

تیماردهی شیر خام با CO₂ - تأثیر بر روی ویژگی‌های میکروبی و ماندگاری شیر خام

آزاده سلیمانی وفا^۱، جواد حصاری^{۲*} و عادل احمدی زنوز^۲

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۸۸/۶/۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- به ترتیب استادیار و دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

* مسئول مکاتبه E-mail: jhesari@tabrizu.ac.ir

چکیده

تیماردهی شیر خام سرد توسط CO₂ به عنوان روشی جهت جلوگیری از ازدیاد بار میکروبی کل، کنترل باکتریهای سرماگرا و افزایش ماندگاری شیر مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور 4 تیمار بر روی شیر خام (شیر خام بدون استفاده از CO₂ (نمونه شاهد)، شیر خام با استفاده از تزریق CO₂ تا سه سطح pH، برابر 6/2، 6/4 و اعمال شد. نمونه‌های شیر خام برای مدت 10 روز در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در روزهای 1، 5، 8 و 10 مورد ارزیابی میکروبی قرار گرفتند. برای ارزیابی تأثیر CO₂ و اثر زمانهای مختلف بر روی صفات مورد مطالعه از طرح آماری اسپلیت پلات در زمان با طرح پایه بلوکهای کامل تصادفی در سه تکرار (در سه روز مختلف بعنوان بلوک) استفاده گردید. تجزیه تحلیل آماری نتایج نشان داد که افزودن CO₂ به شیر خام خنک تا pH 6 و 6/2 به طور قابل ملاحظه‌ای رشد میکروبی را کاهش داد، بطوریکه این نمونه‌ها به ترتیب با نمونه شیر شاهد اختلافی در حدود 1/082 و 0/85 واحد لگاریتمی برای بار میکروبی کل و 1/089 و 0/923 واحد لگاریتمی برای باکتریهای سرماگرا پس از 10 روز نگهداری در دمای 4°C از خود نشان داد و مشخص گردید که افزودن CO₂ تا pH 6 و 6/2 به شیر خام سرد شده روش مؤثری جهت جلوگیری از ازدیاد بار میکروبی کل، کنترل باکتریهای سرماگرا و حفظ کیفیت شیر است. با استفاده از CO₂ تا pH = 6 زمان نگهداری شیر خام در 4 درجه سانتی‌گراد تا 3 روز افزایش یافت و بهترین تیمار انتخاب شده در این پژوهش بود که البته در اکثر موارد اختلاف آن با شیر تیماردهی شده تا pH = 6/2 غیر معنی دار بود.

واژه های کلیدی: بار میکروبی، باکتریهای سرماگرا، دی اکسیدکربن، نگهداری شیر خام

Treatment of Raw Milk with CO₂ - Effects on Microbial Characteristics and Self Life of Raw Milk

A Solimani¹, J Hesari^{2*} and A Ahmadi-Zenouz²

¹MSc Student, Department of Food Science & Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Assistant Prof and, Associate Prof., Department of Food Science & Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author: E-mail: jhesari@tabrizu.ac.ir

Abstract

Treatment of raw milk with CO₂ as a procedure for preventing of microbial growth, control of psychrotrophic bacteria and extending of self life of milk products was studied using normal raw milk, as control samples, and raw milks treated with CO₂ up to pH = 6.4, 6.2 and 6. Experimental milk samples were stored for 10 days at 4°C and used for microbial assessment at 1, 5, 8 and 10 days of storing. The experimental design was split plot based on randomized complete blocks with four replications. Results showed adding of CO₂ to raw milk up to pH=6.2 and 6 inhibited significantly ($P<0.05$) microbial growth and those samples had a difference of 1.082 and 0.85 logarithmic unit in total count and also 1.089 and 0.923 in Psychrotrophic bacteria populations with control samples, respectively. It is concluded that adding of CO₂ to raw milk up to pH= 6.2 and 6 can be considered as an effective pretreatment for preventing of increasing microbial population and preservation of raw milk. Samples treated by CO₂ with pH=6 had a self life of 3 days longer than control samples and was selected as the most effective treatment, although there were not significant differences in most parameters between pH=6 and pH= 6.2.

Keywords: CO₂, Psychrotrophic bacteria, Raw milk preservation, Total count contamination

تکثیر باکتریهای سرماگر¹ که در آلودگیهای معمول شیر خام حضور دارند، فراهم می آورد (رائوس-مادیدو و همکاران 1998، رائوس-مادیدو و همکاران 2002 و ما و همکاران 2003). مطالعات قبلی نشان داده است که باکتریهای سرماگرا فلور غالب شیر نگهداری شده در دماهای پایین را تشکیل می دهند. با وجود اینکه

مقدمه

سرد کردن شیر در دامداریها و کارخانه های فرآوری لبنیات به دلیل کاهش سرعت رشد باکتریهای مزوفیل باعث حفظ کیفیت شیر می شود و زمان نگهداری شیر خام را قبل از فرآوری افزایش می دهد. معذالک نگهداری در دماهای پایین، شرایط مناسبی را برای

¹- باکتریهای سرماگرا: به باکتریایی اطلاق می شوند که قادی به رشد در دمای ۷ درجه سانتی گراد و پایین تر هستند.

در مطالعات متعددی به اهمیت باکتری کشندگی محیط اسیدی شده با CO₂ اشاره شده است (ارکمن 1997 و ارکمن 2000).

رائوس مادیدو و همکاران (1996) گزارش دادند که CO₂ در شیرهای با کیفیت میکروبی پایین در مقایسه با شیرهایی که دارای کیفیت میکروبی بالا می باشند، اثر بازدارندگی بیشتری روی کلیه گروههای میکروبی (به استثنای کلی فرم ها) دارد. در عین حال هیچ مدرکی دال بر اینکه CO₂ رشد میکروارگانیسمهای بی هوازی را افزایش می دهد وجود ندارد (هوچکس و همکاران 1999).

وقتی CO₂ به طور مناسب و در مقادیر کافی افزوده می شود، دوره ماندگاری فرآورده های لبنی را بوسیله بازدارندگی از رشد میکروبهها و احتمالاً محدود کردن تندشدگی اکسیداتیو گسترش می دهد. این امر در فرآورده های لبنی که به مدت طولانی نگهداری می شوند، باعث توسعه بازارها و کانالهای جدید توزیع می گردد، همچنین از تعداد کالاهای تاریخ مصرف گذشته می کاهد (توماسولا و بوسول 1997).

بر اساس نتایج حاصل از بررسی منابع علمی، در این پژوهش تأثیر استفاده از CO₂ بر روی ماندگاری و کیفیت میکروبی شیر خام خنک که یکی از معضلات اساسی مراکز دامداری و تولید شیر و حمل آن به مراکز صنعتی در کشورمان است مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

۲-۱- ماده اولیه

جهت انجام این تحقیق شیر خام تازه دوشیده شده که بلافاصله تا دمای 4 درجه سانتی گراد سرد شده بود از واحد گاوداری ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز در 3 روز مختلف و هر بار به میزان تقریباً 5 کیلوگرم تهیه شد.

سرماگراها در اثر تیمارهای حرارتی متداول شیر از بین می روند اما این ارگانیسمها قادر به تولید آنزیمهای برون سلولی (پروتئاز و لیپاز) هستند که به طور کامل توسط تیمارهای حرارتی غیر فعال نمی شوند. این آنزیمها قادر به تجزیه ترکیبات مختلف شیر هستند که روی ماندگاری شیر فرایند شده بوسیله حرارت تأثیر می گذارند و بالطبع روی کیفیت محصولات لبنی مؤثر هستند (رائوس-مادیدو و همکاران 1996، سورهاگ و استپانیاک 1997 و گیموند و همکاران 2003). فعالیتهای پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی باکتریهای سرماگرا زمانی می توانند قابل ملاحظه و مؤثر باشند که شمارش این باکتریها از 10⁶ تا 10⁷ (cfu/ml) تجاوز کند (رائوس-مادیدو و همکاران 1996).

کیفیت بهداشتی شیر خام و میزان آلودگیهای مختلف آن می تواند نقش چشمگیری در کمیت و به ویژه در کیفیت فرآورده های استحصالی آن ایفا نماید (ما و باربانو 2003). با توجه به اینکه انواع تقلبات به منظور سرپوش نهادن بر کیفیت نامناسب بهداشتی شیر در کشور رایج است، لزوم استفاده از روشهای سالم و مجاز جهت حفظ کیفیت شیر بیش از پیش احساس می شود. تحقیقات انجام گرفته حاکی از این مطلبند که بار میکروبی شیرهای خام، در کشور ما بالا است و این امر افت کیفیت و کاهش ماندگاری شیر و فرآورده های لبنی را در پی دارد، که در سالهای اخیر مطرح و یکی از موارد تحقیقاتی موجود در این زمینه می باشد (عزتی 1382). مطالعاتی که در سالهای اخیر انجام گرفته است نشان می دهد که افزودن CO₂ به شیر خام روش مؤثری جهت جلوگیری از ازدیاد بار میکروبی و کنترل باکتریهای سرماگرا است (هوچکس و همکاران 1999). CO₂ فعالیت ضد میکروبی دارد و زمانی که تحت فشار به کار برده شود تأثیر بازدارندگی آن افزایش می یابد (8). ترکیب فشار پایین CO₂ و دمای پایین، کیفیت میکروبی و بهداشتی شیر خام را بهبود می بخشد (راجاگوپال و همکاران 2005).

2-2- روش‌ها

ترتیب عبارت بودند از دمای 30 درجه سانتی گراد به مدت 72 ساعت، دمای 6/5 درجه سانتی گراد به مدت 7 تا 10 روز و دمای 30 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت (مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران 1373، 1379 و 1381).

تست جوش

مقدار کمی شیر در یک لوله آزمایش ریخته شد و روی شعله تا حرارت جوش گرم شد و از لحاظ تشکیل لخته مورد بررسی قرار گرفت (فرخنده 1371).

تست الکل

در یک لوله آزمایش معمولی 2 میلی لیتر شیر و 2 میلی لیتر الکل اتیلیک 68 درجه اضافه شد و به شدت تکان داده شد و از لحاظ تشکیل لخته مورد بررسی قرار گرفت (فرخنده 1371).

طرح آماری

برای ارزیابی تأثیر CO₂ و اثر زمانهای مختلف بر روی صفات مورد مطالعه از طرح اسپلیت پلات در زمان با طرح پایه بلوکهای کامل تصادفی² در سه تکرار (در سه روز مختلف بعنوان بلوک) استفاده گردید. در این طرح فاکتور اصلی 4 سطح مختلف CO₂ و فاکتور فرعی شامل 4 زمان نمونه برداری بود، تأثیر این دو فاکتور به ترتیب تحت اسامی فاکتور A (A₁ = نمونه شاهد، A₂، A₃ و A₄ = نمونه های تیمار شده با CO₂ تا pH های به ترتیب 6/4، 6/2 و 6) و فاکتور B (B₁ = روز اول، B₂ = روز پنجم، B₃ = روز هشتم و B₄ = روز دهم) بر روی پارامترهای مهم کیفی شیر مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین های مورد نیاز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام شد. برای تجزیه داده ها و رسم

شیر خام دریافت شده در کارگاه لبنیات ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی در 16 بطری پلاستیکی به حجم 250 میلی لیتر در شرایط کاملاً بهداشتی با فضای خالی¹ تقریباً 7 درصد توزیع شد، و با دربهای پلاستیکی مخصوص دربندی گردید، بطوریکه امکان نشت گاز وجود نداشته باشد. سپس در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

جهت انجام آزمایشات لازم در این طرح 4 تیمار بر روی شیر خام اعمال و کلیه آزمایشات با 3 تکرار انجام گردید. تیمارهای مورد استفاده شامل شیر خام سرد شده بدون استفاده از CO₂ (نمونه شاهد) و شیر خام سرد شده با استفاده از تزریق CO₂ تا در سه سطح pH، برابر 6، 6/2 و 6/4 بودند. جهت تزریق CO₂ از یک کپسول حاوی CO₂ (نوع خوراکی) و مجهز به رگلاتور جهت کنترل فشار استفاده شد. تزریق CO₂ در داخل بطریها تا pH مورد نظر با ابزار مناسب استریل شده، تحت شرایط کاملاً بهداشتی انجام گرفت. نمونه ها در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند و در هر 24 ساعت ضمن اندازه گیری pH، در صورت مشاهده افزایش آن در نمونه های تیمار شده با CO₂ با تزریق مجدد CO₂ pH تا سطح قبلی تنظیم گردید. نمونه ها برای مدت 10 روز در این دما نگهداری شدند و در روزهای اول (روز دریافت شیر)، 5، 8 و 10 مورد ارزیابی میکروبی قرار گرفتند.

آزمایشها

ارزیابی میکروبی

جهت کشت بار میکروبی کل و باکتریهای سرماگرا از محیط کشت پلیت کانت آگار و جهت کشت باکتریهای کلی فرم از محیط کشت کریستال ویولت نیوترال رد بایل لاکتوز آگار استفاده شد. شرایط رشد برای بار میکروبی کل، باکتریهای سرماگرا و کلی فرم ها به

²Randomized complete block design¹Head space

با CO₂ تا pH برابر 6 و 6/2 در روزهای 5 و 8 نگهداری و با کلیه نمونه های تیمار شده با CO₂ در روز 10 نگهداری وجود داشت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس شاخص های میکروبی بیانگر اختلاف معنی داری در سطح احتمال 1% در تأثیر متقابل بین تیمارهای CO₂ و زمان های نمونه برداری برای بار میکروبی کل و باکتریهای سرماگرا بود. معنی دار بودن اثر متقابل بیانگر تأثیر متفاوت تیمارهای CO₂ در زمانهای مختلف ارزیابی بر صفات مختلف است.

بر اساس نتایج بدست آمده، افزودن CO₂ به شیر خام سرد شده تا pH های برابر 6 و 6/2 به طور قابل ملاحظه ای رشد میکروبی را کاهش داده است، بطوریکه این نمونه ها به ترتیب با نمونه شیر شاهد اختلافی در حدود 1/082 و 0/85 واحد لگاریتمی برای بار میکروبی کل و 1/089 و 0/923 واحد لگاریتمی برای باکتریهای سرماگرا و 0/742 و 0/674 واحد لگاریتمی برای باکتریهای کلی فرم پس از 10 روز نگهداری در دمای 4°C از خود نشان دادند. در مطالعات ما و همکاران (2003) افزودن CO₂ 1500 ppm (pH= 6/2) رشد میکروبی را به طور قابل توجهی کاهش داده است و اختلافی در حدود 1 تا 2 واحد لگاریتمی برای بار میکروبی کل و باکتریهای سرماگرا نمونه شیر شاهد و نمونه حاوی CO₂ 1500 ppm گزارش شده است. در تحقیقات راثوس ماییدو و همکاران (1998) نیز اختلاف بین نمونه های تیمار شده با CO₂ تا pH برابر 6 و 6/2 با نمونه شیر شاهد به ترتیب 1/34 و 2/02 واحد لگاریتمی برای بار میکروبی کل، 1/12 و 1/48 برای کلی فرم ها و 1/74 و 2/03 برای باکتریهای سرماگرا گزارش شده است.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در روز اول بار میکروبی کل (حدود 10⁶ cfu/ml) بالاتر از شمارش باکتریهای سرماگرا (حدود 10⁵ cfu/ml) بود، در طی نگهداری در کلیه تیمارها شمارش بار میکروبی کل و باکتریهای سرماگرا به سطح مشابهی رسیده اند. ما و

نمودارها از نرم افزارهای کامپیوتری MSTAT-C، MINITAB و EXCEL استفاده گردید.

نتایج و بحث

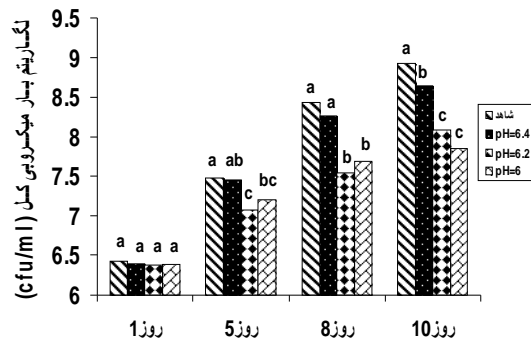
نتایج حاصل از مقایسه میانگین بار میکروبی کل، باکتریهای سرماگرا و باکتریهای کلی فرم برای سطوح A (مقادیر مختلف CO₂) در سطوح مختلف B (زمان های نمونه برداری) به روش دانکن¹ در سطح احتمال 5% در شکل های 1، 2 و 3 نشان داده شده است. بررسی نتایج شکل 1 نشان می دهد که در روزهای 8 و 10 نگهداری، بار میکروبی کل نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با CO₂ تا pH = 6/4 اختلاف معنی داری با نمونه های تیمار شده با CO₂ تا pH های 6/2 و 6 داشتند. به عبارت دیگر افزودن CO₂ تا مقادیر pH های 6 و 6/2 به شیر تأثیر قابل ملاحظه ای در کاهش بار میکروبی داشته است. ما و همکاران (2003) در مطالعات خود مشاهده کردند که با افزودن 1500 ppm CO₂ به شیر خام رشد میکروبی به طور معنی داری کاهش می یابد به طوریکه این محققان توانستند شیر خام با کیفیت بالا را با افزودن مقدار ذکر شده CO₂ در دمای 4 درجه سانتی گراد برای مدت 14 روز با بار میکروبی کمتر از 3×10⁵ (cfu/ml) نگهداری نمایند.

همانطور که در شکل 2 مشهود است، در روزهای 5، 8 و 10 نگهداری اختلاف معنی داری بین باکتریهای سرماگرای نمونه های تیمار شده با CO₂ تا pH های 6/2 و 6 با نمونه شاهد و نمونه تیمار شده تا pH=6/4 مشاهده گردید. راثوس ماییدو و همکاران (1998) در مطالعات خود مشاهده کردند که با تزریق CO₂ به نمونه های شیر با دمای پایین تا pH 6 و 6/2 از رشد باکتریهای سرماگرا به طور قابل ملاحظه ای جلوگیری می گردد.

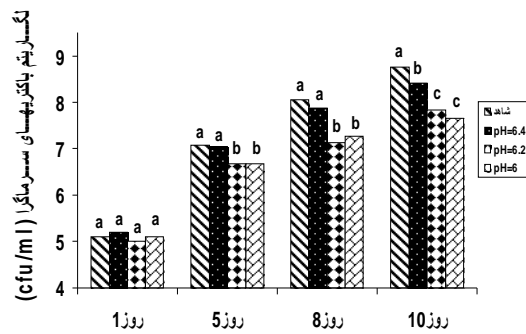
شکل 3 نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین باکتریهای کلی فرم نمونه شاهد با نمونه های تیمار شده

¹Duncan's test

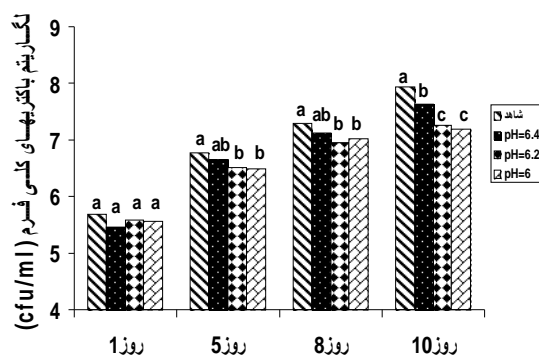
همکاران (2003) نیز در مطالعات خود به نتایج مشابهی دست یافتند و چنین استنباط نموده اند که طی نگهداری



شکل ۱- مقایسه میانگین بار میکروبی کل برای سطوح A (مقادیر مختلف CO_۲) در سطوح مختلف B (زمان های نمونه برداری) در نمونه شیر شاهد و نمونه های تیمار شده با CO_۲



شکل ۲- مقایسه میانگین باکتریهای سرماگرا برای سطوح A (مقادیر مختلف CO_۲) در سطوح مختلف B (زمان های مختلف نمونه برداری) در نمونه شیر شاهد و نمونه های تیمار شده با CO_۲



شکل ۳- مقایسه میانگین باکتریهای کلی فرم برای سطوح A (مقادیر مختلف CO_۲) در سطوح مختلف B (زمان های مختلف نمونه برداری) در نمونه شیر شاهد و نمونه های تیمار شده با CO_۲

نگهداری را نشان می دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می گردد رشد میکروبی در نمونه های فرایند شده با CO₂ به طور محسوسی کاهش یافته است.

شیر در 4 ° C، میکروارگانیسم های حاضر در آن عمدتاً باکتریهای سرماگرا هستند. شکل 4 مقایسه پلیت های حاصل از کشت بار میکروبی کل در روز دهم



شکل ۴- پلیت های حاصل از کشت بار میکروبی کل در روز دهم نگهداری

(پلیت شماره ۱: نمونه شاهد، پلیت شماره ۲: نمونه تیمار شده با CO₂ تا pH = ۶/۴، پلیت شماره ۳: نمونه تیمار شده با CO₂ تا pH = ۶/۲، پلیت شماره ۴: نمونه تیمار شده با CO₂ تا pH = ۶)

شاهد افزایش 3 روز ماندگاری بیشتر بودیم، همچنین کاربرد CO₂ تا pH = 6/2 نیز مدت ماندگاری را تا 2 روز افزایش داد.

جدول 1 نتایج حاصل از انجام آزمایش جوش و الکل برای نمونه شیر شاهد و نمونه های تیمار شده با CO₂ طی 10 روز نگهداری را نشان می دهد. بر اساس این نتایج، با افزودن CO₂ به شیر خام سرد شده تا pH = 6

جدول ۱- نتایج حاصل از آزمایش جوش و الکل

نمونه شاهد	pH = ۶/۴	pH = ۶/۲	pH = ۶
از روز ۶ تا ۶	+	+	+
روز ۷	-	+	+
روز ۹	-	-	+
روز ۱۰	-	-	-

(+ عدم تشکیل لخته، - تشکیل لخته)

تواند به عنوان روش مناسبی جهت افزایش نگهداری شیر خام سرد شده مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش چنین به نظر می‌رسد که استفاده از CO₂ تا pH = 6 مؤثرترین تیمار باشد، بطوریکه ماندگاری شیر خام با افزودن این مقدار CO₂ در دمای 4 °C تا 3 روز افزایش می‌یابد که برای مراکز تولید و صنایع شیر کشورمان بسیار با ارزش است و در نهایت با توجه به ساده، سالم و اقتصادی بودن این تکنولوژی در مقایسه با اثرات سوء نگهدارنده‌های مصنوعی و تکنولوژیهای بسته بندی هزینه بر به نظر می‌رسد که پس از تکمیل مطالعات روش مناسبی برای نگهداری شیر خام در دامداریها، مراکز جمع آوری شیر و صنایع شیر باشد.

هاچ کیس و همکاران (1999) با افزودن 21/5 میلی مولار CO₂ به شیر خام فاز تأخیری رشد را تقریباً تا 3 روز گسترش دادند. ما و همکاران (2003) با افزودن 1500 ppm CO₂ به شیر خام شاهد افزایش زمان نگهداری تا دو برابر بودند.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از بررسی تأثیر CO₂ بر روی خواص میکروبی شیر خام در این کار پژوهشی حاکی از آن است که کاربرد CO₂ تأثیر مثبتی در ماندگاری و خواص میکروبی شیر خام سرد شده دارد. بطوریکه افزودن CO₂ تا pH های برابر 6 و 6/2 به شیر خام سرد شده روش مؤثری جهت جلوگیری از ازدیاد بار میکروبی کل و کنترل باکتریهای سرما گرا است و می

منابع مورد استفاده

- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1373. شیر، روش شمارش میکروارگانسیم های سرماگرا، استاندارد ملی ایران شماره 3451 .
- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1379. شیر و فرآورده های آن، روش شمارش کلی فرمها قسمت اول (روش شمارش پرگنه)، استاندارد ملی ایران شماره 1-5486.
- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1381. شیر و فرآورده های آن، روش شمارش کلی پرگنه های میکروارگانسیم ها، استاندارد ملی ایران شماره 5484.
- عزتی ر، 1382. بررسی تأثیر تعداد باکتریهای سرماگرا روی خواص فیزیکی، شیمیایی و بازده پنیر سفید سنتی و اولترافیلتراسیون. پایان نامه کارشناسی ارشد، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- فرخنده ع، 1371. روشهای آزمایش شیر و فرآورده های آن. جلد دوم. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران.

Champagne CP, St-Gelais D and de Candolle A, 1998. Acidification rates and population ratios of lactic starters in carbonated milk. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 2: 100-106.

Erkmen O, 1997. Antimicrobial effects of pressurized CO₂ on staphylococcus aureus in broth and milk. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 30: 826-829.

- Erkmen O, 2000. Effect of CO₂ pressure on listeria monocytogenes in physiological saline and foods. *Food Microbiology*, 17: 589-596.
- Erkmen O, 2001. Effects of high-pressure CO₂ on Escherichia coli in nutrient broth and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 65: 131-135.
- Glass K, Kaufman K, Smith A, Johnson E, Chen J and Hotchkiss JH, 1999. Toxin production by clostridium botulinum in pasteurized milk treated with CO₂. *Journal of Food Protection*, 8: 872-876.
- Gueimonde M, Alonso L, Delgado T, Bada-Gancedo JC and de los Reyes-Gavilan GC, 2003. Quality of plain yoghurt made from refrigerated and CO₂-treated milk. *Food Research International*, 36: 43-48.
- Hotchkiss JH, Chen JH and Lawless HT, 1999. Combine effects of CO₂ and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, 82: 690-695.
- Hotchkiss JH, 2003. Use of CO₂ for long haul transportation of raw milk. *Food Science/NEDFRC*
- Loss CR and Hotchkiss JH, 2002. Effect of dissolved CO₂ on thermal inactivation of microorganisms in milk. *Journal of Food Protection*, 12: 1924-1929.
- Ma Y and Barbano M, 2003. Effect of temperature of CO₂ injection on the pH and freezing point of milks and creams. *Journal of Dairy Science*, 86: 1578-1589.
- Ma Y, Barbano M and Santost M, 2003. Effect of CO₂ addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4° C. *Journal of Dairy Science*, 86: 1616-1631.
- Rajagopal M, Werner BG and Hotchkiss JH, 2005. Low pressure CO₂ storage of raw milk: microbiological effects. *Journal of Dairy Science*, 88: 3130-3138.
- Raus-Madiedo P, Bada-Gancedo JC, Fernandez-Garcia E, Gonzalez de Llano D and Reyes-Gavilan C, 1996. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by CO₂ addition. *Journal of Food Protection*, 59: 502-508.
- Ruas- Madiedo P, Bada-Gancedo JC, Alonso L and de los Reyes-Gavilan C, 1998. Afuega'l pitu cheese quality: CO₂ Addition to refrigerated milk in acid- coagulated cheesemaking. *International Dairy Journal*, 8: 951-958.
- Ruas-Madiedo P, Alonso L, Delgado T, Bada-Gancedo JC and de los Reyes-Gavilan GC, 2002. Manufacture of Spanish hard cheeses from CO₂-treated milk. *Food Research International*, 35: 681-690.
- Sorhaug T and Stepaniak L, 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Food Science and Technology*, 2: 35-41.
- Tomasula PM and Boswell RT, 1999. Measurement of the solubility of CO₂ in milk at high pressures. *Journal of Supercritical Fluids*, 16: 21-26.
- Werner BG and Hotchkiss JH, 2006. Continues flow none thermal CO₂ processing: the lethal effects of subcritical and supercritical CO₂ on total microbial populations and bacteria spores in raw milk. *Journal of Dairy Science*, 89: 872-881.