

بررسی اثر عملیات میدان الکتریکی پالسی بر مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس در دوغ

زهره دیدار^{۱*}

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۱۹

^۱ استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

* مسئول مکاتبه: Email: z_didar57@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: بادکردگی دوغ ناشی از فعالیت مخمرها یکی از معایب عمده این محصول به حساب می‌آید. مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس یکی از مهم‌ترین عوامل فساد دوغ و عامل بادکردگی محصول است. هدف: در این تحقیق اثر عملیات میدان الکتریکی پالسی بر مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس در دوغ بررسی شده است. روش کار: بدین منظور ابتدا نمونه‌های دوغ توسط مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس با جمعیت تقریبی 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر تلقیح گردید و سپس تحت عملیات میدان الکتریکی پالسی شامل شدت میدان الکتریکی ۱، ۲، ۳ و ۴ کیلو ولت در سانتی‌متر و تعداد پالس ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ قرار گرفت. سپس به منظور بررسی جمعیت باقی‌مانده مخمر از روش کشت میکروبی استفاده گردید. اثر عملیات میدان الکتریکی پالسی بر روی رفتار رئولوژیکی، ویسکوزیته و درصد دوفاز شدن دوغ نیز مورد بررسی قرار گرفت. بررسی مورفولوژیکی سلول‌های مخمر قبل و بعد از اعمال عملیات میدان الکتریکی پالسی با استفاده از میکروسکوپ روبشی با بزرگنمایی ۱۵۰۰۰-۵۰۰۰۰ انجام شد. **نتایج:** بررسی‌ها نشان داد عملیات میدان الکتریکی پالسی سبب کاهش جمعیت مخمر در نمونه‌های دوغ گردید ($P<0/05$). بیشترین کاهش در تیمار فرآوری شده با عملیات میدان الکتریکی پالسی با شدت میدان الکتریکی ۴ kV/cm و تعداد پالس ۱۰۰-۲۵۰ مشاهده گردید. عملیات میدان الکتریکی پالسی سبب کاهش میزان ویسکوزیته گردید و درصد دوفاز شدن نمونه‌های دوغ تحت این عملیات افزایش نشان داد ($p<0/05$). **نتایج بررسی مورفولوژیکی،** نشان داد عملیات میدان الکتریکی پالسی سبب تغییراتی در مورفولوژی سلول مخمر شده است. **نتیجه گیری نهایی:** عملیات میدان الکتریکی پالسی سبب کاهش جمعیت مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس که عامل مهم بادکردگی و فساد دوغ است، می‌گردد.

واژگان کلیدی: دوغ، مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس، عملیات میدان الکتریکی پالسی

مقدمه

آروما و بادکردگی محصول در طول زمان نگهداری محصول است که ناشی از فعالیت میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (ترکی و همکاران ۱۳۹۶). تحقیقات وجود مخمر در برخی از نمونه‌های دوغ پس از پاستوریزاسیون و بسته بندی بیش از حد مجاز استاندارد را نشان داده است

دوغ یکی از فرآورده‌های لبنی تخمیری پرمصرف در ایران بخصوص در طول فصول گرم است (سلطانی و همکاران ۲۰۱۲). از معایب عمده دوغ که باعث کاهش زمان ماندگاری و بازارپسندی آن می‌گردد، تغییر طعم و

مواد و روش‌ها

مخمر کلویوروماایسس مارکسیانوس (PTCC 5188) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. پس از فعال سازی، سلول‌ها در محیط YDP آگار شیب دار در دمای 4°C نگهداری شدند.

تهیه مایه تلقیح

یک لوپ کامل از کلنی خالص مخمر به یک ارلن مایر فلاسک ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط تلقیح (۵ درصد لاکتوز، ۰/۳ درصد عصاره مخمر و ۰/۵ درصد پپتون در آب مقطر) منتقل و سپس در یک انکوباتور شیکر دار با دمای 30°C درجه سانتی گراد در دور ثابت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد.

جداسازی و آماده سازی سلول‌های مخمر

سلول‌های مخمر به وسیله سانتریفوژ محیط کشت محلول در شرایط ۴۵۰۰ g برای مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند (سه مرتبه شستشو با آب سرد دیونیزه). (محمدزاده و همکاران ۱۳۹۳). پس از آن، غلظت 10^6 سلول در میلی لیتر تهیه گردید (ابراهیمی و همکاران ۱۳۹۲).

روش تولید دوغ

برای تهیه دوغ با فرمولاسیون دوغ معمولی (۴۰ درصد ماست، ۰/۷ درصد نمک و ۵۹/۳ درصد آب) از ظروف و وسایل تمیز و سترون با رعایت اصول بهداشتی استفاده گردید. برای این منظور پس از توزین ماست با ترازوی دیجیتال، ماست هم زده شد (۱۳۰ rpm) تا کاملاً صاف و یکدست شود. سپس محلول آب و نمک اندک اندک و در حین هم زدن به ماست اضافه گردید. برای تهیه محلول دوغ یکنواخت عمل مخلوط کردن ۲-۳ دقیقه ادامه داده شد (فروغی نیا و همکاران ۱۳۸۸).

(مهربان سنگ آتش و همکاران ۱۳۹۰). میرعلیزاده و همکاران (۱۳۹۶) وجود آلودگی کپک و مخمری در ۷/۹۳ درصد از نمونه‌های دوغ در زنجان را تأیید نموده‌اند. ذوالفقاری و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند از مجموع ۲۰۲ نمونه دوغ شهرستان قم، تعداد ۱۹۵ نمونه آلوده به کپک و مخمر بوده‌اند. از جمله مخمرهای عامل فساد در ماست و فرآورده‌های آن مخمر کلویوروماایسس مارکسیانوس است (ویلجیون ۲۰۰۳). یکی از روش‌های غیرحرارتی نگهداری مواد غذایی شامل استفاده از عملیات میدان الکتریکی پالسی است. استفاده از ولتاژ بالا سبب غیر فعال شدن میکروارگانیسم‌ها بدون ایجاد اثرات منفی به خصوص در عطر و طعم و ارزش غذایی نسبت به فرآوری‌های حرارتی می‌شود (وانگ و همکاران ۲۰۱۸).

اثر عملیات میدان الکتریکی پالسی بر روی دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌های مختلف شامل انواع باکتری‌ها نظیر استوباکتر (نیو و همکاران ۲۰۱۸)، اشرشیاکلی (تائو و همکاران ۲۰۱۵)، انتروباکتر آئروژنز (کجاوارا و همکاران ۲۰۱۵)، ساکاروماایسس سرویسیه (تائو و همکاران ۲۰۱۵) و کاندیدا آلیکانس (گیو و همکاران ۲۰۱۸) بررسی شده است. مخمرها حساسیت بسیار زیادی به میدان الکتریکی پالسی نسبت به باکتری‌های رویشی دارند که علت آن اندازه بزرگتر مخمر نسبت به اکثر باکتری‌ها است (اورتگا-ریواس ۲۰۱۱). از جمله اثرات میکروب‌کشی عملیات میدان الکتریکی پالسی، ایجاد استرس سلولی و تحریک پاسخ‌های استرس در سلول‌ها است (موئن و همکاران ۲۰۱۳). میزان مقاومت میکروارگانیسم‌های مختلف در این خصوص متفاوت است. پاستوریزاسیون برخی فرآورده‌ها نظیر شیر با استفاده از عملیات میدان الکتریکی پالسی مورد مطالعه قرار گرفته است (هاوا و همکاران ۲۰۱۱). در این تحقیق، اثر استفاده از عملیات میدان الکتریکی پالسی بر روی مخمر کلویوروماایسس مارکسیانوس در دوغ بررسی شده است.

روش عملیات میدان الکتریکی پالسی

در این پژوهش، شدت میدان الکتریکی (۱، ۲، ۳ و ۴ کیلوولت بر سانتی‌متر) و تعداد پالس (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰) به کار برده شد. نمونه شاهد، تحت عملیات میدان الکتریکی پالسی قرار نگرفت.

اندازه گیری برخی شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی دوغ

برای تعیین میزان پروتئین، چربی، اسیدیته و ماده خشک از روش استاندارد شماره ۲۴۵۳ مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران استفاده شد (مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. دوغ ساده. ویژگی‌ها و روش‌های آزمون). شاخص pH نمونه‌های دوغ توسط pH سنج دیجیتال مدل Metrohm ۷۴۴ در دمای محیط اندازه گیری شد.

اندازه گیری میزان دو فاز شدن دوغ

برای تعیین میزان دو فاز شدن از لوله‌های آزمایش به ابعاد مشخص (قطر ۱/۴، طول ۱۶ سانتی‌متر) استفاده شد. این لوله‌ها تا ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری از سمت پایین نشانه‌گذاری شدند، این ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری معادل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. سپس نمونه‌ها تا خط نشانه داخل لوله ریخته شدند و پس از درب‌بندی، به صورت کاملاً عمودی قرار گرفتند. برای اندازه گیری میزان دو فاز شدن در زمان‌های مورد نظر از فاصله خط نشانه (در ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری) تا خط ایجاد شده بین دو فاز اندازه گیری شد و هر میلی‌لیتر معادل یک درصد میزان جداسازی فازی در نظر گرفته شد (فروغی نیا و همکاران، ۱۳۸۸).

تعیین ویژگی‌های رئولوژیکی دوغ

آزمون رفتار جریان در محدوده سرعت برشی ۱۱-۳۲۱ برثانیه با استفاده از اسپیندل اس سی ۴-۱۸ ویسکومتر چرخشی مدل ال وی دی وی اولترا شرکت بروکفیلد کشور آمریکا اندازه‌گیری شد. دمای نمونه نیز در طول فرآیند با چرخش مداوم آب توسط حمام سرکولاتور (سری ام آ شرکت جولابو کشور آمریکا) در بین دو

جداره استوانه در دمای ۵°C ثابت نگه داشته شد (قربانی گرجی و همکاران ۱۳۹۰) در ویسکومتر، اسپیندل درون استوانه دیگری قرار گرفته، سیال در حجم محصور بین این دو استوانه ریخته شد و یکی از استوانه‌ها را با سرعت زاویه‌ای (Ω) معینی چرخانده، گشتاور بر روی استوانه چرخان یا استوانه ثابت اندازه گیری شد. بنابراین رابطه گشتاور و سرعت زاویه‌ای به دست آمد. اما از طرفی تنش وارده از طرف سیال بر روی دیواره استوانه‌ها با گشتاور رابطه مستقیم داشته و سرعت برش نیز با سرعت درون استوانه متناسب است. در نهایت از روی این روابط، ارتباط تنش و سرعت برش به دست آمد و با توجه به رابطه زیر، ویسکوزیته در سرعت برش‌های مختلف حاصل شد:

بررسی مورفولوژی سلول‌های $\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$ ه از تصویر برداری میکروسکوپی روبشی

به منظور بررسی خصوصیات ظاهری و مورفولوژی سلول‌های مخمر از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل phenom proX با بزرگ‌نمایی ۱۵۰۰-۵۰۰۰ استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: همه آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام شد. برای گزارش اطلاعات به دست آمده از تکرار آزمایشات و مشاهدات از میانگین استفاده شد. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS 16 آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. از آزمون دانکن جهت مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

دوغ تهیه شده دارای ۲/۱ درصد پروتئین، ۰/۹۸ درصد چربی، ۶/۹ درصد ماده خشک، اسیدیته ۴۳ درجه دورنیک، pH حدود ۴/۲ و گرانیوی ظاهری mPa.s ۱۰/۹۲ بود.

اثر پالس الکتریکی بر جمعیت مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس*

بررسی جمعیت مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* در نمونه‌های مختلف دوغ حاکی از کاهش جمعیت مخمر در شرایط به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی است (جدول ۱). بیشترین میزان جمعیت مخمر مربوط به نمونه شاهد بود ($p < 0/05$) و به کار بردن عملیات میدان

الکتریکی پالسی سبب کاهش جمعیت مخمری شده است به طوری که در شرایط به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی با شدت ۳ kv/cm و تعداد ۲۰۰ پالس، لگاریتم جمعیت مخمر به حدود $1/9 \pm 0/01$ رسیده است. در شرایط عملیات میدان الکتریکی پالسی ۴ kv/cm جمعیت مخمر همچنان روند کاهشی داشت و در تعداد پالس ۲۵۰ به $1/65 \pm 0/01$ رسید.

جدول ۱- اثر پارامترهای مختلف عملیات میدان الکتریکی پالسی بر جمعیت مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس*

Table1-The effect of different pulsed electric field parameters on *Kluyveromyces marxianus* count

Electric field strength (kv/cm), pulses number	Yeast count (log CFU/ml)	Electric field strength (kv/cm), pulses number	Yeast count (log CFU/ml)	Electric field strength (kv/cm), pulses number	Yeast count (log CFU/ml)	Electric field strength (kv/cm), pulses number	Yeast count (log CFU/ml)
1, 50	4.3 ± 0.05^a	2, 50	3.2 ± 0.03^f	3, 50	2.2 ± 0.02^k	4, 50	1.7 ± 0.03^p
1, 100	4.1 ± 0.01^b	2, 100	3.06 ± 0.02^g	3, 100	2.1 ± 0.02^l	4, 100	1.66 ± 0.02^q
1, 150	3.9 ± 0.02^c	2, 150	2.9 ± 0.02^h	3, 150	2 ± 0.01^m	4, 150	1.66 ± 0.01^q
1, 200	3.7 ± 0.01^d	2, 200	2.6 ± 0.03^i	3, 200	1.9 ± 0.01^n	4, 200	1.65 ± 0.01^q
1, 250	3.5 ± 0.02^e	2, 250	2.4 ± 0.01^j	3, 250	1.76 ± 0.02^o	4, 250	1.65 ± 0.01^q

Each value in the table represents the mean $\pm$ standard deviation of triplicate analysis. Different superscripts represent significant difference at $P < 0.05$.

نتایج حاصله با سایر گزارش‌های مشابه همخوانی دارد از جمله سیمونیس و همکاران (۲۰۱۹) نابودی قابل توجه گونه‌های مختلف مخمر در آب پنیر اسیدی تحت شرایط عملیات میدان الکتریکی پالسی را گزارش نمودند. مطابق این گزارش هر قدر شدت میدان الکتریکی به کار برده شده بیشتر باشد، میزان کاهش جمعیت میکروارگانیسم‌های مختلف بخصوص مخمرها بیشتر خواهد بود (سیمونیس و همکاران ۲۰۱۹). در گزارش دیگری از این محقق، بیان شده است عملیات میدان الکتریکی پالسی سبب بروز آپوپتوزیس در سلول‌های مخمر و در نتیجه کاهش تعداد سلول زنده *ساکارومایسس سرویسیه* به میزان 62 ± 6 درصد گردیده است (سیمونیس و همکاران ۲۰۱۷).

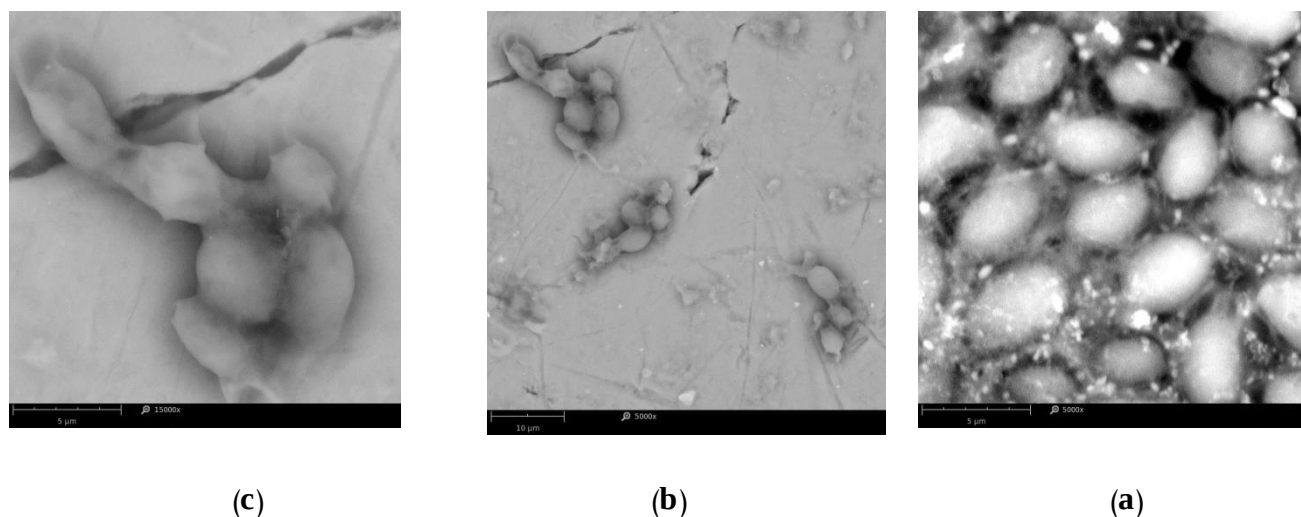
محمد و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی با شدت ۸/۸۴ کیلو ولت در

سانتی‌متر به تعداد ۹۰ پالس سبب کاهش جمعیت میکروبی کلی از حدود $10^2 \times 2/27$ کپک و مخمر به کمتر از ۱۰ کلنی در هر گرم می‌شود و زمانی که شدت میدان الکتریکی به ۱۰/۸۲ کیلو ولت در سانتی متر در ۶۰ پالس افزایش یافت، تعداد کپک و مخمر به صفر رسیده است. بررسی‌ها در خصوص اثر تعداد پالس‌های مختلف بر جمعیت مخمر بیانگر اثر معنی دار این عامل بر جمعیت مخمر بود ($p < 0/05$). دلایل متعددی برای نابودی میکروارگانیسم‌ها در مواجهه با عملیات میدان الکتریکی پالسی توسط محققین مختلف ذکر شده است از جمله پدیده الکتروپوراسیون در غشا میکروب‌ها که منجر به نابودی آن‌ها می‌شود (کانتیک و همکاران ۲۰۱۲). برخی مطالعات اثر عملیات میدان الکتریکی پالسی بر میتوکندری از جمله اثر این عملیات بر روی پتانسیل غشاء میتوکندری را نشان داده است (استلاک و همکاران

(۲۰۱۴). آزاد شدن یون کلسیم از میتوکندری نیز از دیگر فرضیه‌های مطرح شده در این زمینه است. افزایش غلظت یون کلسیم خارج سلولی نیز از پیامدهای به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی در سلول‌های میکروبی است که این افزایش غلظت یون کلسیم در بروز آپوپتوزیس، پاسخ‌های استرس سلول و نیز تشکیل اکسیژن واکنشی نقش دارد (ناپونتیک و همکاران ۲۰۱۶). همچنین برخی گزارشات اثر عملیات میدان الکتریکی پالسی بر روی اسیدهای نوکلئیک سلول‌ها تأیید نموده است مطابق این تحقیقات، به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی سبب شکل نامنظم و خرد شدن، طولیل شدن و متراکم شدن ساختار سلولی می‌گردد بعلاوه عملیات میدان الکتریکی پالسی سبب تخریب DNA می‌شود (رن و همکاران ۲۰۱۳). شدت میدان الکتریکی به کار برده شده نیز تفاوت معنی‌داری از نظر میزان نابودی مخمر ایجاد نمود ($p < 0/05$). ولتاژ بالاتر منجر به نابودی بیشتر مخمر گردید (جدول ۱). اثر عملیات میدان الکتریکی

پالسی بستگی به قدرت میدان الکتریکی و همچنین مدت زمان به کار بردن فرآیند دارد. اثر کشندگی نیز بستگی به میزان دمای سیال که در طی این فرآیند در اثر انرژی اصطکاک که توسط جریان الکتریکی ایجاد می‌شود، دارد. از دیگر عواملی که بر میزان نابودی میکروارگانیسم‌ها توسط عملیات میدان الکتریکی پالسی مؤثر هستند شامل مدت زمان فرآیند، درجه حرارت، ترکیب ماده غذایی، میزان رطوبت، فعالیت آبی، اسیدیته، وجود ترکیبات یونی، میزان هدایت حرارتی و الکتریکی و قدرت یونی ماده غذایی است. نوع میکروارگانیسم، اندازه سلول، تعداد میکروارگانیسم و مرحله رشد میکروب از دیگر عوامل مؤثر بر میزان اثر کشندگی این فرآیند هستند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۸).

بررسی‌های میکروسکوپی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز بروز تغییراتی در مورفولوژی سلول‌های مخمر پس از به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ روبشی از سلول‌های مخمر *کلویرومایسس مارکسیانوس* (a) قبل از مواجهه با عملیات میدان الکتریکی پالسی (b) پس از مواجهه با عملیات میدان الکتریکی پالسی ۴ کیلوولت، ۲۵۰ پالس (بزرگنمایی ۵۰۰۰)، (c) پس از مواجهه با عملیات میدان الکتریکی پالسی ۴ کیلوولت در سانتی‌متر، ۲۵۰ پالس (بزرگنمایی ۱۵۰۰۰).

Fig1- Scanning Electron Microscope images of *Kluyveromyces marxianus*. (a) Before subjecting to pulsed electric field operation. (b) After subjecting to electric field strength 4 kv/cm, 250 pulses number ($\times 5000$). (c) After subjecting to electric field strength 4 kv/cm, 250 pulses number ($\times 15000$).

تغییرات مورفولوژیکی میکروارگانیزم‌ها تحت شرایط به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی توسط پیل و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش شده است. مطابق گزارش پیل و همکاران (۲۰۱۶)، بررسی‌های انجام شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی صدمات به دیواره سلولی و غشاء سلولی در سلول میکروارگانیزم‌هایی که تحت عملیات میدان الکتریکی پالسی با شدت ۷/۵ کیلوولت در سانتی‌متر قرار گرفته‌اند را نشان داده است.

اثر عملیات میدان الکتریکی پالسی بر دوفاز شدن دوغ: بررسی‌های آماری نشان داد میزان دوفاز شدن دوغ تحت شرایط مختلف عملیات میدان الکتریکی پالسی شامل شدت میدان الکتریکی و تعداد پالس به کار برده شده با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند و عملیات میدان الکتریکی پالسی سبب افزایش درصد دوفاز شدن در

تمامی تیمارها گردید ($p < 0/05$). بسته به میزان ولتاژ پالس الکتریکی و تعداد پالس‌های به کار برده شده، شدت دوفاز شدن در نمونه‌های دوغ متفاوت بود. کمترین درصد دوفاز شدن (۵۲/۶٪) مربوط به نمونه شاهد بود. در شرایط عملیات میدان الکتریکی پالسی با شدت میدان الکتریکی ۱ kv/cm و تعداد ۵۰ پالس درصد دوفاز شدن برابر با $53/2 \pm 0/5$ درصد تعیین شد. با افزایش تعداد پالس و شدت میدان الکتریکی، میزان دوفاز شدن نیز افزایش پیدا نمود به طوری که در شرایط شدت میدان الکتریکی ۴ kv/cm و تعداد ۲۵۰ پالس، بیشترین میزان دوفاز شدن پس از گذشت یک هفته در نمونه دوغ مشاهده گردید ($72 \pm 0/8$ ٪). دلیل احتمالی شامل ناپایدار شدن فاز پروتئینی در اثر به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی ناشی از کوآگولاسیون پروتئین‌ها است که نتیجه آن افزایش میزان سرم است.

جدول ۲- اثر شرایط مختلف عملیات میدان الکتریکی پالسی بر درصد دوفاز شدن دوغ

Table 2- The effect of various pulsed electric field parameters on percentage of serum separation

Electric field strength (kv/cm), pulses number	Serum separation (%)	Electric field strength (kv/cm), pulses number	Serum separation (%)	Electric field strength (kv/cm), pulses number	Serum separation (%)	Electric field strength (kv/cm), pulses number	Serum separation (%)
1, 50	53.2±0.5 ⁿ	2, 50	58.2±0.44 ⁱ	3, 50	63±0.6 ^{ef}	4, 50	68±0.3 ^c
1, 100	54±0.2 ^{mn}	2, 100	58.73±0.38 ^{hi}	3, 100	63.86±0.5 ^e	4, 100	70±0.5 ^b
1, 150	54.46±0.4 ^m	2, 150	59.33±0.51 ^h	3, 150	65.33±0.7 ^d	4, 150	70.6±0.7 ^{ab}
1, 200	55.53±0.52 ^k	2, 200	61.2±0.6 ^g	3, 200	66.6±0.35 ^d	4, 200	71±0.6 ^{ab}
1, 250	57.33±0.7 ^j	2, 250	62.5±0.4 ^f	3, 250	67±0.27 ^{cd}	4, 250	72±0.8 ^a

Each value in the table represents the mean ± standard deviation of triplicate analysis. Different superscripts represent significant difference at $P < 0.05$.

این خصوص هم‌خوانی دارد از جمله موسوی و امام جمعه (۲۰۰۸) در گزارش خود رفتار نیوتنی در نمونه‌های مختلف دوغ با مقادیر مختلف اسیدیته و ماده جامد را بیان نموده‌اند (موسوی و امام جمعه ۲۰۰۸).

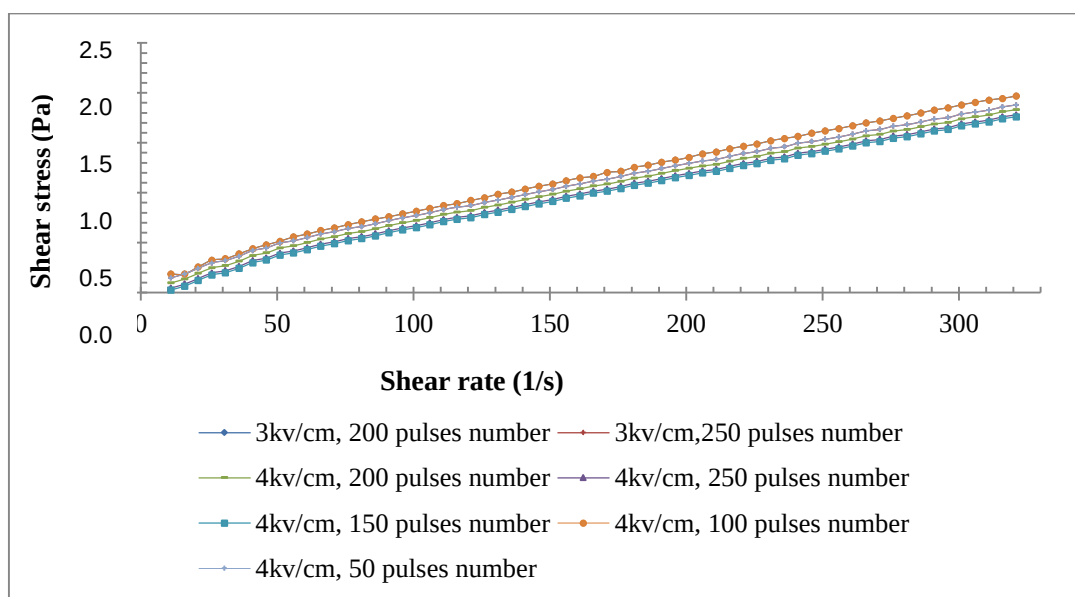
مطابق شکل‌های ۲ و ۳، به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی تغییر چندانی در رفتار رئولوژیکی نمونه‌های دوغ ایجاد ننموده است و می‌توان نتیجه گرفت

اثر عملیات میدان الکتریکی پالسی بر خصوصیات رئولوژیکی دوغ

منحنی جریان و ویسکوزیته نمونه‌های مختلف دوغ در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. مطابق شکل ۲، از نظر رئولوژیکی، دوغ رفتار مشابه مایعات نیوتونی دارد که با افزایش میزان نرخ برش، میزان تنش برشی افزایش داشته است که این مشاهدات با سایر تحقیقات مشابه در

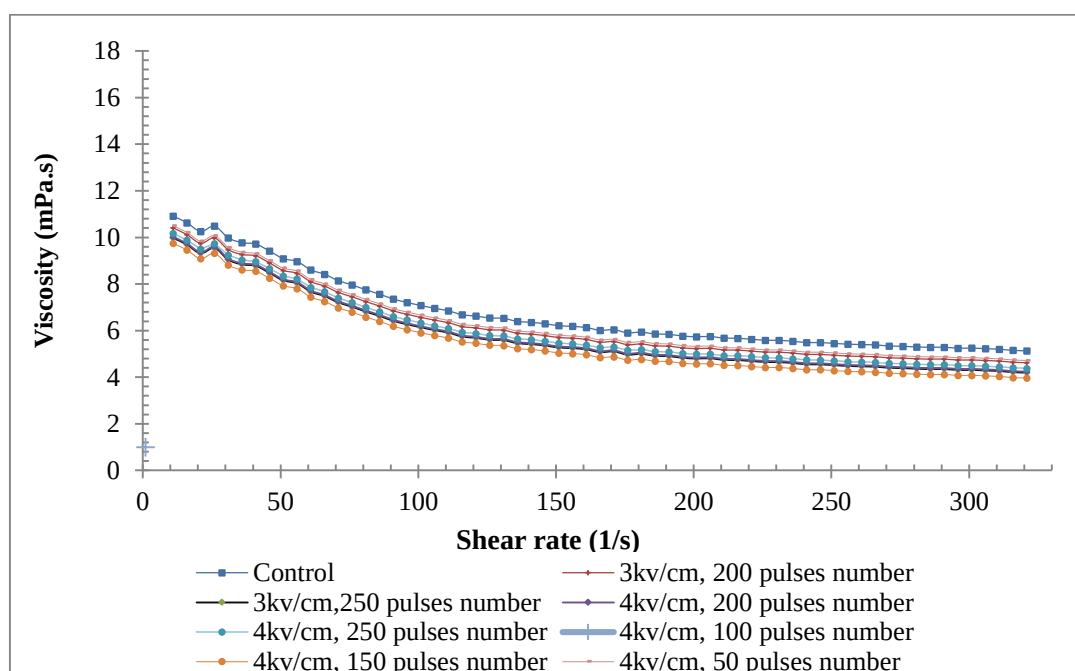
عمل می‌کنند و بر روی رفتار جریانی محصولات لبنی تأثیر گذار هستند. پیوندهای بین مولکولی و ویژگی‌های ترمودینامیک پروتئین‌ها نیز بر خصوصیات رئولوژیکی فرآورده‌های لبنی مؤثر هستند و دوغ به علت رقیق بودن و غلظت کم پروتئین‌ها، رفتار جریانی شبیه به مایعات نیوتنی دارد (موسوی و امام جمعه ۲۰۰۸).

شرایط عملیات میدان الکتریکی پالسی مورد مطالعه در این پژوهش اثر قابل توجهی بر پیوندهای بین مولکولی پروتئین‌های نمونه‌ها نداشته است. رفتار رئولوژیکی دوغ، مشابه مایعات نیوتنی است که علت این رفتار جریانی در دوغ، غلظت پایین پروتئین‌ها در دوغ است. پروتئین‌ها مانند پروتئین‌های آب پنیر و کازئین مانند ذرات کلئیدی



شکل ۲- نمودار تنش برشی بر حسب نرخ برش در نمونه‌های مختلف دوغ

Fig2- Shear stress versus shear rate of Doogh samples



شکل ۳- نمودار ویسکوزیته ظاهری بر حسب نرخ برش در نمونه‌های مختلف دوغ

Fig3- Apparent viscosity versus shear rate of Doogh samples

جدول ۳- اثر شرایط مختلف عملیات میدان الکتریکی پالسی بر میزان ویسکوزیته ظاهری دوغ (mPa.s)

Table3- The effect of various condition of pulsed electric field on apparent viscosity of Doogh (mPa.s)

Electric field strength (kv/cm), pulses number	Viscosity (mPa.s)	Electric field strength (kv/cm), pulses number	Viscosity (mPa.s)	Electric field strength (kv/cm), pulses number	Viscosity (mPa.s)	Electric field strength (kv/cm), pulses number	Viscosity (mPa.s)
1, 50	10.91±0.01 ^a	2, 50	10.86±0.02 ^b	3, 50	10.79±0.01 ^c	4, 50	10.65±0.02 ^e
1, 100	10.91±0.01 ^a	2, 100	10.76±0.01 ^c	3, 100	10.69±0.03 ^d	4, 100	10.64±0.01 ^e
1, 150	10.85±0.02 ^b	2, 150	10.65±0.03 ^e	3, 150	10.59±0.01 ^f	4, 150	10.55±0.01 ^g
1, 200	10.76±0.01 ^c	2, 200	10.62±0.01 ^{ef}	3, 200	10.48±0.01 ^h	4, 200	10.47±0.02 ^h
1, 250	10.69±0.02 ^d	2, 250	10.59±0.02 ^f	3, 250	10.42±0.02 ⁱ	4, 250	10.43±0.03 ⁱ

Each value in the table represents the mean ± standard deviation of triplicate analysis. Different superscripts represent significant difference at $P < 0.05$.

سبب تغییراتی در ویسکوزیته نسبت به نمونه شاهد گردید. بیشترین کاهش ویسکوزیته در نمونه فرآوری شده تحت شرایط به کار بردن ۴ کیلوولت در سانتی‌متر و ۲۵۰ پالس مشاهده گردید (جدول ۳). از جمله دلایل احتمالی کاهش ویسکوزیته ظاهری، این است که عمل-آوری با میدان الکتریکی پالسی سبب تغییراتی در کوآگولاسیون پروتئین‌ها و اندازه گلبول‌های چربی و

تغییرات میزان ویسکوزیته ظاهری در نمونه‌های دوغ تحت عملیات میدان الکتریکی پالسی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد در تیمارهایی که تحت شدت میدان الکتریکی ۱ کیلو ولت بر سانتی‌متر و تعداد پالس‌های ۵۰ و ۱۰۰ قرار گرفتند، مقدار ویسکوزیته تغییر معنی داری نداشته است ولی در سایر تیمارها به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی مختلف بر روی دوغ

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد به کار بردن عملیات غیر حرارتی عملیات میدان الکتریکی پالسی سبب کاهش جمعیت مخمر عامل بادکردگی دوغ (*کلویرومایسس مارکسیانوس*) می شود به طوری که جمعیت مخمر در شدت میدان الکتریکی 4 kv/cm در تعداد پالس های ۱۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰، به کم ترین میزان رسید. به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی تغییراتی در خصوصیات رئولوژیکی دوغ ایجاد نموده و سبب کاهش ویسکوزیته ظاهری آن نسبت به نمونه شاهد شد بعلاوه، درصد دوفاز شدن نیز در اثر به کار بردن این عملیات، افزایش پیدا نمود.

توزیع آنها می گردد (اکسیانگ و همکاران ۲۰۱۱). نتایج مشابهی در گزارش اکسیانگ و همکاران (۲۰۱۱) در شرایط فرآوری شیر سویا با عملیات میدان الکتریکی پالسی بیان گردیده است. تغییر در ویسکوزیته در اثر به کار بردن عملیات میدان الکتریکی پالسی ناشی از شکستن پیوندهای بین پروتئین ها و آرایش مجدد آنها در طی حرکت براونی مولکول ها است.

منابع مورد استفاده

- ابراهیمی ل، اعتباریان ح ر، امینیان ح و صاحبانی ن. ۱۳۹۲. کنترل بیولوژیک بیماری کپک آبی سیب توسط مخمر *Metschnikowia pulcherrima* و بررسی امکان تلفیق آن با سیلیکون و برخی مکانیسم های دفاعی. بیماری های گیاهی. ۴۹(۱)، ۱۲۹-۱۲۳.
- بی نام. ۱۳۸۷. دوغ ساده. ویژگی ها و روش های آزمون. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۷، شماره استاندارد ۲۴۵۳.
- ترکی ز، حجت الاسلامی م و جعفری م. ۱۳۹۶. کیفیت میکروبی دوغ تهیه شده با افزودن همزمان صمغ CMC، زانتان و کتیرا در طول زمان نگهداری. مجله میکروب شناسی مواد غذایی. ۴(۱)، ۸۳-۷۵.
- فروغی نیا س، عباسی س و حمیدی ز. ۱۳۸۸، بررسی تأثیر هم زدن و همگن سازی روی میزان دو فاز شدن دوغ، مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی، ۱(۳)، ۱۰۰-۸۳.
- قربانی گرچی ا، محمدی فر م، عزت پناه ح و مرتضویان ا م. ۱۳۹۰، تأثیر سه گونه کتیرای ایرانی بر ویژگی های رئولوژیک و پایداری دوغ بدون چربی، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۶(۲)، ۴۱-۳۲.
- محمدزاده ج، طباطبایی یزدی ف، مرتضوی ع، کدخدایی ر و کوچکی آ. ۱۳۹۳، بررسی سینتیک و بهینه سازی شرایط رشد مخمر *کلویرومایسس مارکسیانوس* به منظور تولید بیومولوسیفایر مانان با استفاده از پودر آب پنیر، نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی. ۳(۳)، ۲۱۱-۲۲۶.
- مهربان سنگ آتش م، سرابی جماب م، کاراژیان ر، نوربخش ر، قلاسی ف، وثوق ا م و محسن زاده م. ۱۳۹۰، ارزیابی منابع آلودگی میکروبی موثر بر بادکردگی دوغ ایرانی در طول فرآیند تولید، مجله پژوهش های صنایع غذایی ۲۱(۱)، ۵۵-۴۵.
- میرزاعلیزاده ع، تاجکی ج، ساطعی ن، زمانی ع و حجازی ج. ۱۳۹۶، ارزیابی ویژگیهای شیمیایی و میکروبی فرآورده های شیر و دوغ پاستوریزه تولیدی استان زنجان بین سال های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲، علوم غذایی و تغذیه. ۱۴(۲)، ۱۲۳-۱۱۵.
- Estlack L E, Roth C C, Iii G L T, Iii WAL, Ibey BL, 2014. Nanosecond pulsed electric fields modulate the expression of Fas/CD95 death receptor pathway regulators in U937 and Jurkat cells, Apoptosis 19 : 1755-1768, <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-014-1041-9>.
- Guo J, Dang J, Wang K, Zhang J, Fang J. 2018. Effects of nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) on the human fungal pathogen *Candida albicans*: an in vitro study. Journal of Physics D: Applied Physics 51(18): DOI: 10.1088/1361-6463/aab8c8.

- Hawa L C, Putri RI and Susilo B, 2011. Pulsed Electric Fields Pasteurization of Milk: Effects of Various Voltage and Treatment Time on Physical Properties. *Journal of Basic and Applied Scientific Research* 1(10):1516-1523.
- Kajiwarra, T., Oide, T., Baba, K., Ohnishi, N., Katsuki, S., Akiyama, H., Sasahara, R., Inoue, K., 2015. Inactivation of *enterobacter aerogenes* in carboxymethyl cellulose solution using intense pulsed electric fields (iPEF) combined with moderate thermal treatment. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 22 (4):1849-1855.
- Kotnik, T, Kramar P, Pucihar G, Miklavcic D, Tarek M, 2012, Cell membrane electroporation—part 1: the phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine* 28:14-23.
- Moen E K, Roth, C C, Cerna C L, Estalck G, Wilmlink BL, 2013. Changes in protein expression of U937 and Jurkat cells exposed to nanosecond pulsed electric fields, SPIE, 2013: P. The Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE). LongWave Photonics LLC; M Squared, <http://dx.doi.org/10.1117/12.2005062>.
- Mohammed M E A, Amer Eissa A H, Aleid S M, 2016. Application of Pulsed Electric Field for Microorganisms Inactivation in Date palm Fruits. *Journal of Food and Nutrition Research* 4(10): 46-652.
- Mousavi M, Emam-Djomeh Z. 2008. Rheological Properties of Iranian Yoghurt Drink, Doogh. *International Journal of Dairy Science* 3(2): 71-78.
- Napotnik TB, Reberšek M, Vernier VT, Mali B, Miklavčič D, 2016. Effects of high voltage nanosecond electric pulses on eukaryotic cells (in vitro): A systematic review. *Bioelectrochemistry* 110: 1–12.
- Niu D, Wang L-H, Zeng X-A, Wen Q-H, Brennan C-S, Tang Z-S, Wang M-S. 2019. Effect of ethanol adaption on the inactivation of *Acetobacter* sp. by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 52: 25-33.
- Ortega-Rivas E, 2011. Critical Issues Pertaining to Application of Pulsed Electric Fields in Microbial Control and Quality of Processed Fruit Juices. *Food and Bioprocess Technology* 4:631-645.
- Pillet F, Formosa-Dague C, Baaziz H, Dague E, Rols M-P, 2016. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Scientific Reports* 6:19778 | DOI: 10.1038/srep19778.
- Ren Z, Chen X, Cui G, Yin S L, Chen L, Jiang J et al, 2013. Nanosecond pulsed electric field inhibits cancer growth followed by alteration in expressions of NF-kappa B and Wnt/beta-catenin signaling molecules, *PLoS One* 8(9), e74322, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074322>.
- Simonis P, Kersulis S, Stankevich V, Kaseta V, Lastauskiene E, Stirke A, 2017. Caspase dependent apoptosis induced in yeast cells by nanosecond pulsed electric fields. *Bioelectrochemistry* 115: 19–25.
- Simonis P, Kersulis S, Stankevich V, Sinkevich K, Striguniene K, Ragoza G, Stirke A, 2019. Pulsed electric field effects on inactivation of microorganisms in acid whey. *International Journal of Food Microbiology* 291: 128-134.
- Soltani M, Say D, Güzeler N, 2012. Production and Quality Characteristics of “Doogh”. *Akademik Gıda* 10(4): 50-53.
- Tao, Chen, Li, Zhao, Zhang, 2015. Influence of pulsed electric field on *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Properties* 18 (7): 1416-1427.
- Viljoen B C, 2003. Temperature abuse initiating yeasts growth in yoghurt. *Food Research International* 36: 193-197.
- Wang M-S, Wang L-H, El-Din A. Bekhit A, Yang J, Hou Z-P, Wang Y-Z, Dai Q-Z, Zeng X-A, 2018. A review of sublethal effects of pulsed electric field on cells in food Processing. *Journal of Food Engineering* 223: 32-41.
- Xiang B, Ngadi M, Simpson B, 2011. Effect of pulsed electric field on the rheological and color properties of soy milk. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62(8): 787–793.
- Zolfaghari M R, Gaeni R, Kalhor N, Khalilian M, Razavian M H & Sasani M S, 2012. Study of microbial contamination of milk and pasteurization dairy products in Qom province. *Journal of Microbial World* 5: 47-57.

Investigation the effect of pulsed electric field treatment on *Kluyveromyces marxianus* of Doogh

Z Didar^{1*}

Receives: April 12, 2018 Accepted: May 9, 2019

¹Assistant professor of Food Science, Department of Food Science and Technology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

*Corresponding author: Email: Z_didar57@yahoo.com

Introduction: Swelling is one of the main disadvantages of Doogh (Iranian yoghurt drink). *Kluyveromyces marxianus* is the main cause of Doogh spoilage and its swelling. Investigations showed the yeast count of Doogh samples more than permitted standard level (Mehraban Sangatash et al., 2011). Other researches also confirmed the presence of mold and yeast contamination in Doogh samples in Zanjan (Mir Alizadeh et al., 2017). A major yeast causative spoilage of yogurt and its products is *Kluyveromyces marxianus* (Viljoen 2003). One of the non-thermal methods of food processing involves the use of pulsed electric field operations. The use of pulsed electric field causes inactivation of microorganisms without adverse effects especially on flavor and nutritional value (Wang et al., 2018). In this research, the effect of pulsed electric field treatment on the *Kluyveromyces marxianus* in Doogh was investigated. Quality of Doogh samples was also determined.

Material and methods: The yeast *Kluyveromyces marxianus* (PTCC 5188) was purchased from Iranian Research Organization for Science and Technology. After activation, cells were incubated in YDP agar at 4°C. For preparation of inoculum, a complete loop of pure yeast colony was transferred to a 250 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of inoculum (5% lactose, 0.3% yeast extract and 0.5% peptone in distilled water) and then placed in a shaker incubator (30°C, 150 rpm, 24 h). Thereafter, yeast cells were isolated by centrifugation at 4500 g for 10 minutes (three times rinsing with deionized water) (Mohammadzadeh et al., 2014). Then, a concentration of 10^5 cells per ml was prepared (Ebrahimi et al., 2013). Preparation of Doogh samples was done according the following steps. 40% yogurt, 0.7% salt and 59.3% water was mixed (130 rpm). Mixing was continued for 2–3 minutes to prepare a uniform Doogh samples (Foroughinia et al., 2009). In this study, electric field strength (1, 2, 3 and 4 kV / cm) and pulses number (50, 100, 150, 200 and 250) were used. The control sample did not undergo pulsed electric field operation.

To determine the amount of protein, fat, acidity and dry matter, standard method of Iranian National Standards Organization was used (Iranian Institute of Standardization and Industrial Research; Doogh – Specifications and test method, ISIRI 2453). The pH of the Doogh samples was measured by digital pH meter 744 Metrohm at ambient temperature. Serum separation of Doogh samples were determined according to the following steps. Experimental tubes with specified dimensions (1.4 cm diameter, 16 cm in length) were used to determine the serum separation percentage. These tubes were marked down to a height of 10 cm, this height of 10 cm was considered as 100%. The samples were then poured into the tube to the marking line and, after capping, positioned completely vertically and in specific time intervals, the line formed between the two phases was measured, and each milliliter was equal to 1% of the phase separation rate (Foroughi Nia et al., 2009). The flow behavior test was measured at a shear rate range of 11- 321 per second using a Spindle SC4-18 LV DV III Ultra rotary viscometer from Brookfield, USA. Morphological study of yeast cells was performed before and after applying pulsed electric field treatment using scanning electron microscope with magnification of 15000-5000.

Results and discussion: Doogh had 2.1% protein, 0.98% fat, 6.9% dry matter, acidity=43, pH about 4.2 and apparent viscosity of 10.92 mPa.s. Evaluation of the yeast population of *Kluyveromyces marxianus* in different Doogh samples indicates that the yeast population is reduced under conditions of application of pulsed electric field operation. The highest yeast population belonged to the control sample ($p < 0.05$) and application of pulse electric field operation reduced the yeast population and in conditions of pulse electric field operation with electric field strength of 3 kv /cm and pulses number=200, the log of the yeast population reached about 1.9 ± 0.01 . In the conditions of pulsed electric field operation 4 kv / cm and pulses number=250, yeast population continued to decrease, reaching to 1.65 ± 0.01 . Statistical analysis showed that there is a significant difference between serum separation of Doogh samples under different conditions of pulse electric field operation including the electric field strength and the number of pulses used ($p < 0.05$). Pulse electric field operation increased percentage of serum separation and control sample had lowest serum separation (52.6%). Depending on the amount of electric field strength and the number of pulses applied, the amount of serum separation in Doogh samples were changed. In Doogh sample subjected to 1 kv / cm electric field strength and pulses number= 50, serum separation was equal to $53.2 \pm 0.5\%$ and in sample subjected to electric field strength= 4 kv / cm and 250 pulses number, the highest serum separation was observed ($72 \pm 0.8\%$), and results might be due to the coagulation of proteins during application of pulsed electric field resulting in an increase in serum separation level. Applying pulsed electric field operation did not significantly change the rheological behavior of Doogh samples and it can be concluded that the conditions of pulsed electric field operation studied in this study did not have a significant effect on the intermolecular bonds of the sample proteins. Investigation of the apparent viscosity of Doogh samples under pulsed electric field operation showed that the viscosity values did not change significantly in samples that were exposed to 1 kV/cm and 50 and 100 pulses number, but in other treatments, it caused changes in viscosity compared to the control sample. The highest decrease in viscosity was observed in the treated sample under conditions of 4 kV /cm and 250 pulse number. One of the possible reasons for the decrease in apparent viscosity is that the pulsed electric field results in the coagulation of proteins and the size of distribution of fat globules (Xiang et al., 2011). The results of morphological examination of yeast cells, showed that the pulsed electric field treatment caused a change in the morphology of the yeast cell.

Conclusion: The results of this study showed that application of non-thermal operation of pulsed electric field reduces the population of *Kluyveromyces marxianus*, a major causative of swelling of this product. At electric field strength of 4 kv/cm and pulses numbers of 100, 150, 200 and 250, the log of yeast count reaches to the lowest level. Applying pulsed electric field operation caused some changes in the rheological properties of the Doogh and reduced its apparent viscosity compared to the control sample. In addition, the percentage of serum separation, increased as a result of applying this operation.

Keywords: Doogh, *Kluyveromyces marxianus*, Pulsed Electric Field treatment