

## رفتار سویه‌های مختلف *یرسینیا انتروکولیتیکا* در پنیر فراپالایشی و نقش بازدارندگی کشت آغازگر لاکتیکی

رضا واتقی بخشایش<sup>۱</sup>، شهرام حنیفیان<sup>۲\*</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

\* نویسنده مسئول مکاتبات: hanifian@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۲۱ پذیرش نهایی: ۹۴/۴/۳۱)

### چکیده

هدف از این تحقیق مطالعه رفتار سویه‌های مختلف *یرسینیا انتروکولیتیکا* در پنیر فراپالایشی و بررسی قابلیت بازدارندگی کشت آغازگر لاکتیکی بر این باکتری بود. برای این منظور، شیر پاستوریزه و فراپالایش شده با تعداد ۳ واحد لگاریتمی در هر گرم از سویه‌های استاندارد DSM 11502 و DSM 9499 و سویه بومی *یرسینیا انتروکولیتیکا* تلقیح شد و نمونه‌های پنیر دارا و فاقد کشت آغازگر تهیه شدند. تعداد *یرسینیا انتروکولیتیکا* در زمان تلقیح، متعاقب گرمخانه‌گذاری و طی ۲ ماه دوره نگه‌داری با روش کشت در محیط CIN آگار شمارش و با آزمون PCR مورد تأیید قرار گرفت. طبق نتایج مطالعه، بعد از گرمخانه‌گذاری تعداد *یرسینیا انتروکولیتیکا* در هر دو گروه از نمونه‌های دارا و فاقد آغازگر به مقدار ۴/۱۴ واحد لگاریتمی ( $P < 0/01$ ) افزایش پیدا کرد. اما طی دوره نگه‌داری، تعداد این باکتری فقط در نمونه‌های حاوی آغازگر کاهش یافت. از آنجایی که مقدار pH بین نمونه‌های دارا و فاقد آغازگر تفاوت معنی‌داری ( $P < 0/01$ ) داشت؛ لذا شرایط اسیدی از عوامل اصلی مهار کننده *یرسینیا انتروکولیتیکا* در پنیر فراپالایشی می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، سویه بومی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در مقایسه با سویه‌های آزمایشگاهی به‌طور معنی‌داری ( $P < 0/01$ ) پایداری بیشتری در پنیر فراپالایشی داشت. با در نظر گرفتن نقش کشت آغازگر در غیرفعال نمودن *یرسینیا انتروکولیتیکا*، ایجاد شرایط دمایی و زمانی برای تکثیر و فعالیت مناسب باکتری‌های آغازگر و یا استفاده از کشت‌هایی با قابلیت تولید ترکیبات آنتاگونیستی می‌تواند علاوه بر ایجاد طعم و بافت مناسب در محصول، در کنترل مخاطره ناشی از آلودگی‌های احتمالی پنیر فراپالایشی موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: *یرسینیا انتروکولیتیکا*، پنیر فراپالایشی، کشت آغازگر

## مقدمه

*یرسینیا انتروکولیتیکا* از باکتری‌های مهم بیماری‌زای غذایی بوده و از نظر خصوصیات مرفولوژیکی شامل باسیل‌ها کوتاه، گرم منفی، غیراسپورزا، اکسیداز منفی و بی‌هوازی اختیاری است. این باکتری قادر به تحمل تغییرات pH بین ۴ تا ۱۰ (مقدار مطلوب ۷/۶) و مقدار ۵ درصد نمک می‌باشد (Robins-*et al.*, 1991; Robins-Browne and Hartland, 2003 and Zadernowska *et al.*, 2014). رشد باکتری در دامنه دمایی ۰ تا ۴۵ درجه سلسیوس و محدوده دمای مطلوب ۲۵ تا ۲۹ درجه سلسیوس صورت می‌گیرد (Weagant and Feng, 2001). به دلیل دارا بودن طبیعت سرماگرا، این باکتری می‌تواند بدون ایجاد علائم ظاهری فساد، در مواد غذایی نگهداری شده در یخچال رشد و تکثیر نموده و موجب عوارض گوناگونی شود (Robins-Browne and Hartland, 2003). *یرسینیا انتروکولیتیکا* عامل بیماری یرسینیوزیس در انسان است و علائم عفونت از اسهال ملایم و محدودشونده تا لنفادنیت مزانتریک متغیر است. از دیگر عوارض و سندرم‌های بالینی ناشی از آن می‌توان به سپتی‌سمی، آپاندیسیت کاذب، فارنژیت اکسوداتیو و آرتريت اشاره نمود (Weagant and Feng, 2001).

*یرسینیا انتروکولیتیکا* اغلب در خاک، فاضلاب، آب‌های شیرین و هم‌چنین در مواد غذایی نظیر گوشت قرمز، گوشت ماکیان، شیر و فرآورده‌های آن، تخم‌مرغ، سبزیجات و ... یافت می‌شود (Minnich *et al.*, 2001; and Fredriksson-Ahomaa and Korkeala, 2003). بین سویه‌های مختلف این باکتری فقط تعداد محدودی بیماری‌زای انسانی هستند و در میان منابع مختلف غذایی، گوشت خوک منشأ اصلی انتقال این سویه‌ها به

انسان گزارش شده است (Robins-Browne and Hartland, 2003). البته آلودگی شیرهای خام و پنیرهای سنتی با سویه‌های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* در سرتاسر دنیا و از جمله در ایران گزارش گردیده است (Aytaç and Özba, 1992; Weagant and Feng, 2001; Skurnik *et al.*, 2010; Hanifian and Khani, 2012a). از سوی دیگر، با ردیابی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در شیرهای پاستوریزه، احتمال عدم کفایت پاستوریزاسیون و یا بروز آلودگی ثانویه مطرح شده است. در نتیجه خطر ابتلای انسان از طریق مصرف شیر و فرآورده‌های حرارت‌دیده نیز متفی نمی‌باشد (Ackers *et al.*, 2000; Soltan-Dallal *et al.*, 2004; Longenberger *et al.*, 2014; حنیفیان, ۱۳۹۰).

پنیر فرآپالایشی از شیر پاستوریزه (۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه) گاوی و متعاقب فرآپالایش (Ultra-filtration) تهیه می‌شود. این نوع پنیر دارای حداقل ۳۴ درصد ماده خشک، ۱۵ درصد چربی، ۱۱ درصد پروتئین و pH آن در بازه ۴/۸-۴/۶ می‌باشد. مقدار نمک پنیر فرآپالایشی ۲ تا ۴ درصد است که به صورت خشک (dry salting) به لخته اضافه می‌شود. این نوع پنیر پس از طی دوره گرمخانه‌گذاری (در ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ روز) و دوره نگهداری (در ۸ درجه سلسیوس به مدت ۱ تا ۲ هفته) به بازار عرضه می‌گردد (Karami *et al.*, 2009).

در طی فرایند فرآپالایش شیر، غلظت پروتئین‌های سرمی در رتنتیت (Retentate) افزایش یافته و منجر به بالا رفتن ظرفیت بافری رتنتیت می‌شود. در نتیجه رشد و فعالیت باکتری‌های لاکتیکی و به تبع آن نزول pH به کندی صورت می‌گیرد (Karami *et al.*, 2009). به علاوه، محدود بودن دوره گرمخانه‌گذاری این نوع پنیر

#### - تهیه دوز تلقیحی *یرسینیا انتروکولیتیکا*

جمعیت *یرسینیا انتروکولیتیکا* در کشت اولیه با روش اسپکتروفوتومتری و با طول موج ۵۸۰ نانومتر تعیین گردید (حنیفیان، ۱۳۸۸). سلول‌های باکتریایی با ساتریفیوژ با شدت ۴۰۰۰ g و مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شدند و سپس با افزودن سرم رینگر استریل تا رسیدن به تعداد تقریبی ۳ واحد لگاریتمی در هر گرم از رتنتیت رقیق‌سازی گردید.

#### - تهیه پنیر سفید فراپالایشی

برای تهیه نمونه‌های پنیر از رتنتیت (Retentate) پاستوریزه (۷۲ درجه سلسیوس و ۱۵ ثانیه) با فاکتور تغلیظ ۵/۱ استفاده گردید. رتنتیت از کارخانه شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان شرقی و مشابه با ترکیب مورد استفاده برای تهیه پنیر فراپالایشی تأمین شد. قبل از تلقیح، رتنتیت از نظر عدم وجود آلودگی *یرسینیا انتروکولیتیکا* با روش کشت مستقیم ارزیابی گردید. به علاوه، به منظور جلوگیری از اثرات مهارتی ترکیبات آنتی‌بیوتیکی بر *یرسینیا انتروکولیتیکا* و نیز فعالیت کشت آغازگر، رتنتیت از نظر عدم آلودگی با این ترکیبات با آزمون کوپن (Copan Italia S.p.A., Italy) مورد آزمایش قرار گرفت. سپس رتنتیت به طور جداگانه با تعداد ۳ واحد لگاریتمی به ازای هر گرم (Log cfu/g) از هر یک از سویه‌های استاندارد و بومی *یرسینیا انتروکولیتیکا* تلقیح شد. مطابق دستورالعمل تهیه پنیر سفید فراپالایشی ایرانی، کشت آغازگر باکتری‌های مزوفیل لاکتیکی هوموفرمانتاتیو (FD-DVS FRC 65) (Chr. Hansen, Denmark) به نمونه‌های دارای کشت آغازگر (به مقدار ۱۰۰ گرم به ازای ۵۰۰۰ کیلوگرم رتنتیت) اضافه گردید. کشت آغازگر شامل مخلوطی از

به ۲۴ ساعت، فرصت کافی برای فعالیت کشت آغازگر لاکتیکی فراهم نمی‌آورد (Hanifian, 2014). لذا، در صورت موثر نبودن فرایند پاستوریزاسیون و یا آلودگی ثانویه، خطر رشد میکروب‌های بیماری‌زا و عامل فساد به ویژه انواع سرماگرایی مقاوم به اسید و نمک ایجاد می‌شود. در این مطالعه، رفتار سویه‌های مختلف *یرسینیا انتروکولیتیکا* طی روند تهیه و نگهداری پنیر فراپالایشی و کفایت کشت آغازگر لاکتیکی در مهار باکتری مزبور مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### - سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا*

جهت ارزیابی تفاوت‌های احتمالی در رفتار سویه‌های مختلف *یرسینیا انتروکولیتیکا* در پنیر فراپالایشی، دو سویه استاندارد این باکتری با کد DSM 11502 و 9499 DSM (DSMZ, Germany) و هم‌چنین یک سویه بومی که از پنیر محلی منطقه آذربایجان شرقی جداسازی شده بود (Hanifian and Khani, 2012a)، برای تلقیح استفاده گردید. قابلیت بیماری‌زایی سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* با ردیابی ژن *ail* (attachment invasion locus) مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های باکتریایی طی دو مرحله متوالی در محیط آبگوشت BHI (Merck, Germany) فعال‌سازی (۲۹ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت) گردید. کشت‌های ذخیره در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد و یک روز قبل از تلقیح در محیط آبگوشت BHI تجدید کشت داده شد (Hanifian and Khani, 2012b).

لاکتوکوکوس‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها) و شیمیایی (pH، درصد نمک و رطوبت) در زمان‌های یاد شده بر روی نمونه‌های پنیر انجام گرفت. این مطالعه سه بار و طی روزهای مجزا تکرار گردید.

جدول (۱) - انواع پنیر فراپالایشی تهیه شده با در نظر گرفتن استفاده از کشت آغازگر و سویه *یرسینیا انتروکولیتیکا*

سویه	کشت آغازگر	نوع پنیر
11502	+	S+, S <sub>1</sub>
9499	+	S+, S <sub>2</sub>
بومی	+	S+, N
11502	-	S-, S <sub>1</sub>
9499	-	S-, S <sub>2</sub>
بومی	-	S-, S <sub>n</sub>

(S+) و (S-) به ترتیب نشان‌دهنده نمونه‌های دارا و فاقد آغازگر؛ S<sub>1</sub>، S<sub>2</sub> و S<sub>n</sub> به ترتیب شامل سویه‌های استاندارد DSM 11502، DSM 9499 و سویه بومی (Native) *یرسینیا انتروکولیتیکا* است.

#### - آزمون‌های میکروبی و شیمیایی

جهت شمارش *یرسینیا انتروکولیتیکا* از روش کشت سطحی در محیط (پایه) جامد انتخابی CIN agar base و با افزودن مکمل آنتی‌بیوتیکی (Merck, Germany) Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin استفاده شد (Weagant and Feng, 2001). مقدار ۱۰ گرم از نمونه‌های پنیر متعاقب همگن‌سازی، با ۹۰ میلی‌لیتر محلول هضم پنیر (۱ درصد کازیتون و ۲ درصد سیترات‌سدیم) مخلوط گردید و لوله‌های رقت با استفاده از آب‌پپتونه ۰/۱ درصد استریل از رقت ۱۰<sup>-۲</sup> تا ۱۰<sup>-۸</sup> تهیه شد (Weagant et al., 1998). مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت بر روی CIN آگار کشت داده شد.

باکتری‌های لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس (*Lactococcus lactis subsp. lactis*)، لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه کرموریس (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*)، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) و اس-تریتوکوکوس ترموفیلوس (*Streptococcus thermophilus*) بود. سپس مقدار ۲۰۰ گرم از مخلوط رتنتیت و کشت آغازگر به ظروف پنیر انتقال یافت و رنت (Meito Sangyo, Japan) به مقدار ۰/۰۰۲ درصد (وزنی-وزنی) به مخلوط اضافه شد. مرحله لخته شدن پنیر در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. سطح لخته با کاغذ مخصوص (Parchment paper) پوشانده و پس از افزودن ۲ درصد نمک بر روی کاغذ، درب ظروف مسدود گردید (Hanifian, 2014). نمونه‌های پنیر به مدت ۱ روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد و سپس تا روز ۶۰ در سردخانه ۸ درجه سلسیوس نگه‌داری گردید (Karami et al., 2009).

#### - طرح مطالعه

مطابق جدول (۱) شش نوع پنیر فراپالایشی با در نظر گرفتن استفاده یا عدم استفاده از کشت آغازگر و همچنین نوع سویه *یرسینیا انتروکولیتیکا* تهیه گردید. تعداد ۹ نمونه از هر نوع پنیر ساخته شد و طی مراحل زیر مورد ارزیابی قرار گرفت: ۱- ساعت صفر (زمان تلقیح)؛ ۲- روز ۱ (پس از گرمخانه‌گذاری)؛ ۳- روز ۵ (انتهای دوره قرنطینه و زمان عرضه به بازار)؛ ۴- روزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ (طی نگه‌داری). آزمایش‌های میکروبی (شمارش *یرسینیا انتروکولیتیکا*،

در پلیت‌های استاندارد مجذور تعداد پرگنه‌های شمارش شده (مثلاً ۱۰ پرگنه از مجموع ۱۰۰ پرگنه شمارش شده) *یرسینیا انتروکولیتیکا* با PCR ارزیابی شد. برای این منظور، ژن *ail* که در کروموزوم تمامی سویه‌های بیماری‌زای *یرسینیا انتروکولیتیکا* حضور دارد، به‌عنوان ژن هدف انتخاب و از پرایمرهای 9A: 5'-GTT TAT CAA TTG CGT CTG TTA ATG TGT 10A: 5'-CTA TCG AGT TTG GAG و ACG-3' و 3'-TAT TCA TAT GAA GCG-3' استفاده گردید (Thisted Lambertz and Danielsson-Tham, 2005; Hudson *et al.*, 2008).

هر پرگنه *یرسینیا انتروکولیتیکا* در میکروتیوب حاوی ۲ میلی‌لیتر آبگوشت BHI کشت داده شد (۲۹ درجه سلسیوس و ۲۴ ساعت). پس از سانتریفیوژ کردن و جداسازی سلول‌های باکتری (۶۰۰۰ g و ۱۰ دقیقه)، DNA ژنومی مطابق با روش یک مطالعه قبلی (Bhaduri and Cottrell, 1998) استخراج گردید و سپس با استفاده از فنول-کلروفرم-ایزوامیل‌الکل با نسبت ۱:۲۴:۲۵ (Merck, Germany) خالص‌سازی شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر آب یون‌زدایی شده (Deionized water) عاری از DNA/RNA بر روی DNA اضافه گردید. غلظت و خلوص DNA استخراج شده با نانودراپ (Thermo Scientific, USA) و به‌ترتیب با طول موج ۲۶۰ نانومتر و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ ارزیابی شد. مخلوط واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲× (Fermentas, Germany)، ۶۰ پیکومول از هر پرایمر (Eurofins, Germany) و ۲۵ نانوگرم DNA الگو بود. حجم نهایی مخلوط با افزودن آب یون‌زدایی شده عاری از DNA و RNA (Fermentas, Germany) به ۲۵ میکرولیتر رسید.

پلیت‌ها در ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس پرگنه‌های دارای قطر ۱-۲ میلی‌متر، با مرکز قرمز رنگ و پیرامون بی‌رنگ شمارش شد (Weagant and Feng, 2001). پس از روز ۲۰ دوره نگه‌داری، در نمونه‌هایی که تعداد *یرسینیا انتروکولیتیکا* به کمتر از حد قابل شمارش رسیده بود، از نمونه تغلیظ شده استفاده گردید. برای این منظور ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه در لوله‌های فالكون استریل و در سانتریفیوژ با شتاب ۴۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شد. رسوب به‌دست آمده با ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آب‌پیتونه استریل مخلوط گردید و در محیط کشت CIN agar کشت داده شد (Hanifian and Khani, 2012b). در نهایت نسبتی از پرگنه‌های شمارش شده با PCR تأیید گردید.

برای شمارش باکتری‌های کشت آغازگر از محیط‌های کشت انتخابی MRS آگار برای لاکتوباسیلوس‌ها و M17 آگار (Merck, Germany) برای لاکتوکوکوس‌ها استفاده گردید. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر لوله سریال رقت به محیط کشت‌های مزبور منتقل و کشت سطحی انجام گرفت. لاکتوکوکوس‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ روز تحت شرایط هوازای گرمخانه‌گذاری شدند. گرمخانه‌گذاری لاکتوباسیلوس‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در جار بی‌هوازی حاوی گاز پک نوع C (Merck, Germany) به مدت ۳ روز انجام گرفت (Gardiner *et al.*, 1998). ویژگی‌های شیمیایی نظیر pH، درصد نمک و رطوبت بر اساس روش AOAC تعیین گردید (AOAC, 1995).

– تأیید *یرسینیا انتروکولیتیکا* با PCR

مقایسه بین گروهی (نمونه‌های دارا و فاقد آغازگر) از آزمون T مستقل (Independent Samples T-Test) استفاده شد.

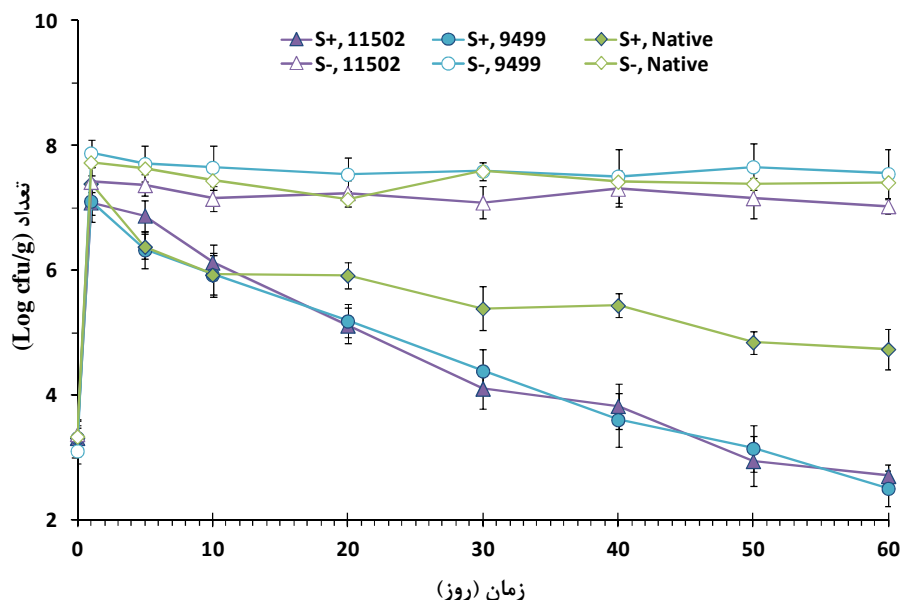
### یافته‌ها

تغییرات جمعیت سویه‌های مختلف *یرسینیا انتروکولیتیکا* طی مراحل تهیه و نگهداری پنیر فراپالایشی در نمودار (۱) نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، جمعیت *یرسینیا انتروکولیتیکا* از زمان تلقیح تا روز ۱ (گرمخانه‌گذاری) در نمونه‌های حاوی کشت آغازگر و فاقد آن به‌طور میانگین ۴/۱۴ واحد لگاریتمی افزایش ( $p < ۰/۰۱$ ) یافت. اما پس از طی این دوره به تدریج تعداد این باکتری در هر دو گروه از نمونه‌ها کاهش پیدا کرد. این میزان کاهش تا روز ۵ فقط ۰/۳۸ واحد لگاریتمی برآورد گردید که از نظر آماری معنی‌دار نبود. در دوره نگهداری تعداد *یرسینیا انتروکولیتیکا* در نمونه‌های فاقد آغازگر کاهش چشمگیری نشان نداد و در انتهای دوره ۶۰ روزه تعداد ۷/۳۳ واحد لگاریتمی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در هر گرم از پنیر ردیابی شد. در حالی که در نمونه‌های دارای آغازگر تعداد این باکتری در هر مقطع زمانی از دوره نگهداری، به‌طور معنی‌داری ( $p < ۰/۰۱$ ) کمتر از نمونه‌های فاقد آغازگر بود. طوری که در انتهای دوره ۶۰ روزه نگهداری صرفاً ۳/۳۲ واحد لگاریتمی از باکتری زنده در هر گرم پنیر شمارش گردید.

واکنش PCR با یک مرحله دمایی  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴ دقیقه برای دناتوراسیون اولیه آغاز گردید. سپس ۳۵ سیکل متوالی شامل  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه جهت دناتوراسیون،  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه برای اتصال پرایمرها و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه جهت توسعه توالی هدف و در نهایت یک مرحله دمایی  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه برای توسعه نهایی اعمال گردید (Thisted, Lambertz and Danielsson-Tham, 2005). محصول PCR شامل یک قطعه ۴۵۴ bp بود که متعاقب الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد (Invitrogen, USA) حاوی ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ سایبرگرین (SYBR Green) (Sigma-Aldrich, USA)، وجود این باند ارزیابی گردید.

### - تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از شمارش *یرسینیا انتروکولیتیکا* و باکتری‌های کشت آغازگر به مقیاس لگاریتمی تبدیل و مورد تجزیه و تحلیل آماری (SPSS, Version 17) قرار گرفت. نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون‌های Skewness و Kurtosis بررسی گردید. پس از انجام آمار توصیفی (میانگین و انحراف معیار) بر روی داده‌های مطالعه، تغییرات تعداد *یرسینیا انتروکولیتیکا* در طی مراحل مختلف تهیه و نگهداری پنیر در هر گروه از داده‌ها و همچنین تفاوت تغییرات سویه‌های مختلف *یرسینیا انتروکولیتیکا* با آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan's test) مقایسه گردید. برای



نمودار (۱) - تغییرات تعداد (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) سویه‌های مختلف *یرسینیا انتروکولیتیکا* طی تولید، گرمخانه‌گذاری و نگهداری پنیر فراپالایشی؛ (S+) و (S-) به ترتیب نشان‌دهنده نمونه‌های دارا و فاقد کشت آغازگر؛ 11502، 9499 و Native به ترتیب شامل سویه‌های استاندارد DSM 11502، DSM 9499 و سویه بومی *یرسینیا انتروکولیتیکا* است.

میانگین دو سویه‌های استاندارد به ترتیب ۴/۷۴ و ۲/۶۱ واحد لگاریتمی در هر گرم تعیین گردید. میانگین تغییرات باکتری‌های آغازگر لاکتیکی (لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌های مزوفیل) طی مراحل مختلف تهیه، گرمخانه‌گذاری و نگهداری پنیر سفید فراپالایشی در جدول (۲) نشان داده شده است. شمارش باکتری‌های لاکتیکی نشان داد پس از دوره گرمخانه‌گذاری (روز ۱) در نمونه‌های حاوی کشت آغازگر، لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها در حدود ۱ واحد لگاریتمی در هر گرم افزایش یافت. این روند افزایشی طی روزهای ۵ و ۱۰ نگهداری نیز مشاهده گردید و در روز ۱۰ بالاترین جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها به ترتیب و با تعداد ۹/۶۱ و ۹/۳۴

در نمودار (۱) به نتایج تغییرات تعداد سویه‌های مختلف *یرسینیا انتروکولیتیکا* اشاره شده است. در نمونه‌های فاقد آغازگر، سویه‌های استاندارد (DSM 11502 و DSM 9499) و بومی *یرسینیا انتروکولیتیکا* رفتار مشابهی نشان داده و با تفاوت مختصری، تا پایان دوره ۶۰ روزه نگهداری بقای خود را حفظ نمودند. در حالی که در نمونه‌های دارای آغازگر سویه بومی *یرسینیا انتروکولیتیکا* در قیاس با سویه‌های استاندارد پایداری بیشتری داشت. رفتار سویه‌های مختلف تا روز ۱۰ نگهداری مشابه برآورد گردید، اما از روز ۲۰ تا پایان مدت نگهداری تفاوت معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) در جمعیت سویه بومی با سویه‌های استاندارد مشاهده گردید. در انتهای دوره نگهداری، تعداد سویه بومی و

واحد لگاریتمی در هر گرم پنیر به دست آمد ( $p < 0/01$ ). نزولی در جمعیت باکتری‌های آغازگر مشاهده گردید. اما متعاقب روز ۱۰ و تا انتهای دوره نگهداری روند

جدول (۲) - تغییرات تعداد (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) باکتری‌های لاکتیکی طی روند تولید، گرمخانه‌گذاری و نگهداری پنیر فرابالایشی تهیه شده با و بدون کشت آغازگر لاکتیکی

نوع پنیر*	زمان نگهداری (روز)								
	۰	۱	۵	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰
S+, Lb.	۷/۹۴±۰/۴۵ <sup>b</sup>	۸/۸۵±۰/۲۵ <sup>b</sup>	۹/۱۷±۰/۱۲ <sup>a</sup>	۹/۶۱±۰/۱۵ <sup>a</sup>	۸/۸۵±۰/۱۷ <sup>b</sup>	۸/۸۶±۰/۲۸ <sup>b</sup>	۸/۰۴±۰/۲۳ <sup>b</sup>	۶/۹۳±۰/۲۷ <sup>c</sup>	۶/۸۷±۰/۱۹ <sup>c</sup>
S+, Lc.	۷/۶۵±۰/۳۸ <sup>b</sup>	۸/۶۶±۰/۱۶ <sup>b</sup>	۹/۳۸±۰/۱۴ <sup>a</sup>	۹/۳۴±۰/۱۱ <sup>a</sup>	۹/۳۳±۰/۱۲ <sup>a</sup>	۹/۱۷±۰/۲۵ <sup>a</sup>	۷/۷۷±۰/۲۹ <sup>b</sup>	۷/۴±۰/۱۸ <sup>b</sup>	۷/۳۸±۰/۲۲ <sup>b</sup>
S-, Lb.	۱/۳±۰/۲۲ <sup>c</sup>	۳/۳۲±۰/۲۵ <sup>b</sup>	۳/۰۷±۰/۲۷ <sup>b</sup>	۳/۸۴±۰/۲۱ <sup>a</sup>	۳/۹۸±۰/۱۴ <sup>a</sup>	۴/۱۴±۰/۱۴ <sup>a</sup>	۳/۷۴±۰/۲۳ <sup>a</sup>	۴/۰۵±۰/۲۱ <sup>a</sup>	۳/۹۵±۰/۱۹ <sup>a</sup>
S-, Lc.	۱/۴۴±۰/۱۸ <sup>c</sup>	۳/۳۸±۰/۱۶ <sup>b</sup>	۳/۹۸±۰/۲۴ <sup>b</sup>	۴/۷۴±۰/۱۹ <sup>a</sup>	۴/۴۵±۰/۲۲ <sup>a</sup>	۴/۳۸±۰/۱۵ <sup>a</sup>	۴/۸۱±۰/۱۹ <sup>a</sup>	۴/۵۵±۰/۱۱ <sup>a</sup>	۴/۳۸±۰/۱۲ <sup>a</sup>

(\*): S+ و S- به ترتیب نشان‌دهنده نمونه‌های دارا و فاقد آغازگر و Lb. و Lc. به ترتیب نشانگر لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌هاست. (a, b, c): حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت ( $p < 0/01$ ) است.

لاکتوکوکوس‌ها به ترتیب به حداکثر تعداد ۴/۱۴ و ۴/۴۵ واحد لگاریتمی در هر گرم رسید.

در جدول (۳) میانگین تغییرات pH در نمونه‌های پنیر تهیه شده با کشت آغازگر و فاقد آن نشان داده شده است. براساس این نتایج، در نمونه‌های دارای آغازگر میزان pH در پایان دوره گرمخانه‌گذاری به ۴/۸۰ کاهش یافت که از نظر آماری معنی‌دار ( $p < 0/01$ ) بود. اما در ادامه دوره نگهداری تغییرات معنی‌داری در مقدار pH مشاهده نشد. در نمونه‌های فاقد آغازگر تغییرات pH از زمان تهیه پنیر تا انتهای دوره نگهداری غیرمعنی‌دار بود.

شمارش باکتری‌های لاکتیکی در نمونه‌های فاقد کشت آغازگر حاکی از حضور تعداد میانگین ۱/۳۷ واحد لگاریتمی لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس در هر گرم از رتتیت بود. این گروه جزو باکتری‌های لاکتیکی شیر خام هستند که شرایط پاستوریزاسیون و سایر فرایندهای تهیه پنیر سفید فرابالایشی را تحمل نموده‌اند. پس از گرمخانه‌گذاری این مقدار به‌طور تقریبی ۲ واحد لگاریتمی افزایش ( $p < 0/01$ ) یافت و در روزهای ۳۰ و ۴۰ دوره نگهداری جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها و



جدول (۳) - تغییرات pH (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) طی روند تولید، گرمخانه‌گذاری و نگهداری پنیر فراپالایشی تهیه شده با کشت آغازگر لاکتیکی و بدون آن

نوع پنیر*	زمان نگهداری (روز)								
	۰	۱	۵	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰
S+	۶/۶۱±۰/۱۱ <sup>bi</sup>	۴/۸۰±۰/۱۵ <sup>ai</sup>	۴/۷۱±۰/۱۷ <sup>ai</sup>	۴/۷۱±۰/۱۵ <sup>ai</sup>	۴/۸۸±۰/۱۲ <sup>ai</sup>	۴/۹۱±۰/۰۹ <sup>ai</sup>	۴/۸۳±۰/۱۳ <sup>ai</sup>	۴/۹۰±۰/۱۷ <sup>ai</sup>	۴/۸۷±۰/۱۹ <sup>ai</sup>
S-	۶/۶۱±۰/۱۱ <sup>ai</sup>	۵/۸۵±۰/۱۶ <sup>ag</sup>	۶/۰۳±۰/۲۱ <sup>ag</sup>	۶/۰۳±۰/۱۱ <sup>ag</sup>	۵/۹۸±۰/۱۴ <sup>ag</sup>	۶/۰۸±۰/۱۵ <sup>ag</sup>	۵/۸۹±۰/۱۹ <sup>ag</sup>	۵/۹۳±۰/۱۸ <sup>ag</sup>	۶/۰۱±۰/۲۲ <sup>ag</sup>

\* (S+) و (S-) به ترتیب نشان‌دهنده نمونه‌های دارا و فاقد آغازگر است.  
 (a) و (b): حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت ( $p < 0/01$ ) است.  
 (i) و (g): حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ( $p < 0/01$ ) بین گروه‌هاست.

میانگین نتایج هر دو گروه به‌عنوان درصد نمک و رطوبت در نظر گرفته شد. طبق این نتایج، تفاوت معنی‌داری در میزان این پارامترها طی دوره‌های مختلف تهیه و نگهداری پنیر مشاهده نشد.

در جدول (۴) نتایج تغییرات درصد نمک و رطوبت نمونه‌های پنیر نشان داده شده است. با توجه به اینکه تفاوت معنی‌داری از نظر خصوصیات شیمیایی بین گروه‌های دارای و فاقد آغازگر مشاهده نگردید،

جدول (۴) - تغییرات درصد نمک و رطوبت (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) طی روند تولید، گرمخانه‌گذاری و نگهداری پنیر فراپالایشی

نوع پنیر	زمان نگهداری (روز)								
	۰	۱	۵	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰
نمک	-	۱/۶۲±۰/۱۵	۱/۷۱±۰/۱۳	۱/۷۳±۰/۱۲	۱/۸۵±۰/۰۸	۱/۸۰±۰/۰۹	۱/۸۱±۰/۱۳	۱/۷۹±۰/۱۵	۱/۸۲±۰/۱۹
رطوبت	۶۴/۵±۰/۱۱	۶۴/۶±۰/۱۶	۶۴/۱±۰/۱۸	۶۴/۲±۰/۱۱	۶۴/۰±۰/۱۲	۶۳/۸±۰/۱۱	۶۳/۶±۰/۱۳	۶۳/۸±۰/۱۶	۶۳/۵±۰/۲۱

## بحث و نتیجه‌گیری

حضور باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی و ورود آن‌ها به بدن، به‌ویژه در کودکان، سالمندان و افراد با ضعف سیستم ایمنی می‌تواند عوارض شدید و حتی مرگبار به‌دنبال داشته باشد. با توجه به اهمیت تغذیه‌ای شیر و فرآورده‌های آن و مصرف این محصولات از سوی افراد مختلف، کیفیت و استاندارد بالای بهداشتی آن از پیش‌نیازهای این گروه از مواد غذایی است. در

همین راستا، طی مطالعات تلقیحی متعددی رشد و بقای میکروب‌های بیماری‌زا در فرآورده‌های شیر مورد بررسی قرار گرفته است (Erkmen, 1997; Mohammadi and Hanifian, 2014).

در مطالعه اخیر، با مقایسه تعداد یرسینیا *انتروکولیتیکا* در نمونه‌های حاوی کشت آغازگر و فاقد آن (نمودار ۱) می‌توان به تفاوت قابل ملاحظه در تعداد این باکتری پی برد. برآورد جمعیت باکتری‌های لاکتیکی

گرمخانه‌گذاری، بلکه تا روز ۳۰ دوره نگه‌داری هیچ کاهش‌ی در نتیجه نزول pH نشان نداد (Hanifian, 2014). به نظر می‌رسد تفاوت در رفتار میکروب‌ها می‌تواند به توانایی آن‌ها در تحمل شرایط نامساعد محیطی و از آن جمله تفاوت در حساسیت نسبت به pH باشد.

بر اساس یافته‌های این مطالعه، درجات متفاوتی از مقاومت در برابر عوامل نامساعد در بین سوبه‌های استاندارد و بومی *یرسینیا/انتروکولیتیکا* مشاهده گردید (نمودار ۱). به نظر می‌رسد سوبه‌های وحشی *یرسینیا/انتروکولیتیکا* در مقایسه با سوبه‌های آزمایشگاهی پایداری بیشتری در برابر استرس‌های محیطی داشته باشند. پدیده «محافظت متقاطع» (Cross-protection) مناسب‌ترین توجیهی است که می‌توان برای این موضوع مطرح نمود. به این معنی که در معرض قرارگیری یک ارگانیسم با تنش‌های محیطی، منجر به فعال شدن برخی ژن‌های مقاومت شده و در نتیجه ارگانیسم در برابر استرس‌های بعدی پایداری بیشتری می‌گردد. سوبه بومی *یرسینیا/انتروکولیتیکا* از جدایه‌هایی انتخاب گردید که طی مطالعه‌ای از پنیر سنتی لیقوان جداسازی شده بود (Hanifian and Khani, 2012a). با توجه به این‌که شرایط داخلی (Intrinsic parameters) پنیر لیقوان از نظر اسیدیته، درصد نمک (فشار اسمزی) و حضور فلور میکروبی رقیب با قابلیت تولید ترکیبات آنتاگونیستی، شرایط دشوارتری در قیاس با محیط پنیر فراپالایشی برای میکروب‌ها ایجاد می‌کند، لذا در چنین محیط‌هایی باکتری‌ها با واسطه محافظت متقاطع جمعیت‌های مقاوم‌تری برای تحمل تنش‌های محیطی به وجود می‌آورند (Capozzi et al., 2009; Bergholz et al.,

نشان داد، متعاقب گرمخانه‌گذاری جمعیت کشت آغازگر افزایش یافته و به تبع آن pH نمونه‌ها به حدود ۴/۸۰ کاهش یافت. از این مرحله به بعد تفاوت چشم‌گیری در تعداد *یرسینیا/انتروکولیتیکا* بین نمونه‌های دارای آغازگر نسبت به نمونه‌های فاقد آن مشاهده گردید. بر اساس شواهد موجود به نظر می‌رسد فعالیت کشت آغازگر و افت pH به‌عنوان مهم‌ترین دلیل کاهش تعداد *یرسینیا/انتروکولیتیکا* در نمونه‌های دارای آغازگر باشد. دلایل مشابهی در مطالعات متعدد برای این موضوع مطرح شده است. ارکمن در مطالعه‌ای فعالیت کشت آغازگر به همراه افزودن نمک را دلایل کاهش تعداد *یرسینیا/انتروکولیتیکا* در پنیر فتای ترکیه (Turkish Feta cheese) مطرح نمود. این روند نزولی به موازات سپری شدن دوره رسیدن پنیر و کاهش pH اتفاق افتاد (Erkman, 1997). در مطالعه دیگری اثر لاکتوباسیلوس *بولگاریکوس* و *استریتوکوکوس ترموفیلوس* بر ماندگاری *یرسینیا/انتروکولیتیکا* در پنیر سفید ایرانی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده هم‌خوانی بالایی با نتایج این مطالعه داشت. به این معنی که باکتری‌های لاکتیکی با کاهش pH پنیر موجب مهار رشد و بقای *یرسینیا/انتروکولیتیکا* گردید (حنیفیان و کریم، ۱۳۸۵). در مطالعات تلقیحی انجام یافته در پنیر فراپالایشی، بقای میکروب‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج حاصل، بیانگر شباهت‌ها و تفاوت‌هایی با آن چه که در مطالعه اخیر به دست آمده است، می‌باشد. برای مثال *استافیلوکوکوس اورئوس* رفتار مشابهی با *یرسینیا/انتروکولیتیکا* در واکنش به کاهش pH نشان داد (Mohammadi and Hanifian, 2014). در حالی که *مایکوباکتریوم اوپوم پاراتوبرکلوزیس* نه تنها طی دوره

قابل ملاحظه‌ای نداشت، لذا استفاده از دوره گرمخانه‌گذاری طولانی‌تر می‌تواند بر میزان رشد و فعالیت کشت آغازگر و به تبع آن در تولید اسید و ترکیبات آنتاگونیستی موثر باشد. در نهایت برای دستیابی به محصولی با کیفیت بهداشتی بالاتر و ایجاد حاشیه امنیت برای مصرف‌کنندگان، می‌توان از کشت‌های آغازگر با قابلیت تولید باکتریوسین‌ها و یا توانایی رشد در دماهای پایین‌تر بهره برد.

### سپاسگزاری

این مطالعه در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد و با استفاده از امکانات آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز و همکاری بخش تحقیق و توسعه کارخانه شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان شرقی انجام گرفت.

2012). در مقابل سویه‌های استاندارد شامل باکتری‌های هستند که در نتیجه رشد در شرایط آزمایشگاهی و به دور از تنش‌های محیطی به تدریج قابلیت‌های خود را از دست می‌دهند.

در این مطالعه تکثیر سریع *یرسینیا انتروکولیتیکا* طی دوره گرمخانه‌گذاری نشان می‌دهد، در صورت بروز آلودگی ثانویه در حین تولید و بسته‌بندی، باکتری مزبور امکان رشد و تکثیر سریع را خواهد داشت که از این نظر یک مخاطره بهداشتی محسوب می‌گردد. به‌علاوه با وجود اثر مهاری کشت آغازگر، تمامی سویه‌های *یرسینیا انتروکولیتیکا* بقای خود را تا پایان دوره نگهداری پنیر فراپالایشی حفظ نمودند. در نتیجه این باکتری به‌عنوان خطر بالقوه در ارتباط با مصرف پنیرهای فراپالایشی است که دچار آلودگی ثانویه شده‌اند و یا احتمالاً فرآیند پاستوریزاسیون به‌طور مؤثر بر روی آن‌ها اعمال نشده است. با عنایت به این‌که جمعیت باکتری‌های آغازگر طی گرمخانه‌گذاری پنیر فراپالایشی افزایش

### منابع

- حنیفیان، شهرام (۱۳۸۸). مطالعه تأثیر دوز تلقیح *یرسینیا انتروکولیتیکا* بر بقاء آن در پنیر سفید نگه‌داری شده در آب نمک. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، دوره ۳، شماره ۱، صفحات: ۴۳۴-۴۲۷.
- حنیفیان، شهرام (۱۳۹۰). جداسازی، شناسایی و تعیین *یرسینیا انتروکولیتیکا* بیماری‌زا از شیرهای پاستوریزه. مجله بهداشت مواد غذایی، دوره ۴، شماره ۴، صفحات: ۳۶-۲۳.
- حنیفیان، شهرام و کریم، گیتی (۱۳۸۵). مطالعه اثر متقابل لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس طی روند تولید و نگه‌داری پنیر سفید ایرانی. مجله علوم تخصصی دامپزشکی ایران، دوره ۳، شماره ۲، صفحات: ۴۹۲-۴۸۵.
- Ackers, M.K., Schoenfeld, S., Markman, J., Smith, M.G., Nicholson, M.A., DeWitt, W., et al. (2000). An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurized milk. *Journal of Infectious Disease*, 181(5): 1834-1837.

- AOAC. (1995). Official Methods of Analysis, AOAC International. 16<sup>th</sup> Edition, Vol. 2, Chap: 33, Subchapter 7, Cheese, pp. 58–61.
- Aytaç, S.A. and Özba, Z.Y. (1992). Isolation of *Yersinia enterocolitica* from Turkish pickled white cheese. Australian Journal of Dairy Technology, 47(1): 60–62.
- Bergholz, T.M., Bowen, B., Wiedmann, M. and Boor, K.J. (2012). *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and -independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection against other stresses. Applied and Environmental Microbiology, 78(8): 2602–2612.
- Bhaduri, S. and Cottrell, B. (1998). A simplified sample preparation method from various foods for PCR detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*: a possible model for other food pathogens. Molecular and Cellular Probes, 12(2): 79–83.
- Bottone, E.J. (1991). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. Microbes and Infection, 1(4): 323–333.
- Capozzi, V., Fiocco, D., Amodio, M.L., Gallone, A. and Spano, G. (2009). Bacterial stressors in minimally processed food. International Journal of Molecular Sciences, 10(7): 3076–3105.
- Erkmen, O. (1997). Survival of virulent *Yersinia enterocolitica* during the manufacture and storage of Turkish Feta cheese. International Journal of Food Microbiology, 33(2-3): 285–292.
- Gardiner, G., Ross, R.P., Collins, J.K., Fitzgerald, G. and Stanton, C. (1998). Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains, Applied and Environmental Microbiology, 64: 2192–2199.
- Hanifian, S. (2014). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Ultra-filtrated white cheese. Letters in Applied Microbiology, 58(5): 466–471.
- Hanifian, S. and Khani, S. (2012a). Prevalence of virulent *Yersinia enterocolitica* in bulk raw milk and retail cheese in northern-west of Iran. International Journal of Food Microbiology, 155(1-2): 89–92.
- Hanifian, S. and Khani, S. (2012b). Fate of *Yersinia enterocolitica* during manufacture, ripening and storage of Lighvan cheese. International Journal of Food Microbiology, 156(2): 141–146.
- Hudson, J., King, N., Cornelius, A., Bigwood, T., Thom, K. and Monson, S. (2008). Detection, isolation and enumeration of *Yersinia enterocolitica* from raw pork. International Journal of Food Microbiology, 123(1-2): 25–31.
- Karami, M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaie, K. and Safari, M. (2009). Changes in the rheological properties of Iranian UF-Feta cheese during ripening. Food Chemistry, 112(3): 539–544.
- Longenberger, A.H., Gronostaj, M.P., Yee, G.Y., Johnson, L.M., Lando, J.F., Voorhees, R.E., et al. (2014). *Yersinia enterocolitica* infections associated with improperly pasteurized milk products: southwest Pennsylvania, March-August, 2011. Epidemiology and Infection, 142(8): 1640–50.
- Minnich, S.A., Smith, M.J., Weagant, S.D. and Feng, P. (2001). *Yersinia*, In: Hui, Y.H., Pierson, M.D. and Gorham, J.R. (Editors), Foodborne Diseases Handbook. Vol. 1, CRC Press LLC, p. 677.
- Mohammadi, K. and Hanifian, S. (2014). Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in Iranian ultra-filtered white cheese. International Journal of Dairy Technology, DOI: 10.1111/1471-0307.12158.
- Robins-Browne, R.M. and Hartland, E.L. (2003). *Yersinia* Species, In: Marianne, D.M., and Jeffery, W.B. (Editors), International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker Inc, p. 858.
- Skurnik, M., Radström, P., Knutsson, R., Segerman, B., Hallanvuo, S., Thisted Lambertz, S., et al. (2010). *Yersinia*. In: Liu, D. (Editor), Molecular Detection of Foodborne Pathogens. CRC Press, New York, pp. 501–513.
- Soltan-Dallal, M.M., Tabarraie, A. and MoezArdalan, K. (2004). Comparison of four methods for isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw and pasteurized milk from northern Iran. International Journal of Food Microbiology, 94(1): 87–91.
- Thisted Lambertz, S. and Danielsson-Tham, M.L. (2005). Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 71(7): 3674–3681.

- 
- Zadernowska, A., Wierzchowska, W.C. and Trokenheim, L.L. (2014). *Yersinia enterocolitica*: A dangerous, but often ignored, foodborne pathogen. *Food Reviews International*, 30(1): 53–70.
  - Weagant, S.D. and Feng, P. (2001). *Yersinia*, In: Pouch Downes, F. and Ito, K. (Editors), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 3<sup>th</sup> Edition, American Public Health Association, Washington DC, pp. 421–428.
  - Weagant, S.D., Feng, P. and Stanfield, J.T. (1998). *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, In: Jackson, G.J., Merker, R.I. and Bandler, R. (Editors), *Bacteriological Analytical Manual*, 8<sup>th</sup> Edition, FDA publication, USA, pp. 156–170.

## Behavior of various strains of *Yersinia enterocolitica* in Ultra-filtered cheese and inhibitory effect of lactic starter bacteria

Vaseghi Bakhshayesh, R.<sup>1</sup>, Hanifian, S.<sup>2\*</sup>

1- M.Sc Graduate in Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

\*Corresponding author email: hanifian@iaut.ac.ir

(Received: 2015/1/11 Accepted: 2015/7/22)

### Abstract

This study aimed to assess the behavior of various strains of *Yersinia enterocolitica* in ultra-filtered (UF) cheese and to evaluate the inhibitory effect of lactic starter bacteria on survival of *Y. enterocolitica*. To this end, pasteurized ultra-filtered milk was inoculated with 3 log cfu/g of two standard strains (DSM 11502 and DSM 9499) and one native strain of *Y. enterocolitica*. UF cheese samples were produced with and without starter culture. Enumeration of *Y. enterocolitica* was performed at the time of inoculation, after incubation time and during the 2-months storage period on CIN agar. The enumerated colonies were confirmed by PCR. Results revealed that after incubation, the populations of *Y. enterocolitica* in both groups increased by 4.14 log cfu/g ( $P < 0.01$ ). However, during the storage period the number of *Y. enterocolitica* decreased only in the samples made with starter cultures. pH values revealed a significant difference ( $P < 0.01$ ) between the samples made with and without starter culture; therefore, it seems that acidic pH is the major factor inhibiting the survival of *Y. enterocolitica* in UF cheese. Besides, a significantly ( $P < 0.01$ ) different behavior was observed among native and standard strains. Considering the inhibitory effect of starter bacteria, it seems that creation of proper conditions in terms of temperature and the time necessary for proliferation and activity of starter bacteria or application of cultures capable of producing antagonistic products can be effective in controlling possible microbial contaminations along with the development of desirable aroma and texture in UF cheese.

**Key words:** *Yersinia enterocolitica*, Ultra-filtered cheese, Starter cultures