ۴۱
جدول۳-۵- آزمون های میکروبی انجام شده در تحقیق ۴۲
جدول ۳-۶- شرایط بهینه برای اجرای واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر ۴۷
جدول ۳-۷- چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۴۸
جدول ۴-۱- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیرخام دریافتی کارخانجات مورد مطالعه ۵۲
جدول ۴-۲- کیفیت مورد قبول شیرخام مطابق استانداردها و منابع علمی ۵۶
جدول ۴-۳- برخی از مشخصات زنجیره تأمین شیرخام سه کارخانه مورد مطالعه ۵۸
جدول ۴-۴- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیرخام ورودی به کارخانجات مورد مطالعه بر اساس منبع تهیه‌کننده ۵۹
جدول ۴-۵- ویژگی‌های میکروبی شیرخام در استاندارد ملی ایران ۲۴۰۶ و استاندارد بین‌المللی FDA ... ۶۰
جدول ۴-۶- درجه‌بندی شیرخام ورودی‌کارخانجات مورد مطالعه مطابق استاندارد ملی ایران ۲۴۰۶ ..... ۶۱
جدول ۴-۷- درجه‌بندی شیرخام ورودی به کارخانجات مورد مطالعه از نظر میزان اسپورهای هوازی (عدد در میلی‌لیتر) ۶۴
جدول ۴-۸- درجه‌بندی شیرخام از نظر تعداد *باسیلوس سرئوس* در کارخانجات مورد مطالعه (عدد در میلی‌لیتر)..... ۶۵
جدول ۴-۹- درصد نسبت‌های میان تعداد کل میکروارگانیسم‌ها، اسپورهای هوازی و *باسیلوس سرئوس* در سه کارخانه مورد مطالعه به تفکیک منبع تهیه شیرخام ۶۶

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۴-۱۰- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیرخام ذخیره شده در مخزن شیرخام در کارخانجات مورد مطالعه ۶۷

جدول ۴-۱۱- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیرپنیرسازی قبل و بعد از کلاریفایر/ باکتوفیوژ کارخانجات مورد مطالعه ۷۰

جدول ۴-۱۲- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگیهای فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیر پنیرسازی قبل و بعد از پاستوریزاسیون در کارخانجات مورد مطالعه ۷۳

جدول ۴-۱۳- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیر پاستوریزه ذخیره شده در مخزن در کارخانجات مورد مطالعه ۷۵

جدول ۴-۱۴- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیر پنیرسازی قبل و بعد از هموژنایزر در کارخانجات مورد مطالعه ۷۷

جدول ۴-۱۵- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیر پنیرسازی قبل و بعد از پیش گرمکن در کارخانه‌های ۱ و ۳ .....۷۹

جدول ۴-۱۶- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی قبل و بعد از پاستوریزاسیون دوم در کارخانه ۲ .....۷۸

جدول ۴-۱۷- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیر پنیرسازی قبل و بعد از غشای اولترافیلتراسیون در کارخانجات مورد مطالعه ۸۱

جدول ۴-۱۸- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی فاز ماندگار ذخیره شده در مخزن در کارخانجات مورد مطالعه ۸۳

جدول ۴- ۱۹- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی فاز ماندگار قبل و بعد از پرکن در کارخانجات مورد مطالعه ۸۵

جدول ۴-۲۰- مقایسه میانگین و انحراف معیار برخی ویژگی‌های فیزیکی، فیزیکوشیمیایی و میکروبی دلمه پنیر بعد از عبور از تونل انعقاد در کارخانجات مورد مطالعه ۸۶

جدول ۴-۲۱- درصد نسبت‌های میان تعداد کل میکروارگانیسم‌ها، اسپورهای هوازی و *باسیلوس سرئوس* در برخی نقاط مهم در کارخانجات مورد مطالعه ۸۶

جدول ۴-۲۲- میانگین و انحراف معیار تغییرات pH از زمان تولید تا انقضای محصول ۹۴

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۴-۲۳- میانگین و انحراف معیار تغییرات اسیدیته از زمان تولید تا انقضای محصول ۹۵
جدول ۴-۲۴- میانگین و انحراف معیار تغییرات نمک از زمان تولید تا انقضای محصول ۹۶
جدول ۴-۲۵- میانگین و انحراف معیار تغییرات رطوبت از زمان تولید تا انقضای محصول ۹۷
جدول ۴-۲۶- میانگین و انحراف معیار تغییرات دما از زمان تولید تا انقضای محصول ۹۸
جدول ۴-۲۷- میانگین و انحراف معیار تغییرات تعداد کل میکروارگانیسم‌ها از زمان تولید تا انقضای محصول.....۹۹
جدول ۴-۲۸- میانگین و انحراف معیار تغییرات اسپورهای هوازی از زمان تولید تا انقضای محصول ۱۰۰
جدول ۴-۲۹- میانگین و انحراف معیار تغییرات تعداد *باسیلوس سرئوس* از زمان تولید تا انقضای محصول..... ۱۰۱
جدول ۴-۳۰- میانگین و انحراف معیار تغییرات تعداد کپک و مخمر از زمان تولید تا انقضای محصول... ۱۰۲
جدول ۴-۳۱- فرآیند شستشو و پاکیزه سازی در محل مربوط به مبدل های حرارتی و پیش‌گرم‌کن در هر سه کارخانه مورد مطالعه ۱۰۴
جدول ۴-۳۲- فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی در محل مربوط به غشای اولترافیلتراسیون در هر سه کارخانه.....۱۰۵
جدول ۴-۳۳- فرایند شستشو و پاکیزه‌سازی در محل مربوط به مخازن، خطوط تولید و پرکن در هر سه کارخانه مورد مطالعه ۱۰۶
جدول ۴-۳۴- میانگین و انحراف معیار ویژگی‌های میکروبی طی فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی درکارخانه۱.... ۱۰۷
جدول ۴-۳۵- میانگین و انحراف معیار ویژگی‌های میکروبی طی فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی درکارخانه۲..... ۱۰۹
جدول ۴-۳۶- میانگین و انحراف معیار ویژگی‌های میکروبی‌طی فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی درکارخانه۳..... ۱۱۰
جدول ۴-۳۷- توالی آغازگرهای مورد استفاده و دمای اتصال آنها ۱۲۰
جدول ۴-۳۸- نتایج حاصل از تکثیر ژن در نمونه‌های کارخانه ۱ .....۱۲۲
جدول ۴-۳۹- نتایج حاصل از تکثیر ژن در نمونه‌های کارخانه ۳ .....۱۲۳
جدول ۴-۴۰- نتایج حاصل از تکثیر ژن در نمونه‌های کارخانه ۲ .....۱۲۳
جدول ۴-۴۱- نولکئوتیدهای جهش یافته به همراه جایگاه آنها و اسید آمینه تغییر یافته در نمونه ۱ .....۱۲۵
جدول ۴-۴۲- نولکئوتیدهای جهش یافته به همراه جایگاه آنها و اسید آمینه تغییر یافته در نمونه ۲ .....۱۲۶
جدول ۴-۴۳- نولکئوتیدهای جهش یافته به همراه جایگاه آنها و اسید آمینه تغییر یافته در نمونه ۳ و ۴.....۱۲۷
جدول ۴-۴۴- نولکئوتیدهای جهش یافته به همراه جایگاه آنها و اسید آمینه تغییر یافته در نمونه ۵، ۶ و ۷ .....۱۳۱

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- توزیع ترکیبات شیر بر حسب کیلوگرم بین لخته تازه تشکیل شده و بخش محلول (بر حسب کیلو گرم) ۳

نمودار ۳-۱- فرآیند تولید پنیر در سه کارخانه مورد مطالعه ۳۶

نمودار ۳-۲- مـراحل انجام کار..... ۳۸

نمودار ۳-۳- مـوارد در نظـر گرفته شده جهت انتخاب نمونـه‌های *باسیلوس سرئوس* جدا شده جهت آزمون‌های ژنتیکی..... ۴۴

نمودار ۴-۱- همبستگی میان تعداد کل میکروارگانیسم‌ها واسپورهای هوازی با *باسیلوس سرئوس* در شیرخام دریافتی در کارخانه ۱..... ۵۳

نمودار ۴-۲- همبستگی میان تعداد کل میکروارگانیسم‌ها و اسپورهای هوازی با *باسیلوس سرئوس* در شیرخام دریافتی کارخانه ۲..... ۵۴

نمودار ۴-۳- همبستگی میان تعداد کل میکروارگانیسم‌ها و اسپورهای هوازی با *باسیلوس سرئوس* در شیرخام دریافتی کارخانه ۳..... ۵۵

نمودار ۴-۴- میزان آلودگی کلی شیرخام ورودی به کارخانه ۱ بر اساس منبع تهیه‌کننده..... ۶۱

نمودار ۴-۵- میزان آلودگی کلی شیرخام ورودی به کارخانه ۲ بر اساس منبع تهیه‌کننده..... ۶۲

نمودار ۴-۶- میزان آلودگی کلی شیرخام ورودی به کارخانه ۳ بر اساس منبع تهیه‌کننده..... ۶۳

نمودار۴-۷- مقایسه میانگین ویژگی‌های میکروبی قبل و بعد از ذخیره‌سازی شیرخام در مخزن در کارخانه ۶۸

نمودار ۴-۸- مقایسه میانگین ویژگی‌های میکروبی قبل و بعد از ذخیره‌سازی شیرخام در مخزن در کارخانه۲.... ۶۸

نمودار ۴-۱۰- مقایسه میانگین قبل و بعد از ذخیره شیر پاستوریزه در مخزن کارخانه ۱..... ۷۵

نمودار ۴-۱۱- مقایسه میانگین قبل و بعد از ذخیره شیر پاستوریزه در مخزن کارخانه ۲..... ۷۶

نمودار ۴-۱۲- مقایسه میانگین قبل و بعد از ذخیره شیر پاستوریزه در مخزن کارخانه ۳..... ۷۶

نمودار ۴-۱۳- مقایسه میانگین قبل و بعد از ذخیره فاز ماندگار در مخزن کارخانه ۱..... ۸۳

نمودار ۴-۱۴- مقایسه میانگین قبل و بعد از ذخیره فاز ماندگار در مخزن کارخانه ۲..... ۸۴

نمودار ۴-۱۵- مقایسه میانگین قبل و بعد از ذخیره فاز ماندگار در مخزن کارخانه ۳..... ۸۴

نمودار ۴-۱۶- میانگین تعداد کل میکروارگانیسم‌ها قبل و بعد از توقف خط تولید در کارخانه ۱ ..... ۱۱۲

نمودار ۴-۱۷- میانگین تعداد اسپورهای هوازی قبل و بعد از توقف خط تولید در کارخانه ۱ ..... ۱۱۲

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

نمودار ۴-۱۸- میانگین تعداد *باسیلوس سرئوس* قبل و بعد از توقف خط تولید در کارخانه ۱ ..... ۱۱۳
نمودار ۴-۱۹- تعدادکل میکروارگانیسم‌ها، اسپورهای هوازی و *باسیلوس سرئوس* در مخزن اسید و سود مورد استفاده جهت شستشوی خط تولید قبل و بعد از فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی کارخانه ۱ ..... ۱۱۴
نمودار ۴-۲۰- تعداد کل میکروارگانیسم‌ها، اسپورهای هوازی و *باسیلوس سرئوس* در مخزن اسید و سود مورد استفاده جهت شستشوی خط تولید قبل و بعد از فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی کارخانه ۲ ..... ۱۱۴
نمودار ۴-۲۱- تعداد کل میکروارگانیسم‌ها، اسپورهای هوازی و *باسیلوس سرئوس* در مخزن اسید و سود مورد استفاده جهت شستشوی خط تولید قبل و بعد از فرآیند شستشو و پاکیزه‌سازی کارخانه ۳ ..... ۱۱۵
نمودار ۴-۲۲– تولید آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز در نمونه‌های *باسیلوس سرئوس* جدا شده از کارخانه۱ ..... ۱۱۷
نمودار۴-۲۳– تولید آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز در نمونه‌های *باسیلوس سرئوس* جدا شده از کارخانه۲..... ۱۱۷
نمودار۴-۲۴– تولید آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز در نمونه‌های *باسیلوس سرئوس* جدا شده از کارخانه۳..... ۱۱۸
شکل ۴-۱- تصویر برخی از DNA های استخراج شده به روش استخراج نمکی بر روی ژل آگارز ۱۱۹
شکل ۴-۲ - به ترتیب از راست به چپ محصول PCR ژن سرولیزین A، سرولیزین B و همولایزین بر روی ژل آگارز ۱٪ ۱۲۰

فصل اول

مقدمه

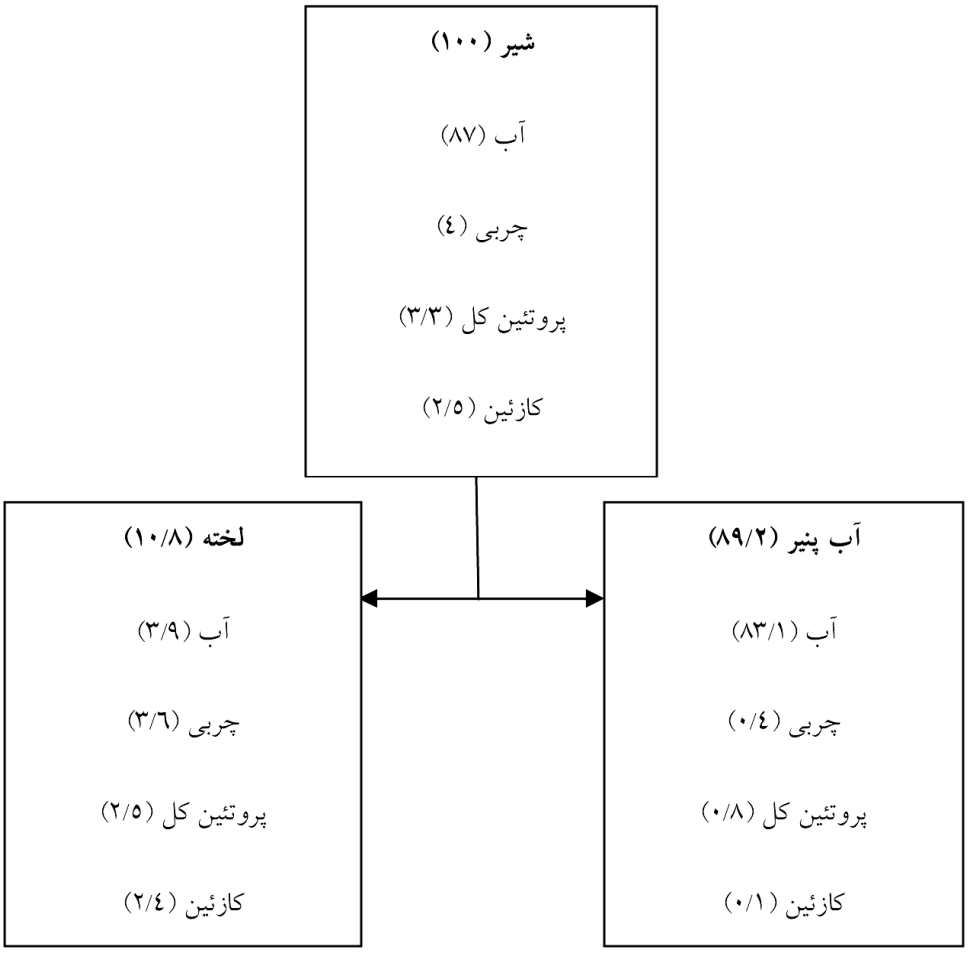
پنیر قدیمی‌ترین فرآورده شیری تولید شده به وسیله انسان بوده و تولید آن از حدود ۸۰۰۰ سال قبل در مناطق مدیترانه در شمال ترکیه شروع شده است (فاکس و همکاران، ۲۰۰٤). هزاران سال قبل بشر برای اولین بار بر حسب تصادف پنیر را تهیه کرد. در آن زمان احتمالاً هنگام حمل شیر در ظروفی از جنس پوست یا شکمبه و در شرایط هوای گرم با تخمیر شیر محصولی شبیه دلمه بوجود آمده است (رابینسون، ۱۹۹۱). اکنون بیش از ۱۰۰۰ نوع پنیر در جهان شناسایی شده است که هرکدام مزه و شکل خاص خود را دارد (برسفورد و همکاران، ۲۰۰۱).

فرآورده‌های شیری از مهمترین گروه‌های مواد غذایی مورد مصرف روزانه هر فرد محسوب می‌شوند (فاکس و همکاران، ۲۰۰٤). به لحاظ اقتصادی، میزان تولید و نقش آن در تغذیه انسان، پنیر یکی از مهمترین فرآورده‌های شیری به شمار می‌رود. از طرفی تبدیل شیر به پنیر یکی از روش‌های نگهداری و ذخیره سازی شیر به شکل مطبوع و دلپذیر نیز محسوب می‌گردد (ویرتانن و همکاران، ۲۰۰۲).

تولید شیر گاو در جهان در سال ۲۰۰۸، مطابق گزارشات جهانی فدراسیون بین المللی شیر (۲۰۰۹) ۵۷۷ میلیون تن بوده که از این مقدار ۳٤ میلیون تن پنیر در جهان تولید شده است. این فدراسیون همچنین میزان تولید شیر و تولید پنیر در ایران را به ترتیب ۸ میلیون تن و ۲۳٤ هزار تن گزارش نموده است. میزان مصرف پنیر در جهان نیز در این گزارشات ۲۲ میلیون تن ذکر شده که سهم ایران ۳٤۰ هزار تن یعنی تنها ۰/۰۱۵٪ مصرف جهانی بوده است (IDF، ۲۰۰۹).

پنیر کنسانتره‌ای از شیر شامل کازئین، مواد محلول در آب و چربی شیر می‌باشد که در نتیجه هیدرولیز کازئین به وسیله آنزیم رنین یا آنزیم‌های مشابه در حضور اسید لاکتیک تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها و انعقاد شیر در حضور کلسیم یونیزه بوجود می‌آید (فاکس و همکاران، ۲۰۰٤). با تغلیظ چربی و کازئین در این مخلوط، آب پنیر به عنوان محصول فرعی تولید می‌شود (ویرتانن و همکاران، ۲۰۰۲).

در طی فرآیند پنیرسازی و ایجاد لخته ترکیبات شیر دستخوش تغییراتی می‌شود که به صورت شماتیک در شکل ۱-۱ نشان داده شده است (هوتکینز، ۲۰۰٦):



شکل ۱-۱- توزیع ترکیبات شیر بر حسب کیلوگرم بین لخته تازه تشکیل شده و بخش محلول (بر حسب کیلو گرم)

کیفیت شیمیایی پنیر معمولاً تحت تأثیر عواملی از قبیل استانداردهای قانونی موجود، تغییرات فصلی، روش تولید پنیر و ... می‌باشد. تغییراتی که در پنیر در دوره رسیدن ممکن است رخ دهد، متعدد است و به طور کلی عواملی که می‌تواند چنین تغییرات بیوشیمیایی را تحت تأثیر خود قرار دهد عبارتند از (رابینسون، ۱۹۹۱):

- نوع شیر مورد استفاده

- شرایط فرآوری (دما، هموژنیزاسیون، اولترافیلتراسیون و بازسازی شیر)، میزان نمک، مدت زمان نگهداری در انبار و دمای انبار
- درجه یا میزان پروتئولیز یا لیپولیز که معمولا تحت تأثیر نوع شیر، نوع پروتئاز افزوده شده و انواع لیپاز موجود در شیر است.

مدارکی از نوشته‌های قدیمی و منابع باستان شناسی مربوط به پنیر وجود دارد که احتمالاً می‌توان پنیر آب نمکی را جزء قدیمی‌ترین انواع پنیر دانست. پنیرهای آب نمکی به پنیرهای نرمی گفته می‌شود که در آب نمک نگه‌داری می‌شوند. انواع بسیار مختلفی از پنیرهای آب نمکی در اروپای شرقی، بالکان و خاورمیانه تولید و با نام‌های متفاوتی عرضه می‌شود، اما پنیرهای آب نمکی مثل فتا[1]، عکاوی[2] و هالومی[3] پذیرش جهانی پیدا کرده‌اند. امروزه حدود ۳۰ نوع پنیر آب نمکی در جهان وجود دارد که پنیر فتا یکی از مشهورترین آنهاست (رابینسون، ۱۹۹۱).

۱-۱- پنیر فتا

پنیر فتا به صورت سنتی در یونان از زمان هومریها تولید می‌شده است. فتا پنیری سفید، رسیده، آب نمکی، فاقد پوسته سخت سطحی و متعلق به گروه پنیرهای نیمه نرم است. این نوع پنیر دارای مزه نسبتاً شور، تیز و عطر و طعمی خوشایند با مقبولیت جهانی است (رابینسون، ۱۹۹۱).

بزرگترین تولید کننده پنیر فتا از شیر گاو، کشور دانمارک است و بعد از آن کشورهای آلمان، مجارستان، ایرلند، هلند و انگلستان قرار دارند. دانمارک عمده‌ترین صادرکننده‌ی فتای حاصل از شیر گاو است و عمده ترین کشورهای وارد کننده پنیر فتا در سال ۱۹۸٤ به ترتیب کشورهای ایران، عربستان صعودی و مصر بوده‌اند (رابینسون، ۱۹۹۱).

1 Feta
2 Akawi
3 Halloumi

۱-۱-۱- تهیه پنیر فتا به روش اولترافیلتراسیون[1]

یکی از پیشرفت‌های اخیر در صنعت تولید پنیر استفاده از غشاهای اولترافیلتراسیون می‌باشد. کاربرد اولترافیلتراسیون در صنایع شیر، با جداسازی و تغلیظ پروتئین‌های سرمی شیر[2] آغاز گردید. از کاربردهای دیگر آن، تغلیظ شیر در جریان پنیرسازی می‌باشد که باعث افزایش راندمان تولید پنیر می‌شود (رنر و عبدالسلام، ۱۹۹۱). از طرفی به دلیل حفظ پروتئین‌های محلول شیر در دلمه، ارزش تغذیه ای این نوع پنیر بهبود می‌یابد (رابینسون، ۱۹۹۱).

آغاز بکارگیری روش اولترافیلتراسیون در صنعت شیر به اوایل دهه ۷۰ میلادی باز می‌گردد. اولترافیلتراسیون نوعی فرآیند جداسازی غشایی است که بطور انتخابی چربی و پروتئین شیر را تغلیظ می‌کند (مک سوینی، ۲۰۰۷). این غشاها قادرند مولکولهای نسبتاً بزرگ را حفظ نمایند و سازندگان آنها این ویژگی را بر اساس قابلیت عبور ملکولی[3] مشخص می‌نمایند. وزن مولکولی ترکیباتی که می‌توانند به وسیله این غشاها جدا گردند، در محدوده‌ی 10^{3}-10^{6} دالتون قرار دارد. یک غشای ایده‌آل بایستی دارای منافذی با اندازه یکسان و یکنواخت باشد تا بتواند قابلیت عبور مولکولی دقیق و معینی را دارا باشد. معمولاً اندازه سوراخ‌های این غشاها در محدوده ۰/۰۲-۰/۰۰۱ میکرومتر قرار دارد (رابینسون، ۱۹۹۱). در روش اولترافیلتراسیون، تنها مولکول‌هایی از غشا عبور می‌کنند که از اندازه روزنه‌های غشا کوچکتر باشند، این عمل بر غلظت ترکیبات شیر اثر می‌گذارد (رابینسون، ۱۹۹۱). اندازه ترکیبات شیر در جدول ۱-۱ مشخص شده است (رنر و عبدالاسلام، ۱۹۹۱):

جدول ۱-۱- اندازه تقریبی ترکیبات موجود در شیر

ترکیبات	اندازه (نانومتر)
آب	۰/۳
کلرید، یون کلسیم	۰/٤
لاکتوز	۰/۸
پروتئین های سرمی شیر	۳-۵
میسلهای کازئین	۲۵-۱۳۰
گویچه‌های چربی	۱۳۰-۱۳۰۰

1 Ultrafiltration
2 Whey proteins
3 Molecular cut-off