

بهینه‌سازی نابودی پاتوژن‌های شاخص و بررسی تغییرات کیفی شیر بطری شده تیمار شده با پلاسمای سرد

آزاده رنجبر ندامانی

گروه مکانیک بیوسیستم، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
(a.ranjbar@sanru.ac.ir) نویسنده مسئول

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۲/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵
تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۲/۰۱/۱۲

واژه‌های کلیدی

استریلیزاسیون
پلاسمای سرد
روش سطح پاسخ
شیر بطری شده
کامسول

چکیده

در این مطالعه، یک سیستم پلاسمای تخلیه سطح شامل یک سیستم استوانه‌ای برای تیمار شیر درون بطری استفاده شد. تخلیه برق با فرکانس و ولتاژ مورد مطالعه به الکتروود انجام شد. با کمک نرم‌افزار دیزاین اکسپرت و طرح اپتیمال فاکتوریل، تیمارهای بهینه‌سازی به دست آمدند. زمان نابودی میکروارگانیسم‌های *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس کواگولانس*، *باسیلوس استئاروترموفیلوس* و *کلیستریدیوم بوتولینوم*، ترکیبات تغذیه‌ای و یا بروز واکنش‌های شیمیایی، و میزان زمان غیرفعال‌سازی آنزیم‌های کاتالاز، فسفاتاز قلیایی، لیپاز، پراکسیداز، پروتئاز و زمان نابودی ترکیبات تغذیه‌ای آلبومین سرم گاوی، ایمنوگلوبولین‌ها، آلفا-لاکتآلبومین، بتا-لاکتآلبومین، لیزین و تیامین نیز به عنوان پاسخ در طرح دیزاین اکسپرت در نظر گرفته شدند. شبیه‌سازی توسط نرم‌افزار کامسول ۳.۵ برای یک هندسه دوبعدی اجرا شد. نتایج نشان دادند *باسیلوس استئاروترموفیلوس* بیشترین مقاومت در برابر اعمال پلاسمای سرد را داشته و بعد از آن سایر باکتری‌ها مقاومت نزدیکی از خود نشان داده‌اند. تغییرات دمای اولیه نسبت به تغییرات ولتاژ، اثر بیشتری بر میزان تولید گونه‌های فعال داشت. تحت تأثیر تیمار پلاسمای غیرحرارتی، زمان دناتورده شدن پروتئین‌ها و اسیدآمین‌ها مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد دارد. در این بین، زمان غیرفعال شدن اسیدآمین‌ها لیزین از سایر موارد مطالعه شده در این بررسی، کمتر و پروتئین بتا-لاکتآلبومین از همه بیشتر بود. فناوری پلاسمای سرد می‌تواند به عنوان یک مداخله ضد میکروبی جدید برای غیرفعال کردن پاتوژن‌ها و بهبود ایمنی محصولات لبنی مورد استفاده قرار گیرد.



مقدمه

۳۴۰ گرم در لیتر چربی، ۳۳ گرم در لیتر پروتئین و ۷ گرم در لیتر ویتامین و مواد معدنی می‌باشند (Nikmaram & Keener, 2022). ایمنی شیر و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری آن، اغلب توسط فراوری حرارتی (پاستوریزاسیون یا استریلیزاسیون)، تخمیر و رساندن (مانند تولید پنیر) ایجاد می‌شود. به این ترتیب، نابودی میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی، یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های صنایع فراوری مواد غذایی است. چراکه علی‌رغم ورود تکنولوژی‌های نوین مانند فشار بالا،

نابودی میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی، یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های صنایع فراوری مواد غذایی است. متأسفانه روش‌های سنتی پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون به شکل بارزی بر کیفیت شیر اثر گذاشته و منجر به قهوه‌ای شدن آنزیمی، ازدست رفتن ویتامین‌ها و طعم و تغییرات ساختاری پروتئین‌ها می‌شوند. شیر گاو در کل جهان مصرف می‌شود. ترکیبات موجود در شیر گاو شامل ۸۷۰ گرم در لیتر آب، ۴۹۰ گرم در لیتر لاکتوز،

ترکیب اسید چرب و پراکسیداسیون لیپید در آن را بررسی کردند. در نهایت آنها اعلام کردند تیمار پلاسما با DBD انکپسوله شده، برای مدت کمتر از ۱۰ دقیقه، باعث تغییرات اندک در کیفیت فیزیکی شیمیایی شیر شد (Kim *et al.*, 2015). Wang و همکاران (۲۰۲۰) به ارزیابی اثرات فراوری با پلاسما سرد بر غیرفعال کردن میکروبی و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و ساختار پروتئین‌های شیر گوسفند پرداختند. آنها دریافتند تیمار ۳۰۰ ثانیه با پلاسما سرد، اثر مشابه پاستوریزاسیون در غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها از خود نشان داد. افزایش زمان تیماردهی اثر اندکی بر تغییرات رنگ و pH شیر گوسفند داشت و به‌طور کلی مشخص شد تیمار با پلاسما سرد توانایی جایگزینی با پاستوریزاسیون را داراست (Wang *et al.*, 2020). Gurol و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از یک سیستم تخلیه کرونا، شیر فرادما و خام را تحت تیمار پلاسما با الکترودهای دایره‌ای با شعاع ۰/۸ میلی‌متر و توان ۹ کیلووات قرار دادند. آنها گزارش کردند پلاسما سرد باعث تغییرات معنی‌دار در pH و رنگ نمونه‌های شیر خام نشد (Gurol *et al.*, 2012). Lee و همکاران (۲۰۱۲) نیز از یک سیستم DBD برای تیمار پنیر با پلاسما سرد استفاده کردند و تغییرات رنگی و پذیرش حسی آن را مورد ارزیابی قرار دادند و کاهش بارزی در کیفیت حسی از جمله بو و طعم، و پذیرش کلی مشاهده شد (Lee *et al.*, 2012). Yong و همکاران (۲۰۱۵) اثر تیمار با پلاسما سرد DBD را بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و حسی پنیر چدار بررسی و گزارش دادند pH و L* بعد از تیمار پلاسما سرد کاهش یافتند در حالی که ترکیبات فعال اسید تیوباریتوریک و b* به شکل بارزی با افزایش زمان در معرض ماندن، افزایش یافتند. تفاوت معنی‌داری در افت کلی رنگ، پذیرش کلی و ارزیابی رنگی نمونه تیمار شده با پلاسما و شاهد مشاهده نشد. اما بو و طعم و بد طعمی افزایش یافتند. آنها در نهایت گزارش دادند که می‌توان از DBD برای تیمار پنیر چدار استفاده کرد اما شرایط عملیات برای استفاده در مقیاس صنعتی باید بهینه شود (Yong *et al.*, 2015). Korachi و همکاران (۲۰۱۵) نیز شیر را با سیستم تخلیه کرونا با دو الکترو دایره‌ای با شعاع ۰/۸ میلی‌متر و توان ۹ کیلووات در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت صفر، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و ۲۰ دقیقه تیمار کردند. آنها دریافتند در مقدار ۱-اکتانول، ۲-

مایکروویو، میدان‌های الکتریکی پالسی و غیره، برای نابودی میکروارگانیسم‌ها اغلب نیاز به استفاده از حرارت وجود دارد. در برخی موارد به‌منظور نابودی میکروارگانیسم هدف، استفاده از حرارت‌های بالا مانند استریلیزاسیون باعث نابودی ترکیبات تغذیه‌ای در مقیاس وسیع می‌شود. علاوه بر آن، تغییر طعم، بو، بافت، رنگ و ویژگی‌های ظاهری نیز از نتایج منفی استفاده از حرارت برای سالم‌سازی مواد غذایی است. به‌همین دلیل محققین این حوزه همواره به دنبال راهکارهای جایگزین یا ترکیبی از روش‌ها برای کاهش استفاده از حرارت‌های بالا بوده‌اند. از جمله این روش‌ها می‌توان به فشار هیدرواستاتیک بالا، میدان الکتریکی پالسی، اولتراسوند و پلاسما اتمسفری سرد اشاره کرد. در سال‌های اخیر، پلاسما سرد یکی از جایگزین‌های موردانتظار برای تیمارهای پس‌از برداشت و مدیریت پس‌از برداشت محصولات محسوب می‌شود (Misnal *et al.*, 2022). تکنولوژی پلاسما سرد (CP^۱) یا پلاسما غیرحرارتی^۲ یک فرایند فیزیکی غیرحرارتی است که پتانسیل بالایی برای استفاده در صنایع غذایی دارد (Xiang *et al.*, 2019). زیرا این تکنولوژی به راحتی قابلیت استفاده در مقیاس وسیع را داشته و هیچ بقایای شیمیایی خطرناکی از خود به جا نمی‌گذارد؛ ضمن اینکه پاتوژن‌ها را بدون صدمه حرارتی به ماده غذایی نابود یا غیرفعال می‌کند (Kim *et al.*, 2015; Misnal *et al.*, 2022; Ng *et al.*, 2021; Sharma & Singh, 2022). شیر حاوی تمام ترکیبات لازم برای تأمین نیازهای تغذیه‌ای و انرژی بدن انسان است (Balthazar *et al.*, 2017). اما به دلیل بالابودن فعالیت آبی، یک محیط فوق‌العاده برای رشد باکتری‌هایی مانند *اشریشیاکلی*^۳، *سالمونلاها*^۴، *لیستریا مونوسیتوژنز*^۵ و سایر باکتری‌هاست که باعث اتلاف تغذیه‌ای شیر و کاهش کیفیت و ایمنی آن می‌شوند (Coutinho *et al.*, 2018).

اکنون از این روش‌های غیرحرارتی به‌طور گسترده در صنایع لبنی (مانند شیر، پنیر، ماست و بستنی) جهت انجام تحقیق‌ها استفاده می‌شود. Kim و همکاران (۲۰۱۵) شیر را با سیستم DBD (۲۵۰ وات، ۱۵ کیلوهرتز، دمای اتاق) تحت تیمار با پلاسما سرد قراردادده و pH، رنگ،

¹ Cold plasma

² Non-thermal plasma

³ *Escherichia coli* (*E. coli*)

⁴ *Salmonella*

⁵ *Listeria monocytogenes*

طرح اپتیمال فاکتوریل، تیمارهای بهینه‌سازی به‌دست‌آمدند. برای این منظور، فاکتورهای ولتاژ (A: ۵۰-۱۰)، غلظت اولیه میکروارگانیسم (B: ۱۰,۰۰۰-۱,۰۰۰)، فرکانس (C: ۲۰-۱)، و دمای فرایند (D: ۵۰-۸۰ درجه سانتی‌گراد) مورد مطالعه قرار گرفتند. **جدول (۱)** ترکیب تیمارهای طرح فاکتوریل نرم‌افزار را نشان می‌دهد. در این طرح، پاسخ‌ها عبارت بودند از زمان نابودی میکروارگانیسم، غیرفعال شدن آنزیم، دناتوره شدن پروتئین‌های تغذیه‌ای شیر، نابودی ویتامین و بروز واکنش قهوه‌ای شدن (دقیقه). میکروارگانیسم‌های *باسیلوس سرئوس*^۲، *باسیلوس کوآگولانس*^۳، *استاروترموفیلوس*^۴ و *کلستریدیوم بوتولینیوم*^۵، آنزیم‌های کاتالاز، فسفاتاز قلیایی، لیپاز، پراکسیداز، پروتئاز، ترکیبات تغذیه‌ای آلبومین سرم گاوی، ایمونوگلوبولین‌ها، آلفا-لاکتآلبومین، بتا-لاکتآلبومین، لیزین و تیمین و میزان بروز واکنش‌های قهوه‌ای شدن طی تیمار پلاسما نیز به‌عنوان پاسخی که شاخص بروز واکنش‌های شیمیایی در شیر می‌باشد، مورد مطالعه قرار گرفت.

محاسبه زمان فرایند پاسخ‌های مورد مطالعه

در زمان استفاده از تیمار حرارتی برای نابودی میکروارگانیسم هدف در مواد غذایی، زمان مورد نیاز برای رسیدن به یک درجه معین k در دمای معین T ، «زمان مرگ حرارتی» (F) نامیده می‌شود که طبق رابطه (۱)، توسط ضرب k در D به‌دست می‌آید (Ibarz & Augusto, 2017).

رابطه (۱)

$$F_T = kD_T$$

رابطه (۱)، موسوم به قانون اول مرگ حرارتی میکروارگانیسم، یا قانون اول تجزیه و یا قانون بقاست (Ibarz & Augusto, 2017). محاسبه D به شکل رابطه (۲) تا رسیدن به ۹۰ درصد غلظت اولیه، محاسبه و برای محاسبه F در رابطه (۱) قرار داده شد:

رابطه (۲)

$$t = D_T \log_{10} \left(\frac{N_0}{N} \right)$$

هیتانون، ۲- هگزانال، ۲- اکتنال، نونانال و بنزآلدئید افزایش مشاهده شد در حالی که تغییرات بارزی در ترکیب لیپید، کتون کل یا الکل کل دیده نشد (Korachi et al., 2015).

در محصولات لبنی، کفایت تیمار پلاسما به عواملی مانند نوع میکروارگانیسم، توان ورودی، زمان تیمار، ترکیب گاز و ترکیبات ماده غذایی وابسته است. لذا در این مطالعه در کنار بررسی شرایط بهینه نابودی میکروارگانیسم‌های مورد نظر، میزان نابودی ترکیبات تغذیه‌ای مانند پروتئین‌های تغذیه‌ای، لیزین، ایمونوگلوبولین و همچنین بروز واکنش‌های قهوه‌ای شدن نیز مورد بررسی قرار خواهد گرفت. برای کاهش هزینه‌های آزمایشگاهی، با کمک داده‌های تجربی، عملیات شبیه‌سازی در کامسول انجام و سپس داده‌ها توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت جهت بهینه‌سازی تحلیل می‌شوند. نتایج این تحقیق برای حذف تیمارهای اولیه پیش‌آزمایش جهت انجام مطالعه‌ها روی سایر پارامترهای کیفی و حسی شیر خام مفید خواهد بود.

مواد و روش‌ها

مدل فیزیکی سیستم پلاسما

یک سیستم پلاسمای تخلیه سطح برای این منظور استفاده شد. راکتور این سیستم یک استوانه کوارتزی با قطر ۱ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر بود. از یک پوشش استیل با ضخامت ۱ میلی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر در سطح داخلی راکتور و به‌عنوان الکتروود تخلیه ولتاژ بالا استفاده شد. مایع درون بطری (شیر) نیز به‌عنوان الکتروود خنثی در نظر گرفته شد (Wang et al., 2022). تخلیه برق با فرکانس و ولتاژ مورد مطالعه به الکتروود انجام شد. پلاسما باعث تولید گونه‌های فعالی مانند پراکسید هیدروژن، ازن، رادیکال هیدروکسیل و رادیکال اکسیژن می‌شود. از آنجاکه پایش ازن طی عملیات آسان و نمایان‌گر مناسبی برای بررسی شرایط پلاسما می‌باشد (Wang et al., 2020)، در این مطالعه غلظت ازن به‌عنوان شاخص شبیه‌سازی استفاده شد.

تعیین طرح آزمایش‌ها در دیزاین اکسپرت

با کمک نرم‌افزار دیزاین اکسپرت^۱ نسخه ۱۲ و با استفاده از

² *Bacillus cereus*

³ *Bacillus coagulans*

⁴ *Bacillus stearothermophilus*

⁵ *Clostridium botulinum*

¹ Design Expert

جدول ۱- ترکیب تیمارهای طرح اپتیمال فاکتوریل نرم افزار دیزاین اکسپرت

شماره تیمار	درجه حرارت (درجه سانتی گراد)	غلظت اولیه (واحد تشکیل دهنده کُلنی بر لیتر)	فرکانس (کیلوهرتز)	ولتاژ (کیلوولت)
۱	۶۴/۴	۵۲,۷۵۰	۹/۶۱۵۷۹	۳۱/۵۸۴۶
۲	۸۰	۵۷,۷۰۰	۱۰/۲۵۰۹	۳۱/۵۸۴۶
۳	۶۲/۹	۱۰۰,۰۰۰	۲۰	۳۱/۵۸۴۶
۴	۸۰	۶۶,۲۵۰	۱	۱۰
۵	۶۹/۰۵	۳۱,۱۵۰	۲۰	۱۰
۶	۵۰	۱۰۰,۰۰۰	۱۰/۹۷۵	۱۰
۷	۵۰	۱۰,۰۰۰	۱	۱۰
۸	۶۳/۳۵	۱۰۰,۰۰۰	۱	۲۲/۴
۹	۸۰	۱۰۰,۰۰۰	۱۸/۱۱۱۲	۲۲/۴
۱۰	۵۰	۵۷,۷۰۰	۲۰	۲۲/۴
۱۱	۶۵	۱۰,۰۰۰	۱۰/۵	۲۲/۴
۱۲	۷۳/۵۴۶۵	۴۸,۷۰۰	۲۰	۵۰
۱۳	۵۰	۱۰۰,۰۰۰	۱۲/۷۸	۵۰
۱۴	۸۰	۱۰۰,۰۰۰	۱	۵۰
۱۵	۸۰	۱۰,۰۰۰	۱	۳۵
۱۶	۵۰	۶۴,۴۵۰	۱	۳۵
۱۷	۵۰	۱۰,۰۰۰	۲۰	۳۵
۱۸	۶۶/۶۵	۵۷,۲۵۰	۱۰/۵۹۵	۳۵

$k_{Lipase} = 53.70 \exp\left(\frac{-160}{8314T}\right)$	رابطه (۱۰)	<p>ضرایب k برای میکروارگانیسمها (رابطه ۳ الی ۶)، آنزیمها (رابطه های ۷ الی ۱۱)، پروتئین های تغذیه ای شیر (رابطه های ۱۲ الی ۱۴)، ویتامین تیامین (رابطه ۱۶) و واکنش قهوه ای شدن (رابطه ۱۷) در نظر گرفته شدند (De Jong, 2008)</p>
$k_{Phosphatase} = 95.17 \exp\left(\frac{-275}{8314T}\right)$	رابطه (۱۱)	رابطه (۳)
$k_{AlphaLactalbumin} = 84.92 \exp\left(\frac{-296}{8314T}\right)$	رابطه (۱۲)	$k_{Bacillus Stearothermophilus} = 101.15 \exp\left(\frac{-345.4}{8314T}\right)$
$k_{BetaLactoglobulin} = 89.43 \exp\left(\frac{-280}{8314T}\right)$	رابطه (۱۳)	رابطه (۴)
$k_{Immunoglobulin} = 90.38 \exp\left(\frac{-275}{8314T}\right)$	رابطه (۱۴)	$k_{Clostridium Botulinum} = 107.5 \exp\left(\frac{-351}{8314T}\right)$
$k_{Thiamin} = 29.78 \exp\left(\frac{-100.8}{8314T}\right)$	رابطه (۱۵)	رابطه (۵)
$k_{Lysine} = 8.77 \exp\left(\frac{-190}{8314T}\right)$	رابطه (۱۶)	$k_{Bacillus Coagulans} = 151.29 \exp\left(\frac{-509}{8314T}\right)$
$k_{Pigmentbrown} = 29.09 \exp\left(\frac{-116}{8314T}\right)$	رابطه (۱۷)	رابطه (۶)
		$k_{Bacillus Cereus} = 91.92 \exp\left(\frac{-294.5}{8314T}\right)$
		رابطه (۷)
		$k_{Protease} = 15.19 \exp\left(\frac{-64}{8314T}\right)$
		رابطه (۸)
		$k_{Catalase} = 180.72 \exp\left(\frac{-529}{8314T}\right)$
		رابطه (۹)
		$k_{Peroxidase} = 222.5 \exp\left(\frac{-663}{8314T}\right)$

تحلیل داده ها و بهینه سازی

بهینه سازی مدل برای به دست آوردن بیشترین میزان نابودی

نتایج و بحث

اثر متغیرهای فرایند تیمار با پلاسما بر پاسخ نهایی شکل (۱) میزان همبستگی فاکتورهای تیمار پلاسما و پاسخ‌های مورد مطالعه که توسط آنالیز همبستگی پیرسون انجام شده است را نشان می‌دهد. ضرایب همبستگی با رنگ‌های مختلف و با کمک راهنمای سمت راست شکل (۱) نشان داده شده است. اگر ضریب همبستگی به -۱ نزدیک شود، یعنی همبستگی منفی است (آبی) و اگر به +۱ نزدیک شود، یعنی همبستگی مثبت است (قرمز).

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها و بررسی اثر فاکتورهای مستقل بر زمان فرایند نابودسازی میکروارگانیسم‌ها که در شکل (۱) نشان داده شده است. همچنین جدول (۲) اثر متغیرهای مستقل بر زمان نابودی میکروارگانیسم‌ها و تعیین ضرایب معنی‌داری مدل رگرسیونی را نشان می‌دهد. مطابق جدول (۲)، دمای اولیه شیر فاکتور معنی‌داری بر زمان نابودی تمامی میکروارگانیسم‌ها بود و در نابودی باسیلوس کوآگولانس علاوه بر دمای اولیه شیر، فرکانس تولید پلاسمای سرد نیز فاکتور معنی‌داری در نابودی میکروارگانیسم محسوب می‌شد. جدول (۳) اثر متغیرهای مستقل بر زمان غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها و تعیین ضرایب معنی‌داری مدل رگرسیونی را نشان می‌دهد. نتایج جدول (۳) فاکتورهای دما در تمام آنزیم‌ها و در آنزیم کاتالاز، علاوه بر فاکتور دمای اولیه شیر، فاکتور غلظت اولیه آنزیم نیز بر میزان غیرفعال‌شدن آنزیم اثر داشتند. نتایج جدول (۴) نشان می‌دهد دمای اولیه شیر برای تمامی پروتئین‌های مورد مطالعه و دمای اولیه شیر به همراه فرکانس تولید پلاسمای سرد برای ایمونوگلوبولین‌ها اثر معنی‌داری در نابودی داشتند. جدول (۵) نیز نشان می‌دهد در سطح معنی‌داری ($P < 0.05$)، تغییرات ولتاژ اثری بر نتیجه نداشته و فاکتور مهم مؤثر بر پاسخ‌های مدنظر، دمای اولیه شیر بوده است. براساس شکل (۲)، تیمارهای مختلف انجام‌شده، بر پاسخ معنی‌دار بودند. به این معنی که تغییرات انجام‌شده در دمای اولیه، ولتاژ، فرکانس و غلظت اولیه میکروارگانیسم‌ها، بر پاسخ نهایی اثر داشته است. اما میزان این اثر در مورد غیرفعال‌کردن آنزیم کاتالاز و پراکسیداز، نابودی باکتری کلستریدیوم بوتولینیوم، دناتوره کردن ایمونوگلوبولین و نابودی تیامین با پاسخ همبستگی منفی نشان داده است.

میکروارگانیسم و کمترین میزان اتلاف تغذیه‌ای و بروز واکنش‌های نامطلوب، برحسب فاکتورهای مورد مطالعه انجام شد. متغیرهای پاسخ نیز با معادله درجه یک و معادله درجه دوم برازش شدند. رابطه (۱۸) قادر به توصیف ارتباط بین پاسخ‌ها و متغیرهای غیروابسته بود.

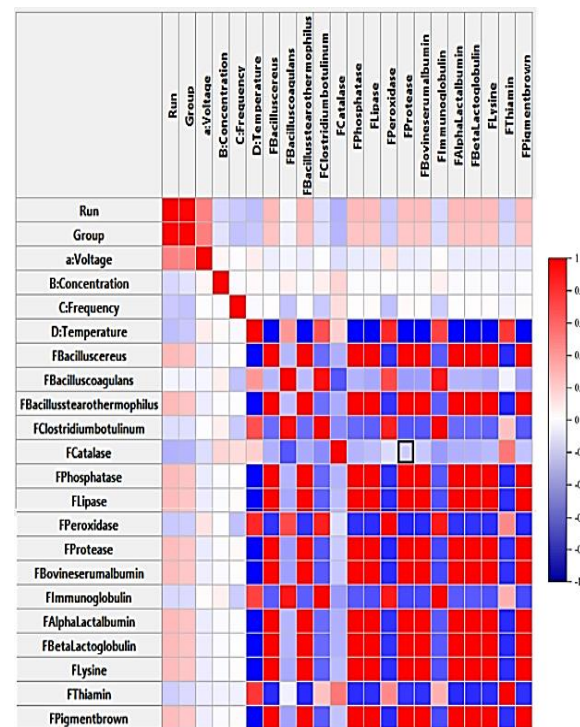
رابطه (۱۸)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^2 \beta_{ij} X_{ij}$$

در رابطه (۱۸)، Y پاسخ، X_i و X_j متغیرهای مستقلی هستند که روی پاسخ اثر می‌گذارند و β_0 ، β_i ، β_{ii} و β_{ij} به ترتیب ضرایب رگرسیونی عبارت‌های عرض از مبدا، خطی، درجه دوم و برهم‌کنش‌ها هستند.

آنالیز آماری

جهت بررسی صحت مدل و تشخیص ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری آماری، آنالیز واریانس (ANOVA) در دیزاین اکسپرت انجام شد. معادله خط، ضرایب رگرسیونی و عدم برازش توسط پارامترهای آماری R^2 ، P -value (در سطح 0.05) و $Adj-R^2$ مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۱- آنالیز همبستگی فاکتورهای تیمار پلاسما و پاسخ‌های مورد مطالعه انجام‌شده توسط آنالیز همبستگی پیرسون

جدول ۲- جدول ANOVA اثر متغیرهای مستقل بر زمان نابودی میکروارگانیسم‌ها و تعیین ضرایب معنی‌داری مدل رگرسیونی

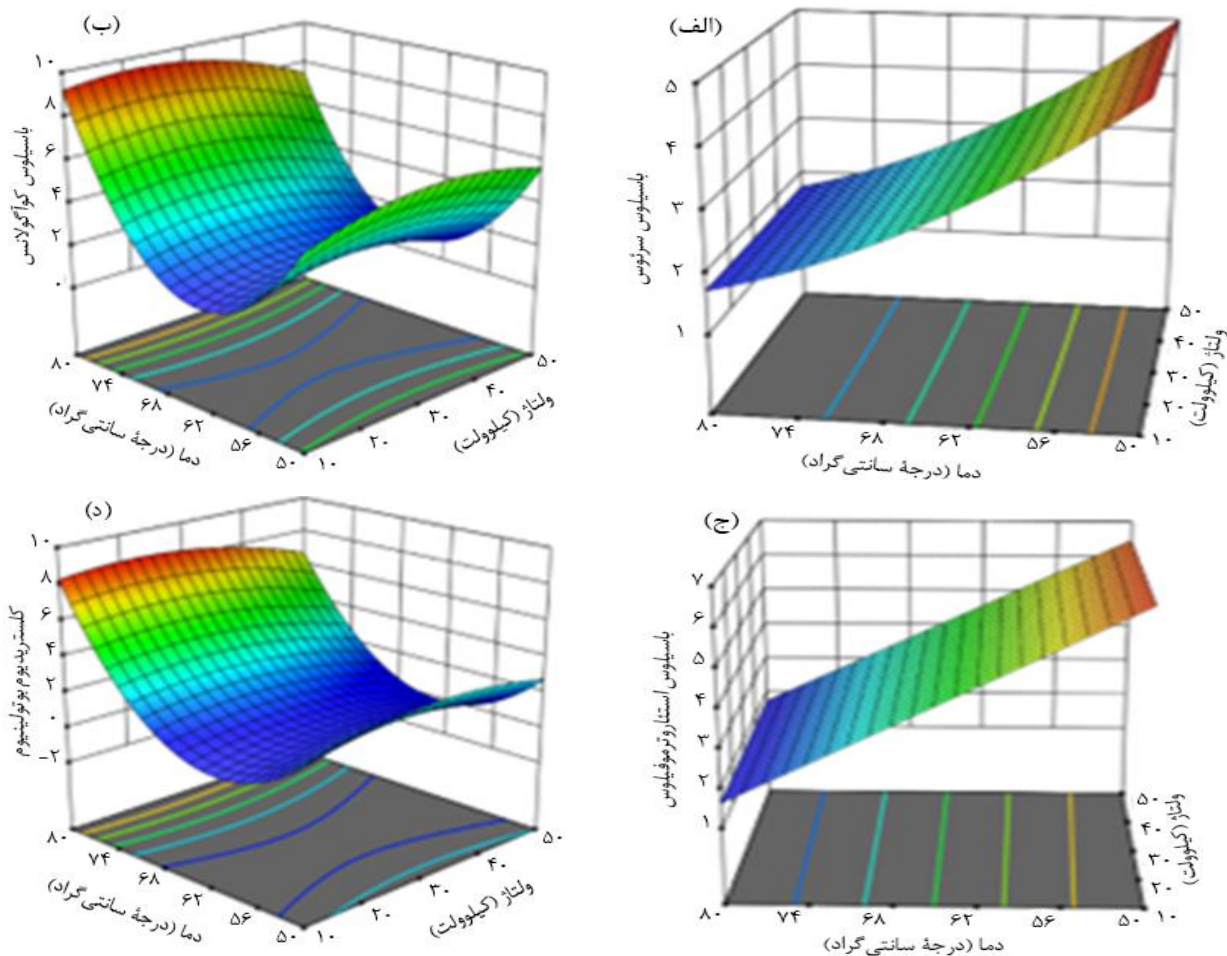
منبع	باسیلوس استناروترموفیلوس		کلستریدیوم بوتولینوم		باسیلوس کواگولانس		باسیلوس سرئوس	
	اندریس P	ضریب	اندریس P	ضریب	اندریس P	ضریب	اندریس P	ضریب
	<۰/۰۰۰۱		۰/۰۰۴۰		۰/۰۰۵۲		<۰/۰۰۰۱	
مدل		دوفاکتور		درجه دوم		درجه دوم		دوفاکتور
عرض از مبدا		۱۴/۷۳۱۱۲		۷۲/۳۲۲۳۴		۹۹/۸۸۸۸۰۲		۱۰/۲۵۶۱۴
A	۰/۰۱۷۶۷۵	۰/۱۸۵۵	۰/۲۳۱۵۸۵	۰/۵۲۲۴	۰/۲۴۹۰۴۰	۰/۲۱۷۰	۰/۰۰۷۷۳۳	۰/۹۸۲۷
B	۰/۰۰۰۰۵۴	۰/۹۵۸۰	۰/۰۰۰۰۵۴	۰/۷۵۴۶	۰/۰۰۰۰۵۸	۰/۷۳۴۸	۱/۳۸۵۱۹E-۰۷	۰/۹۶۵۹
C	۰/۰۲۴۶۷۱	۰/۸۲۲۳	۰/۱۳۹۹۴۵	۰/۰۵۰۱	۰/۱۵۴۹۶۵	۰/۰۵۰۰	۰/۰۱۵۷۲۴	۰/۸۰۵۳
D	۰/۱۶۰۳۲۰	<۰/۰۰۰۱	۰/۲۴۲۴۰۰	۰/۰۰۰۰۶	۰/۱۸۶۰۷	۰/۰۰۴۱	۰/۰۱۰۷۵۲۲	<۰/۰۰۰۱
AB	۳/۹۹۳۴E-۰۸	۰/۸۵۹۵	۰/۱۰۴۷۳E-۰۸	۰/۷۴۷۵	۰/۸۷۰۱E-۰۸	۰/۷۹۴۰	۱/۰۱۰۸۱E-۰۸	۰/۹۳۹۴
AC	۰/۰۰۰۲۶۹	۰/۷۹۶۶	۰/۰۰۲۲۰۵	۰/۱۴۳۴	۰/۰۰۲۳۹۶	۰/۱۴۵۴	۰/۰۰۰۱۲۶	۰/۸۳۷۱
AD	۰/۰۰۰۱۸۸	۰/۷۷۴۸	۰/۰۰۱۴۶۱	۰/۱۳۱۳	۰/۰۰۱۵۷۸	۰/۱۳۵	۰/۰۰۰۰۹۲	۰/۸۱۷۲
BC	۶/۱۹۸۱۱E-۰۹	۰/۹۸۷۴	۱/۷۴۳۱E-۰۷	۰/۷۹۳۸	۱/۸۲۵۵E-۰۷	۰/۷۹۹۳	۲/۶۱۲۶E-۰۹	۰/۹۹۱۰
BD	۰/۱۵۲۹۴E-۰۸	۰/۹۶۳۱	۲/۲۷۱۰E-۰۷	۰/۴۲۰۲	۲/۳۹۴۱E-۰۷	۰/۴۳۵۵	۰/۰۲۶۹E-۰۹	۰/۹۶۷۳
CD	۰/۰۰۰۰۵۵۸	۰/۶۲۶۸	۰/۰۰۰۰۹۷۸	۰/۳۵۸۸	۰/۰۰۰۱۱۰۴	۰/۳۶۰۳	۰/۰۰۰۰۳۳۴	۰/۶۲۱۵
A ²	۰/۰۰۲۱۰۸	۰/۲۷۰۰	۰/۰۰۲۱۰۸	۰/۲۷۰۰	۰/۰۰۲۲۸۰	۰/۰۸۴۴		
B ²	۳/۷۲۶۰E-۱۰	۰/۰۸۲۹	۳/۷۲۶۰E-۱۰	۰/۰۸۲۹	۴/۰۱۱۴۹E-۱۰	۰/۵۷۲۰		
C ²	۰/۰۰۰۳۲۱۸	۰/۵۷۹۰	۰/۰۰۰۳۲۱۸	۰/۵۷۹۰	۰/۰۰۰۳۴۵۸	۰/۰۰۰۰۴		
D ²	۰/۰۲۰۲۷۸	۰/۰۰۰۰۶	۰/۰۲۰۲۷۸	۰/۰۰۰۰۶	۰/۰۲۵۶۴۳	۰/۷۳۴۸		
R ²	۰/۹۷	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۹۸	۰/۹۸		
Adj-R ²	۰/۹۳	۰/۹۳	۰/۹۳	۰/۹۳	۰/۹۱	۰/۹۱		
CV	۱۱/۳۷	۱۷/۶۹	۱۷/۶۹	۱۷/۶۹	۸/۱۹	۸/۱۹		

عبارات A, B, C و D به ترتیب نشان‌دهنده فاکتور مستقل ولتاژ، غلظت اولیه، فرکانس و دمای اولیه شیر می‌باشند.

جدول ۳- جدول ANOVA اثر متغیرهای مستقل بر زمان غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها و تعیین ضرایب معنی‌داری مدل رگرسیونی

منبع	پروتئاز		کاتالاز		پراکسیداز		لیپاز		فسفاتاز	
	اندریس P	ضریب	اندریس P	ضریب	اندریس P	ضریب	اندریس P	ضریب	اندریس P	ضریب
	<۰/۰۰۰۱		۰/۰۰۲۳		۰/۰۲۲۸		<۰/۰۰۰۱		<۰/۰۰۰۱	
مدل		دوفاکتور		درجه دوم		درجه دوم		دوفاکتور		دوفاکتور
عرض از مبدا		۳/۱۵۰۷۶		۰/۶۸۷۹۲۴۷		۲۲/۶۱۷۵۰		۴/۵۴۸۵۲		۵/۴۹۶۵۸
A	۰/۰۰۱۳۶۶	۰/۸۰۷۳	۰/۰۶۱۵۸۸	۰/۰۸۷۶	۰/۳۹۰۴۸۷	۰/۹۴۰۸	۰/۰۰۱۹۴۹	۰/۹۹۱۶	۰/۰۰۵۴۲۸	۰/۹۳۷۲
B	۱/۳۸۴۹E-۰۷	۰/۵۸۴۲	۰/۰۰۰۰۱۰	۰/۰۰۸۷	۰/۰۰۰۰۹۶	۰/۶۰۹۴	۰/۲۰۹۱۲E-۰۸	۰/۹۳۹۹	۰/۶۴۷۳E-۰۸	۰/۹۴۱۹
C	۰/۰۰۰۰۵۰۸	۰/۹۹۵۹	۰/۰۲۶۹۰۲	۰/۵۸۲۹	۰/۰۹۰۶۱۴	۰/۰۵۰۰	۰/۰۰۲۶۸۶	۰/۸۲۵۴	۰/۰۰۷۱۴۹	۰/۸۳۲۶
D	۰/۰۱۶۳۱۸	<۰/۰۰۰۱	۲/۲۴۹۱۱	۰/۰۲۴۷	۰/۰۹۵۸۰۴۵	۰/۰۰۱۸	۰/۰۰۳۸۶۱۴	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۵۶۳۱۶	<۰/۰۰۰۱
AB	۳/۴۷۰۸E-۰۹	۰/۵۱۸۶	۶/۹۰۲۵E-۰۷	۰/۰۱۵۱	۰/۵۴۲۷E-۰۷	۰/۱۳۲۶	۳/۳۰۵۰E-۰۹	۰/۹۰۱۱	۱/۳۲۶۵E-۰۸	۰/۸۳۴۸
AC	۰/۰۰۰۰۳۰	۰/۲۴۵۵	۰/۰۰۲۴۴۶	۰/۰۳۲۴	۰/۰۰۴۶۷۸	۰/۱۲۴۴	۰/۰۰۰۰۳۲	۰/۷۹۶۰	۰/۰۰۰۰۸۵	۰/۷۷۳۴
AD	۰/۰۰۰۰۱۳	۰/۴۲۴۶	۰/۰۰۰۰۵۷۹	۰/۲۶۶۸	۰/۰۰۲۹۷۵	۰/۱۲۲۵	۰/۰۰۰۰۲۲	۰/۷۷۷۶	۰/۰۰۰۰۵۶	۰/۷۶۳۳
BC	۰/۶۶۴۴E-۰۹	۰/۶۱۶۱	۰/۵۸۶۴E-۰۷	۰/۳۹۰۵	۸/۲۴۳E-۰۷	۰/۴۸۰۹	۱/۷۸۶۷E-۰۹	۰/۹۶۹۲	۱/۵۴۱۶E-۰۹	۰/۹۸۸۹
BD	۰/۲۳۶۲E-۰۹	۰/۶۸۹۲	۰/۶۹۸۳E-۰۷	۰/۲۱۹۷	۶/۷۷۴۰E-۰۷	۰/۲۹۸۴	۰/۷۴۵۸E-۱۰	۰/۹۷۹۸	۰/۴۰۵E-۰۹	۰/۹۵۰۱
CD	۳/۱۵۰۷۶	۰/۵۱۹۷	۰/۶۸۷۹۲۴۷	۰/۱۰۸۸	۰/۰۰۰۰۳۵۸	۰/۵۹۰۳	۰/۰۰۰۰۶۳	۰/۶۴۰۵	۰/۰۰۰۰۱۶۳	۰/۶۱۳۷
A ²	۰/۰۶۱۵۸۸	۰/۰۶۱۵۸۸	۰/۰۶۱۵۸۸	۰/۰۶۱۵۸۸	۰/۰۰۱۵۳۷	۰/۶۳۰۵				
B ²	۰/۰۰۰۰۱۰	۰/۰۰۰۰۱۰	۰/۰۰۰۰۱۰	۰/۰۰۰۰۱۰	۶/۳۶۱۲E-۱۰	۰/۱۲۸۰				
C ²	۰/۰۲۶۹۰۲	۰/۰۲۶۹۰۲	۰/۰۲۶۹۰۲	۰/۰۲۶۹۰۲	۰/۰۰۲۸۱۲	۰/۹۸۲۱				
D ²	۲/۲۴۹۱۱	۲/۲۴۹۱۱	۲/۲۴۹۱۱	۲/۲۴۹۱۱	۰/۰۰۹۶۹۶	۰/۰۲۹۲۹				
R ²	۰/۹۹	۰/۹۹	۰/۹۹	۰/۹۹	۰/۹۶	۰/۹۶				
Adj-R ²	۰/۹۹	۰/۹۹	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۸	۰/۸				
CV	۰/۵۳	۱۰/۰۲	۱۰/۰۲	۱۰/۰۲	۳۵/۵۴	۳۵/۵۴				

عبارات A, B, C و D به ترتیب نشان‌دهنده فاکتور مستقل ولتاژ، غلظت اولیه، فرکانس و دمای اولیه شیر می‌باشند.



شکل ۲- اثر فاکتورهای معنی‌داری مدل بر زمان فرایند نابودسازی (الف) باسیلوس سرئوس، (ب) باسیلوس کوآگولانس، (ج) باسیلوس استاروترموفیلوس و (د) کلستریدیوم بوتولینیوم

با دما همبستگی منفی داشته‌اند، کاهش، و مواردی که با دما همبستگی مثبت داشته‌اند، افزایش می‌یابد. در مورد سایر فاکتورهای مستقل مورد مطالعه، تغییرات فرکانس نیز همبستگی‌هایی با برخی پاسخ‌ها نشان داده است. برای مثال در مورد نابودی باکتری باسیلوس سرئوس و کلستریدیوم بوتولینیوم، غیرفعال شدن آنزیم پراکسیداز و دناتوره شدن ایمنوگلوبولین، تغییرات فرکانس دارای همبستگی منفی با پاسخ یعنی زمان بروز این پدیده‌ها بوده است. هرچند این همبستگی منفی بسیار اندک است، اما می‌تواند به این معنا باشد که در صورت افزایش فرکانس فرایند، زمان بروز این پدیده‌ها کاهش می‌یابد. اما در مورد اثر فرکانس بر غیرفعال کردن آنزیم کاتالاز، یک همبستگی ضعیف مثبت مشاهده می‌شود که باید در زمان بهینه‌سازی شرایط بهینه برای رسیدن به پاسخ نهایی، در نظر گرفته شود (شکل ۳).

همچنین تیمارها با سایر موارد دارای همبستگی مثبت بودند. هرچند این میزان همبستگی‌های منفی یا مثبت بسیار ضعیف می‌باشند، اما در زمان بررسی اثر متقابل فاکتورها طبق **جدول (۲)** الی (۵) مشخص شد که عامل دما مهم‌ترین فاکتور مستقلاً بوده است که بر این پاسخ‌ها اثر معنی‌داری داشته است. بر اساس **شکل (۲)** نیز مشاهده می‌شود که دما همبستگی منفی قوی با زمان نابودی میکروارگانیسم‌های باسیلوس سرئوس، باسیلوس استاروترموفیلوس و غیرفعال شدن آنزیم‌های فسفاتاز، لیپاز، پراکسیداز و پروتئاز، دناتوره کردن آلفا-لاکتالومین، بتا-لاکتوگلوبولین و لیزین و در نهایت بروز واکنش‌های قهوه‌ای شدن داشته است. در عوض تغییرات دمایی اولیه شیر، همبستگی مثبت قوی با غیرفعال شدن پراکسیداز، دناتوره شدن ایمنوگلوبولین‌ها و نابودی تیمامین داشته است. این نشان می‌دهد که با افزایش دما، زمان لازم برای مواردی که

جدول ۴- جدول ANOVA اثر متغیرهای مستقل بر زمان دنا توره شدن پروتئین‌ها و تعیین ضرایب معنی‌داری مدل رگرسیونی

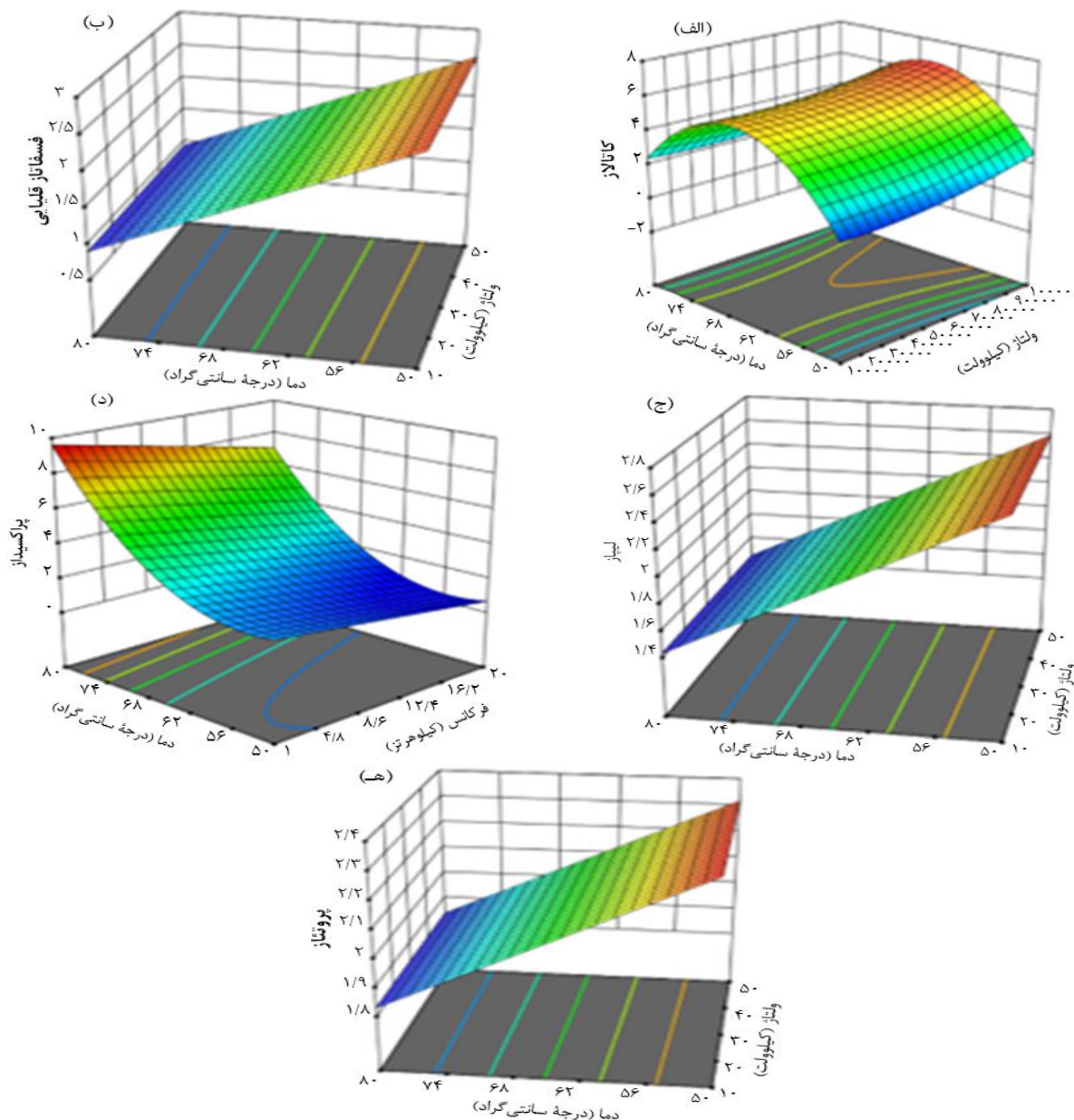
منبع	آلفا-لاکتالبومین		آلبومین سرم گاوی		ایمنوگلوبولین		بتا-لاکتوگلوبولین	
	ضریب	اندیس P	ضریب	اندیس P	ضریب	اندیس P	ضریب	اندیس P
مدل	دوفاکتور	<۰/۰۰۰۱	درجه دوم	<۰/۰۰۰۱	درجه دوم	۰/۰۰۳۶	۱۴/۹۲۳۷۰	<۰/۰۰۰۱
عرض از مبدا	۹/۰۳۱۰۰		۹/۲۲۰۰۲		۶۵/۸۴۲۲۵			
A	-۰/۰۰۷۳۶۲	۰/۹۹۷۲	-۰/۰۰۲۲۰۶	۰/۵۲۷۱	-۰/۲۲۷۹۲۲	۰/۵۲۸۲	-۰/۰۱۲۰۱۷	۰/۹۹۲۱
B	-۲/۸۴۶۰۰E-۰۷	۰/۹۷۸۸	-۳/۴۳۲۵۴E-۰۷	۰/۴۰۲۷	-۰/۰۰۰۰۵۳	۰/۷۶۶۸	-۵/۰۳۸۷۲E-۰۷	۰/۹۷۵۵
C	۰/۰۱۱۵۱۱	۰/۷۸۳۸	-۰/۰۰۱۲۳۱	۰/۵۱۹۵	-۰/۱۳۶۹۱۴	۰/۰۵۰۰	۰/۰۱۸۶۷۲	۰/۷۹۱۳
D	-۰/۰۹۴۷۶۳	<۰/۰۰۰۱	-۰/۰۷۸۰۱۰	<۰/۰۰۰۱	-۲/۲۵۰۸۸	۰/۰۰۰۴	-۰/۱۵۴۱۵۴	<۰/۰۰۰۱
AB	۱/۱۰۵۳۹E-۰۸	۰/۹۲۲۶	-۶/۹۴۵۴۴E-۰۹	۰/۳۴۹۰	-۴/۸۰۸۳۷E-۰۸	۰/۷۲۸۳	۲/۰۲۴۳۰E-۰۸	۰/۹۱۰۶
AC	۰/۰۰۰۱۱۶	۰/۸۲۴۵	-۱/۳۴۸۱۲E-۰۶	۰/۹۱۸۹	-۰/۰۰۲۱۷۶	۰/۱۴۴۵	۰/۰۰۰۱۸۹	۰/۸۲۰۳
AD	۰/۰۰۰۰۸۵	۰/۷۹۶۶	-۶/۵۵۴۰۴E-۰۶	۰/۷۱۶۷	-۰/۰۰۱۴۴۲	۰/۱۳۲۴	۰/۰۰۰۱۳۶	۰/۹۷۵۴
BC	۶/۸۸۵۴۷E-۰۹	۰/۹۷۲۳	۱/۵۹۳۰۹E-۰۸	۰/۲۷۵۷	۱/۷۳۰۷۰E-۰۷	۰/۷۹۲۲	۱/۵۳۲۱۱E-۰۸	۰/۹۶۱۱
BD	-۱/۲۰۲۲۶E-۰۹	۰/۹۹۲۴	۳/۹۶۴۳۱E-۰۹	۰/۵۶۰۹	۲/۲۶۶۳۸۸E-۰۷	۰/۴۲۰۰	-۲/۹۰۶۰۹E-۰۹	۰/۹۸۸۴
CD	-۰/۰۰۰۲۶۷	۰/۶۴۴۵	-۹/۲۲۹۷۸E-۰۶	۰/۷۴۳۲	-۰/۰۰۰۹۵۰	۰/۳۶۵۴	-۰/۰۰۰۴۳۴	۰/۶۳۶۴
A ²			-۰/۰۰۰۰۱۹	۰/۵۱۱۶	-۰/۰۰۲۰۵۸	۰/۲۷۲۶		۰/۹۸
B ²			۱/۹۸۰۰۲E-۱۲	۰/۵۷۳۴	۳/۶۶۷۹۰E-۱۰	۰/۰۸۴۲		۰/۹۵
C ²			۰/۰۰۰۰۳۳	۰/۶۸۳۸	-۰/۰۰۳۱۶۷	۰/۵۸۰۴		۰/۹۵
D ²			۰/۰۰۰۲۲۵	۰/۰۰۵۳	۰/۰۱۹۰۹۶	۰/۰۰۰۷		۰/۹۸
R ²	۰/۹۸		۰/۹۹		۰/۹۹			۰/۹۸
Adj-R ²	۰/۹۴		۰/۹۹		۰/۹۳			۰/۹۵
CV	۸/۴۵		۰/۳۰		۱۹/۲۹			۷/۸۷

عبارت‌های A، B، C و D به ترتیب نشان‌دهنده فاکتور مستقل ولتاژ، غلظت اولیه، فرکانس و دمای اولیه شیر می‌باشند.

جدول ۵- جدول ANOVA اثر متغیرهای مستقل بر زمان اتلاف ترکیبات تغذیه‌ای و بروز واکنش‌های شیمیایی و تعیین ضرایب معنی‌داری مدل رگرسیونی

منبع	تیامین		لیزین		رنگدانه قهوه‌ای	
	ضریب	اندیس P	ضریب	اندیس P	ضریب	اندیس P
مدل	خطی	۰/۰۰۱۶	دوفاکتور	<۰/۰۰۰۱	دوفاکتور	<۰/۰۰۰۱
عرض از مبدا	-۸/۹۲۹۵۳		-۰/۰۰۱۳۰۳		۵/۰۰۴۶۸	
A	-۰/۰۳۱۷۶۹	۰/۴۸۶۷	۰/۰۰۰۰۲۵	۰/۹۵۳۱	-۰/۰۰۰۵۸۸	۰/۹۲۸۶
B	-۵/۶۲۷۷۷E-۰۶	۰/۷۴۰۶	-۱/۵۳۸۵۲E-۰۸	۰/۹۲۱۶	-۱/۱۹۴۶۸E-۰۷	۰/۹۶۲۱
C	-۰/۰۱۸۸۲۳	۰/۸۰۸۱	۰/۰۰۰۰۴۴	۰/۸۳۶۵	۰/۰۰۱۵۸۵	۰/۷۴۶۳
D	۰/۲۴۶۶۹۹	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۲۳	<۰/۰۰۰۱	-۰/۰۳۶۳۳۶	<۰/۰۰۰۱
AB	-۱/۰۹۶۵۵E-۱۰	۰/۸۵۵۶	-۱/۰۹۶۵۵E-۱۰	۰/۸۵۵۶	-۴/۲۴۳۶۷E-۱۰	۰/۹۸۰۱
AC	-۴/۶۰۳۴۶E-۰۷	۰/۷۷۶۵	-۴/۶۰۳۴۶E-۰۷	۰/۷۷۶۵	۸/۱۹۵۸۴E-۰۶	۰/۹۱۷۰
AD	-۲/۰۲۷۶۲E-۰۷	۰/۷۶۸۴	-۲/۰۲۷۶۲E-۰۷	۰/۷۶۸۴	۸/۹۵۵۳۴E-۰۶	۰/۸۵۶۶
BC	۳/۹۵۴۷۳E-۱۰	۰/۹۵۸۷	۳/۹۵۴۷۳E-۱۰	۰/۹۵۸۷	۴/۱۲۲۰۸E-۰۹	۰/۸۸۹۶
BD	۲/۴۰۵۹۴E-۱۰	۰/۹۶۰۳	۲/۴۰۵۹۴E-۱۰	۰/۹۶۰۳	۱/۱۹۸۳۴E-۰۹	۰/۹۴۹۳
CD	-۱/۰۲۰۶۱E-۰۶	۰/۶۱۲۴	-۱/۰۲۰۶۱E-۰۶	۰/۶۱۲۴	-۰/۰۰۰۰۳۷	۰/۶۶۹۲
R ²	۰/۶۲		۰/۹۹		۰/۹۹	
Adj-R ²	۰/۴۵		۰/۹۷		۰/۹۹	
CV	۴۶/۷		۳/۸۱		۱/۳۴	

عبارت‌های A، B، C و D به ترتیب نشان‌دهنده فاکتور مستقل ولتاژ، غلظت اولیه، فرکانس و دمای اولیه شیر می‌باشند.



شکل ۳- اثر فاکتورهای معنی‌داری مدل بر زمان فرایند غیرفعال کردن آنزیم‌های الف) کاتالاز، ب) فسفاتاز قلیایی، ج) لیپاز، د) پراکسیداز و ه) پروتئاز

معنی‌دار هستند. میزان R^2 و $Adj-R^2$ بالای ۰/۹ برای مدل‌ها نشانه برازش مطلوب داده‌ها با مدل آماری بوده است. همچنین میزان واریاسیون ضرایب (CV^1) که نشان‌دهنده انحراف از مقادیر میانگین است و صحت مدل را نشان می‌دهد، کمتر از ۱۰ درصد بود؛ یعنی صحت مدل در بهترین حالت است. شکل‌های (۲) و (۳) به ترتیب نشان‌دهنده اثر فاکتورهای معنی‌داری مدل بر زمان فرایند نابودسازی میکروارگانیسم‌ها، غیرفعال کردن آنزیم‌ها، دناتوره شدن پروتئین‌ها و اسیدآمینه تغذیه‌ای، نابودی تیامین و بروز رنگ قهوه‌ای می‌باشد.

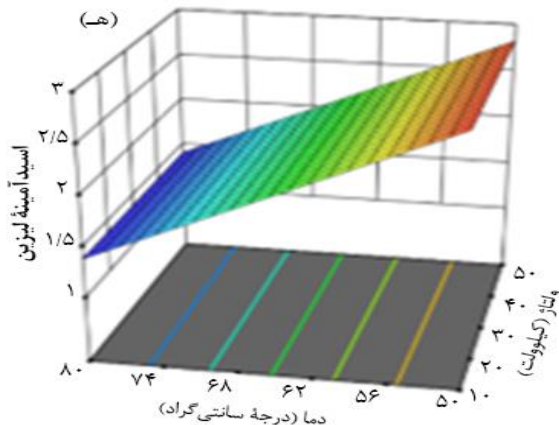
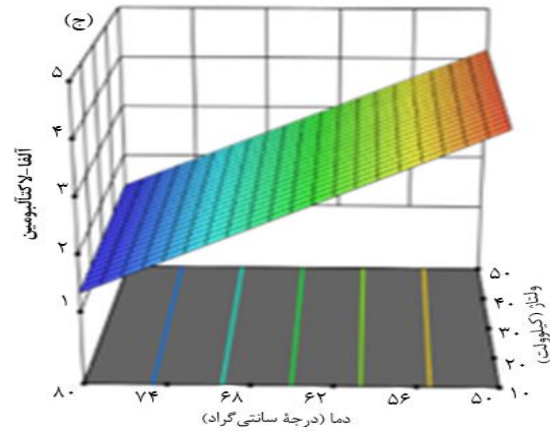
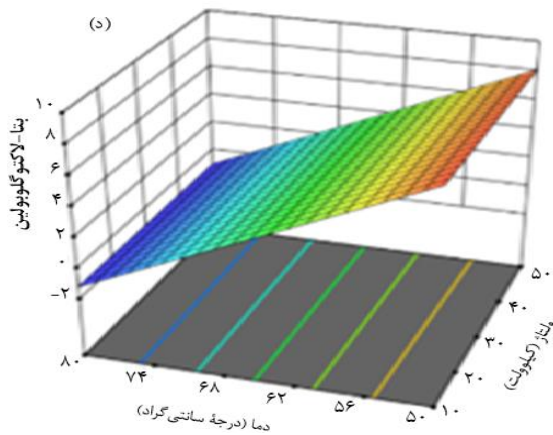
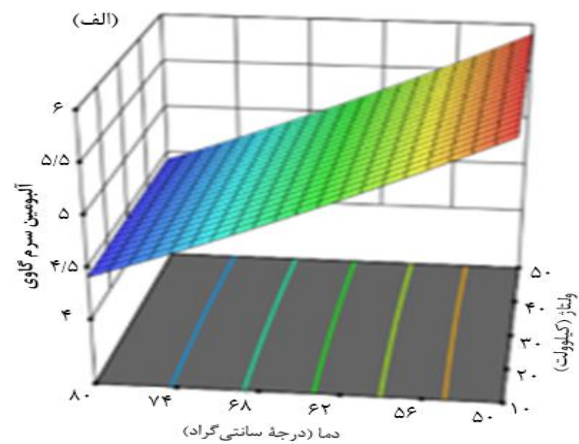
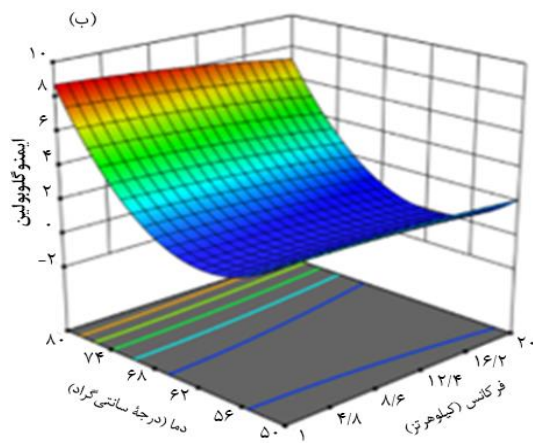
داده‌های مربوط به زمان بروز فرایندهای مورد مطالعه در تیمار با پلاسما، برحسب دمای اولیه، ولتاژ، فرکانس و غلظت اولیه میکروارگانیسم‌ها، در جداول (۲) الی (۵) نشان داده شده است. این داده‌ها به‌عنوان داده خام برای استفاده در روش سطح پاسخ (RSM) جهت یافتن یک مدل پیش‌بینی و بررسی آماری مدل و ضرایب آن مورد استفاده قرار گرفت. طبق نتایج جداول (۲) الی (۵)، معادله درجه دوم و معادله دوفاکتوره خطی بهترین برازش را در سطح معنی‌داری ($P < 0/05$) نشان دادند. صحت و برازش مدل‌ها، توسط آنالیز واریانس (ANOVA) انجام شد. اندیس احتمال مدل‌ها کمتر از ۰/۰۱ بود که نشان می‌دهد مدل‌های پاسخ‌ها از نظر آماری

¹ The coefficient of variation

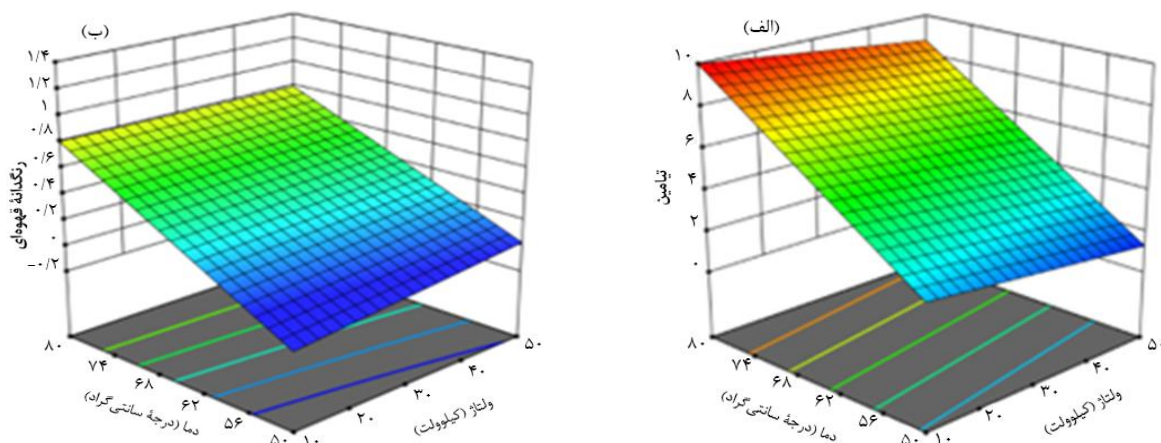
نشان داده است.

شکل (۵) نشان می‌دهد دما و ولتاژ قادرند در ترکیب با یکدیگر بر نابودی تیمین و بروز رنگ قهوه‌ای اثر داشته باشند. به این ترتیب که با افزایش ولتاژ و کاهش دما، میزان نابودی تیمین کاهش می‌یابد. همچنین با کاهش ولتاژ و کاهش دمای اولیه شیر، میزان بروز واکنش‌های قهوه‌ای شدن در شیر کاهش می‌یابد.

شکل (۴) اثر فاکتورهای معنی‌داری مدل بر زمان فرایند دنا توره شدن آلبومین سرم گاوی، ایمنوگلوبولین، آلفا-لاکتآلبومین، بتا-لاکتوگلوبولین و اسید آمینه لیزین را نشان می‌دهد. مطابق **شکل (۴)**، دما و فرکانس اثر معنی‌داری با یک رابطه مثبت بر میزان دنا توره شدن پروتئین‌های مورد مطالعه را از خود نشان می‌دهد. همچنین در بتا-لاکتوگلوبولین، ترکیب ولتاژ و دما نیز یک رابطه مثبت قوی بر کاهش زمان نابودی این پروتئین از خود



شکل ۴- اثر فاکتورهای معنی‌داری مدل بر زمان فرایند دنا توره شدن الف) آلبومین سرم گاوی، ب) ایمنوگلوبولین، ج) آلفا-لاکتآلبومین، د) بتا-لاکتوگلوبولین و ه) اسید آمینه لیزین



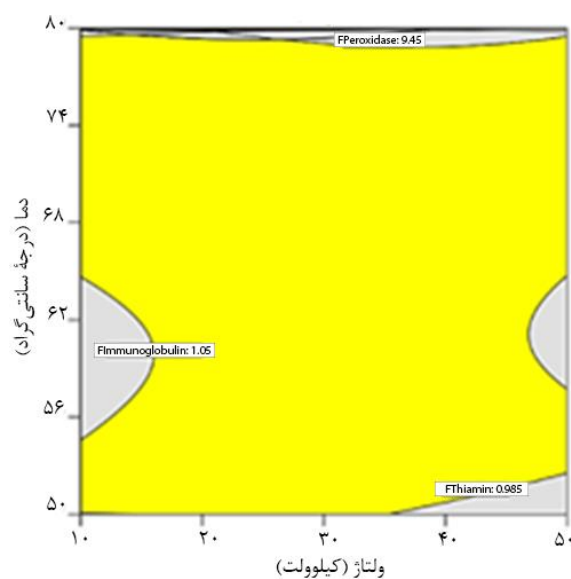
شکل ۵- اثر فاکتورهای معنی‌داری مدل بر زمان فرایند الف) نابودی تیمامین و ب) بروز رنگ قهوه‌ای

بهینه‌سازی فرایند تیمار با پلاسما

در کنار بررسی شرایط تیمار پلاسما بر نابودی میکروارگانیسم‌ها و سایر ترکیبات موجود در شیر خام، مشخص شد شرایطی که بتوان در آن حداکثر کشندگی با کمترین تغییرات در ترکیبات تغذیه‌ای را به دست آورد، ضروری است. برای این منظور از بهینه‌سازی با کمک نرم‌افزار دی‌زاین اکسپرت استفاده شد. در این حالت، زمان نابودی میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌های مضر در حداقل شرایط و زمان نابودی ترکیبات تغذیه‌ای و بروز تغییرات رنگی در حالت حداکثری با درجه اهمیت ۴ تعریف شد. به این ترتیب شرایط پیش‌بینی شده بهینه برای دستیابی به چنین هدفی، ولتاژ ۴۰/۱۲ کیلوولت، فرکانس ۶/۹ کیلوهرتز و دمای اولیه ۶۵/۴ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۶).

نتیجه‌گیری

در مورد سایر فاکتورهای مستقل مورد مطالعه، تغییرات فرکانس نیز همبستگی‌هایی با برخی پاسخ‌ها نشان داده است. برای مثال در مورد نابودی باکتری باسیلوس سرئوس و کلسترییدیوم بوتولینوم، غیرفعال شدن آنزیم پراکسیداز و دناتوره شدن ایمنوگلوبولین، تغییرات فرکانس دارای همبستگی منفی با پاسخ یعنی زمان بروز این پدیده‌ها بوده است. هرچند این همبستگی منفی بسیار اندک است، اما می‌تواند به این معنا باشد که در صورت افزایش فرکانس فرایند، زمان بروز این پدیده‌ها کاهش یابد. همچنین در مورد اثر فرکانس بر غیرفعال کردن آنزیم کاتالاز، یک همبستگی ضعیف مثبت مشاهده می‌شود که باید در زمان بهینه‌سازی شرایط بهینه برای رسیدن به پاسخ نهایی، در نظر گرفته شود. به این ترتیب شرایط پیش‌بینی شده بهینه برای دستیابی به چنین هدفی، ولتاژ ۴۰/۱۲ کیلوولت، فرکانس ۶/۹ کیلوهرتز و دمای اولیه ۶۵/۴ درجه سانتی‌گراد خواهد بود. فناوری پلاسما سرد می‌تواند به عنوان یک مداخله ضد میکروبی جدید برای غیرفعال کردن پاتوژن‌ها و بهبود ایمنی محصولات لبنی مورد استفاده قرار گیرد. این تکنیک که به عنوان «ایمن برای محیط زیست» نیز طبقه‌بندی می‌شود، با تمام استانداردهای زیست‌محیطی مطابقت دارد و دارای راندمان غیرفعال‌سازی میکروبی بالا در دماهای پایین و تأثیر کم بر ماتریس محصول می‌باشد. بررسی‌های بیشتر برای روشن کردن اثرات پلاسما سرد بر پارامترهای کیفی محصولات لبنی، از جمله ویژگی‌های حسی، حفظ ارزش غذایی و پایداری در طول نگهداری این محصولات مورد نیاز



شکل ۶- شرایط بهینه‌شده عملیات تیمار شیر درون بطری با پلاسما سرد

مشارکت نویسندگان

آزاده رنجبر ندامانی: جمع‌آوری داده، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن پیش‌نویس مقاله، آنالیز داده‌ها، ارائه ایده پژوهشی و طراحی مطالعه، بازبینی و اصلاح مقاله، نظارت بر مطالعه، تأیید نسخه نهایی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

است. علاوه بر این، اثر فناوری پلاسما غیرحرارتی در مقایسه با عملیات حرارتی مرسوم باید در محصولات بیشتر و در شرایط مختلف تیمار مورد مطالعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری جهت حمایت مالی از این پژوهش در قالب طرح به شماره ۲۰-۱۴۰۱-۰۲ سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- Balthazar, C. F., Pimentel, T. C., Ferrão, L. L., Almada, C. N., Santillo, A., Albenzio, M., . . . Cruz, A. G. (2017). Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 16(2), 247-262. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12250>
- Coutinho, N. M., Silveira, M. R., Rocha, R. S., Moraes, J., Ferreira, M. V. S., Pimentel, T. C., . . . Cruz, A. G. (2018). Cold plasma processing of milk and dairy products. *Trends in Food Science & Technology*, 74, 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.008>
- De Jong, P. (2008). Chapter 1-Thermal processing of milk. In Britz & Robinson (Eds.), *Advanced dairy science and technology* (pp. 2-34). Blackwell.
- Gurol, C., Ekinci, F. Y., Aslan, N., & Korachi, M. (2012). Low Temperature Plasma for decontamination of E. coli in milk. *Int J Food Microbiol*, 157(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.016>
- Ibarz, A., & Augusto, P. E. D. (2017). Chapter 3-Principles of unit operations in food processing. In Sant'Ana (Ed.), *Quantitative Microbiology in Food Processing* (pp. 68-83). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118823071.ch3>
- Kim, H.-J., Yong, H. I., Park, S., Kim, K., Choe, W., & Jo, C. (2015). Microbial safety and quality attributes of milk following treatment with atmospheric pressure encapsulated dielectric barrier discharge plasma. *Food Control*, 47, 451-456. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.053>
- Korachi, M., Ozen, F., Aslan, N., Vannini, L., Guerzoni, M. E., Gottardi, D., & Ekinci, F. Y. (2015). Biochemical changes to milk following treatment by a novel, cold atmospheric plasma system. *International Dairy Journal*, 42, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.10.006>
- Lee, H.-J., Jung, S., Jung, H.-S., Park, S.-H., Choe, W.-H., Ham, J.-S., & Jo, C. (2012). Evaluation of a dielectric barrier discharge plasma system for inactivating pathogens on cheese slices. *Journal of Animal Science and Technology*, 54(3), 191-198. <https://doi.org/10.5187/jast.2012.54.3.191>
- Misnal, M. F. I., Redzuan, N., Zainal, M. N. F., Ahmad, N., Raja Ibrahim, R. K., & Agun, L. (2022). Cold Plasma: A Potential Alternative for Rice Grain Postharvest Treatment Management in Malaysia. *Rice Science*, 29(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2021.12.001>
- Ng, S. W., Lu, P., Rulikowska, A., Boehm, D., O'Neill, G., & Bourke, P. (2021). The effect of atmospheric cold plasma treatment on the antigenic properties of bovine milk casein and whey proteins. *Food Chem*, 342, 128283. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128283>
- Nikmaram, N., & Keener, K. M. (2022). The effects of cold plasma technology on physical, nutritional, and sensory properties of milk and milk products. *LWT*, 154, 112729. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112729>
- Sharma, S., & Singh, R. K. (2022). Effect of atmospheric pressure cold plasma treatment time and composition of feed gas on properties of skim milk. *LWT*, 154, 112747. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112747>

- Wang, S., Liu, Y., Zhang, Y., Lü, X., Zhao, L., Song, Y., . . . Ge, W. (2022). Processing sheep milk by cold plasma technology: Impacts on the microbial inactivation, physicochemical characteristics, and protein structure. *LWT*, 153, 112573. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112573>
- Wang, Y., Wang, Z., Yang, H., & Zhu, X. (2020). Gas phase surface discharge plasma model for yeast inactivation in water. *Journal of Food Engineering*, 286, 110117. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110117>
- Xiang, Q., Liu, X., Liu, S., Ma, Y., Xu, C., & Bai, Y. (2019). Effect of plasma-activated water on microbial quality and physicochemical characteristics of mung bean sprouts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.11.012>
- Yong, H. I., Kim, H.-J., Park, S., Kim, K., Choe, W., Yoo, S. J., & Jo, C. (2015). Pathogen inactivation and quality changes in sliced cheddar cheese treated using flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma. *Food Research International*, 69, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.008>

Optimization of Determined Pathogenes Deactivation and Investigating the Quality of Bottled Milk under Cold-Plasma Treatment

Azadeh Ranjbar Nedamani 

Department of Biosystem Engineering, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran

* Corresponding author (a.ranjbar@sanru.ac.ir)

Abstract

In this study, a surface discharge plasma system including a cylindrical system was used for the treatment of milk in bottle. Electric discharge was performed to the electrode with the studied frequency and voltage. To optimization the process, the Design Expert software and optimal factorial design were used. The destruction time of *Bacillus cereus*, *Bacillus Coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, and *Clostridium botulinum* microorganisms, nutritional compounds or the occurrence of chemical reactions, and the time of inactivation of catalase, alkaline phosphatase, lipase, peroxidase, and protease enzymes, bovine serum albumin, immunoglobulins, alpha lactalbumin, beta lactalbumin, lysine and thiamine were also considered as answers in the Design Expert. The simulation was performed by COMSOL a3.5 software for a two-dimensional geometry. Among the four studied bacteria, *Bacillus stearothermophilus* had the highest resistance to cold plasma and other bacteria showed low resistance. In Cold plasma treatment wich investigated in this study, changes in initial temperature had a greater effect on the amount of production of active species than changes in voltage. Under the influence of non-thermal plasma treatment, the denaturation time of the studied proteins and amino acids has a significant difference at the 5% level. In the meantime, the inactivation time of lysine amino acid was shorter than other cases, and β -lactalbumin protein had the longest destruction time. Cold plasma technology can be used as a new antimicrobial intervention to inactivate pathogens and improve the safety of dairy products.

Key words: Bottled milk, Cold plasma, Comsol, Response surface methodology, Sterilization

