مروری بر روش‌های سالم سازی سرد شیر

پریسا رشتچی[۱*]، علی بزمی[۲] و هادی الماسی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۳- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۳۰)

چکیده

روش معمول و سنتی افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی، فرآیند حرارتی می‌باشد. با توجه به اثرات منفی این فرآیند بر روی خواص حسی و تغذیه‌ای، استفاده از روش‌های سرد در سالم سازی مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است. از مهمترین روش‌های غیر حرارتی مورد استفاده در مورد شیر می‌توان به این موارد اشاره نمود: استفاده از فشار بالا، میدان الکتریکی ارتعاشی، میکروفیلتراسیون، استفاده از گاز CO_2 تحت فشار بالا و تشعشع. فرآیند فشار بالا از طریق تخریب دیواره و غشاء سلولی، تغییر مورفولوژی سلول‌ها، غیرطبیعی کردن پروتئین‌ها، ممانعت از مکانیزم‌های ژنتیکی و تخریب ریبوزوم‌ها موجب سالم‌سازی محصول می‌شود. تکنولوژی میدان الکتریکی ارتعاشی به دلیل ایجاد حفرات در غشاء سلولی، موجب از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها می‌شود. میکروفیلتراسیون از طریق جداسازی میکروارگانیسم‌ها بر اساس اختلاف اندازه و حجم آنها با ترکیبات اصلی ماده غذایی عمل می‌کند. تکنولوژی استفاده از گاز CO_2 تحت فشار بالا با ایجاد تغییر در غشاء سلولی، کاهش pH داخل سلولی، غیر فعال شدن آنزیم‌های کلیدی، اثر مستقیم روی متابولیسم، به هم زدن تعادل الکترولیت داخلی و خروج ترکیبات حیاتی از سلول و غشاء سلولی، میکروارگانیسم‌ها را از بین می‌برد. پرتودهی از طریق تغییر در سیستم‌های زیستی سبب نابودی میکروارگانیسم‌ها می‌شود. در این مقالهٔ مروری، مزایا و معایب روش‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفته و مثال‌هایی از کاربرد هر کدام در سالم سازی شیر آورده شده است.

کلید واژه‌گان: سالم‌سازی سرد شیر، فناوری فشار بالا، میدان الکتریکی ارتعاشی، میکروفیلتراسیون، پرتو دهی.

* مسئول مکاتبات: parisa_rashtchi@yahoo.com

۱- مقدمه

شیر به دلیل دارا بودن مواد مغذی ضروری و شرایط محیطی مطلوب، محیط مناسبی برای رشد تعداد زیادی از میکروارگانیسم-ها بوده و جزء غذاهای فسادپذیر سریع به‌حساب می‌آید. مهمترین میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن که ممکن است در شیر وجود داشته باشد عبارتنداز: اشرشیاکلی[1]، استافیلوکوکوس اورئوس[2]، لیستریا مونوسیتوژنز[3] و باسیلوس سرئوس[4] [۱]. روش معمول و سنتی جلوگیری از فساد و افزایش زمان ماندگاری شیر خام، پاستوریزاسیون می‌باشد که در طی این فرایند اکثر باکتری‌های بیماری‌زا و عامل فساد از بین می‌روند. با این حال، این فرایند سبب نابودی کامل باکتری‌های ترمودیوریک و اسپورزا نمی‌شود [۲]. از سوی دیگر برخی از باکتری‌ها آنزیم‌های خارج سلولی مانند پروتئاز، لیپاز و فسفولیپاز تولید می‌کنند که در برابر حرارت مقاوم بوده و در طی نگهداری شیر پاستوریزه در شرایط یخچالی فعال می‌شوند. همچنین تعدادی از باکتری‌ها که به صورت نسبی تخریب شده‌اند ترمیم یافته و تکثیر می‌یابند. به‌طور کلی برای غلبه بر این مشکلات بایستی از فرایند حرارتی شدیدتری استفاده نمود که این فرایند حرارتی نیز سبب ایجاد تغییرات نامطلوب در خصوصیات حسی و ترکیبات مغذی شیر می‌شود [۳].

امروزه افزایش توجه مصرف کنندگان به ارزش غذایی و ویژگی‌های حسی محصولات غذایی و تمایل به استفاده از مواد غذایی فراوری شده با بالاترین ارزش تغذیه‌ای و بیشترین شباهت از نظر ویژگی‌های ارگانولپتیکی به محصولات دست نخورده، توجه تولید کنندگان را به استفاده از روش‌های غیرحرارتی به منظور افزایش ماندگاری مواد غذایی بدون اینکه تأثیر منفی بر روی خواص حسی آنها داشته باشند، جلب کرده است. شیر نیز از جمله مواد غذایی است که استفاده از روش‌های غیرحرارتی برای کاهش بار میکروبی و افزایش ماندگاری آن روز به روز در حال گسترش است.

1. Escherichia coli
2. Staphylococcus aureus
3. Listeria monositogenes
4. Basillus cereus

استفاده از فناوری فشار بالا، اِعمال میدان الکتریکی ارتعاشی[5] (PEF)، فناوری غشایی و میکروفیلتراسیون، پرتو دهی و استفاده از گاز CO_2 از جمله روش‌هایی هستند که گزارش‌های زیادی در مورد استفادهٔ موفقیت آمیز از آنها برای کاهش بار میکروبی شیر و افزایش ماندگاری آن وجود دارد؛ بدون اینکه تأثیر خاصی بر کاهش ارزش غذایی و خواص ارگانولپتیکی آن داشته باشند. برخی از این روش‌ها سبب سالم‌سازی کامل شیر شده و برخی نیز به عنوان یک روش کمکی عمل می‌کنند. در این مقاله، هرکدام از این روش‌های سالم‌سازی سرد شیر مورد بررسی قرار گرفته و به مکانیسم عمل، معایب و مزایا و مثال‌هایی از کاربرد هر کدام از آنها در مورد شیر اشاره خواهد شد.

۲- روش‌های سالم سازی سرد شیر

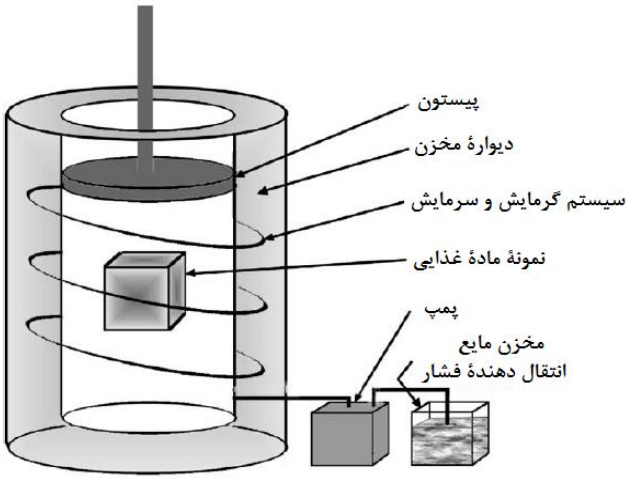
۲-۱- فناوری فشار بالا[6]

یکی از مناسب‌ترین روش‌های جایگزین برای تیمار حرارتی مواد غذایی به ویژه شیر، استفاده از فناوری فشار بالا است. طی سالهای اخیر استفاده از این روش در مورد فراورده‌های شیر از این نظر مورد توجه قرار گرفته است که هم دارای اثر ضد میکروبی بوده و هم تغییری در ویژگی‌های حسی و تغذیه‌ای ماده غذایی ایجاد نمی‌کند [۴]. Hite و همکاران [۵] اولین محققانی بودند که تأثیر مثبت این تکنیک را در کاهش میکروارگانیسم‌های مادهٔ غذایی به اثبات رساندند. آنها مشاهده نمودند که با قرار دادن شیر خام در معرض فشار بالا (۶۵۰ مگا پاسکال «MPa») بار میکروبی آن به طور چشمگیری کاهش می‌یابد. امروزه با توجه به حفظ ارزش غذایی و خواص حسی فراورده‌های تولید شده با استفاده از فناوری فشار بالا، استفاده از این روش در فراوری مواد غذایی روز به روز در حال گسترش است.

اساس فناوری فشار بالا، فشرده کردن مایع اطراف ماده غذایی و اعمال فشار به محصول غذایی است. شکل ۱، تصویر شماتیک دستگاه اِعمال فشار بالا را نشان می‌دهد [۶]. مادهٔ غذایی در مخزنی که قادر است فشار مورد نظر را تحمل کند، قرار گرفته و درون مایعی که به عنوان مادهٔ حدواسط انتقال دهندهٔ فشار شناخته

5. Pulsed electric field
6. High pressure technology

می‌شود، غوطه‌ور می‌گردد. این مایع ممکن است آب، روغن سیلیکون، اتانول، گلیکول و... باشد. فشار اعمال شده، بسته به نوع مادهٔ غذایی و میکروارگانیسم مورد نظر، بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ MPa متغیر است. اما مشاهده شده است که فشار ۳۰۰-۶۰۰MPa برای غیر فعال سازی میکروارگانیسم‌های مولد فساد و بیماری‌زا کافی خواهد بود [۷].



شکل ۱ شمای تجهیزات پایه برای استفاده در فرایند فشار بالا به منظور سالم سازی مواد غذایی [۶]

مکانیزم‌های پیشنهاد شده برای غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها توسط این فرایند شامل تخریب دیواره و غشای سلولی، تغییر مورفولوژی سلول‌ها، غیر طبیعی کردن پروتئین‌ها، ممانعت از مکانیزم‌های ژنتیکی و تخریب ریبوزوم‌ها می‌باشد [۸]. در اثر اعمال فشار، غشای میکروارگانیسم‌ها آسیب دیده و قابلیت نفوذپذیری انتخابی خود را از دست می‌دهد. همچنین غیر طبیعی شدن آنزیم‌ها نیز ممکن است در متابولیسم سلول‌ها ایجاد اختلال کند. میزان تأثیر تیمار فشار بالا بر روی میکروارگانیسم‌ها به عوامل مختلفی بستگی دارد که مهمترین آنها عبارتند از:

- شرایط فرایند

در این فناوری شرایط فرآیند (فشار، دما و مدت زمان اعمال فشار) نقش مهمی در میزان کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها دارند. با افزایش میزان فشار و زمان فرآیند میزان کاهش فعالیت بیشتر می‌شود ولی اثر دما روی کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها متفاوت است. برخی از میکروارگانیسم‌ها در دمای اتاق و برخی دیگر در دمای پایین‌تر به اعمال فشار حساس می‌باشند. برای مثال لیستریا اینوکوآ[1]، پسودوموناس فلورسنس[2] و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس[3] در دمای ۴ ^{o}C و استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی در دمای اتاق حساسیت بیشتری به فشار نشان می‌دهند [۱۰،۹،۷]. روند غیرفعال‌سازی برخی از میکروارگانیسم‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است [۷]. بر اساس جدول ۱، میزان مقاومت میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه توسط Trujillo و همکاران [۷] در برابر تیمار فشار بالا متفاوت بوده و به ترتیب زیر از میزان مقاومت آنها کاسته می‌شود: پسودوموناس‌فلورسانس، اشرشیاکلی، لیستریا اینوکوآ، لاکتوباسیلوس‌هلوتیکوس، استافیلوکوکوس‌اورئوس.

- نوع میکروارگانیسم‌ها و خصوصیات فیزیولوژیک آنها

شدت فشار مورد استفاده در فرایند و میزان تأثیر آن بر روی میکروارگانیسم‌ها، به نوع آنها و همچنین به خصوصیات فیزیولوژیک آنها بستگی دارد [۷، ۸].

میزان مقاومت میکروارگانیسم‌های مختلف در برابر تیمار فشار بالا به این صورت است: اسپورهای باکتریایی> سلول‌های رویشی باکتری‌ها > ویروس‌ها > کپک‌ها و مخمرها. سلول‌های در حال رشد نسبت به سلول‌هایی که در فاز سکون هستند حساسیت بیشتری نسبت به اعمال فشار دارند. همچنین باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی‌ها در مقابل اعمال فشار مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند که علت آن مربوط به ترکیبات دیواره سلولی آنها می‌باشد. باکتری‌های میله‌ای شکل نسبت به باکتری‌های کروی نیز حساسیت بیشتری نسبت به فشار دارند [۷].

-ترکیب مادهٔ غذایی

یکی از ترکیبات مهم که فرآیند غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد چربی می‌باشد. محتوای چربی روی میکروارگانیسم‌ها اثر محافظت کنندگی و تخریبی توأم دارد. اثر محافظت کنندگی شامل جذب شوک حاصل از فشار و ممانعت از تبادل مواد بین غشاء داخل و خارج سلول می‌باشد. اثر تخریبی به‌صورت افزایش غلظت مواد محلول در چربی با اثر ضد میکروبی و جایگزینی تری گلیسریدهای شیر با لیپوپروتئین‌های

1. L. innocua
2. P. fluorescens
3. Lb. helveticus

غشاء سلولی و درنتیجه آسیب پذیرتر شدن غشا می‌باشد که تأثیر نهایی آن از مجموع این دو رفتار حاصل می‌شود. به نظر می‌رسد اثر چربی تحت تاثیر شرایط فرآیند، گونه میکروبی، درصد چربی و نوع شیر قرار می‌گیرد [۶].

جدول۱ تأثیر فناوری فشار بالا در کاهش سیکل لگاریتمی برخی میکروارگانیسم‌ها در فشارها و دماهای مختلف [۷]

میکروارگانیسم	شرایط تیمار	سیکل لگاریتمی
اشرشیاکلی	۳۰۰MPa/۲°C	۵/۳۵
	۳۰۰MPa/۲۵°C	۵/۱۹
پسودوموناس فلورسانس	۲۵۰MPa/۲°C	۳/۸۷
	۲۵۰MPa/۲۵°C	۴/۵۸
لیستریا اینوکوآ	۴۰۰MPa/۲°C	۳/۱۲
	۴۰۰MPa/۲۵°C	۴/۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۴۵۰MPa/۲°C	۲۰/۰۰
	۴۵۰MPa/۲۵°C	۱۶/۷۰
لاکتوباسیلوس هلوتیکوس	۴۵۰MPa/۲°C	۷/۱۰
	۴۵۰MPa/۲۵°C	۹/۱۰

در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای روی غیر فعال شدن میکروارگانیسم‌های بیماریزا و مولد فساد شیر توسط تیمار فشار بالا انجام شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که کیفیت میکروبی شیر خام تحت فشار ۶۰۰MPa-۴۰۰ قابل مقایسه با شیر پاستوریزه می‌باشد اما به دلیل مقاومت بالای اسپورها نمی-توان از این فرآیند به منظور استریلیزاسیون استفاده نمود [۷]. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که تیمار فشار بالا در ۴۰۰MPa به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰°C-۴۰ فعالیت پروتئولتیک باکتری‌های شیر را کاهش می‌دهد و در ۲۵°C ویژگی‌های ارگانولپتیک را بهبود می‌دهد. پیشنهاد شده است که این تیمار می‌تواند شیر با خصوصیات حسی خوب و زمان ماندگاری بالا تولید کند [۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲]. در مطالعه‌ای دیگر مشاهده گردید زمان ماندگاری شیر تیمار شده با ۳۵۰ MPa در ۰ C° تا ۲۵ روز، در ۵°C تا ۱۸ روز و در ۱۰ °C تا ۱۲ روز افزایش می‌یابد [۱۳].

تیمار فشار بالا تنها پیوندهای غیرکووالانسی (شامل پیوندهای هیدروژنی، یونی و آبگریز) را تحت تأثیر قرار داده و روی پیوندهای کووالانسی بی‌تأثیر است. بنابراین در بین ترکیبات شیمیایی ماده غذایی، تنها ترکیباتی که دارای وزن مولکولی بالا بوده و ساختارهای سوم را دارند (نظیر پروتئین‌ها و آنزیم‌ها) نسبت به فشار حساس بوده و دچار تغییر می‌شوند. در حالیکه ترکیبات با وزن مولکولی پایین از جمله ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و قندهای ساده و ترکیبات عطر و طعم در اثر تیمار فشار بالا بدون تغییر باقی می‌مانند [۱۴]. به‌طور کلی سالم‌سازی شیر با استفاده از فناوری فشار بالا، نسبت به روش تیمار حرارتی مزایای زیادی دارد که از مهمترین آنها می‌توان به این موارد اشاره نمود: حذف و یا کاهش استفاده از دماهای بالا و در نتیجه جلوگیری از تجزیه حرارتی ترکیبات مادهٔ غذایی، عدم ایجاد تغییر در ویژگی‌های حسی و تغذیه‌ای مادهٔ غذایی، کمک به حفظ عطر و طعم و رنگ طبیعی محصولات، تیمار سریع و یکنواخت و مطمئن همهٔ قسمت‌های مادهٔ غذایی و کاهش نیاز به استفاده از افزودنی‌های شیمیایی [۱۵].

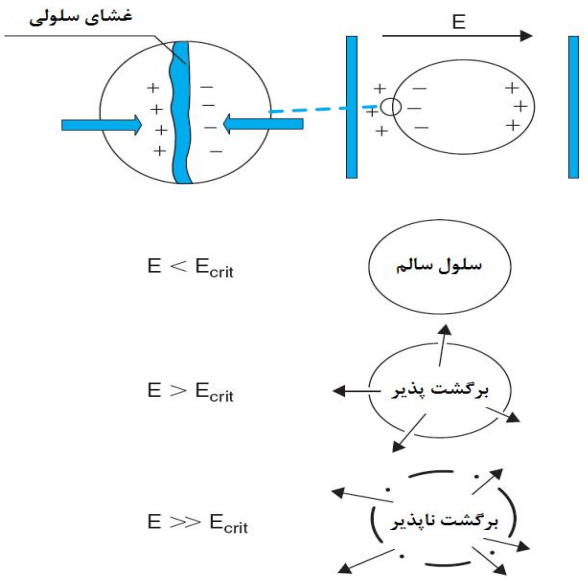
۲-۲- تیمار میدان الکتریکی ارتعاشی

استفاده از PEF به عنوان یک فرایند غیرحرارتی می‌تواند در سالم سازی شیر مورد استفاده قرار گیرد. این تکنیک برای اولین بار به‌صورت صنعتی جهت کاهش بار میکروبی و افزایش ماندگاری آبمیوه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [۱۶]. این روش در دمای پایین (۶۰ °C>) و زمان کوتاه سبب غیر فعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌ها می‌گردد بدون اینکه تأثیری بر روی کیفیت تغذیه‌ای و خواص ارگانولپتیکی ماده غذایی داشته باشد و بیشتر در مورد مواد غذایی مایع مورد استفاده قرار می‌گیرد. در نتیجه می‌تواند در سالم‌سازی شیر به‌عنوان جایگزین مناسبی برای روش‌های زمان‌بر و انرژی‌بر حرارتی مورد توجه قرار گیرد [۱۷].

فرایند PEF شامل تیمار با پالس‌های الکتریکی خیلی کوتاه در میدان الکتریکی قوی و در دمای ملایم می‌باشد [۱۷]. تجهیزاتی که برای تیمار PEF مورد استفاده قرار می‌گیرد شامل تولید کنندهٔ ارتعاش با ولتاژ بالا، محفظهٔ تیمار، سیستم انتقال مایع و وسایل کنترل و نمایش فرایند می‌باشد. پارامترهای مشخص این تیمار شامل میدان الکتریکی با شدت kV/cm ۵۰-۱۵، ارتعاش با عرض μs ۵-۱ و بسامد Hz ۴۰۰ -۲۰۰ می‌باشد [۱۸]. کاربرد تجاری این روش شاید به دلیل نبود قوانین مصوب، نیاز به سرمایه اولیه بالا و هزینه بالای فرایند توسعه نیافته است [۱۹].

استفاده از فرایند PEF سبب ایجاد حفره‌هایی در غشاء سلول می‌شود که موجب نابودی میکروارگانیسم‌ها می‌گردد. تئوری‌های

زیادی برای توضیح چگونگی شکل‌گیری این حفره‌ها وجود دارد ولی شواهد روشنی مبنی بر اینکه ایجاد حفره در شبکه پروتئینی است یا لیپیدی در دسترس نمی‌باشد. آنچه با اطمینان می‌توان گفت این است که میدان الکتریکی سبب تغییر ساختار سلول‌های میکروبی و دیواره میکروارگانیسم‌ها با مکانیزم متفاوت از تیمار حرارتی می‌شود. تیمار حرارتی سبب آسیب به اجزای سلولی می‌شود؛ در صورتی که در فرایند PEF گسیختگی در ساختارها مشاهده می‌شود [۱۷]. قابل پذیرش‌ترین نظریه در مورد نحوهٔ اثر فرایند PEF بر غشای سلول‌ها، تئوری ارائه شده توسط Zimmermann [۲۰] و Tsong [۲۱] می‌باشد. طبق این نظریه، با قرار گرفتن سلول‌ها در میدان الکتریکی، بارهای الکتریکی غیرهمنام در سمت غشا تجمع می‌یابند. زمانیکه شدت میدان الکتریکی از یک حد بحرانی که معمولاً ۱ ولت است بیشتر باشد، تحرک بارها در اطراف غشا باعث ایجاد تغییر شکل در غشا و به ایجاد حفره در آن منجر می‌شود (شکل ۲). اگر شدت میدان الکتریکی به اندازهٔ کافی بالاتر از شدت بحرانی باشد، حفرات ایجاد شده کاملاً پایدار بوده و درنتیجه انتقال کنترل نشدهٔ مواد به داخل و خارج غشای سلولی، باعث مرگ سلول خواهد شد.



شکل ۲ مکانیسم ایجاد حفره در غشای سلولی در اثر قرار گرفتن در میدان الکتریکی خارجی [۲۱]

سلول‌های زنده در فرم رویشی در صورت کاربرد PEF به میزان ۹۹/۹۹٪ کاهش می‌یابند [۲۲]. در این میان باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت‌ها به این تیمار حساس‌تر می‌باشند که به دلیل ضخامت بیشتر لایه ماکروپپتید در این گروه باکتری‌ها می‌باشد [۱۸]. تیمار PEF به تنهایی سبب نابودی اسپورها نمی‌شود. تنها راه غیر فعال سازی اسپورها، استفاده توام از فشار بالا و PEF می‌باشد؛ به طوریکه استفاده از فشار MPa ۱۵۰ به مدت ۳۰ دقیقه در $۴۰^{o}C$ موجب رویش اسپورها شده و به دنبال آن با استفاده از فرایند PEF می‌توان میکروارگانیسم‌های جوانه زده را غیر فعال نمود [۱۷]. به طور معمول آنزیم‌ها نسبت به میکروارگانیسم‌ها به تیمار PEF شدیدتری برای غیر فعال شدن نیاز دارند. این موضوع در صنعت حائز اهمیت است چراکه حضور برخی آنزیم‌ها در صنعت شیر مهم می‌باشد. در این صورت شیر می‌تواند تحت تیمار PEF قرار گرفته و بدون غیر فعال شدن آنزیم‌ها، میکروارگانیسم‌های آن غیر فعال شود. در این رابطه آنزیم‌های متعددی مورد مطالعه قرار گرفته است. میزان اثر PEF روی فعالیت آنزیم‌ها بستگی به شدت میدان، تعداد ارتعاش‌های کاربردی و خصوصیات آنزیم دارد. همچنین میزان غیر فعال سازی به محیطی که آنزیم در آن قرار می‌گیرد نیز بستگی دارد [۱۷]. اثر تیمار PEF روی ترکیبات غذا از جمله پروتئین های آب پنیر و ویتامین ها و طعم مورد مطالعه قرار گرفته و مشاهده شده است که اثر تخریبی این فرایند روی ترکیبات مورد بررسی ناچیز می باشد [۲۲].

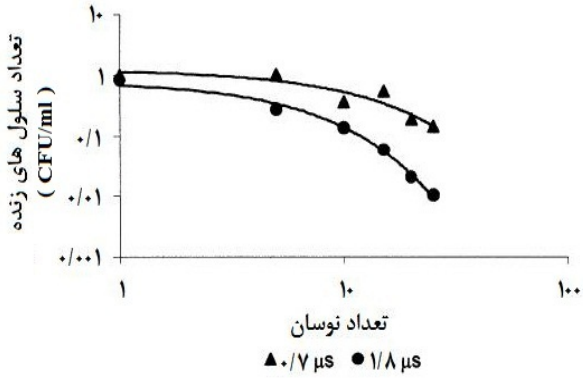
حداقل زمان لازم فرایند برای شروع غیر فعال سازی سلول‌ها به خصوصیات سلول و همچنین نوع محیطی که سلول در آن قرار می‌گیرد بستگی دارد [۱۷]. Bendiho و همکاران [۱۷] مشاهده کردند که سلول‌های میکروبی با قطر بالا در میدان الکتریکی ضعیف‌تری نسبت به سلول‌هایی با قطر کوچک‌تر غیر فعال می‌شوند. ترکیب مادهٔ غذایی نیز بر روی روند غیرفعال شدن میکروارگانیسم‌ها تأثیرگذار است. از جمله مهمترین این عوامل می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

– **حضور ترکیبات با وزن مولکولی بالاتر:** در محیط‌هایی با ترکیبات پیچیده، غیر فعال شدن میکروارگانیسم‌ها کمتر صورت می‌گیرد که یکی از علل آن حضور پروتئین‌ها می‌باشد. چربی نیز عامل محافظت کنندهٔ میکروارگانیسم‌ها در مقابل غیر فعال شدن می‌باشد و علت آن جذب رادیکال‌ها و یون‌های فعال موجود در سلول شکسته شده، توسط چربی است [۱۷].

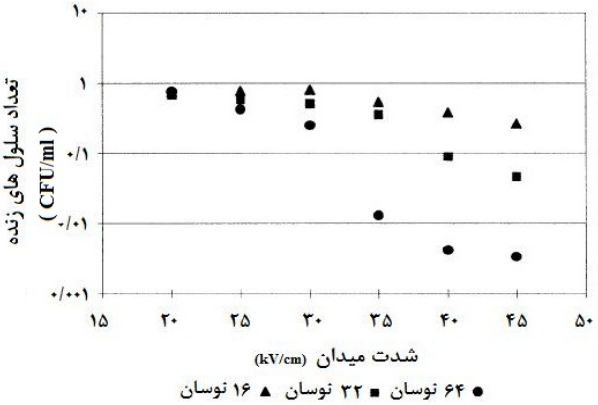
pH: در مواد غذایی با pH کمتر، غیر فعال سازی میکروارگانیسم‌ها بیشتر صورت می‌گیرد.

– **قدرت یونی**: شدت غیر فعال شدن در قدرت یونی پایین‌تر بیشتر است [۱۸].

شرایط فرآیند از جمله شدت میدان، تعداد ارتعاش و مدت زمان ارتعاش نیز تاثیر زیادی بر غیر فعال سازی میکروارگانیسم‌ها دارند. شکل ۳ گویای این مطلب است که در شدت میدان و تعداد ارتعاش برابر، غیر فعال سازی اشرشیاکلی با افزایش زمان ارتعاش افزایش می‌یابد و در تعداد ارتعاش‌های بالاتر اثر افزایش زمان تیمار در غیرفعال شدن میکروارگانیسم‌ها بیشتر می‌شود. همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، با افزایش شدت میدان و تعداد ارتعاش نیز غیر فعال‌سازی اشرشیا کلی بیشتر خواهد شد [۱۷].



شکل ۳ اثر مدت زمان ارتعاش در غیر فعال سازی اشرشیاکلی در شیر پس چرخ بعد از تیمار ۲۵ Kv/cm [۱۷]



شکل ۴ اثر شدت میدان و تعداد اتعاش روی غیر فعال سازی اشرشیاکلی در شیر پس چرخ با استفاده از تیمار PEF [۱۷]

Odriozola و همکاران [۲۳] اثر میدان الکتریکی ارتعاشی با شدت بالا[1] HIPEF اعمال شده در ۳۵/۵ kV/cm به مدت ۱۰۰۰ یا ۳۰۰µs و دمای ۴۰°C را بر روی ماندگاری میکروبی و پارامترهای مربوط به کیفیت شیر کامل بررسی کرده و نتایج را با شیر پاستوریزه شده به روش حرارتی مقایسه کردند. مشاهده شد که تیمارHIPEF تحت شرایط ۱۰۰۰ µs سبب پایداری میکروبی شیر کامل در شرایط یخچالی به مدت ۵ روز (همانند تیمار حرارتی) می‌گردد. بعلاوه تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر میزان اسیدیته، pH، اسید چرب آزاد، پروتئولیز و لیپولیز بعد از یک هفته ماندگاری در بین دو روش سالم سازی مذکور مشاهده نشد [۲۳]. در بررسی دیگر اثر اعمال پروسه HIPEF (۴۰kV/cm) روی شیر ۲٪ چربی نشان داد که مدت زمان ماندگاری میکروبی فراورده به ۲ هفته افزایش یافته و خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی آن با شیر پاستوریزه تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان نداد [۲۴]. شاید دلیل مدت ماندگاری بیشتر در این مطالعه نسبت به مطالعه Ordiozola استفاده از دمای بالاتر (۵۰°C) در محصول حاوی میزان چربی کمتر باشد. به دلیل عدم تغییر خصوصیات حسی شیر تیمار شده با PEF، پیشنهاد گردیده است که برای تهیه پنیر، کره و بستنی از شیر تیمار شده با این روش استفاده گردد، زیرا ویژگی‌های حسی فراورده، مشابه فراورده تازه می‌باشد [۲۳].

در مطالعه‌ای مشاهده شد که ترکیب تیمار PEF (۸۰kV/cm ، ۵۰ پالس) با حرارت ملایم ۵۲°C و افزودن مواد ضد میکروبی طبیعی مثل نیسین (۳۸ lU/ml) و لیزوزیم (۱۶۳۸ lU/ml) به فراورده، میزان بار میکروبی را تا ۷ سیکل لگاریتمی کاهش می‌دهد. این میزان کاهش بیشتر از مجموع کاهش بار میکروبی مشاهده شده در کاربرد هر یک از این تیمارها به تنهایی می‌باشد [۲۵]. PEF بیشتر سبب غیر فعال شدن گرم منفی‌ها می‌شود تا گرم مثبت‌ها، در حالی که مواد ضد میکروبی بیشتر گرم مثبت‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند [۲۵]. به این علت است که کاربرد توام تکنیک PEF و ترکیبات ضدمیکروبی (نیسین و لیزوزیم) موجب بهبود عملکرد تک تک این روش‌ها از نظر سالم سازی میکروبی محصول می‌گردد.

1. High Intensive Pulsed Electerical Field

بنابراین استفاده از ترکیبی از روش PEF و سایر روش‌های سالم‌سازی مانند افزایش دما، فرایند فشار بالا، افزودن مواد ضدمیکروبی و... کارایی این روش را در افزایش ماندگاری شیر بیشتر می‌کند. اما به‌طور کلی مشکلاتی از قبیل عدم وجود قوانین و استانداردهای مشخص، هزینهٔ بالای نصب، راه اندازی و نگهداری تجهیزات و مهمتر از همه، ایجاد واکنش‌های الکتروشیمیایی بین دیوارهٔ داخلی محفظهٔ دستگاه (که معمولاً از جنس فولاد ضد زنگ است) با مادهٔ غذایی و تولید ترکیبات مضر برای سلامتی که اخیراً توسط محققین بسیاری مورد توجه قرار گرفته است، مانع گسترش استفاده از این تکنیک در صنایع غذایی شده است.

۲-۳- میکروفیلتراسیون[1]

اساس تکنولوژی میکروفیلتراسیون بر عبور تحت فشار ماده از میان غشایی با اندازه حفرات ۰/۱-۱۰μm استوار می‌باشد. در طی این فرآیند برخی ماکرومولکول‌ها از غشاء فیلتر عبور کرده و وارد تراویده[2] می‌شود؛ در حالی که ماکرومولکول‌های بزرگ‌تر و گلبول‌های چربی در ناتراویده[3] باقی می‌مانند [۲۶]. این تکنولوژی توسط Sarterius Werke در سال ۱۹۲۹ در آلمان توسعه تجاری یافت. در این روش میکروارگانیسم‌ها (هم رویشی و هم اسپورها) جدا گردیده و فراورده سترون تولید می‌گردد و مزیت عمده آن حذف لاشه میکروارگانیسم‌ها از محصول فرآیند شده است [۲۷].

یکی از مشکلات این فرآیند محدوده اندازه گلبول‌های چربی و هم پوشانی پراکنش اندازه‌ای آنها با اندازه باکتری‌هاست که سبب باقی ماندن مقدار زیادی از چربی همراه با باکتری‌ها در ناتراویده می‌شود. برای حل این مشکل می‌توان از قبل چربی شیر را جدا نمود و شیر پس چرخ را تحت تیمار میکروفیلتراسیون قرار داد [۲۶].

معمول‌ترین فرایند تجارتی مورد استفاده برای زدودن باکتری‌های شیر پس چرخ فرآیند Bactochate می‌باشد که توسط Pully Switizerland Tetra Pak توسعه پیدا کرده است. اندازه حفرات میکروفیلتر به کار برده شده به منظور سالم سازی معمولاً ۱/۴ میکرومتر می‌باشد و از دمای ۵۰°C و سرعت جریان ۷/۲m/s و فشار ۰/۵ bar استفاده می‌گردد [۲۷]. جدول ۲ اندازهٔ ترکیبات مختلف شیر را نشان می‌دهد. از روی اندازهٔ ترکیبات می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که در طی فیلتراسیون، کازئین‌ها و ترکیبات دیگر از غشاء عبور کرده و میزان بالایی از باکتری‌ها و همه سلول‌های سوماتیک در ناتراویده باقی می‌مانند. نتایج به دست آمده از مطالعات صورت گرفته روی کارآیی میکروفیلتراسیون در کاهش لگاریتمی میکروبی چند نمونه شیر در جدول ۳ آورده شده است. به منظور استاندارد کردن شیر میکروفیلتر شده ناتراویده و خامه جدا شده تحت تیمار ۱۳۰°C به مدت ۴ ثانیه قرار می‌گیرد و به نسبت مورد نظر به شیر پس چرخ میکروفیلتر شده افزوده می‌شود [۲۸]. طبق تحقیقات Holm و همکاران [۲۹] کیفیت آروماتیکی شیر تازه حاصل از تکنولوژی Bactocatch به مدت ۲۱-۱۶ روز در دمای ۸°C ثابت باقی می‌ماند و طعم پخته نیز در آن احساس نمی‌شود.

مطالعات صورت گرفته روی ترکیبات شیر میکروفیلتر شده نشان می‌دهد که میکروفیلتراسیون ضمن کاهش ۵-۳ سیکل لگاریتمی جمعیت باکتری‌ها (معادل ۹۹/۹۴-۹۹/۹۰)، تغییر قابل ملاحظه‌ای را در میزان کازئین، پروتئین‌های آب پنیر، نیتروژن غیر پروتئینی و لاکتوز ایجاد نمی‌کند [۳۰، ۳۱].

جدول ۲ توزیع اندازه ترکیبات مختلف شیر [۲۶، ۲۷]

نوع ترکیب	اندازه ذره (nm)
آب	۰/۳
cl^- ca^{++}	۰/۴
لاکتوز	۰/۸
پروتئین آب پنیر	۵-۳
میسل کازئین	۳۰۰-۳۲
گلبول چربی	۲۰۰۰-۱۰۰
باکتری	۱۵۰۰-۲۰۰
سلول‌های سوماتیک	۱۵۰۰۰-۶۰۰۰

1. Microfiltration
2. Permeate
3. Retentate

جدول ۳ تعداد کاهش لگاریتمی جمعیت میکروبی چند نمونه شیر سالم سازی شده با میکروفیلتراسیون [۲۸، ۳۰]

نوع شیر	کاهش بار میکروبی (سیکل لگاریتمی)	منبع
گاو	۳	Pito et al. 1987
گاو بی‌چربی	۲/۶	Trous et al. 1991
بز بی‌چربی	۲/۳۴	Joubert et al. 1991
گاو بی‌چربی	۴-۵	Pafylias et al. 1996
گوسفند بی‌چربی	۳	Beolchini et al. 2004
گاو بی‌چربی	۲/۸	Bindith 1996
گاو بی‌چربی	۳/۷۹	Elwell 2006

با توجه به مطالب گفته شده بیش از ۹۹ ٪ باکتری‌ها در ناتراویده میکروفیلتر باقی مانده و ۹۹٪ کازئین‌ها از طریق غشاء عبور می‌کنند. در نتیجه تراویده حاصل، بار میکروبی پایینی داشته و شامل قریب به اتفاق کازئین‌ها و آنزیم‌های موجود در شیر بوده و از این جهت مناسب برای پنیر سازی می‌باشد [۳۲]. مطالعات نشان داده‌اند که کیفیت بهداشتی پنیر تهیه شده از شیر میکروفیلتر شده برابر و یا بیشتر از پنیر حاصل از شیر پاستوریزه می‌باشد [۲۶]. در نتیجه می‌توان از این روش به منظور سالم سازی شیر مورد استفاده در پنیرهای تهیه شده از شیر خام استفاده نمود.

یکی از مشکلات استفاده از تکنولوزی غشایی گرفتگی غشاء می‌باشد که می‌توان با افزایش سرعت جریان، ضخامت رسوب تشکیل شده روی سطح غشا را کاهش داد و یا سیستم را به گونه‌ای طراحی نمود که بر کاهش شدید فشار غلبه کند. از سوی دیگر جذب ترکیبات روی غشاء را می‌توان با انتخاب غشاء مناسب و انجام برخی تیمارهای خاص کاهش داد. با انتخاب غشایی که دارای اندازه حفرات و توزیع مناسب باشد و نیز استفاده از پمپ‌هایی که اندازه ذرات را به دلیل فشارهای برشی تغییر نمی‌دهند می‌توان به گرفتگی کمتر غشاء و جداسازی بهتر دست یافت [۳۳].

۲-۴- سالم سازی شیر به روش اشعه دادن[1]

یکی دیگر از روش‌های سالم سازی سرد شیر استفاده از اشعه می‌باشد. امواج الکترومغناطیسی که دارای قابلیت یونیزه کردن می‌باشند، در اثر تماس مستقیم با مادهٔ غذایی، باعث یونیزه شدن و ایجاد تغییر در سلول‌های زنده شده و به مرگ آنها منجر می‌شود. هرچند که گزارش‌هایی در مورد استفاده از امواج با انرژی بالاتر نظیر پرتو گاما در مورد مواد غذایی مختلف وجود دارد، اما استفاده از امواج با طول موج بیشتر و انرژی کمتر، به دلیل اثرات مخرب کمتری که بر سایر ترکیبات مادهٔ غذایی می‌گذارند رایج‌تر است. استفاده از امواج مایکروویو و پرتو فرابنفش از جمله مهمترین روش‌های پرتودهی مواد غذایی به‌حساب می‌آیند. اما به منظور غیرفعال سازی میکروارگانیسم‌ها در محصولاتی مانند شیر، بیشتر از پرتو فرابنفش استفاده می‌شود. در این فرایند از اشعه‌های الکترومغناطیس در طیف ۲۰۰-۴۰۰nm استفاده می‌شود که این طیف به سه دسته تقسیم می‌شود؛ UV-A (۳۲۰-۴۰۰nm)، UV-B(۲۸۰-۳۲۰nm)، UV-C (۲۰۰-۲۸۰nm) [۳۴]. شدت این اشعه با واحد وات بر متر مربع (Wm^{-2}) و دوز آن که تابعی از شدت و زمان تماس می‌باشد با واحد ژول بر متر مربع (Jm^{-2}) بیان می‌گردد. UV-C اثر میکروب کشی روی میکروارگانیسم‌هایی از جمله باکتری، ویروس، کپک، مخمر و جلبک دارد و طول موج ۲۴۵nm برای ضد عفونی سطوح، آب و غذاهای مایع استفاده می‌شود [۳۴]. به نظر محققین، غیر فعال سازی میکروبی در طی این فرآیند، در نتیجه تغییرات فتوشیمیایی پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلوئیک و اثر پرتوها بر تکثیرسلولی، موتاسیون یا جهش ژنتیکی و اثر کشندگی آن می‌باشد [۳۵]. از آن جایی که اثر کشندگی اشعه از طریق تاثیر آن روی DNA مولکولی می‌باشد و آنزیم‌ها فاقد DNA می‌باشند، در نتیجه آنزیم‌ها از مقاومت بالایی در برابر تابش اشعه برخوردارند بنابراین لازم است به منظور غیر فعال سازی لیپاز و دیگر آنزیم‌های ایجاد کننده تغییرات نامطلوب در فراورده، از تیمار حرارتی کافی به همراه تشعشع برای حذف آنزیم‌ها استفاده نمود. این روش به نوبه خود با مشکلاتی از جمله تشدید طعم نامطلوب در شیر در اثر حرارت همراه می‌باشد [۳۶].

1. Irradiation

از مشکلات استفاده از اشعه در سالم سازی شیر، حساسیت شیر تیمار شده با اشعه در برابر قهوه‌ای شدن و ایجاد طعم نامطلوب در آن می‌باشد. دلیل حساسیت به قهوه‌ای شدن تشکیل ردوکتون‌هاست[1] که به عنوان گروه کربونیل عمل می‌کنند [۳۴]. بو و مزه اکسیدی حاصل از چربی اشعه دیده به دلیل ترکیبات اسید چرب آن می‌باشد. یکی از این اسیدهای چرب مشخص شده اسید لینولنیک می‌باشد. اسیدهای چرب دارای گروه‌های وینیل و زنجیره‌های شاخه‌دار نیز از دیگر عوامل ایجاد کننده بو و مزه اکسید شده می‌باشند. قرار گرفتن اسید لینولنیک تحت تیمار تشعشع، ترکیباتی با بوی ماهی و ترکیبات حاوی گروه وینیل و زنجیره شاخه‌دار، بویی شبیه شمع ایجاد می‌کنند که این دو بو با هم ترکیب شده و طعم پیه مانند چربی را در شیر تیمار شده با تشعشع ایجاد می‌کنند [۳۷]. تلاش های زیادی به منظور زدودن طعم نامطلوب ایجاد شده در شیر انجام شده است. افزودن ۰/۱-۰/۰۱ درصد پراکسید هیدروژن بعد از اشعه دادن، طعم نامطلوب اولیه بعد از نگهداری در یخچال را کاهش می‌دهد، اما برای مقبولیت کامل کافی نیست. روش دیگر به منظور کاهش طعم نامطلوب در شیر استفاده از سدیم آسکوربات و آسوربیل پالمیتات می‌باشد [۳۵].

مطالعات انجام شده روی اثر نور UV با دوز $۱۵/۸\pm۱/۶ mJ/cm^2$ بر شیر گوسفندی نشان داد که این فرآیند سبب کاهش ۵ سیکل لگاریتمی در جمعیت لیستریا مونوسیتوژنز می‌شود اما مشاهده گردید که ویژگی‌های حسی و شیمیایی شیر حاصل، متفاوت از شیرخام می‌باشد [۳۸].

۲-۵- استفاده از CO_2 در سالم سازی شیر

سرد کردن شیر در دامداری‌ها و کارخانه‌های فرآوری شیر باعث کاهش نرخ رشد باکتری‌های مزوفیل و حفظ کیفیت شیر می‌شود ولی با این عمل رشد باکتری‌های سرماگرا متوقف نمی‌شود و به عنوان فلور میکروبی غالب باقی می‌مانند. این باکتری‌ها می‌توانند آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز خارج سلولی مقاوم به حرارت تولید کنند که توسط تیمارهای حرارتی معمول در صنعت برای سالم سازی فرآورده‌های شیر به طور کامل از بین نمی‌روند. این آنزیم‌ها با تجزیه ترکیبات مختلف شیر، ماندگاری و کیفیت شیر و فراورده‌های شیر را تحت تاثیر قرار می‌دهند. افزودن CO_2 رشد باکتری‌های سرماگرا را مهار می‌کند و موجب افزایش ماندگاری شیر خام و شیر پاستوریزه می‌شود و اثر زیان‌باری روی کیفیت بیوشیمیایی شیر ندارد [۳۹، ۴۰].

در تکنولوژی استفاده از گاز CO_2، ماده غذایی برای مدت زمان مشخصی به صورت غیر مداوم و یا نیمه مداوم با CO_2 فوق بحرانی یا زیر بحرانی تماس می‌یابد. CO_2 فوق بحرانی در شرایطی ایجاد می‌شود که دما و فشار بالاتر از نقطه بحرانی (دمای بحرانی T_C=۳۱/۱°C و فشار بحرانی P_C =۷/۳۸ MPa) باشد و به صورت تک فاز درآید. در این شرایط CO_2 دارای این توانایی منحصر به فرد خواهد بود که می‌تواند مانند گاز در جامدات نفوذ کند و مانند مایعات مواد را در خود حل نماید. این شکل از CO_2 اثر ضد میکروبی بیشتری دارد [۴۰، ۴۱، ۴۲]. این فرآیند به علت شرایط ملایم دارای مزایایی نسبت به تیمار فشار بالا است. فشار مورد استفاده در این روش خیلی پایین است (معمولا کمتر از ۲۰MPa) و این امکان را فراهم می‌آورد که مدیریت و کنترل فشار در این فرایند راحت‌تر بوده و به تبع آن هزینه نیز کاهش یابد [۴۳].

مکانیسم غیر فعال سازی میکروارگانیسم‌ها توسط CO_2 به صورت زیر می‌باشد [۴۴]:

۱- حل شدن CO_2 در فاز مایع پیرامونی سلول
۲- تغییر غشاء سلولی
۳- کاهش pH داخل سلولی
۴- غیر فعال شدن آنزیم‌های کلیدی به علت کاهش pH
۵- اثر مستقیم CO_2 مولکولی و HCO_3^- روی متابولیسم
۶- به هم خوردن تبادل الکترولیت داخل سلولی
۷- خروج ترکیبات حیاتی از سلول و غشاء سلولی

در مرحله اول CO_2 یا H_2CO_3 به صورت مولکولی در مایع خارجی سلول حل شده و بعد به صورت HCO_3^-، CO_3^{-2} و H^+ شکسته می‌شوند. در مرحله دوم CO_2 ممکن است در غشاء سلولی نفوذ کرده و در لایه پربی دوست تجمع یابد که این امر به دلیل از دست دادن زنجیره‌های چربی سبب افزایش سیالیت غشاء می‌شود این تغییرات سبب اختلال در خصوصیات عملکردی و ساختمانی غشاء می‌شود. همچنین CO_2 موجب تغییر در بار سطحی غشاء نیز می‌گردد. در مرحله سوم CO_2 در سیتوپلاسم

1. Redoctones

داخلی سلول باکتری تجمع می‌یابد و سبب کاهش pH می‌گردد [۴۴].

آنزیم‌های کلیدی سیتوپلاسم حداکثر فعالیت را در pH مطلوب خود دارند و فعالیت آنها با تغییر pH شدیداً کاهش می‌یابد؛ در نتیجه با کاهش pH سیتوپلاسم ناشی از حضور CO_2 آنزیم‌های ضروری برای فرآیند متابولیک غیر فعال می‌شوند. سرعت عمل آنزیم‌ها علاوه بر pH، به غلظت داخلی سوبسترا، فراورده و کوفاکتور آن نیز بستگی دارد. به نظر می‌رسد که غلظت H_2CO_3 برای تنظیم فعالیت آنزیم، نقش حیاتی داشته و سبب فعال‌تر شدن و یا ممانعت از فعالیت آنزیم می‌شود. H_2CO_3 و CO_2 حل شده روی فعالیت کربوکسیلی و دکربوکسیلی تاثیر دارد [۴۵].

HCO_3^- و CO_2 می‌توانند الکترولیت‌های غیر آلی داخل سلولی از جمله Ca^{+2} و Mg^{+2} و یون‌های موجود در سلول و غشاء سلولی را رسوب دهند. این یون‌ها ارتباط اسمزی بین سلول و محیط را نگه می‌دارند و این عمل سبب آسیب به حجم سلول می‌شود [۴۴].

تجمع CO_2 به علت قدرت حل کنندگی بالا، ترکیبات حیاتی را از سلول و غشاء سلولی خارج می‌کند. در این حالت CO_2 در سلول نفوذ می‌کند تا مقدار آن به سطح بحرانی در داخل سلول برسد و بعد ترکیبات داخل سلولی را بیرون می‌آورد که این امر سبب مختل شدن یا تغییر ساختار غشاء و یا تعادل سیستم زیستی می‌شود که پیامد آن غیر فعال شدن سلول است. به نظر می‌رسد که این فرآیند با حذف ناگهانی فشار تشدید می‌شود، زیرا سبب انتقال سریع مواد داخل سلولی به محیط خارج می‌شود [۴۴].

فاکتورهای موثر در غیر فعال سازی میکروارگانیسم‌ها توسط CO_2 عبارتنداز: افزایش دما، فشار و رطوبت [۴۳، ۴۴]. از سوی دیگر حضور چربی و پروتئین نفوذ CO_2 به درون سلول را کاهش می‌دهد [۴۶]. همچنین سلول‌های باکتریایی در pH کمتر، به حضور CO_2 حساس‌تر می‌باشند که به دلیل افزایش نفوذ پذیری غشاء به این گاز است [۴۴].

به علت ترکیبات دیواره سلولی، باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی‌ها مقاوم‌تر می‌باشند و با افزایش بار میکروبی مقاومت آنها به غیر فعال سازی نیز افزایش می‌یابد. به طور کلی سلول‌ها در فاز سکون نسبت به فاز لگاریتمی به حرارت و فشار مقاوم‌ترند و دلیل آن سنتز پروتئین جدید می‌باشد که سلول را در مقابل شرایط جدید محافظت می‌کند [۴۴]. استفاده از فناوری CO_2 با فشار بالا در دمای متوسط (۲۰-۴۰°C) برای کاهش شکل اسپوری باکتری‌ها کارایی ندارد و بدین منظور مدت زمان طولانی‌تری لازم می‌باشد (۱۴۴۰ دقیقه). تیمارهای دیگر، نظیرافزودن نیسین، لاکتوپراکسیداز و لیزوزیم نیز برای این منظور استفاده می‌شود [۴۴]. همچنین دمای بالاتر از ۸۰°C همراه با CO_2نیز سبب نابودی اسپورها می‌شود. در نتیجه این تیمار به تنهایی نمی‌تواند به منظور استریلیزاسیون استفاده شود زیرا در استریلیزاسیون حداقل 10^6 cfu/m اسپور بایستی به صورت کامل از بین برود[۴۷]. در مطالعه‌ای، تاثیر CO_2 تحت فشار (۱/۵-۵/۵MPa) و زمان‌های مختلف تماس روی بقای اشرشیاکلی، ساکارومایسیس سرویزیه[1] و انتروکوکوس فکالیس[2] مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده گردید که با افزایش فشار و زمان تماس، تخریب سلولی نیز بیشتر می‌شود. بعلاوه یک رابطه خطی بین غیرفعال‌سازی میکروب‌ها، فشار CO_2 و مدت زمان تماس وجود دارد [۴۸]. استفاده از تیمار CO_2 سبب کاهش بار میکروبی بیشتر و یا برابر با فرآیند پاستوریزاسیون می‌شود و فراورده‌ای با ماندگاری بیشتر و ویژگی‌های حسی بهتر تولید می‌کند [۴۲]. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که افزودن ۱۵۰۰ppm CO_2 به شیر خام سرد شده به طور معنی داری پروتئولیز و لیپولیز را طی ۲۱ روز نگهداری در ۴C° کاهش می‌دهد که عمدتا مربوط به اثر بازدارندگی میکروبی CO_2 می‌باشد. افزودن CO_2 به شیر خام پروتئولیز را از طریق دو مکانیسم کاهش می‌دهد: کاهش پروتئازهای میکروبی به دلیل کاهش رشد میکروبی و کاهش فعالیت پلاسمین به این دلیل که پلاسمین یک پروتئاز قلیایی است و با افزودن CO_2 به شیر pH محیط از مقدار بهینه فعالیت آن دور می‌شود [۴۹].

در مطالعه‌ای که روی شیر فرآیند شده با CO_2 انجام گرفت مشاهده گردید که در مقایسه با نمونه شاهد، طی سرد کردن شیرهای فرآیند شده با CO_2 مقادیر کمتری از ترکیبات فرار تولید شده و محتوی اسید لاکتیک این شیرها ثابت باقی ماند؛ در صورتی که در شیر شاهد مقادیر آنها به آرامی افزایش یافت. از

1. Sacharomyces cervisiae
2. Enterococcus faecalis

سوی دیگر خاصیت ضد میکروبی CO_2 زمانی که pH شیر را به ۶ می‌رساند بیشتر از زمانی می باشد که pH ۶/۲ است [۵۰].

افزودن CO_2 به شیر سبب کاهش در pH، خروج کلسیم کلوئیدی و کلسیم باند شده با کازئین‌ها شده، سطح یون کلسیم افزایش یافته و ساختمان میسل شکسته می‌شود. افزایش میزان یون کلسیم در خصوصیات انعقاد توسط رنت مفید خواهد بود. اگر چه قابلیت حل شدن فسفات کلسیم کلوئیدی می‌تواند فرایند تولید پنیر را تحت تاثیر قرار دهد. تهیه پنیر از شیر سرد تیمار شده با CO_2 نشان داد که رشد آغازگرهای این پنیر و تولید اسیدهای آلی و ترکیبات فرار با اسیدی کردن شیر توسط CO_2 تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. همچنین در تولید پنیر از شیر تیمار شده با CO_2، زمان انعقاد و مقدار رنت لازم کاهش و راندمان پنیرسازی، سفتی لخته و خروج آب پنیر افزایش می‌یابد. افزودن CO_2 به شیر، اثرات زیان آوری روی خواص شیمیایی، میکروبی یا حسی نشان نمی‌دهد [۳۹، ۴۰].

۳- نتیجه‌گیری

بیشتر روش‌های سالم سازی سرد شیر در ضمن کاهش بار میکروبی اثر نامطلوبی روی ویژگی‌های حسی و شیمیایی ندارد. در این میان استفاده از فشار بالا و PEF کارایی خوبی داشته ولی هزینه این فرآیندها بالا می‌باشد. روش میکروفیلتراسیون روش کارآمدی برای افزایش زمان ماندگاری شیر پاستوریزه بوده پنیرهای حاصل از این شیر خام، خواص مطلوبی خواهد داشت. استفاده از CO_2 با فشار بالا نیز اثر مطلوبی در کاهش بار میکروبی شیر خام به‌ویژه سرماگراها دارد اما پرتودهی به دلیل تاثیر نامطلوب بر روی طعم و بو کاربرد چندانی ندارد. به‌طور کلی در انتخاب روش‌های غیرحرارتی به‌منظور افزایش ماندگاری شیر، بایستی موارد زیادی مورد توجه قرار گیرد که مهمترین آنها عبارتند از هزینهٔ فرایند و صرفهٔ اقتصادی آن، وجود سایر تیمارهای کمکی، نوع میکروارگانیسم هدف و نوع استفاده‌ای که برای شیر فراوری شده در نظر گرفته شده است. به دلیل افزایش آگاهی مصرف کننده و تمایل او به مصرف فراورده‌های غذایی سالم و طبیعی با ارزش تغذیه‌ای بالا، انتظار می‌رود که استفاده از این روش‌های سالم‌سازی سرد، جای خود را در صنعت تولید فراورده‌های لبنی باز کرده و در آیندهٔ نزدیک بطور گسترده برای فراوری این محصول غذایی مهم مورد استفاده قرار گیرد.

۴- منابع

[1] Smiddy, M. A., Martin, J., Huppertz, T. and Kelly, A. L. (2007). Microbial shelf-life of high-pressure-homogenised milk. International Dairy Journal. 17: 29-32.

[2] Pafylias, I., Cheryan, M., Mehaia, M. A. and Saglam, N. (1996). Microfiltration of milk with ceramic membranes. Food Research International. 29: 141-146.

[3] Hayes, M. G., Fox, P. F. and Kelly, A. L. (2005). Potentional application of high pressure homogenization in processing of liquid milk. Journal of Dairy Research. 72: 25-33.

[4] Huppertiz, T., Kelly, A. l. and Fox, P. F. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. International Dairy Journal. 12: 561-572.

[5] Hite, B. H. (1899). The effect of pressure in the preservation of milk. West Virginia Agricultural Experimental Station Bulletin. 58: 15–35.

[6] Gervilla, R., Ferragut, V. and Guamis, B. (2009). High hydrostatic pressure effects on color and milk-fat globule of ewes milk. Journal of food Science. 66: 880-885.

[7] Trujillo, A. J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R. and Guamis, B. (2002). Application of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 3: 295-307.

[8] Black, E. P., Kelly, A. l. and Fitzgerald, G. F. (2005). The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 6: 286-292.

[9] Gervilla, R., Ferragut, V. and Guamis, B. (2000). High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. Journal of Dairy Science. 83: 674-682.

[10] Buffa, M., Guamis, B., Roya, C. and Trujillo, A. J. (2001). Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure-treated milk. Food Microbiology. 18: 45-51.

[11] Smelt, J. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. Trends in Food Science and Technology. 9: 152-158.
[12] Buffa, M. N., Trujilo, A. J., Pavia, M. and Guamis, B. (2001). Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw. pasteurized or high-pressure-treated goats milk. International Dairy Journal. 11: 927-934.
[13] Mussa, D. M. and Ramaswamy, H. S. (1997). Ultra high pressure pasteurization of milk, kinetics of microbial destruction and changes in physic-chemical characteristics. Lebensmittle-Wissenschaft und- Technologie. 30: 551-557.
[14] Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. and Balny, C. (1994). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. Trends in Biotechnology. 12: 493–501.
[15] Datta, N. and Deeth, H. C. (1999). High pressure processing of milk and dairy products. The Australian Journal of Dairy Technology. 54: 41–48.
[16] Clark, J. P. (2006). Pulsed electric field processing. Food Technology. 06: 66-67.
[17] Bendicho, S., Barbosa-Canovas, G. V. and Martin, O. (2002). Milk processing by high intensity pulsed electric fields. Trends in Food Science and Technology. 13: 195-204.
[18] Wan, J., Coventry, J., Swergon, P., Sanguansri, P. and Versteeg, C. (2009). Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safty-pulsed electic field and low-temperature plasma. Trends in Food Science and Technology. 20: 414-424.
[19] Sepulveda, D. R., Gongora-Nieto, M. M., Guerrero, J. A. and Barbosa-Canovas, G. V. (2009). Shelf life of whole milk processed by pulsed electric field in combination with PEF-generated heat. Food Science and Technology. 42: 735-739.
[20] Zimmermann, U. (1986). Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. Review in Physiology Biochemistry and Pharmacology. 105: 176-257.
[21] Tsong, T. Y. (1991). Electroporation of cell membranes. Biophysical Journal. 24: 271-295.
[22] Grahl, T. and Markl, H. (1996). Killing of microorganisms by pulsed electrical field. Application Microbology and Biotechnology. 45: 148-157.
[23] Odriozola-Serrano, I., Bendicho-Porta, S. and Martin-Belloso, O. (2006). Comparativ study on shelf life of whole milk processed by high-intensity pulsed electric field or heat treatment. Journal of Dairy Science. 89: 905-911.
[24] Qin, B. L., Pothalcamury, U. R., Vega, H., Martin, O, Barbosa-canovas, G. V. and Swanson, B. G. (1995). Food pasteurization using high-intensity pulsed electric field. Food Technology. 49: 55-60.
[25] Smith, K., Mittal, C. S. and Griffiths, M. W. (2002). Pasteurization of milk using pulsed electrical field and antimicrobials. Journal of Food Science. 67: 2304-2308.
[26] Grandison, A. S. (2003). Membran filtration techniques in food preservation, In: Zeuthen, P., Bogh-Sorensen, L. (eds). CRC Press LLC, chaptere 14.
[27] Saboya,, L. V. and Maubois, J. (2000). Current developments of microfiltration technology in the dairy industry INRA. EDP Sciences. 80: 541-553.
[28] Elwell, M. W. and Barbano, D. M. (2006). Use of microfiltration to improve fluid milk quality. Journal of Dairy Science. 89: 10-30.
[29] Holm, S., Malmberg, R. and Svensson, K. (1984). Method and plant for producing milk with a low bacterial content. Journal of Dairy Science. 43: 194-202.
[30] Bolchini, F., Vegilo, F. and Barba, D. (2004). Microfiltration of bovine and ovine milk for the reduction of microbial content in a turbular membrane: a preliminary investigation. Desalination. 161: 251-25
[31] Kosikowski, F. V. and Mistry, V. V. (1990). Microfiltration, ultrafiltration, and centrifugation separation and sterilization processes for improving milk and cheese quality. Journal of Dairy Science. 73: 1411-1419.
[32] Amornkul, Y. and Henning, D. R. (2007). Utilization of microfiltration or lactoperoxidase system or both for manufacture of Cheddar cheese from raw milk. Journal of Dairy Science. 90: 4988-5000.

[33] Merin, U. and Daufin, G. (1990). Cross flow microfiltration in dairy industry. state-of-the-art Lait. 70: 281-291.

[34] Wertheim, J. H., Roychoudhury, R. N., Hoff, J., Goldblith, S. A. and Proctor, B. E. (1957). Milk irradiation preservation of milk and milk products. Journal Of Agricultural and Food Chemistry. 5: 944-950.

[35] Matak, K. E., Sumner, S. S., Duncant, S. E., Hovingh, E., Worobo, R. W. and Hackney, C. R. (2007). Effects of ultraviolet irradiation on chemical and sensory properties of goat milk. Journal of Dairy Science. 90: 3178-3186.

[36] Curran, H. R. and Tamsma, A. (1960). Some observation on the ultraviolet irradiation of milk(centrifilmer process) with emphasis upon organoleptic effects and sporidal efficieny. Journal of Dairy science. 43: 410-412.

[37] Hoff, E., Wertheim, J. H. and Proctor, B. E. (1959). Radiation preservation of milk and milk products. v. precursors to the radiation-induced oxidation flavor of milk fat. Journal of Dairy science. 42: 468-475.

[38] Matak, K. E., Churey, J. J., Worobo, R. W., Sumner, S. S., Hovingh, E., Hackney, C. R. and Pierson, M. D. (2005). Efficacy of UV light for the reduction of Listeria monocytogenes I goat milk. Journal of Food Protection. 68: 2212-2216.

[39] Ruas-Mddiedo, P., Bade-Gancedo, J. C., Alonso, L., Reyes-Gavilan, C. (1998). CO_2 addition to refrigerated milk in acid-coagulated cheese making. International Dairy Journal. 8: 951-958.

[40] Ruas-Madiedo, P., Alonso, L., Delgado, T., Bada-Gancedo, J. C. and Reyes-Gavilan, C. G. (2000). Manufacture of Spanish hard cheese from CO_2-treated milk. Food Research International. 35: 681-690.

[41] Kamihira, M., Taniguchi, M. and Kobayashi, T. (1986). Sterilization of microorganisms with supercritical carbon dioxide. Agricultural and Biological Chemistry. 51: 407-712.

[42] Warner, B. G. and Hotchkiss, J. H. (2006). Countinus flow nonthermal CO_2 processing : the lettal effect of subcritical and supercritical CO_2 oon total microbial. Journal of Dairy Science. 89: 872-881.

[43] Wu, Y., Yao, S. J. and Guan, Y. X. (2007). Inactivation of microorganisms in carbon dioxide at elevated pressure and ambient temperature. Industrial Engineering Chemistry Research. 46: 6345-6352.

[44] Gonzalez, L., Geeraerd, A. H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginnekn, L., Debevere, J. and Van Impe, J. F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in food: the past, the present and the future. International Journal of Food Microbiology. 117: 1-28.

[45] Joes, R. P. and Greenfield, P. F. (1982). Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. Enzyme and Microbial Technology. 4: 210-223.

[46] Erkmen, O. (2001). Effects of high-pressure carbon dioxide on Escherichia coli in nutrient broth and milk. International Journal of Food Microbiology. 65: 131-135.

[47] Zhang, J., Davis, T. A., Matthews, M. A., Drews, M. J. and Laberg, M. (2006). Sterilization using high-pressure carbon dioxide. Journal of Supercritical Fluids. 38: 354-372.

[48] Debs-Louka, E., Louka, N., Abraham, G., Chabot, V. and Allaf, K. (1999). Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability. Applied and Environmental Microbiology. 6: 626-631.

[49] Ma, Y., Barbano, D. M. and Santost, M. (2003). Effect of CO_2 addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4ºC. Journal of Diry Science. 86: 1616-1631.

[50] Fernandez-Garcia, E., Gonzales Dellano, D. and Delosreyes-Gavilan, C. G. (2004). Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by CO_2 addition. Journal of Food Protection. 59: 502-508.

A review on cold sanitization methods of milk

Rashtchi, P. [1*], Bazmi, A. [2], Almasi, H. [3]

1- M.Sc Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3- Ph.D Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
(Received:89/4/6 Accepted: 90/9/30)

Thermal processing is the most common and traditional method to extend the shelf life of food. Because of negative effects of this processing method on sensory and nutritional properties of food, using of cold methods for sanitization has often been interesting substitutes for thermal treatment. High pressure, pulsed electric field, microfiltration, using of high pressure carbon dioxide and irradiation are such an important of the cold sanitization methods. High pressure processing inactivates microorganisms through deformation of their membrane, changing cell morphology, protein denaturation and inactivation of genetic mechanisms, disruption of ribosomes and denaturation of essential enzymes. Pulsed electric field treatment causes electroporation of the cell membrane wich results destruction of the microorganism. Microfiltration is based on the separation of microorganisms according to size differences with food components. High pressure carbon dioxide technique inactivates microorganisms through deformation of cell membrane, intercellular pH decrease, inactivation of essential enzymes, direct influence on metabolism, disordering of intracellular electrolyte balance, and removal of vital constituents from cell and cell membranes. Finally, irradiation inactivates microorganisms by causing some changes in biological systems. The benefits and defects of these mentioned methods have been investigated in this review paper and exhibited some examples for applications of each of them for sanitization of milk.

Key words: Cold sanitization of milk, High pressure technology, Pulsed electric field, Microfiltration, Irradiation.

*Corresponding Author E-mail address: parisa_rashtchi@yahoo.com