مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد اول، شماره سوم، پاییز ۸۸
۱-۱۸
www.ejfpp.info

ارزیابی اثر سردخانه‌گذاری بر تغییرات کیفیت شیمیایی و میکروبی قالب‌های کره بسته‌بندی شده

***فرشته تفنگ‌سازان[۱]، مرتضی خمیری[۲]، گیتی کریم[۳]، سعید حسنی[۴] و سعیده سیف‌هاشمی[۵]**

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]عضو هیأت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]عضو هیأت علمی گروه بهداشت مواد غذایی دانشگاه تهران، [۴]عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۵]مدرس دانشگاه جامع علمی‌کاربردی

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۱۲

چکیده

سردخانه‌گذاری موجب تغییرات کیفیت شیمیایی و میکروبی کره می‌گردد. در این پژوهش، اثرات دو دمای نگهداری ۹- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد بر تغییرات رطوبت، چربی، اسیدیته و پراکسید و همچنین میکروارگانیسم‌های کلی‌فرم و سرماگرا موجود در کره منجمد بررسی گردید. نتایج نشان داد که میزان رطوبت و چربی طی ۷ ماه نگهداری به‌صورت منجمد در هر دو دما، به‌ترتیب به‌میزان ۱/۸ درصد کاهش و ۱/۷۸ درصد افزایش یافت. میزان اسیدیته و پراکسید در طی سردخانه‌گذاری به‌مدت ۷ ماه در هر دو دما تغییر معنی‌داری نداشت ($P<۰/۰۵$). میکروارگانیسم‌های کلی‌فرم پس از ۲ ماه سردخانه‌گذاری آسیب‌دیده و تعداد سلول‌ها صفر شد. تعداد میکروارگانیسم‌های سرماگرا در هیچ‌کدام از نمونه‌ها خارج از دامنه استاندارد نبود و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد در مقایسه با دمای ۹- درجه سانتی‌گراد بیش‌تر کاهش یافت. اثرات دماهای نگهداری و وزن‌های متفاوت بر کیفیت شیمیایی و میکروبی کره معنی‌دار نبودند ($P<۰/۰۵$).

واژه‌های کلیدی: کره، سردخانه‌گذاری، تغییرات، شیمیایی و میکروبی

* مسئول مکاتبه: fereshteh_eng@yahoo.com

مقدمه

امروزه در میان دهها نوع فرآورده لبنی، کره از موقعیتی ویژه و استثنایی برخوردار بوده و به‌عنوان یکی از مواد غذایی اصلی در رژیم غذایی انسان مطرح می‌باشد. طبق تعریف کمیسیون غذایی کدکس در سال ۱۹۷۳، کره فرآورده چربی است که منحصراً از شیر به‌دست می‌آید. انجماد یکی از روش‌های بسیار مهم نگهداری مواد غذایی می‌باشد که به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای زمان ماندگاری محصولات را افزایش می‌دهد و از این‌رو جهت نگهداری طولانی‌مدت بسیاری از موادغذایی به‌کار می‌رود. فساد کره اغلب بر اثر فعالیت میکروارگانیسم‌هایی ایجاد می‌گردد که قادر به رشد در حرارت‌های پایین بوده یا پس از ذوب قادر به فعالیت می‌باشند و با عمل لیپولیز و پروتئولیز، باعث طعم بد و تغییر رنگ کره می‌گردند (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷٤؛ رابینسون، ۲۰۰۲؛ باربارا و همکاران، ۲۰۰۰؛ آدامز و ماوس، ۲۰۰۲).

با توجه به اهمیت کره از نظر تغذیه‌ای، در خصوص خواص شیمیایی و میکروبی آن پژوهش‌های زیادی صورت گرفته است. آزکنل و کیا (۲۰۰۵)، برروی پایداری نگهداری روغن کره تولید شده از شیر پاستوریزه و غیرپاستوریزه گوسفند در دماهای ٦۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد در محل تاریک پژوهش نمودند. با افزایش دما میزان پراکسید و اسید تیوباربیتوریک افزایش یافت. افزایش جزیی در میزان اسید چرب آزاد نشان داد که واکنش‌های هیدرولیتیکی مسئول فساد کره بودند. مگدا و همکاران (۱۹۹٤)، نشان دادند نگهداری کره به‌مدت ۷/۵ ماه در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد اثر معنی‌داری روی ترکیبات کربونیل و لاکتون داشته است. دیت و همکاران (۱۹۷۹)، گزارش نمودند که لیپولیز قبل از پاستوریزاسیون به‌وسیله لیپاز میکروبی یا طبیعی موجب افزایش غلظت اسید چرب آزاد در کره از طریق آزادسازی اسید چرب از چربی شیر یا خامه می‌شود. نتایج این نوع لیپولیز جدی نمی‌باشد زیرا اسیدهای چرب آزاد زنجیر کوتاه که مسئول طعم نامطبوع هستند در مرحله شستشوی کره از بین می‌روند. هالیدی و همکاران (۲۰۰۳)، گزارش نمودند که *E. coli*، *Salmonella* و *Listeria monocytogenes* می‌توانند در کره‌های نمک‌دار با رطوبت ۸۵ درصد در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد رشد کنند و همچنین نشان دادند که میزان بقای *E. coli* در فرآورده‌های پرچربی که دارای pH برابر با ۳/۸ تا ۵/۵، نمک ۱/۵ تا ۵ درصد در دمای ٤/٤ یا ۲۱ درجه سانتی‌گراد، نسبت به سایر فرآورده‌ها بیش‌تر است. پس از بسته‌بندی و سردخانه‌گذاری قالب‌های کره مشکلاتی از نظر تغییرات شیمیایی و میکروبی در صنعت به دفعات مشاهده شده است. بنابراین، با توجه به اهمیت میکروارگانیسم‌های کلی‌فرم و سرماگرا و همچنین مسأله تغییرات شیمیایی کره در صنعت، این پژوهش به انجام رسید.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه‌های آزمایشگاهی: برای انجام این پژوهش، از بسته‌های ۲۵ کیلوگرمی کره نوع بی‌نمک دارای پوشش اتیلنی از کشور نیوزیلند شرکت NZMP، بلافاصله پس از ورود به کارخانه به‌صورت تصادفی نمونه‌برداری شد و به‌مدت ۱۰ روز تا انجام آزمایش‌ها و سپس تأیید براساس نتایج در سردخانه ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرنطینه شدند. لازم به ذکر است که از تاریخ تولید این بسته‌ها تا زمان ورود به کارخانه ۳ ماه گذشته و طی این مدت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده‌اند. نمونه‌های وارداتی پس از تأیید، در وزن‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ گرمی، براساس بیش‌ترین وزن‌های مورد عرضه و تقاضای بازار کشور، بسته‌بندی شده و در شرایط سردخانه‌ای تحت کنترل در دو دمای ۹- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد، براساس دمای تعیین شده توسط استاندارد، به‌مدت ۷ ماه نگهداری شدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های وارداتی از نظر تمامی خواص شیمیایی و میکروبی مطابق استاندارد بودند.

اندازه‌گیری میزان رطوبت کره: اندازه‌گیری درصد رطوبت کره توسط دستگاه ترازوی رطوبت‌سنج Sartorius، مدل MA45- آلمان انجام گرفت. در این دستگاه توسط اشعه مادون قرمز، رطوبت‌زدایی از کره انجام و اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری میزان چربی کره: برای تعیین چربی کره از بوتیرومتر مخصوص کره (۹۰ تا ۱۰۰ درصد) استفاده شد. ۵ گرم کره در قسمت داخلی بوتیرومتر[1] توزین شد، ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ژربر ۹۰ درصد، حدود ۷ میلی‌لیتر آب مقطر ۳۰ تا ٤۰ درجه سانتی‌گراد و سپس یک میلی‌لیتر الکل آمیلیک اضافه شد. بوتیرومتر را با آب مقطر گرم (۳۰ الی ٤۰ درجه سانتی‌گراد) تا درجه ۱۰۰ آن پر نموده، تکان داده و مجدداً با آب مقطر به درجه ۱۰۰ رسانیده شد. سپس در حمام آب ٦۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه قرار گرفت. حجم روی ۱۰۰ تنظیم گردید و به‌مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ ژربر با دور ۱۱۰۰ قرار داده شد. سپس به‌مدت ۵ دقیقه آن را به حمام آب برگردانده و در نهایت درصد چربی از روی بوتیرومتر خوانده شد (AOAC، ۲۰۰۵).

اندازه‌گیری اسیدیته کره: ابتدا کره داخل ظروف شیشه‌ای درب‌دار، در حمام آب ۳۰ درجه سانتی‌گراد ذوب گردید و پس از دو فاز شدن (روغن- دوغ کره) آن را از کاغذ صافی عبور داده و سپس ۵/٦٤ گرم روغن کره از فاز روغن در داخل ارلن‌مایر، توزین گردید. ۵۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک خنثی در حال

1- Butter Beaker

جوش روی آن ریخته، سپس چند قطره معرف فنل‌فنالئین افزوده و با محلول هیدروکسید پتاسیم ۰/۱ نرمال تا ظهور رنگ صورتی تیتر گردید (AOAC، ۲۰۰۵).

اندازه‌گیری اندیس پراکسید کره: ابتدا کره داخل ظروف شیشه‌ای درب‌دار، در حمام آب ۳۰ درجه سانتی‌گراد ذوب گردید و پس از دو فاز شدن (روغن- دوغ کره) آن را از کاغذ صافی عبور داده و سپس حدود ۵ گرم (۵/٦٤ میلی‌لیتر) روغن کره از فاز روغن در داخل ارلن‌مایر، توزین گردید. ۳۰ میلی‌لیتر مخلوط اسید استیک- کلروفرم (۳ حجم اسید استیک + ۲ حجم کلروفرم) به آن افزوده، ۰/۵ میلی‌لیتر یدور پتاسیم اشباع روی آن ریخته و یک دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و در نهایت ۰/۵ میلی‌لیتر معرف چسب نشاسته اضافه گردید. تغییر رنگ محتویات ارلن به آبی خاکستری، نشان‌دهنده وجود ید آزاد در محلول است که بایستی با محلول تیوسولفات سدیم تیتر شود و عدم مشاهده رنگ آبی به معنای صفر بودن پراکسید می‌باشد (AOAC، ۲۰۰۵).

شمارش کلی‌فرم‌ها به روش شمارش پرگنه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد: ۱۰ گرم کره تحت شرایط استریل حمل شده به آزمایشگاه را وزن نموده و پس از ذوب کردن در حمام آب ٤٥ درجه سانتی‌گراد، با ۹۰ میلی‌لیتر محلول پپتون ٤٥ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد و سپس رقت‌های اعشاری تا 10^{-6} از آن تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از فاز آبی سوسپانسیون را داخل پلیت ریخته و سپس محیط کشت VRBA را آرام آرام با آن مخلوط نموده، در دمای اتاق قرار داده تا خنک و سرد شود. سپس در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد و بعد از ٢٤ ساعت پرگنه‌های ارغوانی- بنفش شمارش شدند (استاندارد ملی ایران، ش ۱-٥٤٨٦).

آزمایش‌های تأییدی کلی‌فرم‌ها و تست IMViC: ۱۰ عدد کلنی (نماینده تمام کلنی‌ها) از هر پلیت را داخل لوله حاوی محیط آبگوشت سبز درخشان[1] دارای لوله دورهام برده و سپس در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. از لوله‌های حاوی گاز در داخل لوله دورهام، یک لوپ روی محیط کشت ائورین متیلن بلو کشت خطی انجام شد. کلنی‌های ارغوانی تیره مرکز سیاه دارای جلای سبز رنگ کلی‌فرم مدفوعی در نظر گرفته شده و سپس تست IMViC انجام گردید (کریم، ۱۳۸۲).

شمارش میکروارگانیسم‌های سرماگرا در ٦/٥ درجه سانتی‌گراد: پس از تهیه سوسپانسیون ۱۰ گرم کره با ۹۰ میلی‌لیتر محلول پپتون، ۰/۱ و ۱ میلی‌لیتر از فاز آبی آن را داخل پلیت ریخته و سپس محیط

1- Brilliant Green Bile Broth

کشت پلیت کانت اسکیم میلک آگار[1] را به آن‌ها افزوده، مخلوط کرده و در دمای اتاق قرار داده تا خنک و سرد شود. سپس در گرم‌خانه ٦/٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٠ روز گرم‌خانه‌گذاری شد و پرگنه‌های دوکی شکل سفید شمارش شدند (استاندارد ملی ایران، ٣٤٥١ ش).

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری نتایج به‌علت تکرارپذیری زمان، در قالب طرح اندازه‌گیری مکرر (Repeated Measure Design) انجام گردید و داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح ٥ درصد مقایسه شدند.

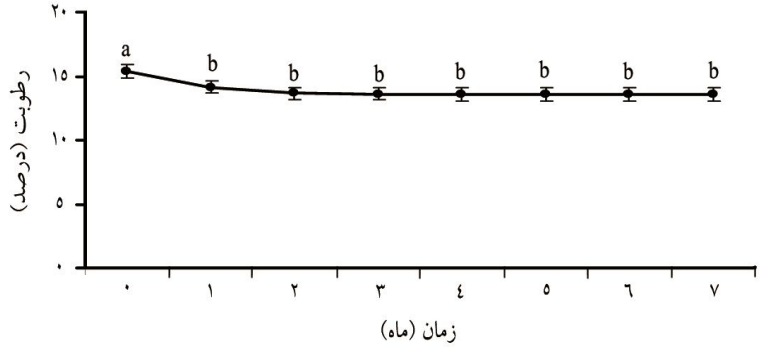
نتایج و بحث

تغییرات رطوبت: نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر زمان و همچنین اثر متقابل زمان در دما بر درصد رطوبت معنی‌دار می‌باشد و بین قالب‌های مختلف کره با وزن‌های متفاوت و دو دمای انجماد ٩- و ١٨- درجه سانتی‌گراد از نظر درصد رطوبت اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P<٠/٠٥$) (جدول ١). براساس نمودار ١، با افزایش زمان سردخانه‌گذاری و نگهداری قالب‌های کره به‌صورت منجمد، میانگین درصد رطوبت به‌میزان ١/٨ درصد کاهش یافت و مقدار متوسط درصد رطوبت در قالب‌های مختلف کره ١٣/٨٨ درصد بوده است.

جدول ١- منابع تغییر، درجات آزادی و سطوح احتمال درصد رطوبت قالب‌های متفاوت کره.

منبع تغییر	درجه آزادی	F Value	F > Pr
وزن	٣	٠/٩٣	٠/٤٣٢٨
زمان	٧	٦٧/٢٧١	٠/٠٠٠١
دما	٣	٠/٩٤	٠/٥٢٣٤
اثر متقابل زمان در دما	٧	٤٤/١٣	٠/٠٠٠١

1- Plate Count Skim Milk Agar



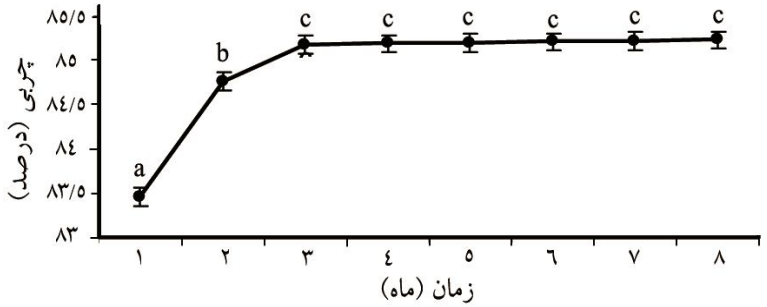
نمودار ۱- روند تغییرات درصد رطوبت قالب‌های مختلف کره در طی ۷ ماه زمان نگهداری به‌صورت منجمد.
***حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین آن‌ها است.**

کمپنون و همکاران (۲۰۰۵)، بیان نمودند که تصعید یخ سطحی در طی انجماد و نگهداری به‌صورت انجماد، به‌علت اختلافات در فعالیت آبی بین سطح غذا و محیط سردخانه موجب کاهش رطوبت و کاهش وزن که یک مسأله مهم کیفی و اقتصادی است، می‌شود. هنگام نگهداری مواد غذایی به‌صورت منجمد، به‌علت اختلاف درجه حرارت داخلی یک محصول و نوسانات درجه حرارت داخل سردخانه ممکن است جابه‌جایی رطوبت انجام گیرد. بنابراین در مواد غذایی منجمد، تبخیر رطوبت از محصول و انتقال به سطوح سردتر سردخانه موجب کاهش رطوبت ماده غذایی می‌شود (اریکسون و هانگ، ۱۹۹۷؛ دربدنوا، ۱۹۷۱). بنابراین، نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری رطوبت قالب‌های مختلف کره طی سردخانه‌گذاری در این پژوهش، همچون نتایج کمپنون و همکاران (۲۰۰۵)، اریکسون و هانگ (۱۹۹۷) و دربدنوا (۱۹۷۱) و همچنین به‌دلیل خروج رطوبت از لابلای تاهای فویل‌های بسته‌بندی قالب‌های کره، بیانگر کاهش درصد رطوبت نسبت به زمان قبل از سردخانه‌گذاری می‌باشد.

تغییرات چربی: نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس نشان داد که بین درصد چربی با زمان و اثر متقابل زمان در دما اختلاف معنی‌داری وجود داشته اما بین قالب‌های مختلف کره با وزن‌های متفاوت و همچنین بین دو دمای انجماد ۹- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد از نظر درصد چربی اختلاف معنی‌داری وجود نداشته است ($P<0/05$) (جدول ۲). طی دوره زمانی ۷ ماه نگهداری داخل سردخانه، چربی به‌میزان ۱/۷۸ درصد نسبت به زمان قبل از سردخانه‌گذاری افزایش یافت و مقدار متوسط چربی در قالب‌های مختلف کره پس از ۷ ماه سردخانه‌گذاری ۸٤/۱۵ درصد بود (نمودار ۲).

جدول ۲- منابع تغییر، درجات آزادی و سطوح احتمال درصد چربی قالب‌های متفاوت کره.

منبع تغییر	درجه آزادی	F Value	Pr > F
وزن	۳	۱/٤۱	۰/۲۵۲٦
زمان	۷	۷۲/۲۹۵	۰/۰۰۰۱
دما	۳	۱/٤۸	۰/۲٤۲۸
اثر متقابل زمان در دما	۷	۳۱/۲۹	۰/۰۰۰۱



نمودار ۲- روند تغییرات درصد چربی قالب‌های مختلف کره در طی زمان نگهداری به‌صورت منجمد.

***حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین آن‌ها است.**

تاکنون پژوهشی در خصوص تغییرات چربی کره در هنگام نگهداری به‌صورت منجمد نشده است. در این پژوهش، با توجه به کاهش درصد رطوبت قالب‌های متفاوت کره در طی زمان نگهداری داخل سردخانه و توازن بین میزان ترکیبات می‌توان بیان نمود که درصد ماده خشک کره به‌دلیل کاهش درصد رطوبت در طی نگهداری قالب‌ها در سردخانه افزایش یافته است و به این دلیل که چربی جزیی از ماده خشک کره محسوب می‌شود، درصد آن طی ۷ ماه سردخانه‌گذاری افزایش یافته است.

تغییرات اسیدیته: نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس نشان می‌دهد که بین قالب‌های مختلف کره با وزن‌های متفاوت از نظر میزان اسیدیته اختلاف معنی‌داری وجود نداشته و اثر زمان، دما و همچنین اثر متقابل زمان در دما نیز بر میزان اسیدیته معنی‌دار نبوده است ($P<۰/۰۵$) (جدول ۳).

جدول ۳- منابع تغییر، درجات آزادی و سطوح احتمال میزان اسیدیته قالب‌های متفاوت کره.

منبع تغییر	درجه آزادی	Value F	F > Pr
وزن	۷	۲/۱۷	۰/۱۰٤٤
زمان	۳	۰/٦۸	۰/۲۳٤٥
دما	۱	۰/۱۳	۰/۷۱۹۹
اثر متقابل زمان در دما	۷	۰/۰٦	۰/۹۹۹۷

کراسا و همکاران (۲۰۰۸)، اثرات دماهای نگهداری ۲۰- و ۰ درجه سانتی‌گراد بر بافت و طعم بسته‌های کره ۱۱۳ گرمی و ٤ کیلوگرمی را مطالعه کردند. آن‌ها بیان نمودند که زمان نگهداری، دما و نوع بسته روی میزان پراکسید و میزان اسیدهای چرب آزاد کره تأثیر دارد و نگهداری کره در دماهای بالاتر از دمای انجماد موجب طعم نامطبوع همزمان با پایداری اکسیداتیو پایین‌تر و میزان پراکسید و اسیدهای چرب آزاد بالاتر می‌گردد. کانلی و همکاران (۱۹۷۹) و اوکانل و همکاران (۱۹۷۵)، بیان نمودند که فساد هیدرولیتیکی کره به‌وسیله فعالیت لیپاز و در نتیجه اسیدهای چرب آزاد رها شده از چربی شیر موجب بو و طعم نامطبوع در کره می‌شود. زمانی‌که شرایط نگهداری کره در خارج از سردخانه، اجازه توسعه غلظت بالای اسیدهای چرب آزاد را بدهد موجب تولید طعم نامطبوع جدی در کره و کم‌ارزش کردن یا بازار ناپسند کردن آن می‌شود (میور، ۱۹۹٦؛ جاشی و تاکر، ۱۹۹٤؛ امر، ۱۹۹۱؛ بایندل و وادوا، ۱۹۹۱). غلظت اسید چرب آزاد در کره تولید شده به‌وسیله لیپاز باکتری‌های سرماگرا مقاوم به حرارت که پاستوریزاسیون را به‌خوبی گذرانده‌اند، افزایش می‌یابد. لیپاز میکروبی آزاد شده توسط آن‌ها در کره تولید شده می‌تواند منجر به ایجاد نقص‌های جدی در طعم شود. اما رشد باکتری‌های سرماگرا بستگی به درجه حرارت محیط دارد و با کاهش درجه حرارت میزان رشد کند می‌شود. به علاوه در غذاهای منجمد به دلیل این‌که معمولاً در دماهای ۱۷- تا ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند، باکتری های سرماگرا قادر به رشد نیستند (دانی، ۱۹۸۵؛ توماس و درانس، ۱۹۷۱؛ کریم، ۱۳۸۲). نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری میزان اسیدیته در طی ۷ ماه سردخانه‌گذاری با نتایج کراسا و همکاران (۲۰۰۸)، کانلی و همکاران (۱۹۷۹) و اوکانل و همکاران (۱۹۷۵) مطابقت دارد زیرا در این پژوهش نشان داده شد که نگهداری کره در سردخانه مانع از افزایش اسیدهای چرب آزاد می‌گردد.

تغییرات پراکسید: نتایج آزمایش‌ها هیچ‌گونه تغییری در میزان پراکسید کره طی سردخانه‌گذاری ۷ ماهه با نتایج قبل از سردخانه‌گذاری آن نشان نداد به‌طوری‌که این میزان در تمام مدت زمان نگهداری و قبل از آن صفر بود.

تغییرات کلی‌فرم‌ها: نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس نشان داد که بین تعداد کلی‌فرم‌های شناسایی شده با زمان، دما و همچنین اثر متقابل زمان در دما ارتباط بسیار معنی‌داری وجود دارد اما بین قالب‌های مختلف کره با وزن‌های متفاوت از نظر تعداد کلی‌فرم‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P<۰/۰۵$) (جدول ٤). مطابق بررسی‌های آماری به عمل آمده میانگین تعداد کلی‌فرم‌ها log cfu/gr ۰/٤۱±۰/۰٤ می‌باشد. براساس آنالیزهای آماری میانگین تعداد کلی‌فرم‌ها قبل از سردخانه‌گذاری log cfu/gr ۲/٤٦±۰/۰٤ بوده و پس از ۱ ماه نگهداری به‌صورت منجمد به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش یافت و به log cfu/gr ۰/۸۷±۰/۰٤ رسید و از ماه دوم سردخانه‌گذاری تا پایان دوره به صفر تنزل پیدا نمود (جدول ۵). همان‌گونه که از نمودار ۳ برمی‌آید، تعداد کلی‌فرم‌ها در قالب‌های مختلف کره در دمای ۹- درجه سانتی‌گراد کم‌تر از ۱۸- درجه سانتی‌گراد بود. از ۱۹۲ نمونه مورد آزمون در هر دو دمای نگهداری قبل از سردخانه‌گذاری و طی یک ماه نگهداری قالب‌ها به‌صورت منجمد، ۳۳ نمونه (۱۷/۱۸ درصد) از نظر تعداد کلی‌فرم‌ها خارج از دامنه تعریف شده استاندارد (<۳۰) بودند. نتایج آزمون‌های تأییدی و تست IMViC نشان داد که ۳ نمونه (۱/٥٦ درصد) آلوده به *E. coli*، ۲٤ نمونه (۷۲/۷ درصد) آلوده به انتروباکتر و ٦ نمونه (۱۸/۱ درصد) آلوده به سیتروباکتر بودند.

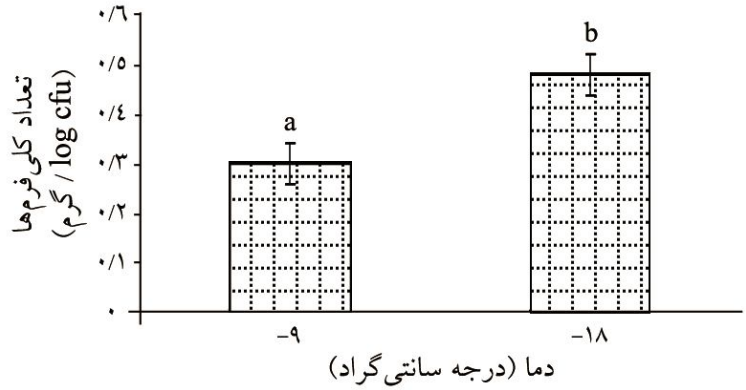
جدول ٤- منابع تغییر، درجات آزادی و سطوح احتمال کلی‌فرم‌های (داده‌های تبدیل لگاریتمی شده) موجود در قالب‌های متفاوت کره.

منبع تغییر	درجه آزادی	F Value	F > Pr
وزن	۱	۱/۳۳	۰/۲٥٤۳
زمان	۷	٤۱۹/۸٤	<۰/۰۰۰۱
دما	۱	٥۱/٤٦	<۰/۰۰۰۱
اثر متقابل زمان در دما	۷	٥۱/٤٦	<۰/۰۰۰۱

جدول ۵- تعداد کلی‌فرم‌ها در قالب‌های مختلف کره طی ۷ ماه نگهداری به‌صورت منجمد.

زمان (ماه)	تعداد کلی‌فرم‌ها (log cfu/gr)
۰	۲/٤٦[a]
۱	۰/۸۷[b]
۲	۰[c]
۳	۰[c]
٤	۰[c]
۵	۰[c]
٦	۰[c]
۷	۰[c]

* حروف غیرمشابه در هر ردیف نمایانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



نمودار ۳- تعداد کلی‌فرم‌ها در قالب‌های مختلف کره در دو دمای متفاوت طی ۷ ماه نگهداری به‌صورت منجمد.
***حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین آن‌ها است.**

رکاه و همکاران (۲۰۰۱)، برروی نگهداری *E. coli* به‌مدت ۲٤ و ۱٦۸ ساعت به حالت انجماد در VB[1] و سپس شمارش سلول‌های صدمه‌دیده روی محیط انتخابی VRBA، محیط غیرانتخابی PCA و محیط ترمیمی VRBA/PCA مطالعه نمودند. در زمان قبل از انجماد، جمعیت پاتوژن غیرمنجمد به‌دلیل سالم بودن سلول‌ها در آن زمان و این‌که عوامل انتخابی و نمک‌های صفراوی موجود برای سلول‌های

1- Vegetable Broth

E. coli مضر نبودند، برروی ۳ محیط تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت. ولی در مدت ٢٤ و ١٦٨ ساعت نگهداری در ۱۸- درجه سانتی‌گراد، به‌دلیل اثر زیان‌آور pH محیط VB (حدود ۵/۲) موجب کاهش جمعیت سلول‌ها شد. همچنین نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس نشان داد که انجماد یک فاکتور مهم کاهش جمعیت سلول‌های زنده بوده و بعد از ٢٤ و ١٦٨ ساعت به‌ترتیب ۲۲ درصد و ٤٥ درصد از سلول‌ها صدمه‌دیده بودند. اگرچه نتایج به‌دست آمده از پژوهش آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبودند اما اثرات عوامل انتخابی VRBA مانند نمک‌های صفراوی برروی جمعیت پاتوژن را نشان داد. نمونه‌های منجمد و خارج شده از حالت انجماد در VB، تعداد کلنی‌های بیش‌تری روی VRBA/PCA در مقایسه با کشت مستقیم روی محیط انتخابی VRBA تولید کردند. مکی (۲۰۰۰)، بیان نمود غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی سلول‌ها را در مقابل آنزیم‌های لیتیک، نمک‌های صفراوی و برخی آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت کرده، اما اجازه انتشار مواد مغذی با وزن مولکولی پایین به فضای پری‌پلاسمیک، که در آنجا آن‌ها ممکن است به‌وسیله سیستم‌های نقل و انتقال موجود در غشاء سیتوپلاسمی برداشته شوند را می‌دهد. اگر غشای خارجی صدمه ببیند، سلول‌ها حساس شده و قادر به رشد روی محیط‌های کشت حاوی نمک‌های صفراوی یا رنگیزه‌های تری‌فنیل‌متان مانند مک‌کانگی یا بریلیانت گرین آگار[1] نمی‌باشند. سیج و اینقم (۱۹۹۸)، در بررسی اثر انجماد (۲۰- درجه سانتی‌گراد، ٢٤ ساعت) بر روی *E. coli* در آب سیب و نان شیرینی گوشت‌دار، کاهش جمعیت نژادهای متفاوت پاتوژن در هر دو نمونه را روی VRBA گزارش نمودند. ری و اسپیک (۱۹۷۳) و موسل و کری (۱۹۷۷)، اثر سمیت نمک‌های صفراوی در محیط‌های حاوی آگار برروی نژادهای غیربیماری‌زای *E. coli* آسیب‌دیده را مشخص کردند. استیفانسه و مکیب (۲۰۰۳)، گزارش نمودند که آسیب به غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی موجب افزایش حساسیت به نمک‌های صفراوی و بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. همچنین تخریب غشاء سیتوپلاسمی موجب افزایش حساسیت آن‌ها به نمک و اسید می‌گردد. جیکوبسن (۱۹۸۳)، برروی کیفیت میکروبی کره پس از نگهداری بررسی نمود. وی نشان داد که نگهداری در سردخانه ۲۵- درجه سانتی‌گراد، موجب کاهش کل تعداد باکتری‌های موجود در هر دو نوع کره بی‌نمک و نمک‌دار می‌شود. جاو و همکاران (۲۰۰۵)، غیرفعال‌سازی *E. coli* ATCC 15597 در آب را از طریق دو روش خشک کردن انجمادی و سردخانه‌گذاری طبیعی و اثر دماهای انجماد ۵-، ۱۵- و ۳۵- درجه سانتی‌گراد بررسی

1- MacConkey or Brilliant Green Agars

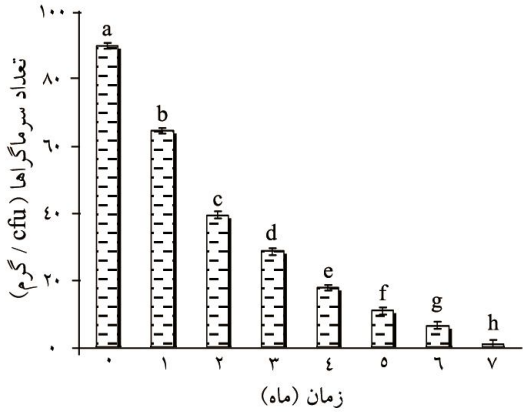
نمودند. آن‌ها گزارش نمودند که تحت زمان‌های نگهداری طولانی‌تر و شرایط دمایی در برودت کمتر، صدمه به سلول‌ها بیشتر می‌شود.

نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های آماری این پژوهش با نتایج رکاه و همکاران (۲۰۰۱)، سیج و اینقم (۱۹۹۸)، ری و اسپیک (۱۹۷۳) و موسل و کری (۱۹۷۷) مطابقت دارد. براساس نتایج به‌دست آمده از مکی (۲۰۰۰) و این پژوهش، سلول‌های صدمه‌دیده کلی‌فرم در کره‌های آلوده در اثر فرآیند انجماد برروی محیط VRBA به‌دلیل حضور و اثر بازدارندگی نمک‌های صفراوی و همچنین اثر سمیت رنگ‌ها، قادر به رشد نبودند و پس از ۱ ماه سردخانه‌گذاری به‌میزان چشم‌گیری کاهش یافتند و در نتیجه شناسایی آن‌ها امکان‌پذیر نبود. با نگاهی بر مطالعه حاضر و مطالعات گذشته طبق نتایج جیکوبسن (۱۹۸۳)، نگهداری کره به‌خصوص کره‌های بی‌نمک در خارج از شرایط سردخانه‌ای موجب افزایش سریع تعداد باکتری‌ها می‌گردد. ولی با پیشرفت زمان نگهداری بسته‌های کره در دماهای پایین انجماد به‌دلیل آسیب بیش‌تر به سلول‌ها باعث کاهش بیش‌تر تعداد کلی‌فرم‌ها گردید. همانند نظریات جاو و همکاران (۲۰۰۵)، صدمه بیش‌تر به سلول‌ها در زمان‌های انجماد طولانی‌تر و شرایط دمایی برودت کم‌تر، میزان آسیب وارد شده به کلی‌فرم‌ها در کره نیز در دمای ۹- درجه سانتی‌گراد بیش‌تر بوده و تعداد کلی‌فرم‌ها نسبت به دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد کمتر بوده است.

بررسی تغییرات سرماگراها: نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس نشان داد که بین قالب‌های متفاوت کره با وزن‌های مختلف از نظر تعداد میکروارگانیسم‌های سرماگرا اختلاف معنی‌داری وجود نداشته اما بین تعداد سرماگراها با زمان اختلاف بسیار معنی‌دار و بین دما و همچنین اثر متقابل زمان در دما و تعداد میکروارگانیسم‌های سرماگرا اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$) (جدول ٦). مطابق نمودار ٤، بین تعداد سرماگراها در قالب‌های مختلف کره طی زمان‌های مختلف ۷ ماه نگهداری در سردخانه اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد به‌طوری‌که با پیشرفت زمان تعداد آن‌ها کاهش می‌یابد. بررسی‌های آماری نشان داد که تعداد سرماگراهای شمارش شده در هیچ‌کدام از نمونه‌ها قبل و پس از سردخانه‌گذاری و طی ۷ ماه نگهداری به‌صورت منجمد خارج از دامنه تعریف شده استاندارد (حداکثر ۵×۱۰^{٤}) نبوده‌اند. براساس نمودار ۵، بین دو دمای سردخانه‌گذاری و تعداد سرماگراها اختلاف معنی‌داری وجود داشته و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد تعداد سرماگراها نسبت به دمای ۹- درجه سانتی‌گراد، بیش‌تر کاهش یافتند.

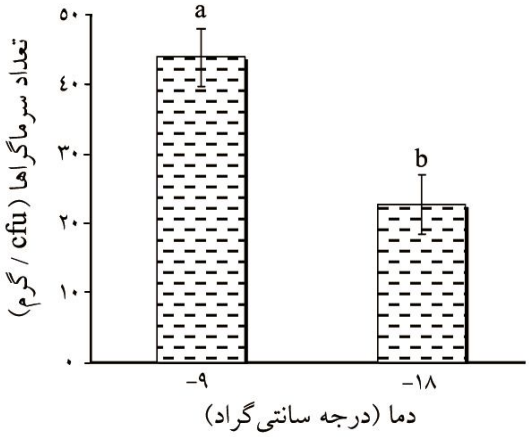
جدول ٦- منابع تغییر، درجات آزادی و سطوح احتمال سرماگراهای موجود در قالب‌های متفاوت کره.

منبع تغییر	درجه آزادی	F Value	F > Pr
وزن	۱	۱/۳۵	۰/۲۵۲۲
زمان	۷	۱۰/۹۰	۰/۰۰۰۱<
دما	۳	٦/٤١	۰/۰۰۰۱
اثر متقابل زمان در دما	۳	۷/۳	۰/۰۰۰۱



نمودار ٤- روند تغییرات سرماگراها در قالب‌های مختلف کره طی زمان نگهداری به‌صورت انجماد.

*** حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین آن‌ها است.**



نمودار ۵- تعداد سرماگراها در قالب‌های مختلف کره طی ۷ ماه سردخانه‌گذاری در دو دمای متفاوت.

*** حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین آن‌ها است.**

کازن (۱۹۸۲)، دانی (۱۹۸۵)، دیت و همکاران (۱۹۷۹) و اوکانل و همکاران (۱۹۷۵) ارگانیسم‌های سایکروتروفیک، مانند سودوموناس و کاندیدا را مهم‌ترین عامل ایجاد تند شدن هیدرولیتیکی میکروبی در کره نگهداری شده در سردخانه گزارش کردند. بنابراین گاهی در کره با کیفیت بالا نگهداری شده در سردخانه بدطعمی ناشی از فساد هیدرولیتیکی مشاهده می‌شود. بسیاری از میکروارگانیسم‌های سرماگرا موقعی که به تعداد زیاد در یک ماده غذایی وجود داشته باشند می‌توانند تغییراتی از نظر طعم و حالت فیزیکی ماده غذایی ایجاد کنند. رشد آن‌ها بستگی به درجه حرارت محیط دارد و اگر درجه حرارت کاهش یابد، میزان رشد به‌طور افزایشی کند می‌شود. مطابق نظریه کریم (۱۳۸۲)، میکروارگانیسم‌های سرماگرا در غذاهای منجمد به‌دلیل این‌که در برودت ۱۷- تا ۲۰- نگهداری می‌شوند، رشد نمی‌کنند. رشد آن‌ها بستگی به درجه حرارت محیط دارد و اگر درجه حرارت کاهش یابد، میزان رشد آن‌ها به‌طور افزایشی کند می‌شود و در صورتی‌که غذا مختصری از حالت انجماد خارج شود، این میکروارگانیسم‌ها قادر به رشد می‌باشند. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، کاهش تعداد سرماگراها در دمای پایین‌تر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۹- درجه سانتی‌گراد به‌دلیل کند شدن رشد با کاهش دما، با نظریه کریم (۱۳۸۲) کاملاً مطابقت دارد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود واجب می‌دانیم از مدیریت محترم شرکت مواد غذایی شکلی جناب آقای دکتر شکروی و همچنین مدیر کنترل کیفیت آن شرکت خانم دکتر سیف‌هاشمی کمال تشکر را داشته باشیم.

منابع

Adams, M.R., and Moss, M.O. 2002. Food microbiology. 2th edition, 1: 1-5.

Amr, S.A. 1991. Effectiveness of synthetic and potential natural antioxidants in improving the stability of sheep's anhydrous butter fat during long-term storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55:75-85.

AOAC. 2005. Official methods of Analysis, 15th Edition. Association of official analytical chemist.

Arannilewa, S.T., Salawu, S.O., Sorungbe, A.A., and Ola-Salawu, B.B. 2005. Effects of frozen period on the chemical, microbiological and sensory quality of frozen tilapia fish. *African Journal of Biotechnology*, 4:8. 852-855.

Ballabio, L., and Leon, S. 1998. Microbiological standards for some food of animal origin. *Indurtrie-Alimentaria*, 37: 19-24.

Barbara, M.L., Tony, C.B.P., Grahame, W.G., and Bernard, M.M. 2000. The microbiological safety and quality of foods, 1: 6. 22-145.

Bindal, M.P., and Wadlhwa, B.K. 1991. Renovation of rancid ghee. *Indian Journal Dairy Science*, 44: 5. 323-326.

Campanone, L.A., Salvadori, V.O., and Mascheroni, R.H. 2005. Simultaneous surface dehydration: approximate production of freezing time. *International Journal of Heat and Mass Transfer,* 48: 1205-1213.

Connolly, J.F., Murphy, J.J., Oconnor, C.B., and Headon, D.R. 1979. Relationship between lipolysed flavor and free fatty acid levels in milk and butter. *International Journal of Food Science and Technology*, 3: 79-83.

Cousin, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review, *Australian Journal of Dairy Technology*, 31: 53-59.

Deeth, H.C., Fitz-Geral, C.H., and wood, A.F. 1979. Lipolysis and butter quality. *Australian Journal of Dairy Technology*, 34: 146-151.

Derbedeneva, Z.A. 1971. Histological changes in plant tissue during freezing and thawing of strawberries. *Kholodilnaya Tekhnika*, 48: 36-39.

Downey, W.K. 1985. Review of the progress of dairy science: Flavor important from pre and post-manufacture lipolysis in milk and dairy products. *Journal of Dairy Research*, 47: 237-242.

Erikson, M.C., and Hung, Y. 1997. Quality in frozen food. 1st edition, New York: Chamoan and Hall, USA, 2: 176-211.

Gao, W., Smith, D.W., and Li, Y. 2005. Natural freezing as a wastewater treatment method: E. coli inactivation capacity. *Water Research*, 40: 2321-2326.

Halliday, S.L., Barbara, B., and Beuchat, L.R. 2003. Food Microbiology. 20: 2. 159-168.

Jacobson, D.H. 1983. Bacterial content and keeping quality of butter after removal from storage. *Journal of Dairy Science*, 21: 4. 187-193.

Joshi, N.S., and Thakar, P.N. 1994. Methods to evaluate deterioration of milkfat a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, 31: 3. 181-196.

Karim, G. 1382. Microbial examination of food products. Tehran University, 4th Edition, Pp: 52-72.

Krause et al. 2008. The effect of refrigerate and frozen storage on butter flavor and texture. *Journal of Dairy Science*, 91: 455-465.

Mackey, B.M. 2000. The recovery of sub lethally injured Escherichia coli from frozen meat. *Journal of Applied Bacteriology*, 48: 3. 15-324.

Magda, 1994. The effect of freezing storage on the qualities of butter. J. Sci. Direct. Pp: 28-32.

Mortazavi, S.A., Ghods Rohani, M., and Joyande, H. 1374. Technology of milk and dairy product. Mashhad University, 3rd Edition, Pp: 371-375.

Mossel, D.A., and Corry, J.E.L. 1977. Detection and enumeration of sub lethally injured pathogenic and index bacteria in foods and water processed for safety. Alimental, Special, Issue (microbiology), Pp: 19-34.

Muir, D.D. 1996. The shelf-life of dairy products: 3 factors influencing intermediate and long life dairy products. *Journal of Dairy Technology*, 49: 3. 67-72.

National Standard of Iran. 1386. Enumeration OF Coliforms, NO 5486-1.

National Standard of Iran. 1386. Enumeration of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy product at 6.5^{o}C, NO 5486-1.

Oconnel, J.M., Cogan, T.M., and Downey, W.K. 1975. Lipolysis in butter pre and post manufacture. proc. Lipolysis Symp., IOF DOC. Pp: 86-88.

Ozkanli, O., and Kaya, A. 2005. Storage ability of butter oils produced from sheep's non-pasteurized and pasteurized milk. *Food Chemistry*, Pp: 1026-1031.

Raccach, M., Bamiro, T., Combs, G., Gierczynski, A., and Karam, R. 2001. Frozen storage of Escherichia coli O157:H7 in vegetable broth. *Food Control*. Pp: 381-385.

Ray, B., and Speck, M.L. 1973. Escherichia coli in frozen samples after recovery from injury. *Applied Microbiology*, 25: 499-503.

Robinson, R.K. 2002. Dairy microbiology handbook. 3rd edition, 4: 123-170.

Rodraguezl, A., lodsada, V., Anga, M., Quitral, V., Vinagrel, J., and Aubourg, S.P. 2006. Development of lipid changes related to quality loss during the frozen storage of farmed Coho Salmon. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 727-734.

Sage, J.R., and Ingham, S.C. 1998a. Evaluating survival of Escherichia coli O157:H7 in frozen and thawed apple cider: potential use of a hydrophobic grid membrane filter-SD-3q agar method. *Journal of Food Protection*, 61: 490-494.

Stephensa, P.J., and Mackeyb, B.M. 2003. Hand book of culture media for food microbiology. *Progress in Industrial Microbiology,* 37: 2. 25-48.

Thomas, S.B., and Druce, R.G. 1971. Psychrotrophic microorganisms in butter. A review. *Dairy Industry*, 36: 145-152.

United States Department of Agriculture (USDA). 1999. Dairy world markets and trade.

ضمیمه

جدول میانگین ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی قالب‌های متفاوت کره طی ۷ ماه نگهداری در دو دمای ۹- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد.

وزن نمونه	قالب ۲۵ گرمی	قالب ۵۰ گرمی	قالب ۱۰۰ گرمی	قالب ۲۵۰ گرمی
رطوبت (درصد)	۱۳/۸۶[a]	۱۳/۸۷[a]	۱۳/۸۸[a]	۱۳/۸۸[a]
چربی (درصد)	۸٤/٤٤[a]	۸٤/٤۸[a]	۸٤/٤۲[a]	۸٤/٤[a]
اسیدیته (گرم اسید اولئیک در ۱۰۰ گرم نمونه)	۰/۱۷[a]	۰/۱۷[a]	۰/۱۷[a]	۰/۱۷[a]
پراکسید (میلی اکی‌والان/ کیلوگرم)	۰	۰	۰	۰
کلی‌فرم‌ها ۹- درجه سانتی‌گراد (logcfu/gr)	۰/۳۱[a]	۰/۳۲[a]	۰/۳۱[a]	۰/۳۳[a]
کلی‌فرم‌ها ۱۸- درجه سانتی‌گراد (logcfu/gr)	۰/٤۸[a]	۰/٤۷[a]	۰/٤۸[a]	۰/٤۸[a]
سرماگراها ۹- درجه سانتی‌گراد (cfu/gr)	٤۱/٤٤[a]	٤۲/۷[a]	٤۱/٥۷[a]	٤۲[a]
سرماگراها ۱۸- درجه سانتی‌گراد (cfu/gr)	۲۲/۷٦[a]	۲۲/۷٥[a]	۲۲/۷٦[a]	۲۲/۷٤[a]

[*] حروف مشابه در گروه‌بندی آماری نمایانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین آن‌ها است.

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

EJFPP., Vol. 1 (3): 1-18
www.ejfpp.info

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Study on the effect of freezing on the changes of chemical and microbial quality of butter

***F. Tofangsazan[1], M. Khomeyri[2], G. Karim[3], S. Hasani[4] and S. Seifhashemi[5]**

[1]Former M.Sc. Student, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Faculty of Member, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Faculty of Member, Dept. of Food hygiene, University of Tehran, [4]Faculty of Member, Dept. of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [5]Lecturer, university of allpied scence and technology

Abstract

Freezing causes changes on chemical and microbial quality of butter. In this research, effects of two different temperatures -9 and -18^{o}C on changes of moisture, fat, acidity and peroxide value and also *Coliform* and Psychrotrophic microorganisms in frozen butter were studied. Results showed that values of moisture and fat during 7 months of frozen storage at two temperatures decreased 1.8% and increased 1.78%, respectively. Acidity and peroxide value during 7 months of storage at two temperatures had no significant difference changes ($P<0.05$). *Coliform* microorganisms were destroyed after 2 months of freezing and the numbers of cells became zero. The numbers of Physchrotrophic microorganisms did not out of the range of standard in all and at -18^{o}C in compare to -9 ^{o}C was decreased more. Effects of storage temperatures and different weights on the chemical and microbial quality of butter were not significant ($P<0.05$).

Keywords: Butter; Freezing; Changes; Chemical and microbial

* Corresponding Author; Email: fereshteh_eng@yahoo.com