اثر تغییرات درجه حرارت بر جمعیت میکروبی بیماریزا در دوره رسیدن پنیر لیقوان

راحله نژاد رزمجوی اخگر[1*]

۱- عضو هیئت علمی بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۶ /۰۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۱/۲۰)

چکیده

رسیدن پنیر فرآیندی کند و تدریجی بوده و در نتیجه پرهزینه و گران می‌باشد. افزایش درجه حرارت نگهداری، به منظور تسریع دوره رسیدن مؤثرترین و ارزانترین روش برای کوتاه کردن دوره رسیدن و کاهش هزینه‌های تولید می‌باشد. با وجود این رشد میکروارگانیسم‌های مضر نیز با افزایش درجه حرارت تسریع می‌گردد. هدف از این پژوهش بررسی اثر افزایش دما به منظور تسریع رسیدن بر روی تغییرات جمعیت میکروبی بیماری‌زا در طول ۱۲۰ روز رسیدن پنیر لیقوان بود. نمونه‌های پنیر آزمایشی دوره رسیدن را در ٤ دمای ۹°C، ۱۳°C، ۱۵°C و ۱۹°C سپری کردند و از نظر شمارش کلی باکتری، کلی‌فرم، کپک و مخمر، وجود *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در طول رسیدن مورد آنالیز قرار گرفتند. اثر دما بر شمارش کلی و کلی‌فرم در تمامی روزهای آزمایش، معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) و پنیرهای رسیده در دمای ۱۹°C به طور معنی‌داری دارای شمارش میکروبی بالاتری بودند ($P<۰/۰۵$). وجود *اشرشیاکلی* در نمونه‌های رسیده در دمای ۱۹°C در روزهای ۳۰، ٦۰ و ۹۰ و در نمونه‌های رسیده در سایر دماها در روزهای ۳۰ و ٦۰ تأیید گردید. *استافیلوکوکوس اورئوس* در همه تیمارها منفی بود. از نظر شمارش کپک و مخمر، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نگردید ($P<۰/۰۵$). در همه تیمارها با گذشت دوره رسیدن، شمارش میکروبی روند کاهشی نشان داد. بر اساس نتایج این پژوهش افزایش دما جهت تسریع رسیدن باید با احتیاط و در نظر گرفتن استانداردهای بهداشتی صورت گیرد. حداکثر دما جهت تسریع در رسیدن نباید از ۱۵°C تجاوز کند.

کلید واژگان: پنیر لیقوان، جمعیت میکروبی بیماری‌زا، درجه حرارت، دوره رسیدن

* مسئول مکاتبات: razmjooi@yahoo.com

۱- مقدمه

رسیدن پنیر یک فرآیند بیوشیمیایی بسیار پیچیده شامل گلیکولیز، لیپولیز و پروتئولیز همراه با تغییرات متعدد ثانویه است که مسئول طعم و بافت ویژه هر یک ازانواع پنیر می‌باشد. این فرآیند دارای روند کند و تدریجی بوده و بنابراین پرهزینه و گران می‌باشد. در نتیجه انگیزه‌های اقتصادی و فنی برای تسریع رسیدن وجود دارد. روش‌های اصلی که جهت تسریع رسیدن پنیر مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ عبارتند از: افزایش دمای رسیدن، تلقیح شیر با استارترهای تضعیف شده یا کشت‌های الحاقی، استفاده از آنزیم‌های خارجی و افزودن دوغاب و اسیدهای آمینه آزاد [۱ و ۲].

از نقطه نظر فنی افزایش دما هیچ‌گونه افزایش هزینه‌ای در بر ندارد، در نتیجه ارزانترین روش برای تسریع رسیدن پنیر و کوتاه کردن این دوره می‌باشد. با این حال، استانداردهای بهداشتی باید در تولید پنیرهای تسریع یافته در نظر گرفته شود [۳]. با افزایش درجه حرارت علاوه بر رشد سریع باکتری‌های اسید لاکتیک استارتر و غیر استارتر، تکثیر سایر میکروارگانیسم‌های نامطلوب می‌تواند اتفاق افتد و آنها می‌توانند باعث کاهش کیفیت پنیر و متعاقباً مسمومیت یا عفونت غذایی گردند [٤].

پنیر لیقوان یکی از معروف‌ترین پنیرهای آب نمکی سنتی است که به علت ویژگی‌های حسی مطلوب آن، در بین مصرف‌کنندگان طرفداران زیادی دارد. این پنیر از انواع پنیر نیمه سخت بوده و از شیر گوسفند یا مخلوط شیر گوسفند و بز تولید می‌شود. طول مدت رسیدن در پنیر لیقوان طولانی و حدود ۱۲-۳ ماه می‌باشد و طعم ویژه آن قبل از ۱۲۰ روز رسیدن ایجاد نمی‌شود. بنابراین تسریع رسیدن در مورد این پنیر می‌تواند مفید باشد. در تولید پنیر لیقوان، بر حسب عرف محل، از شیر خام استفاده می‌شود زیرا پنیرسازان منطقه بر این باورند استفاده از شیر خام، عطر و رایحه مطلوب در پنیر ایجاد می‌کند. علت آن به فعالیت پروتئولیتیک و لیپولیتیک آنزیم‌های میکروفلورای شیر خام نسبت داده می‌شود که نقش کلیدی را در رسیدن و در نتیجه ایجاد عطر و رایحه ویژه پنیر ایفا می‌کنند [۵]. در پنیر لیقوان به دلیل آلوده شدن شیر پس ازدوشش و در مراحل اولیه تولید و عدم پاستوریزاسیون شیر، احتمال آلودگی به انواع میکروب های بیماری‌زا وجود دارد.

پنیر لیقوان توسط محققان مختلف با اهداف متفاوت مورد مطالعه قرار گرفته است. تغییرات در ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و ارگانولپتیکی پنیر لیقوان در طول ۹۰ روز رسیدن توسط Shahab Lavasani و همکاران (۲۰۱۱) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد مقادیر ماده خشک و چربی کاهش و سطح لیپولیز و پروتئولیز در طول رسیدن افزایش یافت. مرحله رسیدن عامل عمده مؤثر در ویژگی‌های حسی پنیر بود [٦]. Aminifar و همکاران (۲۰۱٤) تغییرات بافتی، ریزساختار و محتوای اسیدهای چرب آزاد را در پنیر لیقوان در طول رسیدن تسریع یافته با لیپاز مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاکی از افزایش مقادیر اسیدهای چرب آزاد و محو شدن گلبول‌های چربی انفرادی، افزایش سختی و کاهش تردی پنیر پس از ۹۰ روز بود [۷].

رفتار *یرسینیا اینترکولیتیکا*[1] در طول تولید، رسیدن و نگهداری پنیرلیقوان توسط Hanifian و Khani (۲۰۱۲) مورد مطالعه قرار گرفت. شیر خام گوسفندی با ۳ گونه *یرسینیا اینرکولیتیکا* تلقیح شد و جهت پنیرسازی مورد استفاده قرار گرفت. سطح تلقیح اولیه و طول مدت نگهداری اثر معنی‌داری بر دوام پاتوژن فوق داشت ($P<0/05$). تعداد این باکتری در طول رسیدن و نگهداری کاهش یافت و سرانجام بعد از ٤ ماه به کلی از بین رفت [۸]. Mirzaei (۲۰۱۱) تغییرات میکروبی پنیر لیقوان را در طول تولید و ۹۰ روز رسیدن مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد شمارش کل باکتری‌های هوازی، لاکتوکوکوس‌ها و لاکتوباسیل‌های مزوفیل و ترموفیل و انتروکوکوس در طول ۱۵ روز اول رسیدن به حداکثر رسید و سپس تا انتهای دوره رسیدن ۳-۲ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. شمارش کلی‌فرم‌ها، میکروکوک و استافیلوکوک در مراحل اولیه تولید افزایش و در انتهای مراحل تولید و رسیدن روند کاهشی نشان داد. شمارش مخمرها نیز در طول تولید و رسیدن کاهش پیدا کرد [۹].

آقازاده مشگی (۱۳۸٦) ویژگی‌های میکروبی پنیر کوزه‌ای آذربایجان غربی را مورد مطالعه قرار داد. نتایج بیانگر وجود *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* کوگولاز مثبت در پنیرهایی بود که زمان زیادی از رسیدن آنها سپری نشده بود. در پنیرهایی که طول مدت رسیدن در آنها بیش از یک سال بود، باکتری‌های بیماری‌زا جداسازی نشد [۱۰].

1. *Yersinia entercolitica*

در زمینه اثر افزایش دما به منظور تسریع رسیدن، بر روی تغییرات جمعیت میکربی بیماری‌زا در طول رسیدن پنیر لیقوان مطالعه‌ای انجام نگرفته است. لذا هدف از این مطالعه اثر درجه حرارت معمول (۹°C) و درجه حرارت‌های بالاتر رسیدن (۱۳، ۱۵ و ۱۹°C) بر روی جمعیت میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده پنیر لیقوان در طول ۱۲۰ روز دوره رسیدن بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- روش تهیه پنیر

این طرح در یکی از کارگاه‌های پنیرسازی دهکده لیقوان اجرا گردید. شیر تازه کامل گوسفندی خریداری شده از گوسفندداران دهکده لیقوان پس از عبور از صافی وارد بیدون‌های استیل شده و دمای آن تا ۲۶°C سرد گردید. سپس طبق عرف محل، مایه پنیر قارچی (میتو سانگیو، ژاپن) ۰/۰۰۱ ٪ (وزنی/ حجمی) به شیر اضافه شد. عمل انعقاد ۲ ساعت پس از افزودن مایه پنیر تکمیل شد. دلمه حاصل بر روی پارچه کرباسی که در داخل کانالی پهن شده بود، منتقل شد و پس از یک ساعت با چاقو برش داده شد. دلمه دو مرتبه دیگر در فواصل زمانی نیم‌ساعته برش داده شد. به منظور خروج بیشتر آب پنیر، وزنه به مدت ۲ ساعت روی دلمه قرار داده شد. وزن وزنه ۵ کیلوگرم به ازای ۱۵ کیلوگرم دلمه بود. دلمه به وسیله تخته برش به شکل مکعب‌هایی با ابعاد ۵/ ۸ × ۸/۵ × ۵ /۸ سانتی‌متر برش داده شد. سپس قالب‌های پنیر به مدت ۸ ساعت وارد حوضچه محتوی ۲۲٪ آب نمک شدند. پس از این مدت قالب‌های پنیر از آب نمک خارج شده و به مدت ۳ روز در تشتک‌های فلزی قرار داده شدند و جهت تسریع در آبدهی به سطوح زیرین و رویی پنیرها نمک دانه درشت پاشیده شد. قالب‌های پنیر هر ۱۲ ساعت برگردانده شده و عملیات نمک‌پاشی تکرار شد. مقدار نمک مصرفی ۲۰۰ گرم به ازای هر ۳۰ کیلوگرم قالب پنیر بود. در نهایت قالب‌های پنیر با وزن تقریبی ۳۰۰ گرم در ظروف پلی‌اتیلنی محتوی ۱۲٪ آب نمک پاستوریزه قرار داده شده و درب‌بندی انجام گرفت. عملیات تولید پنیر ۳ بار طی ۳ روز متوالی تکرار شد. نمونه‌های پنیر آزمایشی ۱۲۰ روز دوره رسیدن را در دماهای ۹±۱°C، ۱۳±۱°C، ۱۵±۱°C و ۱۹±۱°C سپری کردند.

۲-۲-آنالیز میکروبی

از هر تیمار، ۳ قالب پنیر در روزهای ۱ (قبل از نمک زنی)، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و۱۲۰ام دوره رسیدن نمونه برداشته شد و در اسرع وقت به آزمایشگاه تجزیه مواد غذایی منتقل گردید. نمونه‌ها در شرایط استریل باز شدند. شمارش کلی[2]، کلی‌فرم[3]، *اشرشیاکلی*[4]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[5]و کپک و مخمر[6]در مراحل مختلف دوره رسیدن مطابق روش‌های استاندارد انجام گرفت. جهت تهیه سوسپانسیونی همگن از هر نمونه، ۱۰ گرم پنیر به داخل بگ‌های استریل حاوی ۹۰ میلی‌لیتر محلول سیترات سدیم ۲٪ استریل منتقل و توسط دستگاه هضم ضربه‌ای[7] به خوبی هموژن شده و صاف گردید. به این ترتیب رقت 10^{-1} تهیه شد. سپس رقت‌های بعدی نیز با استفاده از آب پپتون ۱٪ استریل تهیه شدند. برای شمارش کلی باکتری‌ها از محیط کشت پلیت کانت آگار[8]و روش پورپلیت با شرایط انکوباسیون ۳۰°C به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. در روزهای ۱، ۳۰ و ۶۰ از رقت‌های چهارم و پنجم و در روزهای ۹۰ و ۱۲۰ از رقت‌های سوم و چهارم استفاده شد. برای شمارش کلی‌فرم از روش پورپلیت و محیط کشت ویولت‌رد بایل آگار[9] و شرایط انکوباسیون ۴۸ ساعت و دمای ۳۷°C استفاده گردید. در روزهای ۱، ۳۰ و ۶۰ از رقت‌های چهارم و پنجم و در روزهای ۹۰ و ۱۲۰ از رقت‌های دوم و سوم استفاده شد. جهت شناسایی *اشرشیاکلی* از محیط کشت برلیانت گرین دوبل حاوی لوله دورهام و شرایط انکوباسیون ۲۴ ساعت و دمای ۳۷°C استفاده گردید. سپس تشکیل یا عدم تشکیل گاز دی اکسید کربن در لوله‌های دورهام مورد بررسی قرار گرفت. در صورت مثبت بودن وجود گاز، به *اشرشیاکلی* مشکوک شده و از محیط‌های کشت افتراقی و تست IMVIC[10]جهت تأیید وجود *اشرشیاکلی* استفاده گردید. کشت استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت به صورت سطحی، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C، در محیط کشت بردپارکر آگار[11]انجام شد. برای تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* در روزهای ۱، ۳۰ و ۶۰ از رقت‌های

2.Total Count
3. *Coliform*
4. *E.Coli*
5. *Staphylococcus aureus*
6. *yeasts*
7. *stomacher*
8. PlateCount Agar
9. Violet red bile agar
10. Indole,Methyl Red ,VogesProskauer, Citrate
11. Baird Parker Agar

دوم و سوم و در روزهای ۹۰ و ۱۲۰ از رقت اول استفاده شد. جهت شمارش کپک و مخمر از روش پورپلیت، محیط کشت YGC[12]، دمای ۲۵°C به مدت ۵-۳ روز و رقت‌های دوم و سوم استفاده شد [۱۱].

۲-۳- طرح آماری

این پروژه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تیمار و ۳ تکرارا‌جرا شد. میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه مورد مقایسه قرار گرفتند. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار ۱۸ – SPSS انجام شد و برای رسم نمودارها از اکسل ۲۰۰۷ استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اثر دمای رسیدن بر شمارش کلی باکتری‌ها

شمارش میکروارگانیسم‌ها در پنیر لیقوان یک روزه (قبل از نمک‌زنی) در جدول ۱ ارائه شده است. شکل ۱ نیز اثر دمای رسیدن را بر شمارش کلی باکتری‌ها نشان می‌دهد.

Table 1 Count of Lighvan cheese microorganisms on first day (before salting) (Logcfu/g)

Total count	8.91
Coliforms	6.41
E.Coli	+
Staphylococcus aureus	–
Yeasts	4.85

نتایج نشان داد شمارش کل باکتری‌ها در طول ۱۲۰ روز دوره رسیدن در هر ٤ تیمار دمایی روند نزولی داشت. در همه تیمارها، بیشترین شمارش کلی میکروبی در اولین مرحله رسیدن مشاهده گردید و با پیشرفت زمان و گذشت دوره رسیدن، در هر ٤ تیمار جمعیت میکروبی روند کاهشی نشان داد. شمارش کلی باکتری‌ها در پنیر لیقوان یک روزه logcfu/g ۸/۹۱ بود. در روز ۱۲۰ ام دوره رسیدن، این تعداد در تیمارهای مختلف به logcfu/g ٦/٧٩ – ۳/۹۹ کاهش یافت.

روند کاهش شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در طول رسیدن پنیر توسط محققان مختلف گزارش شده است. نتایج تحقیقات حسامی راد و نژاد رزمجوی اخگر (۱۳۸۵) [۱۲] بر روی پنیر لیقوان، Hayaloglu و همکاران (۲۰۰۷) [۱۳] و Caglar (۲۰۰۱) [١٤] روی پنیر تولوم، Coorsetti و همکاران (۱۹۹۸) [۱۵] بر روی پنیر پکورینو اومبرو[13] حاکی از روند کاهشی مشابهی در شمارش کلی باکتری‌ها در طول رسیدن می‌باشد. در تمام طول دوره رسیدن، شمارش کلی باکتری‌ها در پنیرهای رسیده در دمای ۱۹°C به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بالاتر از پنیرهای رسیده در دماهای ۹، ۱۳ و ۱۵°C بود.

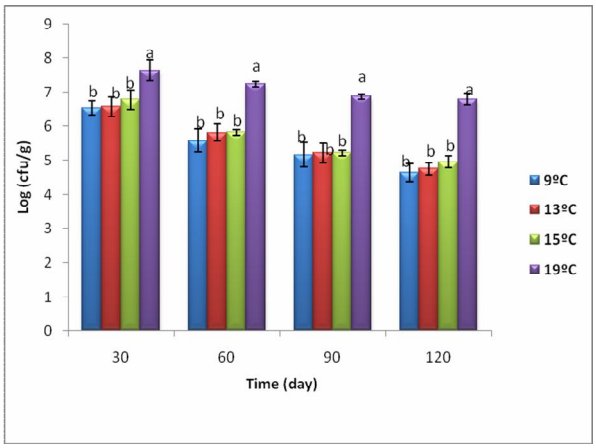

Fig 1 Log total count in Lighvan cheeses ripened under 4 different temperatures during 120-day storage

پنیرهای رسیده در دماهای ۹، ۱۳ و ۱۵°C اختلاف معنی‌داری را از نظر شمارش کلی باکتری‌ها در طول رسیدن نشان ندادند (P>۰/۰۵). شدت کاهش شمارش کلی باکتری‌ها در دمای رسیدن ۱۹°C کمتر از سایر دماها بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که دمای ۱۹°C دمای مساعدتری برای رشد و تکثیر باکتری‌ها بود و برای تسریع رسیدن پنیر دمای مناسبی نیست.

کاهش جمعیت میکروبی با گذشت مدت زمان رسیدن، به غلظت بالای آب نمک (۲۲٪ برای آب نمک اولیه و ۱۲٪ برای آب نمک در طول رسیدن) نسبت داده می‌شود. علاوه بر آب نمک، عوامل دیگری که در کاهش جمعیت میکروبی در طول رسیدن دخالت دارند، شامل اثر ممانعت‌کنندگی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، [١٦] می‌باشد، به طوری‌که این باکتری‌ها از طریق کاهش pH و افزایش غلظت اسید لاکتیک این ممانعت را به وجود می‌آورند [۱۷].

12. Yeast Extract glucose chloramphenicol agar

13. Pecorino Umbro

۲-۲- اثر دمای رسیدن بر کلی‌فرم‌ها و *اشرشیاکلی*

اثر دمای ۱۹°C بر شمارش باکتری‌های کلی‌فرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). شمارش کلی‌فرم‌ها در روزهای ۳۰، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ ام در پنیرهای نگهداری شده در دمای ۱۹°C به طور معنی‌داری بالاتر از پنیرهای نگهداری شده در ۳ دمای دیگر بود (P<۰/۰۵). با گذشت دوره رسیدن، شمارش کلی‌فرم‌ها در همه تیمارها کاهش پیدا کرد و از ٦/٤۱ logcfu/g در روز اول به ۲/۰۸-۳/۵۷logcfu/g در روز ۱۲۰ ام دوره رسیدن کاهش یافت. Mirzaei (۲۰۱۱) نیز کاهش باکتری‌های کلی‌فرم را از ٦/۳logcfu/g در روز اول به ۱/٦٦ logcfu/g در روز ۹۰ ام رسیدن پنیر لیقوان گزارش کرد [۹]. Manolopoulou و همکاران (۲۰۰۳) کاهش تعداد کلی‌فرم‌ها و *اشرشیاکلی* را در پنیر فتای سنتی تولید شده از شیر خام گوسفندی در طول رسیدن و عدم شناسایی آنها را بعد از روز ۱۲۰ ام گزارش کردند [۱۸]. در تحقیق Hayaloglu و همکاران (۲۰۰۷) بر روی پنیر تولوم، کلی‌فرم‌ها پس از ۱۵۰ روز رسیدن کلاً از بین رفته بودند [۱۳]. نتایج تحقیقات Govaris و همکاران (۲۰۰۲) نشان داد که *اشرشیاکلی* پس از ٤۰ روز رسیدن در پنیر فتا و تلمز[14]قابل جداسازی نبود [۱۹].

به طور کلی در پژوهش حاضر، تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در همه تیمارها بالا بود که این نشان‌دهنده آلودگی شیر خام در طول شیردوشی و نگهداری، حمل و نقل شیر در دمای بالا، شستشوی نامناسب ظروف حمل شیر و آلودگی احتمالی پنیر در طول تولید می‌باشد [۲۰].

اشرشیاکلی در روزهای ۱، ۳۰ و ٦۰ ام در همه تیمارها مثبت بود. در روز ۹۰ ام، *اشرشیاکلی* فقط از نمونه‌های رسیده در دمای ۱۹°C ایزوله گردید و در روز ۱۲۰ ام، *اشرشیاکلی* در همه تیمارها از بین رفته بود. در ۳ تیمار دمایی ۹°C، ۱۳°C و ۱۵°C، وجود *اشرشیاکلی* تا روز ٦۰، مثبت و در روزهای ۹۰ و ۱۲۰، منفی بود. در مورد تیمار ۱۹°C، *اشرشیاکلی* تا روز ۹۰، مثبت بود. ولی در روز ۱۲۰، *اشرشیاکلی* مشاهده نگردید. وجود *اشرشیاکلی* در دماهای رسیدن ۹°C، ۱۳°C و ۱۵ °C تا روز ٦۰ ام و در دمای ۱۹°C تا روز ۹۰ ام نشان‌دهنده تحمل آنها به این غلظت آب نمک است. همچنین حضور *اشرشیاکلی* در تیمار دمایی ۱۹°C تا روز ۹۰ ام دلیل بر مساعد بودن این دما برای رشد و بقای این باکتری می‌باشد. بنابراین این دما برای تسریع رسانیدن پنیر لیقوان مناسب نیست.

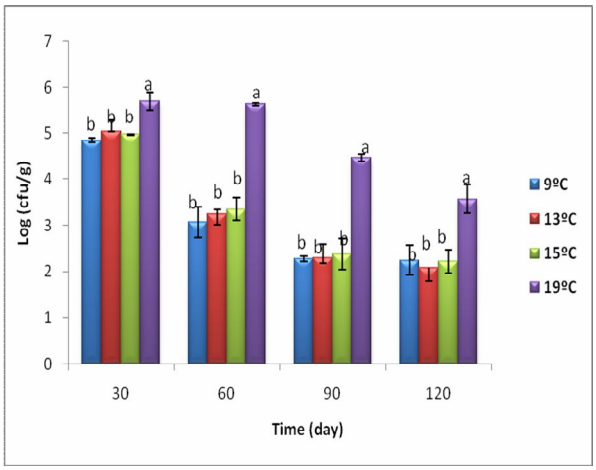

Fig 2 Log count of coliform in Lighvan cheeses ripened under 4 different temperatures during 120-day storage

کاهش شمارش کلی‌فرم و *اشرشیاکلی* در طول رسیدن به توسعه شرایط ممانعت‌کننده مانند کاهش pH، کمبود اکسیژن، مصرف قندها به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک و فعالیت میکروفلور ثانوی نسبت داده می‌شود [۲۱ و ۲۲]. کلی‌فرم‌ها به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی مطرح هستند. بنابراین حضور این میکروارگانیسم‌ها در پنیر رسیده، دال بر نامناسب بودن شرایط بهداشتی در تولید این پنیر و ضرورت بهبود آن می‌باشد [۲۳].

۳-۳- اثر دمای رسیدن بر *استافیلوکوکوس اورئوس*

در کلیه روزهای نمونه‌برداری و در همه تیمارهای دمایی، *استافیلوکوکوس اورئوس*کواگولاز مثبت، منفی بود. عدم حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر توسط برخی محققان دیگر نیز گزارش شده است. مرتضوی و همکاران (۱۳۹۳) عدم حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* را در پنیر سنتی کردی تولید شده از شیر خام گزارش کردند [۲٤]. در پژوهش Cuesta و همکاران (۱۹۹٦) بر روی پنیر آفوئگال پیتو[15]نیز نشانی از آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* یافت نشد. با وجود این، پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهند که در صورت بروز آلودگی، این میکروارگانیسم در طول دوره رسیدن کاهش خواهد یافت [۲۵]. مطالعه Mirzaei (۲۰۱۱) وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* را در پنیر لیقوان که دوره رسیدن را در طی یک ماه

14. Telemes

15. Afuega'lPitu

اول در زاغه‌های با دمای ۱۵°C و طی دو ماه بعد در یخچال با دمای ۵°C سپری کرده بودند، تأیید کرد. تعداد این میکروارگانیسم در طول دوره رسیدن روند نزولی داشت [۹]. در پژوهشی دیگر که بر روی پنیر گیبنابایدا[16]تهیه شده از شیر خام انجام شد، شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* در روز اول ۳/۰۲ logcfu/g بود و پس از ۲۴۰ روز هیچ استافیلوکوکی در نمونه‌ها یافت نشد [۲۶].

افزایش غلظت نمک، افزایش فعالیت باکتری‌های استارتر، رقابت میکروبی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک، تولید آب اکسیژنه توسط سیستم لاکتوزپراکسیداز، رقابت برای تأمین مواد غذایی، ازدیاد مواد دفعی، دمای ذخیره‌سازی پنیر از دلایل کاهش یا حذف *استافیلوکوکوس اورئوس* در پایان دوره رسیدن می‌باشند [۱۸].

۳-٤- اثر دمای رسیدن بر شمارش کپک و مخمر

در طول مدت رسیدن، اثر دما بر شمارش کپک و مخمر معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) و ٤ تیمار از نظر شمارش کپک و مخمر اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. در روز اول شمارش کپک و مخمر ٤/۸۵ logcfu/g بود و در پایان روز ۱۲۰ ام به ۰/٦۹ logcfu/g کاهش پیدا کرد. مطابق گزارش Mirzaei (۲۰۱۱) شمارش کپک و مخمر در پنیر لیقوان در طول ۹۰ روز دوره رسیدن پنیر لیقوان، روند نزولی داشت و از ۳/۹۵ logcfu/g در روز اول به ۰/۸۸ logcfu/g در روز ۹۰ ام کاهش یافت [۹]. نتایج مرتضوی و همکاران (۱۳۹۳) نیز حاکی از کاهش تعداد کپک و مخمر در پنیر سنتی کردی از روز ۲۰ تا ٦۰ ام دوره رسیدن بود [۲٤]. Cuesta و همکاران (۱۹۹٦) گزارش کردند تعداد مخمرها در پنیر آفوئگال پیتو پس از گذشت ۳ روز، ۲ سیکل لگاریتمی افزایش یافت؛ اما پس از ۳۰ روز کاهش یافت. کپک‌ها نیز روند مشابه مخمرها را در طول رسیدن نشان دادند [۲۵]. نتایج پژوهش آقازاده مشگی (۱۳۸٦) بر روی پنیر کوزه‌ای نشان داد که کپک‌ها و مخمرها به تعداد بسیار بالا در پنیر کوزه حضور داشتند [۱۰].

شمارش نسبتاً بالایی از مخمرها در پنیرهای نرم، نیمه نرم و پنیرهای رسیده سطحی احتمالاً از تجهیزات فرآوری و محیط منشأ می‌گیرند. همچنین گزارش شده که منبع مهمی از آلودگی به مخمرها ممکن است محلول آب نمک باشد [۲۷]. شمارش بالای بعضی از گونه‌های مخمر در پنیر به تحمل آنها به pH و فعالیت آبی پایین، غلظت بالای نمک، قابلیت رشد در دمای پایین، توانایی تخمیر لاکتوز، جذب اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک، سوکسینیک و سیتریک، فعالیت‌های پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی و مقاومت به ترکیبات ضدعفونی‌کننده و پاک‌کننده نسبت داده می‌شود [۲۸].

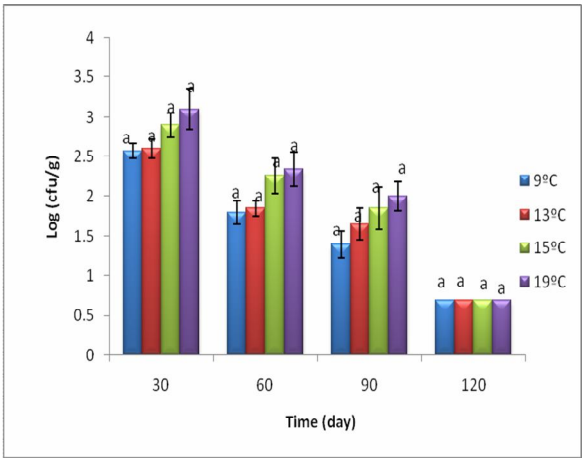

Fig 3 Log count of yeasts in Lighvan cheeses ripened under 4 different temperatures during 120-day storage

٤- نتیجه‌گیری

بررسی‌های میکروبی نشان دادند که با افزایش دمای رسیدن جمعیت میکروبی در پنیر افزایش می یابد. بنابراین افزایش دما به منظور تسریع رسیدن باید با احتیاط و با در نظر گرفتن همه فاکتورهای بهداشتی از جمله بار میکروبی اولیه شیر صورت گیرد. مطابق نتایج به دست آمده از این کار پژوهشی و با توجه به بار میکروبی بالای شیر مورد استفاده، حداکثر دما جهت تسریع رسیدن پنیر، درجه حرارت ۱۵°C به مدت یک ماه و سپس ذخیره‌سازی در دماهای پایین تر می‌باشد. بالا بودن جمعیت میکروبی، به ویژه حضور میکروارگانیسم‌های شاخص بیماری‌زا در پنیر رسیده به ضرورت بهبود شرایط بهداشتی از هنگام دوشش شیر تا تولید این پنیر اشاره دارد.

۵- سپاسگزاری

نگارنده مقاله از مؤسسه علوم دامی کشور جهت تأمین بودجه اجرای این طرح پژوهشی کمال امتنان را دارند.

16. GibnaBayda

٦- منابع

[1] Fox P.F., Wallace J.M., Morgan S., Lynch C.M., Niland E.J., Tobin J. (1996). Acceleration of cheese ripening. Antonie van Leeuwenhoek. 70:271-297.

[2] Law, B.A. (2001). Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. International Dairy Journal 11: 383–398.

[3] Sihufe G.A., Zorrilla S.E., Perotti, M.C., Wolf I.V., Zalazar C.A., Sabbag N.G., Rubiolo A.C. (2010). Acceleration of cheese ripening at elevated temperature. An estimation of the optimal ripening time of a traditional Argentinean hard cheese. Food Chemistry 19: 101-107.

[4] Lurlina M.O., Fritz R. (2004). Microbiological quality of Port SalutArgentino cheese stored at two temperature treatments. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie - Food Science and Technology 37: 739–748.

[5] Little C.L., Rhoades J.R., Sagoo S.K., Harris J., Greenwood M., Mithani V.,Grant K., McLauchlin J. (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK.Food Microbiology 25: 304-312.

[6] Shahab Lavasani A., Ehsani M.R., Mirdamadi S., Ebrahimzadeh Mousavi M.A. (2011). Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. International Journal of Dairy Technology 65: 64-70.

[7] Aminifar M., Emam-Djomeh Z. (2014). Changes of Texture, Microstructure and Free Fatty Acid Contents of Lighvan Cheese during Accelerated Ripening with Lipase. Journal of Agricultural Science and Technology16: 113-123.

[8] Hanifian SH., Khani S. (2011). Fate of Yersinia enterocolitica during manufacture, ripening and storage of Lighvan cheese. International Journal of Food Microbiology156: 141–146.

[9] Mirzaei H. (2011). Microbiological changes in Lighvan cheese throughout its manufacture and ripening. African Journal of Microbiology Research5: 1609-1614.

[10] AghazadehMeshgi M. (2007). Evolution of some microbial and chemical properties of West Azerbaijan's jug cheese. Journal of Food Science and nutrition. 3: 80-87.

[11] Marshall T.R. (2005). Standard methods for the examination of dairy products (450 pp.).Washington, DC: American Public Health Association.

[12] Hesami Rad R., NezhadRazmjouiAkhgar R. (2006). Study of the Effect of different renneting temperatures on the Efficiency and Physicochemical properties of Lighvan Cheese. 16th National congress of Iran foodindustry (1st regional congress). GorganUniversity of agricultural sciences and natural resources, Gorgan-Iran.

[13] Hayaloglu A.A., Cakmakci S., Brechany E.Y., Deegan K.C., McSweeney P.L.H. (2007). Microbiology, Biochemistry, and Volatile Composition of Tulum Cheese Ripened in Goat's Skin or Plastic Bags. Journal of Dairy Science 90: 1102–1121.

[14] Caglar A. (2001). Cig suttenuretilenvefarkliambalajlamamateryallerindeolgunlastirilan Erzincan Tulum peynirlerininmikrobiyolojikozelliklerindekidegismeler. Ataturk Univ. ZiraatFak. Derg 32:285–292.

[15] Coorsetti A., Gobbetti M., Smacchi E., De Angelis M., Rossi J. (1998). Accelerated ripening of Pecorino Umbro cheese. Journal of Dairy Research 65: 631-642.

[16] Nunaez M., Gaya P., Meina M. (1985). Influence of manufacturing and ripening condition on the survival of Enterobacteriacea in Manchego cheese. Journal of Dairy Science 68: 794-800.

[17] Zarate N.P., Belda F., Perez C., Cardell E. (1997). Changes in the microbial flora of Tenerife goots milk cheese during ripening. International Dairy Science7: 635-641.

[18] Manolopoulou E., Sarantinopoulos P., Zoidou E., Aktypis A., Moschopoulou E., Kandarakis I.G., Anifantakis E.M. (2003). Evolution of microbial population during traditional Feta cheese manufacture and ripening. International Journal of Food Microbiology 82: 153-161.

[19] Govaris A., Papageorgiou D.K., Papatheodorou K. (2002). Behavior of Escherichia coli 0157:H7 during the manufacture and ripening of Feta and Telemes cheeses. Journal of Food Protection 65:609-615.

[20] Psoni L., Kotzamanidis C., Yiangou M., Tzanetakis N., LitopoulouTzanetaki E. (2007). Genotypic and phenotypic diversity of Lactococcuslactis isolates from Batzos, a

Greek PDO raw goat milk cheese. International Journal of Food Microbiology 114: 211–220.
[21] Gripon J.C. (1993). Mould-ripened cheeses. In: Fox P.F (Ed.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 2nd edition, Major Cheese Groups, vol. 2. Chapman and Hall, London: 111 – 114.
[22] Walstra P., Noomen A., Geurts T.J. (1993). Dutch-type varietiesIn: Fox P.F Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 2nd edition, Major Cheese Groups, vol. 2. Chapman & Hall, London: 74– 76.
[23] Kafili T., Razavi S.H., EmamDjomeh Z., Naghavi M. R., Alvarez-Martín P., Mayo B. (2009). Microbial characterization of Iranian traditional Lighvan cheese over manufacturing and ripening via culturing and PCR-DGGE analysis: identification and typing of dominant lactobacilli. European Food Research and Technology 229:83-92.
[24] Mortazavi S.A., MoeinFard M., Milani A. (2014). Evaluation of pathogenic microbial population changes during ripening of traditional Kurdish cheese. Journal of innovation in Food Science and Thechnology 2: 83-92.
[25] Cuesta P., Fernández-Garcìa E., González de Llano D., Montilla A., Rodríguez A. (1996). Evolution of the Microbiological and Biochemical Characteristics of Afuega'lPitu Cheese During Ripening. Journal of Dairy Science 79(10): 1693-1698.
[26] A.O. E.L. Owni O, I.A. Hamid O. (2008). Effect of storage period on weight loss, chemical composition, microbiological composition and sensory characteristics of Sudanese White Cheese (GibnaBayda). Pakistan Journal of Nutrition7(1):75-80.
[27] Viljoen B. C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. International Journal of Food Microbiology 69: 37-44.
[28] Ferreira A. D., Viljoen B.C. (2003). Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. International Journal of Food Microbiology 86: 131–140.

Effect of temperature changes on pathogenic microbial population during Lighvan cheese ripening

Nezhad Razmjoui Akhgar, R. [1*]

1. Assistant professor of Animal science Department, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Urmia, Iran

(Received: 2017/10/27 Accepted:2018/04/09)

Cheese ripening is a slow and gradual process and therefore it is costly and expensive. Enhancing ripening temperature is the most efficient and cheapest method to shorten ripening period and reduce manufacturing expenses. However, the growth of harmful microorganisms is accelerated with increasing temperature. The aim of this research was to investigate the effect of enhancing temperature in order to accelerate ripening on pathogenic microbial population changes during 120-day ripening period of Lighvan cheese. The experimental cheese samples were stored at 4 temperatures including 9°C, 13°C, 15°C and 19°C during ripening period and analysed for enumeration of total bacteria, coliforms, yeasts and molds and presence of *Staphylococcus aureus* and *E.coli.* Microbial population increased in cheese samples with increasing ripening temperatures. Temperature effect was significant ($P<0.05$) on total and coliform counts in all sampling days and the cheeses stored at temperature of 19°C had significantly higher bacterial counts ($P<0.05$). Presence of *E. coli* was confirmed in samples ripened at 19°C on days 30, 60 and 90 and in other temperatures on days 30 and 60. In all samples *Staphylococcus aureus* was negative. No significant difference was observed between treatments in mold and yeast count. In all treatments**,** bacterial count had decreasing trend during ripening. On the basis of results of this research, enhancing temperature to accelerate ripening should be done cautiously while considering sanitary standards. Maximum temperature for accelerated ripening should not be exceeded of 15°C.

Key words: Lighvan cheese, Pathogenic microbial population, Temperature, Ripening period

*Corresponding Autor E-Mail Address: razmjooi@yahoo.com