مطالعهٔ تفصیلی و شناسایی مولکولی باکتری‌های ایجادکنندهٔ طعم تلخی در خامهٔ پاستوریزه

هدی دژخی[1]، سجاد یزدان ستاد*[2]، نازیلا ارباب سلیمانی[3]، رضا نجف پور[4]، سید محمد غیبی حیات[5]، الیکا فرج تبریزی[4]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، البرز، ایران.
۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.
۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.
۴. گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.
۵. کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه زیست‌فناوری پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

* **نویسنده مسئول:** *sajjad.yazdansetad@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۰۱/۲٦

چکیده

خامه به دلیل رطوبت کافی، pH نزدیک به خنثی و غنی بودن مواد غذایی محیط مناسبی برای رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها است. دلیل عمدهٔ تلخی خامه، تجزیهٔ پروتئین‌های خامه به پپتیدهای هیدروفوبیک توسط آنزیم پروتئ+از حاصل از باکتری‌های مقاوم به دمای پاستوریزاسیون است. پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تفصیلی و شناسایی مولکولی باکتری‌های تلخ کنندهٔ خامهٔ پاستوریزه انجام گرفت. نمونه-های خامه پاستوریزه پس از جمع‌آوری، تحت آزمایش‌های میکروبی شامل شمارش تعداد کل میکروارگانیسم‌ها، تعداد باکتری‌های سرمادوست، تعداد باکتری‌های‌کلی‌فرم، تعداد باکتری‌های مقاوم به حرارت، تعداد باکتری‌های اسپوردار و نیز آزمون‌های شیمیایی شامل اسیدیته و pH قرار گرفت. این آزمون‌ها در دو دمای ۴ و ۱۵ درجه سلسیوس و در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ بعد از تولید خامه و با سه تکرار انجام شد. جدایه-های تلخ کنندهٔ خامه از نظر فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، فیلوژنتیکی و مولکولی شناسایی شدند. جدایه‌ها به خامهٔ سترون تلقیح و ازنظر تغییر طعم به‌صورت حسی ارزیابی شدند. دو گونهٔ باکتری عامل طعم تلخی از خامهٔ پاستوریزه جداسازی و شناسایی شدند. تعیین توالی مولکولی قطعهٔ ژنی *16S rRNA* جدایه‌ها نشان داد که *Bacillus cereus* و *Bacillus subtilis* علت عمدهٔ تلخی بودند. دمای نگهداری یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در فعالیت میکروارگانیسم‌ها و ماندگاری شیر خام است. نگهداری شیر خام به مدت طولانی قبل از فرایند پاستوریزاسیون منجر به افزایش باکتری‌های پروتئولیتیک مقاوم به دمای پاستوریزاسیون و تولید پروتئاز و تغییر طعم محصول می‌گردد.

واژگان کلیدی: پروتئاز، تلخی، خامه، *باسیلوس*.

مقدمه

شیر و محصولات آن از اقلام غذایی مهم و ارزشمند در صنایع غذایی مختلف انسانی است که آلودگی آن با عوامل میکروبی زیان‌های اقتصادی زیادی را در پی دارد (Faye and Konuspayeva, 2012). نگهداری شیر در شرایط بهداشتی و سرد کردن آن به میزان کافی طی مدت نگهداری اهمیت زیادی را در سلامت فرآورده‌های شیر تولیدشده دارد (Al-Mazeedi *et al.*, 2013). علاوه بر این، فاصلهٔ بین تولید و بسته‌بندی فرآورده شیر که تحت عنوان زمان ماند[1] تعریف می‌شود در صورت طولانی شدن، محصول را مستعد فساد میکروبی کرده و غیرقابل مصرف می‌سازد. ماندگاری خامه بر اساس ویژگی‌های فیزیکی (طعم، رنگ، بو)، ویژگی-های شیمیایی (اسیدیته، pH، میزان چربی) و ویژگی‌های میکروبیولوژیکی ارزیابی می‌گردد (Ledenbach and Marshall, 2009).

فساد میکروبی شیر و فرآورده‌های آن مانند خامه اغلب به

[1] Retention time

Archive of SID
www.SID.ir

علت تجزیه پروتئین‌ها و چربی‌های موجود با آنزیم‌های تولیدشده توسط میکروارگانیسم‌ها است که رنگ، بو و طعم محصول را نامطلوب می‌سازد (Goff, 2015). صنایع شیر برای حفظ کیفیت شیر خام طی مدت نگهداری از دماهای پایین استفاده می‌کند. از طرف دیگر، نگهداری شیر به مدت نسبتاً طولانی در دماهای پایین باعث تغییر توازن میکروبی آن شده و شرایط را برای رشد باکتری‌های سرمادوست فراهم می‌کند (Ma *et al*., 2013).

بیشترین فلور میکروبی شیر نگهداری شده در دماهای پایین، باکتری‌های سرمادوست است که علت عمدهٔ فساد شیر و فرآورده‌های آن نیز ناشی از آن‌ها است (Fernandes, 2009; Goff, 2015). باکتری‌های سرمادوست مانند *سودوموناس*، *آکروموباکتر*، *فلاوباکتریوم*، *آلکالیژنز*، *باسیلوس* و *استرپتوکوکوس* در دمای پایین‌تر از ۱۵ درجه سلسیوس به‌خوبی رشد می‌کنند به‌طوریکه در دمای ۴ درجه سلسیوس نیز قادر به رشد هستند. به علت خاصیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی اغلب باکتری‌های سرمادوست، شیر حتی در صورت نگه‌داری در دماهای نسبتاً پایین نیز به‌راحتی فاسد می‌شود (Barbano, 2006). اغلب این میکروارگانیسم‌ها در اثر تیمارهای حرارتی متداول و فرآیند پاستوریزاسیون از بین می‌روند اما برخی از آن‌ها آنزیم‌های برون سلولی پروتئاز و لیپاز مقاوم به حرارت تولید می‌کنند که با تیمارهای حرارتی کاملاً غیرفعال نمی‌شوند و تا حد زیادی دمای پاستوریزاسیون را تحمل می‌کنند. این آنزیم‌ها پروتئین‌ها و چربی‌های شیر را تجزیه کرده و باعث نامطلوب شدن کیفیت شیر و فرآورده‌های آن می‌گردند (Lemieux and Simard, 1992).

طعم از مهم‌ترین نشانه‌های کیفیت محصول نزد مصرف‌کننده است. طعم تلخی، تندی، اکسیدشدگی و ترشی متداول‌ترین طعم‌هایی است که در اثر تغییرات بیوشیمیایی در خامه پاستوریزه ممکن است به وجود آید. طعم تلخی خامه ناشی از تأثیر پروتئازهای ترشح‌شده از باکتری‌های پروتئولیتیک روی پروتئین‌های خامه است که آن‌ها را به پپتیدهای کوچک‌تر تجزیه می‌کند. به گفتهٔ برخی از محققین، طعم تلخ شیر و خامه ناشی از وجود پروتئازهای مقاوم به حرارت است که با هیدرولیز کازئین و لاکتالبومین باعث تولید پپتیدهای تلخ می‌شوند. تجزیه پپتیدها به ترکیبات متعفن نیز سبب بروز طعم و بوی گندیدگی می‌شود. طعم تندی یا صابونی در اثر فعالیت باکتری‌های لیپولیتیک و تولید اسیدهای چرب آزاد مثل اسیدبوتیریک، اسید کاپریلیک، اسید کاپریک و اسید لوریک است. طعم اکسیدشدگی ناشی از اکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای گلبول‌های چربی است. طعم ترشی در اثر فعالیت باکتری‌های اسیدلاکتیکی مانند *لاکتوکوکوس لاکتیس* و سایر باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک است. بسیاری از باکتری‌های دیگر نظیر کلی‌فرم‌ها نیز می‌توانند سبب ترش شدن محصول شوند. طعم میوه‌ای نیز معمولاً توسط باکتری‌های سرمادوست به‌ویژه *سودوموناس*‌ها به علت تولید استرهای اتیل بوتیرات و اتیل هگزانوات ایجاد می‌گردد (Muir, 1990). طعم نامطلوب خامه معمولاً ناشی از پروتئولیز و لیپولیز آنزیمی است که باعث تلخ شدگی و تندشدگی محصول و افت کیفیت آن می‌شود (Murugan, 2009).

پژوهش حاضر باهدف جداسازی باکتری‌های ایجادکنندهٔ طعم تلخی در خامه‌های پاستوریزه، شناسایی مولکولی باکتری‌ها و مطالعهٔ آن‌ها در ایجاد تغییر طعم خامه انجام گرفت.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری از شیر و خامه قبل از پاستوریزاسیون

نمونه‌برداری به صورت مقطعی از اردیبهشت تا مهر ماه سال ۱۳۹۱ از کارخانجات وابسته به صنایع لبنی ایران انجام گرفت. به‌منظور نمونه‌برداری از شیر خام و خامه قبل از مرحلهٔ پاستوریزاسیون، محل خروج شیر و خامه از تانک با استفاده از شعلهٔ چراغ‌الکلی کاملاً سترون شد و ۵۰ میلی‌لیتر از نمونهٔ شیر و ۵۰ گرم از نمونهٔ خامه به شیشه‌های سترون انتقال یافت و برای انجام آزمایش‌های شیمیایی و میکروبی بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت.

نمونه‌برداری از خامه بعد از پاستوریزاسیون

در مرحلهٔ بعد، نمونه‌برداری از خامه بعد از اعمال فرایند حرارتی و پاستوریزاسیون با سه تکرار انجام گرفت. در هر بار نمونه‌گیری تعداد ۱۲ بستهٔ ۲۰۰ گرمی از خامه‌های پاستوریزه برای انجام آزمایش‌های شیمیایی و میکروبی

Archive of SID
www.SID.ir

بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت و ۶ بسته از آن در ۴ درجهٔ سلسیوس و ۶ بسته دیگر در ۱۵ درجهٔ سلسیوس به مدت یازده روز گرم‌خانه گذاری شد.

آزمایش‌های شیمیایی و میکروبی

بر روی نمونه‌های شیر خام و خامه قبل و بعد از مرحلهٔ پاستوریزاسیون در روزهای اول، سوم، پنجم، هفتم، نهم، و یازدهم آزمایش‌های شیمیایی تعیین اسیدیته و pH و آزمایش‌های میکروبی شامل شمارش تعداد کل میکروارگانیسم‌ها، تعداد باکتری‌های سرمادوست، تعداد باکتری‌های کلی‌فرم، تعداد باکتری‌های مقاوم به حرارت و تعداد باکتری‌های اسپوردار با سه تکرار انجام شد.

برای تعیین pH، از دستگاه pH متر (Crison GLP 21, Spain) استفاده شد به این منظور نمونه‌های خامه با دمای ۲۰ درجهٔ سلسیوس به بشر ۳۰ میلی‌لیتری منتقل شد و الکترود دستگاه به‌طور کامل در داخل نمونه قرار داده شد. پس از حدود ۴۵ ثانیه عدد ثبت‌شده با دستگاه pH متر، یادداشت گردید.

برای بررسی اسیدیته، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از نمونهٔ خامه در بشر ریخته شد و به همان مقدار آب مقطر اضافه شد. سپس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فنل فتالئین به آن افزوده و به‌وسیله هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال عیار سنجی شد. این عمل، تا ظهور رنگ صورتی کم‌رنگ و ثبوت رنگ به مدت ۵ ثانیه ادامه یافت و مقدار اسیدیته محاسبه گردید (Varga, 2007).

شمارش باکتری‌های مزوفیل

جهت شمارش باکتری‌های مزوفیل از روش مرسوم Pour plate استفاده شد. برای این منظور، از نمونه‌های خامه رقت‌های متوالی (Serial dilutions) تهیه شد و از هریک از رقت‌های تهیه‌شده مقدار یک میلی‌لیتر به پلیت‌های سترون انتقال یافت. سپس مقدار۲۰-۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت پلیت کانت آگار[2] (Merck, Germany) سترون حاوی شیر فاقد چربی با دمای ۴۰ درجهٔ سلسیوس به هر پلیت اضافه شد و بعد از جامد شدن محیط، پلیت‌ها در ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرم‌خانه گذاری گردیدند. پس از این مدت، تعداد کل کلنی‌ها با استفاده از دستگاه کلنی شمار (Colony counter BZG 40, Germany) شمارش گردید (Fernandes, 2009).

شمارش باکتری‌های مقاوم به حرارت

برای بررسی و شمارش باکتری‌های مقاوم به حرارت، از روش شوک حرارتی استفاده شد. برای این منظور، ابتدا ۱۰ میلی-لیتر از نمونه‌های خامه به فلاسک‌های ارلن‌مایر سترون انتقال یافت و به مدت ۳۵ دقیقه در حمام آب گرم (بن-ماری) در ۶۳ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد سپس، فلاسک-های ارلن‌مایر حاوی نمونه بلافاصله با استفاده از آب در دمای ۲۰ درجهٔ سلسیوس تحت شوک سرمایی قرار داده شد. شمارش باکتری‌های مقاوم به حرارت، مطابق با روش استاندارد Pour plate انجام گرفت (Fernandes, 2009).

شمارش باکتری‌های سایکروفیل (سرمادوست)

شمارش باکتری‌های سرمادوست نیز با روش استاندارد Pour plate انجام گرفت. با این تفاوت که پلیت‌ها در دمای ۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۰ روز در گرم‌خانه یخچال‌دار قرار داده شدند (Fernandes, 2009).

شمارش کلی‌فرم‌ها

به‌منظور شمارش کلی‌فرم‌های موجود در خامه، از محیط کشت ویولت رد بایل آگار[3] (Merck, Germany) و روش استاندارد Pour plate استفاده شد. در این روش، از رقت‌های متوالی تهیه‌شده، مقدار یک میلی‌لیتر در هر پلیت کشت داده شد و در ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری و نهایتاً شمارش گردید (Fernandes, 2009).

شمارش باکتری‌های اسپوردار هوازی

برای این منظور، ابتدا نمونه‌ها در فلاسک ارلن‌مایر سترون به مدت ۱۲ دقیقه در حمام آب گرم در ۸۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند و بلافاصله در ظرف حاوی آب و یخ سرد گردیدند. سپس بقیه مراحل مطابق روش استاندارد Pour

[2] Plate count agar (PCA)

[3] Violet Red Bile Agar (VRBA)

Archive of SID
www.SID.ir

plate انجام گرفت (Fernandes, 2009).

ارزیابی حسی خامه ازنظر تغییر طعم

خامه‌هایی که در ۱۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند پس از گذشت چند روز ازنظر تغییر طعم و ایجاد تلخی بررسی شدند. این ارزیابی توسط سه ارزیاب متخصص و آموزش‌دیده انجام و تأیید شد. پس از تأیید تلخی، آزمون‌های شیمیایی و میکروبی مطابق آنچه گفته شد، انجام گرفت.

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های عامل تلخی

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های عامل تلخی متعاقب انجام آزمون‌های میکروبی از نمونه‌های خامه انجام شد. باکتری‌های مزوفیل، مقاوم به حرارت، سرمادوست، کلی‌فرم و اسپوردارهای هوازی با استفاده از روش استاندارد کشت خطی روی محیط مغذی و آبگوشت عصاره مغز و قلب[4] (Merck, Germany) جداسازی و خالص‌سازی شد و کلنی‌های باکتری‌ها ازلحاظ میکروسکوپی و ماکروسکوپی بررسی گردیدند (Fernandes, 2009).

بررسی تأثیر تلقیح باکتری‌ها در تغییر طعم خامه

برای تعیین غلظت استاندارد باکتری‌های تلقیح شده به خامه، از روش استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد. برای بررسی اثر باکتری‌ها در ایجاد تغییر طعم در خامه پاستوریزه، از کلنی‌های خالص باکتریایی، سوسپانسیون تهیه شد. برای تهیه سوسپانسیون، از کلنی‌های خالص باکتریایی به ۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون انتقال یافت و بعد از مخلوط کردن با دستگاه ورتکس (IKA VORTEX Genius 3, China) با محلول استاندارد نیم مک‌فارلند مقایسه و یکنواخت‌سازی شد. سپس با استفاده از سرنگ سترون مقدار ۲ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به خامه‌های ۲۰۰ گرمی در شرایط سترون با ۵ تکرار تلقیح شد و در ۲۰ درجهٔ سلسیوس در گرم‌خانه قرار داده شد. تغییر طعم نمونه‌های خامه بعد از گذشت سه روز از تلقیح باکتری‌ها، توسط افراد متخصص و آموزش‌دیده مورد ارزیابی حسی قرار گرفت (Montanhini *et al.*, 2013).

بررسی اثر تلقیح ترکیبی باکتری‌ها در تغییر طعم خامه

برای این منظور، از هر باکتری مطابق روش استاندارد نیم مک فارلند سوسپانسیون تهیه شد. برای بررسی اثر دو باکتری از هر سوسپانسیون به میزان ۱ میلی‌لیتر و برای بررسی اثر سه یا چهار باکتری از هر سوسپانسیون به میزان نیم میلی‌لیتر به خامه‌ها تلقیح شد و از روز سوم بعد از تلقیح نمونه‌ها، ازنظرحسی ارزیابی شدند (Montanhini *et al.*, 2013).

تحلیل آماری

پس از جمع‌آوری اطلاعات، داده‌های حاصل توسط آزمون تی (T-test) دوطرفه و همچنین آزمایش فاکتوریل که عامل دما در دو سطح ۴ و ۱۵ درجهٔ سلسیوس و عامل دیگر (روزهای آزمایش) در شش سطح که روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، و ۱۱ بود در قالب طرح کاملاً تصادفی توسط نرم‌افزار آماری SAS 9.2 تجزیه و تحلیل گردید.

شناسایی باکتری‌ها و تعیین هویت آن‌ها

جدایه‌های باکتریایی ابتدا بر اساس آزمایش رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، اکسیداز، احیای نیترات، مصرف سیترات، مصرف منابع قندی مانیتول، آرابینوز، گلوکز، گزیلوز، TSI[5]، SIM[6]، رشد در شرایط بی‌هوازی، رشد در محیط نشاسته آگار، رشد روی محیط باسیلوس سرئوس سلکتیو آگار[7] (Merck, Germany) انجام گرفت. نهایتاً با استفاده از روش مولکولی تکثیر و تعیین توالی قطعه 16S rRNA تعیین هویت شدند (Whitman *et al.*, 2012).

استخراج DNA از باکتری‌ها و تکثیر قطعهٔ 16S rRNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

استخراج DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن (Sinnagen, Korea) انجام گرفت. تکثیر قطعهٔ 16S rRNA باکتری‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای (F: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', R: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') در دستگاه ترمال سایکلر (Peqlab, UK) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی، در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل

[4] Brain Heart Infusion Agar

[5] Triple Sugar Iron

[6] Sulfide, Indole, Motility

[7] Bacillus cereus Selective Agar

Archive of SID
www.SID.ir

واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. قطعهٔ تکثیرشده جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (MacroGen, Korea) ارسال گردید (Sambrook et al., 2011).

ترسیم درخت فیلوژنتیکی جدایه‌ها جهت تعیین قرابت ژنتیکی

پس از تعیین ترادف قطعهٔ ژنی 16S rRNA جدایه‌ها و تعیین ترادف‌های به دست آمده با ترادف‌های معتبر با استفاده از نرم‌افزار بلاست وب‌سایت NCBI[8]، به‌منظور تعیین قرابت ژنتیکی جدایه‌ها، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار PHYLIP 3.5 و نرم‌افزار MEGA 6 و روش خوشه‌بندی بیوانفورماتیکی (Neighbour-joining)، ترسیم گشت (Eisen and Fraser, 2003).

نتایج

آنالیز مقایسه‌ای تعداد کل باکتری‌ها، کلی‌فرم‌ها، باکتری‌های مقاوم به حرارت، باکتری‌های اسپوردار و باکتری‌های سرمادوست موجود در شیرخام و خامه، قبل از مرحلهٔ پاستوریزاسیون در جدول ۱ آورده شده است. با توجه به اینکه میانگین تعداد کل باکتری‌های موجود در خامهٔ غیرپاستوریزه نسبت به شیر خام کمتر است ولی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و میزان آلودگی در هر دو یکسان بود. بنابراین فرض H0 مبنی بر عدم تفاوت از نظر میزان آلودگی، قبول و فرض خلاف آن (H1) مبنی بر تفاوت از نظر تعداد باکتری، رد گردید. از نظر تعداد کلی‌فرم‌ها بین شیر خام و خامهٔ غیرپاستوریزه در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد و با توجه به میانگین می‌توان نتیجه گرفت که تعداد کلی‌فرم‌ها در خامهٔ غیرپاستوریزه کمتر از شیر خام بود. بنابراین فرض H1 مبنی بر وجود تفاوت در تعداد باکتری قابل قبول بود. با توجه به اینکه میانگین تعداد باکتری‌های مقاوم به حرارت در خامهٔ غیرپاستوریزه کمتر از شیر خام بود ولی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده و میزان آلودگی در هر دو نمونه یکسان بود. بنابراین فرض H0 دال بر عدم تفاوت ازنظر میزان آلودگی، قبول گردید. با توجه به اینکه میانگین تعداد باکتری‌های اسپوردار در خامهٔ غیرپاستوریزه نسبت به شیر خام بیشتر بود ولی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و میزان آلودگی در هر دو نمونه یکسان بود. بنابراین فرض H0 مبنی بر عدم تفاوت ازنظر میزان آلودگی، قبول گردید. با توجه به میانگین تعداد باکتری‌های سرمادوست بین شیر خام و خامهٔ غیرپاستوریزه، تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت و میزان آلودگی در هر دو یکسان بود. بنابراین فرض H0 مبنی بر عدم تفاوت ازنظر میزان آلودگی، قبول گردید.

مقایسه میزان pH و اسیدیته در شیر خام و خامه، قبل از مرحلهٔ پاستوریزاسیون در جدول ۲ نشان داده‌شده است. از نظر pH بین شیر خام و خامهٔ غیرپاستوریزه در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد و با توجه به میانگین و نمودار می‌توان نتیجه گرفت که pH در خامهٔ استحصال‌شده از شیر خام کمتر بود. یکی از عوامل این تغییر، طولانی شدن زمان حدفاصل دریافت شیر خام تا مرحله تولید خامه بود که سبب کاهش pH شده است. بنابراین فرض H1 قبول گردید. از نظر اسیدیته بین شیر خام و خامهٔ غیرپاستوریزه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و اسیدیتهٔ هر دو یکسان بود. بنابراین فرض H0 قبول گردید.

بررسی آماری اثر زمان (روز) در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس بر تعداد کل باکتری‌ها در خامهٔ پاستوریزه در نمودار ۱ آورده شده است. اطلاعات نمودار ۱ نشان می‌دهد که بین اثر زمان (روز) و تعداد کل باکتری‌ها در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و با گذشت زمان، تعداد کل باکتری‌ها افزایش یافته، بطوریکه بیشترین تعداد کل باکتری‌ها در روز یازدهم مشاهده شد. بررسی آماری اثر زمان (روز) در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس بر تعداد کلی‌فرم‌ها، باکتری‌های مقاوم به حرارت، باکتری‌های اسپوردار و باکتری‌های سرمادوست در خامهٔ پاستوریزه در نمودار ۲

[8] http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Archive of SID
www.SID.ir

آورده شده است. اطلاعات نمودار ۲ نشان می‌دهد که بین اثر زمان (روز) و تعداد کلی‌فرم‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و با توجه به این‌که در روزهای هفتم و نهم بر تعداد کلی‌فرم‌ها در خامه افزوده‌شده بود ولی اختلاف معناداری مشاهده نشد. بین اثر زمان (روز) و تعداد باکتری‌های مقاوم به حرارت در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و با گذشت زمان بر تعداد باکتری‌های مقاوم به حرارت افزوده شد. با این حال، اختلاف معناداری مشاهده نشد. بین اثر زمان (روز) و باکتری‌های اسپوردار در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و با گذشت زمان به میزان اندکی بر تعداد باکتری‌های اسپوردار افزوده شد و اختلاف معناداری مشاهده نشد. بین اثر زمان (روز) و تعداد باکتری‌های سرمادوست در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و با گذشت زمان تا روز هفتم هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نشده و در روز نهم و یازدهم تعداد باکتری‌ها به میزان کمی افزایش یافت. با این حال اختلاف معنی‌دار نبود.

جدول ۱- بررسی تعداد کل باکتری‌ها، کلی‌فرم‌ها، باکتری‌های مقاوم به حرارت، باکتری‌های اسپوردار و باکتری‌های سرمادوست موجود در شیرخام و خامه، قبل از مرحلهٔ پاستوریزاسیون توسط آزمون T

تعداد باکتری‌ها	آزمون T	انحراف استاندارد	انحراف معیار	میانگین	درجه آزادی	متغیر
کل باکتری‌ها	۰/۹۲۲ NS	۱/۲۶۳۳	۸/۶۴۴۹	۲۳۰۰۰ *	۱۰	شیر خام
		۲/۲۴۷۱	۲/۶۰۵۳	۱۹۴۱۷ *		خامه قبل از پاستوریزاسیون
کلی‌فرم‌ها	۳/۰۰۸ S	۳۲/۷۰۲	۸۰/۱۰۴	۴۹۱/۶۷ *	۱۰	شیر خام
		۴۹/۴۴۱	۱۲۱/۱۱	۳۱۳/۳۳ *		خامه قبل از پاستوریزاسیون
باکتری‌های مقاوم به حرارت	۰/۹۰۶ NS	۱۱۸/۰۱۵	۲۸۹/۴	۱۰۲۵ *	۱۰	شیر خام
		۲۶۹/۷	۶۶۰/۶۲	۷۵۸/۳۳ *		خامه قبل از پاستوریزاسیون
باکتری‌های اسپوردار	۰/۱۸۷ NS	۳۰/۹۵۷	۷۵/۸۲۹	۳۷۵ *	۱۰	شیر خام
		۱۲۹/۷۴	۳۱۷/۸	۴۰۰ *		خامه قبل از پاستوریزاسیون
باکتری‌های سرمادوست	۰/۶۹۲ NS	۲۰۹/۶۶	۵۱۳/۵۷	۱۴۲۵ *	۱۰	شیر خام
		۹۱/۸۹۴	۲۳۵/۰۹	۱۲۶۶/۷ *		خامه قبل از پاستوریزاسیون

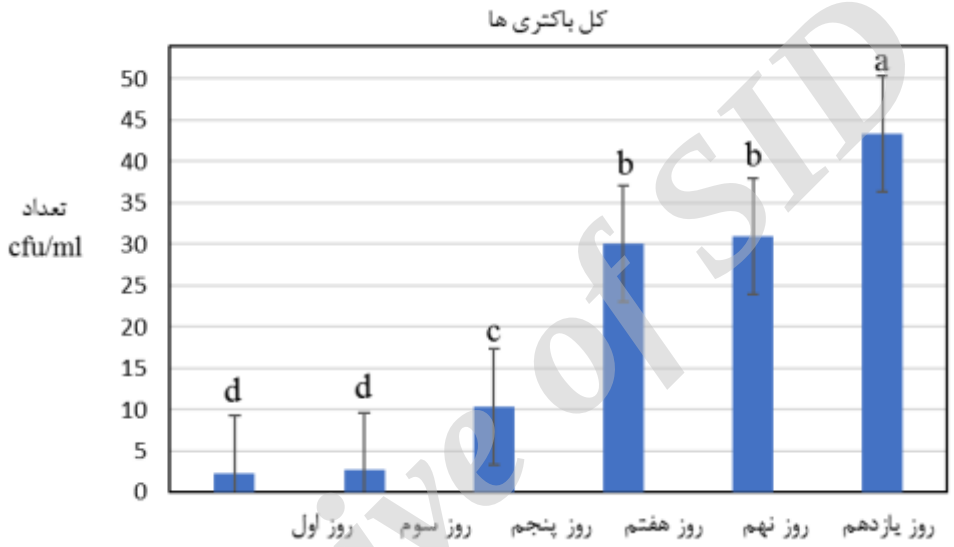
NS غیر معنی‌دار، S معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد، * واحد بر اساس (cfu/ml)

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه میزان pH و اسیدیته در شیر خام و خامه، قبل از پاستوریزاسیون توسط آزمون T

	آزمون T	انحراف استاندارد	انحراف معیار	میانگین	درجه آزادی	متغیر
pH	۴/۰۲۱۷ S	۰/۰۱۴۵	۰/۰۲۵۲	۶/۶۸۶۷	۴	شیر خام
		۰/۰۳۳۳	۰/۰۵۷۷	۶/۵۳۳۳		خامه قبل از پاستوریزاسیون
اسیدیته	۰/۰۰۰۱ NS	۰/۶۶۶۷	۱/۱۵۴۷	۱۴/۶۶۷	۴	شیر خام
		۰/۳۳۳۳	۰/۵۷۷۴	۱۴/۶۶۷		خامه قبل از پاستوریزاسیون

S معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد، NS غیر معنی‌دار

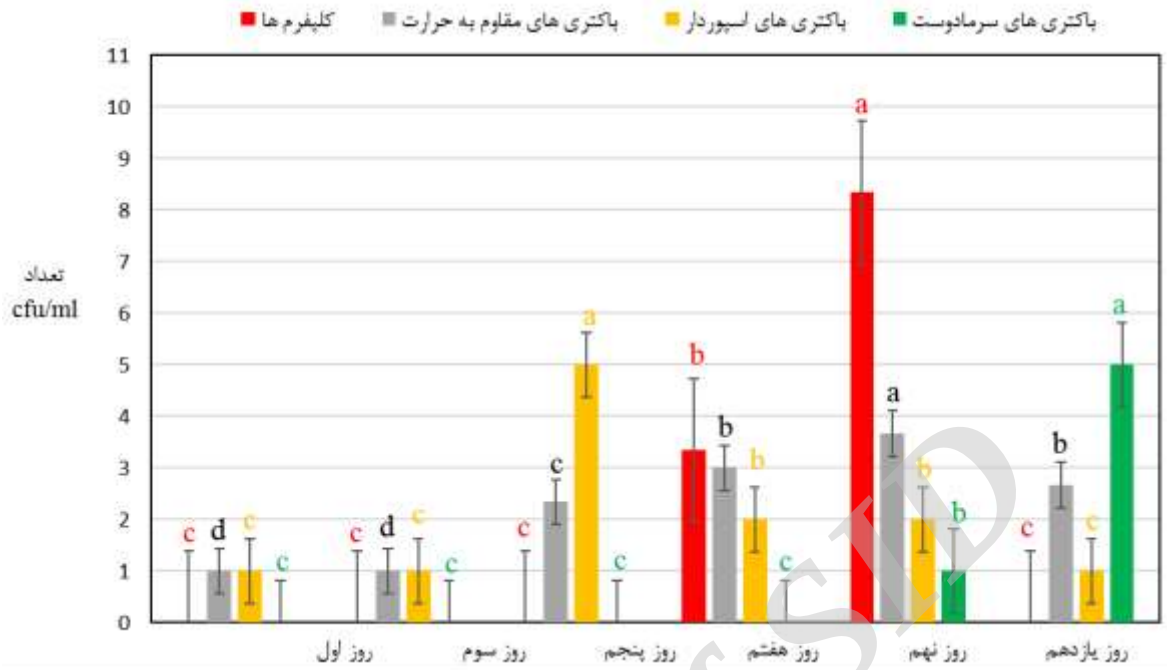


نمودار ۱- اثر زمان (روز) در دمای ۴ درجه سلسیوس بر تعداد کل باکتری‌ها در خامه پاستوریزه

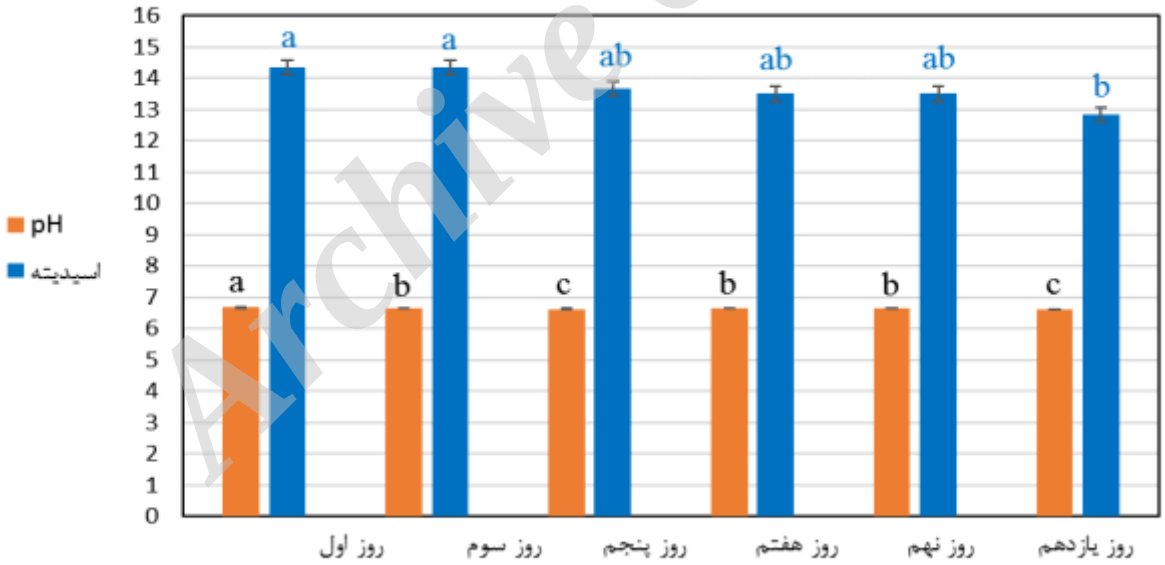
بررسی آماری اثر زمان بر میزان pH و اسیدیته خامهٔ پاستوریزه در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس در نمودار ۳ آورده شده است. اطلاعات نمودار ۳ نشان می‌دهد که بین اثر زمان (روز) و میزان pH در دمای ۴ درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و با گذشت زمان در روزهای پنجم و یازدهم کاهش جزئی pH دیده شد ولی اختلاف معنی‌دار نبود. بین اثر زمان (روز) و میزان اسیدیته در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد و با گذشت زمان در روز یازدهم کمترین میزان اسیدیته مشاهده شد.

بررسی آماری اثر زمان و دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس بر تعداد کل باکتری در خامهٔ پاستوریزه در نمودار ۴ آورده شده است. اطلاعات نمودار ۴ نشان می‌دهد که بین اثر زمان (روز) و تعداد کل باکتری‌ها در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد و با گذشت زمان بر تعداد کل باکتری‌ها افزوده شد، بطوریکه در روز یازدهم بیشترین تعداد باکتری‌ها مشاهده گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

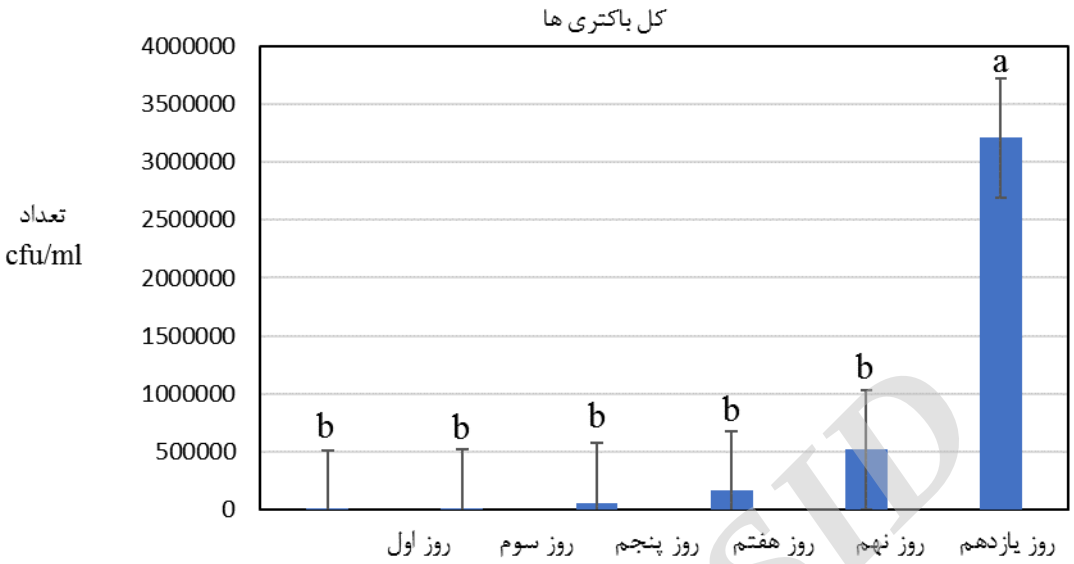


نمودار ۲- اثر زمان (روز) در دمای ۴ درجه سلسیوس بر تعداد کلی‌فرم‌ها، باکتری‌های مقاوم به حرارت، باکتری‌های اسپوردار و باکتری‌های سرمادوست در خامه پاستوریزه



نمودار ۳- اثر زمان در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس بر میزان pH و اسیدیته خامه پاستوریزه

Archive of SID
www.SID.ir

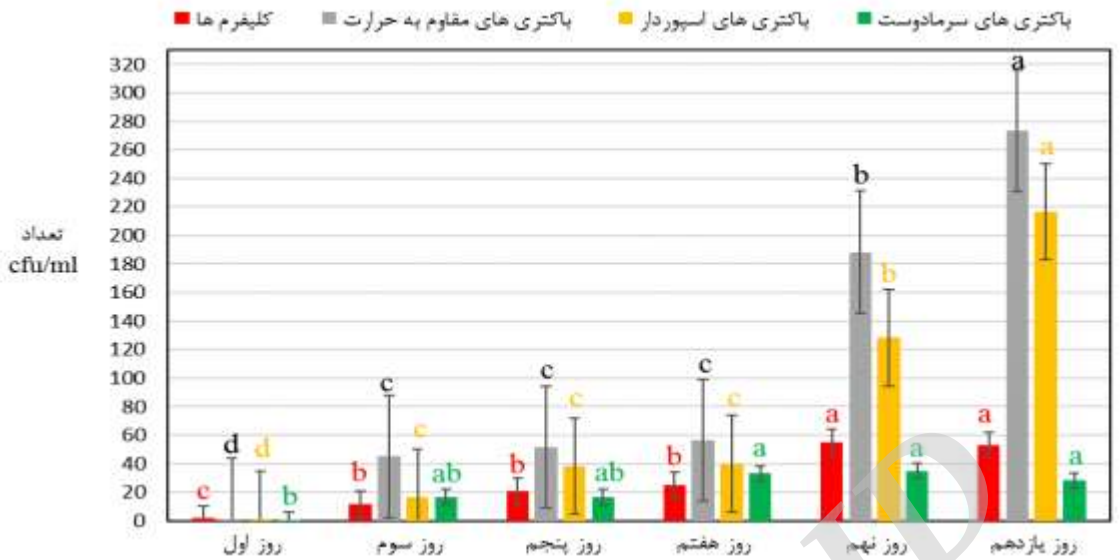


نمودار ۴- اثر زمان در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس بر تعداد کل باکتری‌ها در خامه پاستوریزه

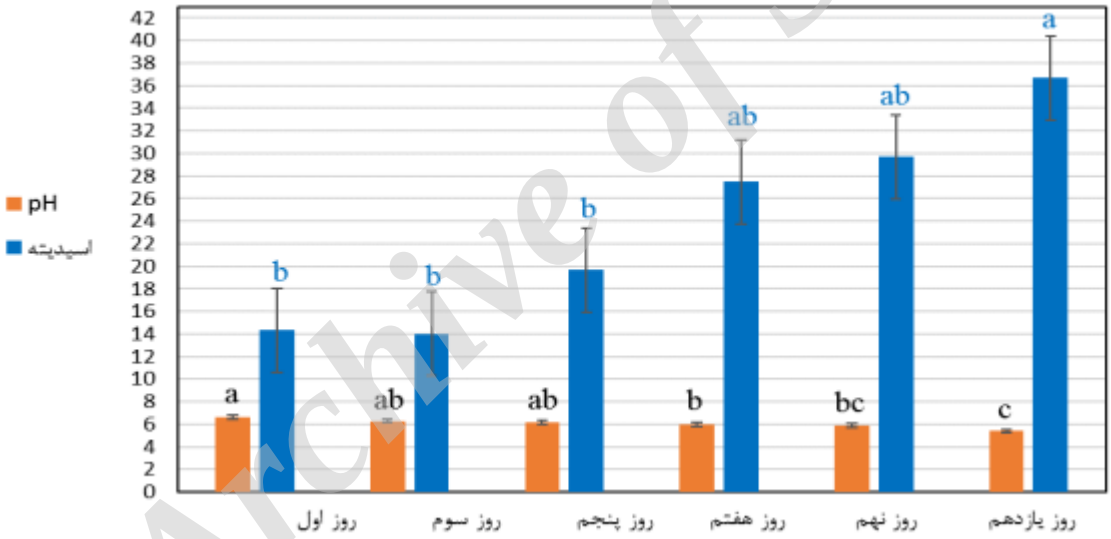
بررسی آماری اثر زمان و دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس بر تعداد کلی‌فرم‌ها، باکتری‌های مقاوم به حرارت، باکتری‌های اسپوردار و باکتری‌های سرمادوست در خامهٔ پاستوریزه در نمودار ۵ آورده شده است. اطلاعات نمودار ۵ نشان می‌دهد که بین اثر زمان (روز) و تعداد کلی‌فرم‌ها در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و با وجود افزایش تعداد کلی‌فرم‌ها در روزهای نهم و یازدهم اختلاف معناداری مشاهده نشد. بین اثر زمان (روز) و تعداد باکتری‌های مقاوم به حرارت در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد و با گذشت زمان بر تعداد باکتری‌های مقاوم به حرارت افزوده شد بطوریکه بیشترین تعداد باکتری‌ها در روز یازدهم مشاهده شد. بین اثر زمان (روز) و باکتری‌های اسپوردار در دمای ۱۵ درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد و با گذشت زمان بر تعداد باکتری‌های اسپوردار افزوده شد، بطوریکه در روز یازدهم بیشترین تعداد باکتری‌ها مشاهده شد. بین اثر زمان (روز) و تعداد باکتری‌های سرمادوست در دمای ۱۵ درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد و با گذشت زمان تعداد باکتری‌های سرمادوست افزایش‌یافته و در روزهای هفتم، نهم و یازدهم بیشترین تعداد باکتری مشاهده شد.

بررسی آماری اثر زمان در دمایی ۱۵ درجه سلسیوس بر میزان pH و اسیدیته خامهٔ پاستوریزه در نمودار ۶ آورده شده است. اطلاعات نمودار ۶ نشان می‌دهد که بین اثر زمان (روز) و میزان pH در دمای ۱۵ درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد و با گذشت زمان، pH کاهش یافت. بین اثر زمان (روز) و اسیدیته در دمای ۱۵ درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد و با گذشت زمان اسیدیته به‌شدت افزایش یافت.

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۵- اثر زمان در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس بر تعداد کلی‌فرم‌ها، باکتری‌های مقاوم به حرارت، باکتری‌های اسپوردار و باکتری‌های سرمادوست در خامه پاستوریزه



نمودار ۶- اثر زمان در دمای ۱۵ درجه سلسیوس بر میزان pH و اسیدیته خامه پاستوریزه

بررسی‌های میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی

از نمونه‌های خامهٔ تلخ که در دمای ۱۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند، تعداد ۹ باکتری جداسازی شد که ۲ جدایهٔ باکتری از یک جنس و گونه بودند و از بین ۷ جدایهٔ باکتری دیگر، تعداد ۲ جدایهٔ طعم تلخی و تعداد ۲ جدایهٔ نیز طعم ترشیدگی در خامه ایجاد کردند. تعداد ۳ جدایه نیز تغییردر طعم خامه ایجاد نکردند. جدایه‌های باکتری عامل تلخی (جدایه‌های D و F) در خامه ازنظر رنگ‌آمیزی گرم، مثبت و ازنظر آرایش میکروسکوپی میله‌ای شکل بودند.

تأثیر تلقیح جدایه‌های باکتری به خامه و ارزیابی حسی آن

نتیجهٔ تلقیح هر یک از جدایه‌های باکتری به خامهٔ سترون و نتیجهٔ ارزیابی حسی خامه بعد از گذشت ۳ روز از تلقیح در جدول ۳ آورده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- نتایج حاصل از تلقیح یک نوع باکتری به خامهٔ سترون

باکتری	نتیجه ارزیابی حسی
باکتری D	تلخی تائید شد
باکتری F	تلخی تائید شد
باکتری H	تغییر در طعم ایجاد نشد
باکتری K	تغییر در طعم ایجاد نشد
باکتری S	تغییر در طعم ایجاد نشد
باکتری B	طعم ترشی تائید شد
باکتری M	طعم ترشی تائید شد

دو جدایهٔ باکتری که در خامه‌های سترون طعم تلخی ایجاد کرده بودند انتخاب شدند و رقت ۱:۲ از این جدایه‌ها تهیه شد و در شرایط سترون به خامه‌های سترون تلقیح شد و تلخی خامه‌های آلوده‌شده با جدایهٔ D از روز سوم مجدداً تایید شد.

تلخی خامه‌های آلوده‌شده با جدایهٔ F نیز از روز هفتم تائید شد ولی شدت تلخی ایجادشده توسط این جدایه نسبت به جدایهٔ D کمتر بود.

تأثیر تلقیح ترکیبی جدایه‌های باکتری به خامه و ارزیابی حسی آن

برای بررسی طعم غالب ایجادشده در نمونه‌های خامه، جدایه‌های باکتری به‌صورت ترکیبی به خامهٔ سترون تلقیح و مورد ارزیابی حسی قرار گرفت (جدول ۴). در تمام نمونه‌هایی که با جدایهٔ D و F آلوده‌شده بودند حتی در ترکیب با جدایه‌های عامل طعم ترشی، طعم تلخی بسیار محسوس بود.

جدول ۴- نتایج حاصل از تلقیح ترکیبی باکتری‌ها به خامهٔ سترون

ترکیب جدایه‌های باکتری	نتیجه ارزیابی حسی
جدایه‌های D, F	طعم تلخی تائید شد
جدایه‌های B, M	طعم ترشی تائید شد
جدایه‌های S, K	تغییر در طعم ایجاد نشد
جدایه‌های B, M, D, F	طعم تلخی تائید شد
جدایه‌های S, K, D, F, H	طعم تلخی تائید شد

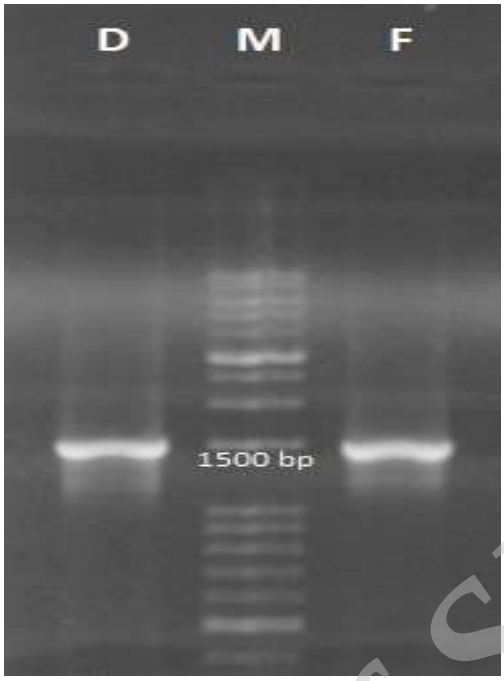
شناسایی مولکولی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های باکتری

قطعهٔ 16S rRNA جدایه‌های باکتری عامل ایجاد تلخی در خامه (جدایه‌های D و F) با روش PCR تکثیر یافت و باند در محدودهٔ تقریبی ۱۵۰۰ جفت‌باز را به‌درستی نشان داد (شکل ۱).

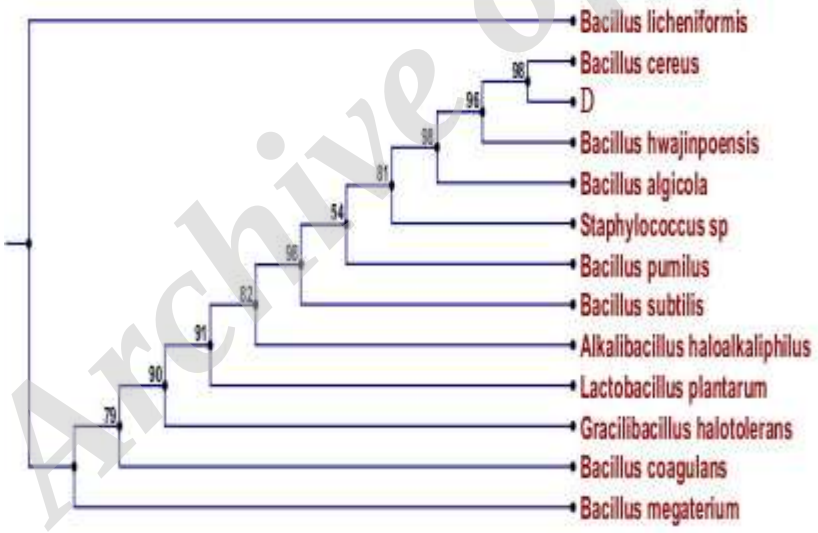
درخت فیلوژنتیکی برای جدایهٔ D (شکل ۲) و جدایهٔ F (شکل ۳) پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعهٔ 16S rRNA ترسیم شد. آنالیز بلاست نوکلئوتیدی و درخت فیلوژنتیکی، شباهت ۹۸ درصدی جدایهٔ D را با باکتری *باسیلوس سرئوس*[9] و شباهت ۱۰۰ درصدی جدایهٔ F را با باکتری *باسیلوس سوبتیلیس*[10] نشان داد. توالی نوکلئوتیدی قطعهٔ 16S rRNA جدایهٔ F در بانک اطلاعاتی NCBI[11] به شماره دسترسی KJ207080.1 ثبت گردید.

[9] *Bacillus cereus*
[10] *Bacillus subtilts*
[11] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/588483706

Archive of SID
www.SID.ir



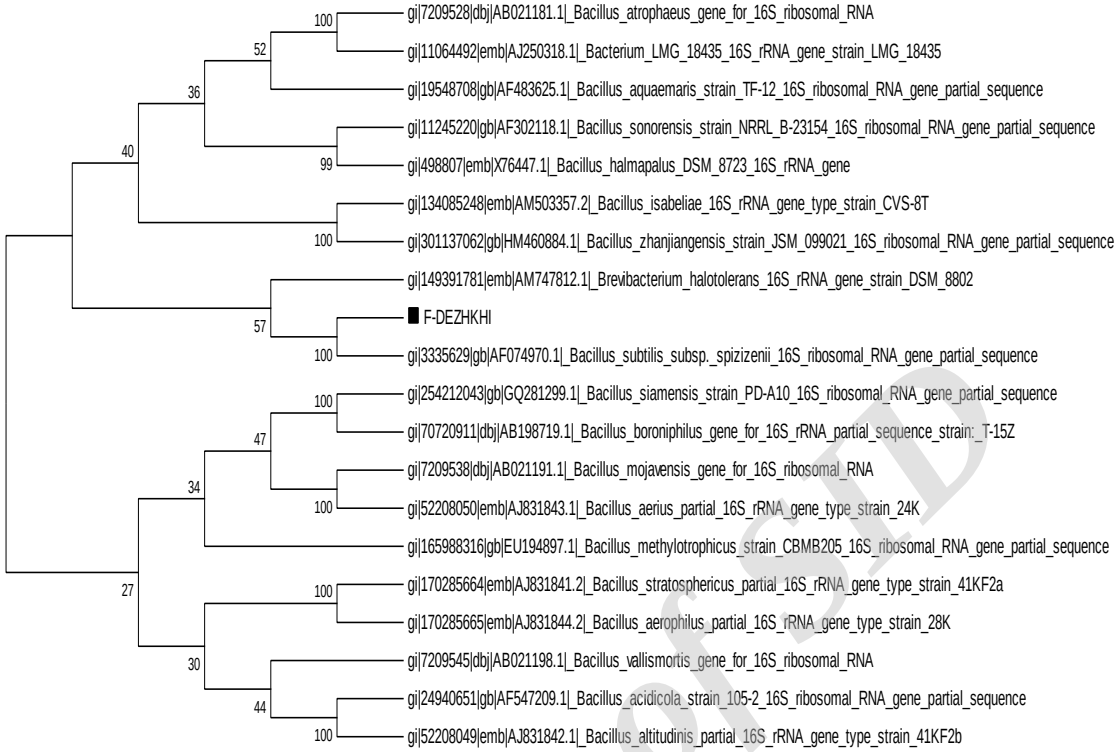
شکل ۱- ستون D: قطعهٔ 16S rRNA جدایهٔ D، ستون M: مارکر DNA (1 KB Plus DNA Ladder, SMOBiO-Dm3200)، ستون F: قطعهٔ 16S rRNA جدایهٔ F



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده برای جدایهٔ باکتری D و وضعیت تاکسونومیکی آن

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده برای جدایهٔ باکتری F و وضعیت تاکسونومیکی آن

بحث

شیر و خامه به دلیل رطوبت کافی، pH نزدیک به خنثی، و غنی بودن مواد غذایی محیط مناسبی برای رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها هستند. از طرف دیگر، بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی مانند لاکتوپراکسیداز و آگلوتنین موجود در شیر تازه دوشیده شده به دلیل تخمیر قند و تولید اسید توسط باکتری‌های معمول شیر به‌سرعت غیرفعال شده و امکان رشد میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌کنند (Al-Mazeedi *et al*., 2013).

نگهداری شیر خام به مدت طولانی قبل از فرآیند پاستوریزاسیون باعث افزایش باکتری‌های سرمادوست شده که با تولید آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز سبب نامطلوب شدن شیر و کاهش کیفیت فرآورده‌های حاصل از آن مانند خامه می‌گردند (Samet-Bali *et al*., 2013).

لمیوکس و سیمارد[12] در بررسی‌های خود نشان دادند که باکتری‌های سرمادوست شیر با تولید آنزیم‌های پروتئاز مقاوم در برابر حرارت باعث تلخی شیر و لخته شدن آن می‌شوند. مطالعات گووینداسمی-لوسی[13] و همکاران نشان داد که سرد سرد کردن شیر خام و نگه‌داری آن به مدت نسبتاً طولانی سبب انتقال پروتئاز قلیایی (پلاسمین) از فاز کلوئیدی به فاز سرمی می‌شود. بتاکازئین در دمای پایین به گاماکازئین و پروتئوز پپتون[14] هیدرولیز شده و در حضور پروتئازهای دیگر به پپتیدهای هیدروفوبیک کوچک‌تر تبدیل‌شده و طعم تلخ در شیر و فرآورده‌های حاصل از آن ایجاد می‌کند (Govindasamy-Lucey *et al*., 2006).

پاستوریزاسیون قادر به از بین بردن میکروارگانیسم‌های بیماریزای موجود در شیر است اما گونه‌های باسیلوس و دیگر میکروارگانیسم‌هایی که می‌توانند اندوسپورهای مقاوم به حرارت تولید کنند و در طی پاستوریزاسیون باقی می‌مانند. باسیلوس‌ها نیز در شیر و فرآورده‌های آن ضمن تولید

[12] Lemieux & Simard

[13] Govindasamy-Lucey

[14] Proteose peptone

Archive of SID
www.SID.ir

اسپورهای مقاوم به حرارت، قادر به تولید آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز هستند (Janstova *et al*., 2006).

بهترین روش برای کنترل فساد شیر توسط باکتری‌های اسپورزا کاهش تعداد آن‌ها در شیر خام است. دستیابی به این هدف با رعایت موارد بهداشتی نظیر شستشو و خشک‌کردن دام قبل از دوشش و استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده امکان‌پذیر است.

دمای نگه‌داری شیر یک عامل مهم و تأثیرگذار در ماندگاری و نوع میکروارگانیسم‌های محصول است. در شیر پاستوریزه در دمای یخچال عامل اصلی فساد، *سودوموناس* است (Samet-Bali *et al*., 2013) درحالی‌که در دمای بالای ۱۰ درجهٔ سلسیوس، گونه‌های انتروباکتریاسه و باکتری‌های گرم مثبت مانند باسیلوس‌ها غالب هستند. در دمای پایین‌تر از ۶ درجهٔ سلسیوس گونه‌های باسیلوس سرمادوست نقش مهمی را در کاهش ماندگاری شیر پاستوریزه دارند. گونه‌های سرمادوست جنس *باسیلوس* قادر به رشد در شیر و فرآورده-های شیری نگه‌داری شده در یخچال و تولید پروتئاز هستند. در صورت تشکیل اسپور توسط گونه‌های *باسیلوس* زمان تکثیر باکتری در یخچال به تأخیر افتاده و فساد ناشی از آن تا تبدیل اسپور به سلول رویشی نیز روند آهسته خواهد داشت و معمولاً دو هفته بعد از نگهداری در یخچال فساد ایجاد می‌شود (Ledenbach and Marshall, 2009).

از دیگر عواملی که در کیفیت فرآوردهای حاصل از شیر تأثیرگذار است، آلودگی ثانویهٔ فرآورده است. آلودگی ثانویه در بخش سرد کردن محصول، محل نگه‌داری، بسته‌بندی نهایی محصول در اثر شرایط نامناسب بهداشتی ایجاد می‌شود. حضور کلی‌فرم‌ها به‌عنوان شاخص آلودگی محصول بوده و نشان‌دهندهٔ آلودگی ثانویه آن طی فرآوری است. آلودگی پس از فرآیند غالباً توسط میکروارگانیسم‌های سرمادوست ایجاد می‌شود که با تولید آنزیم‌های متعدد باعث نامطلوب شدن طعم محصول می‌گردند (Mahari and Gashe, 1990).

در این پژوهش برای اولین بار بر روی شیر خام و خامهٔ پاستوریزه در دو دمای ۴ و ۱۵ درجهٔ سلسیوس آزمایش‌های میکروبی و شیمیایی انجام شد و باکتری‌های تلخ کننده از خامه‌های پاستوریزه و نگه‌داری شده در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس جداسازی و نقش آن‌ها در ایجاد تلخی بررسی گردید.

با بررسی شیر خام و خامه استحصالی از آن قبل از ورود به پاستوریزاتور مشخص شد که بین شیر خام و خامهٔ استحصالی از آن در تعداد کل باکتری‌ها، باکتری‌های مقاوم به حرارت، باکتری‌های اسپوردار، باکتری‌های سرمادوست و اسیدیته اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. ولی در تعداد کلی‌فرم‌ها و pH اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد و تعداد کلی‌فرم‌ها و اسیدیته در خامه استحصالی در مقایسه با شیر خام کمتر بود.

بررسی‌های انجام‌گرفته در خامهٔ پاستوریزه در دو دمای ۴ و ۱۵ درجهٔ سلسیوس نشان داد که در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس بین زمان (روز) و میزان اسیدیته اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود داشت و در روز یازدهم اسیدیته کمتر از روزهای دیگر بود ولی در طعم و شکل ظاهری خامه حتی بعد از گذشتن تاریخ‌مصرف آن تغییری ایجاد نشده بود و این نشان‌دهنده کیفیت بالای تولید بود.

در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس بین زمان (روز) و تعداد کل باکتری‌های خامهٔ پاستوریزه، تعداد باکتری‌های سرمادوست و اسیدیته اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد و با گذشت زمان تعداد باکتری‌ها افزایش یافت. بین زمان و تعداد باکتری‌های مقاوم به حرارت، باکتری‌های اسپوردار و pH اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد دیده شد و با گذشت زمان تعداد باکتری‌ها افزایش یافت ولی در تعداد کلی‌فرم‌ها اختلاف معنی‌داری دیده نشد. مطالعه‌ای که لانگولد[15] و کوپروس[16] (Langeveld and Cuperus, 1980) در مورد وضعیت میکروبی و شیمیایی (pH و اسیدیته) شیر و فرآورده‌های آن انجام دادند مشخص شد که با نگه‌داری محصول در مدت ۹ تا ۳۰ روز در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس، نمونه‌ها ابتدا افزایش جزئی pH و با گذشت زمان کاهش تدریجی pH را نشان دادند درحالی‌که در مطالعهٔ ما در ۴ درجهٔ سلسیوس تا روز یازدهم به میزان بسیار اندکی pH کاهش یافت بطوریکه کاهش pH ازلحاظ

[15] Langeveld
[16] Cuperus

Archive of SID
www.SID.ir

آماری معنی‌دار نبود.

نگه‌داری نمونه‌ها در دمای ۲۲ درجهٔ سلسیوس مشخص کرد که اغلب نمونه‌ها با گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، افت شدید pH داشته درحالی‌که در مطالعهٔ ما در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس از روز اول تا روز یازدهم روند آهسته‌ای در کاهش pH دیده شد.

نتایج تعیین اسیدیته در مطالعهٔ لانگولد و کوپروس نشان داد که در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس در همه نمونه‌ها افزایش تدریجی اسیدیته وجود داشت و در روزهای آخر نگه‌داری نمونه‌ها، اسیدیته با سرعت بیشتری افزایش یافت درحالی‌که در مطالعهٔ ما در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس کاهش اسیدیته تا روز یازدهم مشاهده شد.

در مطالعهٔ اخیر در دمای ۲۲ درجهٔ سلسیوس با گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در اغلب نمونه‌ها افزایش سریع اسیدیته مشاهده شد درحالی‌که در مطالعهٔ ما در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس از روز اول تا یازدهم افزایش شدید اسیدیته مشاهده شد.

نتایج حاصل از تعیین تعداد کل باکتری‌ها در نمونه‌های خامه پاستوریزه در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس در مطالعهٔ لانگولد و کوپروس نشان داد که در روزهای نخست نگه‌داری محصول، سرعت تکثیر باکتری‌ها کند بوده اما در روزهای بعد تعداد کل باکتری‌ها به‌سرعت افزایش یافت ولی در مطالعهٔ ما در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس تا روز یازدهم تعداد کل باکتری‌ها افزایش اندک داشت.

نتایج حاصل از تعیین تعداد کل باکتری‌ها در نمونه‌ها در دمای ۲۲ درجهٔ سلسیوس در مطالعهٔ اخیر نشان داد که تعداد کل باکتری‌ها در روز نخست (۲۴ ساعت اول) بسیار سریع افزایش یافت و بعد از آن این مقدار روند نزولی داشت. درصورتی‌که در مطالعهٔ ما در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس از روز اول تا روز یازدهم تعداد کل باکتری‌ها افزایش داشته بطوریکه بیشترین تعداد باکتری‌ها در روز یازدهم مشاهده شد.

نتایج حاصل از تعیین تعداد باکتری‌های سرمادوست در نمونه‌ها در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس در مطالعهٔ اخیر نشان داد که در روزهای نخست نگه‌داری محصول در این دما باکتری یافت نشد ولی بعد از گذشت چند روز وجود باکتری اثبات گردید بطوریکه در ابتدا سرعت رشد آن‌ها کند بوده و بعد از چند روز تا روز هیجدهم، تعداد باکتری‌ها افزایش داشت، اما در مطالعهٔ ما در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس تا روز هفتم باکتری دیده نشده و در روز نهم و یازدهم به تعداد بسیار اندکی مشاهده شد.

نتایج حاصله از تعیین تعداد باکتری‌های سرمادوست در دمای ۲۲ درجهٔ سلسیوس در مطالعهٔ اخیر نشان داد که از همان روزهای نخست آزمایش تعداد این باکتری‌ها افزایش یافت که با نتیجه مطالعهٔ ما نیز در این رابطه مطابقت داشت.

نتایج حاصل از تعیین تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در دو دمای ۴ و ۲۲ درجهٔ سلسیوس در مطالعهٔ اخیر نشان داد که نمونه‌ها در این دو دما فاقد کلی‌فرم بودند. در مطالعهٔ ما نیز در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس نمونه‌ها فاقد کلی‌فرم بودند و فقط در روز هفتم و نهم تعداد بسیار اندکی کلی‌فرم دیده شد که این آلودگی احتمالاً ناشی از خط تولید و یا عدم رعایت اصول بهداشتی قبل و یا بعد از تولید بود. ازآنجایی‌که آلودگی محصول با کلی‌فرم به علت آلودگی ثانویه است، احتمال عدم وجود این باکتری‌ها در محصول سالم پیش‌بینی‌شده بود. در مطالعهٔ ما در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس نیز تعداد کلی‌فرم‌ها تا روز یازدهم افزایش داشت ولی اختلاف معنی‌دار نداشت و تعداد باکتری‌ها بسیار اندک بود.

تحقیقات فاجاردو-لیرا[17] و همکاران نشان داد که باکتری-های *سودوموناس فلورسانس*[18] M3/6 و *سودوموناس فراژی*[19] K122 به علت داشتن فعالیت پروتئازی عامل ایجاد طعم تلخی در شیر و خامهٔ نگه‌داری شده در دمای ۷ درجهٔ سلسیوس هستند (Fajardo-Lira *et al.*, 2000). درحالی‌که در مطالعهٔ ما باسیلوس‌ها (*باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتلیس*) گونه‌های غالب ایجادکنندهٔ طعم تلخی بودند. گونه‌های باسیلوس سرمادوست به دلیل توانایی بالای

[17] Fajardo-Lira
[18] *Pseudomonas fluorescens* M3/6
[19] *Pseudomonas fragi* K122

Archive of SID
www.SID.ir

رشد در فرآورده‌های شیری نگه‌داری شده در شرایط سرد و تولید پروتئازهای قوی، باکتری‌های غالب تغییردهندهٔ طعم محصول و تلخ کنندهٔ آن هستند. این مسئله ناشی از تطبیق‌پذیری بالای باسیلوس‌ها در مقایسه با دیگر باکتری‌ها جهت رشد و فعالیت در فرآورده‌های شیری است (Chen *et al*., 2004).

مازیرو مونتانهینی [20] و سانتوس برسوت[21] تأثیر پروتئازهای مترشحه از گونه‌های *باسیلوس* را بر روی تلخی خامه بررسی کردند. در این مطالعه *باسیلوس سوبتلیس* بالاترین فعالیت پروتئولیتیکی را در زمان‌های ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴ و ۳۰ ساعت از نگه‌داری خامه در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس نسبت به دیگر باسیلوس‌ها نشان داد. درحالی‌که در این پژوهش *باسیلوس سرئوس* شدت پروتئولیتیکی بیشتری نسبت به *باسیلوس سوبتلیس* نشان داد و *باسیلوس سرئوس* بعد از سه روز و *باسیلوس سوبتلیس* بعد از پنج روز باعث تلخی در خامه پاستوریزه شدند (Montanhini and Bersot, 2013).

مونتانهینی[22] و همکاران نشان دادند برخی از گونه‌های باسیلوس خصوصاً *باسیلوس سرئوس* فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی بالایی را در شیر و فرآورده‌های آن نشان می‌دهد که این میکروارگانیسم‌ها باعث هیدرولیز چربی و تولید اسیدهای چرب آزاد و تلخی محصول می‌شوند. به گفتهٔ آن‌ها، گلیسیریدهای ناقص ناشی از واکنش هیدرولیز چربی هم می‌توانند باعث بروز طعم تلخ در خامه باشند (Montanhini *et al*., 2013).

نتیجه‌گیری

این مطالعه برای نخستین بار در کشور به‌صورت تفصیلی در مورد باکتری‌های تلخ کنندهٔ خامه انجام گرفت. *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس سرئوس* باکتری‌های غالب تلخ کنندهٔ خامه پاستوریزه بودند. با توجه به زیان‌های اقتصادی ناشی از تلخ شدن خامه در صنایع شیر، پیشنهادهایی توسط نویسندگان جهت ارتقای کیفیت، سلامت محصول و جلوگیری از خسارت‌های احتمالی ارائه می‌گردد: الف) کاهش زمان نگه‌داری شیر خام در تانک‌های ذخیره تا مرحله تولید خامه ب) کاهش دمای نگه‌داری خامه در تانک قبل از مرحلهٔ پاستوریزاسیون تا زمان ورود به پاستوریزاتور ج) اعمال شرایط بهینهٔ هموژنیزاسیون و پاستوریزاسیون ازنظر دما و زمان د) رعایت کامل اصول بهداشتی برای جلوگیری از آلودگی‌های ثانویه ه) انتقال محصول به سردخانه بلافاصله پس از تولید و) رساندن زودهنگام محصول به دست مصرف‌کننده.

منابع

1. Al-Mazeedi, H.M., Gholoum, F.A. and Akbar, B.H. 2013. Microbiological status of raw and pasteurized milk in the state of Kuwait. Int J Eng Sci. 3(11): 15-19.
2. Barbano, D.M., Ma, Y., and Santos, M.V. 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. J Dairy Sci. 89: E15-E19.
3. Chen, L., Coolbear, T. and Daniel, R.M. 2004. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven Bacillus sp. isolated from milk powder production lines. Int Dairy J. 14(6): 495-504.
4. Eisen, J.A., Fraser, C.M. 2003. Phylogenomics: intersection of evolution and genomics. Sci. 300: 1706-1707.
5. Fajardo-Lira, C., Oria, M., Hayes, K.D., Nielsen, S.S. 2000. Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fres milk. J Dairy Sci. 83: 2190-2199.
6. Faye, B., and Konuspayeva, G. 2012. The sustainability challenge to the dairy sector–The growing importance of non-cattle milk production worldwide. Int Dairy J. 24(2): 50-56.
7. Fernandes, R. 2009. Microbiology Handbook-Dairy Products. 3rd ed. Leatherhead Publishing, a Division of Leatherhead Food International Ltd: Randalls Road, Leatherhead, UK, 173.
8. Goff, D. 2015. Introduction to Dairy Science-Milk Production and Biosynthesis,

[20] Maziero Montanhini
[21] Santos Bersot
[22] Montanhini

Archive of SID
www.SID.ir

processing plant in Addis Ababa, Ethiopia. J Dairy Res. 57: 233-138.

16. Montanhini, M.T.M., and Bersot, L.D.S. 2013. Evaluation of psychrotrophic behavior and lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from refrigerated dairy products. Acta Sci-Technol. 35(1): 163-167.
17. Montanhini, M.T.M., Montanhini, R.N., Pinto, J.P.N. and Bersot, L.S. 2013. Effect of temperature on the lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from dairy products. Int Food Res J. 20(3): 1417-1420.
18. Muir, D.D. 1990. The Microbiology of Heat-treated fluid milk products. Dairy Microbiology, 2nd ed. Robinson, R.K. editor. Elsevier Applied Science, London, 209-243.
19. Sambrook, J., Russell, D., and Irwa, *et al*. 2001. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
20. Samet-Bali, O., Felfoul, I., Lajnaf, R., Attia, H., and Ayadi, M.A. 2013. Study of proteolytic and lipolytic activities of Pseudomonas spp. isolated from pasteurized milk in Tunisia. J Agr Sci. 5(7): 46-50.
21. Varga, L. 2007. Microbiological quality of commercial dairy products. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Formatex Microbiology Series (1). Mendez-Vilas, A., editor. Formatex, Badajoz, Spain, 487-494.
22. Whitman, W.B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Ludwig, W. & Suzuki, K.-i. (eds., 2012). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 5, parts A and B, Springer-Verlag, New York, NY.

Dairy Science and Technology Education Series, University of Guelph, Canada. Available online at: http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html.

9. Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J.J., Bostley, A.L., Johnson, M.E., and Lucey, J.A. 2006. Standardization of milk using cold ultrafiltration retentates for the manufacture of parmesan cheese. J Dairy Sci. 87: 2789-2799.
10. Janstova, B., Vorlova, L., Drakova, M. 2006. The effect of lipolytic enzymes of Bacillus spp. on quality of UHT milk. Acta Vet Brno. 75: 427-435.
11. Langeveld, L.P.M., and Cuperus, F. 1980. The relation between temperature and growth rate in pasteurized milk of different types of bacteria which are important to the deterioration of that milk. Neth Milk Dairy J. 34(2): 106-125.
12. Ledenbach, L.H., and Marshall, R.T. 2009. Microbiological spoilage of dairy products. In: Sperber, W.H., and Doyle, M.P editors. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Springer Science+Business Media, New York, NY: 41-67.
13. Lemieux, L., and Simard, R.E. 1992. Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. Le Lait [Dairy Sci Technol]. 72(4): 335-385.
14. MA, Y., Barbano, D.M., Santos, M. 2003. Effect of CO2 addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4ºC. J Dairy Sci. 86: 1616-1631.
15. Mahari, T and Gashe, B. 1990. Survey of the microflora of raw and pasteurized milk and sources of contamination in a milk

Archive of SID
www.SID.ir

Detailed study and molecular identification of bacteria spp. causing bitter flavour in pasteurized cream

Dezhkhi H[1], Yazdansetad S[2*], Arbabsoleymani N[3], Najafpour R[4], Gheibi hayat SM[5], Faraj Tabrizi E [4]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran.
2. Young Researchers and Elite Club, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
3. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
4. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
5. Student Research Committeee, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

[*] **Corresponding author:** *sajjad.yazdansetad@gmail.com*

Received: 15April 2017 Accepted: 4 Sep 2016

Abstract

Cream enabled the growth of most microorganisms due to the adequate moisture, pH close to neutral, and nutrient rich. The major cause of bitter flavour in cream is degradation of proteins to the hydrophobic peptides by protease enzyme derived from the thermostable bacteria resistant to the pasteurization temperature. The present study was aimed to investigate and molecular identify of bacteria spp. causing bitter flavour in pasteurized cream. The pasteurized cream samples were collected, then microbiological tests such as total count of microorganisms, psychrotrophic bacteria count, coliform bacteria count, thermostable bacteria count, sporogen bacteria count and also chemical tests such as acidity and pH measurement were carried out. The tests were fulfilled with three repetitions at 4ºC and 15ºC in first, third, fifth, seventh, ninth, and eleventh days after the cream production. The isolates causing bitter flavour in creams were identified by physiological, biochemical, phylogenetical, and molecular methods. The bacterial isolates were inoculated into the pasteurized creams and assayed for changing in flavour. The two species of bacteria causing bitter flavor were isolated from the pasteurized creams. The sequencing of 16S rRNA gene of isolates indicated that they were *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. The temperature of preservation is one of the most important agents of microorganisms' activity and dairy product durability. Keeping raw milk for a long time before the pasteurization leads to increasing proteolytic bacteria resistant to the pasteurization temperature, producing protease by the organisms and finally, changing the product flavour.

Keywords: protease, bitter, cream, *Bacillus*.

Archive of SID

www.SID.ir