

The use of atmospheric cold plasma technology in reducing the antibiotic residue and microbial load in discarded dairy milk

Mohsen Mahroghi¹, Kaveh Jafari Khorshidi²

¹ Graduate, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, Email: mmahroughi1395@gmail.com

² Associate Professor, Department of Animal Sciences, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:

Received: 05/16/2024
Revised: 07/16/2024
Accepted: 07/17/2024

Keywords:

Atmospheric cold
plasma
Discarded milk
Industrial cattle breeding
Milk antibiotic

ABSTRACT

Background and Objective: cold plasma of a semi-ionized gas includes ions, electrons, ultraviolet photons and radicals. Cold plasma is a non-thermal technology that uses high-energy and reactive gases to inactivate microorganisms on the surface of food products. In general, cold plasma is used to destroy chemicals or organic bacteria, airborne bacteria, and to disinfect food and equipment packaging. The purpose of this experiment was to investigate the use of atmospheric cold plasma technology in reducing antibiotic residue and microbial load in dairy milk.

Materials and Methods: In this study, to investigate the effect of atmospheric cold plasma, atmospheric dielectric barrier discharge device was used. An electric current of 30 milliamps and a sinusoidal current type with a frequency of 20 kHz. 50 ml of milk containing 6 µg/ml antibiotic enrofloxacin and bacteria *Staphylococcus aureus* were used for the experiments. In order to investigate the effect of plasma on the reduction of antibiotic activity, sterile milk was exposed to plasma between 0 and 20 minutes. Then, for the antibiogram test, Mueller Hinton agar culture medium was prepared in the amount of 20 ml in a plate with a diameter of 10. After 18 hours of incubation of bacteria in Tryptic Soy Broth culture medium. Its antibacterial activity was determined by measuring the inhibition zone diameter. To count bacteria, 10 ml volume of milk after inoculation with desired bacteria at the rate of 107 CFU/mL was subjected to plasma flow for a certain period of time. CECIL-1100 HPLC device was used to evaluate the amount of antibiotic reduction. The column of this device was Eclipse plus C18 from Zorbox company. To evaluate the quality characteristics of milk, 25 sterile milk samples were subjected to plasma flow at zero, 5, 10, 15 and 20 minutes. LactoScope FT-B device was used. Color values included L* (light), a* (red) and b* (yellow), which were measured using a chlorometer (CI-7600, X-Rite, Michigan, USA).

Results: The results showed that increasing the time of plasma flow in milk caused a significant decrease in the growth rate of bacteria ($P < 0.05$). Also, the rate of bacterial inactivation decreased significantly and became similar to sterile milk prepared from the

market ($P<0.05$). Therefore, oxidizing agents and high-energy electrons in cold plasma effectively destroy enrofloxacin. With increasing plasma time, milk factors including fat percentage, electrical conductivity (milliseconds), non-protein nitrogen (mg/100 grams), percentage of trans fatty acids and percentage of saturated fatty acids and melamine (mg/kg) increased as well as percentage of non-fat solids, lactose, fatty acid in cis state, sucrose, pH, freezing point, ratio of both volatile fatty acids to milk fat (milliequivalent to 100 grams of fat), and citric acid to citrate (mg/kg) also increased. No significant changes were reported in the density (g/ml) and percentages of each crude protein total solids, mono fatty acid, casein, water and total protein. No changes in ΔE were observed during the cold plasma process, while a color change of 1.15 was recorded during the pasteurization process.

Conclusion: According to the results of this study, it can be concluded that atmospheric cold plasma with a cold plasma flow time of less than 10 minutes and a voltage below 8 kV can be used as a powerful strategy for discarded milk sterilization should be discussed.

Cite this article: Mahroghi, M., Jafari Khorshidi, K. (2025). The use of atmospheric cold plasma technology in reducing the antibiotic residue and microbial load in discarded dairy milk. *Journal of Ruminant Research*, 13(1), 95-106.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/ejrr.2024.22451.1956

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

استفاده از فناوری پلاسمای سرد اتمسفریک در کاهش باقی مانده آنتی بیوتیک و بار میکروبی شیرهای دورریز صنعت گاوداری

محسن محروقی^۱، دکتر کاوه جعفری خورشیدی^۲

^۱ دانش آموخته، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، رایانامه: mmahroughi1395@gmail.com

^۲ دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائم شهر، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی	سابقه و هدف: پلاسمای سرد یک گاز نیمه یونیزه شده شامل یون ها، الکترون ها، فوتون های فرابنفش و رادیکال ها می باشد. پلاسمای سرد یک فناوری غیرحرارتی است که از گازهای پر-انرژی و واکنشی برای غیرفعال کردن میکروارگانیسم های موجود در سطح محصول غذایی استفاده می کند. به طور کلی، پلاسمای سرد برای از بین بردن مواد شیمیایی یا باکتری های آلی، باکتری های معلق در هوا و برای ضد عفونی کردن بسته بندی تجهیزات و مواد غذایی استفاده می شود هدف از انجام این آزمایش بررسی استفاده از فناوری پلاسمای سرد اتمسفریک در کاهش باقی مانده آنتی بیوتیک و بار میکروبی شیرهای دورریز صنعت گاوداری بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۲/۲۷ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۲۷	مواد و روش ها: در این مطالعه جهت بررسی اثر پلاسمای سرد اتمسفریک (گاز ورودی هوا)، از دستگاه تخلیه سد دی الکتریک اتمسفریک استفاده شد. برای انجام آزمایشات از ۵۰ میلی لیتر شیر حاوی ۶ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک انروفلوکساسین و باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. جهت بررسی اثر پلاسما بر کاهش فعالیت آنتی بیوتیک، شیر استریل در بازه های زمانی ۰ تا ۲۰ دقیقه در معرض پلاسما قرار گرفتند. سپس برای تست آنتی بیوگرام، محیط کشت مولر هیتون آگار به میزان ۲۰ میلی لیتر در پلیت با قطر ۱۰ تهیه شد. پس از طی ۱۸ ساعت انکوباسیون باکتری در محیط کشت Tryptic Soy Broth، اثر ضدباکتریایی آن با استفاده از اندازه گیری قطر هاله مهار رشد محاسبه شد. برای شمارش باکتری حجم ۱۰ میلی لیتری شیر پس از تلقیح باکتری موردنظر به میزان 10^5 CFU/ml، تحت شارش پلاسما به مدت مشخص قرار گرفت. ارزیابی مقدار آنتی بیوتیک با دستگاه HPLC با نام تجاری CECIL-1100 انجام شد. ستون این دستگاه Eclipse pluse C18 از شرکت Zorbox بود برای ارزیابی ویژگی های کیفی شیر از ۲۵ نمونه شیر استریل در زمان صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه تحت شارش پلاسما قرار گرفت و سپس از دستگاه LactoScope FT-B جهت اندازه گیری ویژگی های کیفی شیر استفاده شد. مقادیر رنگ شامل *L* (روشن) *a* (قرمز) و *b* (زرد) بود که با استفاده از کلرومتر (CI-7600, X-Rite, Michigan, USA) اندازه گیری شد.
واژه های کلیدی: آنتی بیوتیک شیر پلاسمای سرد اتمسفری شیر دورریز گاوداری صنعتی	یافته ها: نتایج نشان داد افزایش زمان شارش پلاسما بر شیر، باعث کاهش قابل توجهی در میزان

رشد باکتری شد ($P < 0/05$). همچنین نرخ غیرفعال سازی باکتری به طور معنی داری کاهش پیدا کرد و مشابه با شیر استریل تهیه شده از بازار شد ($P < 0/05$)؛ بنابراین گونه های اکسیدکننده و الکترون های پرانرژی در پلاسمای سرد به خوبی باعث تخریب انروفلوکساسین می شود. با افزایش زمان پلاسمای فاکتورهای شیر از جمله درصد چربی، هدایت الکتریکی (میلی ثانیه)، نیتروژن غیر پروتئینی (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم)، درصد اسیدهای چرب ترانس و درصد اسیدهای چرب اشباع و ملامین (میلی گرم بر کیلوگرم) افزایش یافت و درصد مواد جامد غیر چربی، pH، درصد لاکتوز، نقطه انجماد، درصد اسید چرب در حالت سیس، درصد ساکارز، نسبت اسید چرب فرار به چربی شیر (میلی اکی والان به ۱۰۰ گرم چربی)، اسید سیتریک به سترات (میلی گرم به کیلوگرم) افزایش یافت، همچنین مقدار درصد پروتئین خام، درصد مواد جامد درصد اسید چرب مونو، چگالی (گرم بر میلی لیتر)، درصد کازئین، درصد آب و درصد پروتئین کل هیچ تغییری نکرد. در طول فرایند پلاسمای سرد هیچ گونه تغییراتی در مقادیر رنگ مشاهده نشد درحالی که در طی فرایند پاستوریزاسیون تغییر رنگ ۱/۱۵ ثبت شد

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه می توان به این جمع بندی رسید که پلاسمای سرد اتمسفری در زمان شارش پلاسمای سرد کمتر از ۱۰ دقیقه و ولتاژ زیر ۸ کیلوولت می تواند به عنوان یک استراتژی بالقوه جهت استریل سازی شیر دورریز مطرح گردد.

استناد: محروقی، محسن؛ جعفری خورشیدی، کاوه. (۱۴۰۴). استفاده از فناوری پلاسمای سرد اتمسفریک در کاهش باقی مانده آنتی بیوتیک و بار میکروبی شیرهای دورریز صنعت گاو داری. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۱۳ (۱)، ۹۵-۱۰۶.

DOI: 10.22069/ejrr.2024.22451.1956

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان



© نویسندگان.

مقدمه

شیر کامل، جایگزین شیر و شیر دورریز رایج‌ترین خوراک‌های مایع برای گوساله‌ها در گاوداری‌ها می‌باشند (Zhang و همکاران، ۲۰۱۹). اگرچه شیر کامل به‌عنوان بهترین خوراک مایع برای گوساله‌ها در نظر گرفته می‌شود، اما عمدتاً برای مصرف انسان تولید می‌شود (Moore و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به گسترش گاوداری‌ها، مقدار زیادی شیر دورریز از جمله شیر با باقیمانده آنتی‌بیوتیک در بیماری‌های مانند ورم پستان تولید می‌شود. شیر دورریز شیری است که برای فروش به کارخانه مناسب نیست و مربوط به گاوهای است که بلافاصله تحت درمان با داروها (آنتی‌بیوتیک‌ها، داروهای ضدالتهاب یا ضد انگلی) قرار گرفته‌اند، یا از گاوهایی که درمانشان کامل شده است و در زمان منع مصرف شیرشان هستند دوشیده شده است (Zou و همکاران، ۲۰۱۷). از آنجایی که تجاری‌سازی آن از نظر قانونی ممنوع است، شیر دورریز به یک مسئله زیست‌محیطی برای گاوداری‌های صنعتی تبدیل شده است. دفع مناسب این‌گونه مواد مستلزم سیستم‌های تصفیه زباله مانند هاضمه‌های زیستی و استخرهای ته‌نشینی است. از سوی دیگر، ارائه خوراک مایع بارزش غذایی بالا و هزینه کم برای گوساله‌های جوان یکی دیگر از چالش‌های گاوداری‌های صنعتی است. برای جلوگیری از هزینه‌های بالای دفع صحیح و کاهش هزینه‌های تغذیه، بسیاری از گاوداری‌ها معمولاً از شیر دورریز در تغذیه گوساله‌ها استفاده می‌کنند. اگرچه تغذیه شیر دورریز از نظر اقتصادی یک گزینه مقرون‌به‌صرفه است، اما با توجه به بار میکروبی بالا و وجود بقایای آنتی‌بیوتیک در شیر دورریز، این عمل ممکن است خطراتی برای سلامتی گوساله‌ها به همراه داشته باشد (Duse و همکاران، ۲۰۱۳). استفاده از شیر دورریز گاوهای مبتلا به عفونت، مانند ورم پستان، در تغذیه گوساله‌ها موضوع بحث‌برانگیز دیگری را

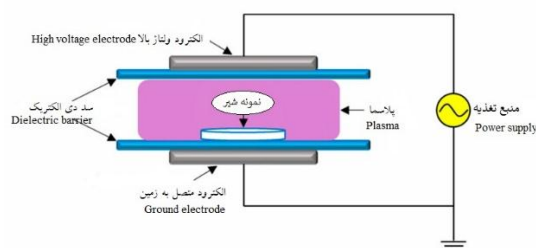
تشکیل می‌دهد (Zou و همکاران، ۲۰۱۷). نگرانی اصلی در استفاده از شیر دورریز مقادیر بیش‌ازحد باکتری‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها است (Aust و همکاران، ۲۰۱۳). استفاده از شیر خام یا فرآورده‌های آن (که با بسیاری از عوامل بیماری‌زا از جمله لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، باسیلوس سرئوس، سالمونلا، کمپیلوباکتر، کلوستریدیوم بوتولینوم مرتبط است) یکی از موارد مهم در بروز بیماری‌های ناشی از غذا در سراسر جهان است (Claeys و همکاران، ۲۰۱۳؛ Aadil و همکاران، ۲۰۱۵). استفاده از گرمای بیش‌ازحد در طول فرآوری مانند پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون منجر به آسیب به اجزای شیر می‌شود که منجر به کاهش محتوای مواد مغذی و کیفیت نامطلوب آن می‌شود (Fellows، ۲۰۰۹). فن‌آوری‌های نوآورانه جدید همچنین منجر به کاهش مصرف آب و انرژی در فرآوری مواد غذایی می‌شود که در نهایت باعث کاهش ردپای آب و کربن می‌شود (Knoerzer و همکاران، ۲۰۱۵). پلاسمای سرد یک گاز نیمه یونیزه شده شامل یون‌ها، الکترون‌ها، فوتون‌های فرابنفش و رادیکال‌ها می‌باشند. به‌طور کلی، پلاسمای سرد برای از بین بردن مواد شیمیایی یا باکتری‌ها، باکتری‌های معلق در هوا و برای ضدعفونی کردن بسته‌بندی تجهیزات، سطوح کار و سطوح مواد غذایی استفاده می‌شود (Thirumdas و همکاران، ۲۰۱۵). زمانی که از هوا (نیتروژن فعال یا اکسیژن فعال) استفاده می‌شود پلاسمای سرد اتمسفریک نامیده می‌شود (Chen و همکاران، ۲۰۲۴). از آنجایی که پلاسمای سرد دارای ویژگی‌های غیر-حرارتی است، این می‌تواند تکنولوژی عالی برای محصولات حساس به گرما استفاده شود (Dasan و همکاران، ۲۰۱۶)؛ بنابراین پلاسمای سرد برای کاهش باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک و بار میکروبی شیرهای دورریز صنعت گاوداری مناسب است. هدف از انجام این

الکتریکی برق ورودی: ۲۲۰ ولت، توان مصرفی: ۱۳۰ وات، ولتاژ: ۱۲ کیلو ولت، جریان الکتریکی ۳۰ میلی آمپر و نوع جریان سینوسی با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز استفاده شد. همچنین دارای ۲ دی الکتریک از جنس کوارتز با ضخامت ۲ میلی متر است که به فاصله ۴ سانتی متر از هم قرار دارند و ظرف نمونه شیر با حجم ۵۰ میلی لیتر در بین این دو الکترود قرار دارد و در معرض پلاسمای سرد می باشد (شکل ۱)

آزمایش بررسی استفاده از فناوری پلاسمای سرد اتمسفریک در کاهش باقی مانده آنتی بیوتیک و بار میکروبی شیرهای دورریز صنعت گاوداری و بررسی خواص کیفی شیر در شرایط آزمایشگاهی و حجم ۵۰ میلی لیتر بود.

مواد و روش ها

در این مطالعه جهت بررسی اثر پلاسمای سرد اتمسفریک (گاز ورودی هوا)، از دستگاه تخلیه سد دی الکتریک اتمسفریک با منبع تغذیه با مشخصه ای



شکل ۱- شماتیک از دستگاه پلاسمای سرد تخلیه سد دی الکتریک

Figure 1- schematic diagram of dielectric barrier discharge cold plasma equipment

$$IR(\%) = \left(1 - \frac{Nf}{N0}\right) \times 100$$

که در آن Nf و $N0$ به ترتیب غلظت باکتری با غلظت (CFU/ml) قبل و بعد از شارش پلازما می باشد جهت بررسی اثر پلاسمای سرد بر کاهش آنتی بیوتیک شیر ابتدا شیر استریل از بازار، کشت خالص استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 10917) و آنتی- بیوتیک انروفلوکساسین تهیه شد. در شروع هر آزمایش ۱۰ برابر غلظت حداقل بازدارندگی باکتری آنتی بیوتیک در یک میلی لیتر حلال کاملاً حل شد و به ۱۰ میلی لیتر شیر استریل اضافه شد و به مدت یک دقیقه با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه هم زده شد. سپس از شیر حاوی آنتی بیوتیک رقت سازی دو برابری تا ۹ مرحله انجام گرفت. برای تست آنتی- بیوگرام، محیط کشت مولر هیتون آگار به میزان ۲۰ میلی لیتر در پلیت با قطر ۱۰ تهیه شد. پس از طی ۱۸ ساعت انکوباسیون باکتری خالص در محیط Tryptic

جهت بررسی اثر پلاسمای سرد بر بار میکروبی شیر ابتدا شیر خام از گاوداری و سپس کشت خالص از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 10917) تهیه شد. شمارش باکتری قبل و بعد از شارش پلازما بر شیر خام حاوی باکتری طی فواصل زمانی ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه در محیط کشت اختصاصی باکتری (Tryptic Soy Broth) انجام شد. در شروع هر آزمایش یک حجم ۵۰ میلی لیتری شیر پس از تلقیح باکتری موردنظر به میزان 10^5 cfu/ml، تحت شارش پلازما به مدت مشخص قرار گرفت. نمونه اخذشده به سرعت در ظرف یخ سرد شد. سپس به منظور شمارش باکتری، نمونه رقیق سازی شده و در محیط اختصاصی کشت داده شد. تمامی نمونه های شیر پس از تست پلازما برای انجام آنالیزهای بعدی در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. نرخ غیرفعال باکتری به این شکل محاسبه شد:

انروفلوکساسین با عبور ۳ میلی لیتر متانول از ستون-ها جدا گردید. محلول متانولی به دست آمده زیر گاز ازت تسخیر شده و باقیمانده در ۱ میلی لیتر متانول حل و توسط فیلتر PTFE با قطر منافذ ۰.۴۵ میکرومتر صاف شد. ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق گردید. ارتفاع پیک های به دست آمده، برای ارزیابی دارو مورد استفاده قرار گرفت (Boatto و همکاران، ۱۹۹۹).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

آنالیز آماری داده های این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS ۱/۹ رویه GLM با ۵ تکرار انجام شد؛ و داده ها به صورت میانگین $\pm$ استاندارد انحراف نشان داده می شود. برای تجزیه آماری اطلاعات مربوط به میانگین از روش آزمون دانت در سطح ۵ درصد آنالیز شد.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

که در این معادله: Y_{ij} = مقدار هر مشاهده، μ = اثر تیمار، e_{ij} = خطای آزمایشی می باشد.

نتایج و بحث

pH و پارامترهای رنگ: نتایج مربوط به اثر pH و پارامترهای رنگ در جدول ۱ نشان داده شده است. pH شیر خام ۶/۷۵ بود و زمانی که شیر تحت شارش پلاسمای قرار گرفت، pH به طور معنی داری از ۶/۷۵ به ۶/۵۰ کاهش پیدا کرد. به علت اینکه لاکتوز در طی واکنش های حرارتی باعث تولید اسید فرمیک، اسید پیروویک، اسید استیک و سایر ترکیبات در طول فرایند می شود. دلیل اصلی افزایش pH، تولید اسید فرمیک در طی فرایند حرارتی می باشد (Coutinho و همکاران، ۲۰۱۹). پلاسمای سرد می تواند مقدار pH را کاهش دهد و باعث افزایش اسیدیته مایع و شیر غنی شده با یون هیدروژن شود، این نتیجه عمدتاً به واکنش های چند مرحله ای گونه های فعال تولید شده

Soy Broth، از این باکتری ۲ مرحله رقیق سازی در نرمال سیلین انجام شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی پلیت مولر هیتون کشت داده شد. پس از خشک شدن سطح پلیت دیسک ها (کاغذ صافی) با پنس استریل روی محیط کشت قرار داده شد و ۱۰ میکرولیتر از رقت های تهیه شده شیر روی دیسک ها ریخته و پس از خشک شدن در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. سپس با اندازه گیری قطر هاله، فعالیت آنتی بیوتیک را بررسی شد.

اندازه گیری pH و پارامترهای رنگ: مقادیر pH با استفاده از pH متر (PB-10, Sartorius, Gottingen, Germany) در دمای اتاق با بافر استاندارد در pH ۴، ۷ و ۱۰ کالیبره شد. خواص رنگ، نمونه های شیر به روش kim و همکاران (۲۰۱۵)، اندازه گیری شد. مقادیر رنگ شامل L^* (روشن)، a^* (قرمز) و b^* (زرد) بود که با استفاده از کلرومتر (CI-7600, X-Rite, Michigan, USA) اندازه گیری شد. تفاوت رنگ با استفاده فرمول ذیل محاسبه شد:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

که در آن مقادیر ΔL ، Δa و Δb ، اختلاف رنگ قبل و بعد از شارش پلاسمای می باشد. همچنین برای ارزیابی مقدار کاهش مقدار آنتی بیوتیک از دستگاه HPLC با نام تجاری CECIL-1100 استفاده شد. ستون این دستگاه Eclipse pluse C18 از شرکت Zorbox بود. جهت آماده سازی نمونه های شیر برای آزمون کروماتوگرافی، ۵ گرم از نمونه شیر به طور کامل همگن شده، ۲ میلی لیتر محلول ۲۰ درصد تری کلرواستیک اسید و ۲۰ میلی لیتر محلول بافر مک ایلواین افزوده شد. ابتدا ستون های SPE توسط عبور دادن ۳ میلی لیتر متانول و ۳ میلی لیتر آب فعال گردیدند. پس از آن ستون ها با ۲ میلی لیتر محلول متانول ۵ درصد در آب شستشو داده شد و در نهایت

شارش پلاسما این مقدار بیشتر شد و به ۹/۱ رسید. در نتیجه تجزیه و تحلیل رنگ با استفاده از یک رنگ-سنج نشان داد که تیمار پاستوریزاسیون منجر به تفاوت رنگ اندکی قابل توجه در شیر گاو در مقایسه با تیمار پلاسمای سرد شود، درحالی که تأثیر روی خواص رنگ با چشم غیرمسلح قابل تشخیص نیست. این نتایج را می توان به عنوان یک تغییر جزئی در رنگ طبیعی گاو (سفید متمایل به زرد) در نظر گرفت که ممکن است به واکنش بین گونه های فعال اکسیژن (ROS)، گونه های نیتروژن فعال (RNS) و ازن (O3) نسبت داده شده؛ که توسط پلاسمای سرد تولید می-شوند (Jahromi و همکاران، ۲۰۲۰).

توسط پلاسما مانند اسید نیتریک (HNO3) و اسید نیتروژن (HNO2) نسبت داده می شود (Liu و همکاران، ۲۰۱۰). مقدار L^* value (روشنی) در شیر استریل نسبت به شیر خام از ۸۸/۴۶ به ۸۹/۶۴ افزایش یافت. درحالی که در تیمارهای پلاسمای سرد هیچ گونه تفاوتی نداشتند. تفاوت رنگ کلی با استفاده از دلتا E بیان شد (ΔE^*) که نشان دهنده فاصله بین دو رنگ در $L^*a^*b^*$ است. در طول فرایند پلاسمای سرد هیچ-گونه تغییراتی در ΔE مشاهده نشد درحالی که در طی فرایند پاستوریزاسیون تغییر رنگ ۱/۱۵ ثبت شد. با توجه به ارزش b^* در شیر پاستوریزه ۸/۶۹ بود که تفاوت ناچیزی با شیر خام گاو داشت. با افزایش

جدول ۱- pH رنگ نمونه های خام و پلاسما شده

Table 1-The pH and color of the native and treatment with plasma samples

اختلاف رنگ Total color difference	ارزش زردی b* value	ارزش قرمزی a* value	ارزش روشنی L* value	pH	نمونه ها Samples
-	8.72±0.08 ^{cd}	-1.64± 0.09 ^a	88.46±0.23 ^b	6.75±0.03 ^a	شیر خام گاو untreated cow milk
1.15±0.15 ^a	8.69±0.06 ^{de}	-2.36±0.15 ^b	89.64± 0.4 ^a	6.72±0.02 ^{ab}	شیر استریل گاو pasteurized cow milk
0.41±0.02 ^b	9.1±0.07 ^{ab}	-1.58± 0.09 ^a	88.49±0.02 ^b	6.5±0.02 ^c	شیر پلاسماشده در زمان ۵ دقیقه CCM5
0.35±0.08 ^b	8.97±0.06 ^{ab}	-1.51± 0.05 ^a	88.41±0.02 ^b	6.65±.0.04 ^c	شیر پلاسماشده در زمان ۱۰ دقیقه CCM10
0.39±0.05 ^b	8.94±0.07 ^b	-1.85± 0.1 ^a	88.52±0.02 ^b	6.65±.0.04 ^c	شیر پلاسماشده در زمان ۱۵ دقیقه CCM15
0.43±0.14 ^b	9.0±0.04 ^e	-1.95±0.17 ^{ab}	88.53±0.02 ^b	6.5±.0.04 ^a	شیر پلاسماشده در زمان ۲۰ دقیقه CCM20

RCM شیر خام گاو، PCM شیر پاستوریزه گاو، PCM5، PCM10، PCM15 و PCM20 شیر تیمارشده با پلاسما در دقیقه ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ به ترتیب می-

باشد. حروف کوچک (a-f) نشان دهنده تفاوت معنی دار در بین گروه ها می باشد ($P<0.05$)

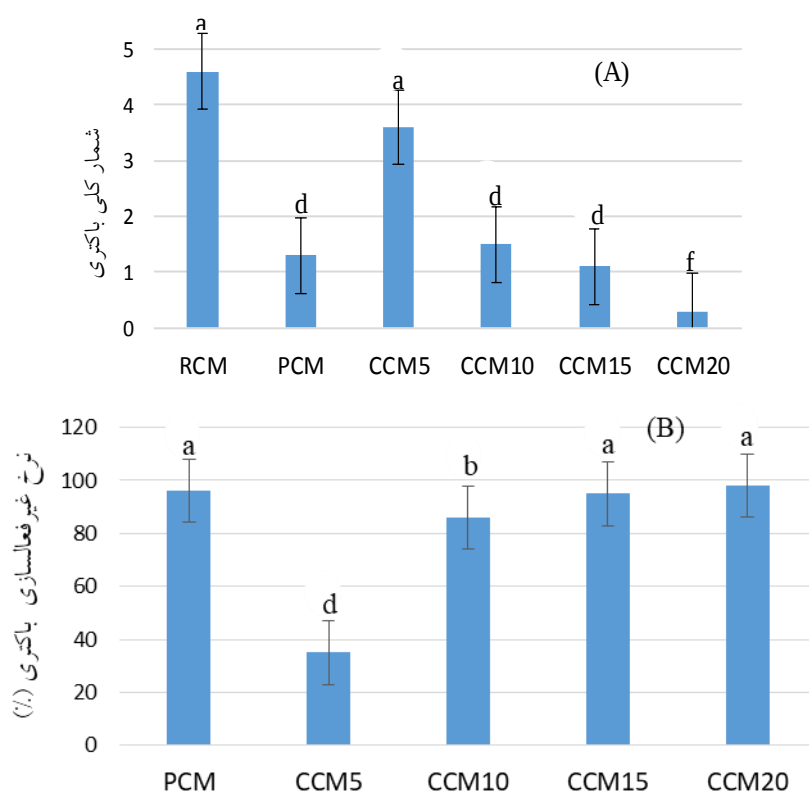
RCM; PCM; CCM5; CCM10; CCM15 and CCM20 refer to untreated, pasteurized, and cold plasma treatment for 5m, 10m, 15,20m, respectively. Different lowercase letters (a-f) represent the significant differences in the intergroup ($P<0.05$)

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داشت درحالی که روش پلاسمای سرد افزایش نرخ غیرفعال سازی بیشتر در زمان کمتر (۳۱ درصد به ۸۴ درصد در ۱۰ دقیقه) نسبت به پاستوریزاسیون داشت؛ و بعد ۱۵ دقیقه غیرفعال سازی باکتری کامل شد. گونه های فعال

شمار کلی باکتری و نرخ غیرفعال سازی باکتری: اثر ضد آلودگی شیر گاو پاستوریزه و تیمارشده با پلاسما سرد در زمان های مختلف فرآوری (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) بین زمان های فرآوری مختلف مقایسه شد. روش پاستوریزاسیون عملکرد مؤثری در کاهش

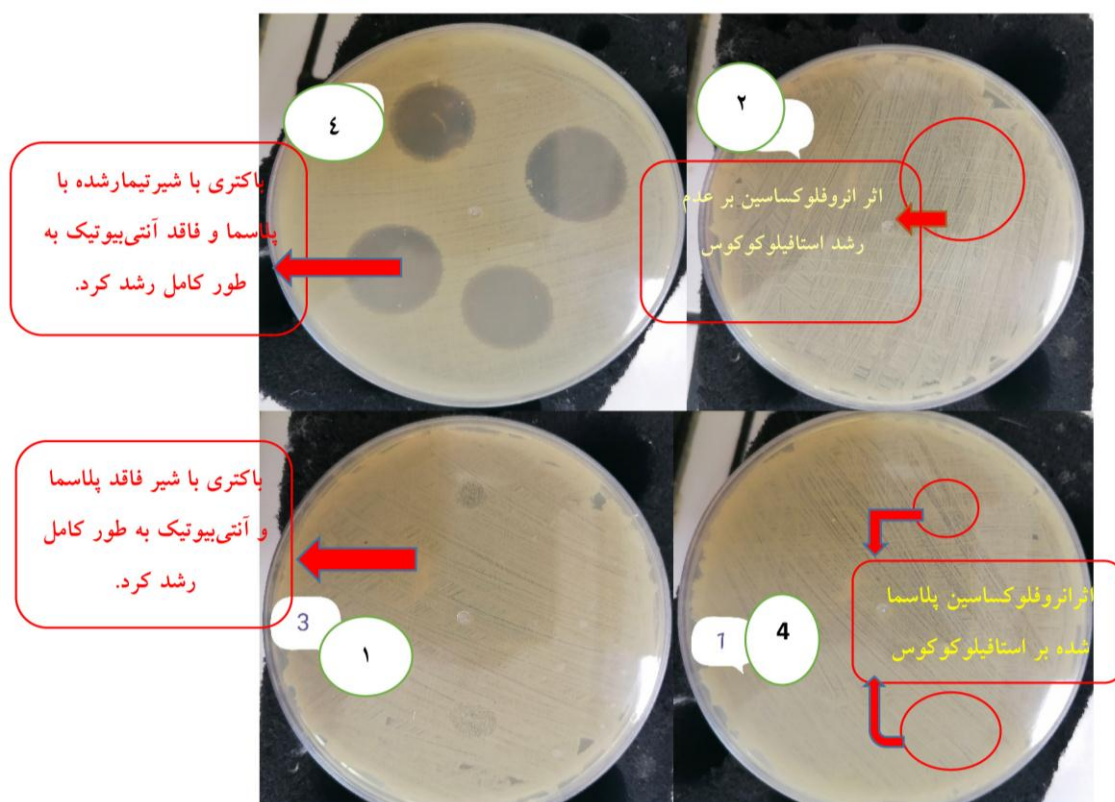
اکسیداسیون غشای سلولی و غیره هستند (Ma و همکاران، ۲۰۰۸). گسترده‌ترین روش غیرفعال میکروب‌ها زمانی است که غشای سلولی با ذرات باردار (یون‌های اتمی و مولکولی)، رادیکال‌های آزاد (یعنی O, OH) و مولکول‌های واکنش‌پذیر (O₂*, O₃ و NO) واکنش شیمیایی می‌دهند. به‌طور کلی پذیرفته شده است که گونه‌های باردار و رادیکال‌ها مانند الکترون، اکسیژن اتمی، ازن (O₃)، پراکسید هیدروژن (H₂O₂)، هیدروکسیل (OH)، هیدروپروکسیل (OOH)، اکسید نیتریک (NO)، نیتريت (NO₂-)، نیترات (NO₃-) و پراکسی نیتريت (ONOO-) مسئول کشتن باکتری‌ها توسط پلاسمای سرد اتمسفری هستند (Shen و همکاران، ۲۰۱۶).

نیترژن و اکسیژن با ماکرو مولکول‌هایی مانند اسیدهای آمینه، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها برهم‌کنش می‌کنند و باعث مرگ و آسیب میکروبی می‌شود. علاوه بر این، تجمع ذرات باردار روی سطح غشای سلول باعث پارگی غشا می‌شوند. فوتون‌های UV، DNA میکروارگانیسم‌ها را تغییر می‌دهند (Smet و همکاران، ۲۰۱۶). گونه‌های فعال اکسیژن (ازن، O₃)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) و اکسیژن اتمی (O) که در حضور اکسیژن در طی فرآیند پلازما تولید می‌شوند، مهم‌ترین اجزای غیرفعال، آسیب سلولی و مرگ میکروب‌ها می‌باشند (Fridman و همکاران، ۲۰۰۷). این گونه‌های واکنش‌پذیر دلیل واکنش‌های بیولوژیکی مانند شکستگی DNA، تخریب پروتئین،



شکل ۱- شماتیک از دستگاه پلاسمای سرد تخلیه سد دی‌الکتریک. (A) شمار کل باکتری (log CFU/ml) نرخ غیرفعال سازی باکتری. RCM شیر خام گاو، PCM شیر پاستوریزه گاو، PCM5، PCM10، PCM15 و PCM20 شیر تیمار شده با پلازما در دقیقه ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ به ترتیب می‌باشد. حروف کوچک (a-f) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در بین گروه‌ها می‌باشد (P < 0.05)

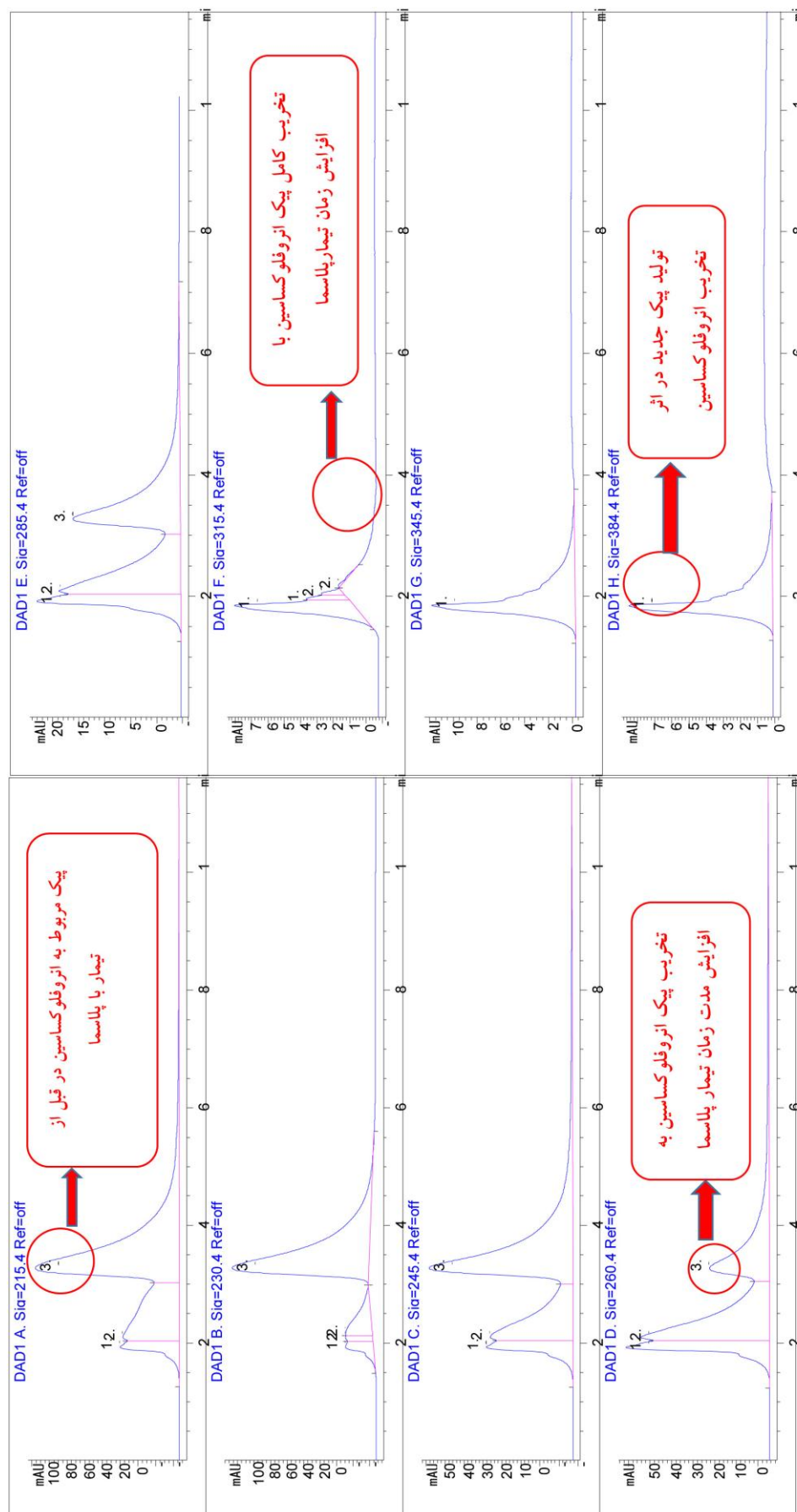
Figure 2- Decontamination efficacy of the native and processed sample. (A) Total bacterial count. (B) Microbial inactivation rate. RCM; PCM; CCM5; CCM10; CCM15 and CCM20 refer to untreated, pasteurized, and cold plasma treatment for 5m, 10m, 15,20m, respectively. Different lowercase letters (a-f) represent the significant differences in the intergroup (P < 0.05)



شکل ۲- تاثیر تیمار پلاسمای سرد بر فعالیت و تخریب آنتی بیوتیک انروفلوکساسین
Figure 2- The effect of cold plasma treatment on the activity and degradation of the antibiotic enrofloxacin

داده شده و باعث شد که باکتری به طور کلی رشد کند و نشان دهنده این می باشد پلازما تأثیر منفی در رشد باکتری ندارد. Kim و همکاران (۲۰۱۳)، از یک سیستم DBD استفاده کرده اند و باعث حذف ۶۰ تا ۹۰ درصد ۹ ترکیب آنتی بیوتیکی، یعنی لینکومایسین، سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین، کلرتراسایکلین، اکسی تراسایکلین، سولفاتiazول، سولفا متوکسازول، سولفامتازین و تری متوپریم شد. علاوه بر این، Sarangapani و همکاران (۲۰۱۷). نتایج حاصل از پردازش پلاسمایی در شکل ۳ نشان داده شده است. محور y کروماتوگرام اندازه شدت جذب (در واحد mAU یا واحد جذب کننده milli-Absorbance) است.

اثر تیمار پلاسمای سرد بر فعالیت و تخریب آنتی بیوتیک انروفلوکساسین در شکل ۲ نشان داده شده است. شکل شماره ۱ در چهار نقطه، شیر فاقد آنتی بیوتیک انروفلوکساسین و فاقد پلازما قرار داده شد و باعث شد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به طور کامل رشد کند. شکل شماره ۲ در چهار نقطه شیر حاوی آنتی بیوتیک بدون تیمار پلازما قرار داده شد همان طور که انتظار داشتیم در نقاط تیره آنتی بیوتیک انروفلوکساسین مانع رشد باکتری استافیلوکوکوس شد. در شکل شماره ۳ در چهار نقطه شیر حاوی آنتی بیوتیک و تحت تأثیر پلازما قرار داده شده و باکتری به کامل رشد کرد که نشان دهنده این است پلازما می تواند به طول کامل باعث تخریب آنتی بیوتیک انروفلوکساسین شود. شکل شماره ۴ مربوط به شیر فاقد آنتی بیوتیک و فاقد پلازما قرار



شکل ۳- کروماتوگرام محلول اولیه انروفلوکساسین در شیر تحت تیمار پلازما در بازه زمانی ۵ تا ۲۰ دقیقه

Figure 3- Chromatogram of initial solution of enrofloxacin in milk under plasma treatment in the time interval of 5 to 10 minutes.

محور x در واحد زمان برحسب دقیقه است. در این آنالیز زمان خروج پیک انروفلوکسازین در دقیقه ۴ مربوط به پیک شیر حاوی آنتی بیوتیک تحت تیمار پلاسما می باشد؛ که با قرار گرفتن محلول در برابر پلاسما سرد این پیک حذف شده و پیک جدیدی در دقیقه ۲ خارج شده و با افزایش زمان شارش پلاسما این پیک افزایش یافت. این نشان می دهد انروفلوکسازین تخریب می شود و پیک جدید ماده حاصل از تخریب انروفلوکسازین می باشد. افزایش تخریب ENRO به دلیل افزایش غلظت ROS و RNS در محلول آبی با پیشرفت پلاسما در زمان بود (Kim و همکاران، ۲۰۱۳). قدرت تخلیه بالاتر با افزایش تولید RNS (گونه های فعال نیتروژن) و ROS (گونه های فعال اکسیژن) و در نتیجه افزایش راندمان تخریب آلاینده های آلی در آب همراه است (Gue و همکاران، ۲۰۱۹).

اثر تیمار پلاسما سرد بر خواص کیفی شیر: اثر تیمار پلاسما سرد بر ویژگی های کیفی شیر در جدول ۲ نمایش داده شده است. با افزایش زمان پلاسما فاکتورهای شیر از جمله درصد چربی، هدایت الکتریکی (میلی ثانیه)، نیتروژن غیر پروتئینی (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم)، درصد اسیدهای چرب ترانس و درصد اسیدهای چرب اشباع و ملامین (میلی گرم بر کیلوگرم) افزایش یافت و درصد مواد جامد غیر چربی، pH، درصد لاکتوز، نقطه انجماد، درصد اسید چرب در حالت سیس، درصد ساکارز، نسبت اسید چرب فرار به چربی شیر (میلی اکی والان به ۱۰۰ گرم چربی)، اسید سیتریک به سیترات (میلی گرم به کیلوگرم) افزایش یافت، همچنین مقدار درصد پروتئین خام، درصد مواد جامد درصد اسید چرب مونو، چگالی (گرم بر میلی لیتر)، درصد کازئین، درصد آب و درصد پروتئین کل هیچ تغییری نکرد. از آنجایی که گونه های فعال اکسیژن بالاتر شامل

رادیکال OH و اکسیژن اتمی منجر به سطح بالاتر اکسیداسیون چربی می شود، به حداقل رساندن غلظت گونه های فعال اکسیژن از طریق ولتاژ پایین تر، زمان کوتاه تر (زیر ۱۰ دقیقه) منجر به اکسیداسیون چربی کمتر می شود. غلظت کمتر O₂ در گاز اولیه مانند نیتروژن خالص نیز منجر به کاهش اکسیداسیون چربی می شود. رادیکال های آزاد مانند رادیکال هیدروکسیل که در طی پلاسما سرد تولید می شوند، با اسیدهای چرب غیراشباع واکنش نشان می دهند و منجر به شکسته شدن دوگانه می شوند (Kim و همکاران، ۲۰۱۵). به احتمال زیاد، رادیکال های آزاد مانند رادیکال های هیدروپروکسیل و اکسیژن منفرد تولید می شوند که نشان داده شده است که به اسیدهای چرب کوتاه تر تولیدکننده PUFA حمله می کنند (Ayala و همکاران، ۲۰۱۴). کاهش در محتوای لاکتوز به برهم کنش رادیکال OH با لاکتوز و در نتیجه انتزاع پروتون از دی ساکارید لاکتوز برای تشکیل رادیکال بدون قند مرتبط است. به طور کلی، بسته به شرایط اعمال شده، اثر پلاسما سرد ممکن است تغییر قابل توجهی ایجاد کند اگر فشار کم (۱۶ Pa) یا گاز نیتروژن اعمال شود (گونه های فعال اکسیژن وجود ندارد) تغییرات پروتئین حداقل است، اگر از هوا و ولتاژ بالا (۶۰ کیلوولت) و زمان طولانی درمان بیش از ۳۰ دقیقه استفاده شود، ممکن است به دلیل غلظت بالاتر گونه های فعال اکسیژن تولید شده، اکسیداسیون خفیف یا تجمع قابل توجهی ایجاد شود؛ بنابراین، برای به حداقل رساندن تغییر پروتئین، شرایط درمان باید متناسب باشد.

نتیجه گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد که پلاسما سرد می تواند به خوبی باعث تخریب آنتی بیوتیک و از بین رفتن باکتری در شیر شود ولی زمانی ولتاژ منبع تغذیه

کمتر از ۱۰ کیلوولت، سیستم تخلیه پلاسما از نوع سد
دی‌الکتریک و زمان تیمار شیر توسط پلاسمای سرد از
۵ تا ۱۰ دقیقه باشد، کمترین تأثیر را بر ویژگی‌های
کیفی شیر و همچنین باعث غیرفعال سازی باکتری و
تخریب مؤثر آنتی‌بیوتیک در شیر دورریز دارد.

منابع

- Aadil, R. Zeng. M., Ali. X. A., Zeng. A., Farooq. F., Han. M. A., Z., Khalid. S., & Jabbar. S. (2015). Influence of different pulsed electric field strengths on the quality of the grapefruit juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(10): 2290-2296. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.12891>.
- Aust.V, Knappstein, K., Kunz. H.J., Kaspar, H., Wallmann, J., Kaske, M. (2019). Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2013; 97 (6):1091–103.
- Ayala. A., Muñoz. M.F., & Argüelles. S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2- nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Boatto. G., Pau. A., Palomba. M., Arenare. L. & Cerri. R. (1999). Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999; 20 (1-2): 321- 6. PubMed PMID: 10704038
- Dasan. B.G., Mutlu. M., & Boyaci. I. H. (2016). Decontamination of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* spores on hazelnuts via atmospheric pressure fluidized bed plasma reactor. *International Journal of Food Microbiology*, 216: 50–59.
- Duse, A., Waller, K.P., Emanuelso, U., Unnerstad, H.E., Persson. Y. & Bengtsson. B. (2013). Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55: 49–57.
- Claeys. W. L., Cardoen. S., Daube. G., De Block. J., Dewettinck. K., Dierick. K., De Zutter. L., Huyghebaert. A., Imberechts. H., Thiange. P., Vandenplas. Y. & Herman, L. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 31(1): 251-262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.035>.
- Coutinho. N.M., Silveira. M.R., Fernandes. L.M., Moraes. J., Pimentel. T.C. & Freitas. M.Q. (2019). Processing chocolate milk drink by low-pressure cold plasma technology. *Food Chemistry*, 278: 276–283.
- Chen. Y., Yile, C. & Jiang, L. (2024). Mechanism of improving the digestibility of coconut globulin by atmospheric cold plasma treatment: the perspective of protein structure. *Food Hydrocolloids*, 2024-109886.
- Fellows. P. J. (2009). Food processing technology: Principles and practice. Elsevier.
- Fridman. G., Brooks. A.D., Balasubramanian. M., Fridman. A., Gutsol. A., Vasilets. V.N. & Friedman. G. (2007). Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria. *Plasma Processes and Polymers*, 4(4): 370–375.
- Guo, H., Jiang, N., Wang, H., Lu.N., & Shang, K. (2019). Degradation of antibiotic chloramphenicol in water by pulsed discharge plasma combined with TiO₂/WO₃ composites: mechanism and degradation pathway, *J. Hazard. Mater*, 371 : 666–676.
- Jahromi, M., Jahromi, M.X., Golmakani. M.T., Ajallouei. & Khalesi. F. M. (2020). Effect of dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma treatment on structural, thermal and techno-functional characteristics of sodium caseinate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66: 102542, 133 (2020) 109869, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109869>.
- 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.

- Kim, K.-S., Yang, C. S. & Mok, Y.S. (2013). Degradation of veterinary antibiotics by dielectric barrier discharge plasma. *Chemical Engineering Journal*, 219:19–27
- Knoerzer, K., Buckow, R., Trujillo, F. J. & Juliano, P. (2015). Multiphysics simulation of innovative food processing technologies. *Food Engineering Reviews*, 7(2): 64–81.
- Liu, F., Sun, P., Bai, N., Tian, Y., Zhou, H. & Wei, S. (2010). Inactivation of bacteria in an aqueous environment by a direct-current, cold-atmospheric-pressure air plasma microjet. *Plasma Processes and Polymers*, 7(3–4): 231–236.
- Ma, Y., Zhang, G. J., Shi, X. M., Xu, G.M. & Yang, Y. (2008). Chemical mechanisms of bacterial inactivation using dielectric barrier discharge plasma in atmospheric air. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 36(4): 1615–1620.
- Moore, D.A., Taylor, J., Hartman, M.L. & Sisco, W.M. (2009). Quality assessments of waste milk at a calf ranch. *Journal of Dairy Science*, 92: 3503–3509. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1623>.
- Sarangapani, C., Ryan Keogh, D., Dunne, J., Bourke, P. & Cullen, P. J. (2017). Characterisation of cold plasma treated beef and dairy lipids using spectroscopic and chromatographic methods. *Food Chemistry*, 235: 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.01>
- Smet, C., Noriega, E., Rosier, F., Walsh, J. L., Valdramidis, V. P. & Van Impe, J. F. (2016). Influence of food intrinsic factors on the inactivation efficacy of cold atmospheric plasma: Impact of osmotic stress, suboptimal pH and food structure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38: 393–406
- Shen, J. (2016). Bactericidal effects against *S. aureus* and physicochemical properties of plasma activated water stored at different temperatures. *Journal Scientific Reports*, 38: 285-55
- Thirumdas, R., Sarangapani, C., & Annapure, U. S. (2015). Cold plasma: A novel non-thermal technology for food processing. *Food Biophysics*, 10(1): 1–11.
- Zhang, R., Zhang, W.B., Bi, Y.L., Tu, Y., Beckers, Y., Du, H.C. & Diao, Q.Y. (2019). Early feeding regime of waste milk, milk, and milk replacer for calves has different effects on rumen fermentation and the bacterial community. *Animals*, <https://doi.org/10.3390/ani9070443>.
- Zou, Y., Wang, Y., Deng, Y., Cao, Z., Li, S. & Wang, J. (2017). Effects of feeding untreated, pasteurized and acidified waste milk and bunk tank milk on the performance, serum metabolic profiles, immunity, and intestinal development in Holstein calves. *Journal of Animal Science*, 8: 53.
- Sang, W., Cui, J., Cui, L., Zhang, Q., Li, Y., Li, D. & Zhang, W. (2019). Degradation of liquid phase N, N-dimethylformamide by dielectric barrier discharge plasma: Mechanism and degradation pathways, *Chemosphere*, 236 :124401.