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

2- دراسة التحلل الدهني والبروتيني في الحليب المعقم الملقح ببكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus* spp.

عبير عبد الجبار العامري عامر محمد علي صالح أكرم ثابت الراوي

الملخص

لقحت نماذج من حليب معقم بمستويات لقاح مختلفة لكل من بكتريا ***Pseudomonas fluorescens*** وبكتريا ***Bacillus* spp.**، وبعد خزنها في درجة حرارة 7م لمدة 72 ساعة، اعيد تعقيم جميع النماذج وتمت متابعة التغيرات في تحلل الدهن (درجة حموضة الدهن ADV) ودرجة تحلل البروتين (قيمة تركيز التايروسين T.V) والترحيل الكهربائي لبروتينات الحليب في اثناء خزن النماذج مدة 40 يوما في درجتي الحرارة 7 و30 م.

دلت النتائج ان كلا النوعين من البكتريا ساهمت انزيماتها المقاومة للحرارة في احداث تحلل في الدهن والبروتين، خاصة عند زيادة حجم اللقاح البكتيري وارتفاع درجة حرارة الخزن، وكان لتلويث الحليب بعدد بكتيري ابتدائي 1×10^3 و 1×10^2 وت م/مل لنوعي البكتريا على الترتيب تأثير واضح في حدوث تلك التحللات وفي تدهور نوعية الحليب المخزون.

المقدمة

تعد عمليات الخزن المبرد في الحقل وفي اثناء النقل من الاجراءات المالوفة في تداول الحليب الخام فضلا عن خزنه لمدة اضافية في المعمل قبل التصنيع وعلى الرغم من ان الخزن المبرد يحد من سرعة نمو الاحياء المجهرية الا انه في الوقت نفسه يشجع نمو أحياء متحملة للبرودة **Psychrotrophs** ويشكل ظرفاً ملائما لتكاثرها (**25**). ان مصطلح **Psychrotroph** الذي تبنته منظمات الالبان الدولية **International Dairy Federation (IDF)** (**20**) يشمل تلك الأحياء المجهرية التي تتمكن من النمو في درجة حرارة 7م أو أقل، بغض النظر عن درجة الحرارة المثلى لنموها. ان تلوث الحليب الخام بالبكتريا المتحملة للبرودة في أثناء الإنتاج هو امر لا يمكن استبعاده على الرغم من ان اتخاذ الاجراءات الصحيحة يعمل على تقليل مستوى التلوث. واغلب هذه المجموعة من البكتريا هي غير مرضية ويتم القضاء عليها بالبسترة، الا ان الخطورة تكمن في انها تفرز عدداً من الأنزيمات الخارجية الثابتة تجاه درجات الحرارة العالية والتي تعمل على تحليل مكونات الحليب، خاصة الأنزيمات المحللة للبروتين (البروتينزات) والأنزيمات المحللة للدهن (اللايبيزات) مما يؤدي الى إنتاج نكهات غير مرغوبة وانواع اخرى من العيوب في منتجات الالبان في اثناء التصنيع والخزن (**9**، **25**)، ويكون اللايبيز الذي تنتجه بالبكتريا المتحملة للبرودة عادة مقاوماً للحرارة ويسبب التزنخ وينتج نكهات المرارة غير المرغوبة (**5**). ان فعالية البروتينيز يمكن ان تقود الى تهليم الحليب وتطور النكهات غير المرغوبة مثل النكهة غير الاعتيادية والمرارة (**11**).

جزء من رسالة ماجستير للباحث الأول .

كلية الزراعة- جامعة بغداد- بغداد، العراق.

تاريخ تسلم البحث: نيسان/**2005**.

تاريخ قبول البحث: حزيران /**2007**.

اشار Renner (24) الى ان فعالية التحلل البروتيني في الحليب ودرجة تحطم البروتين يعدان مؤشراً مفيداً لمعرفة العمر الخزني للحليب. واضاف ان اتساع مدى التحلل البروتيني في حليب معاملة UHT لايعتمد على وجود الانزيمات فقط ولكن أيضاً على درجة الحرارة وطول مدة الخزن.

كما ان وجود البكتريا المقاومة للحرارة العالية (Thermoduric) والمكونة للابواغ تكون على القدر نفسه من اهمية البكتريا المتحملة للبرودة، اذ تعد من اهم اسباب تلف منتجات الالبان مثل الحليب المعقم والقشدة المبسترة من خلال انتاجها الابواغ المقاومة للحرارة وتتحول فيما بعد الى خلايا خضرية نشطة وتكون مسوؤلة عن نشؤ النكهات غير المرغوبة، كما تنتج انزيمات محللة للدهن والبروتين واحياناً سموماً. وبعضها ينتج حموضة والغالب انها تتسبب في تكوين خثرة حلوة في قعر عبوة الحليب في بداية الامر وقد لا يتمكن المستهلك من الانتباه لها خاصة في الحليب المعقم المعبأ في العبوات الكرتونية (33).

هدفت الدراسة الحالية الى توضيح تأثير بعض أجناس وأنواع البكتريا المتحملة للبرودة في التحلل الدهني والبروتيني لبعض منتجات الألبان وذلك بدراسة تاثير البروتينزات واللايبيزات المنتجة من كل من بكتريا *P.fluorescens* و *Bacillus* spp..

المواد وطرائق البحث

عزلات البكتريا

استعملت عزلة محلية لكل من بكتريا *P. fluorescens* و *Bacillus* spp. استحصلتا من بحوث رسالة الماجستير (2).

الحليب الخام وتجهيز وتصنيع الحليب المعقم

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) (2).

تصنيع الحليب المعقم مختبريا وتلقيحه بالبكتريا

عقم الحليب الخام (الجيد النوعية) فور وصوله الى المختبر في درجة حرارة 121م لمدة 10 دقائق وبرد مباشرة الى 7°م بعد انتهاء مدة التعقيم ثم لقح بمستويات لقاح مختلفة من بكتريا *P. fluorescens* (1×10^1، 1×10^3، 1×10^5، 1×10^7) و ت م/ مل وبكتريا *Bacillus* spp. (1×10^1، 1×10^2، 1×10^3، 1×10^4) وت م/مل كل على حدة، مع وجود معاملة مقارنة (من دون تلقيح)، حضنت المعاملات جميعها في درجة حرارة 7م لمدة 72 ساعة، جرى بعدها تعقيم الحليب في درجة حرارة 121م لمدة 10 دقائق، ثم برد وخزن في مكان مظلم في درجتي حرارة 7 و30م لتجرى بعدها متابعة التحلل الدهني والبروتيني لمدد مختلفة من الخزن ولغاية 40 يوماً.

التحاليل الكيميائية

تقدير تركيز الحوامض الدهنية الحرة (F.F.A) في الحليب: استعملت درجة حموضة الدهن (ADV) المقدرة بطريقة BDI كمقياس لمعرفة درجة التحلل الدهني (10) واستعملت الحدود المقترحة من قبل APHA (4) في تحديد جودة الحليب.

تقدير تركيز الحامض الاميني التايروسين: قدر التايروسين دليلاً على التحلل البروتيني (19) ورسم المنحنى القياسي وفق طريقة Hull (19).

– الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد .SDS - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS. **PAGE)**: أجري الترحيل الكهربائي باستعمال طريقة **laemmli** (**34**).

النتائج والمناقشة

يبين الجدولان (**1** و**2**) ان هناك تاثيرا في قيم حموضة الحليب للمعاملات المدروسة، اذ لوحظ ان معاملة السيطرة قد سجلت في اليوم الخامس من الخزن في درجة حرارة **30**م أدنى قيمة للمتغير(**ADV**) والتي بلغت **0.53** و**0.27** مليمكافيء/ **100** غم دهن للحليب المعقم الملقح ببكتريا ***P.fluorescens*** و***Bacillus* spp.**، على الترتيب. ورافق الزيادة في كمية اللقاح البكتيري المضاف ارتفاعاً طردياً في قيم الحموضة، اذ سجلت المعاملة 10^7 وت م/مل من بكتريا ***P.fluorescens*** و 10^4 وت م/مل من بكتريا ***Bacillus* spp.** أقصى قيمة للحموضة والتي بلغت **1.90** و**2.78** مليمكافيء/**100** غم دهن، على الترتيب لدى الخزن في **30**°م لمدة **40** يوماً.

ويظهر الجدولان (**1** و**2**) أيضاً وجود تأثير في قيم **ADV** للمدد الخزنية المدروسة في درجة حرارة **30**م، أذ سجلت المعاملات (السيطرة، 10^1، 10^3 وت م/مل) و(10^7،10^5 وت م/مل) لبكتريا ***P.fluorescens*** ادنى قيم للمتغير **ADV** وذلك عند اليوم الخامس واليوم العاشر من الخزن، على الترتيب.ورافق الزيادة في مدة الخزن ارتفاع طردي في قيم **ADV** وسجل حجم لقاح 10^7 اقصى قيمة للمتغير **ADV** والتي بلغت **2.58** مليمكافيء/**100**غم دهن وذلك في اليوم الثلاثين من الخزن. كما سجلت المعاملات (السيطرة 10^1، 10^3 و10^5) اقصى قيمة للمتغير **ADV** عند اربعين يوما من الخزن (جدول **1**).

جدول **1** :تطور حموضة الحليب (**ADV** مليمكافيء/**100** غم دهن) في الحليب المعقم والملقح بمستويات لقاح مختلفة من بكتريا ***P. fluorescens*** لدى الخزن في درجتي الحرارة **30** و **7**م

مستوى اللقاح (وت م/ مل)	مدة الخزن (يوم) في درجة حرارة 30°م					***ADV*** (7 °م/40 يوم)
	5	10	20	30	40	
السيطرة	0.53	0.64	0.69	0.72	0.80	0.73
10^1	0.62	0.76	0.69	0.97	0.99	1.18
10^3	0.79	0.95	0.87	0.89	1.25	0.98
10^5	0.83	0.80	0.96	1.29	1.65	1.16
10^7	0.98	0.89	1.07	2.58	1.91	1.37

جدول **2**: تأثير مدة الخزن بدرجتي الحرارة **30** و**7**م على تطور حموضة الحليب (**ADV** مليمكافيء/ **100** غم دهن) في الحليب المعقم المصنع مختبرياً والملقح بمستويات لقاح مختلفة من بكتريا .***Bacillus* spp**

مستوى اللقاح (وت م/ مل)	مدة الخزن (يوم) بدرجة حرارة 30 °م					***ADV*** (7°م/40 يوم)
	5	10	20	30	40	
السيطرة	0.27	0.29	0.31	0.67	0.73	0.49
10^1	0.37	0.40	0.47	0.97	0.75	0.68
10^2	0.39	0.58	0.79	0.980	1.20	0.93
10^3	0.47	0.82	0.91	0.78	1.71	1.27
10^4	0.54	0.97	0.78	1.87	2.7 9	1.98

يوضح (الجدول **2**) ازدياد قيم **ADV** تدريجياً من ادنى قيمة لجميع المعاملات لبكتريا .***Bacillus* spp** والتي سجلت في اليوم الخامس من الخزن في درجة حرارة **30**م لتبلغ اعلى قيمة عند **40** يوماً من الخزن باستثناء حجم لقاح 10^1 وت م/مل الذي سجل اعلى قيمة عند **30** يوما من الخزن، كما يلاحظ من الجدول (**2**) ان مستوى لقاح 10^4 وت م/مل سجل اقصى قيمة من بين المعاملات المدروسة والتي بلغت **2.79** مليمكافيء/ **100** غم دهن. ويمكن أن يعزى السبب في ارتفاع قيم **ADV** بمرور مدة الخزن الى ثبات اللايبيزات المنتجة من قبل بكتريا ***Bacillus*** تجاه معاملة

التعقيم والعمل في تحليل دهن الحليب مؤدية بذلك الى زيادة محتوى الأحماض الدهنية الحرة في الحليب المعقم المدروس وبالتالي الى زيادة قيم ADV (5، 27، 28).

كما اجريت دراسة لمعرفة مدى تطور اعداد بكتريا ***P.fluorescens*** و ***Bacillus*** بعد مدة حضن 72 ساعة في درجة حرارة 7م، اذ اتضح ان اعداد بكتريا ***P.fluorescens*** بلغت في نهاية المدة المحددة للحضن 35×10^5 و25×10^6 و 90×10^7 وت م/مل لكل من القيم الابتدائية المدروسة 1×10^1، 1×10^3 و1×10^5 وت م/مل، على الترتيب. وبلغت اعداد بكتريا ***Bacillus*** في نهاية مدة الحضن المشار اليها سلفاً (131×10^4، 50×10^5، 285×10^5 و75×10^7) و ت م/مل لكل من القيم الابتدائية (1×10^1، 1×10^2، 1×10^3 و1×10^4) وت م/ مل، على الترتيب.

وتشير معظم الابحاث الى ان القيمة الحرجة لاعداد البكتريا والمؤثرة سلباً في العمر الخزني ونوعية الحليب هي 5×10^6 و ت م/مل (6، 14، 17، 22، 26، 30، 32).

كما اشارت تدريجات طريقة BDI ظهور نكهة متزنخة واضحة في الحليب المعقم المصنع مختبريا والمضاف له مستوى لقاح 10^7 و ت م/مل من بكتريا ***P. fluorescens*** عند 30 يوماً من الخزن في درجة حرارة 30م، في حين كان ظهور النكهة المتزنخة عند مستوى لقاح 10^5 و10^3 في اليوم 30 و 40 من الخزن، على الترتيب. وظهرت نكهة متزنخة غير واضحة عند حجم لقاح 10^1 وفي معاملة السيطرة في الايام 10 و30 من الخزن، على الترتيب.

وتشير تدريجات طريقة BDI الى ظهور نكهة متزنخة واضحة عند مستويات لقاح 10^4، 10^3 و10^2 وت م/مل من بكتريا ***Bacillus* spp.** وذلك في الايام 30، 40 و40 من الخزن في درجة حرارة 30م، على الترتيب. في حين ظهرت نكهة متزنخة غير واضحة عند مستوى لقاح 10^1 وفي معاملة السيطرة وذلك في الايام 30 و 40 من الخزن، على الترتيب. من ذلك نستنتج ان تلوث الحليب بعدد ابتدائي 1×10^3 و1×10^2 و ت م/مل لكل من بكتريا ***P.fluorescens*** و***Bacillus* spp.** على الترتيب، يشكل سبباً جوهرياً في تدهور نوعية الحليب المعقم بدرجة ملحوظة، إذ لايمكن إطالة مدة خزن الحليب الملوث بهذه البكتريا والمعد للتصنيع لاكثر من يوم واحد.

ويلاحظ أيضاً من الجدولين (1 و2) أن خزن الحليب المعقم في درجة حرارة 7م لمدة 40 يوماً نتج عنه خفض قيم ADV لمعظم المعاملات قياساً مع الحليب المعقم المخزون في درجة حرارة 30م. وقد يعزى ذلك الى أن درجة الحرارة المثلى لعمل اللايبيزات تقع ضمن مدى 30-50°م مع الاحتفاظ بحوالي 20% أواكثر من الفعالية القصوى في درجة حرارة 4-7م (9، 16، 29).

يوضح الجدول (3) ان قيم ADV لوجبات الحليب الخام (جيد النوعية) مباشرة عند التسلم كانت جميعها تقع ضمن المدى الذي تكون فيه نكهة الحليب طبيعية ويعزى ذلك الى تطبيق بعض الشروط الصحية الصحيحة مثل تعقيم ضرع البقرة قبل الحلب وتسلم الحليب في دوراق معقمة ونقل الحليب الخام بسرعة وبظروف مبردة الى المختبر وفي مدة لا تتجاوز 15 دقيقة لاجراء الفحوص البكترية.

جدول 3: قيم درجة حموضة الدهن (ADV) وقيم التايروسين (T.V) للحليب الخام الجيد النوعية

الوجبات	ADV (مليمكافيء/100 غم دهن)	T.V (مايكروغرام /مل)
1	0.48	25.79
2	0.63	27.92
3	0.70	28.31
المتوسط	0.60	27.34

يلاحظ من الجدولين (4 و5) وجود تاثير في قيم محتوى التايروسين T.V للمعاملات المدروسة، اذ سجلت معاملة السيطرة في اليوم الخامس من الخزن بدرجة حرارة 30م ادنى قيمة للمتغير T.V والتي بلغت 24.99 و27.96 مايكروغرام/مل لكل من بكتريا *P.fluorescens* و*Bacillus* spp.، على الترتيب. ورافق الزيادة في مستوى اللقاح البكتيري المضاف ارتفاع طردي في قيم T.V، اذ سجل مستوى لقاح 10^7 و 10^4 و ت م/مل لكل من بكتريا *P.fluorescens* و*Bacillus* spp. اقصى قيمة له ومقدارها 32.87 و 38.48 مايكروغرام/ مل، على الترتيب.

ويتضح ايضا من الجدولين (4 و5) وجود تأثير لمدة الخزن المدروسة في درجة حرارة 30م في مقدار T.V. اذ ازداد مقدارها ولجميع المعاملات تدريجيا بزيادة مدة الخزن من قيمها الدنيا في اليوم الخامس من الخزن لتصل قيمها القصوى عند 40 يوماً من الخزن كما سجل اضافة مستوى اللقاحين 10^7 و10^4 و ت م/مل لكل من بكتريا *P. fluorescens* و*Bacillus* spp. اقصى قيمة له بعد 40 يوما من الخزن والتي بلغت 156.01 و130.31 مايكروغرام/مل، على الترتيب. ويعزى السبب في ارتفاع قيم T.V في اثناء مدة الخزن الى ثبات البروتينزات تجاه معاملة التعقيم وفعلها في تحطيم بروتينات الحليب الى ببتيدات وأحماض أمينية والتي منها الحامض الاميني التايروسين ومن ثم زيادة تركيزه في الوسط (13، 15، 18، 21، 23، 29).

ويلاحظ ايضا من الجدولين (4 و5) ان خزن الحليب المعقم في درجة حرارة 7م لمدة 40 يوماً نتج عنه انخفاض في قيم T.V ولجميع المعاملات قياساً مع الحليب المعقم المخزون في درجة حرارة 30م. ويعود الى أن درجة الحرارة المثلى لعمل البروتينزات هي أقرب الى درجة حرارة 30م من درجة حرارة 7م، اذ ان اتساع مدى التحلل البروتيني في الحليب المعقم لايعتمد على وجود الأنزيم فقط بل ويعتمد ايضاً على درجة الحرارة وطول مدة الخزن (24،27).

جدول 4: محتوى التايروسين (TV) مايكروغرام/مل في الحليب المعقم الملقح بمستويات لقاح مختلفة من بكتريا *P. fluorescens* لدى الخزن في درجتي الحرارة 7 و30م

مستوى اللقاح (وت م/ مل)	مدة الخزن (يوم) بدرجة حرارة 30 م					T.V 7م°/40 يوم
	5	10	20	30	40	
السيطرة	24.99	27.23	30.84	36.17	42.45	39.21
10^1	26.96	29.85	32.74	40.85	46.93	43.92
10^3	29.22	32.88	81.29	123.15	37.04	102.84
10^5	30.61	33.06	89.25	147.05	155.33	121.30
10^7	32.87	34.08	99.14	150.07	156.01	140.12

جدول 5: محتوى التايروسين (TV) مايكروغرام/مل في الحليب المعقم الملقح بمستويات لقاح مختلفة من بكتريا *Bacillus* spp. لدى الخزن في درجتي الحرارة 7 و30 م

مستوى اللقاح (وت م/ مل)	مدة الخزن (يوم) بدرجة حرارة 30 م					T.V 7م°/40 يوم
	5	10	20	30	40	
السيطرة	27.96	30.97	39.12	41.03	42.97	37.99
10^1	28.76	33.74	41.83	43.86	46.06	41.37
10^2	30.37	34.99	42.00	46.31	51.83	45.58
10^3	32.08	38.04	44.65	56.01	64.05	51.34
10^4	38.48	53.89	81.65	113.82	130.31	90.21

ولتحديد بروتينات الحليب الاكثر خضوعاً لفعل البروتينز استخدمت طريقة الترحيل الكهربائي في دراسة تاثير بكتريا *P.fluorescens* في التحلل البروتيني في الحليب المعقم مختبرياً. وقد شخصت البروتينات الرئيسة في الحليب اعتماداً على البروتينات القياسية والتي تشتمل على ($K-Casein$، $\alpha_S-Casein$ $\beta-Casein$)،

($\beta - Lactoglobulin$ و $\alpha - Lactalbumin$) كما تبدو في الشكل (1) مرتبة على أساس الوزن الجزيئي من الأكبر الى الأصغر.

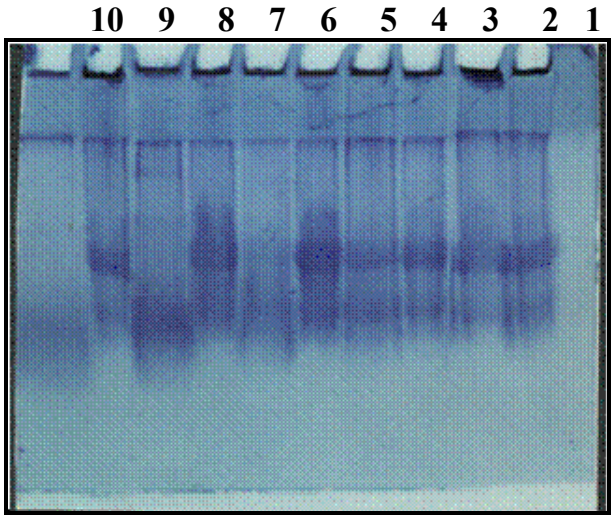
يوضح الشكل (2) التحلل البروتيني الذي حدث لنماذج الحليب المعقم عند وقت الصفر وبعد 40 يوماً من الخزن في درجة حرارة 30 م، اذ يشير الى عدم وجود فروق ملحوظة بين جميع المعاملات عند وقت الصفر. في حين كان لزيادة مدة الخزن ومستوى اللقاح المضاف تأثير واضح قياساً مع نموذج السيطرة، ولاسيما عند مستوى لقاح 10^3، 10^5 و10^7 (بعد 40 يوماً من الخزن). وشمل التحلل كلاً من كازينات الحليب وبروتينات الشرش، إذ يلاحظ ظهور حزم صغيرة سريعة الحركة. اتفقت النتائج مع ما ذكره Cousin و Marth (8) مقدرة عزلات *Pseudomonas* في تحطيم كلٍ من β-Casein وαs-Casein. واشار Adams وجماعته (3) الى مقدرة أنواع من *Pseudomonas* وهي بكتريا متحملة للبرودة في تحليل α-lactalbumin و β-Lactoglobulin (7، 30).

شكل 1: البروتينات القياسية للحليب كما تظهر لدى الترحيل الكهربائي على هلام متعدد الاكريلمايد 1- $\beta - Lactoglobulin$، 2- $\beta - Casein$، 3- $\alpha_S - Casein$، 4 و5- $K - Casein$ و6- $\alpha - Lactalbumin$

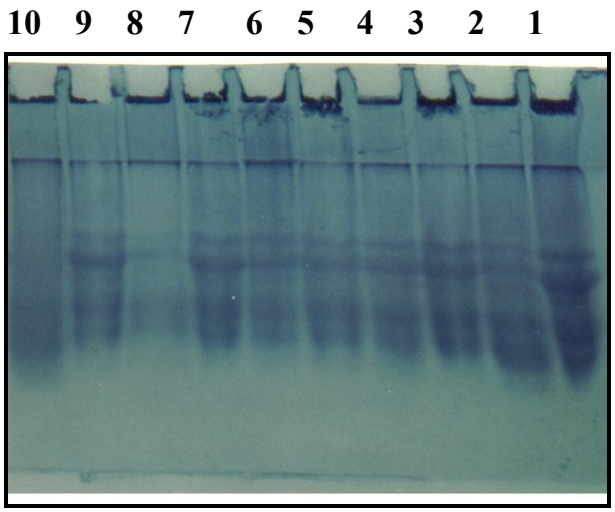
استخدم الترحيل الكهربائي ايضا في دراسة تاثير بكتريا *Bacillus* spp. في التحلل البروتيني في الحليب المعقم عند وقت الصفر. وبعد 40 يوماً من الخزن في درجة حرارة 30م. ويشير الشكل الى عدم وجود فروق ملحوظة بين المعاملات جميعها عند وقت الصفر، في حين كان لزيادة مدة الخزن ومستوى اللقاح المضاف تأثير واضحً قياساً مع نموذج السيطرة، لاسيما عند مستوى لقاح 10^3 و 10^4 وذلك بعد 40 يوماً من الخزن، وشمل التحلل كلاً من كازينات الحليب وبروتينات الشرش، اذ يلاحظ ظهور حزم صغيرة سريعة الحركة. وقد وجد EL Mayda و,جماعته (12) ان البروتينيز المنتج من قبل *B. subtilis* قد حلل بروتينات الشرش والبروتينات المناعية (Immunoglobulins) في الحليب. وبين ان التحلل في β–lactoglobulin كان اسرع من التحلل في α–lactalbumin.

خلصت الدراسة الى ان لكل من بكتريا *P.fluorescens* و *Bacillus* spp. المقدرة في إنتاج البروتينزات واللايبيزات مع تفوق الأولى في قابليتها في تحليل الدهن، وكان لكل منهما دور واضح في تطور التحلل الدهني والبروتيني في الحليب المعقم (مختبرياً) وحتى عند مستويات التلوث الواطئة واثبتت البروتينزات التي تنتجها كل من بكتريا *P.fluorescens* و *Bacillus* spp. المقدرة على تحليل الكازينات وبروتينات الشرش مع كون الكازينات اكثر

خضوعاً للفعل التحللي للبروتينزات من بروتينات الشرش.كما أن خزن وجبات الحليب المعقم (مختبرياً) لمدة 40 يوماً في درجة حرارة 7م ساهم في خفض سرعة التحلل الدهني والبروتيني قياساً بالحليب المعقم المخزون في درجة حرارة 30 م.



شكل (2) : نواتج الهجرة الكهربائية على هلام متعدد الاكريلامايد لبروتينات الحليب المعقم الملقح بمستويات لقاح مختلفة من بكتريا ***P.fluorescens*** {CON (1، 2)، 10^1 (3، 4)، 10^3 (5، 6)، 10^5(7، 8)، 10^7(9،10)} إذ (1،3، 5، 7 و9) تمثل وقت الصفر و(2، 4، 6، 8 و10) بعد 40 يوما من الخزن في درجة حرارة 30م.



شكل 3: نواتج الهجرة الكهربائية على هلام متعدد الاكريلامايد لبروتينات الحليب المعقم الملقح بحجوم لقاح مختلفة من بكتريا ***Bacillus* spp.** {CON (1،2)، 10^1 (3،4)، 10^2(5،6)، 10^3 (7،8)، 10^4(9،10) إذ (1،3، 5، 7 و9) تمثل وقت الصفر و(2، 4، 6، 8 و10) بعد 40 يوما من الخزن في درجة حرارة 30م.

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

3- **Adams, D.M.; J.T. Barach and M.L. Speak (1976). Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to Ultra-high temperature treatment. J. Dairy Sci., 59: 5:823-827.**

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

5- **Bigalke, D. (1985). Dairy food sanit., 5: 388-389 (Cited from Shah, 1994).**

6- **Birkeland, S.E.; L. Stepaniak and T. SΦrhaug (1985). Quantitative studies of heat stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* P1 by the Enzyme–linked immunosorbent assay. Appl. Environ. Microbiol., 49:382.**

7- **Cousin, M.A. (1989). Physical and biochemical effects components .In "Enzymes of psychrotrophic in raw food". Edited by R.C. Mckellar. CRC Press. Boca Raton. F1. USA, 205-225.**

8- **Cousin, M. A. and E. H. Marth (1977). Changes in milk protein caused by psychrotrophic bacteria. Milchwissenschaft., 32: 337-341.**

9- **Cromie, S. (1992). Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. In. Aust. J. Dairy Technol., 47:96-100.**

10- **Deeth, H.C. and C.H. Fitz-Gerald (1976). Lipolysis in dairy products: Areview. Aust. J.Dairy. Technol. 31: 53.**

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

12- **EL Mayda, E.; D. Paquet; J.P. Ramet and G. Linden (1986). Proteolytic activity of a *Bacillus subtilis* neutral protease preparation upon caseins and whey proteins of Cow's milk; J. Dairy Sci., 69:305-310.**

13- **Fairbairn, D.J. and B.A. Law (1986a). Proteinases of Psychrotrophic bacteria: their production, Properties effects and control. J. Dairy Res., 53:139-177.**

14- **Fairbairn, D. J. and B. A. law (1986b). Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Pseudomonas fluorescens* Nc Do 2085. J. Dairy Res., 53:457.**

15- **Fox, P. F. (1981). Neth. Milk Dairy J. 35: 233-253 (Cited from SΦrhaug and Stepaniak, 1991).**

16- **Fox, P.F.;P. Power and T. M. Cogan (1989). Isolation and molecular characteristics. In "Enzymes of psychrotrophic in raw food". Edited by R.C. Mckellar. CRC Press. Boca Raton. F1. USA, 57-120.**

17- **Gray, R.J.H. and T. SΦrhaug (1983). Economic microbiology In "Food, microbiology". Edited by Rose, A.H. Academic Press. London, 8: 1-45.**

18- **Hokney, L.J. and M. A. Cousin (1985). Detection of heat -resistant proteases produced by psychrotrophic in refrigerated milk. J. Dairy Sci., 68: 4:810-816.**

19- **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.**

20- **International Dairy Federation (1976). Psychrotrophs in milk and milk products. IDF E-Doc 68, International dairy federation, Brussels, Belgium (Cited from Suhren, 1989).**

21- **Kroll, S. (1989). Themal stability .In Enzymes of psychrotrophs in raw food". Edited by R.C. McKellar .CRC Press. Boca Raton. Fl. USA, 121-152.**

22- **Law, B.A. (1979). Reviews of the progress of dairy science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products.**

J. Dairy Res., 46: 573-588.

23- Mottar, J.F. (1989). Effect on the quality of dairy products. In "Enzymes of psychrotrophs in raw food". Edited by Mckellar R. C. CRC. Press. Boca Raton. F1.

24- Renner, E. (1988). Storage stability and some nutritional aspects of milk powders and ultra high temperature products at ambient temperature; J. Dairy Res., 55: 125 –142.

25- Shah, N. P. (1994). Psychrotrophic in milk: areview. Milchwissenschaft., 49:8:432-437

26- Shelley, A.W.; H.C. Deeth and I.C. MacRae (1986).J. Appl.Bacteriol.61: 395-400(Cited from SΦrhaug and Stepaniak, 1991).

27- SΦrhaug, T. and L. Stepaniak (1991). Microbial enzymes in the spoilage of milk and dairy products. Vol.1. In "food enzymology" edited by P.F. Fox, Elsevier.

28- SΦrhaug, T. and L. Stepaniak (1997). Psychrotrophic and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects: areview. Trends in Food Sci. Tecnol., 8: 2:35-67.

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

30- Stepaniak, L.; E. Zakrzewski and T. SΦrhaug (1989). Italian. J. Food Sci. 1:45-12 (Cited from SΦrhaug and Stepaniak, 1991).

31- Stepaniak, L.; P.F. Fox and C. Daly (1982). Isolation and general characterization of a heat-stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AFT36, Biochim. Acta, 717, 376.

32- Stepaniak, L.; S.E. Birkeland; G. Vagias and T. SΦrhaug (1987). Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring the production of heat stable proteinases and lipase from *Pseudomonas.* Milchwissenschaft., 42:168-172.

33- Vyletelova, M.; O. Hanus; Z. Pacova; P. Roubal and P. Kopunecz (2001). Frequency of Bacillus bacteria in raw cow's milk and its relation to other hygienic parameters. Czech. J. Anim. Sci., 46: 6: 260 –267.

34- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature., 22: 827.

Iraqi J. Agric. Vol.15 No.1 pp.138–147 Feb./2010

EFFECT OF RAW MILK QUALITY ON THE CHEMICAL CHANGES IN STERILIZED MILK AND PASTEURIZED CREAM
2-LIPOLYTIC AND PROTELYTIC STUDY IN STERILIZED MILK INOCULATED WITH *Pseudomonas fluorescens* AND *Bacillus spp.* BACTERIA

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

ABSTRACT

Samples of sterilized milk was inoculated with different levels of *Pseudomonas. fluorescens and Bacillus* spp,stored for a period of 7 days at 7°C, and samples were re sterilized . The changes manifested by lipid hydrolysis (Acid degree value ADV). Protein hydrolysis (Tyrosine value TV) and electrophoretic analysis of milk proteins as samples stored for 40 days at 7 and 30 °C.

The obtained results indicated that the thermoduric enzymes of both types of bacteria were contributed to hydrolysis of both lipids and proteins particularly as inoculum levels and storage temperature increased. Milk contaminated with an initial count valued 1x 10^3 and 1x10^2 ^{cfu}/ml for *P.fluorescens* and *Bacillus* spp. Respectively, increased significantly lipolysis, proteolysis and rapid deterioration of stored milk.

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