

# تأثیر تیماردهی شیر خام خنک با CO<sub>2</sub> بر پروتئولیز، لیپولیز و ویژگیهای حسی شیر خام

آزاده سلیمانی وفا<sup>۱</sup>، جواد حصاری<sup>۲\*</sup>، عادل احمدی زنوز<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۸۶/۷/۲ تاریخ پذیرش: ۸۷/۲/۲۵

## چکیده

اثرات تیماردهی شیر خام خنک توسط CO<sub>2</sub> بر روی پروتئولیز و لیپولیز شیر مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۴ تیمار بر روی شیر خام (شیر خام بدون استفاده از CO<sub>2</sub> (نمونه شاهد) و شیر خام با استفاده از تزریق CO<sub>2</sub> تا مقادیر pH های برابر ۶/۴، ۶/۲ و ۶) اعمال شد. نمونه‌های شیر خام برای مدت ۱۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در روزهای ۱، ۵، ۸ و ۱۰ روند پروتئولیز و لیپولیز مورد ارزیابی قرار گرفت. طرح آماری مورد استفاده در این تحقیق طرح اسپلیت پلات در زمان با طرح پایه بلوکهای کامل تصادفی در سه تکرار (در سه روز مختلف بعنوان بلوک) بود. نتایج حاصل از بررسی واکنش‌های پروتئولیز و لیپولیز بیانگر تأثیر مثبت CO<sub>2</sub> در کاهش آنها در شیر خام سرد شده بود و افزایش در غلظت CO<sub>2</sub> با کاهش بیشتر در پروتئولیز و لیپولیز طی نگهداری همراه بود. ارزیابی حسی نمونه‌ها بیانگر عدم تأثیر CO<sub>2</sub> بر روی خصوصیات ارگانولپتیکی شیر خام سرد شده بود. در این پژوهش بهترین تیمار انتخاب شده استفاده از CO<sub>2</sub> تا pH = ۶ بود که البته در اکثر موارد اختلاف آن با شیر تیماردهی شده تا pH = ۶/۲ غیر معنی دار بود.

واژه‌های کلیدی: دی‌اکسیدکربن، شیر خام، نگهداری، پروتئولیز، لیپولیز

## مقدمه

تغییر توازن میکروبی به نفع باکتریهای سرماگرا که تحت این شرایط به خوبی رشد و تکثیر می‌کنند می‌گردد (۶). مطالعات قبلی نشان داده است که باکتریهای سرماگرا فلور غالب شیر نگهداری شده در دماهای پایین را تشکیل می‌دهند (۵، ۱۱ و ۱۴). به علت خاصیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی اغلب باکتریهای سرماگرا، شیر حتی در صورت نگهداری در دمای نسبتاً پایین به راحتی فاسد می‌شود (۶). با وجود اینکه سرماگراها در اثر تیمارهای حرارتی متداول شیر از بین می‌روند اما این ارگانوسمها قادر به تولید آنزیمهای برون سلولی (پروتئیناز و لیپاز) هستند که به طور کامل توسط تیمارهای حرارتی غیر فعال نمی‌شوند. این آنزیمها

تولید شیر در شرایط بهداشتی و سرد کردن آن به میزان کافی طی مدت نگهداری از اهمیت بالایی برخوردار است (۶). صنایع شیر به استفاده از دماهای پایین برای حفظ کیفیت شیر خام طی نگهداری و حمل و نقل تکیه دارد (۱۹). در عین حال نگهداری شیر در درجه حرارت پایین باعث

Email: Jhesari@tabrizu.ac.ir

\*نویسنده مسئول مکاتبات

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۲. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۳. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

معضلات اساسی صنایع شیر می باشد، بر این اساس مطالعات زیادی در راستای جستجوی روش مناسب برای کنترل و مهار باکتریهای سرماگرا صورت گرفته است (۳). در سالهای اخیر استفاده از سرما به همراه  $CO_2$  نتایج مثبتی را در نگهداری شیر و جلوگیری از رشد باکتریهای سرماگرا و نتیجتاً حفظ کیفیت شیر از خود نشان داده است (۱۹، ۲۰، ۲۱ و ۲۲). لذا بررسی تأثیر  $CO_2$  در شیر خام سرد شده بر روی ویژگی های کیفی شیر هدف اصلی این پروژه را تشکیل می دهد.

### مواد و روشها

#### مواد اولیه

جهت انجام این تحقیق شیر خام تازه دوشیده شده که بلافاصله تا دمای ۴ درجه سانتی گراد سرد شده بود از واحد گاوداری ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز در ۳ روز مختلف و هر بار به میزان تقریباً ۵ کیلوگرم دریافت شد.

#### روشها

شیر خام دریافت شده در کارگاه لینیات ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی در ۱۶ بطری پلاستیکی به حجم ۲۵۰ میلی لیتر در شرایط کاملاً بهداشتی با فضای خالی تقریباً ۷ درصد توزیع شد، و با دربهای پلاستیکی مخصوص دربندی گردید، بطوریکه امکان نشت گاز وجود نداشته باشد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

جهت انجام آزمایشات لازم در این طرح ۴ تیمار بر روی شیر خام اعمال شد و کلیه آزمایشات با ۳ تکرار انجام گردید. تیمارهای مورد استفاده شامل شیر خام سرد شده

قادر به تجزیه ترکیبات مختلف شیر هستند که روی ماندگاری شیر فرایند شده بوسیله حرارت تأثیر می گذارند و بالطبع روی کیفیت محصولات لبنی مؤثر هستند (۵، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴). فعالیتهای پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی باکتریهای سرماگرا زمانی می توانند قابل ملاحظه و مؤثر باشند که شمارش این باکتریها از  $10^6$  تا  $10^7$  (cfu/ml) تجاوز کند (۱۰).

خصوصیات حسی شیر از قبیل طعم همانند خواص تغذیه ای آن در بازار پسندی نقش دارند، ایجاد طعم های نامطلوب در نتیجه پروتئولیز و لیپولیز دوره ماندگاری و کیفیت شیر پاستوریزه را کاهش می دهد (۲۳). افزایش شدت پروتئولیز از طریق کاهش میزان پروتئین ها ارزش اقتصادی شیر و راندمان تولید پنیر را کاهش می دهد و با تجمع پپتیدهای کوچک باعث تلخی فرآورده های لبنی می گردد. از نتایج عملکرد پروتئازها، طعم و آرومای نامطبوع در شیر، تشکیل دلمه ناچیز یا عدم تشکیل آن در تولید پنیر و زله ای شدن شیر UHT می باشد. کاهش نسبت کازئین به پروتئین کل حتی به میزان ۱ تا ۲٪ می تواند اثرات اقتصادی مهمی داشته باشد، به طوریکه آسیب آنزیمی کازئین مستقیماً در کاهش بازده پنیر منعکس می شود (۱۹). افزایش مقادیر زیادی از اسیدهای چرب آزاد در نتیجه لیپولیز طی مدت زمان بسیار کوتاهی منجر به تند (رنسیدیتی) شیر می شود. طعم حاصل به سهولت به فرآورده های مختلف شیر، نظیر کره و پنیر منتقل می گردد و آنها را غیر قابل قبول می سازد (۶ و ۱۰).

با توجه به اینکه انواع تقلبات به منظور سرپوش نهادن بر کیفیت نامناسب بهداشتی شیر در کشور رایج است، لزوم استفاده از روشهای سالم و مجاز جهت حفظ کیفیت شیر بیش از پیش احساس می شود. از آنجائیکه در کشور ما نگهداری شیر در دامداریها و ارسال آن به مراکز صنعتی از

ژل الکتروفورز در حضور اوره (Urea-PAGE) (۹ و ۲۴) استفاده بعمل آمد.

برای ارزیابی لیپولیز نمونه های شیر خام از اندیس اسیدیته مطابق روش علیزاده (۴) استفاده شد. برای این کار محتوی اسید های چرب آزاد اندازه گیری شدند و مقدار کل اسیدهای چرب با واحد میلی اکسی والان در ۱۰۰ گرم چربی محاسبه گردید. افزایش اسیدهای چرب آزاد به عنوان شاخصی برای لیپولیز استفاده شد (۴).

سایر آزمایشات شیمیایی شامل، اندازه گیری pH (۸)، اسیدیته (۸) و ماده خشک (۷) بودند.

#### ارزیابی حسی

آزمون مورد استفاده جهت ارزیابی حسی نمونه ها در این طرح، آزمون هدونیک پنج نقطه ای بود. جهت مقایسه و ارزیابی ویژگیهای حسی نمونه شیر شاهد (پس از فرایند حرارتی پاستوریزاسیون) و نمونه های فرایند شده با CO<sub>2</sub> (پس از فرایند حرارتی پاستوریزاسیون و خارج کردن گاز با همزدن ملایم در فشار اتمسفر) نمونه های شیر در روزهای ۱ و ۵ در اختیار هفت عضو پانل ارزیابی حسی (ارزیاب ها) تعلیم ندیده بودند اما به خوبی توانایی درک و تفاوت بین حدود دوست داشتن را داشتند (قرار گرفتند (۱)).

#### طرح آماری

برای ارزیابی تأثیر CO<sub>2</sub> و اثر زمانهای مختلف بر روی صفات مورد مطالعه از طرح اسپلیت پلات در زمان با طرح پایه بلوکهای کامل تصادفی<sup>۳</sup> در سه تکرار (در سه روز مختلف بعنوان بلوک) استفاده گردید. در این طرح فاکتور اصلی ۴ سطح مختلف CO<sub>2</sub> و فاکتور فرعی شامل ۴ زمان نمونه برداری بود، تأثیر این دو فاکتور به ترتیب تحت اسامی

بدون استفاده از CO<sub>2</sub> (نمونه شاهد) و شیر خام سرد شده با استفاده از CO<sub>2</sub> تا سطوح pH ۶/۴، ۶/۲ و ۶ بودند. جهت تزریق CO<sub>2</sub> از یک کیپسول حاوی CO<sub>2</sub> (نوع خوراکی) و مجهز به رگلاتور جهت کنترل فشار استفاده شده است. با ابزار مناسب استریل شده، تحت شرایط کاملاً بهداشتی تزریق CO<sub>2</sub> داخل بطریها تا pH مورد نظر انجام گرفت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد و در هر ۲۴ ساعت ضمن اندازه گیری pH، در صورت مشاهده افزایش pH در نمونه های تیمار شده با CO<sub>2</sub> با تزریق مجدد CO<sub>2</sub> تا pH سطح قبلی تنظیم گردید. نمونه ها برای مدت ۱۰ روز در این دما نگهداری شدند و در روزهای اول (روز دریافت شیر)، ۵، ۸ و ۱۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای هر تیمار ۴ بطری در نظر گرفته شد و در هر روز از ارزیابی یک بطری از هر تیمار جهت انجام کلیه این آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

#### ارزیابی شیمیایی

جهت ارزیابی پروتئولیز نمونه های شیر خام طی نگهداری از ازت کل، ازت غیر کازئینی و ازت غیر پروتئینی مطابق روش ماکروکجلدال (۲، ۵ و ۱۵) استفاده شد. برای این کار آماده سازی نمونه جهت اندازه گیری ازت محلول در pH=۴/۶ (ازت غیر کازئینی یا NCN)<sup>۱</sup> (۱۶) و ازت محلول در تری کلرو استیک اسید (ازت غیر پروتئینی یا NPN)<sup>۲</sup> (۴) انجام گرفت. کاهش در نسبت کازئین به پروتئین کل و افزایش در نسبت ازت غیر پروتئینی به ازت کل در شیر طی دوره نگهداری به عنوان شاخصی برای پروتئولیز استفاده شد (۱۹ و ۲۳). همچنین برای بررسی هیدرولیز کازئینها در نمونه های شیر خام از پلی آکریل آمید

1. NCN = Non Casein Nitrogen

2. NPN = Non Protein Nitrogen

تأثیر تیمارهای CO<sub>2</sub> بر pH و اسیدیته طی نگهداری متفاوت بوده است (جدول ۱).

کینگ و مایست (به نقل از منبع شماره ۱۷) و ما و همکاران (۱۷) در مطالعات خود در مورد استفاده از CO<sub>2</sub> در افزایش ماندگاری شیر دریافتند که با افزودن CO<sub>2</sub> به شیر pH کاهش و اسیدیته افزایش می‌یابد. این محققین ارتباط بین غلظت CO<sub>2</sub> و pH شیر را به عنوان معیاری جهت تعیین سطح CO<sub>2</sub> در شیر مطرح نمودند. آمیگو و همکاران (به نقل از منبع شماره ۲۰) در بررسی‌های خود روی تأثیر CO<sub>2</sub> در افزایش ماندگاری شیر با تنظیم pH شیر توسط CO<sub>2</sub> در ۶ و ۶/۲ در فاصله‌های زمانی ۲۴ ساعت گزارش نمودند که به طور قابل توجهی اثر بازدارندگی این گاز با تنظیم مرتب pH بهبود می‌یابد، در این کار پژوهشی نیز همانطوریکه قبلاً اشاره شده است تنظیم pH در هر ۲۴ ساعت انجام گرفته بود.

فاکتور A (A<sub>1</sub>) به نمونه شاهد، A<sub>2</sub>، A<sub>3</sub> و A<sub>4</sub> به ترتیب به نمونه‌های تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH های ۶/۴، ۶/۲ و ۶ اطلاق گردید) و فاکتور B (B<sub>1</sub>) به روز اول، B<sub>2</sub> به روز پنجم، B<sub>3</sub> به روز هشتم و B<sub>4</sub> به روز دهم اطلاق شد) بر روی پارامترهای مهم کیفی شیر مورد بررسی قرار گرفته است. مقایسه میانگین‌های مورد نیاز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. برای تجزیه داده‌ها و رسم نمودارها از نرم افزارهای کامپیوتری MSTAT-C، MINITAB و EXCEL استفاده شد.

### ۳- نتایج و بحث

#### ارزیابی شیمیایی

#### pH و اسیدیته قابل تیتراسیون

تجزیه واریانس pH و اسیدیته نمونه‌های شیر شاهد و فرایند شده با CO<sub>2</sub> نشان داد که اثر متقابل سطوح مختلف تیمارهای CO<sub>2</sub> و زمان‌های نمونه برداری تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱٪ داشت، به عبارت دیگر

جدول ۱- تجزیه واریانس pH، اسیدیته، پروتئولیز و لیپولیز در نمونه شیر شاهد و نمونه‌های تیمار شده با CO<sub>2</sub>

میانگین مربعات شاخص‌های اندازه‌گیری شده

لیپولیز	٪ (ازت غیر پروتئینی به ازت کل)	٪ (کازئین به پروتئین کل)	اسیدیته	pH	درجه آزادی	منابع تغییرات
۰/۰۰۳ ns	۰/۰۱۴ ns	۰/۰۰۰۴ ns	۱/۷۵ ns	۰/۰۰۳ ns	۲	بلوک
۰/۰۹۴ ns	۳/۱۸۱ **	۰/۰۰۵ ns	۵۸/۰۳ ns	۰/۲۰۱ **	۳	سطوح CO <sub>2</sub>
۰/۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰۳	۱/۱۹	۰/۰۰۲	۶	خطای ۱
۱/۱۴۹ **	۱۶/۳۰۳ **	۰/۰۲۱ **	۲۵۶۱/۵۸ **	۰/۲۸۳ **	۳	زمان نمونه برداری
۰/۰۲۵ **	۰/۹۵۲ **	۰/۰۰۲ **	۱۲۳/۸۲ **	۰/۰۴۳ **	۹	سطوح CO <sub>2</sub> × زمان نمونه برداری
۰/۰۱ **	۰/۰۲۹ ns	۰/۰۰۰۲ ns	۱/۷۵ ns	۰/۰۰۳ ns	۶	بلوک × زمان نمونه برداری
۰/۰۰۱	۰/۰۲	۱/۰۰۱	۱/۰۵	۰/۰۰۱	۱۸	خطای ۲
۶/۱۷	۲/۵۱	۰/۷۰	۳/۳۴	۰/۶۳		C.V. (درصد)

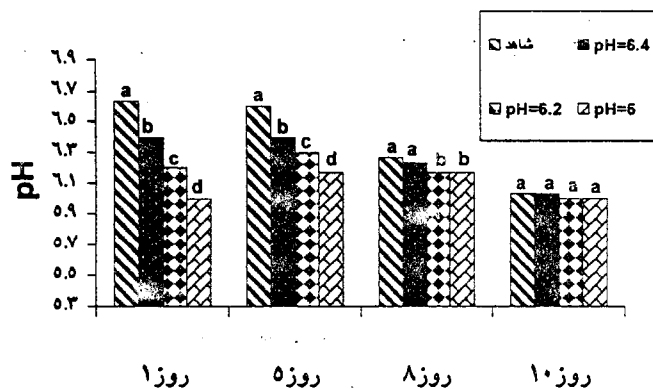
: معنی دار در سطح احتمال ۱٪، \*\*، غیر معنی دار ns.

است. در پنج روز اول نگهداری اختلاف معنی داری بین میانگین pH کلیه تیمارها وجود داشت. در روز ۸ pH

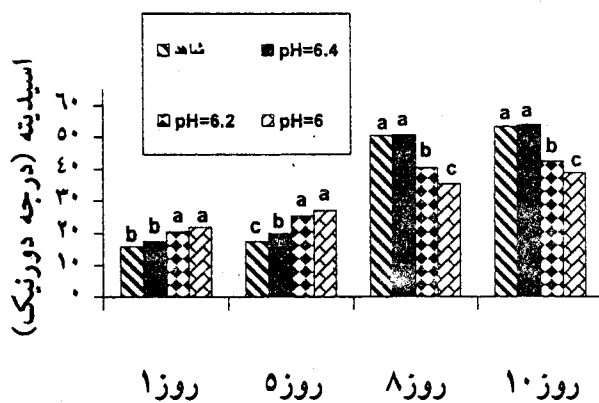
نتایج حاصل از مقایسه میانگین pH و اسیدیته برای مقادیر مختلف CO<sub>2</sub> در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده

نگهداری است. در واقع با گذشت زمان به دلیل کنترل رشد باکتریها بواسطه افزودن CO<sub>2</sub> تا pH برابر ۶ و ۶/۲، اسیدیته در سطح پایین باقی می ماند. در حالیکه در نمونه شیرشاهد و نمونه تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH = ۶/۴ در اثر فعالیت میکروارگانیزم ها و تخمیر لاکتوز، اسیدیته افزایش چشمگیری نشان داده است.

نمونه های تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH برابر ۶ و ۶/۲ اختلاف معنی داری با نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH = ۶/۴ داشت و در روز ۱۰ اختلاف بین نمونه ها غیر معنی دار بود. شکل ۲ بیانگر اختلاف معنی دار بین اسیدیته نمونه های تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH برابر ۶ و ۶/۲ با اسیدیته نمونه شیر شاهد و نمونه حاوی CO<sub>2</sub> تا pH = ۶/۴ طی روزهای



شکل ۱- مقایسه میانگین pH برای سطوح A (مقادیر مختلف CO<sub>2</sub>) در سطوح مختلف B (زمان های نمونه برداری) در نمونه های شیر آزمایشی



شکل ۲- مقایسه میانگین اسیدیته برای سطوح A (مقادیر مختلف CO<sub>2</sub>) در سطوح مختلف B (زمان های نمونه برداری) در نمونه های شیر آزمایشی

CO<sub>2</sub> تا pH برابر ۶/۴ و ۶/۲ به ترتیب در حدود ۰/۴ و ۰/۲ واحد افت کردند در حالیکه pH در نمونه شیر تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH = ۶ به مقدار اولیه برگشت. در مطالعه ای که توسط راثوس مادیدو و همکاران (۲۰) انجام شد، اسیدیته و pH در شیر شاهد تا روز سوم نگهداری ثابت ماند و در روز

pH نمونه شاهد و نمونه حاوی CO<sub>2</sub> تا pH = ۶/۴ در ۵ روز اول نگهداری تقریباً ثابت بودند، در حالیکه pH نمونه های تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH برابر ۶ و ۶/۲ در طی این ۵ روز افزایش یافت. پس از ۱۰ روز نگهداری در دمای ۴ °C pH نمونه شیر شاهد ۰/۶ واحد و نمونه های حاوی

**پروتئولیز**

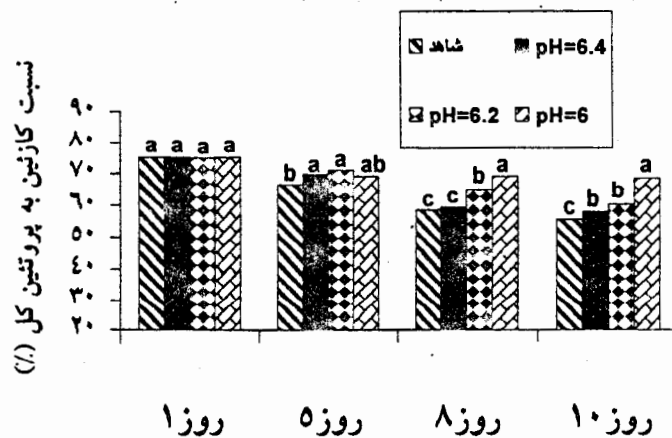
بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشخص شد که اثر متقابل بین تیمارهای CO<sub>2</sub> و زمان های نمونه برداری در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود که علت آن را می توان به تأثیر متفاوت تیمارهای CO<sub>2</sub> بر واکنش پروتئولیز در زمانهای مختلف نمونه برداری نسبت داد (جدول ۱).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین پروتئولیز برای مقادیر مختلف CO<sub>2</sub> در شکل های ۳ و ۴ آمده است.

نتایج شکل ۳ نشان می دهد که در روز ۸ نگهداری، بین نمونه شیر شاهد و نمونه تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH = ۶/۴ با نمونه های تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH ۶/۲ و ۶ از لحاظ نسبت کازئین به پروتئین کل اختلاف معنی داری وجود داشت. همچنین در روز ۱۰ نگهداری نمونه تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH = ۶ اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشت. از روز ۵ تا ۱۰ نگهداری، در کلیه تیمارها کاهش قابل توجهی در نسبت کازئین به پروتئین کل اتفاق افتاد، در حالیکه برای نمونه تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH = ۶ پروتئولیز قابل توجهی مشاهده نگردید.

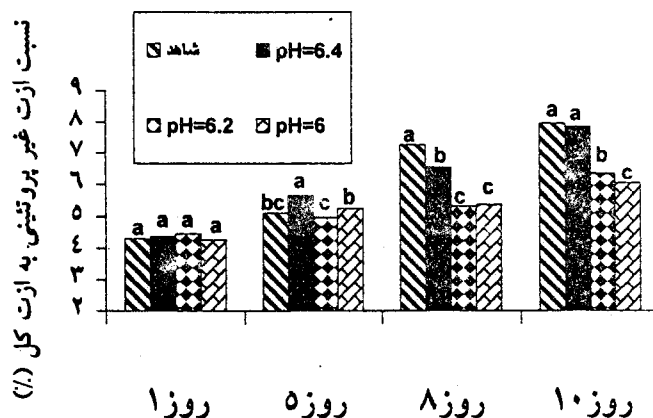
۴ ام pH کاهش یافت در حالیکه در شیر تیمار شده با CO<sub>2</sub>، pH ثابت گزارش گردید. در مطالعات ما و همکاران (۱۸) نیز pH در شیرهای تیمار شده با CO<sub>2</sub> در ۷ روز اول نگهداری افزایش یافت و از روز ۷ تا ۲۱ ثابت ماند و در نمونه شاهد کاهش از خود نشان داد. آنها گزارش کردند که طی نگهداری یک کاهش در حال پیشرفت در غلظت CO<sub>2</sub> در نمونه های تیمار شده با CO<sub>2</sub> مشاهده می شود که میزان آن طی زمان در کلیه تیمارها مشابه است.

با حذف CO<sub>2</sub> در شیرهای تیمار شده با آن، در اثر هم زدن (در فشار اتمسفر)، افزایش در pH و کاهش در اسیدیته نمونه ها مشاهده شد، اما این پارامترها به مقادیر اولیه برنگشتند. راتوس مادیدو و همکاران (۱۸ و ۱۹) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند، بطوریکه این محققان گزارش نموده اند با وجود اینکه حذف گاز باعث افزایش در pH و کاهش در اسیدیته نمونه های شیر می گردد اما مقادیر pH و اسیدیته نمونه های تیمار شده با CO<sub>2</sub> بعد از خروج گاز به ترتیب پایین تر و بالاتر از نمونه شاهد باقی می ماند، که آنرا با خارج نشدن کامل CO<sub>2</sub> یا ایجاد تغییرات در تعادل املاح شیر مرتبط دانسته اند.



شکل ۳- مقایسه میانگین درصد نسبت مقدار کازئین به پروتئین کل برای سطوح A (مقادیر مختلف CO<sub>2</sub>) در سطوح مختلف B (زمان) های نمونه برداری در نمونه های شیر آزمایشی

های برابر ۶ و ۶/۲ از لحاظ عامل مزبور مشاهده می شود بطوریکه با افزایش غلظت CO<sub>2</sub> نسبت ازت غیر پروتئینی به ازت کل در سطح پایین تری حفظ شد. این نتایج بیانگر تأثیر قابل توجه تیمارهای اخیر در کاهش پروتئولیز در طی دوره نگهداری است. ما و همکاران (۱۷) در تحقیقاتشان طی ۱۴ روز نگهداری شاهد توسعه طعم های نامطلوب حاصل از افزایش پروتئولیز در نمونه شیر شاهد بودند در حالیکه پروتئولیز با افزودن CO<sub>2</sub> ۱۵۰۰ ppm به دلیل بازداری از رشد باکتریهای تولید کننده آنزیم های پروتئولیتیک به طور معنی داری کنترل شد.



شکل ۴- مقایسه میانگین درصد نسبت مقدار ازت غیر پروتئینی به ازت کل برای سطوح A (مقادیر مختلف CO<sub>2</sub>) در سطوح مختلف B (زمان های نمونه برداری) در نمونه های شیر آزمایشی

پروتئین کل به طور معنی داری از ۷۹/۸ در روز اول به ۷۷/۵ درصد در روز ۲۱ کاهش یافت. در نهایت این محققان چنین نتیجه گرفتند که CO<sub>2</sub> ۱۵۰۰ ppm به طور معنی داری پروتئولیز را در هر دوی نمونه های شیر با شمارش یاخته های پیکری بالا و پایین کاهش داده است که احتمالاً به دلیل بازداری از رشد باکتریهای تولید کننده آنزیم های پروتئولیتیک است.

همانطور که در نتایج حاصل از این پژوهش ملاحظه گردید با افزایش غلظت CO<sub>2</sub> پروتئولیز کمتری مشاهده

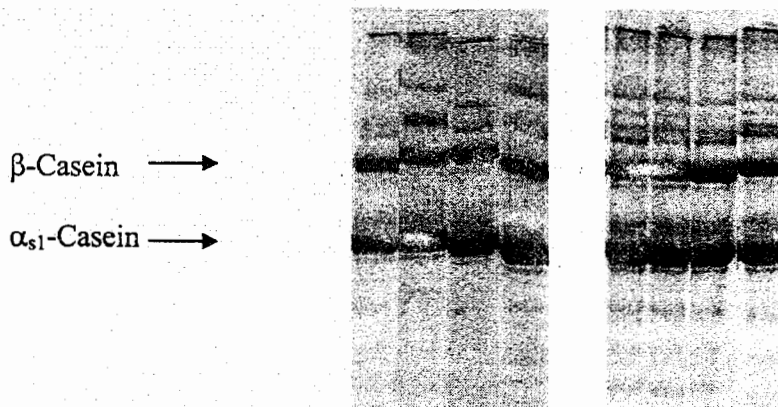
همانطوریکه شکل ۴ نشان می دهد از روز ۵ تا ۱۰ نگهداری، در نمونه شیر شاهد و نمونه فرایند شده با CO<sub>2</sub> تا pH=۶/۴ افزایش قابل ملاحظه ای در ازت غیر پروتئینی مشاهده شد در حالیکه در نمونه های فرایند شده با CO<sub>2</sub> تا pH های برابر ۶ و ۶/۲ پروتئولیز به مراتب کمتر بود. در روز ۸ نگهداری بین نمونه شیر شاهد و نمونه های تیمار شده با CO<sub>2</sub> از لحاظ نسبت ازت غیر پروتئینی به ازت کل اختلاف معنی داری وجود داشت (شکل ۴)، همچنین در روز ۱۰ اختلاف معنی داری بین نمونه شیر شاهد و نمونه تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH=۶/۴ با نمونه های تیمار شده با CO<sub>2</sub> تا pH

ما و همکاران (۱۹) در مطالعات خود گزارش کردند که در نمونه شیر شاهد با شمارش یاخته های پیکری پایین نسبت کازئین به پروتئین کل از ۸۲ درصد در روز اول به ۶۶ درصد در روز ۲۱م کاهش یافت و در شیر حاوی ppm ۱۵۰۰ CO<sub>2</sub> (pH = ۶/۲) پروتئولیز قابل توجهی در طی دوره نگهداری مشاهده نشد و نسبت کازئین به پروتئین کل در ۸۲ درصد حفظ شد. در نمونه شاهد با شمارش یاخته های پیکری بالا نیز پروتئولیز قابل توجهی اتفاق افتاد، در حالیکه در شیرهای حاوی ppm ۱۵۰۰ CO<sub>2</sub> نسبت کازئین به

به پروتئولیز را تأیید می‌کنند. همانطور که در شکل ۵ مشخص شده است، پروتئین‌های  $\alpha_{S1}$  کازئین و  $\beta$  کازئین تحت تاثیر قرار گرفتند و هیدرولیز شدند، که در نتیجه پروتئولیز شدیدتر در نمونه شیر شاهد و نمونه تیمار شده با  $CO_2$  تا  $pH=6/4$  (در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده با  $CO_2$  تا  $pH$ ‌های برابر ۶ و ۶/۲) در روزهای ۸ و ۱۰ نگهداری، تجزیه وسیع‌تر این پروتئین‌ها مشاهده می‌گردد. راتوس مادیدو و همکاران (۲۰) در نتایج خود در خصوص نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه‌های شیر خام شاهد و تیمار شده با  $CO_2$  تا  $pH$  برابر ۶ و ۶/۲ پس از ۴ روز نگهداری در دمای  $4^\circ C$  گزارش دادند که هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود ندارد.

شده است. ولی در نتایج ما و همکاران (۱۹) سطوح پروتئولیز در نمونه‌های شیر با شمارش یاخته‌های پیکری متفاوت بالا و پایین با استفاده از سطوح مختلف  $CO_2$  شامل ۵۰۰ ppm ( $pH=6/5$ )، ۱۰۰۰ ( $pH=6/3$ ) و ۱۵۰۰ ( $pH=6/2$ ) مشابه یکدیگر و همگی کمتر از نمونه شاهد گزارش گردیده است، این پژوهشگران از آزمایشات خود چنین نتیجه گرفتند که با افزایش غلظت  $CO_2$  و یا کاهش بیشتر  $pH$  پروتئولیز کمتری اتفاق نیافتاده است.

شکل ۵ الکتروفورگرام نمونه‌های مختلف شیر را از روز ۸ تا ۱۰ نگهداری نشان می‌دهد (در روزهای ۱ و ۵ نگهداری اختلافی بین نمونه‌های مختلف شیر مشاهده نشده است). الکتروفورگرام‌ها نتایج حاصل از آزمایشات مربوط



8765 4321

شکل ۵- الکتروفورگرام نمونه‌های شیر از روز ۸ تا ۱۰ نگهداری

بود. بنا بر نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشخص شد که اثر متقابل تیمارهای  $CO_2$  و زمان‌های نمونه برداری در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود که بیانگر تأثیر متفاوت تیمارهای  $CO_2$  بر واکنش لیپولیز طی نگهداری است.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین لیپولیز برای مقادیر مختلف  $CO_2$  در شکل ۶ نشان داده شده است. همانطور که از نتایج شکل برمی‌آید در ۵ روز اول نگهداری اختلاف

باند ۱ و ۲ به ترتیب: نمونه شاهد در روزهای ۸ و ۱۰  
باند ۳ و ۴ به ترتیب:  $pH=6/4$  در روزهای ۸ و ۱۰  
باند ۵ و ۶ به ترتیب:  $pH=6/2$  در روزهای ۸ و ۱۰  
باند ۷ و ۸ به ترتیب:  $pH=6$  در روزهای ۸ و ۱۰

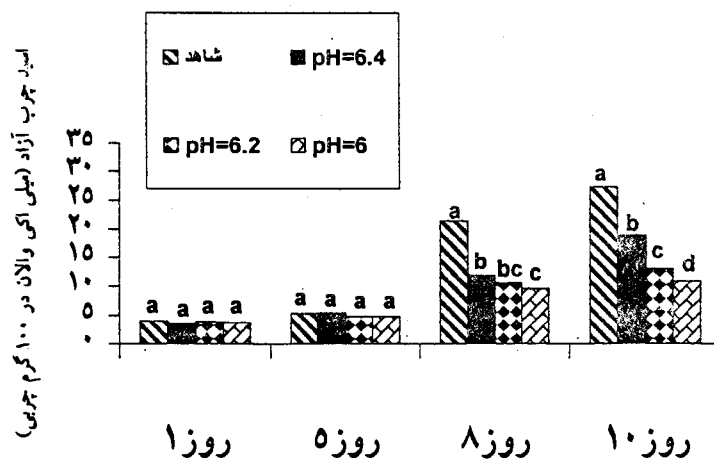
#### لیپولیز

لازم به توضیح است که میانگین مقدار چربی نمونه‌های شیر خام شاهد و تیمار شده با  $CO_2$  در حدود ۳/۴۱ درصد



همکاران (۱۷) در نمونه شاهد با شمارش یاخته های پیکری بالا و پایین افزایش معنی داری در غلظت اسیدهای چرب آزاد بین روزهای ۱۴ و ۲۱ نگهداری مشاهده شده است، اما با افزودن CO<sub>2</sub> ۱۵۰۰ ppm (pH = ۶/۲) به شیر سطح اسیدهای چرب آزاد طی ۲۱ روز نگهداری پایین باقی ماند. آنها گزارش دادند که افزودن CO<sub>2</sub> ۱۵۰۰ ppm به شیر خام لیپولیز را طی ۲۱ روز نگهداری به تأخیر انداخته است.

بین تیمارها غیر معنی دار بود، در روز ۸ نگهداری نمونه های تیمار شده با CO<sub>2</sub> اختلاف معنی داری با نمونه شیر شاهد داشتند و در روز ۱۰ نگهداری اختلاف معنی داری بین کلیه تیمارها مشاهده می شود که این نتایج را می توان به تأثیر قابل ملاحظه CO<sub>2</sub> در کاهش لیپولیز طی دوره نگهداری نسبت داد که با افزایش غلظت آن سطح اسیدهای چرب آزاد تولید شده پایین تر باقی مانده است. در نتایج ما و



شکل ۶- مقایسه میانگین لیپولیز برای سطوح A (مقادیر مختلف CO<sub>2</sub>) در سطوح مختلف B (زمان های نمونه برداری) در نمونه های شیر آزمایشی

### نتیجه گیری

نتایج حاصل از بررسی تأثیر CO<sub>2</sub> بر روی خواص کیفی شیر خام در این کار پژوهشی حاکی از آن است که کاربرد CO<sub>2</sub> تأثیر مثبتی در خواص کیفی شیر خام سرد شده دارد بطوریکه با افزودن CO<sub>2</sub> تا pH های ۶ و ۶/۲ به شیر خام، اسیدیته در سطح پایین تری باقی ماند. نتایج حاصل از بررسی واکنش پروتئولیز بیانگر تأثیر مثبت CO<sub>2</sub> در کاهش واکنش های پروتئولیز شیر خام سرد شده است و افزایش در غلظت آن با کاهش بیشتر در پروتئولیز طی نگهداری همراه بود. همچنین افزودن CO<sub>2</sub> به شیر خام سرد شده منجر به کاهش قابل ملاحظه واکنش های لیپولیز گردید و طی نگهداری بین نمونه شیر شاهد و نمونه های تیمار شده با

### ارزیابی حسی

داده های حاصل از آزمون حسی را به مقیاس های کمی قابل سنجش تبدیل نموده و پس از طبقه بندی داده ها، تجزیه آماری صورت گرفت و نتایج نشان داد که با تزریق CO<sub>2</sub> به شیر خام تغییری در خصوصیات حسی شیر ایجاد نمی شود. راثوس مادیدو و همکاران (۲۰) در تحقیقات خود تفاوت قابل ملاحظه ای در خصوصیات حسی نمونه های تیمار شده با CO<sub>2</sub> و نمونه شیر شاهد گزارش ندادند و در نهایت چنین نتیجه گرفتند که تیماردهی شیر خام با CO<sub>2</sub> با حداقل اثرات منفی بر روی ویژگیهای حسی و بیوشیمیایی شیر همراه است.

کاهش واکنش‌های پروتئولیز و لیپولیز در پی دارد، به عنوان روش مناسبی جهت بهبود کیفیت شیر خام سرد شده قابل توصیه است و امید است با ادامه تحقیقات در راستای کاربرد  $CO_2$  تحت فشار در حجم‌های وسیع‌تر و در مقیاس‌های صنعتی و پس از تکمیل مطالعات در این زمینه، استفاده از  $CO_2$  روش مناسبی برای صنایع شیر کشورمان باشد.

$CO_2$  اختلاف معنی‌داری مشاهده شد که با افزایش درغلظت  $CO_2$  سطح اسیدهای چرب آزاد تولید شده پایین‌تر باقی‌ماند. کاربرد  $CO_2$  در شیر خام سرد شده، خصوصیات حسی و ارگانولپتیکی آن را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد و هیچ تفاوت معنی‌داری بین خصوصیات حسی نمونه شیر شاهد و نمونه‌های تیمار شده با  $CO_2$  مشاهده نشد. با توجه به آثار مثبت و مزایایی که استفاده از  $CO_2$  با

### فهرست منابع

۱. پایان، ر. ۱۳۸۲. مبانی کنترل کیفیت در صنایع غذایی. ویرایش سوم. نشر آریژ.
۲. حسینی، ز. ۱۳۶۹. روش‌های متداول در تجزیه مواد غذایی. انتشارات دانشگاه شیراز.
۳. عزتی، ر. ۱۳۸۲. بررسی تأثیر تعداد باکتری‌های سرماگرا روی خواص فیزیکی، شیمیایی و بازده پنیر سفید سنتی و اولترافیلتراسیون. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۴. علیزاده، م. ۱۳۷۹. مقایسه مایه پنیر تولید شده از ماکور می‌هی با مایه پنیر حیوانی و مایه پنیر تجاری رنیلاز. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران.
۵. فرخنده، ع. ۱۳۷۱. روش‌های آزمایش شیر و فرآورده‌های آن. جلد دوم. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران.
۶. مرتضوی، س. ع، م، قدس روحانی و ح، جوینده. ۱۳۷۵. تکنولوژی شیر و فرآورده‌های لبنی (ترجمه). چاپ دوم. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
۷. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۷۱. شیر، روش تعیین ماده خشک شیر، استاندارد ملی ایران شماره ۶۳۷.
۸. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۷۳. شیر و فرآورده‌های آن، روش تعیین اسیدیته کل و pH یا تراکم یونهای H، استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۵۲.
9. Andrew, A. T. 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*, 50 : 45-55.
10. Anonymous. 1999. CO2 can extend shelf life of dairy foods. <http://www.Extraordinary.com/>
11. Barbano, D. M., Y, Ma and M.V, Santos. 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *Journal of Dairy Science*, 89: 15-19.
12. Champagne, C. P., D, St-Gelais and A, de Candolle. 1998. Acidification rates and population ratios of lactic starters in carbonated milk. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 2 : 100-106.
13. Chen, J. H and J. H, Hotchkiss. 1991. Effect of dissolved  $CO_2$  on the growth of psychrotrophic organisms in cottage cheese. *Journal of Dairy Science*, 74: 2941-2945.
14. De la Fuente, M. 1998. Changes in the mineral balance of milk submitted to technological treatment. *Food Science and Technology*, 9 : 281-288.
15. IDF. 1964. Determination of the protein content of processed cheeses product. IDF standard 25. Brussels, Belgium : International Dairy Federation.
16. Kuchroo, C. N and P. F, Fox. 1982. Soluble nitrogen in cheddar cheese : Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, 37 : 331-335.

17. Ma, Y., M, Barbano., J. H, Hotchkiss., S, Murphy and J. M, Lynch. 2001. Impact of CO<sub>2</sub> addition to milk on selected analytical testing method. *Journal of Dairy Science*, 84 : 1959-1968.
18. Ma, Y and M, Barbano. 2003. Milk pH as a function of CO<sub>2</sub> concentration, temperature, and pressure in a heat exchanger. *Journal of Dairy Science*, 86 : 3822-3830.
19. Ma, Y., M, Barbano and M, Santost. 2003. Effect of CO<sub>2</sub> addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C. *Journal of Dairy Science*, 86 : 1616-1631.
20. Raus-Madiedo, P., J. C, Bada-Gancedo., E, Fernandez-Garcia., D, Gonzalez de Llano and C, de los Reyes-Gavilan. 1996. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by CO<sub>2</sub> addition. *Journal of Food Protection*, 59 : 502-508.
21. Ruas- Madiedo, P., J. C, Bada-Gancedo., L, Alonso and C, de los Reyes-Gavilan. 1998. Afuega'l pitu cheese quality : CO<sub>2</sub> Addition to refrigerated milk in acid- coagulated cheesemaking. *International Dairy Journal*, 8 : 951-958.
22. Ruas-Madiedo, P., L, Alonso., T, Delgado., J. C, Bada-Gancedo and G. C, de los Reyes-Gavilan. 2002. Manufacture of Spanish hard cheeses from CO<sub>2</sub>-treated milk. *Food Research International*, 35 : 681-690.
23. Santos, M. V., Y, Ma., Z, Caplan and M, Barbano. 2003. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 86 : 1601-1607.
24. Shalabi, S. I and P. F, Fox. 1987. Electrophoretic analysis of cheese, comparison of methods. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11 : 135-151.

## Treatment of refrigerated raw milk with CO<sub>2</sub> : Effect on proteolysis, Lipolysis and organoleptic characteristics

Azadeh Soleymani Vafa<sup>1</sup>, Javad Hesari<sup>2\*</sup>, Adel Ahmadi Zenouz<sup>3</sup>

### Abstract

The objective of this study was to determine the effect of CO<sub>2</sub> treatment on proteolysis, lipolysis and quality characteristics of refrigerated raw milk. Four treatments of raw milk were selected (controlled milk (milk without any special treatment) and milks treated with CO<sub>2</sub> until pH = 6.4, 6.2, 6). All experiments were triplicate. Samples were stored at 4°C for 10 days and were analyzed on 1, 5, 8, 10 day for chemical evaluations. Statistical evaluation of the effects of treatments was performed using of split plot experiment with randomized complete block design (RCBD). Statistical analysis, indicated that no significant proteolysis and lipolysis were observed during 10 days of storage using addition of CO<sub>2</sub> to pH = 6, 6.2 and an increase in CO<sub>2</sub> concentration did further reduce proteolysis and lipolysis. The sensory panel did not detect significant difference between CO<sub>2</sub> treated milks and fresh milk. The research revealed that the best treatment was using of CO<sub>2</sub> to pH = 6, although in the most cases there was no significant difference between pH 6.2 and 6.

**Key words:** Raw milk, Co2, proteolysis, lipolysis, preservation

\*. Corresponding Author Email: [jhesari@tabrizu.ac.ir](mailto:jhesari@tabrizu.ac.ir)

1 . Former Msc student of Department of Food Science and Technology; Faculty of Agriculture; University of Tabriz; Tabriz; Iran.

2 . Assistant Prof. of Department of Food Science and Technology; Faculty of Agriculture; University of Tabriz; Tabriz; Iran.

3 . Associate Prof. of Department of Food Science and Technology; Faculty of Agriculture; University of Tabriz; Tabriz; Iran.