

## مرواری بر روش‌های سالم سازی سرد شیر

پریسا رشتچی<sup>۱\*</sup>، علی بزمی<sup>۲</sup> و هادی الماسی<sup>۳</sup>

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  $\text{CO}_2$  تحت فشار بالا و تشعشع. فرآیند فشار بالا از طریق تحریب دیواره و غشاء سلولی، تغییر مورفولوژی سلول‌ها، غیرطبیعی کردن پروتئین‌ها، ممانعت از مکانیزم‌های ژنتیکی و تخریب ریزوZoom‌ها 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  $\text{CO}_2$  تحت فشار بالا با ایجاد تغییر در غشاء سلولی، کاهش pH داخل سلولی، غیرفعال شدن آنزیم‌های کلیدی، اثر مستقیم روی متابولیسم، به هم زدن تعادل الکتروولیت 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 مقاله مرواری، 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

استفاده از فناوری فشار بالا، اعمال میدان الکتریکی ارتعاشی<sup>۵</sup> (PEF)، فناوری غشایی و میکروفیلتراسیون، پرتو دهی و استفاده از گاز  $\text{CO}_2$  از جمله روش‌هایی هستند که گزارش‌های زیادی در مورد استفاده موافقیت 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 باشد. برخی از این روش‌ها سبب سالم‌سازی کامل شیر شده و برخی نیز به عنوان یک روش کمکی عمل می‌کنند. در این مقاله، هر کدام 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

### ۱-۱- فناوری فشار بالا<sup>۶</sup>

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 ماده 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 اعمال فشار بالا را نشان می‌دهد [۶]. ماده غذایی در مخزنی که قادر است فشار مورد نظر را تحمل کند، قرار گرفته و درون مایعی که به عنوان ماده حداوت انتقال دهنده فشار شناخته

5. Pulsed electric field

6. High pressure technology

### 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 به حساب می‌آید. مهمترین میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن که ممکن است در شیر وجود داشته باشد عبارتنداز: اشترشیاکلی<sup>۱</sup>، استافیلوکوکوس اورئوس<sup>۲</sup>، لیستریا مونوسیتوژنر<sup>۳</sup> و باسیلوس سرئوس<sup>۴</sup> [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 می‌رونند. با این حال، این فرایند سبب نابودی کامل باکتری‌های ترمودیوریک و اسپورزا نمی‌شود [۲]. از سوی دیگر برخی از باکتری‌ها آنزیم‌های خارج سلولی مانند پروتتاز، 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 نسیی تخریب شده‌اند ترمیم یافته و تکثیر می‌یابند. به طور 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 monocytogenes

4. Basillus cereus

لیستریا اینوکوآ<sup>۱</sup>، پسودوموناس فلورسنس<sup>۲</sup> و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس<sup>۳</sup> در دمای ۰°C و استافیلوكوکوس اورئوس و اشرشیاکلی در دمای اتاق حساسیت بیشتری به فشار نشان می-دهند [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، استافیلوكوکوس اورئوس.

#### - نوع میکروارگانیسم‌ها و خصوصیات فیزیولوژیک آنها

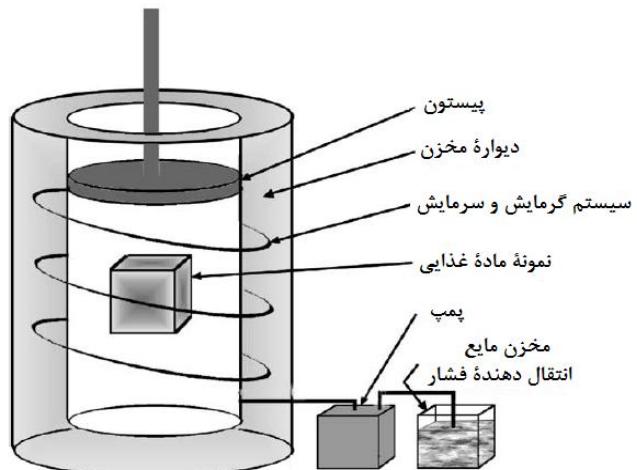
شدت فشار مورد استفاده در فرایند و میزان تأثیر آن بر روی میکروارگانیسم‌ها، به نوع آنها و همچنین به خصوصیات فیزیولوژیک آنها بستگی دارد [۸, ۷].

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 ماده غذایی

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

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



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

mekanizm‌های 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 فرایند (فشار، دما و مدت زمان اعمال فشار) نقش مهمی در میزان کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها دارند. با افزایش میزان فشار و زمان فرایند میزان کاهش فعالیت بیشتر می‌شود ولی اثر دما روی روش کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها متفاوت است. برخی از میکروارگانیسم‌ها در دمای اتاق و برخی دیگر در دمای پایین‌تر به اعمال فشار حساس می‌باشند. برای مثال

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

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]. بطور 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 ماده غذایی، عدم ایجاد تغییر در ویژگی‌های حسی و تغذیه‌ای ماده غذایی، کمک به حفظ عطر و طعم و رنگ طبیعی محصولات، تیمار سریع و یکنواخت و مطمئن همه قسمت‌های ماده 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 به صورت صنعتی جهت کاهش بار میکروبی و افزایش ماندگاری آبمیوه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [۱۶]. این روش در دمای پایین ( ${}^{\circ}\text{C}$ ) و زمان کوتاه سبب غیر فعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌ها می‌گردد بدون اینکه تأثیری بر روی کیفیت تغذیه‌ای و خواص ارگانولپلیتکی ماده غذایی داشته باشد و بیشتر در مورد مواد غذایی مایع مورد استفاده قرار گیرد. در نتیجه می‌تواند در سالم‌سازی شیر به عنوان جایگزین مناسبی برای روش‌های زمان‌بُر و انرژی‌بُر 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 کننده ارتعاش با ولتاژ بالا، محفظه تیمار، سیستم انتقال مایع و وسائل کنترل و نمایش فرایند می‌باشد. پارامترهای مشخص این تیمار شامل میدان الکتریکی با شدت  $\text{kV/cm}$   $15\text{--}50$ ، ارتعاش با عرض  $\mu\text{s}$   $1\text{--}5$  و بسامد  $\text{Hz}$   $400\text{--}2000$  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

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

### جدول ۱ تأثیر فناوری فشار بالا در کاهش سیکل لگاریتمی

برخی میکروارگانیسم‌ها در فشارها و دماهای مختلف [۷]

میکروارگانیسم	لگاریتمی شرایط تیمار	سیکل لگاریتمی
اشرشیاکلی	$300\text{ MPa}/20^{\circ}\text{C}$	۵/۳۵
پسودوموناس فلورسانس	$300\text{ MPa}/25^{\circ}\text{C}$	۵/۱۹
لیستریا اینکوآ	$250\text{ MPa}/20^{\circ}\text{C}$	۳/۸۷
استافیلکوکوس اورئوس	$250\text{ MPa}/25^{\circ}\text{C}$	۴/۵۸
لاکتوپاسیلوس هلموتیکوس	$400\text{ MPa}/20^{\circ}\text{C}$	۳/۱۲
	$400\text{ MPa}/25^{\circ}\text{C}$	۴/۰۰
	$450\text{ MPa}/20^{\circ}\text{C}$	۲۰/۰۰
	$450\text{ MPa}/25^{\circ}\text{C}$	۱۶/۷۰
	$450\text{ MPa}/20^{\circ}\text{C}$	۷/۱۰
	$450\text{ MPa}/25^{\circ}\text{C}$	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 تیمار  $400\text{--}600\text{ MPa}$  قابل مقایسه با شیر پاستوریزه می‌باشد اما به دلیل مقاومت بالای اسپورها نمی‌توان از این فرآیند به منظور استریلیزاسیون استفاده نمود [۷]. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که تیمار فشار بالا در  $400\text{ MPa}$  به مدت ۱۵ دقیقه در  $40\text{--}60^{\circ}\text{C}$  فعالیت پروتولوئیک باکتری‌های شیر را کاهش می‌دهد و در  $25^{\circ}\text{C}$  ویژگی‌های ارگانولپلیتک 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  $350\text{ MPa}$  در  $5^{\circ}\text{C}$  تا  $25^{\circ}\text{C}$  روز، در  $25^{\circ}\text{C}$  روز و در  $10^{\circ}\text{C}$  روز افزایش می‌یابد [۱۳].

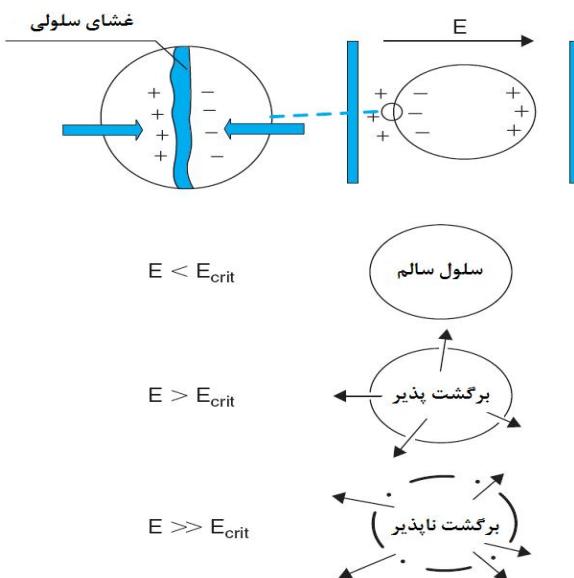
تیمار فشار بالا تنها پیوندهای غیرکوالانسی (شامل پیوندهای هیدروژنی، یونی و آبگریز) را تحت تأثیر قرار داده و روی پیوندهای کوالانسی بی‌تأثیر است. بنابراین در بین ترکیبات شیمیایی ماده غذایی، تنها ترکیباتی که دارای وزن مولکولی بالا بوده و ساختارهای سوم را دارند (نظیر پروتئین‌ها و آنزیم‌ها)

نسبت به گرم مثبت‌ها به این تیمار حساس‌تر می‌باشد که به دلیل ضخامت بیشتر لایه ماکروپیپید در این گروه باکتری‌ها می‌باشد [۱۸]. تیمار PEF به تهایی سبب نابودی اسپورها نمی‌شود. تنها راه غیر فعال سازی اسپورها، استفاده توام از فشار بالا و PEF ۳۰ می‌باشد؛ به طوریکه استفاده از فشار  $150 \text{ MPa}$  به مدت  $40^\circ\text{C}$  دقیقه در  $40^\circ\text{C}$  موجب رویش اسپورها شده و به دنبال آن با استفاده از فرایند PEF می‌توان میکرووارگانیسم‌های جوانه زده را غیر فعال نمود [۱۷]. به طور معمول آنزیم‌ها نسبت به میکرووارگانیسم‌ها 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، میکرووارگانیسم‌های 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 پروتئین‌های آب پنیر و ویتامین‌ها و طعم مورد مطالعه قرار گرفته و مشاهده شده است که اثر تخریبی این فرایند روی ترکیبات مورد بررسی ناچیز می‌باشد [۲۲].

حداقل زمان لازم فرایند برای شروع غیر فعال شروع 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 ماده غذایی نیز بر روی روند غیر فعال شدن میکرووارگانیسم‌ها 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 میکرووارگانیسم‌ها کمتر صورت می‌گیرد که یکی از علل آن حضور پروتئین‌ها می‌باشد. چربی نیز عامل محافظت کننده میکرووارگانیسم‌ها در مقابل غیر فعال شدن می‌باشد و علت آن جذب رادیکال‌ها و یون‌های فعال موجود در سلول شکسته شده، توسط چربی است [۱۷].

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 میکرووارگانیسم‌ها 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 نحوه 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  $1 \text{ V}$  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 اندازه کافی بالاتر از شدت بحرانی باشد، حفرات ایجاد شده کاملاً پایدار بوده و درنتیجه انتقال کنترل نشده 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  $99.99\%$  کاهش می‌یابند [۲۲]. در این میان باکتری‌های گرم منفی

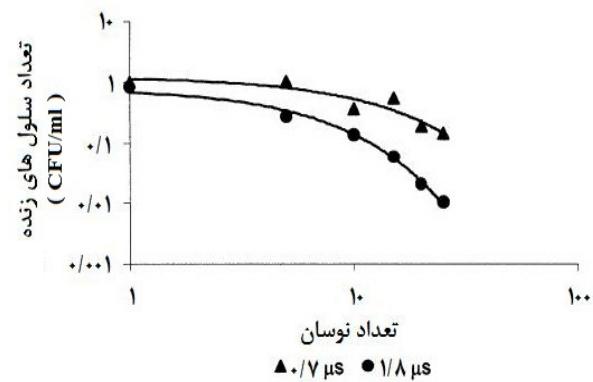
Odrizola و همکاران [۲۳] اثر میدان الکتریکی ارتعاشی با شدت بالا<sup>۱</sup> HIPEF اعمال شده در  $35/5\text{ kV/cm}$  به مدت  $1000\text{ }\mu\text{s}$  یا  $300\text{ }\mu\text{s}$  و دمای  $40^\circ\text{C}$  را بر روی ماندگاری میکروبی و پارامترهای مربوط به کیفیت شیر کامل بررسی کرده و نتایج را با شیر پاستوریزه شده به روش حرارتی مقایسه کردن. مشاهده شد که تیمار HIPEF تحت شرایط  $1000\text{ }\mu\text{s}$  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 ( $40\text{ kV/cm}$ ) در بررسی شیر 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 Ordizola استفاده از دمای بالاتر ( $50^\circ\text{C}$ ) 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  $80\text{ kV/cm}$  PEF،  $50\text{ }\mu\text{s}$  (پالس) با حرارت ملایم  $52^\circ\text{C}$  و افزودن مواد ضد میکروبی طبیعی مثل نیسین ( $38\text{ IU/ml}$ ) و لیزوژیم ( $1638\text{ IU/ml}$ ) به فراورده، میزان بار میکروبی را تا  $7\text{ سیکل لگاریتمی کاهش می‌دهد}$ . این میزان کاهش بیشتر از مجموع کاهش بار میکروبی مشاهده شده در کاربرد هر یک از این تیمارها به تنها یک 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 توان تکنیک PEF و ترکیبات ضد میکروبی (نیسین و لیزوژیم) موجب بهبود عملکرد تک تک این روش‌ها از نظر سالم سازی میکروبی محصول می‌گردد.

1. High Intensive Pulsed Electrical Field

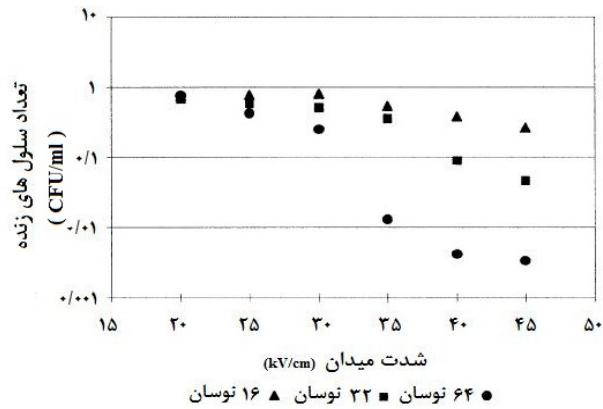
**pH**: در مواد غذایی با pH کمتر، غیر فعال سازی میکروارگانیسم‌ها بیشتر صورت می‌گیرد.

- 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 تأثیر 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 فعال سازی اشرشیاکلی بیشتر خواهد شد [۱۷].



شکل ۳ اثر مدت زمان ارتعاش در غیر فعال سازی اشرشیاکلی در شیر پس چرخ بعد از تیمار  $25\text{ kV/cm}$  [۱۷]



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

حفرات میکروفیلتر به کار برده شده به منظور سالم سازی معمولاً ۱/۴ میکرومتر می‌باشد و از دمای  $50^{\circ}\text{C}$  و سرعت جریان  $7/2\text{m/s}$  و فشار  $0/5\text{ bar}$  استفاده می‌گردد [۲۷]. جدول ۲ اندازه ترکیبات مختلف شیر را نشان می‌دهد. از روی اندازه 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 کارآبی 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  $130^{\circ}\text{C}$  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 ۱۶–۲۱ روز در دمای  $8^{\circ}\text{C}$  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 ۳–۵ سیکل لگاریتمی جمعیت باکتری‌ها (معادل  $99/90-99/94$ )، 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 [۲۷، ۲۶]

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

بنابراین استفاده از ترکیبی از روش PEF و سایر روش‌های سالم‌سازی مانند افزایش دما، فرایند فشار بالا، افروختن مواد ضد میکروبی و... کارایی این روش را در افزایش ماندگاری شیر بیشتر می‌کند. اما به طور کلی مشکلاتی از قبیل عدم وجود قوانین و استانداردهای مشخص، هزینه بالای نصب، راه اندازی و نگهداری تجهیزات و مهمتر از همه، ایجاد واکنش‌های الکتروشیمیایی بین دیواره داخلی محفظه دستگاه (که معمولاً از جنس فولاد ضد زنگ است) با ماده 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.

#### ۲-۳-۲- میکروفیلتراسیون<sup>۱</sup>

اساس تکنولوژی میکروفیلتراسیون بر عبور تحت فشار ماده از میان غشایی با اندازه حفرات  $1-10\mu\text{m}$  استوار می‌باشد. در طی این فرآیند برخی ماکرومولکول‌ها از غشاء فیلتر عبور کرده و وارد تراویده<sup>۲</sup> می‌شود؛ در حالی که ماکرومولکول‌های بزرگ‌تر و گلبول‌های چربی در ناتراویده<sup>۳</sup> باقی می‌مانند [۲۶]. این تکنولوژی توسط Sarterius Werke در سال ۱۹۲۹ در آلمان توسعه تجاری یافت. در این روش میکرووارگانیسم‌ها (هم رویشی و هم اسپورها) جدا گردیده و فراورده سترون تولید می‌گردد و مزیت عمدۀ آن حذف لاشه میکرووارگانیسم‌ها 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 تجاری مورد استفاده برای زدودن باکتری‌های شیر پس چرخ فرآیند Bactochate می‌باشد که توسط Switizerland Tetra Pak توسعه پیدا کرده است. اندازه

1. Microfiltration
2. Permeate
3. Retentate

## ۴-۲- سالم سازی شیر به روش اشعه دادن<sup>۱</sup>

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 ماده 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 نظری 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 ماده غذایی می‌گذارند رایج‌تر است. استفاده از امواج مایکروویو و پرتو فرابنفش از جمله مهمترین روش‌های پرتودهی مواد غذایی به حساب 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 مایکروویو و پرتو فرابنفش از ۲۰۰-۴۰۰ nm استفاده می‌شود که این طیف به سه دسته تقسیم می‌شود: UV-A (۳۲۰-۴۰۰ nm)، UV-B (۲۸۰-۳۲۰ nm) و UV-C (۲۰۰-۲۸۰ nm). شدت این اشعه با واحد وات بر متر مربع ( $W/m^2$ ) و دوز آن که تابعی از شدت و زمان تماس می‌باشد با واحد ژول بر متر مربع ( $J/m^2$ ) بیان می‌گردد. UV-C اثر میکروب کشی روی میکروارگانیسم‌هایی از جمله باکتری، ویروس، پک، مخمیر و جلبک دارد و طول موج ۲۴۵ nm برای ضد عفونی سطوح، آب و غذاهای مایع استفاده می‌شود [۳۴]. به نظر محققین، غیرفعال سازی میکروبی در طی این فرآیند، در نتیجه تغییرات فتوشیمیایی پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و اثر کشنندگی آن می‌باشد [۳۵]. از آن جایی که جهش ژنتیکی و اثر کشنندگی آن می‌باشد [۳۶]. از آن جایی که اثر کشنندگی 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 غیرفعال 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].

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

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

با توجه به مطالب گفته شده بیش از ۹۹٪ باکتری‌ها در ناتراویده میکروفیلتر باقی مانده و ۹۹٪ کاژین‌ها از طریق غشاء عبور می‌کنند. در نتیجه تراویده حاصل، بار میکروبی پایینی داشته و شامل قریب به اتفاق کاژین‌ها 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 تکنولوژی 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].

1. Irradiation

فرآورده‌های شیر را تحت تاثیر قرار می‌دهند. افزودن  $\text{CO}_2$  رشد باکتری‌های سرماگرا را مهار می‌کند و موجب افزایش ماندگاری شیر خام و شیر پاستوریزه می‌شود و اثر زیان‌باری روی کیفیت بیوشیمیابی شیر ندارد [۴۰، ۴۹]. در تکنولوژی استفاده از گاز  $\text{CO}_2$  ماده غذایی برای مدت زمان مشخصی به صورت غیر مداوم و یا نیمه مداوم با  $\text{CO}_2$  فوق بحرانی در بحرانی یا زیر بحرانی تماس می‌یابد.  $\text{CO}_2$  فوق بحرانی در شرایطی ایجاد می‌شود که دما و فشار بالاتر از نقطه بحرانی (دما بحرانی  $T_C = 31/1^\circ\text{C}$  و فشار بحرانی  $P_C = 7/38 \text{ MPa}$ ) باشد و به صورت تک فاز درآید. در این شرایط  $\text{CO}_2$  دارای این توانایی منحصر به فرد خواهد بود که می‌تواند مانند گاز در جامدات نفوذ  $\text{CO}_2$  کند و مانند مایعات مواد را در خود حل نماید. این شکل از  $\text{CO}_2$  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 (معمولًا کمتر از  $20 \text{ MPa}$ ) و این امکان را فراهم می‌آورد که مدیریت و کنترل فشار در این فرآیند راحت‌تر بوده و به تبع آن هزینه نیز کاهش یابد [۴۳].

mekanisim غیرفعال سازی میکروارگانیسم‌ها توسط  $\text{CO}_2$  به صورت زیر می‌باشد [۴۴]:

- ۱ حل شدن  $\text{CO}_2$  در فاز مایع پیرامونی سلول
- ۲ تغییر غشاء سلولی
- ۳ کاهش pH داخل سلولی

-۴ غیرفعال شدن آنزیم‌های کلیدی به علت کاهش pH

-۵ اثر مستقیم  $\text{CO}_2$  مولکولی و  $\text{HCO}_3^-$  روی متابولیسم

-۶ به هم خوردن تبادل الکترولیت داخل سلولی

-۷ خروج ترکیبات حیاتی از سلول و غشاء سلولی

در مرحله اول  $\text{CO}_2$  یا  $\text{H}_2\text{CO}_3$  به صورت مولکولی در مایع خارجی سلول حل شده و بعد به صورت  $\text{HCO}_3^-$  و  $\text{H}^+$  و  $\text{CO}_3^{2-}$  ممکن است در غشاء سلولی تفوّذ کرده و در لایه پرپی 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  $\text{CO}_2$  موجب تغییر در بار سطحی غشاء نیز می‌گردد. در مرحله سوم  $\text{CO}_2$  در سیتوپلاسم

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<sup>۱</sup> 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، 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]. تلاش‌های زیادی به منظور زدودن طعم نامطلوب ایجاد شده در شیر انجام شده است. افزودن  $1/10$  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 آسکوربیات و آسوربیل پالمیتان می‌باشد [۳۵].

مطالعات انجام شده روی اثر نور UV با دوز  $15/8 \pm 1/6 \text{ mJ/cm}^2$  بر شیر گوسفندي نشان داد که این فرآیند سبب کاهش ۵ سیکل لگاریتمی در جمعیت لیستریا مونوسیتوژن می‌شود اما مشاهده گردید که ویژگی‌های حسی و شیمیابی شیر حاصل، متفاوت از شیر خام می‌باشد [۳۸].

## ۲-۵- استفاده از $\text{CO}_2$ در سالم سازی شیر

سرد کردن شیر در دامداری‌ها و کارخانه‌های فرآوری شیر باعث کاهش نرخ رشد باکتری‌های مزوپل 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

1. Reductones

شرایط جدید محافظت می‌کند [۴۴]. استفاده از فناوری  $\text{CO}_2$  با فشار بالا در دمای متوسط ( $20\text{--}40^\circ\text{C}$ ) برای کاهش شکل اسپوری باکتری‌ها کارایی ندارد و بدین منظور مدت زمان طولانی‌تری لازم می‌باشد (۱۴۰ دقیقه). تیمارهای دیگر، نظیر افزودن نیسین، لاکتوپراکسیداز و لیزوژیم نیز برای این منظور استفاده می‌شود [۴۴]. همچنین دمای بالاتر از  $80^\circ\text{C}$  همراه با  $\text{CO}_2$  نیز سبب نابودی اسپورها می‌شود. در نتیجه این تیمار به تنهایی نمی‌تواند به منظور استریلیزاسیون استفاده شود زیرا در استریلیزاسیون حداقل  $10^6 \text{ cfu}/\text{m}^3$  اسپور بایستی به صورت کامل از بین برود [۴۷]. در مطالعه‌ای، تاثیر  $\text{CO}_2$  تحت فشار از  $1/5\text{--}5/5 \text{ MPa}$  و زمان‌های مختلف تماس روی بقای اشرشیاکلی، ساکارومایسیس سرویزیه<sup>۱</sup> و انتروکوکوس فکالیس<sup>۲</sup> مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده گردید که با افزایش فشار و زمان تماس، تخریب سلولی نیز بیشتر می‌شود. علاوه بر این خطي‌بین غیرفعال‌سازی میکروب‌ها، فشار  $\text{CO}_2$  و مدت زمان تماس وجود دارد [۴۸]. استفاده از تیمار  $\text{CO}_2$  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  $1500 \text{ ppm CO}_2$  به شیر خام سرد شده به طور معنی داری پروتئولیز و لیپولیز را طی ۲۱ روز نگهداری در  $4^\circ\text{C}$  کاهش می‌دهد که عمدتاً مربوط به اثر بازدارندگی میکروبی  $\text{CO}_2$  می‌باشد. افزودن  $\text{CO}_2$  به شیر خام پروتئولیز را از طریق دو مکانیسم کاهش می‌دهد: کاهش پروتازهای میکروبی به دلیل کاهش رشد میکروبی و کاهش فعالیت پلاسمین به این دلیل که پلاسمین یک پروتاز قلیایی است و با افزودن  $\text{CO}_2$  به شیر  $\text{pH}$  محیط از مقدار بهینه فعالیت آن دور می‌شود [۴۹].

در مطالعه‌ای که روی شیر فرآیند شده با  $\text{CO}_2$  انجام گرفت مشاهده گردید که در مقایسه با نمونه شاهد، طی سرد کردن شیرهای فرآیند شده با  $\text{CO}_2$  مقادیر کمتری از ترکیبات فرار تولید شده و محتوی اسید لاتکتیک این شیرها ثابت باقی ماند؛ در صورتی که در شیر شاهد مقادیر آنها به آرامی افزایش یافت. از

داخلی سلول باکتری تجمع می‌باید و سبب کاهش  $\text{pH}$  می‌گردد [۴۴].

آنزیم‌های کلیدی سیتوپلاسم حداکثر فعالیت را در  $\text{pH}$  مطلوب خود دارند و فعالیت آنها با تغییر  $\text{pH}$  شدیداً کاهش می‌باید؛ در نتیجه با کاهش  $\text{pH}$  سیتوپلاسم ناشی از حضور  $\text{CO}_2$  آنزیم‌های ضروری برای فرآیند متابولیک غیر فعال می‌شوند. سرعت عمل آنزیم‌ها علاوه بر  $\text{pH}$ ، به غلظت داخلی سوبسترا، فراورده و  $\text{H}_2\text{CO}_3$  برای تنظیم فعالیت آنزیم، نقش حیاتی داشته و سبب فعال‌تر شدن و یا ممانعت از فعالیت آنزیم می‌شود.  $\text{CO}_2$  حل شده روی فعالیت کربوکسیلی و دکربوکسیلی تاثیر دارد [۴۵].

$\text{CO}_2$  و  $\text{HCO}_3^-$  می‌توانند الکترولیت‌های غیر آلبی داخل سلولی از جمله  $\text{Ca}^{+2}$  و  $\text{Mg}^{+2}$  و یون‌های موجود در سلول و غشاء سلولی را رسوب دهند. این یون‌ها ارتباط اسمازی بین سلول و محیط را نگه می‌دارند و این عمل سبب آسیب به حجم سلول می‌شود [۴۶].

تجمع  $\text{CO}_2$  به علت قدرت حل کنندگی بالا، ترکیبات حیاتی را از سلول و غشاء سلولی خارج می‌کند. در این حالت  $\text{CO}_2$  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 [۴۶].

فاکتورهای موثر در غیر فعال سازی میکروارگانیسم‌ها توسط  $\text{CO}_2$  عبارتنداز: افزایش دما، فشار و رطوبت [۴۴، ۴۳]. از سوی دیگر حضور چربی و پروتئین نفوذ  $\text{CO}_2$  به درون سلول را کاهش می‌دهد [۴۶]. همچنین سلول‌های باکتریابی در  $\text{pH}$  کمتر، به حضور  $\text{CO}_2$  حساس‌تر می‌باشند که به دلیل افزایش نفوذ پذیری غشاء به این گاز است [۴۶].

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 می‌باید. به طور کلی سلول‌ها در فاز سکون نسبت به فاز لگاریتمی به حرارت و فشار مقاوم‌ترند و دلیل آن ستر پروتئین جدید می‌باشد که سلول را در مقابل

1. *Sacharomyces cerevisiae*  
2. *Enterococcus faecalis*

فراورده‌های لبنی باز کرده و در آینده نزدیک بطور گستردگی 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] Pafylas, 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). Potential application of high pressure homogenization in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*. 72: 25-33.
- [4] Huppertz, 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.

سوی دیگر خاصیت ضد میکروبی  $\text{CO}_2$  زمانی که pH شیر را به ۶ می‌رساند بیشتر از زمانی می‌باشد که  $\text{pH} = 6/2$  است [۵۰]. افزودن  $\text{CO}_2$  به شیر سبب کاهش در pH، خروج کلسیم کلریدی و کلسیم باند شده با کازئین‌ها شده، سطح یون کلسیم افزایش یافته و ساختمان میسیل شکسته می‌شود. افزایش میزان یون کلسیم در خصوصیات انعقاد توسط رنت مفید خواهد بود. اگر چه قابلیت حل شدن فسفات کلسیم کلریدی می‌تواند فرایند تولید پنیر را تحت تاثیر قرار دهد. تهیه پنیر از شیر سرد تیمار شده با  $\text{CO}_2$  نشان داد که رشد آغازگرهای این پنیر و تولید اسیدهای آلی و ترکیبات فرار با اسیدی کردن شیر توسط  $\text{CO}_2$  تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. همچنین در تولید پنیر از شیر تیمار شده با  $\text{CO}_2$  زمان انعقاد و مقدار رنت لازم کاهش و راندمان پنیرسازی، سفتی لخته و خروج آب پنیر افزایش می‌یابد. افزودن  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  با فشار بالا نیز اثر مطلوبی در کاهش بار میکروبی شیر خام بهویژه سرمگارها دارد اما پرتودهی به دلیل تاثیر نامطلوب بر روی طعم و بو کاربرد چندانی ندارد. بطور کلی در انتخاب روش‌های غیرحرارتی بهمنظور افزایش ماندگاری شیر، بایستی موارد زیادی مورد توجه قرار گیرد که مهمترین آنها عبارتند از هزینه فرایند و صرفه 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 سالم سازی سرد، جای خود را در صنعت تولید

- [22] Grahl, T. and Markl, H. (1996). Killing of microorganisms by pulsed electrical field. *Application Microbiology 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, chapter 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.
- [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. *Lebensmittel-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., Swerigon, P., Sanguansri, P. and Versteeg, C. (2009). Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safty-pulsed electric 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, electroporation 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.

- [42] Warner, B. G. and Hotchkiss, J. H. (2006). Countinus flow nonthermal CO<sub>2</sub> processing : the lettal effect of subcritical and supercritical CO<sub>2</sub> on 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<sub>2</sub> addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C. *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<sub>2</sub> addition. *Journal of Food Protection*. 59: 502-508.
- [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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>-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.

## **A review on cold sanitization methods of milk**

**Rashtchi, P.<sup>1\*</sup>, Bazmi, A.<sup>2</sup>, Almasi, H.<sup>3</sup>**

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 which 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