مجلة الزراعة العراقية مجلد15 عدد1 ص148-154 شباط/2010

تأثير نوعية الحليب الخام في التغيرات الكيميائية في الحليب المعقم والقشدة المبسترة

3 – دراسة التحلل الدهني والبروتيني في القشدة المصنعة من حليب ملقح ببكتيريا *Pseudomonas fluorescens* و*Bacillus* spp.

عبير عبد الجبار العامري اكرم ثابت الراوي عامر محمد علي صالح

الملخص

ساهمت كل من بكتيريا *Pseudomonas fluorescens* و*Bacillus* spp. بشكل واضح في تطور قيم درجة حموضة الدهن (ADV) وتركيز التايروسين (T.V) في القشدة المبسترة المصنعة مختبرياً من حليب معقم ملقح بحجوم لقاح مختلفة من هذين النوعين من البكتيريا وكانت الزيادة في هذه القيم تتناسب طرديا مع الزيادة الحاصلة في حجم اللقاح البكتيري المضاف كما انها تناسبت طرديا مع مدة الخزن (7 أيام بدرجة حرارة 7 م). وكان لتلويث الحليب المعد لتصنيع القشدة بعدد ابتدائي 1×10^3 و1×10^2 وت م/مل لكل من بكتيريا *P. fluorescens* و*Bacillus* spp على الترتيب، أثر واضح في تدهور نوعية المنتج بشكل ملحوظ وذلك قبل انتهاء مدة 7 ايام من الخزن المبرد بدرجة حرارة 7 م.

المقدمة

تعد القشدة من منتجات الألبان السريعة التلف. وتوجد علاقة وثيقة بين النوعية البكتيرية للحليب الخام والقشدة المصنعة منه. إذ ان عملية فصل القشدة بالنبذ المركزي تحتجز 90–95% من بكتيرياً الحليب الخام ولذلك تعد القشدة غنية بجميع أجناس البكتيريا الموجودة أصلاً في الحليب (10). وعلى الرغم من ان عمليات التبريد تحد من سرعة تلف هذا المنتوج إلا إنها وفي الوقت نفسه تشجع نمو أحياء متحملة للبرودة Psychrotrophs وتكون ملائمة لتكاثرها. ان هذا النوع من البكتيريا لا يقاوم درجة حرارة البسترة، الا ان الخطورة تكمن في إفرازه لعدد من الانزيمات المقاومة للحرارة ولاسيما انزيمات التحلل الدهني (Lipases) وانزيمات التحلل البروتيني (Proteinases) والتي اعزي تلف القشدة الشائع اليها، إذ ان هذه الانزيمات تسبب التلف لاحقا عند خزن المنتوج (9). ان اعتدال درجة حرارة البسترة يجعل القشدة المبسترة، تحتوي دائماً على البكتيريا المقاومة للحرارة وعلى وجه التحديد الأبواغ البكتيرية التي تقاوم حرارة البسترة والتي يمكن ان تنمو جيدا في درجة حرارة خزن القشدة، فضلاً عن التلوث بعد البسترة ببكتيريا حساسة للحرارة . لذلك فأن العمر الخزني للقشدة قصير، وان أفضل عامل حفظ للقشدة يعتمد بشكل أساسي على درجة الحرارة في أثناء الخزن والنقل والعامل الثاني المهم هو التلوث بعد المعاملة الحرارية (8).

ولا تلاحظ عيوب النكهة عند مستويات التلوث المنخفضة الا بعد 10–14 يوماً من الخزن في درجات الحرارة المنخفضة في حين تتمكن هذه البكتيريا من النمو بسرعة مسببة ظهور عيوب النكهة في القشدة المخزونة في درجات حرارة فوق المعدلات الطبيعية في بضعة أيام (4، 16).

جزء من رسالة ماجستير للباحث الأول .

كلية الزراعة–جامعة بغداد–بغداد، العراق.

تاريخ تسلم البحث: نيسان/2005.
تاريخ قبول البحث: حزيران /2007.

هدفت الدراسة الى معرفة تأثير كل من بكتيريا ***P.fluorescens*** و ***Bacillus spp.*** في التحلل الدهني والبروتيني في القشدة المبسترة المصنعة مختبريا من حليب معقم ملقح بحجوم لقاح مختلفة من هذين النوعين ودراسة تاثير زيادة حجم اللقاح البكتيري المضاف ومدة الخزن في درجة حرارة 7م.

المواد وطرائق البحث

عزلات البكتيريا

استعملت عزلة محلية لكل من بكتيريا ***Pseudomonas fluorescens*** و بكتيريا ***Bacillus spp.*** المتحصل عليهما من بحوث رسالة الماجستير (2).

تصنيع القشدة المبسترة مختبرياً

حصل على نماذج من الحليب الخام من قسم الثروة الحيوانية-كلية الزراعة-جامعة بغداد، وكان ذا نوعية جيدة ومن فئة الدرجة الاولى، كما حدد في المواصفة العراقية للحليب الخام ومنتجاته لسنة 1992 (5× 10^5 وت م/مل) للحليب الخام درجة أولى (نوعية جيدة) و3× 10^6 وت م/مل للحليب الخام درجة ثانية (نوعية مقبولة) (1). استعمل هذا الحليب في التصنيع المختبري للقشدة المبسترة، إذ عقم الحليب الخام فور وصوله الى المختبر في درجة حرارة 121 م لمدة 10 دقائق وبرد مباشرة بعد انتهاء مدة التعقيم ثم لقح بمستويات لقاح مختلفة من بكتيريا ***P.fluorescens*** (1×10^1، 1×10^3، 1× 10^5 و1×10^7) وت م/مل وبكتيريا ***Bacillus spp.*** (1×10^1، 1×10^2، 1×10^3 و1×10^4) وت م/مل.كلا على حدة، مع وجود معاملة مقارنة (من دون تلقيح) وحضنت المعاملات جميعها في درجة حرارة 7 م لمدة 72 ساعة، فرز الحليب بعد انتهاء مدة الحضن المشار اليها سلفا للحصول على قشدة خام ذات نسبة دهن مرتفعة ومختلفة في كل معاملة، وبعد تعديل نسبة الدهن الى 30% في جميع المعاملات اجريت لها معاملة البسترة في درجة حرارة 80 م لمدة نصف ساعة. وبردت بعدها القشدة وخزنت في درجة حرارة 7 م لمدة 7 ايام وحدث متابعة التحلل الدهني والبروتيني في أثناء مدة الخزن.

تقدير تركيز الحوامض الدهنية الحرة (F.F.A) في الحليب

استعملت درجة حموضة الدهن (ADV) المقدرة بطريقة BDI كمقياس لمعرفة درجة التحلل الدهني (6) واستعملت الحدود المقترحة من قبل APHA (3) في تحديد الجودة وكالاتي:

1- اقل من 0.4 مليمكافيء/100 غم دهن، يكون الحليب طبيعياً.
2- من 0.7 الى 1.1 مليمكافيء/100 غم دهن، نكهة متزنخة غير واضحة.
3- 1.2 مليمكافيء/100 غم دهن فأكثر، غير مرغوب مع نكهة متزنخة واضحة.

تقدير تركيز الحامض الاميني التايروسين

قدر تركيز الحامض الأميني التايروسين كدليل على التحلل البروتيني (10) ورسم المنحنى القياسي وفق طريقة Hull (10).

النتائج والمناقشة

يوضح الجدولان (1 و2) حدوث تغيير في قيم ADV للمعاملات المدروسة، اذ سجلت معاملة السيطرة في وقت الصفر أدنى قيمة للمتغير ADV والتي بلغت 0.50 و0.46 مليمكافيء/100غم دهن لكل من بكتيريا ***P.fluorescens*** و ***Bacillus spp.*** على الترتيب، ورافق الزيادة في مستوى اللقاح البكتيري المضاف أرتفاع طردي في قيم ADV، اذ سجل مستوى لقاح 10^7 و10^4 وت م/مل أقصى قيمة للمتغير ADV والتي بلغت 0.62 و0.97

ملي مكافيء/100غم دهن لكل من بكتيريا *P.fluorescens* و*Bacillus* spp.، على الترتيب. وتعد هذه العلاقة الطردية بين مستوى اللقاح البكتيري وقيم ADV صحيحة بحدود معينة لأن الزيادة العالية في مستوى اللقاح البكتيري المضاف تؤدي الى إنتاج عالٍ من البروتينزات والتي قد تؤدي الى تحطيم اللاييبيزات خاصة في الوسط الذي يكون محتواه الدهني عالٍ (12). ويلاحظ من الجدولين (1 و2) حدوث تغيير في قيم ADV لمدد الخزن المدروسة في درجة حرارة 7م، إذ يبين الجدول (1) ازديادها ADV لجميع المعاملات بزيادة مدة الخزن عن قيمها الدنيا المسجلة في وقت الصفر لتسجل ارتفاعا ولجميع المعاملات وذلك عند اليوم الأول من الخزن، وسجل استعمال حجم لقاح 10^1و10^3 وت م/مل من بكتيريا *P.fluorescens* انخفاضا في اليوم الثاني من الخزن ثم عادت القيم للارتفاع مع تقدم مدة الخزن. واشرت معاملات السيطرة، 10^5 و10^7 وت م/مل انخفاضا في قيم ADV في اليوم السابع من الخزن في درجة حرارة 7 م.

جدول 1: تأثير مدة الخزن بدرجة حرارة 7م في تطور ADV (مليمكافيء/100 غم دهن) في القشدة المبسترة المصنعة مختبرياً من قشدة خام ملقحة بمستويات لقاح مختلفة من بكتيريا *P. fluorescens*

مستوى اللقاح (وت م/ مل)	مدة الخزن (يوم) في 7 م				
	0	1	2	3	7
السيطرة	0.50	0.51	0.57	0.69	0.44
10^1	0.52	0.63	0.58	0.59	0.64
10^3	0.56	0.64	0.59	0.64	0.70
10^5	0.60	0.69	0.76	0.90	0.79
10^7	0.62	0.77	0.82	0.95	0.87

جدول 2 : تأثير مدة الخزن بدرجة حرارة 7م في تطور ADV (مليمكافيء/100 غم دهن) في القشدة المبسترة المصنعة مختبرياً من قشدة خام ملقحة بمستويات لقاح مختلفة من بكتيريا *Bacillus* spp.

مستوى اللقاح (وت م/ مل)	مدة الخزن (يوم) في 7م				
	0	1	2	3	7
السيطرة	0.46	0.58	0.66	0.68	0.74
10^1	0.55	0.64	0.69	0.70	0.62
10^2	0.57	0.87	1.14	0.86	0.51
10^3	0.78	0.89	0.71	0.89	0.31
10^4	0.97	0.98	0.79	0.94	0.49

ويتبين من الجدول (2) ان اليوم الاول من الخزن سجل ارتفاعا في قيم ADV لجميع الوجبات واستمرت معاملة السيطرة بالارتفاع طيلة مدة الخزن، في حين سجل مستوى لقاح 10^4،10^3،10^2،10^1 وت م/مل من بكتيريا*Bacillus* spp. انخفاضا في قيم ADV في الايام 7، 3، 2 و2 من الخزن، على الترتيب. أن أزدياد قيم ADV بمرور مدة الخزن عائد الى فعل اللاييبيزات المنتجة من قبل هذه البكتيريا والتي تمتاز بمقاومتها معاملة البسترة (13). اذ تعمل هذه الانزيمات في تحليل دهن الحليب محررة بذلك حوامض دهنية تؤدي الى رفع قيم ADV (15،18). اما سبب حدوث الانخفاض في مدد مختلفة من الخزن، فقد يعود الى تحرر الحوامض الدهنية ولاسيما طويلة السلسلة والتي تمتاز بتثبيط اللاييبيزات عند تراكمها في الوسط الذي تعمل فيه، ولولا وجود المركبات المستقبلة (Acceptor) لهذه FFA في الحليب مثل البومين مصل الدم BSA، Ca^{++}، Mg^{++} لتوقفت فعالية الأنزيم، لذلك يحتمل ان تكون أغلب الحوامض الدهنية الحرة الناتجة قد ارتبطت بهذه المستقبلات (10، 9، 6). وقد يعود سبب الانخفاض في قيم ADV الى أن الحوامض الدهنية المتحررة ولاسيما الطويلة السلسلة غير المشبعة، تكون اكثر عرضة للأكسدة منتجة بذلك مركبات الديهايدية وكيتونية. وهذه تكون مسؤولة عن ظهور النكهات غير المرغوبة، وذلك يعني نقصاً في مستوى FFA مما يسبب انخفاض قيم ADV (3، 11، 14، 17).

ووفق تدريجات طريقة BDI يتوقع ظهور نكهة متزنخة غير واضحة عند مستوى لقاح 10^3، 10^5 و10^7 وت م/ مل في الايام 7، 2 و1 من الخزن، على الترتيب (جدول 1). في حين بقيت النكهة طبيعة في معاملة السيطرة وفي المعاملة المتمثلة بمستوى لقاح 10^1 وت م/مل طيلة مدة الخزن في درجة حرارة 7 م.

ويشير الجدول (2) الى توقع ظهور نكهة متزنخة غير واضحة (وفق تدريجات BDI) لمعاملة السيطرة وعند حجوم لقاح 10^1، 10^2، 10^3و 10^4و ت م/ مل وذلك في الايام 7، 3، 1، 0 و0 ، على الترتيب.

ومن ذلك يستنتج ان تلويث الحليب بعدد ابتدائي هو 1×10^3 وت م/مل من بكتيريا ***P. fluorescens*** ادى الى ظهور نكهة متزنخة غير واضحة أستمرت طيلة مدة الخزن المدروسة للقشدة المصنعة مختبرياً. وان تلويث الحليب بعدد ابتدائي هو 1×10^1 وت م/ مل من بكتيريا ***Bacillus* spp.** ادى الى ظهور نكهة متزنخة غير واضحة في القشدة المصنعة مختبرياً ومنذ اليوم الثالث للخزن.

يوضح الجدولان (3 و4) حدوث تغيير في قيم T.V للمعاملات المدروسة، اذ سجلت معاملة السيطرة في وقت الصفر أدنى قيمة للمتغير T.V والتي بلغت 20.31 و10.01 مايكروغرام/مل لكل من بكتيريا ***P.fluorescens*** و***Bacillus* sp**، على الترتيب. ورافق الزيادة في مستوى اللقاح البكتيري المضاف ارتفاع طردي في مقدار T.V لتصل اقصاها الى 28.39 و15.14 مايكروغرام/مل عند إضافة حجم لقاح 10^7و10^4 وت م/مل، لكل من بكتيريا ***P.fluorescens*** و***Bacillus* spp**، على الترتيب.

جدول 3: تاثير مدة الخزن بدرجة حرارة 7م في محتوى التايروسين (TV) مايكروغرام/مل في القشدة المبسترة المصنعة مختبرياً من قشدة خام ملقحة بمستويات لقاح مختلفة من بكتيريا ***P.fluorescens***

مستوى اللقاح (وت م/ مل)	مدة الخزن (يوم) بدرجة حرارة 7 م				
	0	1	2	3	7
السيطرة	20.31	20.96	21.95	22.84	24.31
10^1	20.99	21.78	22.98	24.57	26.62
10^3	22.96	24.86	25.76	27.70	30.75
10^5	26.75	28.35	29.01	30.41	33.10
10^7	28.89	29.97	29.85	31.66	35.21

جدول 4 :تأثير مدة الخزن بدرجة حرارة 7م على محتوى التايروسين (TV) مايكروغرام/مل في القشدة المبسترة المصنعة مختبرياً من قشدة خام ملقحة بمستويات لقاح مختلفة من بكتيريا ***Bacillus* spp.**

مستوى اللقاح (وت م/ مل)	مدة الخزن (يوم) بدرجة حرارة 7 م				
	0	1	2	3	7
السيطرة	10.01	10.96	11.56	13.28	13.58
10^1	10.97	11.08	11.97	14.89	16.70
10^2	12.11	12.57	13.86	15.74	16.79
10^3	13.69	15.89	16.04	17.89	18.40
10^4	15.14	16.29	18.52	21.82	22.93

ويلاحظ ايضاً من الجدولين (3 و4) حدوث تغيير في مقدار T.V لمدد الخزن المدروسة في درجة حرارة 7 م. اذ تزداد T.V تدريجياً ولجميع المعاملات بزيادة مدة الخزن من قيمها الدنيا والتي سجلت في وقت الصفر لتبلغ أقصاها ولجميع المعاملات عند اليوم السابع من الخزن. وسجل استعمال حجم لقاح 10^7 و10^4 وت م/مل أعلى قيمة لهمن بين المعاملات اذ بلغت 35.21 و22.93 مايكروغرام/مل لكل من بكتيريا ***P.fluorescens*** و***Bacillus* spp.**، على الترتيب. ان الزيادة الحاصلة في قيم T.V بمرور مدة الخزن قد تعزى الى فعل البروتينزات المنتجة من قبل بكتيريا

P.fluorescens في تحليل البروتينات منتجة ببتيدات وأحماض امينية حرة ومنها الحامض الأميني التايروسين مما يعمل على رفع قيم T.V (5، 13).

خلصت الدراسة الى ان كلاً من بكتيريا *P.fluorescens* و*Bacillus* spp. قد ساهمت في تطور قيم ADV وT.V في القشدة المبسترة المصنعة من حليب ملقح بحجوم لقاح مختلفة من هذه البكتيريا، وكانت الزيادة في هذه القيم متزامنة مع زيادة مستوى اللقاح البكتيري المضاف ومدة الخزن (7 أيام بدرجة حرارة 7م) ويشكل تلويث الحليب المعد لتصنيع القشدة مختبرياً بأعداد ابتدائية 1×10^3 و1×10^2 وت م/مل لكل من بكتيريا *P. fluorescens* و*Bacillus* spp.، على الترتيب مصدراً حقيقياً في تدهور نوعية المنتج بشكل ملحوظ وذلك قبل انتهاء مدة 7 أيام من الخزن بدرجة حرارة 7م.

المصادر

1- الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية (1992). الحدود المايكروبية للحليب ومنتجاته المواصفة القياسية رقم (365).

2- العامري، عبير عبد الجبار (2003). تاثير نوعية الحليب الخام على التغيرات الكيميائية في الحليب المعقم والقشدة المبسترة ودور بكتريا Psychrotrophic في هذه التغيرات.رسالة ماجستير– قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية– كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

3- American Public Health Association (1978). Standard methods for the examination of dairy products. 14th. American Public Health Association. Inc. Washington, USA.

4- Bassette, R. and V.R. Mantha (1986). Off-flavours in milk. In: CRC Critical reitical reviews in Food Sci. and Nutrition, 24: 1:1-52.

5- Deeth, H.C. and C.H. Fitz-Gerald (1976). Lipolysis in dairy products: A review. Aust. J. Dairy. Technol., 31:53.

6- Deeth, H.C. and C.H. Fitz-Gerald (1983). Lipolysis enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. In "Development in dairy chemistry" Part II, Chap.6 Lipids. Edited by Fox, P.F. Applied Sci., London, UK.

7- Driessen, F.M. (1983). Lipases and proteinases in milk, occurrence, heat inactivation, and their importance for the keeping quality of milk products.Neth.Milk Dairy J., 37:193-196.

8- Driessen, F.M. and M.G. Van den berg (1992). Microbiological aspects of pasteurized cream. Int.Dairy Fed. Bull. 271. Chap., 2.4-10.

9- Griffiths, M. W.; J.D. Phillips and D.D. Muir (1981). Development of flavour defects in pasteurized double cream during storage at 6°C and 10°C. J. Soc. Dairy Technol., 43:142-146.

10- Hull, M.E. (1947). Studies on milk proteins. II.Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. J. Dairy Sci., 30: 881.

11- Kielwein, G. (1982). Relationship between the bacteriological quality of raw milk and that of pasteurized milk cream and fermented milk products. Kieler Milchw. Forsch. Ber., 34: 1: 174-177.

12- Olivecrona, T. (1980). Biochemical aspects on lipolysis in bovine milk. Int. Dairy Doc., 118:126.

13- SΦrhaug, T. and L. Stepaniak (1991).Microbial enzymes in the spoilage of milk and dairy products. Vol.1.In "Food Enzymology" Edited by Fox,

14- Sorhaug, T. and L. Stepaniak (1997). Psychrotrophic and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects: Areview. Trends in Food

Sci. Technol., 8:2:35-67.

15- Scow, R.O. and T. Oliveronal (1977). Effect of albumin on products formed from chylomicfon triacylglycerol by lipoprotein lipase in vitro. Biochim. Biophys. Acta., 487: 472.

16- Shipe, W.F.; R. Bassette; D.D. Deane; W.L. Dunkley; E.G. Hammond; W. J. Harper; D.H. Kleyn; M.E. Morgan; J.H. Nelson and R.A. Scanlan (1978). Off flavours in milk. J. Dairy Sci., 61: 855-869.

17- Stead, D. (1986). Microbial lipases: their characteristis, role in food spoilage and industrial uses. J. Dairy Res., 53: 3:481-505.

18- Wook-Choi, I. and I. Jeon (1995).Composition of free fatty acids in ultra-high temperature processed milk and their contribution to acid degree value .J. Food and Biotechnol., 4: 11-13.

EFFECT OF RAW MILK QUALITY ON THE CHEMICAL CHANGES IN STERILIZED MILK AND PASTEURIZED CREAM

3-ASSESSING THE LIPOLYTIC AND PROTEOLYTIC HYDROLYSIS IN PROCESSED CREAM FROM MILK INOCULATED WITH *Pseudomonas fluorescens and Bacillus* spp

A.T. Al-Rawi A.M. Salih A.A. Al-Ammry

ABSTRACT

P. fluorescens **and** ***Bacillus*** **spp. contributed to the development of Acid Degree Value (ADV) and Tyrosine Value (T.V) in pasteurized cream, which was manufactured from milk inoculated with different levels of these bacteria. These values increased and coincided with the increase in the amount of bacterial inoculums and storage period (7 days at 7°C).**

Milk contaminated with an initial count $1x10^3$ and $1x10^2$ cfu/ml of ***P.fluorescens*** **and** ***Bacillus*** **spp. respectively is considered as an actual source for deteriorating the quality of the pasteurized cream before 7 days of storage at 7°C.**

Part of M.Sc. thesis of the first author.
College of Agric.- Baghdad Univ.-Baghdad ,Iraq.