نگهداری شیرخام با روش فعال کردن سیستم لاکتوپراکسیداز

دکتر هوشنگ نیکوپور
عضو هیأت علمی انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذائی کشور

فتانه اعتمادی و مصطفی پیشوا یزدی
کار شناسان انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذائی کشور

چکیده

جمع‌آوری و حمل شیرخام از دامداریهای کوچک به مراکز تولید شیر و لبنیات خصوصاً در ماههای گرم سال به علت فراهم نبودن سیستم سرد کردن، اغلب با کاهش کیفیت بهداشتی شیر مواجه می‌باشد. در این بررسی امکان استفاده از یک روش کاربردی جدید، یعنی فعال کردن سیستم آنزیمی طبیعی لاکتوپراکسیداز در شیر برای نگهداری موقت شیرخام مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های شیر تازه دوشیدهٔ گاو با افزودن ۱۰ قسمت در میلیون تیوسیانات و ۸/۵ قسمت در میلیون آب اکسیژنه فعال گردید و در درجه حرارتهای مختلف نگهداری شد و متعاقباً هر دو ساعت یک بار مورد آزمایشهای میکروبی و شیمیایی قرار گرفت.

نتایج حاصله نشان داد که در حرارتهای ۳۰ و ۴۰ درجه سانتیگراد رشد و تکثیر میکرو - ارگانیسمها در نمونه‌های فعال شده (حداقل به مدت ۶ ساعت) به طور قابل ملاحظه‌ای کندتر از نمونه شاهد بوده و کیفیت نمونه‌های شیر فعال شده در حد مناسبتری باقیمانده است. بررسیهای انجام شده در یک دامداری نیز نشان داد که با فعال کردن سیستم لاکتوزپراکسیداز می‌توان عملاً شیرخام گاو را بدون سرد کردن به مدت طولانی‌تری نگهداری نمود.

مقدمه

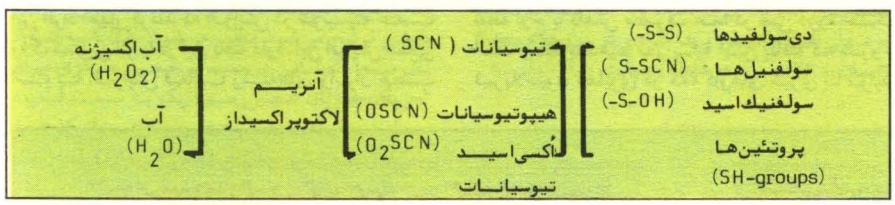
در بسیاری از ممالک در حال توسعه و از جمله کشور ما مشکلات زیادی در زمینه سرد کردن و نگهداری شیرخام پس از دوشیدن و در زمان حمل آن از دامداریهای کوچک به مراکز تولید و کارخانجات لبنیات سازی به دلایل اقتصادی و کمبود انرژی الکتریکی و غیره وجود دارد و بدین ترتیب کیفیت بهداشتی مقادیر قابل ملاحظه‌ای از شیر خام قبل از رسیدن به کارخانجات کاهش یافته و گاهی فاسد و غیر قابل مصرف می‌گردد.

امروزه علاوه بر سرد کردن که بهترین روش شناخته شده برای نگهداری شیر خام است، تنها روش قابل قبول که مورد تأیید سازمان فائو استفاده از آب اکسیژنه با غلظت نسبتاً بالا (۸۰۰-۳۰۰ قسمت در میلیون) به عنوان یک ماده نگهدارنده است (۴). روش اخیر به علت برخی معایب آن از جمله تغییرات احتمالی در ترکیبات شیمیایی و فعالیتهای بیوشیمیایی شیر چندان متداول نمی‌باشد و استاندارد ایران افزودن آب اکسیژنه به شیر خام را غیر مجاز اعلام نموده است.

در دو دههٔ اخیر امکان استفاده از یک سیستم ضد میکروبی طبیعی در شیر به منظور جلوگیری از فساد این محصول مورد بررسی دانشمندان و محققین کشورهای مختلف قرار گرفته است (۱ و ۷).

سیستم ضد میکروبی مورد نظر "سیستم لاکتوپراکسیداز تیوسیانات - آب اکسیژنه" می‌باشد که در این جا مختصراً به نام سیستم لاکتوپراکسیداز خوانده می‌شود.

اثرات ضد میکروبی سیستم لاکتوپراکسیداز به علت ایجاد ترکیبات ضد میکروبی است که موقتاً در حین اکسیداسیون تیوسیانات حاصل می‌شود. ترکیباتی که در اثر اکسیداسیون تیوسیانات به وسیلهٔ آب اکسیژنه و با کمک آنزیم طبیعی شیر یعنی لاکتوپراکسیداز به عنوان کاتالیزور به وجود می‌آید شامل هیپوتیوسیانات -(OSCN) واکسی اسیدهای تیوسیانات -(O_2SCN) می‌باشد که به عنوان ترکیبات واسطه‌ای و به طور اختصاصی باعث اکسیده شدن گروههای آزاد گوگرد دار (SH-groups) در آنزیمها و پروتئینهای باکتری می‌شود و آنها را به ترکیبات ضد میکروبی مانند دی‌سولفیدها (S-S-) سولفنیل - تیوسیانات (S-SCN-) و اسید سلفنیک مربوطه (S-OH-) تبدیل می‌نماید (۲). واکنش عمومی انجام شده در شکل زیر نشان داده شده است.



اکسیداسیون گروههای (SH) در آنزیمها و سایر پروتئینها عامل اصلی در نقش ضد میکروبی سیستم لاکتوپراکسیداز می‌باشد و موجب اختلالاتی در ساختمان غشاء سلولی میکروارگانیسم می‌گردد. ظاهراً ساختمان غشاء سیتوپلاسمی باکتریها در اثر فعال شدن سیستم لاکتوپراکسیداز آسیب می‌بیند و باعث تراوش و نشت یون پتاسیم، اسیدهای آمینه و پلی‌پپتیدها به خارج سلول می‌شود. همچنین جذب گلوکز، پورین‌ها، پریمیدینها و اسیدهای آمینه مختل شده و بالاخره ساخت پروتئینها، RNA,DNA متوقف می‌گردد (۸).

مواد و روشها

در این بررسی جمعاً تعداد ۱۳ نمونه شیر گاوداریهای اطراف تهران واقع در مناطق درکه، جنگلهای لویزان (شمس‌آباد)، قره‌تپه و جادهٔ ساوه جمع‌آوری و مورد آزمایش قرار گرفت. در هر دوره بررسی حدود یک لیتر شیر گاو تازه دوشیده شده در یک ظرف شیشه‌ای استریل جمع‌آوری و در یخدان گذارده شده و در اسرع‌وقت به آزمایشگاه حمل شد.

میزان تیوسیانات در نمونه‌های شیر گاو با روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد (۱۰) و مقدار آن به طور متوسط معادل ۴ قسمت در میلیون تعیین گردید. به منظور فعال کردن سیستم لاکتوپراکسیداز مقدار ۱۰ قسمت در میلیون تیوسیانات و ۸/۵ قسمت در میلیون آب اکسیژنه به نمونه‌ها اضافه گردید و به مدت دو دقیقه شیشه‌های نمونه با دست تکان داده شد.

نمونه‌های فعال شده و شاهد در حرارتهای ۵، ۱۵، ۳۰، ۴۰ درجه سانتیگراد نگهداری و هر دو ساعت یک بار مورد آزمایشهای مختلف قرار گرفت. شمارش کل میکروبی با استفاده از محیط کشت جامد پلیت‌کانت آگار در فواصل زمانی دو ساعته انجام شد. اندازه گیری میزان اسیدیته با روش استاندارد تیتراسیون و آزمایش احیاء بلودومتیلن (۱) بر روی نمونه‌های فعال شده و شاهد هر دو ساعت یک بار صورت گرفت.

بررسیهای عملی نیز در دامداری دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران دنبال شد و نمونه‌های شیر گاو بلافاصله پس از دوشیدن و نگهداری در بیدونها با افزودن ۱۰ قسمت در میلیون تیوسیانات و ۸/۵ قسمت در میلیون آب اکسیژنه فعال گردید و پس از آن به کارخانه لبنیات سازی دانشکده منتقل گردیدند، بیدونها در حرارت محیطی ۳۰ الی ۳۵ درجه سانتیگراد در فواصل زمان ۴ و ۸ ساعت پس از فعال کردن مورد آزمایشهای میکروبی و شیمیایی قرار گرفتند.

مشاهدات و نتایج

نتایج به دست آمده از این بررسی نشان داده که در حرارتهای نگهداری پایین (۵ و ۱۵ درجه سانتیگراد) تفاوت چندانی در کیفیت نمونه‌های فعال شده و شاهد وجود ندارد در حالی که وقتی نمونه‌های شیرخام در معرض حرارتهای محیطی بالاتر (۳۰ و ۴۰ درجه سانتیگراد) قرار داده شد اثرات ضد میکروبی سیستم لاکتوپراکسیداز به طور قابل ملاحظه‌ای نمایان گردید. جدول ۱ زمان لازم برای احیاء بلودومتیلن بر حسب دقیقه در حرارت ۴۰ درجه سانتیگراد را در زمانهای نگهداری مختلف نشان می‌دهد.

همان طوری که ملاحظه می‌شود زمان لازم برای احیاء بلودومتیلن که شاخصی برای کیفیت

پایداری شیر می‌باشد در مورد نمونه‌های فعال شده در مقایسه با نمونه شاهد تا مدت ۶ ساعت پس از فعال شدن سیستم لاکتوپراکسیداز به میزان قابل توجهی طولانی‌تر شده است.

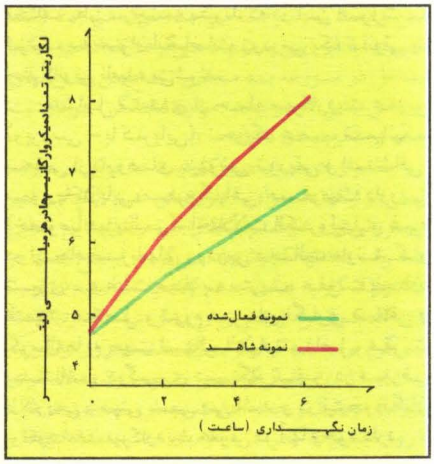
نتایج حاصله از شمارش میکروبی نمونه‌های شیرخام فعال شده که در حرارت ۴۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور نگهداری شده بود در شکل ۱ نشان داده شده است. این نتایج حاکی از این است که رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های فعال شده تا حدود ۶ ساعت به طور قابل ملاحظه‌ای کندتر از نمونه‌های شاهد بوده و در نتیجه کیفیت بهداشتی نمونه‌های شیر فعال شده در حد مناسب‌تری باقی مانده است. لازم به یادآوری است که آزمایشات انجام شده بر روی نمونه‌های فعال شده و شاهد پس از ۸ ساعت نگهداری در ۴۰ درجه سانتیگراد نشان داد که اثرات نگهدارنده سیستم لاکتوپراکسیداز تدریجاً کاهش یافته است.

نتایج به دست آمده از بررسی عملی در دامداری دانشکده کشاورزی در جدول ۲ نشان داده شده است. زمان لازم برای احیاء بلودومتیلن در نمونه‌های فعال شده ۴ برابر نمونه شاهد بوده است و سایر آزمایشهای کیفی و شمارش کل میکروبی بیانگر کیفیت برتر نمونه‌های فعال شده در مقایسه با نمونه شاهد می‌باشد. این نتایج تأکیدی بر امکان بکارگیری سیست لاکتوپراکسیداز در دامداریها و به‌طور عملی می‌باشد.

بحث

به منظور فعال کردن سیستم لاکتوپراکسیداز سه عامل آنزیم لاکتوپراکسیداز، تیوسیانات و آب اکسیژنه باید به میزان کافی در شیر وجود داشته باشد. آنزیم لاکتوپراکسیداز مورد نیاز فقط ۱ الی ۲ قسمت در میلیون است در حالی که میزان آن در شیر گاو به طور متوسط حدود ۳۰ قسمت در میلیون می‌باشد. میزان تیوسیانات که به طور طبیعی در شیرگاو یافت می‌شود متغیر و بستگی به نوع علوفه مصرفی دارد ولی به طور متوسط در حدود ۳/۲ الی

شکل ۱- شمارش کل میکروبی، نمونه‌شیرگاو خام فعال شده و نمونه شاهد در 40^{c}



۴/۶ قسمت در میلیون می‌باشد بنابر این برای فعال کردن سیستم لاکتوپراکسیداز لازم است حدود ۱۰ قسمت در میلیون تیوسیانات اضافه شود.

بدین ترتیب غلظت کل تیوسیانات در شیر به ۱۳ الی ۱۵ قسمت در میلیون خواهد رسید که در مقایسه با غلظت این ماده در بزاق دهان انسان (۳۰۰-۵۰ppm) و در شیرهٔ معدهٔ انسان (۵۰-۴۰ppm) میزان تیوسیانات اضافه شده به شیر بسیار ناچیز می‌باشد. عامل سوم یعنی آب اکسیژنه در شیر وجود ندارد و لازم است به میزان ۸ الی ۱۰ قسمت در میلیون به شیرخام اضافه شود.

در مورد فعال کردن سیستم لاکتوپراکسیداز باید نکات زیر یادآوری گردد:

- آب اکسیژنه اضافه شده بلافاصله در واکنش آنزیمی مصرف می‌شود و در شیر باقی نمی‌ماند.
- ترکیبات ضد میکروبی که در اثر اکسیداسیون تیوسیانات حاصل می‌شود ناپایدار بوده و به طور خود به خود و یا در زمان پاستوریزاسیون شیر تجزیه خواهد شد.
- مدت زمان اثر ضد میکروبی سیستم لاکتوپراکسیداز با درجه حرارت محیط نسبت معکوس دارد.
- فعال کردن سیستم لاکتوپراکسیداز شیرخام هیچ گونه اثر منفی در کار غده تیروئید انسان ندارد.

لازم به یادآوری است که جمع‌آوری و تحویل شیر خام به کارخانجات شیر در ایران خصوصاً در فصول گرم سال همواره با مشکلاتی مواجه بوده و کیفیت شیر دریافتی در مواردی غیر قابل قبول می‌باشد. به طور کلی شیرخام دریافتی کارخانجات از تعداد زیادی دامداریهای منطقه تأمین می‌گردد که فاصله بعضی از آنها از کارخانه بیش از ۱۰۰ کیلومتر است. اگر چه دامداریهای بزرگ دارای وسایل سرد کردن شیر می‌باشند و از تانکرهای دو جداره و مجهز به سیستم خنک کننده استفاده می‌کنند ولی اغلب دامداریهای کوچک فاقد این گونه امکانات هستند به طوری که بیش از ۵۰ درصد از شیر دریافتی در کارخانه شیر پاستوریزه تهران به وسیلهٔ بیدون حمل می‌شود و زمان حمل و نقل در حدود ۲ ساعت می‌باشد.

بنابر این از نتایج به دست آمده از این تحقیق که در تأیید بررسیهای انجام شده در سایر کشورها نیز می‌باشد (۴،۵ و ۶) می‌توان نتیجه گیری کرد که فعال کردن سیستم لاکتوپراکسیداز می‌تواند بعنوان یک روش عملی، مطمئن و ارزان برای نگهداری موقت شیر خام در دامداریهای کشور تا زمان تحویل به کارخانجات شیر و لبنیات‌سازی مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۱: زمان احیاء بلودومتیلن در نمونه‌های شیرگاو خام فعال شده و شاهد

زمان نگهداری نمونه‌ها (ساعت)	زمان احیاء بلودومتیلن (دقیقه) در ۴۰ درجه سانتیگراد	
	شیرخام فعال شده	شاهد
صفر	۳۴۰	۲۵۰
۲	۲۲۰	۱۳۰
۴	۱۰۰	۳۵
۶	۴۰	۲۰
۸	۱۲	۱۰

جدول ۲: کیفیت شیرخام تازه دوشیده شده و نمونه شاهد در دامداری پس از نگهداری به مدت ۴ ساعت در حرارت 32^{c}

نمونه	pH	اسیدیته (درجه درنیک)	آزمایش الیزارول	آزمایش بلو دومتیلن(دقیقه)	شمارش کلی
شیرخام‌فعال‌شده	۶/۴۶	۱۶	قرمزیا کمی‌رسوب	۶۰	$1/2\times10^{7}$
شاهد	۶/۳۹	۱۸	قهوه‌ای‌یا رسوب	۱۵	3×10^{7}

سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات ارزنده آقای دکتر محمدرضا احسانی و خانم سعیده صلاحی (دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران) که ما را در انجام بررسیهای عملی این پروژه یاری کرده‌اند تشکر و قدردانی می‌نماید.

منابع مورد استفاده

۱- فرخنده، ع، ۱۳۷۰، روشهای آزمایش شیر و فرآورده‌های آن، جلد اول، ص ۲۸۱-۲۷۷.

2. Bjorck,L., Claesson, O. and Schul-thess, W., 1979, The lactoperoxidase/thiocyanate/ hydrogen peroxide system as a temporary preservative for raw milk in developing Countries. Milkwissenschaft, 34: 726-729.

3. Bjorck, L., 1979, Enzymatic stabilization of milk-utilization of the milk peroxidase for the preservation of milk, proc. IDF Annual Sessions, Montreaux.

4. Dahlberg, P., Bergmark, A., Eltom, M., Bjorck L. and Chaesson, O., 1985, Effect of thiocyanate levels in milk on thyroid function in iodine deficient subjects. Am.J. of Clin. Nutr. 41:1010-1014.

5. FAO, 1957. Report on the meeting of experts on the use of hydrogen peroxide and other preservatives in milk. Rome. Doc. 57/118655.

6. Harnulv, G. and kandasamy, 1982, Incerasing the keeping quality of milk by activation of its lastoperoxidase system. Results from Sri lanka, Milchwissenschaft 37:454-457.

7. Harnulv, G. and Hamid, A., 1984, Utilization of natural lactoperoxidase system to extend keeping quality of raw milk. pakistan J. Agric. Res. 5:113-117.

8. Kamau, D.N. and Kroger, M., 1984, Preservation of raw milk by treatment with hydrogen peroxide and by activation of lactoperoxidese system. Milchwissenschaft, 39:658-661.

9. Reiter, B. and Harnulv, G., 1984, Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications. J. of Food protection, 74:724-732.

10. Personal communication with Dr. L. Bjorck, Swedish U. of Agric. Sciences.