مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی تاثیر همزمان مخلوط گازهای دی‌اکسیدکربن و نیتروژن بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیرگاو بر اساس روش آماری سطح رویه پاسخ

بهروز قدیری علمداری[۱]، احسان مقدس کیا[۲*]، محمد علیزاده[۳]، زهرا قاسم پور[٤]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی آفاق ارومیه

۲- استادیار گروه تغذیه و علوم غذایی، دانشکده علوم پزشکی مراغه

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

٤- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۹ /۰٦/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۰۵

کلمات کلیدی:

تیمار با گاز،

دی‌اکسیدکربن،

نیتروژن،

شیر خام گاو،

اسیدیته،

شمارش کلی میکروبی.

DOI: 10.52547/fsct.18.03.29

* مسئول مکاتبات:

Ehsan.m.kia@gmail.com

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی اثر تزریق نسبت های مختلف گازهای دی اکسیدکربن، نیتروژن و زمان تیمار با گاز بر اساس طرح آماری ترکیبی بر روی ویژگی های فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیر خام میباشد. در این پژوهش درفاصله زمانی بین ۹ الی ۱۵ دقیقه بعد از تزریق شاخص های اسیدیته، pH، نقطه انجماد، شمارش میکروبی کل، کپک و مخمر و کلی فرم بر روی ۱۵ نمونه تیمار شیرخام سنجیده شد. بررسی های آماری حاصل از این پژوهش نشان میدهد که تیمار توامان گازهای نیتروژن و دی اکسیدکربن بر روی اسیدیته و pH شیر خام تاثیر معنیدار داشت ($p<0/05$)، به طوریکه با افزایش میزان گاز دی اکسیدکربن به ۱۰۰ ٪، pH کاهش یافته و اسیدیته افزایش یافت. تاثیر توامان هر دو گاز بر روی نقطه انجماد شیر خام معنیدار بود ($p<0.05$). افزایش زمان تیمار شیر خام از ۹ به ۱۵ دقیقه بر روی کاهش جمعیت بارمیکروبی، معنی دار بوده ($p<0/05$)ولی در اثر ترکیب گازها کاهش معنیداری مشاهده نشد. با توجه به نتایج آنالیز واریانس در تیمار ۱۰۰٪ نیتروژن و مدت زمان تیمار ۱۵ دقیقه بهترین نتایج به لحاظ میکروبی و شیمیایی مشاهده گردید. همچنین برای بررسی ویژگی های شیر تیمار شده با مخلوط گازهای CO_2و N_2، تاثیر آن در ماست بعنوان مدل غذایی، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های ماست در روزهای ۲، ۱۱، ۲۲ از لحاظ ویژگیهای شیمیایی و میکروبی و ارگانولپتیکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که گازدهی شیر خام، اثر نامطلوبی بر ویژگی های حسی و فیزیکوشیمیایی ماست با شیرتیمارشده با این روش نداشت ($p>0/05$). اما تاثیر مدت زمان نگهداری بر روی اسیدیته،pH و سینرزیس ماست معنی دار بود ($p<0.05$). لذا استفاده از تیماردهی شیر خام با۱۰۰٪ گاز نیتروژن به مدت ۱۵ دقیقه می تواند به عنوان یک عامل باکتری و استاتیک در نگهداری شیر خام در مقیاس صنعتی مطرح باشد.

۱- مقدمه

شیر به عنوان یک محصول با ارزش تغذیه‌ای بالا و منبعی غنی از ویتامین‌ها و املاح به رسمیت شناخته شده است.به هر حال این ماده غذایی فساد پذیر در شرایط خام، دارای عمر نسبتاً کوتاهی می‌باشد.شیر هنگام خروج از پستان معمولا دارای بار میکروبی کمی می‌باشد، ولی در صورت عدم رعایت مسائل بهداشتی و وجود میکروب‌های آلوده کننده در محیط شیر دوشی و تجهیزات مربوطه، آلودگی آن بالا می‌رود. اکثر میکروارگانیسم‌های موجود در شیرخام در صورتی‌که از نظر دمایی در شرایط مناسب قرارگیرند، می‌توانند به سرعت رشد و تکثیر کرده و در نهایت باعث فساد شیر شوند. در صورتی که تعداد میکروب‌ها از^{6}۱۰×۳در هر میلی‌لیتر تجاوز نماید، تخریب چربی، پروتئین‌و قند شیر اتفاق می‌افتد [۱]. تغییرات قابل توجهی در نتیجه رشد میکروبی درشیرخام در طی انتقال و نگهداری آن رخ می‌دهد؛ بیش‌ترین آسیب، ناشی از آزاد شدن آنزیم‌های لیپولیتیک و پروتئولیتیک و تجزیه ساختار پروتئینی میسل‌ها و یا اکسیداسیون چربی ها است [۲]. روش معمول ممانعت از فساد و افزایش زمان ماندگاری شیرخام، پاستوریزاسیون می‌باشد که در طی این فرایند، اکثر باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد از بین می‌روند. با این حال سبب نابودی کامل باکتری‌های ترمودوریکواسپورزا نمی‌شود. از سوی دیگر برخی از باکتری‌ها، آنزیم‌های خارج سلولی مانند پروتئازها، لیپازها و فسفولیپازها تولید می‌کنند که در برابر حرارت مقاوم بوده و در طی نگهداری شیر پاستوریزه در شرایط یخچالی فعال می‌شوند. در نهایت برای حل این مشکلات بایستی از فرایند حرارتی شدیدتری استفاده کرد که این فرایند حرارتی سبب ایجاد تغییرات نامطلوب در خصوصیات حسی و تغذیه‌ای شیر می‌شود. عدم وجود سیستم نگه دارنده شیر به حالت سرد، منجر به فعالیت بیش از حد باکتری‌ها و در نتیجه افزایش اسیدیته شیرخام بیش از میزان مورد قبول برای فرآوری می‌شود. به منظور جلوگیری از رشد بیش از حد باکتری‌ها در شیرخام، FAO دو گزینه را پیشنهاد داده است، نگهداری شیرخام دردمای پایین و یا فعال‌سازی سیستم لاکتوپراکسیداز در شیر (با افزودن دو ماده شیمیایی نگهدارنده، هیدروژن پراکسید و تیوسیانات) [۳]. امروزه به منظور افزایش زمان ماندگاری، توجه محققان و صنایع به پیشبرد تکنیک‌هایی معطوف شده است که مانع از ایجاد تغییر در خصوصیات حسی و تغذیه‌ای محصول می‌شود. از جمله این تکنیک‌ها، استفاده از گاز دی اکسیدکربن و گاز نیتروژن می‌باشد. با استفاده از تزریق گاز دی‌اکسیدکربن و نیتروژن در شیرخام می‌توان مدت زمان نگهداری را افزایش داده و از رشد میکروارگانیسم‌های مضر جلوگیری کرد.

مکانیسم غیرفعال کردن دی‌اکسیدکربن شامل حل شدن دی‌اکسیدکربن، تغییر غشاء سلولی، کاهش متابولیسم داخل سلولی و به تبع آن، غیر فعال شدن آنزیم‌های کلیدی، اثر مستقیم دی‌اکسیدکربن مولکولی، به هم خوردن تبادل الکترولیت داخل سلولی و خروج ترکیبات حیاتی از سلول و غشاء سلول می‌باشد. تحقیقات مستدلی وجود دارند که نشان می‌دهند افزودن مستقیم CO_2 به شیر خام در طی نگهداری پیش از فرایند یا پس از تولید فرآورده‌های مختلف می‌تواند به صورت قابل توجهی مدت زمان نگهداری آن‌ها را بهبود داده و ایمنی محصول را بیشتر کند و در برخی از موارد سبب بهبود کیفیت محصول شود. ون اسلیک و بیکر (۱۹۱۹) پیشنهاد کردند که یک سوم CO_2 در شیر به صورت اسید کربونیک و دو سوم آن به صورت بی کربنات وجود دارد [۲]. نیتروژن به عنوان یک منبع نامحدود در سیستم‌های تولید ارگانیک نیز مجاز بوده و دارای مزایای متعددی می‌باشد. هم‌چنین، عمدتا قادر به افزایش مدت زمان نگهداری شیر بوسیله مهار باکتری‌های فسادزا می‌باشد. تزریق گاز نیتروژن درحضور تجهیزات زنجیره سرد، به منظور کنترل رشد باکتریایی در شیرخام مورد استفاده قرار می‌گیرد[٤]. پترو وهمکاران در سال۲۰۱۷با بررسی توانایی گاز نیتروژن دربرطرف کردن مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها عنوان کردند که اثر مهارکنندگی تیمار نیتروژن بر روی میکروارگانیسم‌های مزوفیل و سایکروفیل دارای مقاومت در برابر آنتی بیوتیک در مقایسه با سیستم لاکتوپراکسیداز فعال شده بازده بیشتری را نشان داده که پتانسیل زیادی در جلوگیری از افزایش مزوفیل‌ها و سایکروتروف‌ها دارد[۵]. گورسوی و همکاران در سال۲۰۱٦، با بررسی اثر گاز N_2به عنوان تیمار تنها و ترکیب با سیستم لاکتوپراکسیداز بر روی ۸ نمونه شیر خام نگهداری شده در دمای$^{\circ}C$ ۱۵ یا $^{\circ}C$۲۵ نشان دادند که فلاشینگ گاز N_2 رشد باکتری‌ها را در شیرخام در دمای$^{\circ}C$۱۵ و$^{\circ}C$۲۵ به ترتیب، به مدت ۲٤ و ۱۲ ساعت مهار می‌کند[٦]. در حضور

تجهیزات زنجیره سرد، فلاشینگ گاز نیتروژن را می‌توان در قالب یک چهارچوب زمانی کنترل شده (۱۲و ۲٤ ساعت به ترتیب در دمای۲۵°C و۱۵°C) و به منظور کنترل رشد باکتریایی در شیر خام مورد استفاده قرار داد.

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر توامان گازهای دی‌اکسیدکربن و نیتروژن در نسبت های مختلف و زمان گازدهی بر روی نمونه اولیه شیرخام به عنوان یک عامل باکتری و استاتیک در نگهداری شیرخام در مقیاس صنعتی و بررسی ویژگی‌های شیمیایی و میکروبی آن می‌باشد.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- مواد

مواد مورد استفاده در پژوهش حاضر، تعداد ۱۵ نمونه شیرخام از یک مخزن ۲ تنی شیرخام در ظروف کوچک ۲ لیتری استریل برداشته شده‌است. هر ۱۵ نمونه در یک محفظه استریل از جنس استیل طبق جدول شماره ۱ طرح آزمایشی تحت تاثیر گازهای نیتروژن و دی‌اکسیدکربن قرار گرفته‌است. استارتر مورد استفاده در این مطالعه (Lactin, Bulgaria) و محیط کشت های VRB،PCA ، YGC و مواد آزمایشگاهی مصرفی ساخت شرکت (Merck, Germany) بودند.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- مراحل طراحی و ساخت محفظه تزریق گاز در مقیاس نیمه صنعتی

محفظه تزریق که از جنس استیلبا گنجایش ۲ لیتر می‌باشد، در کارگاه فنی شرکت پگاه آذربایجان غربی ساخته شده است. محفظه تزریق شبیه به مخازن ایستاده دوجداره نگهداری شیرخام که در کارخانجات و مراکز جمع‌آوری شیرخام موجود می‌باشد، ساخته شده و به راحتی امکان تزریق گاز به شیرخام در این مخازن وجود دارد. گنجایش محفظه طراحی شده دو لیتر می‌باشد و قسمت بالای محفظه، دارای دو شیر تزریق بوده که توسط دو لوله استیل، گاز تزریق شده را تا کف محفظه هدایت می‌کند. در روی درب محفظه یک مانومتر جهت سنجش میزان فشار داخل آن تعبیه شده‌است. فشار گازهای داخل مخازن اصلی،۱۵ بار و فشار گاز ورودی به داخل محفظه تزریق توسط رگلاتور، برروی ۳ بار تنظیم گردیده است. میزان گازتزریق شده به داخل محفظه براساس مدت زمان تعیین شده صورت گرفته ونمونه‌ها براساس جدول طرح آزمایشی با فشار ۳ بار، تحت تیمار گاز تعیین شده قرار گرفته‌است.

۲- ۲-۲- آماده‌سازی نمونه‌ها

طبق طرح آزمایشات آماری (جدول شماره ۱)، ۱۵تیمار متفاوت شیرخام آماده شد. در نمونه‌هایی که درصد گاز اول ۷۵٪ وگاز دوم ۲۵٪ در نظر گرفته شده، براساس درصد تعیین شده گازها، زمان تزریق بین دو گاز تقسیم گردید. به عنوان مثال، در نمونه ۳ جدول طرح آزمایشی که زمان ۱۳/۵ دقیقه در نظر گرفته شده، میزان گاز CO_2 تزریقی۷۵٪ مشخص گردیدکه مدت زمان تزریق گاز ۱۰دقیقه و یک ثانیه و میزان گاز N_2 تزریقی ۲۵٪ مشخص شده بود، که مدت زمان گاز تزریقی۳ دقیقه و ٤ ثانیه صورت گرفت. در زمان تیماردهی، کپسول تزریق تا دهانه داخل یک حوضچه آب سرد با دمای ثابت ٤°C گذاشته شده بود تا دمای گاز و شیر داخل محفظه در تمامی نمونه‌ها بر روی٤ °C ثابت بماند. بلافاصله بعد از اتمام تیماردهی،بر روی تمامی نمونه‌ها، آنالیز کامل شیمیایی و میکروبی انجام گردید. تمامی نمونه‌های تیمارشده بلافاصله آنالیز شده و هم‌چنین از تمامی تیمارها نمونه برداری صورت گرفته و در یخچال با دمای ٤ °C نگهداری گردید تا ٢٤ ساعت بعد، آنالیز کامل شیمیایی و میکروبی روی این نمونه‌ها انجام گردید. بعد از اتمام تیماردهی از شیرهای تیمار شده با گازهای نیتروژن، دی‌اکسیدکربن و شیرخام از هرکدام به میزان دو لیتر به ظروف استیل منتقل شده و تا دمای ۸۵°C حرارت داده شد و بلافاصله تا دمای٤٢°C سرد شده بود و ۲٪ مایه‌زنی انجام شد (استاندارد ملی ایران ٥٥٦٢) و درانکوباتور با دمای ٤٢ °C منتقل شده و تارسیدن به٤/٦=pH در گرم‌خانه نگهداری شدهبود و یک نمونه ماست از شیرخام، نمونه دوم ماست از شیر تیمارشده با دی‌اکسیدکربن و نمونه سوم ماست از شیر تیمارشده با نیتروژن که از هر کدام سه ظرف ماست تهیه شده بود.

۲-۲-۳- تهیه ماست از نمونه ها

از شیرهای تیمار شده با گازهای نیتروژن ۱۰۰ ٪ و دی‌اکسیدکربن ۱۰۰ ٪و شیرخام بدون تیمار از هرکدام به میزان دو لیتر به ظروف استیل منتقل گردیدو تا دمای ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و بلافاصله تا دمای۴۲ °C سرد گردید و ۲٪ مایه زنی انجام گرفت (استاندارد ملی ایران ۵۵۶۲) و تا رسیدن به pH= ٤/٦ در گرمخانه نگهداری گردید و سپس نمونه های ماست به سردخانه با دمای ٤ °C منتقلگردید.

۲- ۳- آزمون‌های فیزیکوشیمیایی شیرخام

۲-۳-۱- pH شیرخام

pH با استفاده از دستگاهpH متر دیجیتالی (مدل ۷٦٦ ساخت کارخانه کینک، کشور آلمان) اندازه‌گیری شده‌است.الکترود pH متر را داخل نمونه با دمای ۱۵°C قرار داده شده و بعداز مدت ٤۵ ثانیه pH نمونه قرائت شده‌است[۷].

۲- ۳- ۲- اسیدیته شیرخام به روش دورنیک

برای اندازه‌گیری اسیدیته،۱۰ میلی لیتر شیرخام را داخل یک بشر ریخته و ۲ قطره فنل فتالین ۱٪ اضافه شده و تا ظهور رنگ صورتیکم رنگ توسط سود n/۹ تیتراسیون ادامه یافته است. طبق تعریف یک درجه درنیک که با D نشان داده می‌شود معادل ۰/۱ گرم اسیدلاکتیک در لیتر شیر می‌باشد[۸].

۲- ۳- ۳- اندازه‌گیری دانسیته شیرخام

دانسیته نمونه‌ها بوسیله ترمولاکتودانسیمتر (مدلDMA35 آنتون پار، اتریش) اندازه‌گیری شده است. اساس کار با ترمولاکتو دانسیمتر به این شرح می‌باشد که استوانه مدرج را تا حجم معینی (معمولا ml۲۵۰) از شیر پر شده و ترمولاکتودانسیمتر، داخل آن شناور می‌گردد. زمانی که ترمولاکتودانسیمتر داخل شیر بدون حرکت ثابت بماند، عدد دانسیته بر حسب درجه‌بندی روی آن قرائت می‌گردد. در صورتی‌که دمای شیر۱۵°C نباشد بایستی عدد خوانده شده تصحیح شود به این ترتیب که بین۱۵°C تا ۲۰°C به ازای هر یک درجه "بالای ۱۵°C رقم ۰/۲ به عدد خوانده شده اضافه شود وبه ازای هر یک درجه کمتراز۱۵ °C رقم ۰/۲ از عدد خوانده شده کمشود[۹].

۲- ۳- ٤- اندازه‌گیری نقطه‌ی انجماد شیرخام

نقطه انجماد شیرخام با استفاده از دستگاه کرایوسکوپ (مدل AD3، ساخت شرکت ادونسد، کشور آمریکا) ارزیابی شده است. نمونه شیر خام را در داخل وت‌های شیشه‌ای ریخته و وت‌ها در محل قرارگیری آن داخل دستگاه کرایسکوپ قرار گرفته شده است. بایستی دقت شود که میزان شیر ریخته شده داخل وت، بیشتر از حد فاصل خطوط میانی مشخص شده در وت نباشد، چرا که در اثر انجماد می‌تواند باعث شکسته شدن وت وایجاد مشکلاتی در دستگاه شود. با فشار دادن دکمه RUN الکترود واردوت شده و محلول کولینگ دمای شیر را پایین آورده و دستگاه در نقطه نزدیک به صفر °C شوک الکتریکی را به شیر خام وارد می‌نماید، که در این لحظه شیرخام شروع به انجماد کرده و نقطه انجماد شیرخام بر روی مانیتور نشان داده شده و قابل قرائت می‌باشد[۱۰].

۲-۳-۵- بررسی تغییرات مربوط به بارمیکروبی شیرخام (باکتری، کپک و مخمر)

جهت کشت میکروبی، ابتدا محیط کشت Plate Count Agar برحسب دستورالعمل مندرج بر روی محیط کشت تهیه شده و در اتوکلاو استریل شد. در کنار شعله رقت مورد نظر تهیه و به داخل پلیت منتقل شده و در انکوباتور ۳۷ °C به مدت ۳ روز قرار داده شد تا آماده شمارش گردد. تعداد کل میکروارگانیسمها بر اساس تعداد پرگنه (کلنی)ها بر مبنای درجه رقت نمونه، تعیین و محاسبه شده است. جهت کشت و بررسی کپک و مخمر، ابتدا برحسب دستورالعمل مندرج بر روی محیط کشت، Yeast Extract Glucose Agar، عمل نموده و ظرف محتوی محیط کشت، در اتو کلاو قرار داده شد تا استریل شود. بعد از استریل شدن محیط کشت، یک میلی لیتر از نمونه به داخل پلیت منتقل کرده و در حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت به آن اضافه شده و در دمای ۲۵ °C به مدت ۵ روز نگهداریشدهاست. سپس، تعداد کلونی‌هاشمارش شده و نتیجه قرائت شدهاست. جهت کشت و بررسی کلیفرم، ۱ میلی لیتر از نمونه داخل پلیت ریخته شده و سپس، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشتViolet Red Bile Agar، که جوشانده شده و سپس تا دمای۴۵ °C الی ۵۰°C خنک شده، به پلیت اضافه شده‌است. سپس، آن را در دمای۲°C±۳۵ به مدت ۳۰ الی ۳۱ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شده و سپس، تعداد کلونی‌ها

شمارش شده و نتیجه قرائت گردیده است [۱۱، ۱۲، ۱۳].

۲- ٤- بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ماست تهیه شده با شیر تیمار شده با گاز های نیتروژن و دی اکسید کربن

۲- ٤- ۱- اندازه‌گیری میزان سینرزیس ماست

برای اندازه‌گیری سینرزیس، ابتدا ۲۵ گرم از نمونه‌ها توزین شده و سپس از فیلتر کاغذی تحت دمای ٤°C (در داخل یخچال با دمای ٤°C) در مدت ۱۲۰ دقیقه عبور دادهشد. سرم جدا شده از ماست برحسب میلی لیتر یادداشت شده و به عنوان میزان سینرزیس بیان شده‌است [١٤].

۲- ٤- ۲-اندازه‌گیری میزان ویسکوزیته ماست

میزان ویسکوزیته ظاهری با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد، در ۲۵ °C و اسپیندل شماره٦٤، در سرعت چرخشی ٦۰rpm و پس از مدت زمان ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری شده‌است. نمونه‌های ماست قبل از اندازه‌گیری ویسکوزیته، برای یکنواخت شدن بافت، به مدت یک دقیقه هم زده شده‌اند. اندازه‌گیری در دمای محیط انجام شده‌است[۱۵].

۲- ٤- ۳- اندازه‌گیری میزان اسیدیته ماست

اندازه‌گیری اسیدیته ماست، طبق استاندارد ملی ایران، شماره‌های ۲۸۵۲، ۱۰ گرم ماست را بر روی ترازو وزن کرده و هم وزن آن آب مقطر اضافه کرده و سه قطره فنل فتالین ۰/۵ درصد اضافه شده و با سود دورنیک N/۹ تیتر شده و تا ظهور رنگ صورتی ادامه یافت. تعداد یک دهم میلی‌لیترهای سود مصرفی، اسیدیته شیر را برحسب درجه دورنیک نشان می‌دهدکه توسط محلول سود ۰/۱ نرمال و در حضور معرف فنل فتالئین انجام شده‌است[١٦].

۲- ٤- ٤- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه‌ها با استفاده از آزمون هدونیک ۵ امتیازی انجام شده است. نمونه‌ها توسط ۱۰ نفر کارشناس صنایع غذایی ارزیابی شده‌اند. ارزیاب‌ها ٦ نفر مرد و ٤ نفرخانم بوده و بازه سنی ارزیاب‌ها بین ۲۸-۳۵ سال بوده‌اند. فاکتورهای مورد ارزیابی شامل بافت، عطر، طعم، رنگ و پذیرش کلی محصول بود. نحوه امتیازدهی به این صورت می‌باشد که کاملا مناسب دارای ۵ امتیاز، مناسب دارای ٤ امتیاز، متوسط دارای ۲ امتیاز، نامناسب دارای ۲ امتیاز و کاملا نامناسب دارای ۱ امتیاز می باشد [۱۷].

۲- ٤- ۵- تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه، از طرح آماری ترکیبی (Combined Design)برای بررسی تاثیر مخلوط دوجزئی از درصدگازها (۱۰۰-۰ درصد) و زمان اعمال گازها (۱۵-۹ دقیقه) بر روی شاخص‌های شیمیایی و میکروبی شیر استفاده شده است. تعداد ۱۵ نمونه شیرخام تحت تاثیر گاز دی‌اکسیدکربن و نیتروژن طبق جدول شماره ۱، طرح آزمایشی قرارگرفته و سپس شیرهای تیمار شده مورد آنالیز شیمیایی و میکروبی قرار گرفته‌است. پس از مدل‌سازی شاخص‌ها، در جدول شماره ۲، از روش عددی برای یافتن شرایط بهینه استفاده شده‌است. جهت مدل سازی و آنالیزهای آماری و بهینه سازی در سطح خطای ۵٪ توسط نرم‌افزار (Design Expert10) استفاده شده‌است.

Table 1 Experimental design for gas flushing of raw milk samples

	Component1	Component 2	Factor 3
Run	CO_2 (%)	N_2 (%)	C:Time(min)
1	0	100	12
2	100	0	15
3	75	25	13.5
4	100	0	9
5	25	75	10.5
6	50	50	12
7	100	0	15
8	50	50	15
9	100	0	12
10	100	0	9
11	0	100	9
12	25	75	13.5
13	0	100	15
14	0	100	9
15	50	50	9

۳-٤- نتایج و بحث

۳-٤-۱- بررسی تغییرات pHشیرخام

افتpH شیرخام در پایداری پروتئین‌های شیرخام نقش مستقیمی دارد. براساس نتایج آنالیز آماری (جدول شماره ۲)، تاثیر توامان گازهای (CO_2)و (N_2) بر روی pH شیرخام معنی‌دار می‌باشد($p<0.05$). بررسی نمودار pHبراساس شکل یک مشخص می‌کند که زمانی که میزان دی‌اکسیدکربن در حد صفر باشد و متقابلا میزان نیتروژن در حد ۱۰۰٪ باشد pH شیرخام در حدود ٦/۷ دامنه طبیعی pH شیرخام بوده و به تدریج با افزایش میزان دی‌اکسیدکربن و کاهش میزان نیتروژن، pH شیرخام نیز افت معنی‌داری خواهد داشت. زمانی‌که درصد هر دو گاز در حد ۵۰٪ باشد، pH در محدوده ۵/۹ می‌باشد و با افزایش دی‌اکسیدکربن به محدوده ۱۰۰٪، pH شیرخام به ۵/۸۲ افت پیدا می‌کند. طبق جدول آنالیز واریانس، هردو گاز نسبت بهpH، دارای خاصیت آنتاگونیستی می‌باشند. در اثر کاربرد CO_2، pH محیط کاهش می‌یابد. حل شدن دی‌اکسیدکربن گازی دریک فازآبی در دماهای متوسط و فشار پایین از قانون هنری تبعیت می‌کند که سبب افتpH محیط می‌گردد. با افزودنCO_2، pHشیر کاهش پیدا کرده و کازئین‌ها از میسل جدا شده و مقدار کلسیم محلول و فسفات افزایش پیدا می‌کند. مانش و همکاران (۲۰۱۰) عنوان نمود که نیتروژن، گازی خنثی برای غلبه بر معایب استفاده از دی‌اکسیدکربن است[۱۸].

pHشیرخام در ابتدا و انتهای هر آزمایش از طریق یک pHمتر اندازه‌گیری شده است، بدون در نظر گرفتن دمای نگهداری وpHاولیه، فلاشینگ در نرخ جریان بالاتر (N_2) در مقایسه با نمونه، شاهد سبب افزایش کمتر از ۰/۲ واحدی در pH شیرخام شده است و تغییر معنی‌داری در pH مشاهده نشده است و مقادیرpH در انتهای آزمایش هنوز هم قابل قبول بوده‌اند. هاتکینز و همکاران (۲۰۰٦) عنوان نمودند که کاهش pH، سبب تفکیک میسل‌های کازیینی شده که نهایتا آزادسازی نمک‌های فسفات و کلسیم را در فاز آبی بدنبال خواهد داشت[۱۹]. این افزایش در مواد جامد محلول سبب کاهش خطی نقطه انجماد شیر می‌گردد. ناپایداری میسل‌های کازئینی در نتیجه افزایش دی‌اکسیدکربن از نقطه نظر افزایش رسوبات در مبدل‌های حرارتی صفحه‌ای طی فرایند حرارتی، نکته نگران‌کننده‌ای خواهد بود[۱۸]. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت دی‌اکسیدکربن در شیرخام،pHشیر نیز افت خواهد داشت و محیط اسیدی می‌گردد.

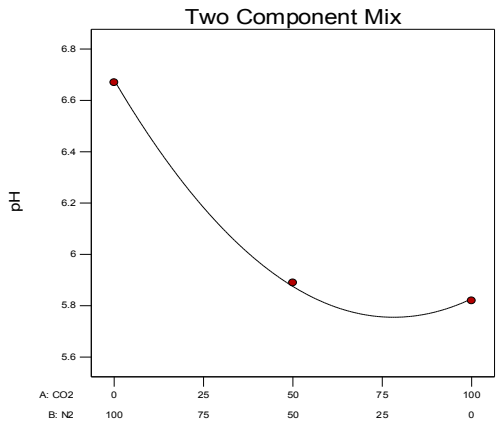

Fig 1 Effect of mixture of gases on pH of raw milk samples

۳-٤-۲- بررسی تغییرات اسیدیته شیرخام

اندازه‌گیری اسیدیته شیر، یکی از مهم‌ترین شاخص‌های کیفی شیر می‌باشد که با افزایش اسیدیته، پایداری پروتئین‌های شیر در مقابل حرارت کمتر می‌شود. براساس نتایج آنالیز آماری، تاثیرتوامان دی‌اکسیدکربن و نیتروژن بر روی اسیدیته شیرخام معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$). طبق شکل شماره ۲، اسیدیته شیرخام، زمانی‌که نیتروژن در میزان ۱۰۰٪ باشد، در محدوده ١٤ درجه دورنیک بوده و به تدریج با افزایش درصد دی‌اکسیدکربن به سمت ۱۰۰٪ اسیدیته به ٤٤ درجه دورنیک افزایش یافته‌است. زمانی‌که درصد گازهادر حدود ۵۰٪ باشد، اسیدیته شیرخام در حدود ۳۷ درجه دورنیک می‌باشد.

استفاده از تزریق گاز نیتروژن به شیرخام، تغییری در اسیدیته شیرخام نداشته و با توجه به نگهداری شیرخام در دمای ٤ °C، تغییری در اسیدیته مشاهده نشده‌است. [۲۰]. حل شدن گاز دی‌اکسیدکربن در محیط مایع، سبب افزایش اسید کربنیک در محیط مایع و افزایش اسیدیته شیرخام می‌گردد. افزایش اسیدیته شیر بوسیله افزودن CO_2 در فاصله‌های زمانی ٢٤ ساعته، به طور قابل توجهی اثر مهارکنندگی رشد میکروبی این گاز را در ٦/۲: pHو ٦: pHبا اسیدی شدن محیط بهبود می‌دهد. دی‌اکسیدکربن تحت فشار به عنوان یک عامل اسیدی‌کننده به شیر اضافه شده‌است. تغییرات فیزیکوشیمیایی که در طی اسیدی کردن با

CO_2 اتفاق می‌افتد، تقریبا مشابه با روش‌های متداول اسیدی کردن می‌باشد. زمانی‌کهCO_2 درفاز آبی حل گردد،اسیدیته شیر افزایش می‌یابد[۲۱]. در طی افزودن CO_2، کاهشpH و افزایش اسیدیته شیر، باعث جدا شدن کلسیم فسفات کلوئیدی و دیگر نمک‌های کلوئیدی از میسل‌های کازئین و ورود آنها به داخل فاز سرمی می‌شود. نیتروژن به عنوان یک منبع نامحدود و به عنوان یک ماده GRAS می‌باشد که در سیستم‌های تولید ارگانیک نیز مجاز بوده و دارای مزایای متعددی می‌باشد و تغییری در اسیدیته شیرخام ندارد. در پژوهش حاضر مشخص شد که با افزایش درصد دی‌اکسیدکربن در محیط مایع و افزایش میزان اسیدکربنیک در محلول، اسیدیته شیر خام افزایش و pH کاهش یافته‌است[۲۲]. لذا، میزان غلظت گاز دی‌اکسیدکربن در شیرخام، در اسیدیته نقش مستقیم داشته و سبب افزایش اسیدیته شیرخام شده‌است.

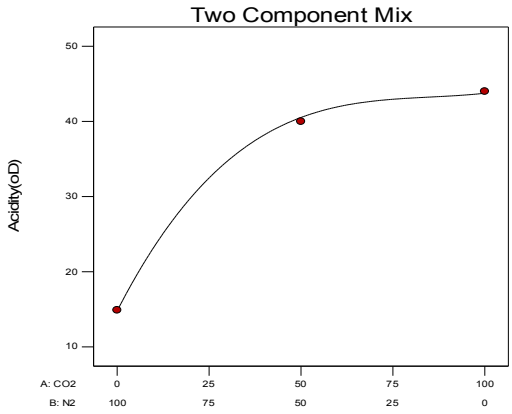

Fig 2 Effect of mixture of gases on acidity of raw milk samples

۳-٤- ۳- بررسی تغییراتنقطه انجماد شیرخام (FP)

براساس نتایج آنالیز آماری، تاثیر توامانگازهای (CO_2)و (N_2) بر نقطه انجماد شیرخاممعنی‌دار می‌باشد($p<0/05$). نتایج مربوطه به نقطه‌انجماد مشخص می‌کند که زمانی‌که درصد گاز نیتروژن در حد ۱۰۰٪ باشد، نقطه‌انجماد شیرخام در حدود ۰/٥٤٥ – هورت-وت می‌باشد و زمانی‌که درصدگاز دی‌اکسیدکربن از صفربه ۵۰٪ می‌رسد نقطه‌انجماد شیرخام به ۰/٦۲۰- هورت‌وت می‌رسد. طبق نمودار شکل ۳، زمانی‌که درصد گاز نیتروژن در حد صفر بوده و گاز دی‌اکسیدکربن به ۱۰۰٪ می‌رسد، نقطه‌انجماد روند افزایشی داشته و به نقطه‌انجماد ۰/٦۳۰- هورت وت می‌رسد. با افت pHو تخریب و دناتوره شدن پروتئین‌های سرمی و با افزایش غلظت نمک‌ها در فاز سرمی، همراه با اسید کربنیک و محصولات تجزیه شده آن، نقطه انجماد با افزایش اسیدیته افت پیدا می‌کند. در شیر اسیدی شده با دی‌اکسیدکربن، زمانی‌که pH تا مقدار ٦ پایین می‌آید پروتئین‌های سرمی تا حد زیادی دناتوره می‌شوند. هم‌چنین نقطه –انجماد شیر پایین می‌آید که به خاطر افزایش غلظت نمک‌ها درفازسرمیشیرهمراهبااسیدکربنیک و محصولات تجزیه شده آن می‌باشد. افزایشمیزانپروتئین‌هایسرمیوکازئین‌ها ظرفیت بافری شیر و محتوای مواد معدنی باند شده به پروتئین را افزایش می‌دهند. در غلظت دی‌اکسیدکربن مشابه در شیر با محتوای پروتئین سرمی بالاتر یا کازئین بیشتر مقاوم به تغییرات pH بالاتر است و کاهش بیشتری در نقطه انجماد شیر رخ می‌دهد [۱۸]. با توجه به اینکه نیتروژن یک گاز خنثی می‌باشد، تاثیری در نقطه انجماد شیرخام نداشته و آنالیزهای صورت گرفته، در صورت افزایش درصد گاز تا ۱۰۰٪ تغییری در نقطه انجماد ندارد[۲۳]. با افت pH، تخریب و دناتوره شدن پروتئین‌های سرمی و با افزایش غلظت نمک‌ها در فاز سرمی همراه با اسید کربنیک و محصولات تجزیه شده آن نقطه انجماد با افزایش اسیدیته کاهش پیدا می‌کند [۲٤].

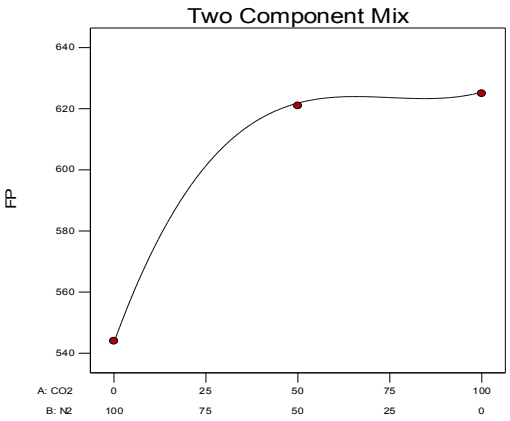

Fig 3 Effect of mixture of gases on freezing point of raw milk samples

۳-٤-٤-بررسی تغییرات اسیدیته شیرخام ۲٤ ساعت بعد تزریق گازها

بر اساس نتایج آنالیز آماری مربوط به اسیدیته، ۲٤ ساعت بعد نشان از معنی‌دار بودن اثرگازهای (CO_2)و (N_2) برروی اسیدیته شیرخام، ۲٤ ساعت بعد می‌باشد ($p<0/05$). نتایج آماری نشان

داده‌است که نمونه‌هایی که ٢٤ساعت بعد از تزریق گازها که در دمای ٤ °C در داخل یخچال نگهداری شده‌اند در نمونه‌هایی که ١٠٠٪ حاوی نیتروژن می‌باشد اسیدیته شیرخام در حد نرمال ١٥ درجه دورنیک می‌باشد که در مقایسه با اسیدیته ٢٤ ساعت قبل تغییر معناداری نداشته و تقریبا ثابت می‌باشد.طبق جدول شماره ١، در نمونه‌هایی که درصد هر دو گاز در حدود ٥٠ درصد باشد، اسیدیته از ٤١ درجه دورنیک به ٤٥ درجه دورنیک افزایش یافته‌است. هم‌چنین، در نمونه‌هایی که درصد گاز دی‌اکسیدکربن در حدود ١٠٠٪ می باشد، اسیدیته نسبت به اسیدیته ٢٤ ساعت قبل، از ٤٤ درجه دورنیک به ٤٧ درجه دورنیک افزایش یافته‌است. نمونه‌های شیرخام بعد از تزریق گاز در داخل یخچال در دمای ٤ °C سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت نگهداری شده و نمونه‌هایی که حاوی ١٠٠٪ نیتروژن بودند تقریبا بدون تغییر مانده و بقیه نمونه‌ها که مخلوطی از هر دوگاز بودند به نحوی باگذشت زمان دچار افزایش اسیدیته شده‌اند. ترکیب گازها برروی اسیدیته اثر آنتاگونیستی داشته است.

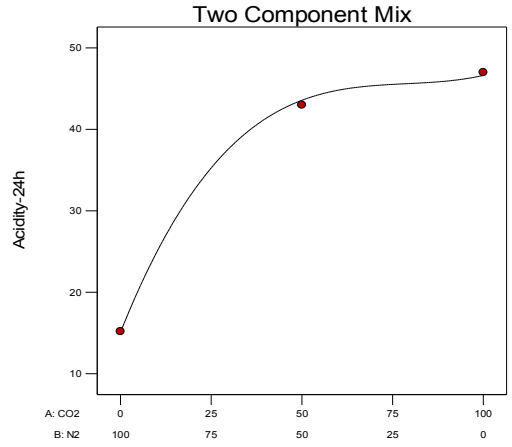

Fig 4 Acidity changes 24 hours after gas flushing

٣-٤-٥- بررسی تغییرات pHشیرخام ٢٤ ساعت بعد از تزریق گازها

نتایج آماری pH ٢٤ ساعت بعد (جدول شماره ٢)، نشان از معنی‌دار بودن اثرگازهای (CO_2)و (N_2) می‌باشد($p<0.05$). بررسی جدول آنالیز واریانس مربوط به تغییرات pH ٢٤ ساعت بعد تزریق گازها نشان می‌دهد که وقتی میزان دی‌اکسیدکربن در حد صفر بوده و میزان نیتروژن در حد ١٠٠٪ باشد، pH شیرخام در حدود ٦/٦٢ بوده و طبق نمودار شکل ٥، زمانی‌که درصد هر دو گاز در حد ٥٠٪ باشد،pH شیرخام در حد ٥/٨٣ می‌باشد. هم‌چنین، زمانی‌که درصد گاز دی‌اکسیدکربن در حد ١٠٠٪ باشد،pH شیرخام در حدود ٥/٧٧ می‌باشد. ترکیب گازها برروی pH خاصیت آنتاگونیستی دارد.

مقادیر pH شیر تیمار شده با گاز نیتروژن و شیرخام، پس از ٦ و ٧ روز نگهداری به ترتیب ٦/٦٧ (نمونه شاهد) و ٦/٨١ (شیر تیمار شده) از ٦/٧٤ (نمونه شاهد) و ٦/٧٥ (شیر تیمار شده) شده‌است. در انتهای آزمایشات مخازن شاهد، بوی بدی را ساطع می‌کردند که معمولا ناشی از شیر فاسد شده‌بود، در مقابل شیر تیمار شده بوی ناخوشایندی حس نشد[٢٣]. ورود نیتروژن خالص به فضای سر فلاسک‌های شیرخام، بدون در نظرگرفتن مدت زمان آزمایش، تنها به میزان اندکی مقادیر pH اولیه شیر را تغییر داده‌است. نتایج بدست آمده از مطالعه انجام شده بوسیله دِکِمی و همکارانش در سال ٢٠٠٥مطابق بود، آن‌ها نیز مشاهده کردند که افزودن گاز نیتروژن خالص، برخلاف تیمار با دی‌اکسیدکربن که باعث اسیدی شدن قابل توجه شیر می‌شود، در pH اولیه شیر تغییری را ایجاد نمی‌کند [٢٥].

pH شیرهایی تیمارشده با دی‌اکسیدکربن در ٧ روز اول نگهداری، افزایش یافته و از روز ٧ تا ٢١ ثابت باقی ماندند و در نمونه شاهد کاهش از خود نشان دادند. که طی نگهداری یک کاهش درحال پیشرفت در غلظت دی‌اکسیدکربن در نمونه‌های تیمار شده دی‌اکسیدکربن مشاهده می‌شود که میزان آن طی زمان در کلیه تیمارها مشابه می‌باشد. نمونه‌های شیر پس از ١٠ روز نگهداری در دمای ٤°C، pH نمونه شیر شاهد ٠/٦ واحد و نمونه‌های حاوی دی‌اکسیدکربن تا pH برابر ٦/٤ و ٦/٢ به ترتیب در حدود ٠/٤ و ٠/٢ واحد افت کردند و در حالیکه pH در نمونه شیر تیمار شده با دی‌اکسیدکربن تا pH برابر ٦ به مقدار اولیه برگشت. مقایسه بین pH اولیه وpH ٢٤ ساعت بعد نشان می‌دهد که در pH نمونه‌های شیرخام بعد از ٢٤ ساعت ٠/٢ واحد تا ٠/٥ واحد افت دیده می‌شود [٢٦].

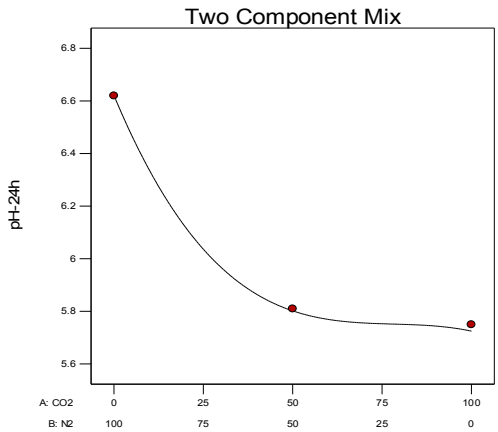

Fig 5 pH changes 24 hours against gas flushing rate

۳-٤-٦- بررسی تغییرات مربوط به بارمیکروبی شیرخام

براساس نتایج آماری کشتکلیباکتری‌های شیرخام، نشان از معنی-دار بودن اثرگازهای (CO_2) و (N_2) می‌باشد ($p<0.05$). بررسی نمودار شکل ٦، مربوط به مدل فوق، نشان داده‌است که با افزایش زمان تحت تاثیر قرارگرفتن شیرخام با مخلوط گازها از ۹ دقیقه به ۱۵ دقیقه میزان جمعیت بارمیکروبی از $۱/۱\times۱۰^{۷}$ CFU/ml به $۷/۵\times۱۰^{٦}$ CFU/ml و در طی ٦ دقیقه جمعیت بارمیکروبی در حدود نیم سیکل لگاریتمی کمتر می‌شود. طبق نتایج آماری، درصد گازها در میزان باکتری‌هایکلیشیرخام معنی‌دار نبوده و اثر خطی ومعادله درجه ۲ زمان بر روی شمارش کلی موثر می‌باشد.

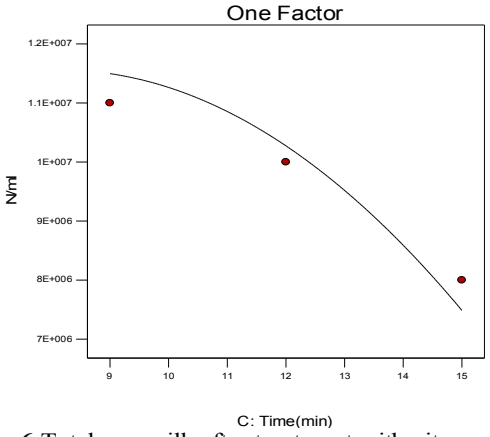

Fig 6 Total raw milk after treatment with nitrogen and carbon dioxide (50:50; time 7.5 min)

بررسی نتایج آماری مربوط به جمعیت باکتری کلی‌فرم، نشان از معنی‌دار بودن اثر گازهای (CO_2) و (N_2) بوده‌است ($p<0.05$). بررسی شکل ۷، مربوط به تغییرات کلی‌فرم، نشان داده‌است که زمانی‌که میزان CO_2 در شیرخام ۱۰۰٪ باشد تعداد کلی‌فرم در شیرخام ۲۸×۱۰^{۳} در میلی‌لیتر، کم‌ترین میزان بوده و زمانی که درصد هر دو گاز در۵۰٪ باشد تعداد کلی‌فرم افزایش یافته و به ٦۸×۱۰^{۳} در میلی‌لیتر می‌رسد. آنچه که از نمودار مشخص می‌شود این است که با افزایش درصد نیتروژن به ۱۰۰٪، تعداد کلی‌فرم به ٤۷×۱۰^{۳} در میلی‌لیتر کاهش پیدا می‌کند. با افزودن CO_2 به شیرخام سرد شده تا pHهای برابر ٦ و ٦/۲ به طور قابل ملاحظه‌ای رشد میکروبی را کاهش داده‌است. به‌طوری‌که این نمونه‌ها به‌ترتیب با نمونه شیر شاهد اختلافی در حدود ۱/۰۸۲ و ۰/۸۵ واحد لگاریتمی برای بار میکروبی کل و ۱/۰۸۹ و ۰/۹۳۳ واحد لگاریتمی برای باکتری سرماگرا و ۰/۷٤۲ و ۰/٦۷٤ واحد لگاریتمیبرای باکتری‌های کلی‌فرم پس از ۱۰ روز نگهداری در دمای ٤°C از خود نشان داد [۲۳].

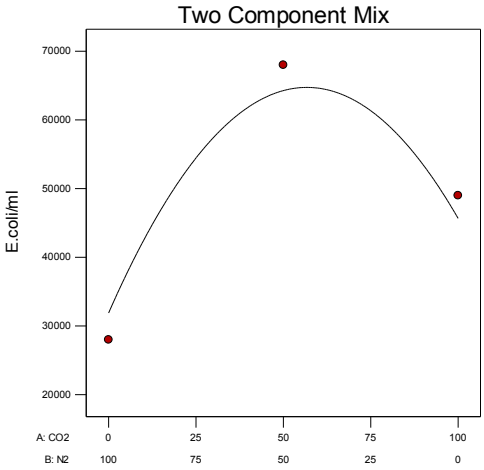

Fig 7 coliform population relation to gas mixture ratio

براساس نتایج آنالیز آماری مربوط به تعداد کپک، نشان از معنی‌دار بودن اثر گازهای (CO_2) و (N_2) بود ($p<0.05$). بررسی نمودار شکل ۸ آنالیز واریانس مربوط به تغییرات تعداد کپک نشان می‌دهد که در زمان ۹ دقیقه تیماردهی، تعداد کپک‌ها ۷×۱۰^{۳} کلونی بوده و با افزایش زمان تیماردهی، تعداد کپک‌ها به ٤×۱۰^{۳} کلونی کاهش یافته‌است. طبق جدول آنالیز واریانس اثر خطی زمان معنادار بوده ولی اثر معادله‌های درجه ۲ و ۳ معنادار نمی‌باشد.

۳ مکانیسم کلی وجود دارد که CO_2 از طریق آن‌ها میکروارگانیسم‌ها را مهار می‌کند. اولین و ساده‌ترین مکانیسم بوسیله جایگزینی با O_2 می‌باشد.

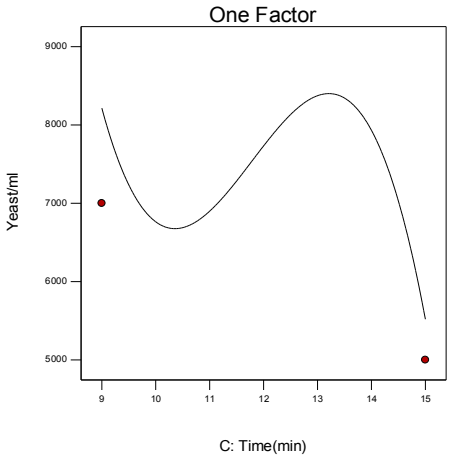

Fig 8 Mold population relation to gas mixture ratio

دومین مکانیسم، پایین آوردن pHمحیط یا ماده غذایی بواسطه حل شدن CO_2 و تشکیل اسیدکربنیک در فاز آبی ماده غذایی .سومین مکانیسم در مقایسه با اثرات غیر مستقیم کاهش pHو جایگزینی O_2، اثری مستقیم بر روی متابولیسم میکروارگانیسم‌ها دارد. به وضوح تیمار با نیتروژن رشد باکتری‌هایی را مهار می‌کند که در آن بیش‌ترین میزان مهار در بالاترین نرخ جریان دیده شده‌است. اگرچه در برخی از نمونه‌ها میزان جمعیت اولیه باکتری‌ها تا حدی بالا بود (۷/۳×۱۰^{٤} CFU/ml)، در دمای ٦°C با نرخ نیتروژن بالاتر به مدت ۱۱ روز فلورمیکروبی در سطح اولیه خود نگه داشته شد [۲۷]. در دمای ۷ °C ، نمونه شاهد بدون توجه به زیر گروه باکتریایی مورد آزمایش، در مدت ۱۰روز افزایش جمعیتی برابر

با ۵ واحد لگاریتمی نشان دادند. در این مطالعه فلاشینگ گاز نیتروژن (N) شمارش کل باکتری‌ها پس از ۷ روز نگهداری در دمای ٦ °C برای هر سه نمونه را زیر ۳×۱۰^{٥} CFU/ml حفظ کرده اما هم‌چنین پنانسیل زیادی را در جلوگیری از افزایش زیاد مزوفیل‌ها یا سایکروتروف‌های حامل ویژگی‌های مقاومت چندگانه نشان داده‌است. [۲۸]. نتایج دو آزمایش که در آن‌ها ۱۱۰ لیتر شیرخام در مخزن در دمای ۰/٤ ± ۵/۵ نگهداشته شده‌بودند، به مدت ٦ تا ۷ روز با گاز فلاش شده در فضای سر، پس از تزریق گاز به مدت ٦ ساعت تیمار شدند، تعداد کل باکتری‌های اولیه ٦×۱۰^{٤} CFU/mL و ۱۰×۱۰^{٤} بودند. در مخزن شماره ۲ که گاز استفاده نشد (شیر خام شاهد)، یک واحد لگاریتمی افزایش در تعداد کلی باکتری‌ها پس از ۲ روز نگهداری مشاهده شد درحالی که، در شیر تیمار شده با گاز نیتروژن، افزایش یک واحد لگاریتمی ٤/۵ تا ۵/۵ روز طول کشید. این تیمار زمان نگهداری را تقریبا ۲/۵ برابر طولانی‌تر می‌کند. مقادیر pHشیر تیمار شده با گاز نیتروژن و شیرخام پس از ٦ و ۷ روز نگهداری، به‌ترتیب، ٦/٦۷ (نمونه شاهد) و ٦/۸۱ (شیر تیمار شده) از ٦/۷٤ (نمونه شاهد) و ٦/۷۵ (شیر تیمار شده) می‌باشد. در انتهای آزمایشات، مخازن شاهد، بوی بدی را ساطع می‌کردند که معمولا ناشی از شیر فاسد شده بود، در مقابل شیر تیمار شده بوی ناخوشایندی حس نشد[۲۵]. نتایج میکروبی مشخص می‌کند کهبا افزایش زمان تیماردهی به ۱۵ دقیقه، میزان جمعیت بارمیکروبینیم سیکل لگاریتمی کاهش پیدا نموده و افزایش میزان گاز نیتروژن به ۱۰۰ درصد، تعداد کلونی‌های کپک از ۷۰۰۰ به ٤۰۰۰ کاهش پیدا می‌کند. براساس نتایج، از گاز نیتروژن می‌توان به عنوان یک بازدارنده رشد میکروبی استفاده کرد.

Table 2 Some Characteristics of the Models for Responses

Model Summary	Regression equation	Response
R^2=0.9978 R^2(adj)=0.9971	+0.43* CO_2+0.14* N_2+4.5E-003* CO_2 * N_2 -2.13E-005* CO_2 * N_2 * (CO_2-N_2)	Acidity (°D)
R^2=0.9929 R^2(adj)=0.9918	+0.058* CO_2+0.06* N2-1.51E-004* CO_2 * N_2	pH
R^2=0.9994 R^2(adj)=0.9992	+6.25* CO_2+5.43* N_2+0.014* CO_2 * N_2-9.92E-005* CO_2 * N_2 * (CO_2-N_2)	FP
R^2=0.9989 R^2(adj)=0.9986	+0.46* CO_2+0.15* N_2+5.08E-003* CO_2 * N_2-2.93E-005* CO_2 * N_2 * (CO_2-N_2)	Acidity-24h
R^2=0.9975 R^2(adj)=0.9952	+0.05* CO_2+0.06* N_2-1.48E-004* CO_2 * N2+8.77E-007* CO_2 * N_2 * (CO_2-N_2)	pH-24h
R^2=0.9306 R^2 (adj)= 0.9180	+5.78E+006+1.41E+006* Time(min) -86880.10* Time(min)2	Total count (CFU/ml)
R^2=0.9011 R^2(adj)=0.8846	+456.71* CO_2+318.94* N_2+10.19* CO_2 * N_2	E.coli (CFU/ml)
R^2=0.7966 R^2(adj)=0.7355	+2.39E+005-60881.23* Time(min)+5243.42* Time(min)2-148.32* Time(min)3	Yeast (CFU/ml)

۳-۵-تاثیر تیمار گازهای دی‌اکسیدکربن و نیتروژن بر روی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ماست تهیه شده

۳-۵-۱- بررسی تغییرات مربوط به سینرزیس و ویسکوزیته ماست

با توجه به بررسی جدول آنالیز واریانس مربوط به سینرزیس ماست مشخص می‌شود که تعداد روزهای نگهداری برروی سینرزیس معنادار می‌باشد($p<0/05$). هم‌چنین مشخص شد که اثر تیمار گازها بر روی شیرخام در سینرزیس ماست معنی‌دار نیست. نتایج جدول آنالیز واریانس در رابطه با ویسکوزیته ماست نتایج معنی‌دار نبوده وتعداد روزهای نگهداری وتیمار گاز بر روی ویسکوزیته ماست تاثیر معنی‌داری ندارد.

۳-۵-۲-بررسی تغییرات مربوط به اسیدیته و pH ماست

براساس نتایج آنالیز آماری مدت زمان نگهداری ماست در اسیدیته معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$). طبق نتایج جدول تیمارها بر اسیدیته ماست تاثیر گذار نمی‌باشد. میانگین اسیدیته در روز دوم ۸۷/۳ درجه دورنیک بوده و میانگین اسیدیته در روزهای یازده و بیست و دو به ترتیب ۹۹/۳۳و۹۷/۳۳ درجه دورنیک بوده‌است. نوع گاز تزریق شده در شیر ماست بر اسیدیته ماست معنی‌دار نمی‌باشد. میانگین اسیدیته ماستی که شیر آن تیمارشده با گاز دی‌اکسیدکربن و نیتروژن و شیرخام بدون تیمار به ترتیب ۹۱/۶ و ۹۲/۳۳ و ۹۳/۳۳ درجه دورنیک بوده و اختلاف معنی-داری مشاهده نمی‌شود. با توجه به بررسی جدول آنالیز واریانس مربوط به pH ماست مشخص شد که تعداد روزهای نگهداری بر روی pH ماست اثر معنی‌داری دارد. pH ماست در روزهای ۲ ،۱۱ ،۲۲ به ترتیب ٤/۳ ، ٤/۱۲و ٤/۱۳ می‌باشد. نتایج جدول نشان می‌دهد گازهای تیمارشده بر pHماست معنی‌دار نمی‌باشد.

۳- ۵- ۳- ویژگی‌های مربوط به ارگانولپتیکی ماست

نمونه‌ها توسط ۱۰ نفر کارشناس آموزش دیده ارزیابی شده‌اند. فاکتورهای مورد ارزیابی شامل بافت، عطر، طعم، رنگ و پذیرش کلی محصول می‌باشد.نحوه امتیازدهی کاملا مناسب ۵ امتیاز، مناسب ٤ امتیاز، متوسط ۲ امتیاز، نامناسب ۲ امتیاز و کاملا نامناسب ۱ امتیاز می‌باشد. نتایج ارزیابی ماست‌ها در روز دوم بدین صورت می‌باشد که ماست تهیه شده از شیرتیمار شده با دی‌اکسیدکربن از لحاظ بافت بسیار شل و از لحاظ طعم و مزه و رنگ نامناسب بوده و برعکس ماست‌های تهیه شده از شیرخام و شیرتیمار شده با نیتروژن دارای بافت مناسب و رنگ و طعم مناسبی بودند میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیرخام٤/٤٧ و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با نیتروژن٤/٦٢ و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با دی‌اکسیدکربن ۱/۰۵بود و در نهایت کارشناسان در روز دوم ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با نیتروژن را با امتیاز کلی ٤/٦٢ نسبت به دو گزینه دیگر برتری دادند. نتایج ارزیابی ماست‌ها در روز ۱۱ بدین صورت می‌باشد که ماست تهیه شده از شیرتیمار شده با دی‌اکسیدکربن از لحاظ بافت بسیار شل و از لحاظ طعم و مزه و رنگ نامناسب بوده و برعکس ماست‌های تهیه شده از شیرخام و شیر تیمار شده با نیتروژن دارای بافت مناسب و رنگ و طعم مناسبی بودند. میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیرخام٤/٥٥ و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیرتیمار شده با نیتروژن٤/٧٢ و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با دی-اکسیدکربن ۱/۰۵بوده و در نهایت کارشناسان در روز ۱۱ ماست تهیه شده از شیر تیمارشده با نیتروژن را با امتیاز کلی٤/٧٢ نسبت به دو گزینه دیگربرتری دادند. نتایج ارزیابی ماست‌ها در روز ۲۲ نیز بدین‌صورت می‌باشد که ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با دی‌اکسیدکربن از لحاظ بافت بسیار شل و از لحاظ طعم ومزه و رنگ نامناسب بود وبرعکس ماست‌های تهیه شده از شیرخام و شیر تیمار شده با نیتروژن، دارای بافت مناسب و رنگ و طعم مناسبی بودند. میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیرخام٤/٣٧ بوده و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با نیتروژن ٤/٦٢ می‌باشد و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با دی‌اکسیدکربن ۱/۰۵بوده و نهایتا کارشناسان در روز ۲۲ ماست تهیه شده از شیر تیمارشده با نیتروژن را با امتیاز کلی٤/٦٢ نسبت به دو گزینه دیگر برتری دادند. ارزیابی ارگانولپتیکی ماست‌ها در روزهای ۲، ۱۱ و ۲۲ نشان می‌دهد که ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با نیتروژن، دارای عطر و طعم و رنگ و بافت قابل قبولی می‌باشد.

٤-نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد کهمیزان غلظت گاز دی‌اکسیدکربن در شیرخام، در اسیدیته و pHشیرخام نقش مستقیم داشته و سبب افزایش اسیدیتهو افت pH شیرخام می‌شود. با افزودن گاز دی‌اکسیدکربن به شیرخام، نقطه انجماد شیرخام کاهش می‌یابد. با افزایش زمان تیمار به ۱۵ دقیقه، میزان جمعیت بارمیکروبی کاهشمی‌یابد. با افزایش میزان گاز نیتروژن به۱۰۰٪، تعداد کلی‌فرم کاهش می‌یابد. با افزایش مدت زمان تحت تاثیر قرارگرفتن شیرخام با مخلوط گاز دی‌اکسیدکربن و نیتروژن به مدت ۱۵ دقیقه، تعداد کپک‌هاکاهش داشته‌است. تعداد روزهای نگهداری ماست (۲روز، ۱۱روز، ۲۲روز) در دمای ٤ °C بر روی اسیدیته ماست تاثیرمعنی‌داری داشته‌است. تعداد روزهای نگهداری ماست برروی pHماست تاثیر معنی‌داری داشته‌است. تعداد روزهای نگهداری ماست در دمای ٤ °C برروی سینرزیس ماست تاثیر معنی‌داری داشته‌است. طعم و مزه و بافت ماستی که با شیرخام تیمار شده با N_2 تهیه شده بود، مطلوب‌تر از طعم ماستی می‌باشد که با شیرخام تیمار شده با دی‌اکسیدکربن و یا شیرخام تهیه شده‌است. بهترین نتایج از لحاظ بازدارندگی تیماردهی شیرخام با ۱۰۰٪گاز نیتروژن می‌باشد. در حالت کلی، استفاده از گازها می‌تواند نویدبخش تولید محصولات با کیفیت و خواص حسی مطلوب‌تر باشد که رسیدن به چنین کیفیتی تنها با انجام پژوهش‌های بیشتر امکان پذیر است.

٥- منابع

[1] Yildiz, F, 2010, Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products, Taylor & Francis Group, London, 3-60.

[2] Hotchkiss,H. Brenda G. Werner, and Edmund Y.C. Lee (2006). Addition of Carbon Dioxide to Dairy Products to Improve Quality "Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,5:158–168.

[3] Staffolo, M.D, Bertola, N, Martino, M, Bevilacqua, A, 2004, Influence of dietry fiber addition on sensory and rheologhical properties of yogurt, International Dairy Journal, 14, 263- 268.

[4] Gschwendtner. S. Alatossava. T. Kublik. S, Mrkonjić Fuka. M, Schloter.M, Munsch Alatossava.P (2016). N2 Gas Flushing Alleviates the Loss of Bacterial Diversity and Inhibits Psychrotrophic Pseudomonas during the Cold Storage of Bovine Raw Milk.

[5] Petrov,P، Yaroslava Zhukova, Yuriy Demikhov (2016)" The Effects of Dairy Management on Milk Quality Characteristics"Turkish Journal of Agriculture Food Science and Technology 4(9): 782-786, 2016

[6] Gursoy.O, Munsch-Alatossava.P, Ertan.K, Yilmaz.Y, Alatossava.T.(2017). Effect of nitrogen gas flushing treatments on total antioxidant capacity and ascorbic acid content in raw bovine milk during cold storage: 155-164.

[7] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, National Iranian Standard No. 2852.

[8] Ramasubramanian, L, Restuccia, C, Deeth, H, 2008, Effect of Calcium on the Physical Properties of Stirred Probiotic Yogurt, Journal of Dairy Science, 9, 4164-4175.

[9] Valdez D, Le Huérou JY, Gindre M, Urbach W and Waks M, 2001. Hydration and protein folding in water and in reverse micelles: compressibility and volume changes. Biophysical journal 80(6): 2751-60.

[10] Henno M, Ots M, Jõudu I, Kaart T and Kärt O, 2008. Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. International Dairy Journal 18(2): 210-215.

[11] ISIRI, 2015. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique, ISIRI 5272-1. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Tehran.

[12] ISIRI, 2014a. Milk and milk products - Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds-colony - count technique at 25°C, ISIRI 10154. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Tehran.

[13] Pacarrynak LA and Danyk HC, 2012. Biology 3400 princioples of microbiology laboratory manual. The University of Lethbridge, Canada.

[14] Dönmez O, Mogol, B, Gökmen, V, 2017, Syneresis and rheological behaviors of set yogurt containing green tea and green coffee powders, J. Dairy Sci, 100, 1-7.
[15] Sahan, N, Yasar, A, Hayaloglu, M, 2008, Physical, chemical and flavor quality of nonfat yogurt as affected by a β-glucan hydrocolloidal composite during storage, Food Hydrocolloids, 22, 1291-1297.
[16] ISIRI, 2017b. yoghurt test– Specification and test methods, ISIRI 2852. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Tehran.
[17] Smit, G, Smit, B, Engels, W, 2005, Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products, FEMS microbiology Reviews, 29, 591-61.
[18] Munsch-Alatossava,p. Oguz Gursoy and Tapani Alatossava (2010)" Improved Storage of Cold Raw Milk by Continuous Flushing of N2 Gas Separated from Compressed Air. J FoodProcess Technol.1:101-122.
[19] Hotchkiss,H. Brenda G. Werner, and Edmund Y.C. Lee (2006). Addition of Carbon Dioxide to Dairy Products to Improve Quality "Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,5:158–168.
[20] Gschwendtner.S. Alatossava.T. Kublik.S,Mrkonjić Fuka. M, Schloter.M, Munsch Alatossava.P (2016). N2 Gas Flushing Alleviates the Loss of Bacterial Diversity and Inhibits Psychrotrophic Pseudomonas during the Cold Storage of Bovine Raw Milk.
[21] Trachoo N & Mistry VV. 1998. Application of ultrafiltered sweet buttermilk and sweet buttermilk powder in the manufacture of nonfat and low fat yogurts. Journal of Dairy Science, 81, 3163-3171.
[22] vianna , e. H. m. Walter , m. e. F. Dias , J. a. F. Faria , F. m. Netto , and m. L. Gigante (2016)." effect of addition of CO2 to raw milk on quality of UHt-treated milk. Journal of Dairy Science Vol. 95 No. 95 :4256–4262, 2012.
[23] Munsch-Alatossava, Tapani Alatossava and Jean-Pierrre Gauchi (2017)." N2 Gas Flushing Limits the Rise of Antibiotic-Resistant Bacteria in Bovine Raw Milk during Cold Storage "frontiers in microbiology.volume 8.
[24] Liaoa.H, Zhongb.K, Huc.X, Liaoc.X.(2019). Effect of high pressure carbon dioxide on alkaline phos phatase activity and quality characteristics of raw bovine milk :457–462.
[25] Munsch-Alatossava,P, Oguz Gursoy, Tapani Alatossava(2019)." Exclusion of phospholipases (PLs) producing bacteria in raw milk flushed with nitrogen gas(N2). Science Direct, Microbiological Research 165 (2010) 61—65.
[26] Ma, Y., M, Barbano., J. H, Hotchkiss., S, Murphy and J. M, Lynch. 2001. Impact of CO2 addition to milk on selected analytical testing method. Journal of Dairy Science, 84: 1959-1968.
[27] Barbano .M.and M, Santost. (2003). Effect of CO2 addition to raw milk on proteolysis andlipolysis at 4 C. Journal of Dairy Science, 86: 1616-1631.
[28] Munsch-Alatossava.p, Tapani Alatossava and Jean-Pierrre Gauchi (2016). Efficiency of N2 Gas Flushing Compared to the Lactoperoxidase Systemat Controlling Bacterial Grow Thin Bovine Raw Milk Stored at Mild Temperatures. Volume 7

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

An Investigation about effects of mixture of carbon dioxide and nitrogen gasproperties of raw bovine milk using response surface methodology

Ghadiri, B. [1], Moghaddas Kia, E. [2]*, Alizadeh, M. [3], Ghasempour, Z. [4]

1. GraduatedM.Sc of food Science, Afagh Higher Education Institute, Urmia, Iran
2. Assistant Professor, Food science and nutrition department, Maragheh University of Medical sciences
3. Professor, Food science and technology department, Urmia University
4. Assistant Professor, Food science and technology department, Tabriz university of Medical sciences

ARTICIE INFO

Article History:

Received 09 September 2020
Accepted 25 November 2020

Keywords:

Gas flushing,
Carbon dioxide,
Nitrogen,
Raw bovine milk,
Acidity,
Total microbial count.

DOI: 10.52547/fsct.18.03.29

*Corresponding Author E-Mail:
Ehsan.m.kia@gmail.com

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of injection of CO_2 / N_2 gases at different ratios and gas treatment duration on physicochemical and microbiological properties of raw milk using a combined design. In this research acidity, pH,freezing point, total count, total yeast and mold count andtotal coliform count were performedon 15 raw milk samples between 9 and 15 minutes after injections. Statistical analysis showed that the combined treatment of nitrogen and carbon dioxide had significant effect on the acidity and pH of raw milk ($p<0.05$), so that with increasing the amount of carbon dioxide to 100%, the pH decreased and acidity increased. The combined effect of both gases on the freezing point of raw milk was significant ($p<0.05$). Increasing the treatment time of raw milk from 9 to 15 minutes had significant effect ($p<0.05$) on reducing the microbial load, but no significant reduction was observed due to the combination of gases. According to ANOVA results, in 100% nitrogen and duration of 15 minutes, the best results in terms of microbiology and chemistry were obtained. The effect of milk treated with a mixture of CO_2 and N_2 gases on yogurt properties, as a food model, has also been investigated. Yogurt samples were investigated for chemical, microbial, and organoleptic properties during 22 days storage time. The results showed that the raw milk treated with gas mixture did not have an adverse significant effect on the sensory and physicochemical properties of yogurt ($p> 0.05$). However, yogurt acidity, pH and synthesis were significantly affected during storage time ($p<0.05$). Therefore, the application of raw milk treatment with 100% nitrogen gas for 15 minutes can be considered as a bacteriostatic agent in the preservation of raw milk in industrial scale.