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

Mohsen Mahroghi¹, K. Jafari Khorshidi²

¹ Graduate, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ghaemshar Branch, Islamic Azad University, Ghaemshar, Iran, Email: mmahroughi1395@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Full Paper

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.

Article history:

Received:

Revised:

Accepted:

Materials and Methods: In this study, in order 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. In order 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).

Keywords:

atmospheric cold plasma
discarded milk
industrial cattle breeding
milk antibiotic

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., Danesh Mesgaran, M., Vakili, S.A.R. (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), .



© The Author(s).

DOI:

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

استفاده از فناوری پلاسمای سرد اتمسفریک در کاهش باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک و بار میکروبی شیرهای دورریز صنعت گاوداری

محسن محروقی^{۱*} و کاوه جعفری خورشیدی^۲

^۱ دانش‌آموخته، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر

رایانامه: mmahroughi1395@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی - پژوهشی	سابقه و هدف: پلاسمای سرد یک گاز نیمه یونیزه شده شامل یون‌ها، الکترون‌ها، فوتون‌های فرا بنفش و رادیکال‌ها می‌باشد. پلاسمای سرد یک فناوری غیرحرارتی است که از گازهای پراثری و واکنشی برای غیرفعال کردن میکروارگانیزم‌های موجود در سطح محصول غذایی استفاده می‌کند. به‌طور کلی، پلاسمای سرد برای از بین بردن مواد شیمیایی یا باکتری‌های آلی، باکتری‌های معلق در هوا، و برای ضدعفونی کردن بسته‌بندی تجهیزات و مواد غذایی استفاده می‌شود هدف از انجام این آزمایش بررسی استفاده از فناوری پلاسمای سرد اتمسفریک در کاهش باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک و بار میکروبی شیرهای دورریز صنعت گاوداری بود.
تاریخ دریافت: تاریخ ویرایش: تاریخ پذیرش:	مواد و روش‌ها: در این مطالعه جهت بررسی اثر پلاسمای سرد اتمسفریک (گاز ورودی هوا)، از دستگاه تخلیه سد دی‌الکتریک اتمسفریک استفاده شد. برای انجام آزمایشات از ۵۰ میلی‌لیتر شیر حاوی ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. جهت بررسی اثر پلاسمای بر کاهش فعالیت آنتی‌بیوتیک، شیر استریل در بازه‌های زمانی ۰ تا ۲۰ دقیقه در معرض پلاسمای قرار گرفتند. سپس برای تست آنتی‌بیوگرام، محیط کشت مولر هینتون آگار به میزان ۲۰ میلی‌لیتر 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 اندازه‌گیری قطر هاله مهار رشد محاسبه شد. برای شمارش باکتری حجم ۱۰ میلی‌لیتری شیر پس از تلقیح باکتری موردنظر به میزان 10^5 CFU/ml، تحت شارش پلاسمای به مدت مشخص قرار گرفت. ارزیابی مقدار آنتی‌بیوتیک با دستگاه HPLC با نام تجاری CECIL-1100 انجام شد. ستون این دستگاه Eclipse pluse C18 از شرکت Zorbox بود برای ارزیابی ویژگی‌های کیفی شیر از ۲۵ نمونه شیر استریل در زمان صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه تحت شارش پلاسمای قرار گرفت و سپس از دستگاه LactoScope FT-B جهت اندازه‌گیری ویژگی‌های 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) اندازه‌گیری شد.
واژه‌های کلیدی: آنتی‌بیوتیک شیر پلاسمای سرد اتمسفری شیر دورریز گاوداری صنعتی	

یافته‌ها: نتایج نشان داد افزایش زمان شارش پلاسما بر شیر، باعث کاهش قابل توجهی در میزان رشد باکتری شد ($P < 0/05$). همچنین نرخ غیرفعالسازی باکتری به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد و مشابه با شیر استریل تهیه‌شده از بازار شد ($P < 0/05$). بنابراین گونه‌های اکسیدکننده و الکترون‌های پرانرژی در پلاسمای سرد به خوبی باعث تخریب انروفلوکساسین می‌شود. با افزایش زمان پلاسما فاکتورهای شیر از جمله درصد چربی، هدایت الکتریکی (میلی‌تانیسه)، نیتروژن غیرپروتئینی (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم)، درصد اسیدهای چرب ترانس و درصد اسیدهای چرب اشباع و ملامین (میلی‌گرم بر کیلوگرم) افزایش یافت و درصد مواد جامد غیرچربی، pH، درصد لاکتوز، نقطه انجماد، درصد اسید چرب در حالت سیس، درصد ساکارز، نسبت اسید چرب فرار به چربی شیر (میلی‌اکی والانت به ۱۰۰ گرم چربی)، اسید سیتریک به سترات (میلی‌گرم به کیلوگرم) افزایش یافت، همچنین مقدار درصد پروتئین خام، درصد مواد جامد درصد اسید چرب مونو، چگالی (گرم بر میلی‌لیتر)، درصد کازئین، درصد آب و درصد پروتئین کل هیچ تغییری نکرد. در طول فرایند پلاسما سرد هیچ گونه تغییری در مقادیر رنگ مشاهده نشد در حالی که در طی فرایند پاستوریزاسیون تغییر رنگ ۱/۱۵ ثبت شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان به این جمع‌بندی رسید که پلاسمای سرد اتمسفری در زمان شارش پلاسما سرد کمتر از ۱۰ دقیقه و ولتاژ زیر ۸ کیلوولت می‌تواند به‌عنوان یک استراژی بالقوه جهت استریل‌سازی شیر دوریز مطرح گردد.

استناد: محروقی، محسن؛ دانش‌مسگران، محسن؛ وکیلی، سیدعلیرضا. (۱۴۰۴). استفاده از فناوری پلاسما سرد اتمسفریک در کاهش باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک و بار میکروبی شیرهای دوریز صنعت گاوداری. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۱۳(۱).

DOI:

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان



© نویسندگان.

مقدمه

شیر کامل، جایگزین شیر و شیر دورریز رایج‌ترین خوراکی‌های مایع برای گوساله‌ها در گاوداری‌ها می‌باشند (Zhang و همکاران، ۲۰۱۹). اگرچه شیر کامل به عنوان 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 گاوهایی 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 شده‌است (Zou و همکاران، ۲۰۱۷). از آنجایی که تجاری‌سازی آن از نظر قانونی ممنوع است، شیر دورریز به یک مسئله زیست‌محیطی برای گاوداری‌های صنعتی تبدیل شده‌است. دفع مناسب این گونه مواد مستلزم سیستم‌های تصفیه زباله مانند هاضمه‌های زیستی و استخرهای ته‌نشینی است. از سوی دیگر، ارائه خوراک مایع با ارزش 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 مقرون به صرفه 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

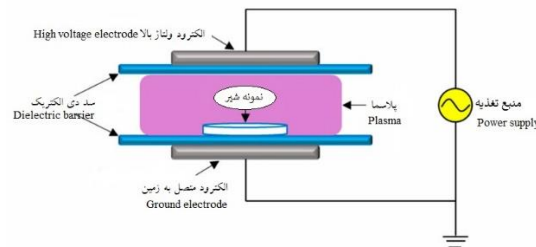
پستان، در تغذیه گوساله‌ها موضوع بحث برانگیز دیگری را تشکیل می‌دهد (Zou و همکاران، ۲۰۱۷). نگرانی اصلی در استفاده از شیر دورریز مقادیر بیش از حد باکتری‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها است (Aust و همکاران، ۲۰۱۳). استفاده از شیرخام یا فرآورده‌های آن (که با بسیاری از عوامل بیماری‌زا از جمله لیستریا مونوسی‌توز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، باسیلوس سرئوس، سالمونلا، کمپیلوباکتر، کلاستریدیم 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 بیش از حد 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. به طور 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). زمانیکه 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 غیرحرارتی 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

دی‌الکتریک اتمسفریک با منبع تغذیه با مشخصه‌ای الکتریکی برق ورودی: ۲۲۰ ولت، توان مصرفی: ۱۳۰ وات، ولتاژ: ۱۲ کیلوولت، جریان الکتریکی ۳۰ میلی‌آمپر و نوع جریان سینوسی با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز استفاده شد. همچنین دارای ۲ دی‌الکتریک از جنس کوارتز با ضخامت ۲ میلی‌متر است که به فاصله ۴ سانتی‌متر از هم قرار دارند و ظرف نمونه شیر با حجم ۵۰ میلی‌لیتر در بین این دو الکتروود قرار دارد و در معرض پلاسمای سرد می‌باشد (شکل ۱)

شیرهای دورریز صنعت گاوداری مناسب است. هدف از انجام این آزمایش بررسی استفاده از فناوری پلاسمای سرد اتمسفریک در کاهش باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک و بار میکروبی شیرهای دورریز صنعت گاوداری و بررسی خواص کیفی شیر در شرایط آزمایشگاهی و حجم ۵۰ میلی‌لیتر بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه جهت بررسی اثر پلاسمای سرد اتمسفریک (گاز ورودی هوا)، از دستگاه تخلیه سد



شکل ۱- شماتیک از دستگاه پلاسمای سرد تخلیه سد دی‌الکتریک

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 پلاسمای سرد می‌باشد جهت بررسی اثر پلاسمای سرد بر کاهش آنتی‌بیوتیک‌ها در ابتدا شیر استریل از بازار، کشت خالص استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 10917) و آنتی‌بیوتیک-انروفلوکساسین تهیه شد. در شروع هر آزمایش ۱۰ برابر غلظت حداقل با دارندگی باکتری آنتی‌بیوتیک در یک میلی‌لیتر حلال کاملاً حل شد و به ۱۰ میلی‌لیتر شیر استریل اضافه شد و به مدت یک دقیقه با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه هم زده شد. سپس از شیر حاوی آنتی‌بیوتیک رقت‌سازی دوبرابری تا ۹ مرحله انجام گرفت. برای تست آنتی‌بیوگرام، محیط کشت مولر هیتتون آگار به میزان ۲۰ میلی‌لیتر در پلیت با قطر ۱۰ تهیه شد. پس از طی ۱۸ ساعت انکوباسیون باکتری خالص در محیط Tryptic Soy

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 پلاسمای سرد 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 میلی‌لیتری شیر پس از تلقیح باکتری مورد نظر به میزان 10^5 cfu/ml، تحت شارش پلاسمای سرد به مدت مشخص قرار گرفت. نمونه اخذ شده به سرعت در ظرف یخ سرد شد. سپس به منظور شمارش باکتری، نمونه رقیق‌سازی شده و در محیط اختصاصی کشت داده شد. تمامی نمونه‌های شیر پس از تست پلاسمای سرد برای انجام آنالیزهای بعدی در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. نرخ غیر-فعال‌سازی باکتری به این شکل محاسبه شد:

انروفلوکسازین با عبور ۳ میلی لیتر متانول از ستون-ها جدا گردید. محلول متانولی به دست آمده زیر گاز ازت تبخیر 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 پیک‌های به دست آمده، برای ارزیابی دارو مورد استفاده قرار گرفت (Boatto و همکاران، ۱۹۹۹).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آنالیز آماری داده‌های این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS ۱/۹ رویه GLM با ۵ تکرار انجام شد. و داده‌ها به صورت میانگین \pm استاندارد انحراف نشان داده می‌شود. 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 می‌باشد

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 معنی‌داری از ۶/۷۵ به ۶/۵۰ کاهش پیدا کرد. به علت اینکه لاکتوز در طی واکنش‌های حرارتی باعث تولید اسید فرمیک، اسید پیروویک، اسید استیک و سایر ترکیبات در طول فرایند می‌شود. دلیل اصلی افزایش pH، تولید اسید فرمیک در طی فرایند حرارتی می‌باشد (Coutinho و همکاران، ۲۰۱۹). پلاسمای سرد می‌تواند مقدار pH را کاهش دهد و باعث افزایش اسیدیته مایع و شیر غنی شده با یون هیدروژن شود، این نتیجه عمدتاً به واکنش‌های چند مرحله‌ای گونه‌های فعال تولید شده

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 دیسک‌ها (کاغذ صافی) با پنس استریل روی محیط کشت قرار داده شد و ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده شیر روی دیسک‌ها ریخته و پس از خشک شدن در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد. سپس با اندازه‌گیری قطر هاله، فعالیت آنتی‌بیوتیک را بررسی شد

اندازه‌گیری 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، نمونه‌های شیر به روش kim و همکاران (۲۰۱۵)، اندازه‌گیری شد. مقادیر رنگ شامل L^* (روشن) a^* (قرمز) و b^* (زرد) بود که با استفاده از کلرومتر (CI-7600, X-Rite, Michigan, USA) اندازه‌گیری 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 می‌باشد. همچنین برای ارزیابی مقدار کاهش مقدار آنتی‌بیوتیک از دستگاه HPLC با نام تجاری CECIL-1100 استفاده شد. ستون این دستگاه Eclipse pluse C18 از شرکت Zorbox بود. جهت آماده‌سازی نمونه‌های 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 ستون‌های SPE توسط عبور دادن ۳ میلی لیتر متانول و ۳ میلی لیتر آب فعال گردیدند. پس از آن ستون‌ها 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 رنگ‌سنج نشان داد که تیمار پاستوریزاسیون منجر به تفاوت رنگ اندکی قابل توجه در شیر گاو در مقایسه با تیمار پلاسما سرد شود، در حالی که تأثیر روی خواص رنگ با چشم غیرمسلح قابل تشخیص نیست. این نتایج را می‌توان به عنوان یک تغییر جزئی در رنگ طبیعی گاو (سفید متمایل به زرد) در نظر گرفت که ممکن است به واکنش بین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، گونه‌های نیتروژن فعال (RNS) و ازن (O3) نسبت داده شود. که توسط پلاسما سرد تولید می‌شوند (Jahromi و همکاران، ۲۰۲۰).

توسط پلاسما مانند اسید نیتریک (HNO3) و اسید نیتروژن (HNO2) نسبت داده می‌شود (Liu و همکاران، ۲۰۱۰). مقدار L^* value (روشنی) در شیر استریل نسبت به شیر خام از ۸۸/۴۶ به ۸۹/۶۴ افزایش یافت. در حالی که در تیمارهای پلاسما سرد هیچ گونه تفاوتی نداشتند. تفاوت رنگ کلی با استفاده از دلتا E بیان شد (ΔE^*)، که نشان‌دهنده فاصله بین دو رنگ در $L^*a^*b^*$ است. در طول فرایند پلاسما سرد هیچ‌گونه تغییراتی در ΔE مشاهده نشد در حالی 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 نمونه‌های 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	نمونه‌ها 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 پلاسما شده 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 پلاسما شده 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 پلاسما شده 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 پلاسما شده در زمان ۲۰ دقیقه CCM20

RCM شیر خام گاو، PCM شیر پاستوریزه گاو، PCM5، PCM10، PCM15 و PCM20 شیر تیمار شده با پلاسما در دقیقه ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ به

ترتیب می‌باشد. حروف کوچک (A-f) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در بین گروه‌ها می‌باشد (P<0.05)

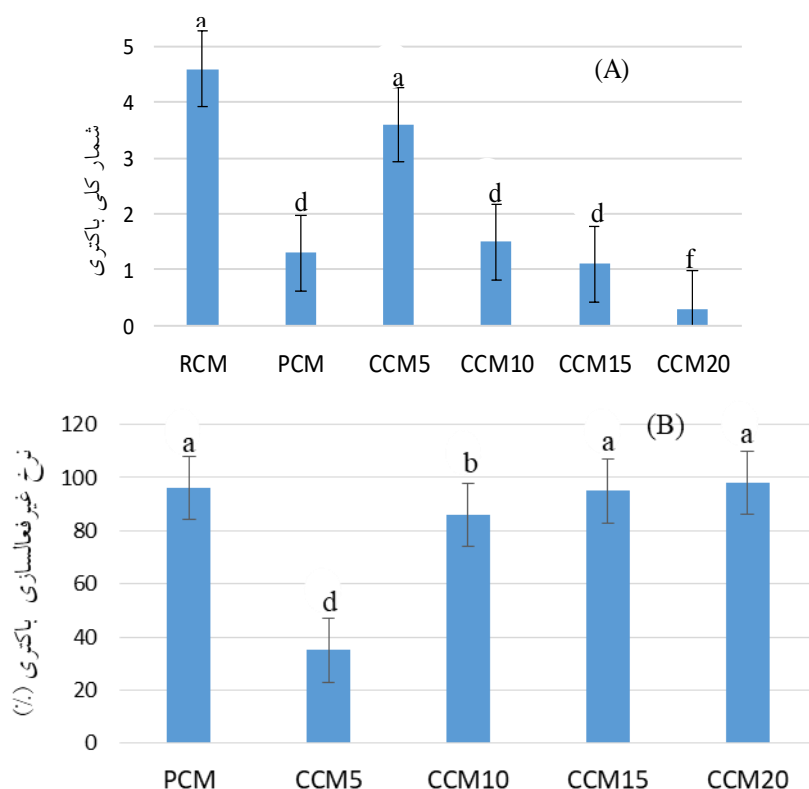
RCM; PCM; CCM5; CCM10; CCM15 and CCM20 refer to untreated, pasteurized, and cold plasma treatment for 5m, 10m, 15 ,20m, respectively. Different lowercase letters (a-f) represent the significant differences in the intergroup (P<0.05)

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داشت در حالی که روش پلاسما سرد افزایش نرخ غیرفعالسازی بیشتر در زمان کمتر (۳۱ درصد به ۸۴ درصد در ۱۰ دقیقه) نسبت به پاستوریزاسیون داشت. و بعد ۱۵ دقیقه غیرفعالسازی باکتری کامل شد. گونه‌های فعال

شمارکلی باکتری و نرخ غیرفعالسازی باکتری: اثر ضدآلودگی شیر گاو پاستوریزه و تیمار شده با پلاسما سرد در زمان‌های مختلف فرآوری (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) بین زمان‌های فرآوری مختلف مقایسه شد. روش پاستوریزاسیون عملکرد موثری در کاهش

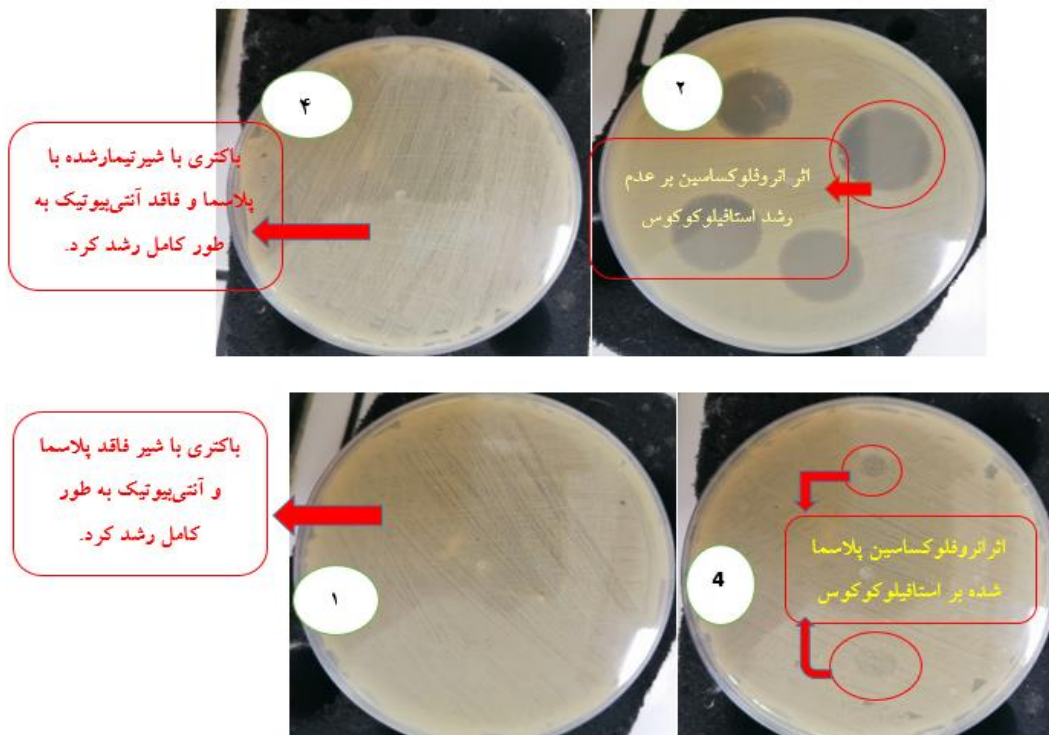
(Ma و همکاران، ۲۰۰۸). گسترده‌ترین روش غیرفعال‌سازی میکروب‌ها زمانی است که غشای سلولی با ذرات باردار (یعنی یون‌های اتمی و مولکولی)، رادیکال‌های آزاد (یعنی O, OH) و مولکول‌های واکنش‌پذیر (یعنی O₂*, O₃ و NO) واکنش شیمیایی می‌دهند. به طور کلی پذیرفته شده‌است که گونه‌های باردار و رادیکال‌ها مانند الکترون، 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).

نیتروژن و اکسیژن با ماکرومولکول‌هایی مانند اسیدهای آمینه، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها بر هم کنش 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 پلاسمای تولید می‌شوند، مهم‌ترین اجزای غیرفعال‌سازی، آسیب سلولی و مرگ میکروب‌ها می‌باشند (Fridman و همکاران، ۲۰۰۷). این گونه‌های واکنش‌پذیر دلیل واکنش‌های بیولوژیکی مانند شکستگی DNA، تخریب پروتئین، اکسیداسیون غشای سلولی و غیره هستند



شکل ۱- شکل شماتیک از دستگاه پلاسمای سرد تخلیه سد دی‌الکتریک. (A) شمار کل باکتری (log CFU/ml) (B) نرخ غیرفعال‌سازی باکتری. RCM، شیر خام گاو، PCM شیر پاستوریزه گاو، CCM5، PCM10، PCM15، PCM20 و شیر تیمار شده با پلاسمای سرد 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)

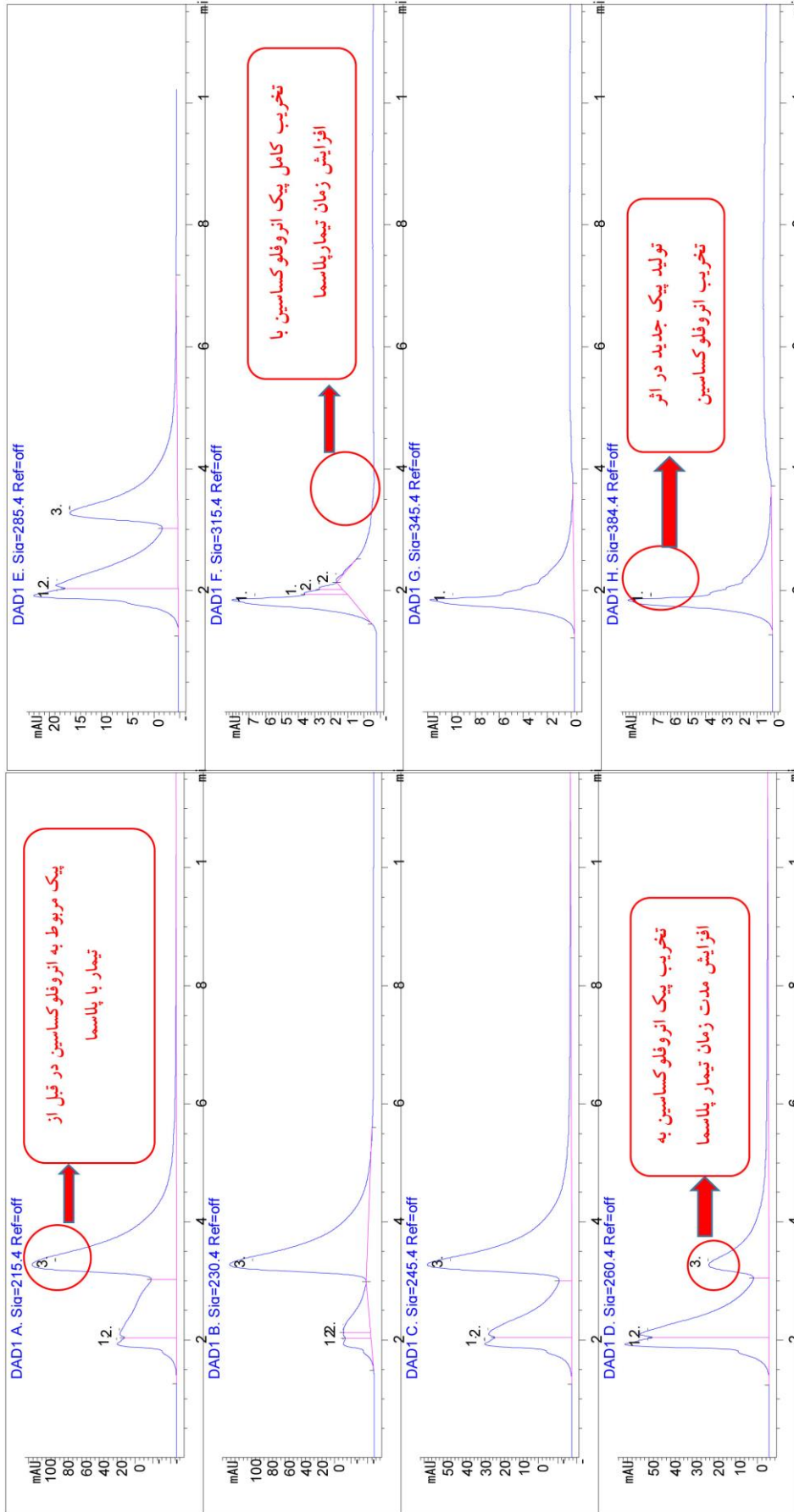


شکل ۲- تاثیر تیمار پلاسمای سرد بر فعالیت و تخریب آنتی بیوتیک انروفلوکساسین

Figure 2- The effect of cold plasma treatment on the activity and degradation of the antibiotic enrofloxacin

مربوط به شیر فاقد آنتی بیوتیک و فاقد پلاسما قرار داده شد و باعث شد که باکتری به طور کامل رشد کند و نشان دهنده این می باشد پلاسما تاثیر 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 تتراسایکلین، سولفاتیزول، 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 γ 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 از آنتی بیوتیک انروفلوکساسین و فاقد پلاسما 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 پلاسما قرار داده شد همانطور 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 تاثیر پلاسما قرار داده شد و باکتری به کامل رشد کرد که نشان دهنده این است پلاسما می تواند به طول کامل باعث تخریب آنتی بیوتیک انروفلوکساسین شود. شکل شماره ۴



شکل ۳- کروماتوگرام محلول اولیه انروفلوکساسین در شیر تحت تیمار پلاسما 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.

اکسیژن اتمی منجر به سطح بالاتر اکسیداسیون چربی می‌شود، به حداقل رساندن غلظت گونه‌های فعال اکسیژن از طریق ولتاژ پایین‌تر، زمان کوتاه‌تر (زیر ۱۰ دقیقه) منجر به اکسیداسیون چربی کمتر می‌شود. غلظت کمتر O₂ در گاز اولیه مانند نیتروژن خالص نیز منجر به کاهش اکسیداسیون چربی می‌شود. رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال هیدروکسیل که در طی پلاسمای سرد تولید می‌شوند، با اسیدهای چرب غیراشباع واکنش نشان می‌دهند و منجر به شکسته شدن دوگانه می‌شوند (Kim و همکاران، ۲۰۱۵). به احتمال زیاد، رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال‌های هیدروپروکسیل و اکسیژن منفرد تولید می‌شوند که نشان داده شده‌است که به اسیدهای چرب کوتاه‌تر تولیدکننده PUFA حمله می‌کنند (Ayala و همکاران، ۲۰۱۴). کاهش در محتوای لاکتوز به برهم کنش رادیکال OH با لاکتوز و در نتیجه انتزاع پروتون از دی‌ساکارید لاکتوز برای تشکیل رادیکال بدون قند مرتبط است. به طور کلی، بسته به شرایط اعمال شده، اثر پلاسمای سرد ممکن است تغییر قابل توجهی ایجاد کند اگر فشار کم (۱۶ Pa) یا گاز نیتروژن اعمال شود (گونه‌های 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 گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده، اکسیداسیون خفیف یا تجمع قابل توجهی ایجاد شود. بنابراین، برای به حداقل رساندن تغییر پروتئین، شرایط درمان باید متناسب باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد که پلاسمای سرد می‌تواند به خوبی باعث تخریب آنتی‌بیوتیک و از بین رفتن باکتری در شیر شود ولی زمانی ولتاژ منبع تغذیه

محور x در واحد زمان بر حسب دقیقه است. در این آنالیز زمان خروج پیک انروفلوکسازین در دقیقه ۴ مربوط به پیک شیر حاوی آنتی‌بیوتیک تحت تیمار پلاسمای سرد می‌باشد. که با قرارگرفتن محلول در برابر پلاسمای سرد این پیک حذف شده و پیک جدیدی در دقیقه ۲ خارج شده و با افزایش زمان شارش پلاسمای سرد این پیک افزایش یافت. این نشان می‌دهد انروفلوکسازین تخریب می‌شود و پیک جدید ماده حاصل از تخریب انروفلوکسازین می‌باشد. افزایش تخریب ENRO به دلیل افزایش غلظت ROS و RNS در محلول آبی با پیشرفت پلاسمای سرد در زمان بود (Kim و همکاران، ۲۰۱۳). قدرت تخلیه بالاتر با افزایش تولید RNS (گونه‌های فعال نیتروژن) و ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) و در نتیجه افزایش راندمان تخریب آلاینده‌های آلی در آب همراه است (Gue و همکاران، ۲۰۱۹).

اثر تیمار پلاسمای سرد بر خواص کیفی شیر: اثر تیمار پلاسمای سرد بر ویژگی‌های کیفی شیر در جدول ۲ نمایش داده شده‌است. با افزایش زمان پلاسمای فاکتورهای شیر از جمله درصد چربی، هدایت الکتریکی (میلی‌ثانیه)، نیتروژن غیرپروتئینی (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم)، درصد اسیدهای چرب ترانس و درصد اسیدهای چرب اشباع و ملامین (میلی‌گرم بر کیلوگرم) افزایش یافت و درصد مواد جامد غیرچربی، pH، درصد لاکتوز، نقطه انجماد، درصد اسید چرب در حالت سیس، درصد ساکارز، نسبت اسید چرب فرار به چربی شیر (میلی‌اکی‌والانت به ۱۰۰ گرم چربی)، اسید سیتریک به سیترات (میلی‌گرم به کیلوگرم) افزایش یافت، همچنین مقدار درصد پروتئین خام، درصد مواد جامد درصد اسید چرب مونو، چگالی (گرم بر میلی‌لیتر)، درصد کازئین، درصد آب و درصد پروتئین کل هیچ تغییری نکرد. از آنجایی که گونه‌های فعال اکسیژن بالاتر شامل رادیکال OH و

کمتر از ۱۰ کیلو ولت، سیستم تخلیه پلاسمای از نوع
سد دی الکتریک و زمان تیمار شیر توسط پلاسمای
و ویژگی های کیفی شیر و همچنین باعث غیرفعال سازی
باکتری و نخریب موثر آنتی بیوتیک در شیر دورریز
سرد از ۵ تا ۱۰ دقیقه باشد، کمترین تاثیر را بر
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*, 2013, 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 (2019) 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 (2020) 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 (2013) 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. Biotech*. 2017, 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 (2019) 124401.