

مدل سازی تشخیص فراصوتی آلودگی پاکت های شیر UHT به باکتری *Escherichia coli* با شبکه عصبی

مصنوعی

وحید محمدی^۱، رحیم ابراهیمی^{۲*}، مهدی قاسمی ورنامخواستی^۳، مریم عباس والی^۴

۱. کارشناس ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۲. دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۳. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۴. استادیار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۶ - تاریخ تصویب ۱۳۹۴/۲/۱۹)

چکیده

تشخیص آلودگی میکروبی شیر، به عنوان مهم ترین شاخص کیفیت شیر در صنایع لبنی، به کمک روش های نوین مهندسی اهمیت زیادی دارد. در تحقیق حاضر، آلودگی میکروبی پاکت های شیر UHT با استفاده از حسگرهای فراصوتی تشخیص داده شد. پاکت ها به صورت مصنوعی در چهار رقت متفاوت و با سه تکرار به باکتری *E. coli* آلوده شدند. فرکانس مرکزی سنسورهای پیزوالکتریک ۱/۰۲ MHz بود و با ولتاژ پیک ۱۸/۵ V استفاده شدند. برای پایش مشخصه های فراصوتی، فاکتورهای دامنه ولتاژ، و تأخیر زمانی اندازه گیری شدند. شبکه عصبی مصنوعی برای پیش بینی تعداد باکتری و pH پاکت های شیر براساس فاکتورهای فراصوتی طراحی شد. نتایج نشان داد که آلودگی پاکت های شیر در رقت اولیه ۱۰۰۰ CFU/ml پس از ۷/۵ ساعت تشخیص پذیر است به صورتی که با کاهش رقت اولیه باکتری، مدت زمان تشخیص افزایش خواهد داشت. شبکه عصبی مصنوعی آموزش داده شده مقادیر تعداد باکتری و pH را نسبت به داده های تجربی با ضرایب تبیین ۰/۸۷۲ و ۰/۸۵۱ پیش بینی کرد. براساس پژوهش انجام شده، مشاهده می شود که آلودگی میکروبی شیر با استفاده از فراصوت امکان پذیر بوده و برای حصول دقت بالاتر، نیازمند تحقیقات بیشتری است.

کلیدواژگان: آلودگی میکروبی، شبکه عصبی مصنوعی، شیر، فراصوت، *Escherichia coli*

مقدمه

غیرمخرب بودن سیستم تشخیص از ویژگی های مهم پایش آلودگی میکروبی و یا سایر پارامترهای کیفی محصولات غذایی، که برای اطمینان از سلامت و کیفیت محصول مدنظر قرار می گیرد، است. آزمون های غیرمخرب و غیرتهاجمی فراصوتی برای تشخیص تغییرات مشخصه های فیزیکی-شیمیایی و آلودگی های گوناگون مواد غذایی در زمینه کنترل کیفیت فراورده های غذایی علاقه مندی به سزایی ایجاد کرده است (Pallav et al., 2009). از این رو تشخیص آلودگی میکروبی شیر، به عنوان مهم ترین شاخص کیفیت شیر، به کمک روش های نوین مهندسی اهمیت زیادی دارد (Ghasemi-Varnamkhasti et al., 2010). از طرفی روش های متداول تشخیص بار میکروبی شیر و محصولات لبنی مستلزم جداسازی نمونه، کشت، گرمخانه گذاری، و تهیه رقت های گوناگون است که معمولاً چندین ساعت به طول می انجامد و نیازمند رعایت اصول و

ضوابط بهداشتی هستند. بنابراین این روش ها تاحدی پیچیده، هزینه بر، زمانبر، و گاهی اختصاصی اند (Quigley et al., 2011). نتایج تحلیلی با استفاده از امواج فراصوت توان پایین (با سطح توانی کمتر از 1 Wcm^{-2}) حاصل می شوند که عموماً در محدوده فرکانسی ۱ تا ۱۰ MHz هستند (Awad et al., 2012). این نوع از کاربردها غیرمخرباند و برای سنجش های کیفی استفاده می شوند. به هر حال در روش های تحلیلی مواد غذایی معمولاً فاکتورهای زمان پرواز و میزان جذب صدا اندازه گیری می شوند که اطلاعاتی از بافت، ساختار، چسبندگی، و غلظت را فراهم می سازند (Mohammadi et al., 2014). شایان ذکر است که امواج فراصوت تحلیلی به هنگام عبور، هیچ گونه تغییرات فیزیکی و یا شیمیایی در خواص ماده ایجاد نمی کند (Tiwari et al., 2012).

Elvira et al. (2006) وسیله هشت کاناله فراصوتی برای تحلیل غذای مایع بسته بندی شده را ارائه دادند و برای بازرسی شیر UHT درون پاکت های کارتنی از آن استفاده کردند و همچنین بیان داشتند که سایر مواد غذایی مایع مانند آب میوه ها

پاکت‌ها، وسایل و تجهیزات، در معرض هوا بودن شیر، و نبودن شست‌وشوی مناسب قطعات صورت گیرد (Chen *et al.*, 2011). پژوهش‌های فراوانی حضور *E. coli* را در شیر و محصولات لبنی گزارش کرده و این باکتری را به‌عنوان باکتری بیماریزا و مدل مناسب بیولوژیکی بررسی کرده‌اند (Elvira *et al.*, 2005; Carneiro *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011).

بنابراین با مرجع قراردادن کار پژوهشی Elvira *et al.* (2010 & 2006, 2005) و ساخت و ارزیابی دستگاه براساس مقالات منتشرشده آنان، سالم و آلوده‌بودن پاکت‌های شیر UHT بررسی شد. برای انتخاب فرکانس، فاکتورهای بررسی‌شده، نوع سنسورهای پیزوالکتریک، و شرایط آزمایش به مقالات Elvira و همکاران استناد شد. از سوی دیگر در کار حاضر از رقت‌های متفاوت، پاکت‌های ۲۰۰ cc، و مدل‌سازی شبکه عصبی مصنوعی برای افزایش عملکرد سیستم استفاده شد.

بنابراین در این پژوهش از فراصوت برای تشخیص غیرمخرب آلودگی پاکت‌های شیر UHT به میکروب *E. coli* استفاده شده است. همچنین برای افزایش دقت سامانه و پیش‌بینی سریع آلودگی میکروبی پاکت‌ها از شبکه عصبی مصنوعی استفاده شده است. بنابراین پژوهش حاضر امکان پیش‌بینی آلودگی میکروبی پاکت‌های شیر را براساس مشخصه‌های فراصوتی آن‌ها بررسی کرده است.

مواد و روش‌ها

مواد و تجهیزات آزمون‌های میکروبی

در این پژوهش از پاکت‌های شیر استرلیزه ۲۰۰cc به‌عنوان محیط کشت طبیعی و عاری از میکروب‌های رقیب استفاده شد. پاکت‌ها تهیه شدند و به آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه شهرکرد انتقال داده شدند. برای ایجاد آلودگی مصنوعی پاکت‌ها، از باکتری *Escherichia coli* استفاده شد. به‌منظور انجام آزمون‌های فراصوتی و کنترل شرایط آزمایش سامانه‌ای که در شکل ۱ نشان داده شده است، تهیه و ساخته شد. برای کنترل شرایط دمایی و رطوبتی مورد نظر محفظه‌ای شیشه‌ای مانند آکواریومی ساخته شد. ابعاد آکواریوم ۳۰×۵۰×۸۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد تا فضای کافی برای اتاقک تست و محیطی که پاکت‌های شیر در آن به تعادل حرارتی برسند و نگهداری شوند، فراهم باشد. محفظه اندازه‌گیری تا ارتفاع ۷ سانتی‌متر از آب پر شد. بخاری ضد آبی برای ثابت نگه‌داشتن دمای آب و پاکت‌های شیر در ۳۵°C غوطه‌ور در کف محفظه قرار داده شد (Elvira *et al.*, 2005). بخاری قادر به کنترل تغییرات دمای حمام آب با دقت $\pm 0.5^\circ\text{C}$

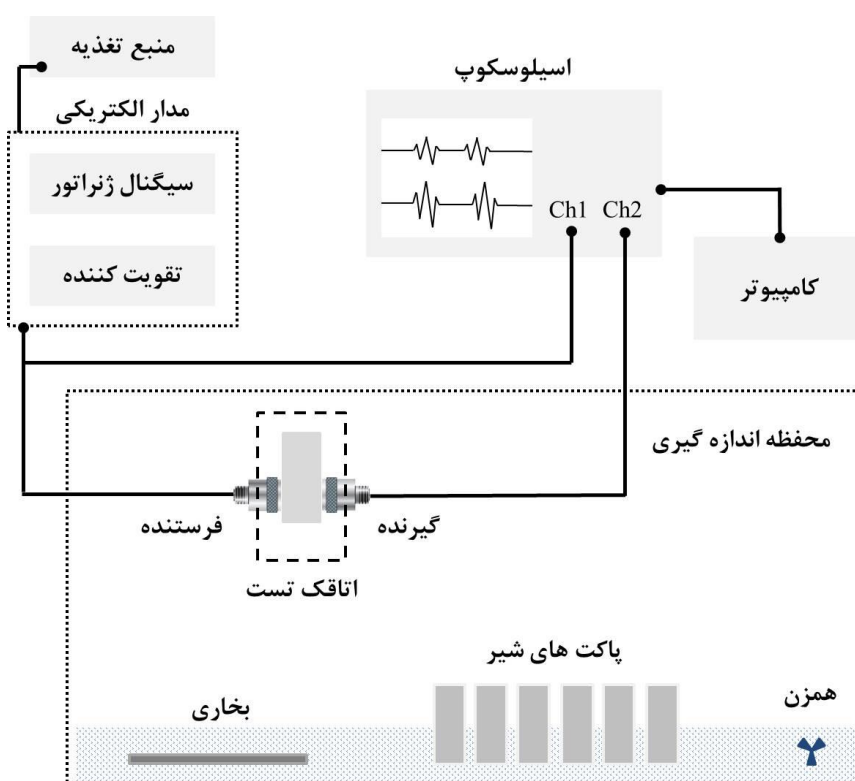
یا سوپ‌ها می‌توانند با این سامانه آنالیز شوند. پس از شروع شدن فرایند، تمام مراحل توسط کامپیوتر پایش می‌شد و دامنه و تأخیر زمانی انتشار پالس از میان شیر سنجیده و با دما و رطوبت در فایل ذخیره می‌شد (Elvira *et al.*, 2010). آن‌ها تغییرات پارامترهای دامنه نوسان و تأخیر زمانی را که توسط میکروب‌های گوناگون ایجاد می‌شد کشف کردند؛ حتی زمانی که سایر پارامترهای شیمیایی و فیزیکی هنوز در حد استریل باقی بودند آن‌ها گزارش کرده‌اند که بسته‌های شیر UHT به سه نوع میکروب (*Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris* and *Bacillus pumilus*) در غلظت‌های گوناگون آغشته شدند. ایشان بیان داشته‌اند که تفاوت‌ها در سرعت و دامنه امواج فراصوت علائم رشد این میکروارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد. همچنین آنها اشاره کرده‌اند که تشخیص رشد میکروبی وابسته به تعداد و نوع میکروب‌ها است (Elvira *et al.*, 2010). (Elvira *et al.*, 2014) در پژوهشی رشد میکروارگانیسم‌ها را در آب‌میوه بررسی کردند. آن‌ها اظهار داشته‌اند که آلودگی میکروبی تأثیر چشمگیری بر خواص فراصوتی آب‌میوه داشته و تشخیص آلودگی وابسته به نوع آب‌میوه و باکتری بوده است.

از شبکه‌های عصبی مصنوعی برای پیش‌بینی رشد میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی طی فرایندهای گوناگون استفاده شده است (Geeraerd *et al.*, 1998; Sofu & Ekinci, 2012; Fievez *et al.*, 2007). در پژوهشی رشد میکروبی به کمک شبکه عصبی مصنوعی مدل‌سازی شد (Jeyamkondana *et al.*, 2001). شبکه عصبی آن‌ها برای رشد میکروب‌های *Shigella flexneri*, *Aeromonas hydrophila* و *Brochothrix thermosphacta* آموزش داده شد. آن‌ها گزارش کرده‌اند که همبستگی داده‌های تجربی و داده‌های پیش‌بینی‌شده شبکه مناسب بوده‌اند و اشاره کرده‌اند که شبکه مذکور مناسب برای استفاده در تولیدات غذایی و کاربردهای میکروبیولوژی است. مدلی احتمالی به کمک شبکه عصبی برای رشد و عدم رشد میکروب‌ها ارائه شد (Hajmeer & Basheer, 2002). آن‌ها گزارش کرده‌اند که شبکه عصبی ایشان توانایی دسته‌بندی بار میکروبی نمونه‌ها و تعیین حالت میکروبی‌نبودن را داشته است (Hajmeer & Basheer, 2002). در پژوهش دیگری، Duan *et al.* (2014) با ابزار غیرمخرب فرورسخت تعداد کل باکتری‌ها را در فیله ماهی پیش‌بینی کردند. آنها گزارش کرده‌اند که نتایج مربوط به پیش‌بینی تعداد باکتری توسط شبکه عصبی به نسبت رگرسیون مناسب‌تر بوده است.

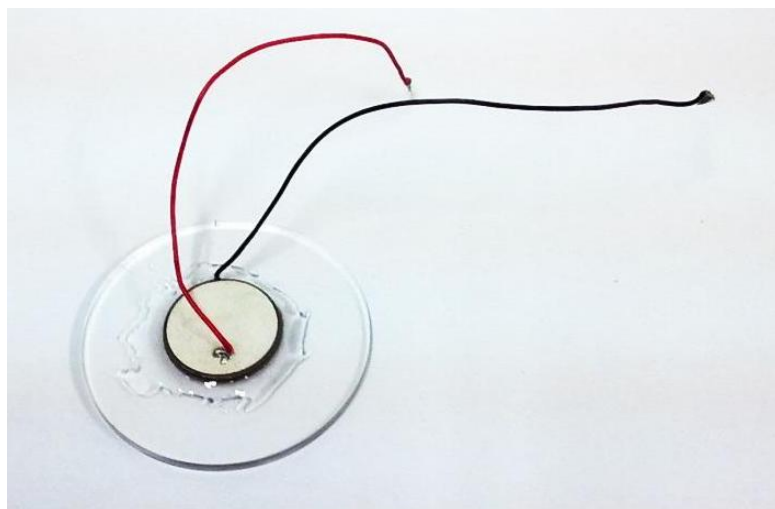
آلودگی میکروبی ناشی از باکتری‌های گرم منفی به‌سرعت موجب فساد شیر می‌شود که می‌تواند از طریق روش پرکردن

یک لایه نازک سیلیکونی با ضخامت یک میلی‌متر بهره گرفته شد (Elvira et al., 2006). همچنین برای عبور امواج فراصوتی از پاکت شیر و دریافت آن‌ها توسط حسگر گیرنده مداری برای تولید و تقویت امواج فراصوتی طراحی و ساخته شد. مدار الکتریکی مذکور قادر به تولید امواج فراصوتی در فرکانس MHz ۱/۰۲ و تقویت ولتاژ اولیه تا ولتاژ پیک ۱۸/۵ V برای حسگرهای فراصوتی بود. در واقع این مدار هم وظیفه تولید امواج را برعهده داشت و هم به‌عنوان تقویت‌کننده عمل می‌کرد.

بود. در صورت تغییر درجه حرارت محفظه، پمپ حرارتی روشن می‌شد و دوباره حمام آب به دمای مورد نظر می‌رسید. دیسک‌های پیزوالکتریک با فرکانس کاری MHz ۱/۰۲ خریداری شد. دیسک‌های پیزوالکتریک دارای ضخامت و قطر به ترتیب ۲ و ۲۰ میلی‌متر بودند. یک عدد دیسک پلکسی‌گلس با ضخامت ۳ میلی‌متر و قطر ۵۰ میلی‌متر بر طرف مثبت کریستال پیزوالکتریک چسبانده شد (شکل ۲). برای توزیع بهتر حسگر با سطح دیواره پاکت و نبود حباب‌های هوا بین حسگر و پاکت از



شکل ۱. طرحواره سامانه انجام آزمون های فراصوتی



شکل ۲. مبدل فراصوتی؛ دیسک پیزوالکتریک با چسب مناسب روی قرص پلکسی‌گلس چسبانده شده است.

روش انجام آزمایش‌ها

ابتدا برای تعیین بازه استریلی بودن شیر توسط دستگاه فراصوتی تعداد ۲۰ عدد پاکت استریل انتخاب و مورد آزمایش قرار داده شدند (Elvira et al., 2010). پاکت‌ها چندین ساعت قبل از شروع آزمایش‌ها در محفظه اندازه‌گیری قرار گرفتند تا به تعادل دمایی با آب 35°C رسیدند. در این شرایط هر بار یک عدد از پاکت‌ها درون اتاقک تست قرار داده و فاکتورهای دامنه ولتاژ و تأخیر زمانی اندازه‌گیری شدند. بر این اساس حد استریلیزه بازه $2/32$ تا $2/48$ تعیین شد. همچنین برای فاکتور تأخیر زمانی حد استریلیزه را بازه 318ns تا 268ns تشکیل داد. از باکتری مذکور روی محیط PCA (Plate Count Agar) کشت خطی داده شد. پلیت‌ها در گرمخانه با دمای 35°C قرار داده و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، از باکتری یک کلنی تک به محیط TSB (Tryptic Soy Broth) استریل منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه 35°C قرار داده شدند. پس از گذشت این مدت تعداد باکتری نمونه به 1×10^9 CFU/ml رسید. سپس از میکروب در محیط کشت برات سریال دایلوژن ده‌دهی در نرمال سیلین تهیه شد. از رقت‌های 10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، و 10^6 CFU/ml، به مقدار $0/2$ میلی‌لیتر به پاکت‌های 200cc در شرایط کاملاً استریل تزریق شد. برای این کار محل قبل از تزریق با الکل ضدعفونی شد و پس از تلقیح نیز محل سوراخ با چسب مناسب کیپ شد. تلقیح باکتری توسط سرنگ‌های یک‌میلی‌لیتری استریل صورت گرفت. بنابراین رقت نهایی میکروب در پاکت‌های شیر به ترتیب 10^1 ، 10^2 ، و 10^3 CFU/ml شد. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند و ۵ نمونه کنترل هم در نظر گرفته شد که فقط نرمال سیلین به درون پاکت‌های شیر تزریق شد. پاکت‌ها درون محفظه قرار گرفتند و پس از تعادل حرارتی آن‌ها با آب، به اتاق تست منتقل شدند. امواج فراصوتی در فرکانس $1/02$ MHz توسط حسگر فرستنده منتشر و با حسگر گیرنده دریافت شدند. پس از تلقیح میکروب به داخل پاکت در اول صبح، آزمون‌های فراصوتی به فاصله یک ساعت و نیم انجام شدند. هر زمان که دستگاه فراصوتی تغییری را تشخیص داد، برای شمارش بار میکروبی شیر یا Total Count، در ۷ لوله آزمایش مقدار ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل، سپس یک میلی‌لیتر از نمونه شیر هر پاکت را در لوله اول ریخته، پس از آن به میزان ۱ میلی‌لیتر از لوله اول برداشته در لوله دوم ریخته و به همین ترتیب تا لوله آخر ادامه داده شد تا رقت‌های مورد نظر ایجاد شد. در هر مرحله با پیپت سرم فیزیولوژی هم زده شد و به صورت یکنواخت درآمد. به منظور شمارش از سه رقت آخر،

یک‌دهم میلی‌لیتر جداگانه برداشته شد و به صورت Pure Plate کشت داده شد و در دمای 35°C به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه گذاشته شد. پس از آن تعداد کلنی‌ها شمارش شد و میانگین شمارش‌شده را در رقت‌های گوناگون محاسبه و به‌عنوان بار میکروبی شیر در نظر گرفته شد (Bylund, 1995). همزمان با بازشدن پاکت، همان نمونه مورد آزمایش pH قرار گرفت. برای انجام آزمون pH از دستگاه Electrochemical Analyser (Consort C933, Belgium) با دقت $0/01$ استفاده شد.

طراحی مدل شبکه عصبی مصنوعی

در این پژوهش از شبکه‌های عصبی پرسپترون چندلایه (MLP) برای پیش‌بینی آلودگی میکروبی پاکت‌های شیر بر مبنای مشخصه‌های فراصوتی استفاده شد. شبکه‌های عصبی پرسپترون ابزارهایی هستند که در توپولوژی شبکه‌های عصبی مصنوعی کاربرد گسترده‌ای دارند. این شبکه‌ها دارای لایه ورودی، یک یا چند لایه پنهان و لایه خروجی هستند. تعداد لایه‌ها و نورون‌ها در لایه مخفی به‌طور معمول از آزمون و خطا مشخص می‌شوند. روش یادگیری شبکه‌های MLP به صورت پس‌انتشار خطا است، زیرا خطای خروجی مدل به عقب و به داخل سیستم برگردانده می‌شود تا تجدید و تنظیم وزن‌های لایه‌های پنهان انجام شود. بنابراین، با تصحیح پیوسته خطا، وزن‌های مناسب برای سیستم به دست می‌آید (Jimenez-Marquez et al., 2005). سپس با مقایسه نتایج مطلوب در زمینه کارایی مدل قضاوت می‌شود. برای مقایسه عملکرد شبکه‌های عصبی ساخته شده از میانگین مربعات خطا (MSE) و ضریب تبیین (R^2) استفاده شد. یکی از روش‌های افزایش تعمیم‌پذیری شبکه، روش توقف زودرس است؛ در این حالت ۱۵ درصد داده‌ها برای آزمون، ۱۵ درصد برای اعتبارسنجی، و ۷۰ درصد برای آموزش شبکه در نظر گرفته شد. این داده‌ها به صورت تصادفی از میان نمونه‌های ورودی انتخاب شدند.

برای متغیرهای ورودی شبکه، دامنه ولتاژ و تأخیر زمانی امواج فراصوتی، و برای متغیرهای لایه خروجی، تعداد میکروب و pH نهایی شیر انتخاب، و شبکه‌های گوناگون طراحی و آموزش داده شد. به منظور یافتن بهترین توپولوژی متناسب با مسئله، تعداد یک لایه پنهان با ۸-۴۰ نورون و ۵۰-۱۵۰۰ دوره یادگیری آزمایش شد. برای انتخاب توابع فعال‌سازی، در لایه‌های گوناگون شبکه، توابع تانژانت زیگموئید (tansig)، لگاریتم زیگموئید (logsig)، و انتقال خطی (purelin) آزمون شدند. در نهایت تابع لگاریتم زیگموئید و تابع انتقال خطی به ترتیب در

کاهش داشته است. میکروب‌ها برای رشد و تکثیر از مواد آلی مانند پروتئین‌ها، چربی‌ها، و قندها تغذیه می‌کنند که این عامل بر خواص مکانیکی محیط حامل امواج فراصوت تأثیرگذار است. همچنین رشد میکروب‌ها، ترشح آنزیم‌هایی را در پی دارد که می‌تواند عامل دیگری برای تغییرات الاستیسیته و ویسکوزیته محیط باشد. (Resa et al., 2007) تغییرات سرعت عبور امواج فراصوت را با افزایش رشد باکتری‌ها گزارش کرده‌اند و این تغییرات را در اثر تبدیل قندها به اسیدلاکتیک دانسته‌اند. در پژوهش دیگری آن‌ها به یک رابطه خطی بین سرعت امواج فراصوت و تعداد آنزیم‌ها دست یافتند. همچنین بیان شد که تغییرات در سرعت امواج فراصوت تابع غلظت قندهای محلول و تعداد آنزیم‌هاست (Resa et al., 2009).

تغییرات در ساختار و خواص شیر بر اثر رشد میکروارگانیسم‌ها که موجب تغییر ویسکوزیته و الاستیسیته شیر می‌شود، توسط سایر محققان گزارش شده است (Ruas-Madiedo et al., 2002a; Ruas-Madiedo et al., 2002; Ruas-Madiedo et al., 2005). Park (2007) در تحقیقی نشان داد که ویسکوزیته شیر از عواملی چون حالت و غلظت چربی، پروتئین‌ها، pH، و مدت ماندگاری شیر تأثیر می‌پذیرد. همچنین برخی محققان گزارش کرده‌اند که افزایش محتوای پروتئینی موجب افزایش ویسکوزیته ظاهری فرآورده شد. آن‌ها بیان داشتند که ویسکوزیته شیر با مقدار مواد جامد محلول در آن رابطه مستقیم داشت (Martin-Diana et al., 2003).

با توجه به شکل ۵ بهترین زمان تشخیص آلودگی باکتری *E. coli* (۷/۲۵ ساعت) در رقت اولیه ۱۰۰۰ CFU/ml بوده است و هرچه غلظت اولیه باکتری کمتر بوده، تشخیص آلودگی دیرتر امکان‌پذیر بوده است. بنابراین زمان تشخیص ارتباط مستقیمی با رقت اولیه میکروب تلقیح‌شده به پاکت دارد (Montero de Espinosa et al., 2003). زمانی که رشد باکتری به مرحله‌نمایی می‌رسد، تعداد باکتری‌ها با سرعت زیادی افزایش می‌یابد که متعاقب آن تغییرات چشمگیری بر خواص فیزیکی شیمیایی شیر خواهد داشت و تشخیص آلودگی را تسهیل می‌کند (Nguyen et al., 2009). دستگاه فراصوت توانست *B. cereus* را در رقت ۱۰۰۰ CFU/ml پس از ۱۰ ساعت تشخیص دهد و در بالاترین حالت، دستگاه آلودگی پاکت‌های شیر مربوط به *S. aureus* را در رقت ۱ CFU/ml پس از ۱۲/۵ ساعت تشخیص داد (Mohammadi, 2013).

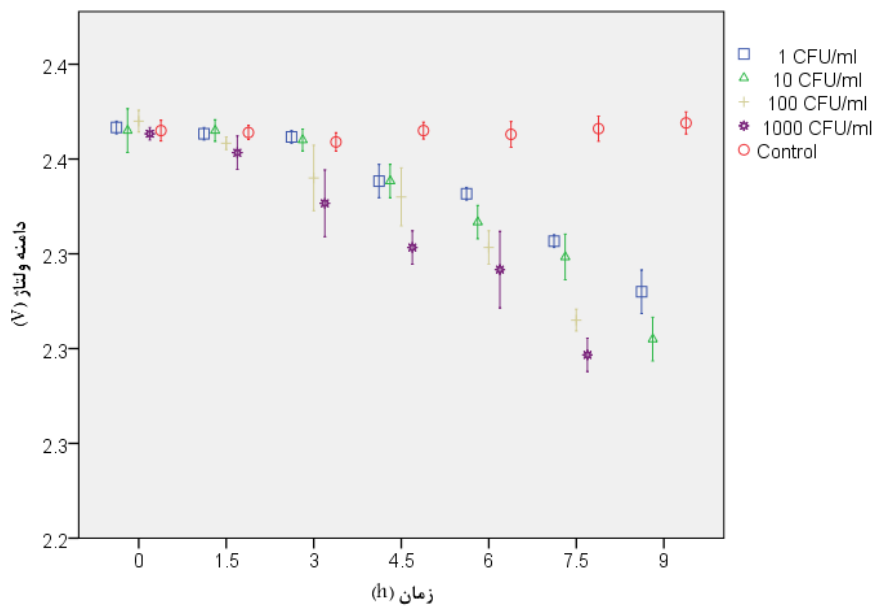
لایه‌های پنهان و خروجی به‌عنوان توابع فعال‌سازی استفاده شدند. تمامی شبکه‌های طراحی و آموزش‌داده‌شده در محیط نرم‌افزار MATLAB نسخه ۸ اجرا شدند.

نتایج و بحث

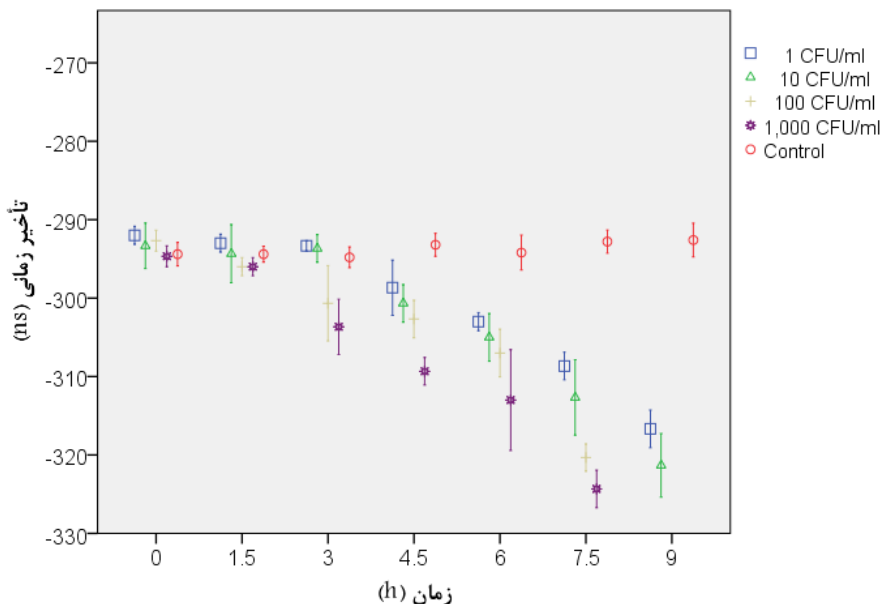
بازه استریلی‌بودن پاکت‌های شیر توسط دستگاه فراصوتی با انتخاب ۲۰ عدد پاکت استریل و مورد آزمایش قرار دادن آن‌ها، تعیین شد (Elvira et al., 2010). همچنین پاکت‌های استریل به مدت ده ساعت از شروع آزمایش‌ها، با دستگاه فراصوتی پایش شدند. مشاهده شد که تغییرات مشخصه‌های فراصوتی در محدوده استریلیزه است.

شکل‌های ۳ و ۴ روند تغییرات دامنه ولتاژ و تأخیر زمانی را در چهار رقت گوناگون برای پاکت‌های آلوده‌شده به *E. coli* نشان می‌دهند. مشاهده می‌شود در چند ساعت ابتدایی روند تغییرات دامنه ولتاژ و تأخیر زمانی ناچیز بوده است. بنابراین دوره رکود رشد باکتری حدود ۱/۵ ساعت مشاهده می‌شود. این دوره برای رقت ۱ و ۱۰ CFU/ml حدود سه ساعت به‌نظر می‌رسد اما احتمالاً این به‌دلیل پایین‌بودن تعداد میکروب‌ها و تغییرات نامحسوس خواص شیر و در نتیجه تشخیص‌ندادن تغییرات دامنه ولتاژ به‌وسیله حسگرها بوده است. از طرفی وقتی میکروارگانیسمی در محیط جدید قرار می‌گیرد، نیاز به مدت زمانی برای تطبیق با محیط دارد که منجر به تغییر متابولیسم آن با مواد غذایی جدید می‌شود (Elvira et al., 2010). در این مدت رشدی صورت نگرفته است و فقط میکروارگانیسم به شرایط جدید عادت می‌کند. بنابراین، بخشی از زمان صرف‌شده در دوره رکود، که مشخصه‌های فراصوتی پاکت‌ها ثابت بوده‌اند، مربوط به تغییر محیط باکتری بوده است. دوره رکود در سایر منابع نیز گزارش شده است که میکروب‌های گوناگون مقادیر متفاوتی داشته‌اند (Elvira et al., 2005). Mohammadi (2013) دوره رکود را برای باکتری *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* به ترتیب حدود ۴/۵ و ۳/۵ ساعت گزارش کرد. بنابراین تأثیر دو باکتری مذکور بر خواص فراصوتی شیر به نسبت باکتری *E. coli* کمتر بوده است که موجب تشخیص دیرتر آلودگی توسط دستگاه شد.

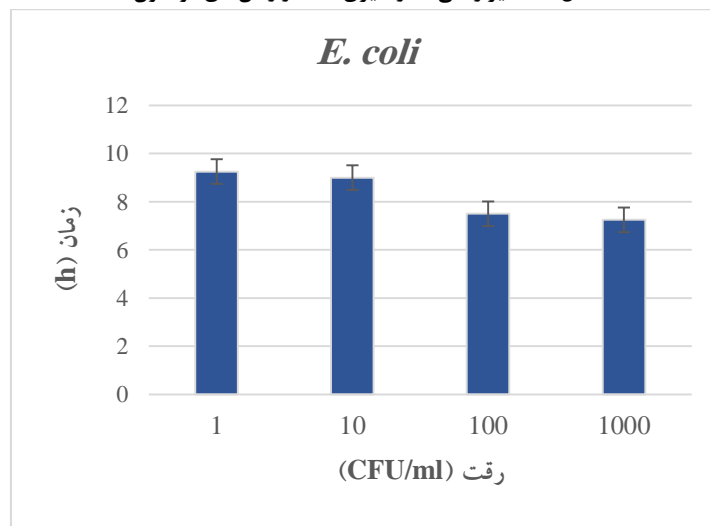
همان‌طور که شکل‌های ۳ و ۴ نشان می‌دهند، آلودگی میکروبی بر مشخصه‌های فراصوتی تأثیر منفی داشته است که با افزایش رشد باکتری، قابلیت انتقال، و سرعت امواج فراصوتی



شکل ۳. دامنه و لنتاز اندازه‌گیری شده در زمان‌های گوناگون



شکل ۴. تأخیر زمانی اندازه‌گیری شده در زمان‌های گوناگون

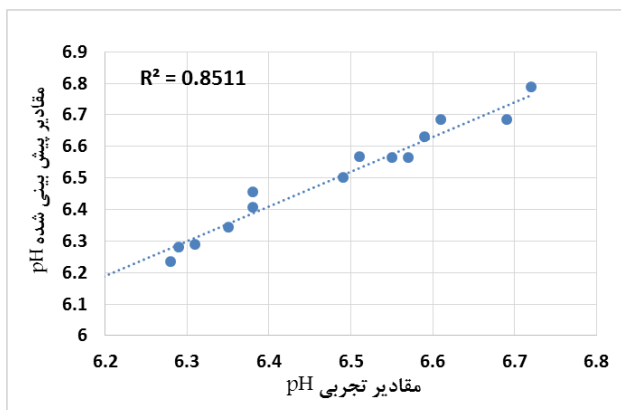


شکل ۵. مقایسه زمان تشخیص آلودگی میکروبی در رقت‌های گوناگون

نسبت مقادیر تجربی پیشگویی کرده است (Jia et al., 2013; Muñoz-Berbel et al., 2008; Kou et al., 2011). شبکه آموزش داده شده مقادیر تعداد باکتری را با ضریب تبیین بهتری (۰/۸۷۲) در مقایسه با مقادیر pH (۰/۸۵۱) پیش بینی کرده است. در تحقیقی رفتار سه نوع میکروب با شبکه عصبی مصنوعی مدل سازی شد که داده های اعتبارسنجی با تقریب مناسبی توسط شبکه تخمین زده شدند (Jeyamkondan et al., 2001). (Cheroutre-Viallette & Lebert, 2001) رشد باکتری *L. monocytogenes* را به عنوان تابعی از دما، pH، و غلظت NaCl توصیف کردند و بیان داشتند که شبکه عصبی آموزش داده شده، می تواند برای پیش بینی رفتارهای پیچیده میکروبی استفاده شود. (García-Gimeno et al., 2002) از شبکه های عصبی مصنوعی برای پیش بینی تأثیر غلظت NaCl، مقدار pH، و دمای ذخیره سازی بر رشد باکتری *Lactobacillus plantarum* استفاده کردند و بیان داشتند که شبکه عصبی برای تخمین تعداد باکتری با دقت بالای ۹۵ درصد توانمند است.

جدول ۱. نتایج عملکرد شبکه های عصبی آموزش شده برای معماری های گوناگون

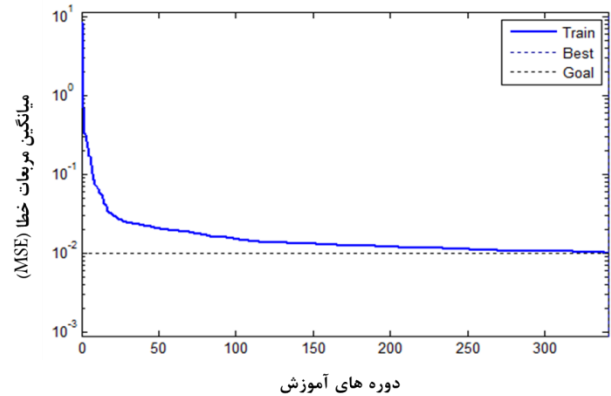
توپولوژی	MSE	R	توپولوژی	MSE	R
۲-۸-۲	۰/۰۴۱۹	۰/۹۶۶۷	۲-۲۶-۲	۰/۰۱۰۱	۰/۹۹۲۱
۲-۱۰-۲	۰/۰۱۵۵	۰/۹۸۷۸	۲-۲۸-۲	۰/۰۱	۰/۹۹۲۲
۲-۱۲-۲	۰/۰۱۵۳	۰/۹۸۷۹	۲-۳۰-۲	۰/۰۱۱۲	۰/۹۹۱۲
۲-۱۴-۲	۰/۰۱۵۶	۰/۹۸۷۷	۲-۳۲-۲	۰/۰۱۱	۰/۹۹۱۱
۲-۱۶-۲	۰/۰۱۶۲	۰/۹۸۷۲	۲-۳۴-۲	۰/۰۱۲۴	۰/۹۹۰۴
۲-۱۸-۲	۰/۰۱۵	۰/۹۸۸۲	۲-۳۶-۲	۰/۰۱۱۴	۰/۹۹۰۲
۲-۲۰-۲	۰/۰۱۳	۰/۹۸۹۸	۲-۳۸-۲	۰/۰۱۰۱	۰/۹۹۰۱
۲-۲۴-۲	۰/۰۱۲۹	۰/۹۸۹۹	۲-۴۰-۲	۰/۰۱۰۲	۰/۹۹۰۱



شکل ۷. مقایسه مقادیر تجربی pH و مقادیر پیش بینی شده توسط شبکه عصبی مصنوعی

مدل سازی شبکه عصبی مصنوعی

با توجه به آزمون شبکه های گوناگون و بررسی نتایج آن مشاهده شد که الگوریتم پس انتشار خطا با توپولوژی ۲-۲۸-۲ واجد بهترین نتیجه از نظر معیارهای در نظر گرفته شده برای شبکه های عصبی است. در شکل ۶ نمودار میانگین مربعات خطا بر حسب دوره های آموزش (Epoch) ترسیم شده است. به تعداد تکرارها، میانگین مربعات خطا وجود دارد که از نمایش تغییرات آن به عنوان معیاری برای درک عملکرد شبکه استفاده می شود. مشاهده می شود که میانگین مربعات خطا برای حالت آموزش و اعتبارسنجی همگرا بوده و بعد از ۱۵۰ دوره به مقدار قابل قبولی کاهش یافته است. خط هدف در دقت ۰/۰۱ تعیین شد که مشاهده می شود منحنی آموزش به سمت آن میل کرده و با روند مناسب و یکنواختی به MSE معادل ۰/۰۱ رسیده است.



شکل ۶. منحنی عملکرد شبکه بهینه با یک لایه پنهان

جدول ۱ عملکرد شبکه عصبی مصنوعی را برای معماری های گوناگون ارائه می دهد. همان طور که مشاهده می شود شبکه با توپولوژی ۲-۲۸-۲ بهترین نتایج را برای آموزش شبکه دربر داشته است. در پژوهشی شبکه عصبی آموزش داده شده توانست با R و RMSE به ترتیب معادل ۰/۹۶۶ و ۰/۰۸۳ تعداد کل باکتری ها را پیش بینی کند (Duan et al., 2014). همچنین، افزایش تدریجی مقدار ضریب تبیین و کاهش کند مقدار MSE حاکی از بهبود ساختار شبکه و آموزش مناسب شبکه است (جدول ۱).

شکل های ۷ و ۸ به ترتیب بیانگر شدت ارتباط خطی بین مقادیر تجربی pH و مقادیر پیش بینی شده توسط شبکه عصبی و مقادیر تجربی تعداد باکتری و تعداد پیش بینی شده توسط شبکه عصبی هستند. در واقع شکل های مذکور نتایج اعتبارسنجی شبکه عصبی مصنوعی آموزش داده شده برای ۱۵ درصد داده های تجربی است که برای آموزش در اختیار شبکه نبوده اند. مشاهده می شود که شبکه عصبی آموزش داده شده تقریب های مناسبی به

تغییرات خواص فیزیکی و شیمیایی شیر به موجب رشد و تکثیر باکتری تغییرات مشخصه‌های فراصوتی را در پی دارد. آلودگی میکروبی پاکت‌ها در بهترین مورد پس از ۷/۲۵ ساعت تشخیص داده شد. شبکه عصبی مصنوعی با ضریب تبیین ۰/۸۷۲ و ۰/۸۵۱ مقادیر تعداد باکتری و pH پاکت‌های میکروبی را پیش‌بینی کرد. در این پژوهش، باکتری‌های *S. aureus*، *B. cereus* و *B. subtilis* نیز بررسی شدند. برای باکتری‌های مذکور نیز تأثیر مشابه بر خواص فیزیکی و شیمیایی شیر در محدوده متفاوتی مشاهده شد. نتایج مربوط به سایر باکتری‌ها در مقالات مجزایی منتشر خواهد شد.

قدردانی

بدینوسیله از آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه شهرکرد، شرکت شهرک‌های صنعتی چهارمحال و بختیاری، و همه عزیزانی که ما را در این پژوهش یاری کردند، قدردانی می‌کنیم.

REFERENCES

Awad, T.S., Moharram, H. E., Shaltout, O. E., Asker D. & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410-427.

Bylund, G. (1995). Dairy processing handbook. Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB.

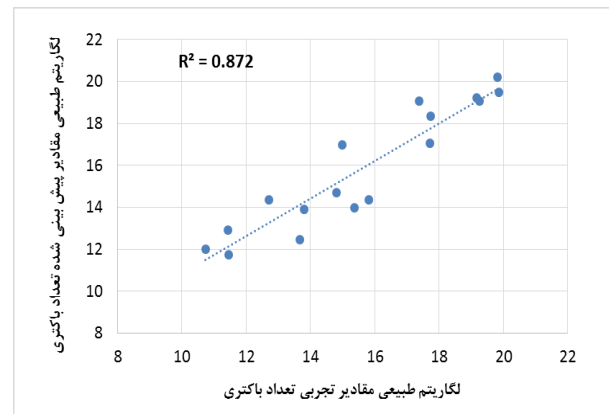
Carneiro, L. A. M., Lins, M. C., Garcia, F. R. A., Silva, A. P. S., Mauller, P. M., Alves, G. B., Rosa, A. C. P., Andrade, J. R. C., Freitas-Almeida, A. C., Queiroz, M. L. P. (2006). Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurised milk. *International Journal of Food Microbiology*, 108 (2), 15-21.

Chen, T. R., Wei, Q. K., & Chen, Y. J. (2011). *Pseudomonas* spp. And *Hafnia alvei* growth in UHT milk at cold storage. *Food Control*, 22 (12), 697-701.

Cheroutre-Vialette, M. & Lebert, A. (2002). Application of recurrent neural network to predict bacterial growth in dynamic conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2), 107-118.

Elvira, L., Durán, C. M., Urréjola, J., & Montero de Espinosa, F. R. (2014). Detection of microbial contamination in fruit juices using noninvasive ultrasound. *Food Control*, 40: 145-150.

Elvira, L., Sampedro, L., Matesanz, J., Gómez-Ullate, Y., Resa, P., Iglesias, J. R., Echevarría, F. J. & Montero de Espinosa, F. (2005). Non-invasive and non-destructive ultrasonic technique for the detection of microbial contamination in packed



شکل ۸. مقایسه مقادیر تجربی تعداد باکتری و مقادیر پیش‌بینی شده توسط شبکه عصبی مصنوعی

نتیجه‌گیری

در طرح حاضر از تلفیق ابزار غیرمخرب فراصوتی و هوش مصنوعی به‌عنوان سامانه سریع و ارزان برای تشخیص آلودگی میکروبی پاکت‌های شیر استفاده شد. نتایج نشان داد که

UHT milk. *Food Research International*, 38(6), 631-638.

Elvira, L., Sampedro, L., Montero de Espinosa, F., Matesanz, J., Gómez-Ullate, Y., Resa, P., Echevarría, F. J. & Iglesias, J. R. (2006). Eight-channel ultrasonic device for non-invasive quality evaluation in packed milk. *Ultrasonics*, 45(1), 92-99.

Elvira, L., Sierra, C., Galán, B. & Resa, P. (2010). Ultrasonic non invasive techniques for microbiological instrumentation. *Physics Procedia*, 3(1), 789-794.

Fievez, V., Colman, E., Castro-Montoya, J. M., Stefanov, I., & Vlaeminck, B. (2012). Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function—An update. *Animal Feed Science and Technology*, 172(1-2) 51-65.

García-Gimeno, R M., Hervás-Martínez, C., & de Silóniz, M. I. (2002). Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2) 19-30.

Geeraerd Herremans, A. H., Herremans, C. H., Cenens, C., & Van Impe, J. F. (1998). Application of artificial neural networks as a non-linear modular modeling technique to describe bacterial growth in chilled food products. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2) 49-68.

Ghasemi-Varnamkhasti, M., Mohtasebi, S. S. & Siadat, M. (2010). Biomimetic-based odor and taste sensing systems to food quality and safety characterization: An overview on basic principles

- and recent achievements. *Journal of Food Engineering*, 100(3), 377-387.
- Hajmeer, M. & Basheer, I. (2002). A probabilistic neural network approach for modeling and classification of bacterial growth/no-growth data. *Journal of Microbiological Methods*, 51(2), 217-226.
- Jeyamkondan, S., Jayas, D. S. & Holley, R. A. (2001). Microbial growth modelling with artificial neural networks. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 343-354.
- Jia, J., Liang, C., Cao, J. & Li, Z. (2013). Application of Probabilistic Neural Network in Bacterial Identification by Biochemical Profiles. *Journal of Microbiological Methods*, 94(2), 86-87.
- Jimenez-Marquez, S. A., Thibault, J. & Lacroix, C. (2005). Prediction of moisture in cheese of commercial production using neural networks. *International dairy journal*, 15(11), 1156-1174.
- Kou, W., Chen, L., Sun, F. & Yang, L. (2011). Application of bacterial colony chemotaxis optimization algorithm and RBF neural network in thermal NDT/E for the identification of defect parameters. *Applied Mathematical Modelling*, 35(3), 1483-1491.
- Mohammadi, V. (2013). Detection of microbial contamination in UHT milk packages using ultrasonic sensors. M. Sc. thesis. Shahrekord University. Iran. In Farsi.
- Mohammadi, V., Ghasemi-Varnamkhasi, M., Ebrahimi, R., Abbasvali, M. (2014). Ultrasonic techniques for the milk production industry. *Measurement*, 58: 93-102.
- Montero de Espinosa, F., Elvira, L., Gomex-Ullate, L., Resa, P., Matesanz, J., Ron, A., Iglesias J. & Echevarria, F. J. (2003). Industrial system to perform the microbiological control of UHT milk in carton-like packages by ultrasound. *Ultrasonics*, 2, 1360-1363.
- Muñoz-Berbel, X., Vigués, N., Mas, J., Del Valle, M., Muñoz, F. J. & Cortina-Puig, M. (2008). Resolution of binary mixtures of microorganisms using electrochemical impedance spectroscopy and artificial neural networks. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 958-962.
- Nguyen, T. M. P., Lee, Y. K. & Zhou, W. (2009). Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by highintensity ultrasound. *International dairy journal*, 19(6), 410-416.
- Pallav, P., Hutchins, D. A. & Gan, T. A. (2009). Air-coupled ultrasonic evaluation of food materials. *Ultrasonics*, 49(2), 244-253.
- Park, Y. W. (2007). Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1), 73-87.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Cotter, P. D. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 150(3), 81-94.
- Resa, P., Bolumar, T., Elvira, L., Pérez, G., & Montero de Espinosa, F. (2007). Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. *Journal of Food Engineering*, 78(3) 1083-1091.
- Resa, P., Elvira, L., Sierra, C., & Montero de Espinosa, F. R. (2009). Ultrasonic velocity assay of extracellular invertase in living yeasts. *Analytical Biochemistry*, 384(1) 68-73.
- Ruas-Madiedo, P., Alonso, L., Delgado, T., Bada-Gancedo, J. C. & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2002a). Manufacture of Spanish hard cheeses from CO² treated milk. *Food Research International*, 35(7), 681-690.
- Ruas-Madiedo, P., Alting, A. C., & Zoon, P. (2005). Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks. *International dairy journal*, 15(2), 155-164.
- Ruas-Madiedo, P., Tuinier, R., Kanning, M. & Zoon, M. (2002b). Role of exopolysaccharides produced by subsp *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *International dairy journal*, 12(8), 689-695.
- Sofu, A., & Ekinçi, F. Y. (2007). Estimation of storage time of yogurt with artificial neural network modeling. *Journal of Dairy Science*, 90:3118-3125.
- Tiwari, B. K., Mason, T. J., Cullen, P., Brijesh, K. & Valdramidis, V. (2012). Ultrasound processing of fluid foods. Elsevier: *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*, 135-165.