

ارزیابی کارایی روش تیتراسیون فرمل در تعیین میزان ماده خشک بدون چربی شیر در بستنی

سید شهرام شکر فروش^{۱*}، خدیجه ابهری^۲

۱- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

۲- دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۳)

چکیده

هدف از انجام این تحقیق ارزیابی کارایی روش تیتراسیون فرمل در تعیین مقدار پروتئین و ماده خشک بدون چربی شیر (MSNF) بستنی بود. از ۴۱ نمونه بستنی شیری و اجزای تشکیل دهنده آنها شامل شیر تازه، شیر خشک و پودر آب پنیر نمونه برداری شد. در همه نمونه‌ها مقدار ماده خشک (به روش خشک کردن در اوون)، چربی (به روش ژربر)، خاکستر (به روش سوزاندن در کوره)، پروتئین (به روش ماکروکلدال) و قند و MSNF (به روش محاسبه) اندازه‌گیری شدند. به علاوه در نمونه‌های بستنی MSNF با روش تیتراسیون فرمل نیز اندازه‌گیری شد. ضریب رگرسیون بین مقدار پروتئین اندازه‌گیری شده با روش کلدال و با روش تیتراسیون فرمل در بستنی ۰/۰۷ ($P > 0.6$) و بین مقدار MSNF واقعی نمونه‌های بستنی و اندازه‌گیری شده به روش تیتراسیون فرمل ۰/۱۱ ($p > 0.5$) بود. این تحقیق نشان داد که روش تیتراسیون فرمل روش دقیقی برای تخمین مقدار پروتئین بستنی نمی‌باشد و بر اساس مقدار پروتئین بستنی اندازه‌گیری شده به روش تیتراسیون فرمل و کلدال نمی‌توان مقدار MSNF آن را تعیین نمود. لذا پیشنهاد می‌شود در استاندارد ملی ۲۴۵۰ "درصد وزنی MSNF" از ویژگیهای بستنی شیری حذف و "حداقل مقدار پروتئین" بر اساس روش کلدال جایگزین آن گردد و حداقل قابل قبولی برای آن در نظر گرفته شود.

کلید واژگان: بستنی، تیتراسیون فرمل، ماده خشک بدون چربی شیر

* مسئول مکاتبات: shekar@shirazu.ac.ir

۱- مقدمه

در استاندارد شماره ۲۴۵۰ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸۷) ویژگی‌ها و روش‌های آزمون بستنی ارائه شده است. در این استاندارد یکی از ویژگی‌های بستنی شیری داشتن حداقل مواد جامد بدون چربی شیر (MSNF) ۷ تا ۹ در صد و روش اندازه‌گیری آن تیتراسیون فرمل بیان شده است [۱]. در حقیقت روش تیتراسیون فرمل روشی برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین شیر می‌باشد. پروتئین به همراه لاکتوز و خاکستر سه جزء اصلی تشکیل‌دهنده MSNF شیر هستند و در واقع در روش پیشنهادی استاندارد ۲۴۵۰، ابتدا مقدار پروتئین بستنی اندازه‌گیری شده و بعد با اعمال یک ضریب میزان MSNF بستنی تخمین زده می‌شود.

در بررسی‌های مقدماتی ما متوجه عدم همخوانی مقدار MSNF بستنی اندازه‌گیری شده به روش تیتراسیون فرمل با مقدار واقعی MSNF نمونه‌های بستنی شدیم و بر آن شدیم که این موضوع را دقیقتر بررسی کنیم. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی کارایی روش تیتراسیون فرمل در تعیین مقدار MSNF بستنی می‌باشد.

۲- روش کار

۱-۲- نمونه‌گیری

با مراجعه مکرر به یکی از کارخانه‌های تولید فرآورده‌های شیری، ۴۱ نمونه از انواع بستنی‌های تولیدی و نمونه‌های آزمایشی پس از مرحله بسته‌بندی و انجماد (Hardening) نمونه‌برداری شد. همچنین نوع و مقدار اجزای تشکیل‌دهنده آنها مشخص و از بعضی اجزای تشکیل‌دهنده شامل شیر تازه، شیر خشک و پودر آب پنیر نمونه‌برداری شد. نمونه‌های بستنی و اجزای تشکیل‌دهنده مورد آزمایش‌های شیمیایی گوناگون قرار گرفتند.

۲-۲- آزمایش‌های شیمیایی:

ابتدا نمونه‌های بستنی در دمای محیط قرار داده شدند تا کاملاً ذوب شوند. در مورد بستنی‌های دارای روکش شکلاتی، قبل از ذوب شدن، روکش آنها بطور کامل برداشته و حذف می‌شد. نمونه‌ها قبل از آزمایش به طور کامل همگن می‌شدند.

مقدار ماده خشک (به روش خشک کردن در اوون)، چربی (به روش ژربر)، خاکستر (به روش سوزاندن در کوره) و پروتئین (به روش ماکروکلدال) نمونه‌های بستنی، شیر تازه، شیر خشک و پودر آب پنیر اندازه‌گیری شدند. میزان قند نمونه‌های بستنی شامل لاکتوز و سوکروز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$+ \text{درصد چربی} - \text{درصد ماده خشک} = \text{درصد قند}$$

$$\text{در صد افزودنی‌ها} + \text{درصد خاکستر} + \text{درصد پروتئین}$$

در فرمول فوق، افزودنی‌ها که حداکثر ۵٪ درصد فرمول را تشکیل می‌دادند شامل ترکیبات امولسیفایر، استابیلایزر، طعم‌دهنده‌ها و رنگ‌ها بودند)

MSNF نمونه‌های شیر تازه و شیر خشک از تفاضل درصد ماده خشک و در صد چربی بدست آمد. MSNF بستنی با دو روش اندازه‌گیری شد

الف: تیتراسیون فرمل: بر اساس روش پیشنهادی استاندارد ملی ۲۴۵۰ [۱].

ب: محاسبه: بر اساس فرمول هر نمونه بستنی، میزان MSNF تامین شده از شیر تازه و شیر خشک با هم جمع شدند. با توجه به این که در فرمولاسیون بستنی‌ها از پودر آب پنیر هم استفاده می‌شد، و بخشی از MSNF بستنی از این ماده تامین می‌شد برای محاسبه تقریبی مقدار MSNF پودر آب پنیر ابتدا میانگین نسبت لاکتوز به پروتئین نمونه‌های شیر خشک مورد استفاده در تولید نمونه‌ها محاسبه گردید (این نسبت ۱/۷۳ به ۱ بود) و بعد مقدار MSNF تامین شده از پودر آب پنیر بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\% \text{MSNF} = \% \text{Ash} + \% \text{Protein} + (\% \text{Protein} \times 1.73)$$

۳-۲- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌آفزار SPSS 11.5 و با آزمون همبستگی پیرسون و رگرسیون مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

۳- نتایج

همانطور که در جدول شماره یک نشان داده شده است میانگین مقدار MSNF واقعی همه نمونه‌ها کمتر از مقدار

MSNF اندازه‌گیری شده به روش استاندارد (روش فرمالین) می‌باشد.

این در حالی است که پودر آب پنیر نیز به عنوان تامین کننده بخشی از MSNF در نظر گرفته شده است. اگر منبع تامین MSNF صرفاً شیر در نظر گرفته شود این تفاوت بیشتر می‌باشد و به علاوه صد در صد نمونه‌ها با میانگین MSNF ۵/۷۶ درصد از نظر استاندارد (حداقل ۷ درصد MSNF) مردود می‌باشند.

جدول ۱ مقدار MSNF نمونه‌های بستنی

| مقدار MSNF (میانگین \pm انحراف معیار) | | | | | |
|---|-------------|------------------|----------------------|-----------------|---------------------------------------|
| فرمول بستنی | تعداد نمونه | تامین شده از شیر | تامین شده از آب پنیر | کل | اندازه‌گیری شده به روش تیتراسیون فرمل |
| ۱ | ۱۸ | ۵/۴۷ \pm ۰/۲۶ | ۲/۰۷ \pm ۰/۱۲ | ۷/۵۴ \pm ۰/۲۲ | ۱۰/۳۹ \pm ۱/۵۸ |
| ۲ | ۸ | ۵/۴۸ \pm ۰/۵۴ | ۱/۳۱ \pm ۰/۰۰ | ۶/۷۹ \pm ۰/۵۴ | ۹/۴۱ \pm ۱/۳۸ |
| ۳ | ۸ | ۶/۶۷ \pm ۰/۵۷ | ۱/۲۷ \pm ۰/۱۷ | ۷/۹۴ \pm ۰/۵۸ | ۱۰/۵۱ \pm ۲/۷۱ |
| ۴ | ۷ | ۵/۸۰ \pm ۰/۱۴ | ۱/۹۶ \pm ۰/۰۱ | ۷/۷۶ \pm ۰/۱۴ | ۱۰/۲۷ \pm ۱/۰۵ |
| جمع | ۴۱ | ۵/۷۶ \pm ۰/۶۰ | ۱/۷۵ \pm ۰/۳۹ | ۷/۵۱ \pm ۰/۵۳ | ۱۰/۲۱ \pm ۱/۷۰ |

MSNF اندازه‌گیری شده به روش فرمالین ۰/۱۱ ($p=0.51$) و بین MSNF کل (تامین شده از شیر و پودر آب پنیر) و MSNF اندازه‌گیری شده به روش فرمالین ۰/۲۴ ($p=0.13$) بود (جدول شماره ۲).

ضریب رگرسیون بین مقدار میزان پروتئین اندازه‌گیری شده با روش کلدادل و با روش تیتراسیون فرمل در شیر خشک، شیر تازه و بستنی در جدول شماره ۲ آورده شده است. در نمونه‌های بستنی ضریب رگرسیون بین مقدار MSNF تامین شده از شیر و

جدول ۲ ضریب رگرسیون بین متغیرهای مختلف شیر خشک، شیر تازه و بستنی

| نمونه | متغیر | ضریب رگرسیون (r ²) | P value |
|----------|---|-----------------------------------|---------|
| شیر خشک | میزان پروتئین اندازه‌گیری شده با روش کلدال و با روش تیتراسیون فرمل | ۰/۰۲ | ۰/۶۶ |
| شیر خشک | میزان پروتئین اندازه‌گیری شده با روش کلدال و میزان MSNF | ۰/۰۲ | ۰/۷۰ |
| شیر تازه | میزان پروتئین اندازه‌گیری شده با روش کلدال و با روش تیتراسیون فرمل | ۰/۰۳ | ۰/۶۶ |
| شیر تازه | میزان پروتئین اندازه‌گیری شده با روش کلدال و میزان MSNF | ۰/۰۰۱ | ۰/۹۳ |
| بستنی | میزان پروتئین اندازه‌گیری شده با روش کلدال و با روش تیتراسیون فرمل | ۰/۰۷۶ | ۰/۶۵ |
| بستنی | میزان پروتئین اندازه‌گیری شده با روش کلدال و میزان MSNF | ۰/۲۱ | ۰/۰۰۳ |
| بستنی | مقدار MSNF اندازه‌گیری شده به روش تیتراسیون فرمل با مقدار MSNF حقیقی بستنی (تأمین شده از شیر) | ۰/۱۱ | ۰/۵۱ |
| بستنی | مقدار MSNF اندازه‌گیری شده به روش تیتراسیون فرمل با مقدار MSNF کل (تأمین شده از شیر و پودر آب‌پنیر) | ۰/۲۴ | ۰/۱۳ |

۴- بحث

نتیجه آزمون، افزودن اگزالات پتاسیم به نمونه قبل از افزودن فرمالین به آن را مؤثر دانست [۲]. همچنین او در تحقیقات بعدی خود نشان داد که در طول یک دوره شیردهی ضریب محاسبه میزان پروتئین شیر بر اساس سود مصرفی (موسوم به ضریب فرمل) تغییر می‌کند. او دلیل این امر را تفاوت در مقدار و نوع NPN شیر در طول یک دوره شیردهی بیان نمود [۳].

کاستیلو و همکاران (۱۹۶۲) در تحقیق خود ضریب رگرسیون بین مقدار پروتئین شیر اندازه‌گیری شده به روش فرمل و کلدال را ۰/۷۰ گزارش نمودند درحالی که این ضریب را بین روش نصب رنگ (Dye-binding) رنگ اورنج جی با کلدال ۰/۹۵ اعلام نمودند. آنها روش‌های نصب رنگ و اسپکتروفتومتری را در اندازه‌گیری مقدار پروتئین شیر دقیق‌تر از روش تیتراسیون فرمل ارزیابی نمودند. آنها با تحقیقات خود نشان دادند که ضریب فرمل در ماه‌های مختلف سال (از ۱/۷۴ تا ۱/۸۱) و در ماه‌های مختلف یک دوره شیردهی (از ۱/۷۳ تا ۱/۸۴) متغیر می‌باشد [۴].

یکی دیگر از عوامل مهم خطا در روش تیتراسیون فرمل حضور آنزیم‌های پروتئولیتیک در شیرهای ورم پستانی و ناشی از ازدیاد باکتری‌ها در شیرهای کهنه می‌باشد که موجب شکسته شدن

یکی از روش‌های اندازه‌گیری پروتئین شیر روش موسوم به تیتراسیون فرمل می‌باشد. از ویژگی‌های این روش، ساده و سریع بودن آن است. در این روش با افزودن فرمالین به شیر خنثی، فرمالین با عامل آمینی پروتئین‌ها (NH₂) باند شد و تشکیل متیل‌آمین (N-CH₂) می‌دهد و موجب اسیدی شدن پروتئین می‌شود. مقدار سود مصرفی برای تیتراسیون اسید تولیدی متناسب با میزان پروتئین نمونه می‌باشد.

این روش اولین بار در سال ۱۹۰۵ توسط استینگاس ارائه شد. بعد از او در سال ۱۹۱۱ ریچموند برای افزایش دقت این روش، استفاده از هیدرواکسید استرانتیوم را به جای سود برای تیتراسیون شیر پیشنهاد نمود و معتقد بود که با این کار دقت تیتراسیون ده درصد افزایش می‌یابد [۲].

پینی (۱۹۳۲) با تحقیقات خود نشان داد که نسبت بین میزان فسفات محلول و کلئوئیدی موجود در شیر در نتیجه آزمون تیتراسیون فرمل مؤثر هستند. او برای حذف اثر فسفات‌ها بر

$$\text{Protein \%} = (\text{ml NaOH} \times \text{normality} \times 9.04) - 0.14$$

آنها دقت این معادله را در تخمین مقدار پروتئین بستنی بیشتر از روش کراوهرست دانستند. اما ضریب همبستگی برای آن گزارش نکردند. همچنین آنها بیان کردند استفاده از ترکیبات دیگر از جمله کنسانتره پروتئین شیر در بستنی مانع از تخمین میزان MSNF بستنی از روی مقدار پروتئین آن می‌شود [۶].

به دلیل استفاده از ترکیبات متعدد از جمله پودر آب پنیر، پودر پرمیست و کنسانتره پروتئین شیر در ترکیب آمیخته بستنی، تعیین مقدار MSNF بستنی بر اساس مقدار پروتئین با خطای زیادی همراه خواهد بود. این مطلب را هیل و همکارش (۱۹۶۴) نیز بیان نموده اند [۶]. حتی پیپلس و همکارش (۱۹۷۹) بر اساس تفاضل نتایج مقدار پروتئین آمیخته بستنی اندازه‌گیری شده به روش تیتراسیون فرمل با روش کلدال معادله‌ای را برای تشخیص مقدار پودر آب پنیر در آمیخته بستنی ارائه نمودند [۷].

این تحقیق نشان داد که روش تیتراسیون فرمل روش قابل اعتمادی برای تخمین مقدار پروتئین بستنی نمی‌باشد و بر اساس مقدار پروتئین بستنی نمی‌توان مقدار MSNF آن را تعیین نمود. لذا پیشنهاد می‌شود در استاندارد ملی ۲۴۵۰ "درصد وزنی MSNF" از ویژگیهای بستنی شیری حذف و "حداقل مقدار پروتئین" بر اساس روش کلدال جایگزین آن گردد و حداقل قابل قبولی برای آن در نظر گرفته شود.

۵- منابع

- [1] Institute of Standards and Industrial Research of Iran (2008). Ice cream - Specifications and test methods. 2450, 5th. Revision.
- [2] Pyne, G.T. (1932). The determination of milk proteins by formaldehyde titration. *Biochem. Journal*, 26(4): 1006–1014.
- [3] Pyne, G. T. (1933). Note on the formaldehyde titration of milk-protein, and its application to the estimation of caseinogens. *Biochem. Journal*, 27(3): 915–917.

پروتئین‌ها به پروتئین‌های کوچکتر، پلی‌پپتیدها و پپتیدها می‌شوند و علی‌رغم اینکه مقدار پروتئین ثابت است، در نتیجه افزودن فرمالین اسید بیشتری تولید شده و مقدار پروتئین بطور کاذب بیشتر نشان داده می‌شود.

همانطور که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است حتی در حالتی که پروتئین بستنی با روش مرجع (کلدال) اندازه‌گیری شده ضریب همبستگی آن با مقدار MSNF نمونه ۰/۲۱ می‌باشد و این مقدار بسیار اندک ضریب همبستگی به هیچ وجه کافی برای تخمین مقدار MSNF بر اساس پروتئین نمی‌باشد. به علاوه در بررسی اینجانب روی نتیجه آزمایش بیش از دوست هزار نمونه شیر دریافتی یکی از کارخانه‌های فرآوری شیر در استان فارس، ضریب رگرسیون بین مقدار پروتئین شیرخام با MSNF آن ۰/۲۳ ($P < 0.001$) بود. هرچند که این یافته بیان می‌کند که ارتباط بسیار معنی‌داری بین مقدار پروتئین نمونه با MSNF آن وجود دارد ولی نمی‌توان بر اساس مقدار پروتئین نمونه، تخمین درستی از MSNF آن نمونه ارائه نمود (داده‌های چاپ نشده).

در سال ۱۹۵۶ کراوهرست برای اولین بار روش تیتراسیون فرمل را برای تخمین MSNF بستنی ارائه نمود. او ضریب فرمل را ۱/۷ و میزان پروتئین شیر خشک را ۳۰ درصد در نظر گرفت و در نهایت ضریب ۵/۶۷ را برای تعیین مقدار MSNF بستنی بر اساس تیتراسیون فرمل با سود ۰/۱ نرمال ارائه نمود [۵].

$$[(1/7 \times 100) \div 30 = 5/67]$$

بعد از او هیل و همکارش (۱۹۶۴) به دلیل وجود ترکیبات دیگر در شیر و تاثیر آنها روی نتایج آزمایش، به منظور اندازه‌گیری مقدار پروتئین بستنی مجدداً روش کراوهرست را با تغییراتی شامل دو برابر کردن حجم نمونه، افزودن اگزالات پتاسیم به نمونه قبل از افزودن فرمالین به آن و انجام تیتراسیون تا pH ۸/۵ (استفاده از pH متر به جای معرف فنل فتالین) انجام دادند و نتایج را با روش کلدال مقایسه نمودند و ضریب جدیدی (معادله رگرسیون) را برای تخمین مقدار پروتئین بستنی ارائه نمودند.

- [6] Hill, R.L. and Stone, W.K. (1964). Procedure for determination of protein in ice milk and ice cream by formol titration. *Journal of Dairy Science*, 47 (9): 1014-1016.
- [7] Peeples, M.L. and Heath, G.L. (1979). Use of protein-formol titration relationships for estimating ratios of skim milk and whey solids in frozen dairy desserts. *Journal of Food Science*, 44 (2), 558-559.
- [4] Castillo, L.S.; Trimberger, G.W.; Henderson, C.R.; Herrington, B.L. and Turk, K.L. (1962). Comparison of orange G dye, formol titration, and kjeldahl methods for milk protein determinations. *Journal of Dairy Science*, 45 (9): 1079-1082.
- [5] Crowhurst, B. (1956). The determination of milk solid-not-fat in ice-cream. *Analyst*, 81: 123-124.

Efficacy of formol titration test for estimating the milk solid non fat in ice cream

Shekarforoush, S. S. ^{1*}, Abhari, K. ²

1. Professor, Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University
 2. Ph.D. Student, Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University
- (Received: 89/12/23 Accepted: 90/8/3)

The present study was established to evaluate the efficacy of formol titration test in detecting the protein and milk solid non fat (MSNF) values in ice cream. A total of 41 ice cream samples and constituents such as fresh milk, skim milk powder and whey powder were tested. The dry matter, fat, ash, total proteins, sugars and MSNF (by calculations) of the samples were measured. The MSNF were also measured by formol titration method. Regression coefficient between total proteins of ice cream, measured by Kjeldal and formol titration was 0.07 ($p>0.6$). This value was 0.11 ($p>0.5$) between true MSNF and measured by formol titration. Our results revealed that the formol titration test was not a valid procedure to estimate the protein values of ice cream, and we were not been able to assess the MSNF values based on the measurement of proteins using formol titration and also Kjeldal method. As a final result, we propose the replacement of “percent of total MSNF” by “the lowest values of total proteins” in the number 2450 rule, of the Iranian national standard regulations.

Keyword: Ice-cream, Formol titration, Milk solid non fat

* Corresponding Author E-Mail Address: shekar@shirazu.ac.ir