ارزیابی اثر امواج فراصوت بر غیرفعال‌سازی ریز زنده‌های *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* در آب انار

حمیدرضا علی‌قورچی[۱]، محسن برزگر[۲*]، محمدعلی سحری[۳]، سلیمان عباسی[۲]

۱- فارغ‌التحصیل دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس و استادیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان.
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

(تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۲۰)

چکیده

میوه انار منبع سرشار ترکیبات فراسودمند با اثرات سلامت بخش هست. فرآوری حرارتی تأثیر قابل‌توجهی بر این ترکیبات دارد. بنابراین، در تحقیق حاضر تأثیر امواج فراصوت به‌عنوان فن‌آوری غیرحرارتی بر غیرفعال‌سازی ریززنده‌های *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* در آب انار مورد بررسی قرار گرفت. آب انارهای حاصل از رقم‌های انار ملس و آلک ساوه با ریززنده‌های *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* تلقیح شدند. سپس با استفاده از سامانه فراصوت مجهز به پروب ۱۹ میلی‌متری در فرکانس ثابت ۲۰ کیلوهرتز در شدت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد به مدت ۰، ۳، ۶ و ۹ دقیقه در یک محفظه شیشه‌ای دو جداره تحت‌تاثیر امواج فراصوت قرار گرفتند. شمارش تعداد سلول‌های زنده نمونه‌ها بر روی محیط کشت اختصاصی انجام گرفت. بر اساس نتایج حاصله تیمار فراصوت در شدت‌ها و زمان‌های مختلف اثر معنی‌داری بر جمعیت میکروبی داشت ($p<0.01$)، درحالی‌که، نوع آب انار تاثیر قابل‌توجهی بر جمعیت میکروبی نداشت. غیرفعال‌سازی *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* در شدت‌های ۵۰ و ۷۵ درصد کمتر از یک سیکل لگاریتمی بود. درحالی‌که در شدت ۱۰۰ درصد به مدت ۹ دقیقه متوسط کاهش تعداد سلول‌های *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* در دو نوع آب انار به ترتیب به میزان ۲ و ۱/۱ سیکل لگاریتمی بود. طراحی مناسب ظرف دوجداره شیشه‌ای، بررسی اثر امواج فراصوت به تنهایی و در دمای ثابت (۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد) را امکان‌پذیر ساخت. بنابراین، به نظر می‌رسد که کنترل دما در این روش امکان غیرفعال‌سازی موثر ریززنده‌های مورد مطالعه را غیرممکن می‌سازد، مگر اینکه مدت‌زمان به‌کارگیری فراصوت افزایش یابد که از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نیست.

کلید واژگان: آب انار، فراصوت، *اشریشیاکلی*، *ساکارومایسس سرویزیه*

* مسئول مکاتبات: mbb@modares.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

انار بانام علمی *Punica granatom* L. متعلق به خانواده *پونیکاسه* بوده و یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های شناخته‌شده هست. مصرف میوه انار به علت شناخته شدن خواص سلامت بخش آن به‌صورت فزاینده‌ای افزایش یافته است. در سال ۲۰۰۷ میزان تولید انار در جهان ۱/۵ میلیون تن گزارش‌شده که ایران تقریباً ۴۷٪ تولید انار دنیا را به خود اختصاص داده بود و ۵۳٪ دیگر نیز در کشورهایی نظیر ترکیه، افغانستان، هند، ایالات‌متحده آمریکا و .... تولید گردید. انار معمولاً به‌صورت میوه تازه، آب انار، مربا، ژله و سایر مکمل‌های انار در جهان مصرف می‌گردد. متوسط مصرف انار در ایران ۸-۷ کیلوگرم به ازای هر نفر است [۱]، که بیشتر به‌صورت میوه تازه یا آب انار تازه مصرف می‌گردد. در ایران معمولاً میوه انار به‌صورت سنتی در آب میوه‌فروشی‌ها آبگیری شده و به فروش می‌رسد که فاقد نگه‌دارنده بوده و فرایندی بر آن اعمال نمی‌شود و ماندگاری کمی دارد.

اما باید توجه داشت که نگرانی اصلی در مورد آب میوه‌های فرآوری نشده، آلوده شدن آن‌ها به ریززنده‌هایی از قبیل باکتری-های مقاوم‌به‌اسید، قارچ‌ها (مخمرها و کپک‌ها) و باکتری‌های بیماری‌زا به‌ویژه *اشریشیاکلی* O157:H7 [۲] و *لیستریا* [۳] است. این ریززنده‌ها قادرند در شرایط اسیدی زنده بمانند، به‌طوری‌که پس از مصرف فراورده‌های آلوده منجر به مرگ انسان نیز می‌گردند [۴]. رشد میکروبی موجب تخریب خصوصیات حسی و تغذیه‌ای آب میوه‌ها از قبیل ترکیبات فراسودمند، رنگ، طعم و بو شده و از طرفی عدم فراوری مناسب آب میوه‌ها منجر به ایجاد بیماری در انسان از طریق باکتری‌های بیماری‌زا یا سموم قارچی می‌گردد [۵]. بنابراین با توجه به مشکلات ایجادشده در مورد مصرف آب میوه‌های پاستوریزه نشده، اداره غذا و داروی ایالات‌متحده آمریکا (USFDA) استاندارد کاهش ۵ سیکل لگاریتمی ریززنده‌های بیماری‌زا را در آب میوه‌ها و آب سبزی‌ها جهت اطمینان از ایمنی چنین فرآورده‌هایی وضع کرد [۶].

افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان به‌منظور مصرف مواد غذایی با فرآوری حداقلی و گرایش صنایع غذایی به سمت تولید چنین محصولاتی، منجر به توسعه و به‌کارگیری فن‌آوری‌های غیرحرارتی برای فرآوری آب میوه‌ها شده است. باید توجه داشت که فرآوری حرارتی، به تنهایی یا همراه با نگه‌دارنده‌های شیمیایی و زیستی موثرترین روش جهت غیرفعال‌سازی ریززنده‌ها و آنزیم‌ها و افزایش زمان ماندگاری آن‌ها است [۷]. اما پاستوریزه و سترون نمودن حرارتی می‌تواند موجب کاهش خصوصیات حسی و تازگی مواد غذایی گردد [۸, ۹]. روش‌های غیرحرارتی در مقایسه با روش‌های حرارتی اثر تخریبی کمتری بر خصوصیات حسی و تغذیه‌ای مواد غذایی دارند. از فن‌آوری‌های غیرحرارتی که قابلیت بالقوه جایگزینی فرآوری حرارتی را دارند می‌توان به صاف کردن غشائی، خشک‌کردن اسمزی، میدان الکتریکی تپی، فراصوت، پرتودهی، فشار هیدرواستاتیک، بسته‌بندی زیست‌فعال و ازن اشاره نمود [۷, ۱۰, ۱۱].

فن‌آوری فراصوت در سال‌های اخیر در زمینه فرآوری مواد غذایی پیشرفت قابل‌توجهی داشته است که عموماً از امواج فراصوت در فرکانس‌هایی از ۲۰ کیلوهرتز تا ۱۰ مگاهرتز استفاده می‌نمایند [۱۲, ۱۳]. مهم‌ترین چالش فن‌آوری‌های غیرحرارتی در فرآوری مواد غذایی غیرفعال‌سازی ریززنده‌های عامل فساد و بیماری‌زا است که بر اساس سازوکارهای مختلفی صورت می‌گیرد. با توجه به متون علمی، روش‌های غیرحرارتی اثر کشندگی بر ریززنده‌ها دارند [۱۰].

کاربرد فراصوت در فرآوری مواد غذایی به‌صورت جامع توسط Knorr و همکاران در مقاله‌ای مروری چاپ شده است [۱۲]. همچنین در پژوهش‌های مختلف توانایی فراصوت در غیرفعال-سازی ریززنده‌ها و آنزیم‌ها در کنار حفظ ویژگی‌های حسی و تغذیه‌ای در آب میوه‌های مختلفی از قبیل توت‌فرنگی، آب انگور، آب گوجه‌فرنگی، شاه‌توت و سرکه سیب گزارش‌شده است [۱۴-۱۶]. سازوکار غیرفعال‌سازی ریززنده‌ها اساساً بر مبنای عوامل فیزیکی و شیمیایی است که ناشی از تاثیر فراصوت بر مواد غذایی مایع است [۱۰]. فراصوت به‌عنوان یک فن‌آوری بالقوه جهت غیرفعال‌سازی ریززنده‌های مربوطه به میزان ۵ سیکل لگاریتمی مطابق با استاندارد اداره غذا و داروی ایالات‌متحده آمریکا (FDA) در آب میوه‌ها معرفی شده است [۶, ۱۷].

با توجه به اینکه اثر فرآوری با فراصوت بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی آب میوه‌های مختلف در پژوهش‌های متعددی گزارش‌شده است و پژوهشی در مورد تاثیر امواج

Archive of SID

www.SID.ir

فراصوت بر ریززنده‌های عامل فساد و بیماری‌زا در آب انار گزارش نشده است. از طرفی پژوهش‌های بسیار محدودی وجود دارد که اثر فراصوت را به تنهایی در دمای ثابت و کمتر از دمای کشندگی مورد بررسی قرار داده باشند [۸، ۹]. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر فراصوت به تنهایی در دمای ثابت ۱±۲۵ °C و در شدت‌ها و زمان‌های مختلف بر آب انار تلقیح شده با ریززنده‌ها *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* است تا بتوان بر اساس نتایج حاصله میزان غیرفعال‌سازی آن‌ها و اعداد D مربوط به هر ریززنده را تعیین نمود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

رقم‌های انار ملس ممتاز ساوه آلک ساوه از مرکز تحقیقات انار ساوه در آذرماه ۱۳۹۰ تهیه گردید. سویه‌های میکروبی *اشریشیاکلی* (PTCC 5052) و *ساکارومایسس سرویزیه* (RITCC 1177) به ترتیب از موسسه سرم‌سازی رازی و سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند. این ریززنده‌ها بر اساس مطالعه‌های قبلی در مورد ریززنده‌های عامل فساد و بیماری‌زای انسانی در آب میوه‌ها انتخاب شدند [۵]. بنابراین در این مطالعه با توجه به محیط اسیدی آب انار *ساکارومایسس سرویزیه* و *اشریشیاکلی* به ترتیب به‌عنوان عامل فساد و بیماری‌زا انتخاب گردیدند. محیط‌های کشت مورد استفاده جهت فعال‌سازی اولیه و تکثیر شامل محیط کشت مایع/جامد نوترینت و عصاره مالت (Nutrient and Malt extract broth/agar) (Micromedia, Hungary) بودند. به‌منظور کشت *ساکارومایسس سرویزیه* از محیط کشت مک کانکی سوربیتول آگار (MacConkey sorbitol agar) (Liofilchem, Italy) و برای *اشریشیاکلی* از محیط کشت دی‌کلران رز بنگال کلرامفنیکل آگار (Dichloran rose bengal chloramphenicol agar) (Merck, Germany) استفاده گردید.

۲-۲- تهیه آب انار و آماده‌سازی آن

به‌منظور تهیه آب انار، انارهای هر رقم به‌صورت مجزا بعد از شستن و خشک‌کردن در ظرف حاوی آب سرد و جداسازی دانه-های آن از پوست، با استفاده از آب انارگیری دستی آب‌گیری شدند. عمل سانتریفوژ کردن نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. نمونه‌ها تا زمان آزمایش در فریزر ۱۸- °C نگهداری شدند.

۲-۳- تهیه تعلیق میکروبی یا تهیه تعلیق باکتریایی

پس از باز نمودن آمپول‌های حاوی سوش‌های استاندارد خشک‌شده به روش خشک کن انجمادی *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه*، به ترتیب روی محیط کشت نوترینت آگار و عصاره مالت اگار کشت داده شدند و بعد از گرمخانه-گذاری به محیط کشت مایع مربوطه منتقل شدند. به‌این‌ترتیب که یک حلقه پر از هر سویه‌ی میکروبی رشد یافته بر روی آگار تحت شرایط سترون به ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع نوترینت و عصاره مالت جهت تهیه تعلیق میکروبی تلقیح گردید و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت به ترتیب در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. سپس با محیط کشت مایع مربوطه رقیق شدند تا کدورت در طول‌موج ۶۰۰ nm برابر با جذب محلول استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند گردد و به‌عنوان رقت پایه میکروبی در نظر گرفته شود. محیط کشت مایع حاوی سلول‌های رشد یافته به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور/دقیقه سانتریفوژ شده و مجدداً توده سلولی حاصله در آب انار سترون مربوط به هر رقم به‌صورت تعلیق درآمد. مقدار ۳ میلی‌لیتر از این تعلیق به ۳۰۰ میلی‌لیتر آب انار حاصل از دانه‌های رقم ممتاز ساوه (۰/۰۱±۳/۵۶ pH) و آلک ساوه (۰/۰۲±۳/۰۹ pH) تلقیح گردید. سپس این تعلیق سلولی جهت سازگار شدن با محیط جدید به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه قبل از مطالعه‌های غیرفعال‌سازی نگه‌داشته شدند [۱۸].

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۴- تجهیزات فراصوت

در این پژوهش از سامانه فراصوت (Ultrasonic liquid processor, USAMisonix, Inc., New York) مجهز به پروب ۱۹ میلی‌متری با شدت‌هایی در محدوده 24.4–61 µm و در فرکانس ثابت ۲۰ کیلوهرتز استفاده گردید. اعمال امواج فراصوت در یک محفظه شیشه‌ای نسوز ۱۵۰ میلی‌لیتری (قطر داخلی و خارجی به ترتیب ۶۰ و ۸۰ میلی‌متر؛ ارتفاع داخلی و خارجی به ترتیب ۵۵ و ۶۵ میلی‌متر) مجهز به مارپیچ داخلی انجام گرفت که جهت ثابت نگه‌داشتن دما، محفظه شیشه‌ای به یک چرخاننده (Cooling thermostat: Lauda Alpha RA 8, Lauda-Königshofen, Germany) حاوی سیال سرمازای اتیلن گلیکول متصل بود. دمای مایع سرمازا بر اساس شدت مورد استفاده بین ۹-۲ درجه سانتی‌گراد بود که با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه گردش می‌نمود تا گرمای ایجادشده در اثر امواج صوتی را از نمونه خارج کرده تا دما در طی فرایند فراصوت ثابت بماند (۲۵±۱ °C) که این دما کمتر از دمای کشنده ریززنده‌های مورد مطالعه است.

۲-۵- غیرفعال‌سازی سوش‌های میکروبی تلقیح شده به آب انار با امواج فراصوت

برای این منظور ابتدا دمای نمونه با دمای فرایند تنظیم گردید. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب انار تلقیح شده با ریززنده مورد نظر در ظرف دوجداره شیشه‌ای ۱۵۰ میلی‌لیتری مجهز به مارپیچ داخلی در شدت‌های (دامنه) فراصوت ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد به مدت ۳، ۶ و ۹ دقیقه به‌صورت پیوسته و بدون تپ تیمار شد. دمای نمونه در طی فرایند فراصوت با استفاده از گردش سیال سرمازا ثابت نگه‌داشته شد (۲۵±۱ °C). بعد از اعمال تیمار فراصوت، نمونه در لوله‌های شیشه‌ای سترون بدون منفذ ریخته شده و بلافاصله در حمام یخ غوطه‌ور شد تا بر روی محیط کشت مربوطه کشت گردد.

۲-۶- شمارش سلول‌های زنده و تخمین زمان مرگ ریززنده‌ها

جهت تعیین میزان سلول‌های زنده، نمونه‌های تیمار شده و نشده با فراصوت به‌صورت متوالی با بافر فسفات رقیق‌شده و کشت آن‌ها به‌صورت سطحی بر روی محیط کشت اختصاصی انجام گرفت. صفحه‌های *اشریشیاکلی* در دمای ۳۵ °C گرمخانه‌گذاری شدند و سپس کلنی‌های ظاهرشده بعد از ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شمارش شدند. همچنین *ساکارومایسس سرویزیه* در دمای ۳۰ °C گرمخانه‌گذاری شد و بعد از ۷۲-۴۸ ساعت شمارش گردید. جهت تعیین میزان غیرفعال‌سازی با فراصوت Log N/N0 هر ریززنده و همچنین عدد دی (D-value) هر کدام محاسبه گردید. منحنی بقاء هر کدام از ریززنده‌ها در شدت-های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد به‌صورت لگاریتم تعداد کلنی‌ها در مقابل زمان فراصوت ترسیم گردید و سپس بهترین برازش در نمودار بقا مشخص شد. مقدار عدد دی به معنای مدت‌زمان بر حسب دقیقه فرایند مربوطه است که سلول‌های زنده ریززنده را به میزان ۹۰٪ کاهش داده و از نظر هندسی معادل منهای عکس شیب منحنی بقا است [۱۹، ۲۰].

۲-۷- تجزیه آماری

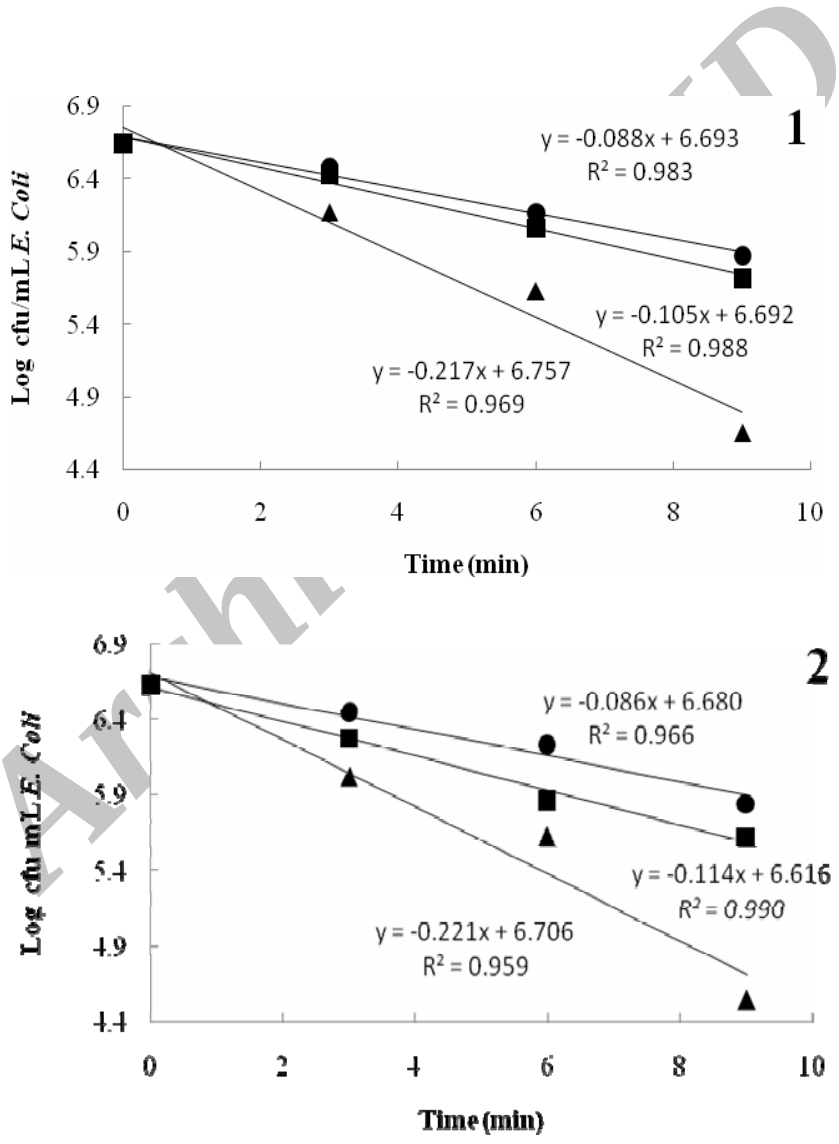
تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت و نتایج به‌صورت میانگین بیان گردید. تجزیه آماری دادها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

۳- یافته‌ها و بحث

در این مطالعه تعلیق *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* به نمونه‌های آب انار تلقیح شدند. سپس اثر غیرفعال‌سازی تیمار فراصوت در شدت‌ها و زمان‌های مختلف در نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. منحنی بقاء ریززنده‌های مورد مطالعه در شکل‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهد که غیرفعال‌سازی سلول‌های *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* در شدت‌های پائین

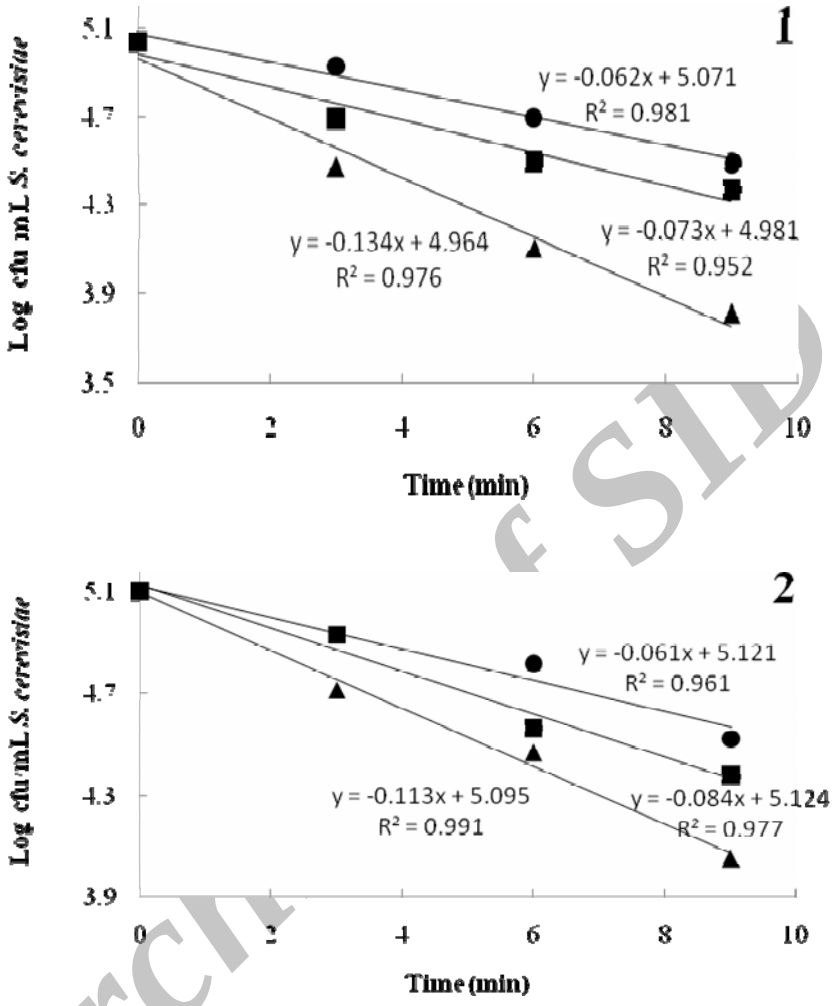
Archive of SID
www.SID.ir

فراصوت (۵۰ و ۷۵ درصد) کمتر یا برابر با یک سیکل لگاریتمی بود. درحالی‌که کاهش یک سیکل لگاریتمی جمعیت *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* در شدت کشندگی ۱۰۰٪ به ترتیب به میزان تقریبی ۲ و ۱/۱ سیکل لگاریتمی مشاهده گردید. همچنین منحنی بقاء *اشریشیاکلی و ساکارومایسس سرویزیه* برازش خوبی با مدل خطی نشان می‌دهد (R^2>0.95)، که این موضوع بیانگر این است غیرفعال‌سازی این ریززنده‌ها در این محدوده توانی و زمانی فراصوت از مدل خطی پیروی می‌نماید. بعلاوه، نتایج بیانگر بالاتر بودن مقدار کاهش لگاریتمی *اشریشیاکلی* نسبت به *ساکارومایسس سرویزیه* در آب انار فراصوت شده است. این نتیجه نشان می‌دهد که *اشریشیاکلی* نسبت به *سرویزیه* از مقاومت کمتری در برابر امواج صوتی برخوردار است. همچنین بر اساس این تحقیق، نوع آب انار تاثیر معنی‌داری بر غیرفعال‌سازی *اشریشیاکلی و ساکارومایسس سرویزیه* نداشت.



شکل ۱ منحنی بقاء *اشریشیاکلی* در شدت‌های ۵۰ (●)، ۷۵ (■) و ۱۰۰ (▲) درصد فراصوت در دو نوع آب انار ملس ممتاز ساوه (۱) و آلک ساوه (۲).

www.SID.ir



شکل ۲ منحنی بقاء *ساکارومایسس سرویزیه* در شدت‌های ۵۰ (●)، ۷۵ (■) و ۱۰۰ (▲) درصد فراصوت در دو نوع آب انار ملس ممتاز ساوه (۱) و آلک ساوه (۲).

مقادیر عدد دی *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* برای تیمار فراصوت در جدول ۱ نشان داده شده است. مقادیر عدد دی ریززنده‌های مورد بررسی در شدت‌های پائین به‌صورت معنی‌داری ($p < 0.01$) کمتر از مقادیر مربوطه در شدت‌های بالابود. به‌عبارت‌دیگر، در آب انارهای مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری در مقادیر عدد دی این دو ریززنده بین سه شدت فراصوت مشاهده گردید. همچنین، روند کاهش جمعیت میکروبی بخصوص *اشریشیاکلی* بین دو آب انار مورد مطالعه به‌استثنای شدت ۷۵ درصد تقریباً یکسان بود و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اما در مورد *ساکارومایسس سرویزیه* روند کاهش ریززنده در آب انارهای تیمار شده متفاوت بود؛ به‌طوری‌که مقدار کاهش لگاریتمی این ریززنده در دو نمونه آب انار در شدت‌های ۷۵٪ و ۱۰۰٪ تفاوت معنی‌داری را نشان داد. در شدت‌ها بالای فراصوت، سرعت غیرفعال‌سازی مخمر و باکتری افزایش نشان داد.

www.SID.ir

جدول ۱ مقادیر دی (D-values) *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* در دو نوع آب انار و در شدت‌های مختلف فراصوت

ریززنده	آب انار	شدت فراصوت (درصد) ۵۰	۷۵	۱۰۰
ساکارومایسس سرویزیه	ملس ممتاز	۱۶/۱۳±۰/۱۸ax	۱۳/۷۰±۰/۲۷bx	۷/۴۶±۰/۲۱cx
	آلک ساوه	۱۶/۳۹±۰/۴۷ax	۱۱/۹۰±۰/۲۳by	۸/۸۵±۰/۱۵cy
اشریشیاکلی	ملس ممتاز	۱۱/۳۶±۰/۱۴ax	۹/۵۲±۰/۱۷bx	۴/۶۱±۰/۱۵cx
	آلک ساوه	۱۱/۶۱±۰/۰۸ax	۸/۷۷±۰/۱۴by	۴/۵۶±۰/۰۹cx

* علائم مختلف (a-c) در ردیف یکسان و (x-y) در ستون یکسان مرتبط با هر ریززنده بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵درصد است.

توانایی فراصوت در غیرفعال‌سازی ریززنده‌ها و آنزیم‌ها در مواد غذایی و سامانه‌های مدل توسط پژوهشگران مختلفی گزارش‌شده است. غیرفعال‌سازی *اشریشیاکلی* در سامانه مدل مایع [۱۷]، سرکه سیب [۲۱, ۲۲] و سیستم مدل فسفات بافر [۹]، *لیستریا مونوسیتوژنس* در سرکه سیب [۱۵] و آب پرتغال [۲۳]، *پیشیا فرمنتانس* در آب گوجه‌فرنگی [۲۴] و *ساکارومایسس سرویزیه* در سامانه مدل [۸] مورد بررسی قرارگرفته‌اند.

کاهش یک سیکل لگاریتمی جمعیت *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* در شدت ۱۰۰ درصد فراصوت به ترتیب به میزان تقریبی ۲ و ۱/۱ سیکل لگاریتمی مشاهده گردید (شکل ۱ و ۲). در تحقیقی گزارش‌شده است که با افزایش چگالی انرژی صوتی دستیابی به کاهش ۵ سیکل لگاریتمی در دماهای کمتر از دمای کشندگی قابل حصول است و کاهش ۵ سیکل لگاریتمی *شیگلا بویدی* در بالاترین توان فراصوت و در دمای ۳۷ °C در زمان ۱۲/۷۵ دقیقه و کاهش ۲/۷ سیکل لگاریتمی *لیستریا مونوسیتوژنس* در طی ۲۰ دقیقه در همین دما گزارش‌شده است [۲۵].

همچنین بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، نوع آب انار تاثیر معنی‌داری بر غیرفعال‌سازی *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* نداشت، که این مشاهده با نتایج گوئرئرو و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت داشت [۸]. آن‌ها گزارش کردند که پ‌هاش تنها در شدت‌های بالای فراصوت و در دمای ۴۵ °C بر *ساکارومایسس سرویزیه* موثر بود. همچنین مقاومت *اشریشیاکلی* نسبت به شرایط اسیدی توسط مونوز و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش‌شده است به‌طوری‌که گرمخانه‌گذاری *اشریشیاکلی* به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق اثر معنی‌داری بر شمارش میکروبی نداشت [۲۶]. همچنین آن‌ها گزارش کردند که تیمار فراصوت به مدت ۱۲۶ ثانیه در دمای ۴۳ °C نتوانست ریززنده‌های مورد مطالعه *اشریشیاکلی* و *لیستریا اینوکولا* را بیشتر از ۱/۵ سیکل لگاریتمی کاهش دهد [۲۶]. در تحقیقی دیگر کاهش ۵ سیکل لگاریتمی *ساکارومایسس سرویزیه* در مدت‌زمان ۷/۵ دقیقه در شدت ۱۰۰٪ فراصوت و در دمای ۴۵ °C گزارش شد [۲۴]. همچنین به‌کارگیری روش فرآوری با فراصوت در دمای ۴۰ °C به مدت ۲۰ دقیقه موجب کاهش جمعیت میکروبی *اشریشیاکلی* به میزان ۵/۳ سیکل لگاریتمی گردید [۲۱]. گزارش‌شده است که در فرایند ترموسونیک جهت کاهش ۵ سیکل لگاریتمی جمعیت سوش‌های مختلف *اشریشیاکلی* به ۴/۵ دقیقه در سرکه سیب با دمای ۵۷ °C [۲۲]، ۴ دقیقه در سرکه سیب با دمای ۶۰ °C [۲۱] و ۲ دقیقه در بافر فسفات با دمای ۶۰ °C [۲۷] نیاز است. در مطالعه دیگری پاتیل و همکاران در سال ۲۰۰۹ مدت‌زمان ۱۵ دقیقه را برای کاهش ۵ سیکل لگاریتمی جمعیت *اشریشیاکلی* در شدت‌های بالای فراصوت را گزارش کردند [۲۸].

مقادیر عدد دی *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* برای تیمار فراصوت در جدول ۱ نشان می‌دهد که در شدت‌ها بالای فراصوت، سرعت غیرفعال‌سازی مخمر و باکتری افزایش می‌یابد که با نتایج پژوهش‌های قبلی انجام‌شده مطابقت داشت [۸, ۲۸]. در تحقیقی گزارش گردید که در دماهای ملایم، مقدار عدد دی *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط کشت مایع سابارو به علت اثر همزمان فراصوت کاهش می‌یابد، ولی در دماهای بالاتر (۵۵ °C)، فراصوت تاثیری بر غیرفعال‌سازی مخمر نداشت [۸] زیرا فرآوری حرارتی در دمای ۶۰ °C سلول‌های مخمر را نابود می‌نماید [۲۹]. همچنین Lee و همکاران با به‌کارگیری فن‌آوری فراصوت و

Archive of SID

www.SID.ir

حرارت جمعیت میکروبی *اشریشیاکلی* را در بافر فسفات (پ-هاش ۷) در دمای ۶۱ °C به میزان ۵ سیکل لگاریتمی کاهش دادند که مقدار عدد دی آن برابر با ۰/۷۵ دقیقه بود [۹].

سازوکار غیرفعال‌سازی ریززنده‌ها اساساً بر مبنای عوامل فیزیکی و شیمیایی است که ناشی از تاثیر فراصوت بر مواد غذایی مایع است. در بین اثرات فیزیکی، نازک شدن غشاء سلولی و تولید حرارت موضعی و تغییر فشار (۵۵۰۰ °C و ۵۰۰۰۰ کیلو پاسکال)؛ و از اثرات شیمیایی تولید رادیکال‌های آزاد از قبیل رادیکال هیدروکسیل و هیدروژن در اثر واکنش‌های صوتی-شیمیایی (Sonochemical reactions) مطرح است [۱۰و ۱۳]. بنابراین، می‌توان بیان کرد که دستیابی به سطح غیرفعال-سازی قابل‌قبول، ناشی از اثر همزمان امواج فراصوت و حرارت ایجادشده توسط فراصوت بوده است [۹]. بااین‌وجود، در این مطالعه طراحی مناسب ظرف دوجداره شیشه‌ای مجهز به مارپیچ داخلی همراه سامانه چرخاننده سیال سرمازا از افزایش دما در طی فرایند فراصوت جلوگیری نموده تا اثر امواج فراصوت به تنهایی مورد بررسی قرار گیرد. بر اساس پژوهش‌های انجام‌گرفته، غیرفعال‌سازی میکروبی با فراصوت در دماهای معتدل انجام گرفته است، بطوریکه کاهش لگاریتمی بار میکروبی در نتیجه اثر همزمان امواج فراصوت و حرارت ایجادشده توسط فراصوت بوده است. بنابراین، در این مطالعات دماهای کمتر از ۴۵ °C به‌عنوان دمای کشنده در نظر گرفته نشده و اثر کشندگی را به امواج فراصوت نسبت داده‌اند. درحالی‌که مطالعه حاضر نشان داد که فراصوت به تنهایی قادر به غیرفعال‌سازی مطلوب ریززنده‌های مورد مطالعه در دمای ۲۵ °C نبوده و بیانگر این نکته است که کاهش ۵ سیکل لگاریتمی ناشی از اثر همزمان فراصوت و حرارت حتی در دماهای کمتر از دمای کشنده است.

بااین‌وجود و بر اساس مطالب گفته‌شده، مقایسه مستقیم این نتایج مشکل است زیرا تفاوت در سوش‌های میکروبی اثر معنی‌داری بر سرعت غیرفعال‌سازی با فراصوت دارد [۱۵]. همچنین شرایط تیمار فراصوت از قبیل فرکانس، شدت، موقعیت قرارگیری پروپ در واکنشگاه، خصوصیات هندسی واکنشگاه و پروپ، روش و محل نمونه‌برداری، چگالی انرژی صوتی و ویژگی‌های محیط نقش مهمی در تعیین سرعت غیرفعال‌سازی دارند [۹]. بعلاوه موثر بودن و کارایی فراصوت در غیرفعال‌سازی ریززنده ها تحت‌تاثیر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، حجم ماده غذایی، دمای فرآوری، شدت و مدت‌زمان اعمال فراصوت قرار دارد [۹, ۱۰]. بنابراین، ضروری است جزئیات شرایط آزمایش در غیرفعال‌سازی ریززنده‌ها ثبت و گزارش گردد تا بتوان مقایسه درستی از نتایج گزارش‌شده توسط گروه‌های تحقیقی مختلف ارائه داد.

۴- نتیجه‌گیری

در نهایت می‌توان گفت که فراصوت به‌عنوان یکی از فن‌آوری-های غیرحرارتی شناخته می‌گردد که قادر به کاهش معنی‌دار ریززنده‌ها بوده و از طرفی خصوصیات حسی و تازگی آب میوه-ها حفظ می‌گردد. اگرچه، پاستوریزه و سترون کردن حرارتی روشی ایمن جهت تخریب و نابودسازی ریززنده‌ها است، اما بسته به شدت دمای مورد استفاده و زمان فرآوری تغییرات معنی-دار و قابل‌توجهی در خصوصیات حسی و تغذیه‌ای مواد غذایی ایجاد می‌گردد. در این مطالعه کاهش جمعیت *اشریشیاکلی* و *ساکارومایسس سرویزیه* دو نمونه آب انار در شدت کشنده۱۰۰٪ به ترتیب به میزان ۲ و ۱/۱ سیکل لگاریتمی مشاهده گردید که معادل D های تقریبی ۸/۱۵ و ۴/۵۸ دقیقه بود. این میزان غیرفعال‌سازی در تعداد ریززنده‌ها ناشی از اثر امواج فراصوت به تنهایی بوده است. بنابراین، جهت دستیابی به کاهش ۵ سیکل لگاریتمی بار میکروبی نیاز به تحقیق‌های بیشتری از جمله افزایش مدت‌زمان اعمال فراصوت یا به‌کارگیری امواج فراصوت به‌صورت فن‌آوری ترکیبی با حرارت و فشار است.

۵- سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به خاطر تأمین مالی این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند. همچنین به‌واسطه انجام کارهای آماری از آقایان سید فرهاد صابرعلی و مصطفی حجتی تشکر می‌گردد.

۶- منابع

[1] Anonymous. 2009. Project document for a regional standard for pomegranate, FAO/WHO. Tunisia.

Archive of SID
www.SID.ir

[2] Doyle, M. P. 1991. *Escherichia coli* O157: H7 and its significance in foods. International Journal of Food Microbiology, 12(4): 289-301.
[3] Char, C., Guerrero, S. and Alzamora, S. M. 2009. Survival of *Listeria innocua* in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. Food Control; 20(1): 67-74.
[4] Uljas, H. E. and Ingham, S. C. 1999. Combinations of intervention treatments resulting in 5-log10-unit reductions in numbers of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 organisms in apple cider. Applied and Environmental Microbiology, 65(5): 1924-1929.
[5] Tournas, V. H., Heeres, J. and Burgess, L. 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. Food Microbiology, 23(7): 684-688.
[6] USDA. 2000. Food and Drug Administration Report. Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies: Ultrasound. Published June 2, 2000.
[7] Ohlsson, T. Bengtsson, N. 2002. *Minimal Processing Technologies in the Food Industry*. Woodhead Publishin,. 1st Ed., Abington, England; p. 4-34.
[8] Guerrero, S., López-Malo, A. and Alzamora, S. M. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. Innovative Food Science and Emerging Technologies 2001; 2(1): 31-39.
[9] Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H. and Martin, S. E. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: microbial responses and kinetics modeling. Journal of Food Engineering, 93(3): 354-364.
[10] Piyasena, P., Mohareb, E. McKellar, R.C. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. International Journal of Food Microbiology, 87(3): 207-216.
[11] Tewari, G. and Juneja, V. K. 2007. *Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation*. Blackwell Publishing, Oxford, UK; p. 167-264.
[12] Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. and Lee, D. U. 2004. Applications and potential of ultrasonics in food processing. Trends in Food Science and Technology, 15(5): 261-266.
[13] Valdramidis ,V. P., Cullen, P. J., Tiwari, B. K. and O'Donnell, C. P. 2010. Quantitative modelling approaches for ascorbic acid degradation and non-enzymatic browning of orange juice during ultrasound processing. Journal of Food Engineering, 96(3): 449-454.
[14] Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P. and Cullen, P. J. 2008. Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(7): 2423-2428.
[15] Baumann, A. R. Martin, S. E. and Feng, H. 2005. Power ultrasound treatment of *Listeria monocytogenes* in apple cider. Journal of Food Protection, 68(11): 2333-2340.
[16] De Gennaro, L., Cavella, S., Romano, R. and Masi, P. 1999. The use of ultrasound in food technology I: inactivation of *peroxidase* by thermosonication. Journal of Food Engineering, 39(4): 401-407.
[17] Salleh-Mack, S. Z. and Roberts, J. S. 2007. Ultrasound pasteurization: the effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. Ultrasonics Sonochemistry, 14(3): 323-329.
[18] Gabriel AA, Nakano H. 2011. Effects of culture conditions on the subsequent heat inactivation of *E. coli* O157: H7 in apple juice. Food Control, 22: 1456-460.
[19] Gabriel, A. A. and Nakano, H. 2009. Inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments. Food Control, 20(4): 443-446.
[20] Liao ,H., Zhang, L., Hu, X. and Liao, X. 2010. Effect of high pressure CO2 and mild heat processing on natural microorganisms in apple juice. International Journal of Food Microbiology, 137(1): 81-87.
[21] Ugarte-Romero, E., Feng, H. and Martin, S. E. 2007. Inactivation of *Shigella boydii* 18 IDPH and *Listeria monocytogenes Scott A* with power ultrasound at different acoustic energy densities and temperatures. Journal of Food Science, 72(4): M103-M107.
[22] D'Amico, D. J., Silk, T. M., Wu, J. and Guo, M. 2006. Inactivation of microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound. Food Research International, 69(3): 556-563.

Archive of SID

www.SID.ir

[23] Ferrante, S., Guerrero, S. and Alzamora, S. M. 2007. Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. Food Research International, 70(8): 1850-1856.

[24] Adekunte, A., Tiwari, B. K., Scannell, A., Cullen, P. J. and O'Donnell, C. 2010. Modelling of yeast inactivation in sonicated tomato juice. International Journal of Food Microbiology, 137(1): 116-120.

[25] Ugarte-Romero, E., Feng, H., Martin, S. E., Cadwallader, K. R. and Robinson, S. J. 2006. Inactivation of *Escherichia coli* with power ultrasound in apple cider. Journal of Food Science, 71(2): E102-E108.

[26] Munoz, A., Palgan, I., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D. J., Whyte, P. and Lyng, J. G.. 2012. Combinations of selected non-thermal technologies and antimicrobials for microbial inactivation in a buffer system. Journal of Food Protection, 47: 100-105.

[27] Zenker, M., Heinz, V. and Knorr, D. 2003. Application of ultrasound-assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods. Journal of Food Protection, 66(9): 1642-1649.

[28] Patil, S., Bourke, P., Kelly, B., Frías, J. M. and Cullen, P. J. 2009. The effects of acid adaptation on *Escherichia coli* inactivation using power ultrasound. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10(4): 486-490.

[29] Truong-Meyer, X. M., Strehaiano, P. and Riba, J. P. 1997.Thermal inactivation of two yeast strains heated in a strawberry product: Experimental data and kinetic model. Chemical Engineering Journal, 65(2): 99-104.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* inactivation in sonicated pomegranate juice

Alighourchi, H. R. [1], Barzegar, M. [2*], Sahari, M. A. [3], Abbasi, S. [2]

1. PhD Student of Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modares University, and Assistant
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

(Received: 90/8/7 Accepted: 90/11/20)

Pomegranate fruit is a rich source of functional compounds with health promoting effects. Thermal processing significantly affects these compounds. Therefore, in this study the effect of ultrasonic as a non-thermal technology, on *E. coli* and *S. cerevisiae* of pomegranate juices has been studied. Fresh pomegranate juices of Malase Momtaze Saveh and Alak Saveh cultivars were inoculated with *E. coli* and *S. cerevisiae* and then, were sonicated using an ultrasonic processor supplied with a 19 mm diameter probe at constant frequency of 20 kHz and at amplitude levels (50, 75 and 100%) and times (0, 3, 6 and 9 min) in double wall glass vessel. The number of surviving microorganisms in samples was determined on selective media. The result showed that various intensities of ultrasound and sonication times significantly affected microbial populations ($p<0.01$), while the source of juice was not effective on the microbial count significantly. The inactivation of *E. coli* and *S. cerevisiae* cells at lower amplitude levels (50 and 75%) were ≤ 1log cycle, while a log reduction was achieved at lethal amplitude level (100%) of sonication that reduced *E. coli* and *S. cerevisiae* cells population approximately by 2log and 1.1log in 9 min in studied juices, respectively. By suitable designing a double wall glass vessel, the evaluation of the effect of ultrasound (alone at constant temperature (25±1 °C)) on microorganisms was possible. Thus, it appears that sub-lethal temperature of ultrasonic process makes it impossible for the inactivation of microorganisms. Unless the time of ultrasonic process increased, that it is not economic.

Keywords: Pomegranate juice, Ultrasounic, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*

Archive of SID

* Corresponding Author E-Mail Address: mbb@modares.ac.ir

www.SID.ir