

**מציאת מדדי איכות אורגנולפטטיים לחלב הגולמי במיכל החלב, ברמות תאים סומטיים
שונות בעזרת שיטות אנליטיות מתקדמות – הלשון ואף אלקטרוניים**

מ. שליסל¹, א.בנימין¹, ע.שווימר², ג. לייטנר³

¹ החוג למדעי המזון, המכללה האקדמית תל-חי

² המערך הארצי לבריאות העטין ואיכות החלב, מועצת החלב

³ המעבדה למחלות עטין, החטיבה לבקטריולוגיה, המכון הווטרינרי

תקציר מדעי של תוכנית המחקר

דלקת עטין היא המחלה הנפוצה ביותר בעדרים מניבי חלב והמקור התחלואתי העיקרי להפסדים כלכליים בייצור חלב. לדלקת העטין שני מופעים: קליני ותת קליני. המופע הראשון ניתן לזיהוי בראייה ומישוש אולם לא קיימת שיטה המסוגלת לאבחן בזמן אמת את נגיעות הפרה בדלקת תת קלינית. אחת הבדיקות המקובלות היום היא ספירת תאים סומטיים (סט"ס) שיכולה להצביע על שכיחות הנגיעות התוך-עטינית – הקלינית והתת-קלינית בעדר שנחלב למיכל החלב. אולם, בדיקת תאים סומאטיים פרטנית לכל פרה נעשית אחת לחודש ולכן אין מעקב צמוד על בריאות הפרה בדלקת תת קלינית וכתוצאה מכך אין מעקב צמוד על בריאות העדר. במחקר הנוכחי נבדקה שיטה חדישה לאבחון דלקות עטין באמצעות האף האלקטרוני. האף האלקטרוני הוא מכשיר בעל חיישני metal oxide היודעים להבחין ולזהות קבוצות ריח שונות וכך לבנות פרופיל ריחות לחומרים שונים. המכשיר אינו יקר ויכול להשתלב במערכות החליבה. המחקר עסק בזיהוי פרופילי ריח של ארבעת החיידקים הפתוגניים העיקריים בעדרי החלב בישראל: *E. coli*, *Staph. Aureus*, *Strep. Dysgalactiae* ו-*Staph. Chromogene* במערכות *in vitro* ובפרות נמצא, שהאף האלקטרוני יודע להבחין בין חלב הנחלב מפרות בריאות לבין חלב הנחלב מפרות חולות. כמו כן, במחקר בודדו וזוהו מחלב נגוע מוליקולות היחודיות לחיידקים המסויימים באמצעות כרומטוגרפיה במכשיר GCMS. מוליקולות אלו יכולות להוות מטרה לזיהוי ספציפי של החיידקים הפתוגניים השונים במכשירי אף אלקטרוני משוכללים. תוצאות המחקר מציעות את האפשרות לשילוב מכשירי אף אלקטרוני במערכות החליבה וכך לנטר בזמן אמת את בריאות העטין של הפרה ובכך לשלוט על בריאות הפרה החולבת והעד

Scientific Summary of the Research Program

Mastitis is the most common disease in milk-producing herds and the main source of financial loss for milk production. The infection has two occurrences: clinical and subclinical. The first occurrence is detectable in vision and tactile, but there is no method capable of real-time diagnosing the infestation of subclinical infections. One of the accepted assays today is somatic cell counts (SCC) that can indicate the incidence of mammary gland infections - clinical and subclinical in a herd. However, individual somatic cell assay for each cow is done once a month, so there is no tight monitoring of the cow's health in inflammation. The present study tested a new method for diagnosing udder infections through the electronic nose. The electronic nose is a device with metal oxide sensors that can detect and identify different odor groups and thus build an odor profile for different substances. The study involved identifying of the four major pathogenic bacteria in dairy herds in Israel: *E. coli*, *Staph. Aureus*, *Strep. Dysgalactiae* and *Staph. Chromogene*. It has been found that the odor profile of milk from sick cows differ from healthy cow's milk. Thus, the E-nose can distinguish between the two groups of cows. In addition, unique molecules were detected from milk infected by particular bacteria through chromatography on a GCMS device. These molecules can serve as a target for specific identification of the various pathogenic bacteria in elaborate E-nose devices. The results of the study offer the possibility of incorporating electronic nose devices into the milking systems and thus monitor the cow's udder health in real time, thereby controlling the health of the milking cow and the herd

1. מבוא ותיאור הבעיה

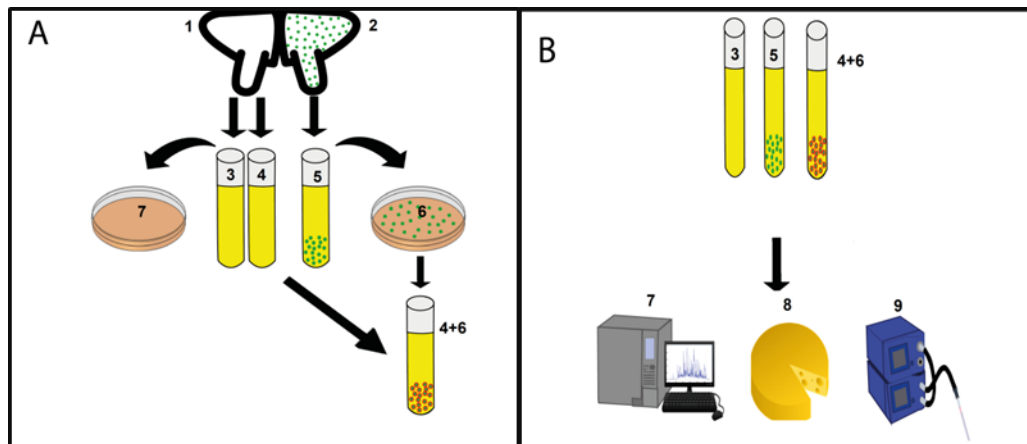
דלקות עטין בפרות הן מהסוגיות הכלכליות החשובות בתעשיית החלב. הדלקות גורמות להפסדים גדולים כתוצאה מירידה ביצרנות הפרה, שפיכת חלב מעטין נגוע, עלויות טיפול ואף כתוצאה ממות הפרה או הוצאתה מהעדר. בנוסף לכך, דלקת העטין משפיעה על איכות החלב הגולמי ותפוקת מוצרי החלב עקב השינוי בהרכב החלב. הרכב חלב הפרה מושפע ממגוון גורמים כגון: גיל הפרה, גנטיקה, שלב בתחלובה בה נמצאת הפרה, התזונה וממשק ההזנה, הרכב מנת המזון, בריאות העטין ומדדי בריאות אחרים והתנאים הסביבתיים. לדלקות עטין זיהומיות, הנגרמות בעיקר כתוצאה מחדירת חיידקים לעטין, יש השפעה רבה על הכמות והאיכות של החלב כמו גם על תהליכי העיבוד של החלב למוצרים. לתגובה הדלקתית יש השפעה על הרכב החלב: חלים שינויים ברמות החלבון והרכבו, שינויים בהרכב השומן, ירידה ברמת הלקטוז ועלייה בריכוז יונים נתרן וכלור. כמו כן, משפיעה דלקת העטין על מספר התאים הסומטיים בחלב. בעטין בריא רמת סת"ס היא עד כ 100,000 למ"ל המתפלגים כ 50% תאי אפיתל ו 50% תאים של המערכת החיסונית (תאי דם לבנים). בעקבות התגובה הדלקתית עולה סת"ס באופן חד, כאשר רב התאים שייכים לתאי המערכת החיסונית. דלקת עטין היא המחלה הנפוצה ביותר בעדרים מניבי חלב והמקור התחלואתי העיקרי להפסדים כלכליים בייצור חלב. השינוי בהרכב החלב נובע משני גורמים: 1. השפעת החיידקים המזהמים הגורמים לשינויים ניכרים בהרכב החלב ובתכונות הפיזיקליות והכימיות של החלב. 2. השפעת התאים הסומאטיים באופן ישיר, ע"י האנזימים המופרשים מהם, בעיקר אנזימים ליפוליטיים ופרוטיאוליטיים. ההשפעה על איכות החלב כתוצאה מדלקת העטין באה לידי ביטוי בירידה בכמות הגבן, קיצור משך חיי המדף ופגיעה בתכונות האורגנולפטיות של המוצר. מכיוון שהוכח שקיים קשר חיובי בין הנגיעות בדלקת העטין לעלייה בסת"ס בחלב, מהווה רמת הסת"ס כסמן העיקרי לזיהוי של דלקות עטין. כמו כן, משמשת רמת הסת"ס מדד לאיכות החלב ומהווה בסיס לקביעת המחיר לחקלאי וקבלת החלב ע"י המחלבה. במגוון רב של עבודות מדעיות, התייחסו החוקרים לעלייה בסת"ס כסמן לדלקת עטין ואינדיקציה לאיכות החלב. אולם, לסוג החיידק הפתוגני, הגורם לדלקת עטין יש השפעה גדולה מאד על תנובת החלב והרכבו (Leitner et al. 2006). החוקרים בדקו את השפעת ארבעה פתוגנים עיקריים לדלקות עטין בפרות: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* (DYS) ו *Staphylococcus chromogenes* (CNS) של איכות חלב לייצור גבינות. בכל ארבעת הפתוגנים נמצא שהדבקה בהם פוגעת באיכות החלב לייצור גבינה. אולם, ישנה שונות בין החיידקים הפתוגנים בהשפעה על איכות החלב. מכאן, מסקנת החוקרים היתה ששיעור הסת"ס בחלב, שהוא המדד המקובל לאיכות החלב, אינו מנבא באופן יעיל את איכות החלב לייצור גבינות.

יתירה מכך, עבודות שנערכו בעבר בישראל הראו כי חלב גולמי ממכלי חלב, שהכילו מעל מיליון תאים למ"ל חלב לעומת כאלו שהכילו מאות אלפים, הניבו פחות גבינה ואיכות המוצרים הייתה נמוכה יותר. לעומת זאת, לא נמצא הבדל מובהק בכמות הגבן ברמות סת"ס מתחת ל 300,000 תאים למ"ל (ניב לבון וגבריאלי לייטנר, הצעת מחקר 111-0011-21). מדד הסת"ס נמצא אם כן כמדד לא מספיק מדויק לקביעת איכות החלב הגולמי ברמת התפוקה ואיכות מוצר החלב שמוצר.

בעבודות המתוארות נעשה שימוש במכשיר ה"אופטיגרף" המודד באופן מהיר את יכולת ההתגבנות של חלבוני הקזאין בחלב. נמצא שיש מתאם בין מרכיבי החלב ומבחן ההתגבנות במכשיר זה. אולם, איכות מוצרי החלב נגזרת גם ובעיקר מהתכונות האורגנולפטיות של המוצר הבאות לידי ביטוי בטעם, ריח, מרקם וכו'. חלק ניכר מתכונות אלו במוצר הסופי נקבעות מאיכות חומר הגלם. ידוע שכתוצאה מנגיעות של דלקת עטין בחלב יכולה להיווצר פעילות אנזימתית לא רצויה המתבטאת בפירוק חלבונים ושומנים. תוצרי הפעילות האנזימתית כוללים פפטידים וחומצות אמינו יחד עם חומרים נדיפים. ההערכה שאותם מולקולות שהתפרקו מהפעילות האנזימתית יכולים להוות סמנים בשיטות הגילוי המתקדמות לקביעת האיכות של חלב גולמי. לכן, יש חשיבות רבה לפיתוח שיטות מתקדמות ומהירות להערכת החלב הגולמי המבוססות על התכונות האורגנולפטיות של החלב. שיטות אלו בנוסף לסת"ס יכולות לצפות באופן יעיל יותר את איכות מוצרי החלב כבר במיכלי החלב ואף ברמת הפרה הבודדת. מיני החיידקים השונים הגורמים לדלקות עטין פועלים במנגנונים שונים בבלוטת החלב. למינם השונים, מערכות מטבוליות שונות המתבטאות בהפרשת אנזימים שונים התוקפים אתרים שונים ברקמה היוצרת ובמרכיבי החלב. לפגיעה זו יש השפעה ניכרת על הרכב החלב המופרש מעטין הפרה וכתוצאה מכך נפגעת יכולתו בתהליך הגיבון (Fleminger et al., 2013; Leitner et al., 2006). השונות בהרכב החלב כתוצאה ממין החיידק גורם הדלקת באה לידי ביטוי בכמות הלקטוז, כמות החומצות האורגניות, בהרכב ובכמות חומצות השומן החופשיות ובהרכב וכמות החלבונים. חומצות השומן החופשיות בחלב נוצרות כתוצאה מליפוליזה של גלובולות השומן בחלב (Murphy et al., 1989). הרכב החלבונים משתנה כתוצאה מפרוטאוליזה של חלבונים בעטין הפרה בזמן הדלקת המאופיינת בעיקר בחיתוך שיירים בחלבון הקזאין (Bezman et al., 2015; Katz et al., 2016). כתוצאה מהפגיעה בחלבון הקזאין תרד יכולת ההגבנה של החלב. דבר המוסבר על ידי העובדה כי כל חיידק מסנטז אנזימים פרוטאוליטיים שונים הפוגעים באתרים שונים בחלבון הקזאין אשר מהווה כ-80% מכלל חלבוני החלב (Mohanty et al., 2016). שונות זו עשויה לגרום לשינויים באיכות מוצרי החלב כל זאת בעוד שרמת הסת"ס בחלב יכולה להיות דומה גם מהדבקה בפתוגנים השונים. בהתבסס על מאפיינים מטאבוליים יחודיים לכל פתוגן, אחת הדרכים המוצעות לזיהוי מני החיידקים הפתוגנים היא בעזרת זיהוי החומרים הנדיפים הנוצרים בתהליך הדלקתי והתגובה אליו. (Hettinga et al., 2015) נראה כי באמצעות מכשיר GC-MS ניתן לזהות בין חיידקי *S. aureus*, CNS, and *E. coli* לשאר החיידקים הפתוגנים. (Hettinga et al., 2015).

אחת הבעיות לעמוד על השינויים החלים בחלב כתוצאה מנוכחות חיידק והתגובה הדלקתית היא השונות הטבעית בהרכב החלב בין בעלי החיים. בפרות, העטין מחולק לארבע בלוטות המבודדות זהו מזו. עובדה זו מאפשרת לבחון את הרכב החלב ברבע העטין הבריא ולהניח כי הרכב החלב ברבע הנגוע טרום הדלקת היה כפי שמופיע ברבע הבריא. לכן השימוש ברבעי העטין כיחידה ניסויית מאפשרת לכמת את השפעות של התגובה הדלקתית על הרכב החלב. מודל הרבע הוא דרך יעילה לבדוד משתנים ממסכים אשר מאלצים את הנסיין להגדיל את מדגם בעלי החיים במאות אחוזים (Merin et al., 2004). בכדי לעמוד את השינויים החלים בחלב בזמן דלקת עטין ובכדי לבדוד את פעילות החיידק מפעילות מערכת החיסון בעטין ניתן להשתמש במודל הרבע באופן דומה לזה שהוצג ולהוסיף לו נדבך נוסף בו מאולח החלב הנחלב מהרבע הבריא בסוג החיידק אשר בודד מהרבע הנגוע.

באמצעות "מודל הרבע והרבע החמישי" יתאפשר לקבל תמונה יותר רחבה על פעילות החיידק, שינויים בהרכב החלב ואיכות החלב כחומר גלם להכנת גבינות במצב של זיהום התוך עטיני (איור 1).



איור 1: מודל הרבע והרבע החמישי

A- שלב ראשון: דיגום הרבעים, בידוד חיידק ואילוח חלב נקי.

(1) רבע בריא. (2) רבע נגוע. (3-4) מבחנות עם חלב נקי. (5) מבחנה עם חלב נגוע. (6) בידוד חיידק. (7) ביקורת לחלב נקי. (4+6) מבחנה 4 עם חלב נקי מאולח בחיידק הבודד מהרבע הנגוע.

B- שלב שני: ביצוע אנליזות לחלב.

(3) מבחנה עם חלב נקי. (5) מבחנה עם חלב נגוע. (4+6) מבחנה מס' 4 עם חלב נקי מאולח בחיידק הבודד מהרבע הנגוע. (8) GC-MS - אנליזות חומרים נדיפים וחומצות שומן. (9) הכנת מוצרי חלב - אנליזות ניצולת ותכונות כימיות ופיסיקליות. (10) אף אלקטרוני - בחינת פרופילי ריח.

כאמור לעיל, החיידקים מבצעים בחלב פעילות מטבולית. ידוע כי כחלק מפעילות זו משתחררים חומרים נדיפים המשתנים בין החיידקים השונים ולכן ניתן באמצעותם לבנות פרופיל ריח הייחודי לכל חיידק. פרופיל הריח נבנה בעזרת מכשיר האף האלקטרוני שבו קיימים עשרה חיישנים סלקטיביים (Metal Oxide Sensors) המגיבים עם החומרים הנדיפים המשתחררים מהדוגמא, ותגובה זו מייצרת שרשרת סיגנלים המעובדים בעזרת תוכנת מחשב לפלט המציג את פרופיל הריח ואת תגובת החיישנים השונים (Ampuero et al., 2003).

2. מטרת המחקר :

2.1 פיתוח שיטה חדישה אנליטית לקביעת איכות החלב הגולמי באמצעות שימוש במכשירי לשון ואף האלקטרוניים.

2.1.1 פיתוח שיטה אנליטית חדשה ומהירה לזיהוי פרה הנגועה בדלקת עטין וסוג הפתוגן באמצעות אף אלקטרוני.

2.2 פיתוח שיטה אנליטית לבדיקת איכות החלב במיכל באמצעות הלשון האלקטרונית והאף האלקטרוני.

2.2.1 השוואת מהימנותה ויעילותה של השיטה מול מדד הסת"ס בהערכת איכות החלב במיכל על ייצור מוצרי חלב ואיכותם האורגנולפטית.

3. שיטות וחומרים :

3.1 האף האלקטרוני : קביעת פרופיל הריח נעשה באמצעות אף אלקטרוני נייד (PEN-3) (Airsense,) (Schwerin, Germany) האף האלקטרוני הנייד בעל מערך חיישנים ותוכנה לפיענוח דפוסי אותות חשמליים (Win Muster v.1.6). מערך החיישנים מורכב מ-10 תחמוצות מתכת מוליכות למחצה, כאשר במכשיר בו נעשה שימוש מגיבים חמישה מהם בלבד. זמן הבדיקה ארך 69 שניות לאחר התייצבות האות החשמלי וזמן אישוש החיישנים ערך 140 שניות בין בדיקה לבדיקה. פירוט החיישנים מופיע בטבלה הבאה :

Reference	תאור כללי	שם חיישן	מספר חיישן
Toluene, 10ppm	תרכובות ארומטיות	W1C ארומטי	1
NO ₂ , 1ppm	רגיש מאוד, טווח רגישות רחב, מגיב על ניטרוגן אוקסידאז ואוזון. מאוד רגיש לסיגנלים שליליים.	W5S טווח רחב	*2
Benzene, 10ppm	אמוניה, שימוש כחיישן לתרכובות ארומטיות	W3C ארומטי	3
H ₂ , 100ppb	מימן בעיקר, באופן סלקטיבי (גזי נשימה)	W6S הידרוגן	4
Propane, 1ppm	אלקנים, תרכובות ארומטיות, תרכובות פחות פולאריות.	W5C ארום אליפטי	5
CH ₄ , 100ppm	רגיש למתאן (סביבה), בקירוב 10ppm לדקה. טווח רחב, דומה לחישן מס.8	W1S מתאן רחב	*6
H ₂ S, 1ppm	מגיב לתרכובות גופרית (0,1ppm H ₂ S)	W1W גופרית אורגנית	*7
CO, 100ppm	קולט אלקוהולים, חלקית תרכובות ארומטיות, טווח רחב.	W2S אלכוהול רחב	*8
H ₂ S, 1ppm	תרכובות אורגניות, תרכובות גופרית אורגניות.	W2W גופרית כלוריד	*9
CH ₄ , 10ppm	מגיב לריכוזים גבוהים <100ppm לפעמים מאוד סלקטיבי (מתאן)	W3S מתאן אליפטי	10

טבלה 1 – פירוט עשרת החיישנים במכשיר האף האלקטרוני

1 מ"ל חלב הודגר בבקבוק 20 מ"ל ב-30 מע"צ למשך 15 דקות. חלל הראש בבקבוק נמדד על ידי האף האלקטרוני עם 10 חיישני Metal oxide.

3.2 דיגום וזיהוי בקטריאלי של פרות נגועות:

בשני מועדים שונים נבחרו פרות מרפת כפר גלעדי עם סת"ס גבוה מ-300 אלף למ"ל ופרות בעלות סת"ס נמוך מ-50 אלף. מרבעים אשר הוגדרו דלקתיים באמצעות CMT נחלבה דוגמת חלב באופן ידני

למבחנת זכוכית 15 מ"ל מעוקרת. באמצעות מקל זריעה נלקחה דוגמה ונזרעה בזריעת בידוד על צלחות אגר דם כבש. הצלחות הודגרו בטמפ' 37 מע"צ למשך 18 שעות ונשמרו במקרר עד לזיהוי מיקרוביאלי. 19 פרות אשר נמצאו חיוביות ל- *Streptococcus* & *coagulase-negative staphylococci* (CNS) נחלבו לכד רבע והחלב חולק לבדיקות הבאות: סת"ס, חלבון, שומן, אוריאה ולקטוז, שבוצעו במעבדת מועצת החלב בקיסריה. בנוסף חולקו 2 מ"ל חלב למבחנות 20 מ"ל אטומות לטובת קביעת פרופיל ריח באף האלקטרוני.

3.3 בדיקות בלשון אלקטרונית (Insent, S4A0B Japan) –

החלב עבר הפרדת שומן לפני הרצה על ידי צנטריפוגה במהירות 4000 סל"ד למשך 20 דקות ב4 מע"צ. הדוגמאות נבדקו לפרופיל טעם על ידי חיישני סלקטיביים לטעמים השונים המכילים ממברנה לפידית. החיישנים שהיו בשימוש: CA0 – עבור חמיצות, C00 – עבור מרירות, CT0 – עבור מליחות, AE1 – עבור עפיצות, AAE – עבור אומאמי וGL1 – עבור מתיקות. בנוסף נבדקה ההשפעה של השארות חומרי הטעם אחרי שטיפה קלה בתמיסת רפרנס (tartaric acid + KCl בריכוזים נמוכים). לזה נקרא בתוצאות CPA לפי חיישן.

3.4 אנליזת SPME-HS-GCMS –

אנליזת דוגמאות החלב ב GCMS נעשתה בשיטת Solid Phase Micro Extraction (SPME), ספיחה לסיב בציפוי Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) בעובי 50 µm (Supelco™, קנדה). ההרצה בוצעה לפי תכנית שפותחה מקולונה מסוג 122-7062 (Agilent, USA) DB-WAX. לכל דוגמת חלב שהורצה הוכנס חומר סטנדרט פנימי 4-Methyl-2-Pentanone בריכוז קבוע. זיהוי החומרים נעשה מול ספריית wiley ושטח הפיקים נורמל לפי הסטנדרט הפנימי.

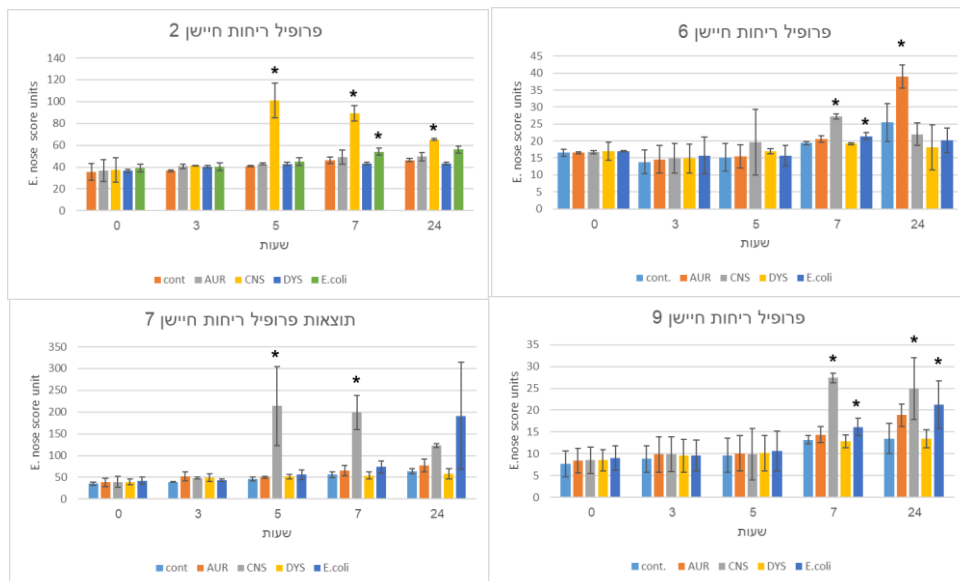
3.5 ניתוח סטטיסטי-

נעשה בעזרת תוכנת XLSTAT עם שימוש בניתוחים PCA, ANOVA ו DA.

4. תוצאות :

4.1 אפיון פרופיל ריחות באמצעות האף האלקטרוני לחיידקים פתוגניים באילוח *in vitro* במבחנות ואנליזת GCMS.

על מנת לאפיין את פרופיל הריחות המייצרים ארבעת מיני החיידקים הפתוגניים :DYS, CNS, S.Aureus ו E.coli נערך ניסוי בו נזרעו החיידקים במבחנות בחלב רפת מפוסטר והודגרו ב 37 מעלות למשך 24 שעות. כביקורת נלקחה מבחנת חלב שלא אולחה. תוצאות הניסוי מוצגות בגרף 1. ניתן לראות שחיידק S. Aureus לא הגיב שונה ממבחנת הביקורת בכל החיישנים ובכל הזמנים. החיידק CNS הגיב שונה באופן מובהק מהביקורת בחיישן מס' 2 לאחר 5 שעות הדגרה. החיידק DYS הגיב באופן שונה מהביקורת בחיישן 7 לאחר 5 שעות הדגרה וכן בחיישן 6 ו 9 לאחר 7 שעות הדגרה. החיידק E.coli הגיב באופן שונה מהביקורת בחיישנים 6 ו 9 לאחר 7 שעות הדגרה.



גרף מס' 1 – פרופיל הריחות של חיידקים שונים בנסויי *in vitro* שנמדד במכשיר האף האלקטרוני. חיידקי S. Aureus(AUR), Streptococcus dysgalactiae(DYS), E.coli ו Coagulase-Negative Staphylococci (CNS) נזרעו במבחנות עם חלב מפוסטר ל 24 שעות. כביקורת נלקחה דוגמא שלא אולחה. cont. דוגמאות נדגמו כל מספר שעות (0,3,5,7,24) ונמדדו במכשיר האף האלקטרוני. הגרף מציג תוצאות של חיישנים שהגיבו באופן מובהק.

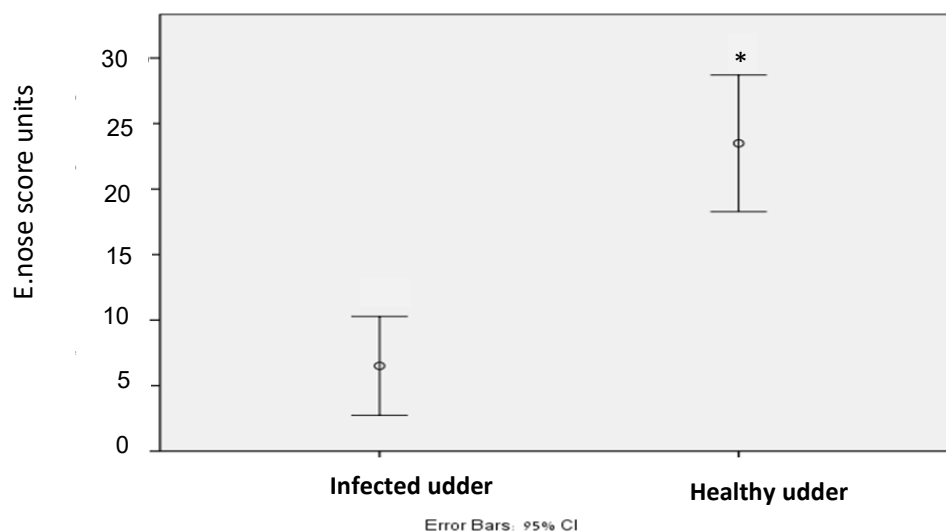
דוגמאות החלב שאולחו בחיידקים הורצו במכשיר ה GCMS בשיטת ה HS-SPME. בטבלה 2 מוצגים החומרים שהופיעו במבחנות החיידקים באחוזי זיהוי גבוהים של מעל 90%. חומרים אלו נמצאו בכל המבחנות שבדקו בזמנים 5,7,24 שעות להדגרה. חומרים אלו לא נמצאו במבחנות הביקורת של חלב שלא אולח בחיידקים השונים בכל זמני ההדגרה. הטבלה אינה מתארת עשרות חומרים באחוזי זיהוי נמוכים יותר.

CNS	RT	compound	% accuracy
S.Auerus	36.74	ETHYL LAURATE	99
	32.98	DECANOIC ACID	98
	33.55	ETHYL CAPRATE APRINATE	98
	6.77	ETHYL BUTANOATE	97
	30.39	Nonanoic acid	96
	36.27	Lauric acid	95
	38.75	Tetradecanoic acid	95
	39.15	ETHYL MYRISTATE	95
CNS	36.28	dodecanoic acid	98
	32.95	DECANOIC ACID	96
	3.05	Butanal, 3-methyl	94
	8.46	2,4-Dimethyl-1-heptene	91
DYS	16.55	Isodecane	97
E.coli	20.44	Benzaldehyde, 3-methyl	94
	6.69	OCTANE	94

טבלה מס' 2 – חומרים יחודיים לחיידקים השונים שאולחו חלב והודגרו במבחנות.

4.2 השוואת פרופילי הריח של חלב הנחלב מפרות עם רבע דלקתי לחלב הנחלב מרבע בריא באמצעות מכשיר האף האלקטרוני.

בשלב הבא נקבע פרופיל ריח באמצעות מכשיר האף האלקטרוני של חלב הנחלב משני רבעי עטין (בריא וחולה) של אותה פרה. בשבע פרות שזוהו כנגועות בחיידק CNS בוצעה בדיקת California Mastitis Test (CMT) לזיהוי הרבעים הנגועים והבריאים. נדגם חלב מרבע בריא ורבע חולה ובוצעה באנליזה באף האלקטרוני לקביעת פרופיל הריחות. CMP מהשוואת פרופילי הריח של חלב הנחלב מרבעים בריאים ורבעים נגועים נמצא כי ישנו שוני מובהק בין פרופילי הריח של דוגמאות החלב מהרבעים השונים בהשוואה אחד לשני (גרף מס' 2). תוצאות אלו מרמזות כי כאשר ישנו פרופיל ריח המהווה בסיס להשוואה ניתן לזהות דלקות עטין תת קליניות בעזרת השינוי בפרופיל הריח.



גרף 2: פרופיל ריח ממכשיר אף אלקטרוני של חלב שנחלב מרבעים בריאים ומרבעים נגועים. פרות נחלבו משני רבעים: נגוע בדלקת עטין (infected udder) וללא דלקת עטין (Healthy udder). החלב נלקח לאנליזה באף אלקטרוני. תוצאות האנליזה המוצגות הם מחיישן 7. חיישנים 2,6,8,9 הגיבו בצורה דומה. (n=7) מבחן T מזווג (p<0.05)

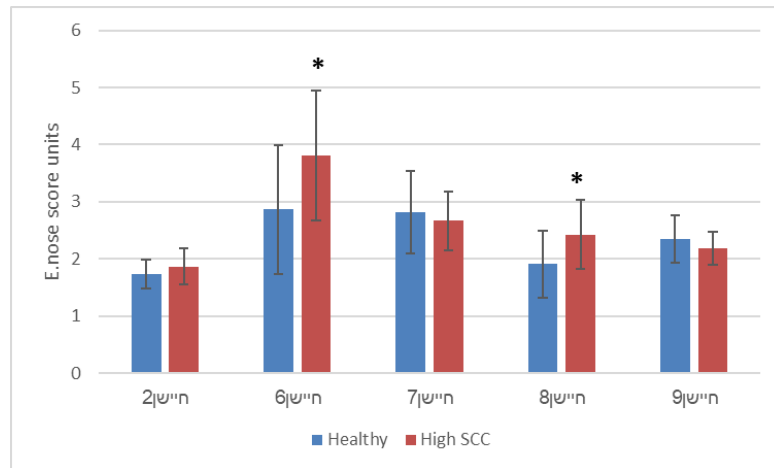
4.3 השוואת פרופילי הריח של חלב הנחלב מפרות עם דלקות עטין הנגרמים מפתוגנים שונים לחלב הנחלב מפרות בריאות באמצעות מכשיר האף האלקטרוני.

בשלב הבא נבדקה היכולת של האף האלקטרוני להבחין בין חלב מפרות בריאות שונות לבין חלב מפרות נגועות בדלקת עטין. נעשה דיגום רחב של חלב מפרות נגועות וחלב מפרות נקיות ובריאות. מטרת דיגום זה היא לזהות פרופילי ריח אופייניים לחלב הנחלב מפרה נגועה בדלקת עטין לבין חלב הנחלב מפרה בריאה. בנוסף לכך, נערך זיהוי מיקרוביאלי לגורם המחלה בפרה הדלקתית ונעשה ניסיון לבחון האם יש פרופיל ריח אופייני לחלב הנחלב מפרה דלקתית בפתוגן מסוים. הפרות נבחרו לפי רמת הסת"ס בחלב. פרות שתוצאת הסת"ס שלהן היתה נמוכה מ 150,000 תאים למ"ל נבחרו כפרות בריאות ואילו פרות שרמת הסת"ס שלהן היתה מעל 400,000 למ"ל נבחרו כפרות נגועות. החלב של פרות אלו נשלח לבדיקה מיקרוביאלית במעבדה המרכזית של מועצת החלב ונעשה זיהוי של הפתוגן המדויק. בטבלה מס' 2, ניתן לראות את סיכום אבחון הפרות.

פתוגן	ממוצע סת"ס * 1000	מס. פרות נדגמות
בריאה	63	14
לא זוהה	1750	11
CNS	1550	15
DYS	6125	9

טבלה מס' 2 – סיכום פרות מבחנת סת"ס ונגיעות בפתוגן פרות ממשק
 כפר גלעדי נבחרו לפי רמת הסת"ס. החלב של הפרות נשלח לזיהוי הפתוגן
 במעבדה המרכזית של מועצת החלב.

בניסוי זה נמצא שהאף האלקטרוני אינו יודע להבחין בין פרות הנגועות בפתוגנים השונים. לעומת זאת, חיישנים 6 ו 8 הצליחו להבחין באופן מובהק בין פרות שאובחנו כבריאות לבין פרות בעלות סת"ס גבוה (גרף מס' 3).

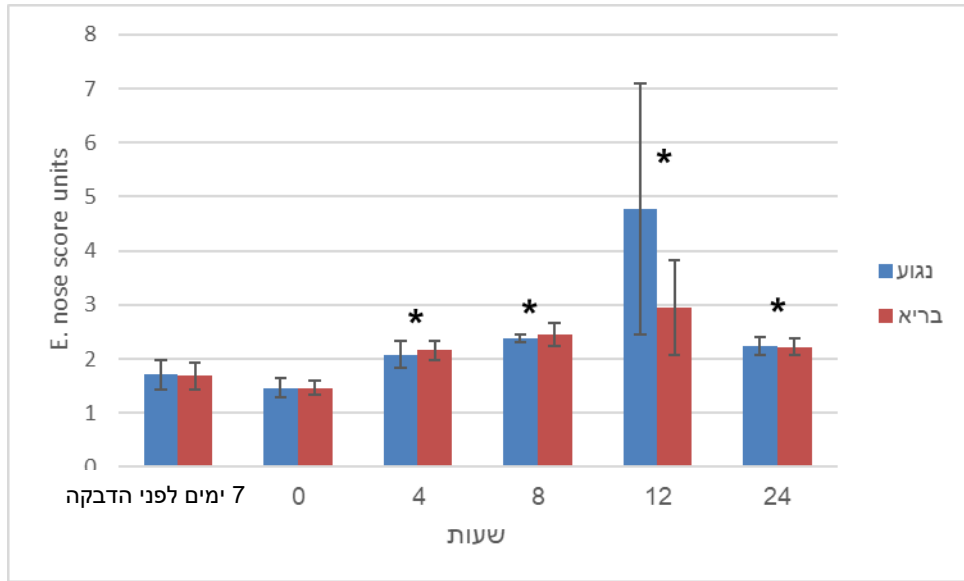


גרף מס' 3 – פרופיל הריחות שנמדדו ע"י חיישנים שונים באף האלקטרוני של פרות בריאות ופרות בעלות סת"ס גבוה. החלב של פרות בריאות (n=14) ופרות בעלות סת"ס גבוה (n=34) נמדד במכשיר האף האלקטרוני. ($p < 0.05$)

4.4 השפעת הדבקת פרות בחיידק E.coli על פרופיל הריחות באף אלקטרוני ומכשיר ה GCMS ומדדי איכות לחלב.

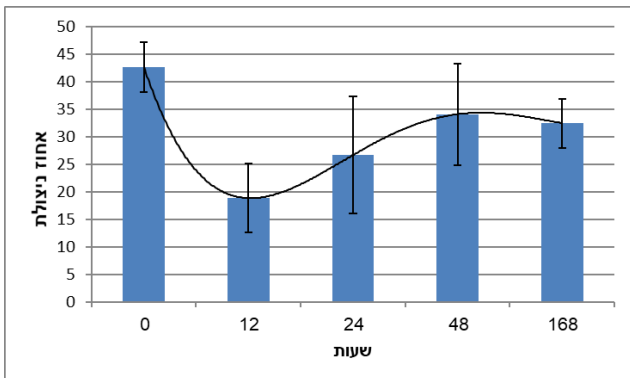
שש פרות הודבקו בחיידק E.coli בכמות של 140 חיידקים ברבע אחד מתוך ארבעת הרבעים. הפרות נחלבו כל 12 שעות ממועד ההדבקה וכן נלקחו דוגמאות חלב לבדיקות באף אלקטרוני במועדים נוספים (0,4,8,12 שעות). בגרף מס' 4 מוצגות תוצאות פרופיל הריחות כפי שנמדד באמצעות חיישן 8 של האף האלקטרוני. ניתן לראות שעד 12 שעות לא היה הבדל בין פרופיל הריחות של הרבע הנגוע לרבע הבריא. אולם, פרופיל הריחות במועדי האיסוף של 4,8,12,24 שעות מההדבקה היה שונה באופן מובהק מפרופיל הריחות של זמן האפס ופרופיל הריחות שנמדד שבעה ימים לפני ההדבקה. להשוואה סטטיסטית זו נלקחו גם הרבעים הבריאים וגם הרבעים הנגועים. תוצאה דומה התקבלה גם בפרופיל הריחות שהתקבל בחיישן מס' 6.

כשנמדדה תנובת החלב מהרבעים הבריאים התקבלה ירידה בתנובה עד 50 שעות מההדבקה ולאחר מכן עלייה בתנובה (גרף מס' 5א). ברבעים הנגועים היתה ירידה דרמטית ב 50 השעות הראשונות עד כמעט שלא היה ייצור של חלב. ראוי לציין שלאחר 12 שעות מההדבקה, הרבעים הנגועים לא ייצרו חלב אלא סרום ללא מוצקים. בנוסף לכך, פרה אחת קרסה במהלך הניסוי כתוצאה מההדבקה. ניצולת יצירת הגבן ירדה ב 50% (מ 40% ל 20% ניצולת) תוך 12 שעות מההדבקה (גרף מס' 5 ב). לאחר מכן היתה עלייה בניצולת הגבן עד שבעה ימים לאחר ההדבקה, אולם עדיין הניצולת היתה נמוכה ב 25% מהניצולת בפרה הבריאה. ריכוז המוצקים ירד ב 12 השעות לאחר ההדבקה (גרף מס' 5ג) אולם חזר לרמתו המקורית לאחר 24 שעות. ראוי לציין העובדה שאמנם ריכוז המוצקים חזר לרמתו המקורית אולם ניצולת הגבן נשארה נמוכה. בנוסף לכך, נמדד ריכוז חיידקי E.coli בחלב מהרבעים הנגועים ונמצא שהיתה עלייה של פי 100 בריכוז החיידקים תוך 12 שעות מההדבקה ולאחר מכן ירידה עד לרמת ההדבקה כשבעה ימים לאחריה (מידע אינו מוצג)

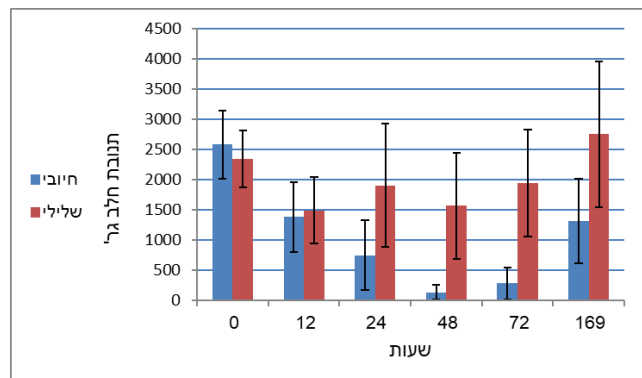


גרף מס' 4 : פרופיל הריחות שנמדד באמצעות חיישן 8 באף האלקטרוני מרבעים נגועים ובריאים של פרות שהודבקו בחיידק E.coli. פרות (n=6) הודבקו בשני רבעים בחיידק E.coli. חלב מרבעים נגועים ובריאים נאסף כשבעה ימים לפני ההדבקה וכמספר שעות לאחר ההדבקה (0,4,8,12,24). פרופיל הריחות נמדד ע"י האף האלקטרוני ונעשתה אנליזה של repeated measure ANOVA (p<0.05) לבדיקת המובהקות של שני הרבעים, נגוע ובריא, מכל מועד יחסית לזמן האפס.

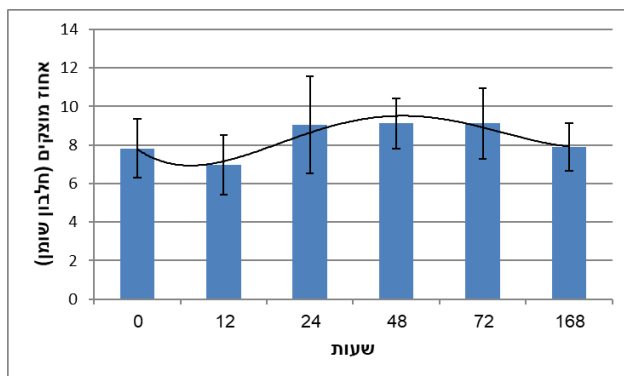
ב.



א.



ג.



גרף מס. 5 – תנובת החלב (א) ניצולת הגבן (ב) וריכוז המוצקים (ג) בפרות שהודבקו בחיידק e.coli. פרות הודבקו בחיידק E.coli ונחלבו כל 12 שעות ממועד ההדבקה. תנובת החלב נמדדה כל 12 שעות (5 מרבעים נגועים (כחול) ורבעים בריאים (אדום)). ניצולת הגבן וריכוז המוצקים נמדדו רק לחלב מרבעים בריאים.

מהפרות שהודבקו בחיידק ה E.coli נלקחו דוגמאות חלב בזמנים שבוע לפני ההדבקה, בזמן אפס ו 12 שעות לאחר ההדבקה. דוגמאות החלב נלקחו מהרבע המודבק ומהרבע שלא הודבק בחיידק. הדוגמאות הורצו בכרומטוגרפיה בשיטת HS-SPME-GCMS. בטבלה 3 מוצגים מספר הפרות שבחלב שלהן זוהו החומרים השונים (רמת זיהוי מעל 90%). ניתן לראות שהחומצה האצטית והחומר Heptanone לא זוהו הביקורת של שבוע לפני ההדבקה, בזמן ההדבקה ולעומת זאת זוהו לאחר 12 שעות בעטינים הנגועים. החומצה האצטית זוהתה לאחר 12 שעות גם בחלב שנחלב מהעטינים הלא נגועים.

	7 ימים לפני הדבקה	זמן אפס	עטין לא נגוע זמן 12	עטין נגוע זמן 12
Ethene	3	4	2	2
Acetic acid	0	0	4	4
Hexanal	2	2	3	1
Butanoic acid	6	6	5	5
Octane	5	5	6	3
Heptanone	0	0	0	3
Hexanoic acid	5	3	5	3
Decane	4	4	5	6
Nonane	4	5	5	0
Hexadecane	3	5	4	2
Tetradecane	1	1	1	0
Hexane	2	5	4	0
Octanoic acid	3	3	4	4
ethyl octanoate	3	3	2	4
Benzene	5	5	6	5
ETHYL CAPRATE	4	1	3	3
Tetracosane	4	5	5	3
Dodecanoic acid	2	3	1	4

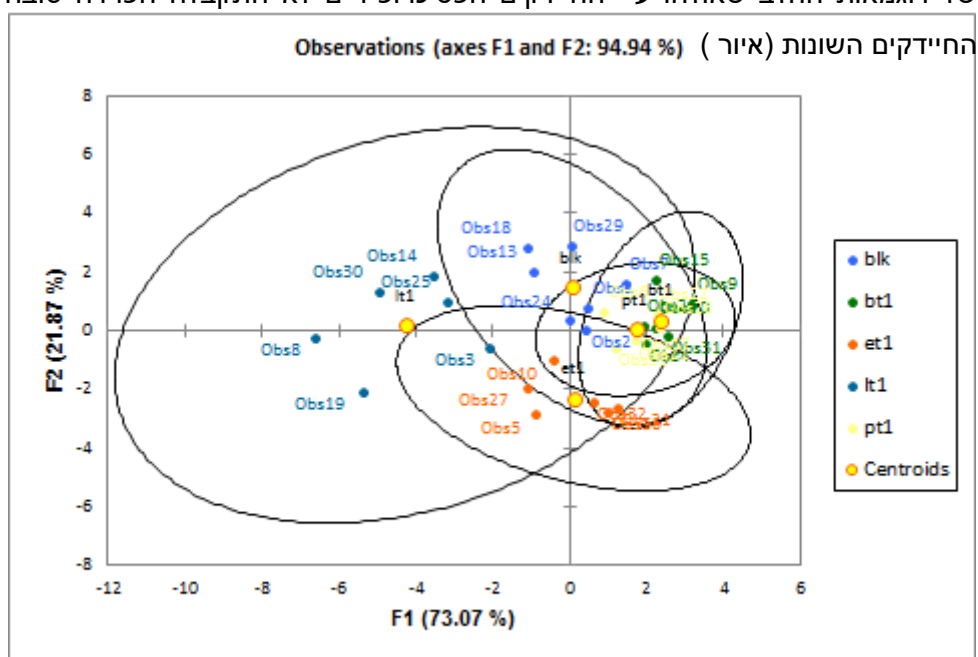
טבלה מס' 3 – נוכחות חומרים בפרות שהודבקו בחיידק ה E.coli. חלב נדגם מפרות שהודבקו בחיידק ה E.coli (n=6) בזמנים שונים ונערכה אנליזת HS-SPME-GCMS. המספרים מייצגים את מספר הפרות שבחלב שלהם זוהו החומרים (רמת זיהוי מעל 90%).

4.5 השוואת פרופילי טעם של דוגמאות חלב שאולחו בחיידקים שונים השכיחים במיכל החלב באמצעות לשון אלקטרונית.

אחת ממטרות המחקר היתה לבדק האם ניתן באמצעות הלשון האלקטרונית לזהות חיידקים פסיכרופיליים השכיחים במיכל החלב. לשם כך, אולחו דוגמאות חלב בחיידקים הבאים :

- 1 E.Coli P4, Bacillus cereus, Pseudomonas fluorescens Migula
- 4 Lactococcus lactis subsp. lactis

ניתן לראות בגרף 6 שבאנליזת DA של הנתונים שהתקבלו מששת החיישנים של הלשון האלקטרונית של דוגמאות החלב שאולחו ע"י החיידקים הפסיכרופיליים לא התקבלה הפרדה טובה בין קבוצות



גרף 6 : א. אנליזת DA לדוגמאות חלב שאולחו ע"י החיידקים הבאים ונבדקו באמצעות מכשיר הלשון האלקטרונית. blk – ביקורת ללא אילוח, bt1 – Bacillus cereus, et1 – E.Coli, lt1 – Pseudomonas fluorescens Migula - pt1, Lactococcus lactis

דלקת עטין היא המחלה הנפוצה ביותר בעדרים מניבי חלב והמקור התחלואתי העיקרי להפסדים כלכליים בייצור חלב. לדלקת העטין שני מופעים: קליני ותת קליני. המופע הראשון ניתן לזיהוי בראייה ומישוש אולם לא קיימת שיטה המסוגלת לאבחן בזמן אמת את נגיעות הפרה בדלקת תת קלינית. ארבעת הפתוגנים המרכזיים בגרימת דלקת עטין בישראל הם: *Staph. Aureus*, *E. coli*, *Strep. Dysgalactiae* (DYS) ו-*Staph. Chromogene* (CNS). מטרת המחקר היא פיתוח שיטה אנליטית חדשה ומהירה לזיהוי פרה הנגועה בדלקת עטין תת קלינית וסוג הפתוגן באמצעות אף אלקטרוני. היתרון של מכשיר זה הוא שהאנליזה מהירה מאד וזולה וניתן לשלבו במערכות החליבה.

בשלב הראשון נבדק פרופיל הריחות של הפתוגנים השונים במערכת *in vitro* ע"י אילוח חלב מפוסטר בחיידקים השונים והדגרה למשך 24 שעות. כביקורת נלקח חלב לא מאולח. נמצא, (גרף מס' 1) שפרופיל הריחות שזוהה ע"י חיישן 2, של החיידק *Strep. Dysgalactiae* (DYS) היה שונה באופן מובהק מהביקורת ומהחיידקים השונים לאחר חמש שעות הדגרה (למעט *E. coli* ב 7 שעות). חיישן 2 לטווח רחב של מוליקולות. החיידק CNS זוהה ע"י חיישן 7 באופן מובהק יחסית לביקורת לחיידקים האחרים בזמן 5 ו 7 שעות לאחר ההדבקה אולם לא זוהה לאחר 24 שעות. חיישן 7 מזהה תרכובות גופרית בעיקר. החיידק *E. coli* זוהה ע"י חיישן 9 אופן מובהק כמו גם החיידק CNS לאחר 7 ו 24 שעות מהאילוח. החיידק *S. Aureus* זוהה רק לאחר 24 שעות הדגרה ע"י חיישן 6. חיישן זה זיהה גם את החיידק CNS. מניסוי זה ניתן לראות שהאף האלקטרוני מצליח לזהות פרופילי ריח יחודיים לחיידקים השונים לאחר 5 שעות הדגרה כתלות בחיידק. בניסוי זה הורצו דוגמאות החלב במכשיר ה GCMS וזוהו חומרים ברמת זיהוי גבוהה הייחודיים לחיידקים השונים ואינם מופיעים בביקורת (טבלה מס' 2). מכשיר האף האלקטרוני שנעשה בו שימוש אינו ייחודי לחומרים מסויימים. היום קיימים חיישנים ספציפיים לחומרים שונים ברגישות גבוהה מאד. החומרים שזוהו בניסוי זה יכולים לשמש כסמן לזיהוי החיידק המסויים באמצעות אף אלקטרוני עם חיישנים ספציפיים.

בשלב הבא נבדק פרופיל הריחות מפרות החולות בדלקת עטין שנגרמה ע"י החיידק CNS. על מנת להימנע משונות וערפילנים הנגרמים מהגנטיקה, הגיל, זמן תחלובה וכו' בעדר נבדק פרופיל הריח של חלב הנלקח מרבע נגוע של פרה והשווה לרבע הבריאה של אותה פרה. בניסוי זה נבדקו שבע פרות ונמצא שפרופיל הריח שזוהה ע"י חיישן מס' 7 שונה באופן מובהק בין חלב מעטין נגוע לחלב מעטין בריא (גרף מס' 2).

בהמשך נבדק פרופיל הריח מחלב של פרות שונות בעדר בקיבוץ כפר גלעדי. בניסוי זה נדגמו פרות בשני מועדים עם רמות סת"ס שונות (טבלה מס' 2). פרות בעלות סת"ס נמוך מ 100,000 למ"ל דורגו כפרות בריאות. פרות בעלות סת"ס הגבוהה מ 400,000 למ"ל נחלבו מהרבע הנגוע, והחלב נשלח לזיהוי החיידק הפתוגן במעבדה המרכזית של מועצת החלב. הפרות בעלות הסת"ס הגבוהה השתייכו לשלו קבוצות: פרות ללא זיהוי מיקרוביאלי, פרות הנגועות בחיידק DYS ופרות הנגועות בחיידק CNS. החלב מפרות משלושת הקבוצות הללו ומקבוצת הביקורת הבריאה נמדד

לאיפיון פרופיל הריח. נמצא (גרף מס' 3) שהאף האלקטרוני אינו מצליח לזהות באופן מובהק את סוגי החיידקים השונים בחלב מפרות במערכת *in vivo*. אולם, כאשר נעשתה סטטיסטיקה בה השווה פרופיל הריח של פרות בריאות לעומת פרות בעלות סת"ס גבוהה נמצא הבדל מובהק בין הקבוצות ע"י חיישנים מס' 6 ו 8.

דלקת עטין הנגרמת ע"י החיידק *E.coli* מאד דרמטית וקשה לזיהוי כיוון שהחיידק נעלם מהעטין תוך זמן קצר מאד מההדבקה. בעבודה זו נעשה ניסוי *in vivo* בפרות ע"י הדבקת שש פרות בחיידק בכמות של 140 חיידקים. ניסוי זה נערך במכון הווטרנרי בבית דגן. חלב נדגם מהפרות שבוע לפני האילוח ונמדדו בו פרמטרים של מספר חיידקים, רמת מוצקים, יעילות הגבנה ופרופיל ריח באמצעות האף האלקטרוני. מיום האילוח בוצעו חליבות כל 12 שעות עד 48 שעות מתחילת הניסוי ונמדדו בו הפרמטרים שצויינו. בנוסף לכך נלקח חלב לאיפיון במכשיר ה GCMS וכן נאספו דוגמאות לאחר 4 ו 8 שעות מההדבקה לבדיקת פרופיל הריח באף האלקטרוני.

ניתן לציין ש 12 שעות לאחר ההדבקה, העטינים הנגועים הפרישו סרום ולא חלב. כלומר, זיהוי הדלקת כדלקת קלינית נעשה כבר לאחר 10-12 שעות. לאיפיון פרופיל הריח של החלב באף האלקטרוני, נלקחו דוגמאות חלב מעטין נגוע ומעטין בריא. נמצא, (גרף 4) שלא היה הבדל בפרופיל הריח של החלב שנלקח מעטין נגוע לבין חלב מעטין שאינו נגוע. אולם, פרופיל הריח של החלב שנלקח לאחר 4 שעות מההדבקה היה שונה באופן מובהק מפרופיל הריח של החלב שנדגם כשבעה ימים לפני הניסוי ובזמן אפס לפני ההדבקה. תוצאה דומה התקבלה גם לאחר 8 שעות מההדבקה. תוצאה זו יכולה להיות מוסברת בכך שפרופיל הריח שנמדד בניסוי זה היה בעיקרו כתוצאה מהתגובה של המערכת האימונית של הפרה להדבקה. תגובה זו התרחשה בשני הרבעים שנמדדו: הנגוע והלא נגוע. בנוסף לכך, תנובת החלב מהרבעים הלא נגועים ירדה ב 40% תוך 12 שעות מההדבקה (גרף 5א). גם אחוזי הניצולת של הגבן ירדו בלמעלה מ 50% ב 12 שעות מתחילת הניסוי (גרף 5 ב'). תוצאות אלו נתמכות בעבודות קודמות, ומסבירות את חוסר ההבדל בפרופיל הריחות בין הרבע הנגוע ללא נגוע באמצעות האף האלקטרוני בשמונה השעות הראשונות לניסוי. המסקנה היא שהמערכת האימונית תורמת בעיקר לפרופיל הריחות בשעות הראשונות לאחר ההדבקה ובהמשך כשעולה ריכוז החיידקים והשפעתם על החלב, משתנה פרופיל הריח של הרבע הנגוע לעומת הרבע הלא נגוע.

בעבודה זו נעשה שימוש גם במכשיר הלשון האלקטרונית לזיהוי הבדלים בחלב המאולח בחיידקים שונים האופייניים למיכל החלב. התוצאות של ניסוי זה מראות שאין הבדל מובהק בפרופיל הטעמים בין קבוצות החיידקים שנבדקו.

- Bezman, D., Lemberskiy-Kuzin, L., Katz, G., Merin, U., and Leitner, G. (2015). Influence of intramammary infection of a single gland in dairy cows on the cow's milk quality. *J. Dairy Res.* 82, 304–311.
- Fleminger, G., Ragonas, H., Merin, U., Silanikove, N., and Leitner, G. (2013). Low molecular mass peptides generated by hydrolysis of casein impair rennet coagulation of milk. *Int. Dairy J.* 30, 74–78.
- Hettinga, K. a, de Bok, F. a M., and Lam, T.J.G.M. (2015). Short communication: Practical issues in implementing volatile metabolite analysis for identifying mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 98, 7906–7910.
- Katz, G., Merin, U., Bezman, D., Lavie, S., Lemberskiy-Kuzin, L., and Leitner, G. (2016). Real-time evaluation of individual cow milk for higher cheese-milk quality with increased cheese yield. *J. Dairy Sci.* 99, 4178–4187.
- Leitner, G., Krifucks, O., Merin, U., Lavi, Y., and Silanikove, N. (2006). Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. *Int. Dairy J.* 16, 648–654.
- Leitner, G., Lavon, Y., 2 Matzrafi, Z., Benun, O., Bezman, D., and and Merin, U. (2016). Pricing of Cow ' s Milk in Relation to Bulk Milk Somatic Cell Count in the Threshold Range of 400×10^3 cells per Milliliter. *Isr. J. Vet. Med.* 71, 10–15.
- Merin, U., Silanikove, N., Shapiro, F., Bernstein, S., and Leitner, G. (2004). Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep and goats. *South African J. Anim. Sci.* 34, 188–191.
- Mohanty, D.P., Mohapatra, S., Misra, S., and Sahu, P.S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health A review. *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 577–583.
- Murphy, S.C., Cranker, K., Senyk, G.F., Barbano, D.M., Saeman, A.I., and Galton, D.M. (1989). Influence of Bovine Mastitis on Lipolysis and Proteolysis in Milk. *J. Dairy Sci.* 72, 620–626.