



## بررسی تاثیر همزمان مخلوط گازهای دی اکسید کربن و نیتروژن بر ویژگی های فیزیکوشیمیایی و میکروبی

### شیر گاو بر اساس روش آماری سطح رویه پاسخ

بهروز قدیری علمداری<sup>۱</sup>، احسان مقدس کیا<sup>۲\*</sup>، محمد علیزاده<sup>۳</sup>، زهرا قاسم پور<sup>۴</sup>

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- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

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

#### چکیده

#### اطلاعات مقاله

هدف از این پژوهش بررسی اثر تزریق نسبت های مختلف گازهای دی اکسید کربن، نیتروژن و زمان تیمار با گاز بر اساس طرح آماری ترکیبی بر روی ویژگی های فیزیکوشیمیایی و میکروبی شیر خام میباشد. در این پژوهش در فاصله 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 شیر خام سنجیده شد. بررسی های آماری حاصل از این پژوهش نشان میدهد که تیمار توامان گازهای نیتروژن و دی اکسید کربن بر روی اسیدیته و pH شیر خام تاثیر معنی دار داشت ( $p < 0/05$ )، به طوریکه با افزایش میزان گاز دی اکسید کربن به ۱۰۰٪، pH کاهش یافته و اسیدیته افزایش یافت. تاثیر توامان هر دو گاز بر روی نقطه انجماد شیر خام معنی دار بود ( $p < 0/05$ ). افزایش زمان تیمار شیر خام از ۹ به ۱۵ دقیقه بر روی کاهش جمعیت باریکروبی، معنی دار بوده ( $p < 0/05$ ) ولی در اثر ترکیب گازها کاهش معنی داری 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<sub>2</sub> و N<sub>2</sub>، 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 شیر تیمار شده با این روش نداشت ( $p > 0/05$ ). اما تاثیر مدت زمان نگهداری بر روی اسیدیته، pH و سینریز ماست معنی دار بود ( $p < 0/05$ ). لذا استفاده از تیماردهی شیر خام با ۱۰۰٪ گاز نیتروژن به مدت ۱۵ دقیقه می تواند به عنوان یک عامل باکتری و استاتیک در نگهداری شیر خام در مقیاس صنعتی مطرح باشد.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۰۵

کلمات کلیدی:

تیمار با گاز،

دی اکسید کربن،

نیتروژن،

شیر خام گاو،

اسیدیته،

شمارش کلی میکروبی.

DOI: 10.52547/fsct.18.03.29

\* مسئول مکاتبات:

Ehsan.m.kia@gmail.com

## 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 معمولاً 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 صورتی که 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  $10^3 \times 3$  در هر میلی‌لیتر تجاوز نماید، تخریب چربی، پروتئین و قند شیر اتفاق می‌افتد [۱]. تغییرات قابل توجهی در نتیجه رشد میکروبی در شیرخام 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 چربی‌ها 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 پروتازها، 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 در دمای 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 دی‌اکسیدکربن 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 بی‌کربنات وجود دارد [۲]. نیتروژن به عنوان یک منبع نامحدود در سیستم‌های تولید ارگانیک نیز مجاز بوده و دارای مزایای متعددی می‌باشد. هم‌چنین، عمدتاً قادر به افزایش مدت زمان نگهداری شیر بوسیله مهار باکتری‌های فسادزا می‌باشد. تزریق گاز نیتروژن در حضور تجهیزات زنجیره سرد، به منظور کنترل رشد باکتریایی در شیرخام مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴]. پترو و همکاران در سال ۲۰۱۷ با بررسی توانایی گاز نیتروژن در برطرف 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 سال ۲۰۱۶، با بررسی اثر گاز  $N_2$  به عنوان تیمار تنها و ترکیب با سیستم لاکتوپراکسیداز بر روی ۸ نمونه شیر خام نگهداری شده در دمای  $15^\circ C$  یا  $25^\circ C$  نشان دادند که فلاشینگ گاز  $N_2$  رشد باکتری‌ها را در شیرخام در دمای  $15^\circ C$  و  $25^\circ C$  به ترتیب، به مدت ۲۴ و ۱۲ ساعت مهار می‌کند [۶]. در حضور

آن تعبیه شده است. فشار گازهای داخل مخازن اصلی، ۱۵ بار و فشار گاز ورودی به داخل محفظه تزریق توسط رگلاتور، بر روی ۳ بار تنظیم گردیده است. میزان گاز تزریق شده به داخل محفظه براساس مدت زمان تعیین شده صورت گرفته و نمونه‌ها براساس جدول طرح آزمایشی با فشار ۳ بار، تحت تیمار گاز تعیین شده قرار گرفته است.

## ۲-۲-۲- آماده سازی نمونه‌ها

طبق طرح آزمایشات آماری (جدول شماره ۱)، ۱۵ تیمار متفاوت شیرخام آماده شد. در نمونه‌هایی که درصد گاز اول ۷۵٪ و گاز 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<sub>2</sub> تزریقی ۷۵٪ مشخص گردید که مدت زمان تزریق گاز ۱۰ دقیقه و یک ثانیه و میزان گاز N<sub>2</sub> تزریقی ۲۵٪ مشخص شده بود، که مدت زمان گاز تزریقی ۳ دقیقه و ۴ ثانیه صورت گرفت. در زمان تیماردهی، کپسول تزریق تا دهانه داخل یک حوضچه آب سرد با دمای ثابت ۴°C گذاشته شده بود تا دمای گاز و شیر داخل محفظه در تمامی نمونه‌ها بر روی ۴°C ثابت بماند. بلافاصله بعد از اتمام تیماردهی، بر روی تمامی نمونه‌ها، آنالیز کامل شیمیایی و میکروبی انجام گردید. تمامی نمونه‌های تیمار شده بلافاصله آنالیز شده و هم‌چنین از تمامی تیمارها نمونه برداری صورت گرفته و در یخچال با دمای ۴°C نگهداری گردید تا ۲۴ 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 هر کدام به میزان دو لیتر به ظروف استیل منتقل شده و تا دمای ۸۵°C حرارت داده شد و بلافاصله تا دمای ۴۲°C سرد شده بود و ۲٪ مایه‌زنی انجام شد (استاندارد ملی ایران ۵۵۶۲) و در آنکوباتور با دمای ۴۲°C منتقل شده و تارسیدن به pH=۴/۶ در گرم‌خانه نگهداری شده بود و یک نمونه ماست از شیرخام، نمونه دوم ماست از شیر تیمار شده با دی‌اکسیدکربن و نمونه سوم ماست از شیر تیمار شده با نیتروژن که از هر کدام سه ظرف ماست تهیه شده بود.

تجهیزات زنجیره سرد، فلاشینگ گاز نیتروژن را می‌توان در قالب یک چهارچوب زمانی کنترل شده (۱۲ و ۲۴ ساعت به ترتیب در دمای ۲۵°C و ۱۵°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 شده است. هر ۱۵ نمونه در یک محفظه استریل از جنس استیل طبق جدول شماره ۱ طرح آزمایشی تحت تاثیر گازهای نیتروژن و دی‌اکسیدکربن قرار گرفته است. استارتر مورد استفاده در این مطالعه (Lactin, Bulgaria) و محیط کشت های YGC، VRB.PCA 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 استیل 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

**۲-۲-۳- تهیه ماست از نمونه ها**

از شیرهای تیمار شده با گازهای نیتروژن ۱۰۰٪ و دی‌اکسیدکربن ۱۰۰٪ شیر خام بدون تیمار از هر کدام به میزان دو لیتر به ظروف استیل منتقل گردید و تا دمای ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و بلافاصله تا دمای ۴۲°C سرد گردید و ۲٪ مایه زنی انجام گرفت (استاندارد ملی ایران ۵۵۶۲) و تا رسیدن به pH= ۴/۶ در گرمخانه نگهداری گردید و سپس نمونه های ماست به سردخانه با دمای ۴°C منتقل گردید.

**۲-۳- آزمون های فیزیکوشیمیایی شیر خام****۲-۳-۱- pH شیر خام**

pH با استفاده از دستگاه pH متر دیجیتالی (مدل ۷۶۶ ساخت کارخانه کینک، کشور آلمان) اندازه گیری شده است. الکتروود pH متر را داخل نمونه با دمای ۱۵°C قرار داده شده و بعد از مدت ۴۵ ثانیه pH نمونه قرائت شده است [۷].

**۲-۳-۲- اسیدیته شیر خام به روش دورنیک**

برای اندازه گیری اسیدیته، ۱۰ میلی لیتر شیر خام را داخل یک بشر ریخته و ۲ قطره فنل فتالین ۱٪ اضافه شده و تا ظهور رنگ صورتی کم رنگ توسط سود n/۹ تیتراسیون ادامه یافته است. طبق تعریف یک درجه درنیک که با D نشان داده می شود معادل ۰/۱ گرم اسید لاکتیک در لیتر شیر می باشد [۸].

**۲-۳-۳- اندازه گیری دانسیته شیر خام**

دانسیته نمونه ها بوسیله ترمولاکتودانسیومتر (مدل DMA35 آنتون پار، اتریش) اندازه گیری شده است. اساس کار با ترمولاکتو دانسیومتر به این شرح می باشد که استوانه مدرج را تا حجم معینی (معمولا ۱۲۵۰ ml) از شیر پر شده و ترمولاکتودانسیومتر، داخل آن شناور می گردد. زمانی که ترمولاکتودانسیومتر داخل شیر بدون حرکت ثابت بماند، عدد دانسیته بر حسب درجه بندی روی آن قرائت می گردد. در صورتی که دمای شیر ۱۵°C نباشد بایستی عدد خوانده شده تصحیح شود به این ترتیب که بین ۱۵°C تا ۲۰°C به ازای هر یک درجه "بالای ۱۵°C رقم ۰/۲ به عدد خوانده شده اضافه شود و به ازای هر یک درجه کمتر از ۱۵°C رقم ۰/۲ از عدد خوانده شده کم شود [۹].

**۲-۳-۴- اندازه گیری نقطه ی انجماد شیر خام**

نقطه انجماد شیر خام با استفاده از دستگاه کرایوسکوپ (مدل AD3، ساخت شرکت ادونسد، کشور آمریکا) ارزیابی شده است. نمونه شیر خام را در داخل وت های شیشه ای ریخته و وت ها در محل قرارگیری آن داخل دستگاه کرایوسکوپ 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 می تواند باعث شکسته شدن وت و ایجاد مشکلاتی در دستگاه شود. با فشار دادن دکمه RUN الکتروود وارد وت شده و محلول کولینگ دمای شیر را پایین آورده و دستگاه در نقطه نزدیک به صفر °C شوک الکتریکی را به شیر خام وارد می نماید، که در این لحظه شیر خام شروع به انجماد کرده و نقطه انجماد شیر خام بر روی مانیتور نشان داده شده و قابل قرائت می باشد [۱۰].

**۲-۳-۵- بررسی تغییرات مربوط به بار میکروبی شیر خام (باکتری، کپک و مخمر)**

جهت کشت میکروبی، ابتدا محیط کشت Plate Count Agar بر حسب 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 بر حسب دستورالعمل مندرج بر روی محیط کشت، Yeast Extract Glucose Agar، عمل نموده و ظرف محتوی محیط کشت، در اتوکلاو 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 نگهداری شده است. سپس، تعداد کلونی ها شمارش شده و نتیجه قرائت شده است. جهت کشت و بررسی کلیفرم، ۱ میلی لیتر از نمونه داخل پلیت ریخته شده و سپس، ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت Violet Red Bile Agar، که جوشانده شده و سپس تا دمای ۴۵°C الی ۵۰°C خنک شده، به پلیت اضافه شده است. سپس، آن را در دمای ۲۵°C±۳۵ به مدت ۳۰ الی ۳۱ ساعت گرم خانه گذاری شده و سپس، تعداد کلونی ها

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

## ۲-۴- بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی ماست تهیه شده با شیر تیمار شده با گاز های نیتروژن و دی اکسید کربن

### ۲-۴-۱- اندازه گیری میزان سینریز ماست

برای اندازه گیری سینریز، ابتدا ۲۵ گرم از نمونه ها توزین شده و سپس از فیلتر کاغذی تحت دمای ۴°C (در داخل یخچال با دمای ۴°C) در مدت ۱۲۰ دقیقه عبور داده شد. سرم جدا شده از ماست برحسب میلی لیتر یادداشت شده و به عنوان میزان سینریز بیان شده است [۱۴].

### ۲-۴-۲- اندازه گیری میزان ویسکوزیته ماست

میزان ویسکوزیته ظاهری با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد، در ۲۵°C و اسپیندل شماره ۶۴، در سرعت چرخشی ۶۰rpm و پس از مدت زمان ۳۰ ثانیه اندازه گیری شده است. نمونه های ماست قبل از اندازه گیری ویسکوزیته، برای یکنواخت شدن بافت، به مدت یک دقیقه هم زده شده اند. اندازه گیری در دمای محیط انجام شده است [۱۵].

### ۲-۴-۳- اندازه گیری میزان اسیدیته ماست

اندازه گیری اسیدیته ماست، طبق استاندارد ملی ایران، شماره های 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/9 تیترا شده و تا ظهور رنگ صورتی ادامه یافت. تعداد یک دهم میلی لیترهای سود مصرفی، اسیدیته

شیر را برحسب درجه دورنیک نشان می دهد که توسط محلول سود ۰/۱ نرمال و در حضور معرف فنل فتالین انجام شده است [۱۶].

### ۲-۴-۴- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه ها با استفاده از آزمون هدونیک ۵ امتیازی انجام شده است. نمونه ها توسط ۱۰ نفر کارشناس صنایع غذایی ارزیابی شده اند. ارزیاب ها ۶ نفر مرد و ۴ نفر خانم بوده و بازه سنی ارزیاب ها بین ۲۸-۳۵ سال بوده اند. فاکتورهای مورد ارزیابی شامل بافت، عطر، طعم، رنگ و پذیرش کلی محصول بود. نحوه امتیازدهی به این صورت می باشد که کاملاً مناسب دارای ۵ امتیاز، مناسب دارای ۴ امتیاز، متوسط دارای ۲ امتیاز، نامناسب دارای ۲ امتیاز و کاملاً نامناسب دارای ۱ امتیاز می باشد [۱۷].

### ۲-۴-۵- تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه، از طرح آماری ترکیبی (Combined Design) برای بررسی تاثیر مخلوط دوجزئی از درصد گازها (۱۰۰-۰ درصد) و زمان اعمال گازها (۱۵-۹ دقیقه) بر روی شاخص های شیمیایی و میکروبی شیر استفاده شده است. تعداد ۱۵ نمونه شیرخام تحت تاثیر گاز دی اکسید کربن و نیتروژن طبق جدول شماره ۱، طرح آزمایشی قرار گرفته و سپس شیرهای تیمار شده مورد آنالیز شیمیایی و میکروبی قرار گرفته است. پس از مدل سازی شاخص ها، در جدول شماره ۲، از روش عددی برای یافتن شرایط بهینه استفاده شده است. جهت مدل سازی و آنالیزهای آماری و بهینه سازی در سطح خطای ۰/۵٪ توسط نرم افزار (Design Expert 10) استفاده شده است.

Table 1 Experimental design for gas flushing of raw milk samples

Run	Component 1	Component 2	Factor 3
	CO <sub>2</sub> (%)	N <sub>2</sub> (%)	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

### ۳-۴- نتایج و بحث

#### ۳-۴-۱- بررسی تغییرات pH شیر خام

افت pH شیر خام در پایداری پروتئین‌های شیر خام نقش مستقیمی دارد. براساس نتایج آنالیز آماری (جدول شماره ۲)، تاثیر توامان گازهای (CO<sub>2</sub>) و (N<sub>2</sub>) بر روی pH شیر خام معنی‌دار می‌باشد (p<0.05). بررسی نمودار pH براساس شکل یک مشخص می‌کند که زمانی که میزان دی‌اکسیدکربن در حد صفر باشد و متقابلاً میزان نیتروژن در حد ۱۰۰٪ باشد pH شیر خام در حدود ۶٫۷ دامنه طبیعی pH شیر خام بوده و به تدریج با افزایش میزان دی‌اکسیدکربن و کاهش میزان نیتروژن، pH شیر خام نیز افت معنی‌داری خواهد داشت. زمانی که درصد هر دو گاز در حد ۵۰٪ باشد، pH در محدوده ۵٫۹ می‌باشد و با افزایش دی‌اکسیدکربن به محدوده ۱۰۰٪، pH شیر خام به ۵٫۸۲ افت پیدا می‌کند. طبق جدول آنالیز واریانس، هر دو گاز نسبت به pH دارای خاصیت آنتاگونیستی می‌باشند. در اثر کاربرد CO<sub>2</sub>، pH محیط کاهش می‌یابد. حل شدن دی‌اکسیدکربن گازی در یک فاز آبی در دماهای متوسط و فشار پایین از قانون هنری تبعیت می‌کند که سبب افت pH محیط می‌گردد. با افزودن CO<sub>2</sub>، pH شیر کاهش پیدا کرده و کازئین‌ها از میسل جدا شده و مقدار کلسیم محلول و فسفات افزایش پیدا می‌کند. مانس و همکاران (۲۰۱۰) عنوان نمود که نیتروژن، گازی خنثی برای غلبه بر معایب استفاده از دی‌اکسیدکربن است [۱۸].

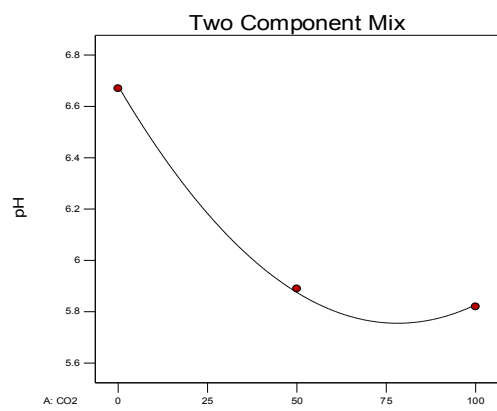


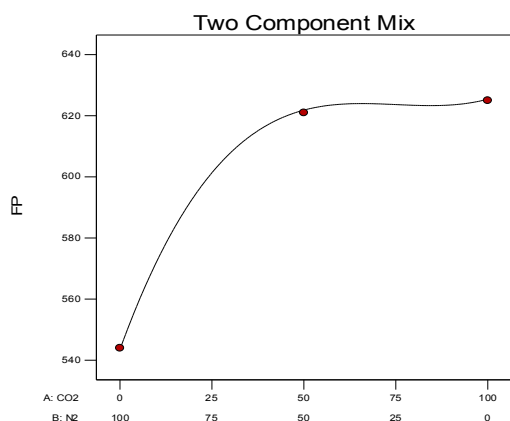
Fig 1 Effect of mixture of gases on pH of raw milk samples

#### ۳-۴-۲- بررسی تغییرات اسیدیته شیر خام

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، تاثیر توامان دی‌اکسیدکربن و نیتروژن بر روی اسیدیته شیر خام معنی‌دار می‌باشد (p<0.05). طبق شکل شماره ۲، اسیدیته شیر خام، زمانی که نیتروژن در میزان ۱۰۰٪ باشد، در محدوده ۱۴ درجه دورنیک بوده و به تدریج با افزایش درصد دی‌اکسیدکربن به سمت ۱۰۰٪ اسیدیته به ۴۴ درجه دورنیک افزایش یافته‌است. زمانی که درصد گازها در حدود ۵۰٪ باشد، اسیدیته شیر خام در حدود ۳۷ درجه دورنیک می‌باشد.

استفاده از تزریق گاز نیتروژن به شیر خام، تغییری در اسیدیته شیر خام نداشته و با توجه به نگهداری شیر خام در دمای ۴ °C، تغییری در اسیدیته مشاهده نشده‌است. [۲۰]. حل شدن گاز دی‌اکسیدکربن در محیط مایع، سبب افزایش اسید کربنیک در محیط مایع و افزایش اسیدیته شیر خام می‌گردد. افزایش اسیدیته شیر بوسیله افزودن CO<sub>2</sub> در فاصله‌های زمانی ۲۴ ساعته، به طور قابل توجهی اثر مهارکنندگی رشد میکروبی این گاز را در ۶/۲ pH تا ۶ pH با اسیدی شدن محیط بهبود می‌دهد. دی‌اکسیدکربن تحت فشار به عنوان یک عامل اسیدی‌کننده به شیر اضافه شده‌است. تغییرات فیزیوشیمیایی که در طی اسیدی کردن با

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 اسیدبته افت پیدا می‌کند. در شیر اسیدی شده با دی‌اکسیدکربن، زمانی که pH تا مقدار ۶ پایین می‌آید پروتئین‌های سرمی تا حد زیادی دناتوره می‌شوند. همچنین نقطه -انجماد شیر پایین می‌آید که به خاطر افزایش غلظت نمک‌ها در فاز سرمی همراه با اسید کربنیک و محصولات تجزیه شده آن می‌باشد. افزایش میزان پروتئین‌های سرمی و کازئین‌ها 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 اسیدبته کاهش پیدا می‌کند [۲۴].

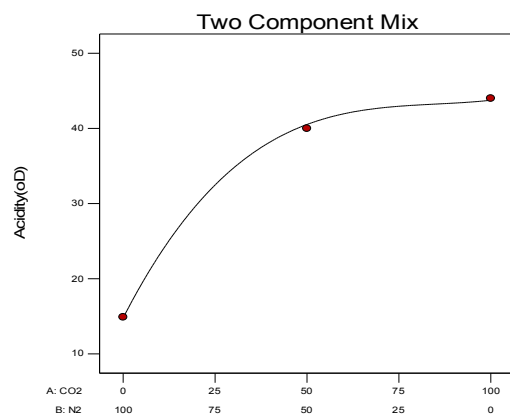


**Fig 3** Effect of mixture of gases on freezing point of raw milk samples

### ۳-۴-۴- بررسی تغییرات اسیدبته شیرخام ۲۴ ساعت بعد تزریق گازها

بر اساس نتایج آنالیز آماری مربوط به اسیدبته، ۲۴ ساعت بعد نشان از معنی دار بودن اثر گازهای (CO<sub>2</sub>) و (N<sub>2</sub>) بر روی اسیدبته شیرخام، ۲۴ ساعت بعد می‌باشد (p < 0/05). نتایج آماری نشان

CO<sub>2</sub> اتفاق می‌افتد، تقریباً مشابه با روش‌های متداول اسیدی کردن می‌باشد. زمانی که CO<sub>2</sub> در فاز آبی حل گردد، اسیدبته شیر افزایش می‌یابد [۲۱]. در طی افزودن CO<sub>2</sub>، کاهش pH و افزایش اسیدبته 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 اسیدبته شیرخام ندارد. در پژوهش حاضر مشخص شد که با افزایش درصد دی‌اکسیدکربن در محیط مایع و افزایش میزان اسیدکربنیک در محلول، اسیدبته شیر خام افزایش و pH کاهش یافته است [۲۲]. لذا، میزان غلظت گاز دی‌اکسیدکربن در شیرخام، در اسیدبته نقش مستقیم داشته و سبب افزایش اسیدبته شیرخام شده است.



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

### ۳-۴-۳- بررسی تغییرات نقطه انجماد شیرخام (FP)

بر اساس نتایج آنالیز آماری، تاثیر توامان گازهای (CO<sub>2</sub>) و (N<sub>2</sub>) بر نقطه انجماد شیرخام معنی دار می‌باشد (p < 0/05). نتایج مربوطه به نقطه انجماد مشخص می‌کند که زمانی که درصد گاز نیتروژن در حد ۱۰۰٪ باشد، نقطه انجماد شیرخام در حدود ۰/۵۴۵ - هورت-وت می‌باشد و زمانی که درصد گاز دی‌اکسیدکربن از صفر به ۵۰٪ می‌رسد نقطه انجماد شیرخام به ۰/۶۲۰ - هورت-وت می‌رسد. طبق نمودار شکل ۳، زمانی که درصد گاز نیتروژن در حد صفر بوده و گاز دی‌اکسیدکربن به ۱۰۰٪ می‌رسد، نقطه انجماد روند افزایشی داشته و به نقطه انجماد ۰/۶۳۰ - هورت-وت می‌رسد. با افت pH و

حد صفر بوده و میزان نیتروژن در حد ۱۰۰٪ باشد، pH شیرخام در حدود ۶/۶۲ بوده و طبق نمودار شکل ۵، زمانی که درصد هر دو گاز در حد ۵۰٪ باشد، pH شیرخام در حد ۵/۸۳ می‌باشد. همچنین، زمانی که درصد گاز دی‌اکسیدکربن در حد ۱۰۰٪ باشد، pH شیرخام در حدود ۵/۷۷ می‌باشد. ترکیب گازها بر روی خاصیت آنتاگونیستی دارد.

مقادیر pH شیر تیمار شده با گاز نیتروژن و شیرخام، پس از ۶ و ۷ روز نگهداری به ترتیب ۶/۶۷ (نمونه شاهد) و ۶/۸۱ (شیر تیمار شده) از ۶/۷۴ (نمونه شاهد) و ۶/۷۵ (شیر تیمار شده) شده است. در انتهای آزمایشات مخازن شاهد، بوی بدی را ساطع می‌کردند که معمولاً ناشی از شیر فاسد شده بود، در مقابل شیر تیمار شده بوی ناخوشایندی حس نشد [۲۳]. ورود نیتروژن خالص به فضای سر فلاسک‌های شیرخام، بدون در نظر گرفتن مدت زمان آزمایش، تنها به میزان اندکی مقادیر pH اولیه شیر را تغییر داده است. نتایج بدست آمده از مطالعه انجام شده بوسیله دیکمی و همکارانش در سال ۲۰۰۵ مطابق 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 [۲۵].

pH شیرهایی تیمار شده با دی‌اکسیدکربن در ۷ روز اول نگهداری، افزایش یافته و از روز ۷ تا ۲۱ ثابت باقی ماندند و در نمونه شاهد کاهش از خود نشان دادند. که طی نگهداری یک کاهش در حال 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 ۱۰ روز نگهداری در دمای ۴°C، pH نمونه شیر شاهد ۰/۶ واحد و نمونه‌های حاوی دی‌اکسیدکربن تا pH برابر ۶/۴ و ۶/۲ به ترتیب در حدود ۰/۴ و ۰/۲ واحد افت کردند و در حالیکه pH در نمونه شیر تیمار شده با دی‌اکسیدکربن تا pH برابر ۶ به مقدار اولیه برگشت. مقایسه بین pH اولیه و pH ۲۴ ساعت بعد نشان می‌دهد که در pH نمونه‌های شیرخام بعد از ۲۴ ساعت ۰/۲ واحد تا ۰/۵ واحد افت دیده می‌شود [۲۶].

داده است که نمونه‌هایی که ۲۴ ساعت بعد از تزریق گازها که در دمای ۴°C در داخل یخچال نگهداری شده‌اند در نمونه‌هایی که ۱۰۰٪ حاوی نیتروژن می‌باشد اسیدیته شیرخام در حد نرمال ۱۵ درجه دورنیک می‌باشد که در مقایسه با اسیدیته ۲۴ ساعت قبل تغییر معناداری نداشته و تقریباً ثابت می‌باشد. طبق جدول شماره ۱، در نمونه‌هایی که درصد هر دو گاز در حدود ۵۰ درصد باشد، اسیدیته از ۴۱ درجه دورنیک به ۴۵ درجه دورنیک افزایش یافته است. همچنین، در نمونه‌هایی که درصد گاز دی‌اکسیدکربن در حدود ۱۰۰٪ می‌باشد، اسیدیته نسبت به اسیدیته ۲۴ ساعت قبل، از ۴۴ درجه دورنیک به ۴۷ درجه دورنیک افزایش یافته است. نمونه‌های شیرخام بعد از تزریق گاز در داخل یخچال در دمای ۴°C ۴ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شده و نمونه‌هایی که حاوی ۱۰۰٪ نیتروژن بودند تقریباً بدون تغییر مانده و بقیه نمونه‌ها که مخلوطی از هر دو گاز بودند به نحوی باگذشت زمان دچار افزایش اسیدیته شده‌اند. ترکیب گازها بر روی اسیدیته اثر آنتاگونیستی داشته است.

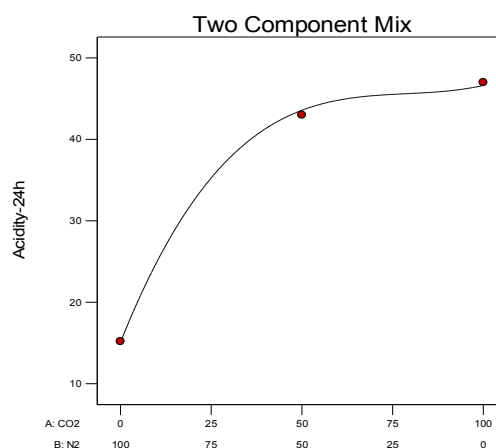


Fig 4 Acidity changes 24 hours after gas flushing

### ۳-۴-۵- بررسی تغییرات pH شیرخام ۲۴ ساعت بعد از تزریق گازها

نتایج آماری pH ۲۴ ساعت بعد (جدول شماره ۲)، نشان از معنی دار بودن اثر گازهای (CO<sub>2</sub>) و (N<sub>2</sub>) می‌باشد (p<0.05). بررسی جدول آنالیز واریانس مربوط به تغییرات pH ۲۴ ساعت بعد تزریق گازها نشان می‌دهد که وقتی میزان دی‌اکسیدکربن در



شیرخام  $28 \times 10^3$  در میلی لیتر، کم ترین میزان بوده و زمانی که درصد هر دو گاز در ۵۰٪ باشد تعداد کلی فرم افزایش یافته و به  $68 \times 10^3$  در میلی لیتر می رسد. آنچه که از نمودار مشخص می شود این است که با افزایش درصد نیتروژن به ۱۰۰٪، تعداد کلی فرم به  $47 \times 10^3$  در میلی لیتر کاهش پیدا می کند. با افزودن  $CO_2$  به شیرخام سرد شده تا pHهای برابر ۶ و ۶/۲ به طور قابل ملاحظه ای رشد میکروبی را کاهش داده است. به طوری که این نمونه ها به ترتیب با نمونه شیر شاهد اختلافی در حدود ۱/۰۸۲ و ۰/۹۳۳ واحد لگاریتمی برای بار میکروبی کل و ۱/۰۸۹ و ۰/۶۷۴ واحد لگاریتمی برای باکتری سرماگرا و ۰/۷۴۲ و ۰/۶۷۴ واحد لگاریتمی برای باکتری های کلی فرم پس از ۱۰ روز نگهداری در دمای  $4^\circ C$  از خود نشان داد [۲۳].

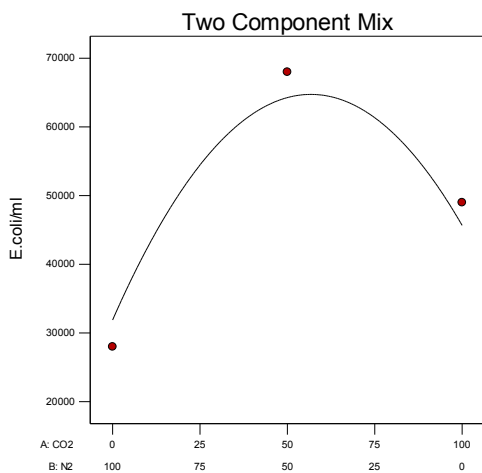


Fig 7 coliform population relation to gas mixture ratio

براساس نتایج آنالیز آماری مربوط به تعداد کپک، نشان از معنی دار بودن اثر گازهای ( $CO_2$ ) و ( $N_2$ ) بود ( $p < 0.05$ ). بررسی نمودار شکل ۸ آنالیز واریانس مربوط به تغییرات تعداد کپک نشان می دهد که در زمان ۹ دقیقه تیماردهی، تعداد کپکها  $7 \times 10^3$  کلونی بوده و با افزایش زمان تیماردهی، تعداد کپکها به  $4 \times 10^3$  کلونی کاهش یافته است. طبق جدول آنالیز واریانس اثر خطی زمان معنادار بوده ولی اثر معادله های درجه ۲ و ۳ معنادار نمی باشد.

۳ مکانیسم کلی وجود دارد که  $CO_2$  از طریق آنها میکروارگانیسمها را مهار می کند. اولین و ساده ترین مکانیسم بوسیله جایگزینی با  $O_2$  می باشد.

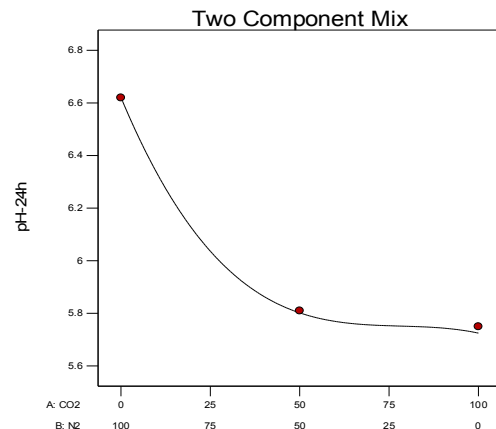


Fig 5 pH changes 24 hours against gas flushing rate

### ۳-۴-۶- بررسی تغییرات مربوط به بار میکروبی شیرخام

براساس نتایج آماری کشت کلیبکتری های شیرخام، نشان از معنی دار بودن اثر گازهای ( $CO_2$ ) و ( $N_2$ ) می باشد ( $p < 0.05$ ). بررسی نمودار شکل ۶، مربوط به مدل فوق، نشان داده است که با افزایش زمان تحت تاثیر قرارگرفتن شیرخام با مخلوط گازها از ۹ دقیقه به ۱۵ دقیقه میزان جمعیت بار میکروبی از  $1/1 \times 10^7$  CFU/ml به  $7/5 \times 10^6$  CFU/ml و در طی ۶ دقیقه جمعیت بار میکروبی در حدود نیم سیکل لگاریتمی کمتر می شود. طبق نتایج آماری، درصد گازها در میزان باکتری های کلی شیرخام معنی دار نبوده و اثر خطی و معادله درجه ۲ زمان بر روی شمارش کلی موثر می باشد.

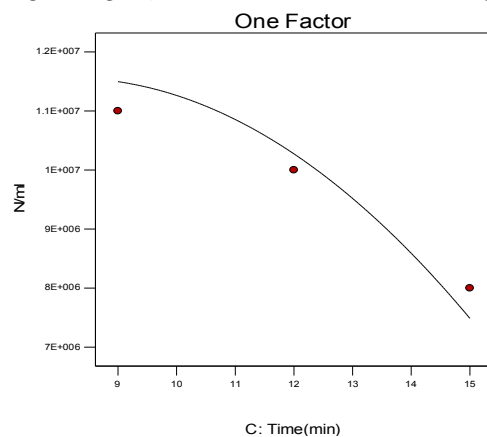


Fig 6 Total raw milk after treatment with nitrogen and carbon dioxide (50:50; time 7.5 min)

بررسی نتایج آماری مربوط به جمعیت باکتری کلی فرم، نشان از معنی دار بودن اثر گازهای ( $CO_2$ ) و ( $N_2$ ) بوده است ( $p < 0.05$ ). بررسی شکل ۷، مربوط به تغییرات کلی فرم، نشان داده است که زمانی که میزان  $CO_2$  در شیرخام ۱۰۰٪ باشد تعداد کلی فرم در

دمای ۶ °C برای هر سه نمونه را زیر ۳×۱۰<sup>۴</sup> 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 ۰/۴ ± ۵/۵ نگهداشته شده‌بودند، به مدت ۶ تا ۷ روز با گاز فلاش شده در فضای سر، پس از تزریق گاز به مدت ۶ ساعت تیمار شدند، تعداد کل باکتری‌های اولیه CFU/mL ۶×۱۰<sup>۴</sup> و ۱۰×۱۰<sup>۴</sup> 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 درحالی‌که، در شیر تیمار شده با گاز نیتروژن، افزایش یک واحد لگاریتمی ۴/۵ تا ۵/۵ روز طول کشید. این تیمار زمان نگهداری را تقریباً ۲/۵ برابر طولانی‌تر می‌کند. مقادیر pH شیر تیمار شده با گاز نیتروژن و شیرخام پس از ۶ و ۷ روز نگهداری، به ترتیب، ۶/۶۷ (نمونه شاهد) و ۶/۸۱ (شیر تیمار شده) از ۶/۷۴ (نمونه شاهد) و ۶/۷۵ (شیر تیمار شده) می‌باشد. در انتهای آزمایشات، مخازن شاهد، بوی بدی را ساطع می‌کردند که معمولاً ناشی از شیر فاسد شده بود، در مقابل شیر تیمار شده بوی ناخوشایندی حس نشد [۲۵]. نتایج میکروبی مشخص می‌کند که با افزایش زمان تیماردهی به ۱۵ دقیقه، میزان جمعیت باریکروبینیم سیکل لگاریتمی کاهش پیدا نموده و افزایش میزان گاز نیتروژن به ۱۰۰ درصد، تعداد کلونی‌های کپک از ۷۰۰۰ به ۴۰۰۰ کاهش پیدا می‌کند. براساس نتایج، از گاز نیتروژن می‌توان به عنوان یک بازدارنده رشد میکروبی استفاده کرد.

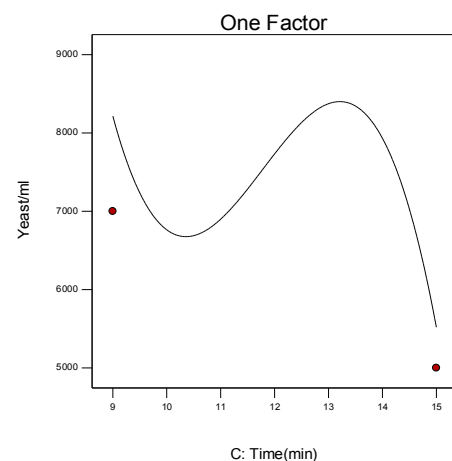


Fig 8 Mold population relation to gas mixture ratio

دومین مکانیسم، پایین آوردن pH محیط یا ماده غذایی بواسطه حل شدن CO<sub>2</sub> و تشکیل اسیدکربنیک در فاز آبی ماده غذایی سومین مکانیسم در مقایسه با اثرات غیر مستقیم کاهش pH و جایگزینی O<sub>2</sub> 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<sup>۴</sup> CFU/ml)، در دمای ۶ °C با نرخ نیتروژن بالاتر به مدت ۱۱ روز فلور میکروبی در سطح اولیه خود نگه داشته شد [۲۷]. در دمای ۷ °C، نمونه شاهد بدون توجه به زیر گروه باکتریایی مورد آزمایش، در مدت ۱۰ روز 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

Table 2 Some Characteristics of the Models for Responses

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

#### ویسکوزیته ماست

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

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

بر اساس 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 ۹۷/۳۳ و ۹۹/۳۳ درجه دورنیک بوده‌است. نوع گاز تزریق شده در شیر ماست بر اسیدیته ماست معنی‌دار نمی‌باشد. میانگین اسیدیته ماستی که شیر آن تیمار شده با گاز دی‌اکسیدکربن و نیتروژن و شیرخام بدون تیمار به ترتیب ۹۱/۶ و ۹۲/۳۳ و ۹۳/۳۳ درجه دورنیک بوده و اختلاف معنی‌داری 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 ۴/۳، ۴/۱۲ و ۴/۱۳ می‌باشد. نتایج جدول نشان می‌دهد گازهای تیمار شده بر pH ماست 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 کاملاً مناسب ۵ امتیاز، مناسب ۴ امتیاز، متوسط ۲ امتیاز، نامناسب ۲ امتیاز و کاملاً نامناسب ۱ امتیاز می‌باشد. نتایج ارزیابی ماست‌ها در روز دوم

بدین صورت می‌باشد که ماست تهیه شده از شیر تیمار 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 شیرخام ۴/۴۷ و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با نیتروژن ۴/۶۲ و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با دی‌اکسیدکربن ۱/۰۵ بود و در نهایت کارشناسان در روز دوم ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با نیتروژن را با امتیاز کلی ۴/۶۲ نسبت به دو گزینه دیگر برتری دادند. نتایج ارزیابی ماست‌ها در روز ۱۱ بدین صورت می‌باشد که ماست تهیه شده از شیر تیمار 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 شیرخام ۴/۵۵ و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با نیتروژن ۴/۷۲ و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با دی‌اکسیدکربن ۱/۰۵ بوده و در نهایت کارشناسان در روز ۱۱ ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با نیتروژن را با امتیاز کلی ۴/۷۲ نسبت به دو گزینه دیگر برتری دادند. نتایج ارزیابی ماست‌ها در روز ۲۲ نیز بدین صورت می‌باشد که ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با دی‌اکسیدکربن از لحاظ بافت بسیار شل و از لحاظ طعم و مزه و رنگ نامناسب بود 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 شیرخام ۴/۳۷ بوده و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با نیتروژن ۴/۶۲ می‌باشد و میانگین امتیاز ارزیابی ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با دی‌اکسیدکربن ۱/۰۵ بوده و نهایتاً کارشناسان در روز ۲۲ ماست تهیه شده از شیر تیمار شده با نیتروژن را با امتیاز کلی ۴/۶۲ 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.

## ۴- نتیجه گیری

به طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که میزان غلظت گاز دی‌اکسیدکربن در شیرخام، در اسیدیته و pH شیرخام نقش مستقیم داشته و سبب افزایش اسیدیته و 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 کاهش می‌یابد. با افزایش مدت زمان به ۱۰۰٪، تعداد کلی‌فرم کاهش می‌یابد. با افزایش مدت زمان تحت تاثیر قرارگرفتن شیرخام با مخلوط گاز دی‌اکسیدکربن و نیتروژن به مدت ۱۵ دقیقه، تعداد کپک‌ها کاهش داشته‌است. تعداد روزهای نگهداری ماست (۲ روز، ۱۱ روز، ۲۲ روز) در دمای ۴ °C بر روی اسیدیته ماست تاثیر معنی‌داری داشته‌است. تعداد روزهای نگهداری ماست بر روی pH ماست تاثیر معنی‌داری داشته‌است. تعداد روزهای نگهداری ماست در دمای ۴ °C بر روی سینریز ماست تاثیر معنی‌داری داشته‌است. طعم و مزه و بافت ماستی که با شیرخام تیمار شده با N<sub>2</sub> 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 امکان‌پذیر است.

## ۵- منابع

- [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 principles of microbiology laboratory manual. The University of Lethbridge, Canada.
- [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 dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt, International Dairy Journal, 14, 263- 268.

- [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 CO<sub>2</sub> 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-Pierre Gauchi (2017)." N<sub>2</sub> 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(N<sub>2</sub>). *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 CO<sub>2</sub> addition to milk on selected analytical testing method. *Journal of Dairy Science*, 84: 1959-1968.
- [27] Barbano .M.and M, Santost. (2003). Effect of CO<sub>2</sub> 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-Pierre Gauchi (2016). Efficiency of N<sub>2</sub> Gas Flushing Compared to the Lactoperoxidase Systemat Controlling Bacterial Grow Thin Bovine Raw Milk Stored at Mild Temperatures. Volume 7
- [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  $\beta$ -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 N<sub>2</sub> 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). N<sub>2</sub> 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.



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

Ghadiri, B. <sup>1</sup>, Moghaddas Kia, E. <sup>2\*</sup>, Alizadeh, M. <sup>3</sup>, Ghasempour, Z. <sup>4</sup>

1. Graduated M.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

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b></p> <p>Received 09 September 2020 Accepted 25 November 2020</p> <hr/> <p><b>Keywords:</b></p> <p>Gas flushing, Carbon dioxide, Nitrogen, Raw bovine milk, Acidity, Total microbial count.</p> <hr/> <p><b>DOI:</b> 10.52547/fsc.t.18.03.29</p> <hr/> <p>*Corresponding Author E-Mail: Ehsan.m.kia@gmail.com</p>	<p>The purpose of this study was to investigate the effects of injection of CO<sub>2</sub> / N<sub>2</sub> 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 and total coliform count were performed on 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&lt;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&lt;0.05). Increasing the treatment time of raw milk from 9 to 15 minutes had significant effect (p&lt;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<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> 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&gt; 0.05). However, yogurt acidity, pH and synthesis were significantly affected during storage time (p&lt;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.</p>