تاثیر فرآیندهای ازن دهی، تابش اشعه UV و میدان پالس الکتریکی بر کاهش آفلاتوکسین M1 و آفلاتوکسین کل در شیر اسیدوفیلوس

عصمت خوری[1]، وحید حکیم زاده[1*]، علی محمد ثانی[1]، حسن رشیدی[2]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

۲. مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *v.hakimzadeh@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۰۸

چکیده

یکی از مهمترین چالش‌های پیش‌روی صنایع لبنی کاهش یا حذف آفلاتوکسین‌ها به خصوص آفلاتوکسین M1 است. از طرفی، تولید محصولات لبنی پروبیوتیک به منظور بهبود سلامت جامعه از اهداف دیگر صنعت لبنیات است. از این‌رو در این تحقیق سعی شد با استفاده از میدان پالس الکتریکی در دامنه ۱۰ تا ۳۰ میکروثانیه، ازن دهی در دامنه صفر تا ۱۰ میلی گرم بر دقیقه و تابش فرابنفش در بازه صفر تا ۵ ژول بر سانتی متر مربع در شیر اسیدوفیلوس تا به محصولی عاری از آفلاتوکسین و در عین حال پروبیوتیک دست یابیم. برای بررسی تاثیر فرآیندهای به کار رفته از طرح آماری سطح پاسخ به روش مرکب مرکزی در قالب مدل درجه دوم کامل استفاده گردید به طوریکه فرآیندهای مذکور به عنوان متغیرهای عملیاتی در نظر گرفته شدند. نتایج نشان دهنده تاثیر معنی دار متغیرهای مستقل و همچنین تاثیر سینرژیستی آن ها در سطح ۰/۰۵ بر کاهش میزان آفلاتوکسین در شیر اسیدوفیلوس بود. شرایط عملیاتی بهینه بر اساس کمترین مقدار آفلاتوکسین در شیر اسیدوفیلوس شامل ۱۳/۱۵ میکروثانیه پالس در میدان الکتریکی، غلظت ۹/۹۹ میلی‌گرم در دقیقه از ازن و شدت ۴/۹۹ ژول بر سانتیمتر مربع از امواج فرابنفش بود. در شرایط بهینه میزان pH برابر با ۶/۲۲، اسیدیته ۱۹/۷۶ درجه دورنیک، ماده خشک ۱۰/۶۹ درصد، تغییر رنگ کلی برابر با ۸/۱۳ واحد و امتیاز پذیرش کلی نمونه برابر با ۴/۷۷ بود. در نهایت با اعمال این شرایط به ترتیب ۸۴/۶۱ و ۸۶/۷۶ درصد از آفلاتوکسین M1 و کل آفلاتوکسین‌ها کاهش یافت و محصول نهایی حاوی $۵/۲\times۱۰^{۶}$ Cfu/g *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بود.

کلید واژه ها: آفلاتوکسین، ازن، شیر اسیدوفیلوس، فرابنفش، میدان پالس الکتریکی.

مقدمه

هردل[1] در لغت به معنی مانعی است که در فرآوری مواد غذایی مانع رشد میکروارگانیسم ها و عامل کنترل آن ها بشمار می‌آید. مهمترین هردل‌ها در نگهداری موادغذایی شامل حرارت، فعالیت آبی، اسیدیته، پتانسیل اکسیداسیون و احیاء، نگهدارنده‌ها و فلور رقابتی است. استفاده از چندین روش نگهداری به صورت تلفیقی، در سطوحی پایین تر از حد بهینه آنها[2] با هدف به وجود آوردن یک محصول پایدار[3]، بهبود کیفیت و فراهم آوردن یک سطح افزایش یافته از ایمنی در شرایط عمل نکردن مانع اصلی که در مجموع آن را روش ترکیبی[4] نیز می‌نامند، هدف تکنولوژی هردل است (جعفری ۱۳۸۵). واژه پروبیوتیک به میکروارگانیسم‌هایی خطاب می‌شود که باعث افزایش فاکتورهای سلامتی بخش در مصرف کننده می‌شود. گونه‌های پروبیوتیک انتخابی باید توانایی زنده ماندن و ابقاء طی مراحل تولید و نگهداری بصورت کشت‌های لیوفیلیزه را داشته باشند. همچنین باید قابلیت زنده ماندن طی عملیات‌های فرآوری غذایی تا مرحله ورود به محصول نهایی را داشته باشند. به نظر می‌رسد که فواید پروبیوتیک ها ناشی از رشد و فعالیت

۱ Hurdle
۲ Sub-optimal
۳ Shelf Stable
۴ Combinated Method

آن‌ها طی فرآوری و یا ناشی از رشد و فعالیت بعضی از گونه‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارشی باشد (Tripathi and Giri 2014).

یکی از مهمترین چالش‌های موجود در زمینه تولید و فرآوری محصولات پروبیوتیک پایین بودن قابلیت بقاء باکتریهای پروبیوتیک به دلیل حساسیت به شرایط سخت و دشوار درون محصول غذایی و هم چنین شرایط نامساعد دستگاه گوارشی است (Ross et al., 2002; Boylston et al., 2004). از بین پروبیوتیک‌ها، لاکتوباسیلوس‌ها جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش و مواد غذایی تخمیر شده هستند و کاندیداهای خوبی برای پروبیوتیک بودن محسوب می شوند (Topisirovic et al., 2006; Cueva 2009).

شیر اسیدوفیلوس یکی از انواع محصولات لبنی تخمیری است که کشت مورد استفاده در آن لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس است. شیر اسیدوفیلوس یک مزه اسیدی قوی دارد که برای مصرف‌کننده چندان خوشایند نیست. برای کاهش مزه اسیدی این محصول، باکتری‌ها به‌طور جداگانه تکثیر و سپس به شیر پاستوریزه اضافه می‌شوند تا شیر اسیدوفیلوس شیرین بدست آید. برای غیرفعال نگه داشتن باکتری‌های پروبیوتیک، معمولاً آن را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌کنند زمانی‌که شیر مصرف می‌شود باکتری‌ها در محیط گرم معده و روده‌ها دوباره فعال می‌شوند. شیر اسیدوفیلوس شیرین را معمولاً با شیر کم چرب (۱ درصد) تهیه می‌کنند. این شیر دارای همان مزه و طعم شیر کم‌چرب معمولی است (حسین زاده و همکاران، ۱۳۹۶).

آفلاتوکسین‌ها سمومی هستند که توسط تعدادی از قارچ‌ها که بر روی خوراک دام و مواد غذائی رشد می‌کنند، تولید می‌شوند. آفلاتوکسین باعث کاهش بازده تبدیل غذایی، کاهش تولید فرآورده دامی، نقص در سیستم ایمنی و ضررهای شدید اقتصادی می‌شود (Heshmati and Milani 2010).

هالیما و همکاران (۲۰۱۵) طی پژوهشی خود با تیمار امواج فرابنفش با شدت ۲۴۰ و ۳۶۵ نانومتر در مدت زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بر روی ذرت، میزان تخریب آفلاتوکسین B1 را به ترتیب ۸۴/۷۳، ۸۸/۵۰ و ۹۲/۵۳ درصد گزارش کردند (Halima et al., 2015). محمدی و همکاران (۲۰۱۷) به تاثیر ازن زنی بر روی میزان آفلاتوکسین M1 در شیر پرداختند و گزارش کردند استفاده از ۸۰ میلی گرم در دقیقه از ازن، در مدت زمان صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه منجر به از بین رفتن آفلاتوکسین موجود می گردد. آنها همچنین گزارش دادند که استفاده از مدت زمان بیشتر منجر به تخریب بیشتر آفلاتوکسین گردید و به این نتیجه دست یافتند که افزایش ازن زنی علاوه بر کاهش میزان آفلاتوکسین منجر به کاهش میزان بار میکروبی کلی در نمونه ها گردیده بود. سابرامانیان[1] و همکاران (۲۰۱۶) میزان تخریب آفلاتوکسین B1 در دکستروز آگار سیب زمینی را تحت تاثیر میدان الکتریکی پالسی به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه ۸۱/۵۰ تا ۹۷/۹۱ درصد و همچنین میزان کاهش آفلاتوکسین کل در این نمونه‌ها را بین ۸۳/۹۶ تا ۹۸/۳۹ درصد گزارش نمودند.

با توجه به موارد فوق در این تحقیق تاثیر مستقل و ترکیبی هاردل های نوینی مانند ازن دهی، تابش فرابنفش و میدان پالس الکتریکی بر کاهش آفلاتوکسین شیر اولیه برای تولید شیر اسیدفیلوس به عنوان یک محصول پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

در این تحقیق شیر پاستوریزه ۱ درصد چربی از شرکت پگاه خراسان، استارتر از شرکت کریستین هانسن[6]، محیط کشت MRS آگار ساخت شرکت دی مان[7]، قرص رینگر از شرکت مرک[8] آلمان، سود[9] از شرکت سیگما[10] آلمان و محلول استاندارد آفلاتوکسین M1 از شرکت سیگما-آلدریچ آلمان تهیه شدند.

1. Subramanian

آماده سازی نمونه (یا تیمار با آفلاتوکسین)

بر اساس استاندارد بالاترین حد مجاز برای آفلاتوکسین M1 در مواد غذایی مانند شیر ۰/۱ میکروگرم در لیتر می باشد. بدین منظور محلول ۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم آفلاتوکسین که حاوی آفلاتوکسین M1 و آفلاتوکسین‌های دیگر بود به مقدار دو برابر بالاترین غلظت حد مجاز (۰/۲ میکروگرم در کیلوگرم آفلاتوکسین در محلول آب مخصوص HPLC، استونیتریل، متانول به نسبت ۶:۲:۲) به میزان ۲۰۰ میلی لیتر تهیه شد و به شیر اضافه گردید (فروغی و همکاران، ۱۳۹۵).

تلقیح

شیر در دمای یخچال، ابتدا توسط مزور در حجم ۲۰۰ میلی لیتر اندازه‌گیری و داخل ارلن ریخته شد. سپس روی همزن مغناطیسی تا دمای ۳۷ درجه سانتیگراد حرارت دهی شد و در این دما مقدار ۱ درصد وزنی–حجمی از باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (طبق دستور شرکت سازنده) به شیر اضافه گشت و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. پس از گذشت این زمان شیر اسیدوفیلوس تولید شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمون نگهداری شد (Moayednia and Mazaheri 2012).

تیمار با میدان پالس الکتریکی

به منظور انجام تیمار میدان الکتریکی پالسی از یک سیستم پایا با استفاده از پالسهای دوقطبی با امواج مربعی استفاده شد. روش کار به این صورت بود که چاهک[1] سیستم توسط ۳۰۰ میلی لیتر از نمونه شیر آلوده به آفلاتوکسین پر شد. سپس نمونه‌ها تحت تاثیر اندازه های مختلفی از پهنای پالس (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکروثانیه) قرار گرفتند (Subramanian et al., 2016).

تابش UV

نمونه ها پس از انجام تیمار میدان الکتریکی پالسی به منظور انجام تیمار تابش فرابنفش تحت تاثیر امواج فرابنفش ایجاد شده توسط یک لامپ UV، در طول موج نانومتر در شدت صفر، ۲/۵ و ۵ ژول بر سانتیمتر مربع به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند (Halima et al.,2015).

ازن دهی

به منظور ازن زنی به نمونه های حاوی آفلاتوکسین M1 ، شیرهای خارج شده پس از انجام تیمارهای قبل توسط دستگاه ازن ژنراتور در مقادیر صفر، ۵ و ۱۰ میلی گرم در دقیقه به مدت ۵ دقیقه تحت تیمار قرار گرفتند (Malakian et al.,2017).

آزمون‌ها

رنگ سنجی

شاخصهای رنگی بر اساس سیستم هانتر (L*, a*, b*) توسط دستگاه رنگ سنج برای هر نمونه فراروده در سه تکرار اندازه گیری شدند. L* شاخص شفافیت نمونه (رنگ سیاه=۰ و رنگ سفید=۱۰۰)، a* (a-=سبزی a+= قرمزی)، b* (b-=آبی b+=زردی) می‌باشد. تغییر رنگ کلی (ΔE) نیز به کمک رابطه ۱ محاسبه شد (حسین زاده و همکاران، ۱۳۹۶).

$$\Delta E = \left[(L^* - L)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2 \right]^{1/2} \quad (1)$$

اسیدیته

اسیدیته ی نمونه‌ها مطابق با استاندارد AOAC ۲۰۰۰ اندازه گیری شد. به این منظور مقدار ۱۰ میلی لیتر از نمونه توسط پیپت ۱۰ میلی‌لیتری برداشته شد و درون ارلن ریخته شد. سپس ۵ قطره از محلول فنل فتالئین روی نمونه افزوده شده و توسط سود ۰/۱ نرمال تا تغییر رنگ تیتر شد. حجم سود مصرفی نشان دهنده میزان اسیدیته نمونه خواهد بود (حسین زاده و همکاران ۱۳۹۶).

ماده جامد کل

ماده‌ی جامد کل، مطابق استاندارد استاندارد ملی ایران به شماره ۶۳۷ برای اندازه گیری میزان ماده خشک شیر

2. Chamber

انجام گرفت. بدین منظور پلیت نمونه به مدت دو ساعت در اتوکلاو ۲±۱۰۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس پلیت را با سرپوش پوشانده و در دیسکاتور قرار داده شد تا سرد شود و سپس توزین شد. نهایتاً میزان ماده خشک نمونه ها در زمانی که اختلاف وزنی قبل و بعد از دسیکاتور وجود نداشت از رابطه ۲ محاسبه گشت (حسین زاده و همکاران ۱۳۹۶).

نسبت درصد ماده خشک = (۲) وزن قبل از خشک کردن / وزن پس از خشک کردن × ۱۰۰

pH

به منظور اندازه گیری pH نمونه ها از pH متر دیجیتال در دمای محیط استفاده شد (Cueva 2009).

شمارش باکتری‌های پروبیوتیک

از محیط کشت MRS آگار برای ارزیابی تعداد باکتریهای پروبیوتیک موجود در نمونه‌ها استفاده شد. بدین منظور مقدار ۱۳/۶۴ گرم از نمونه توسط آب مقطر به حجم ۲۰۰ سی‌سی رسانده شد. به منظور کشت اختصاصی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مقدار ۱۰ گرم صفرا در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و به منظور استریل کردن آن از فیلتر میکرون استفاده شد. قبل از اضافه کردن محیط کشت به نمونه مقدار ۱/۵ میلی لیتر از محلول بایل استریل شده به ۱۰۰ میلی لیتر MRS آگار اضافه گردید. به منظور تهیه رقت‌های مختلف از نمونه، ۱۰ گرم از نمونه شیر اسیدوفیلوس درون ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر ریخته شد و درون لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محلول رینگر استریل ریخته شد. برای تهیه رقت بعدی مجدداً مقدار ۱ میلی لیتر از نمونه درون لوله قبلی برداشته و به درون لوله دیگری حاوی ۹ میلی لیتر محلول رینگر استریل اضافه شد. رقت های یک دهم ،یک صدم و یک هزارم تهیه شده از نمونه را پس از یکنواخت شدن به ۳ پلیت دارای محیط کشت MRS آگار حاوی بایل به صورت سطحی اضافه شد و پلیت‌ها در شرایط هوازی در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ روز قرار گرفت. پس از ۳ روز گرمخانه گذاری شمارش باکتریهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس توسط کلنی کانتر انجام شد (حسین زاده و همکاران ۱۳۹۶).

آزمون حسی

آنالیزهای حسی محصول به روش آزمون هدونیک[1] ۵ نقطه ای به منظور ارزیابی حسی و کلی نمونه‌های شیر اسیدوفیلوس انجـام شد. در این روش نمونه‌ها از نظر ویژگی‌های طعم، بافت، رنگ، آروما مورد ارزیابی قرار گرفت. ارزیابی نمونه‌ها در دمای ۵ درجه ی سانتیگراد انجام شد (Akin et al., 2007).

اندازه گیری میزان آفلاتوکسین M1 و آفلاتوکسین کل

اندازه گیری میزان آفلاتوکسین M1 و آفلاتوکسین کل از طریق روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[2] و به روش زیر انجام شد. ۵ گرم از نمونه شیر اسیدوفیلوس توزین شد و سپس در یک بالن ژوژه با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانیده شد و به مدت ۳۰ دقیقه با ۸۰۰۰g و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در سانتریفیوز یخچال دار سانتریفیوژ شد. مایع رویی توسط فیلتر سلولز استات ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد و ۲۰ میلی لیتر از محلول فیلتر شده، از ستون ایمونوافینیتی دارای آنتی‌بادی‌های ویژه آفلاتوکسین M1 عبور داده شد. سپس ستون با آب مقطر شسته شد و در نهایت آفلاتوکسین M1 موجود در ستون با حلال استونیتریل خارج شده و تغلیظ گردید و ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه جهت تزریق به دستگاه مورد استفاده قرارگرفت.

استانداردها با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ قسمت در بیلیون به دستگاه HPLC تزریق شد و سطح زیر منحنی پیک‌ها بدست آمد و منحنی کالیبراسیون رسم گردید و در نهایتو غلظت نمونه‌های مجهول با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه گردید (امیرپور و همکاران، ۱۳۹۴).

1. Hedonic test

2. HPLC

تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام بررسی و آنالیز نتایج و نهایتاً بهینه سازی پارامترهای عملیاتی، از طرح آماری سطح پاسخ به روش مرکب مرکزی با نرم افزار Design Expert ورژن 7.0.0 استفاده گردید. اثر پارامترهای مستقل در سطح ۵ درصد و بر اساس مدل درجه دوم کامل بررسی شد و نتایج حاصل از آنالیز واریانس و نمودارهای اثرات همزمان دو متغیر مربوطه به صورت سه بعدی ترسیم گشت. پس از مشخص کردن اهداف فرایند، بهینه سازی با استفاده از تکنیک بهینه سازی عددی انجام گرفت (حسین زاده و همکاران ۱۳۹۶).

نتایج

تغییرات ماده خشک

با افزایش شدت میدان الکتریکی پالسی میزان ماده خشک در نمونه‌های شیر اسیدوفیلوس کاهش یافت؛ از سوی دیگر با افزایش میزان ازن دهی کمی افزایش در میزان ماده خشک ایجاد گردید، اما این افزایش معنی دار نبود ($P>0.05$). همچنین با افزایش میزان شدت تابش فرابنفش میزان ماده خشک در نمونه‌ها تا شدتهای متوسط سبب افزایش و با بیشتر شدن شدت تابش، سبب کاهش میزان ماده خشک گردیده که این تغییرات نیز معنی دار نبود.

تغییرات اسیدیته

با افزایش شدت میدان الکتریکی پالسی و تابش فرابنفش، میزان اسیدیته در نمونه‌های شیر اسیدوفیلوس کاهش یافت. از سوی دیگر با افزایش میزان ازن دهی اسیدیته کمی کاهش نشان داد اما این کاهش معنی دار نبود ($P>0.05$). با این حال اثر متقابل بین شدت میدان الکتریکی و تابش فرابنفش بر میزان اسیدیته تاثیر معنی داری نداشت و فاقد تاثیرات سینرژیستی بر روی کاهش اسیدیته بودند ($P>0.05$).

تغییرات تغییر رنگ کلی

تغییر رنگ کلی نمونه ها تحت تاثیر مدل درجه دوم در سطوح مختلف میدان الکتریکی پالسی معنی داری نبود ($P>0.05$). اما تاثیر متقابل شدت میدان الکتریکی پالس- میزان ازن و شدت میدان الکتریکی پالسی- میزان تابش فرابنفش دارای اثر معنی دار بود ($P<0.05$).

ارزیابی حسی

نتایج حاصل از آزمون خصوصیات حسی و پذیرش کلی نمونه‌ها نشان داد، در بین عبارتهای درجه دوم، عبارت درجه دوم هیچ یک از متغیرهای مستقل دارای اثر معنی داری نبود ($P>0.05$) و می توان حالت خطی را در گرافهای سه بعدی انتظار داشت؛ همچنین در بین عبارتهای اثر متقابل، بین متغیرهای مستقل نیز دارای اثر معنی داری نبود ($P>0.05$). معنی دار نشدن آزمون عدم برازش ($P>0.05$) نشان از مناسب بودن مدل پیشنهادی نرم افزار برای برازش داده‌ها داشته است. افزایش میزان تابش فرابنفش نیز با اینکه سبب کمی افزایش در میزان پذیرش کلی نمونه‌ها گردید اما این افزایش معنی دار نبود ($P>0.05$).

زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

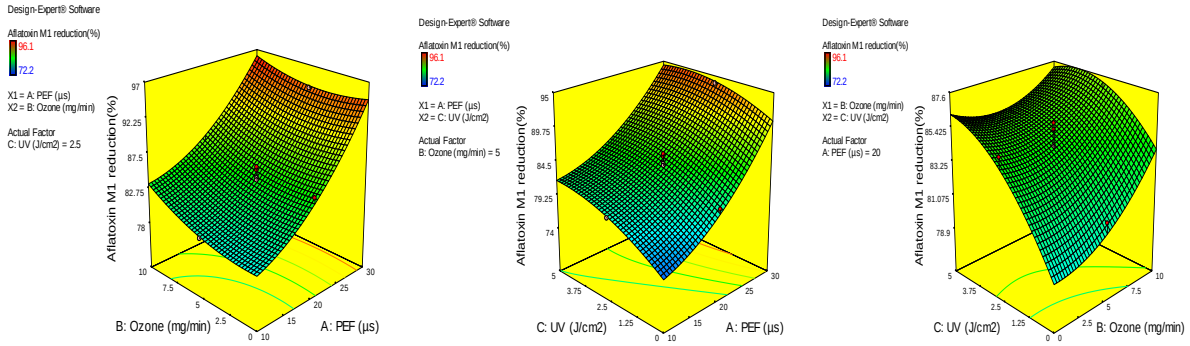
با افزایش شدت میدان الکتریکی پالسی میزان زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلیوس* در نمونه‌ها، به طور معنی داری کاهش یافت ($P<0.05$)، از سوی دیگر با افزایش میزان ازن میزان زنده مانی این باکتری، کمی افزایش یافت؛ اما این افزایش معنی دار نبود. افزایش میزان تابش فرابنفش نیز تا شدتهای متوسط سبب افزایش در میزان زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* گردید اما با گذر از یک حد بحرانی سبب کاهش زنده مانی این باکتری گردید. اما به طور کلی تاثیر تابش فرابنفش بر روی میزان زنده مانی این باکتری معنی دار نبود ($P>0.05$).

میزان حذف آفلاتوکسین M1

نتایج حاصل از آزمون حذف آفلاتوکسین M1 نشان داد که تمامی متغیرهای مستقل شامل میدان الکتریکی

پالسی، ازن و تابش فرابنفش دارای تاثیر خطی معنی دار($P<0.05$) بر حذف آفلاتوکسین M1، نمونه‌های شیر اسیدوفیلوس بودند. در بین عبارتهای درجه دوم، عبارت درجه دوم شدت میدان الکتریکی پالسی در سطح ۹۵ درصد ($P<0.05$) و مقدار ازن و تابش فرابنفش در سطح ۹۵ درصد ($P<0.05$) معنی دار بود و انحنا در گراف‌های سه بعدی را به این دلیل می توان انتظار داشت؛ همچنین عبارت‌های اثر متقابل، بین متغیرهای مستقل میدان الکتریکی پالسی- ازن، و میدان الکتریکی پالسی – تابش فرابنفش در سطح ۹۵ درصد ($P<0.05$) و ازن – تابش فرابنفش در سطح ۹۵ درصد ($P<0.05$) معنی دار بود. این امر نشان دهنده تاثیرات سینرژیستی این متغیرها بر حذف میزان آفلاتوکسین M1 در شیر اسیدوفیلوس بود. از سوی دیگر معنی دار نشدن آزمون عدم برازش ($P>0.05$) نشان از مناسب بودن مدل پیشنهادی نرم افزار برای برازش داده‌ها داشته است. میانگین میزان حذف آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر اسیدوفیلوس تیمار شده به روش‌هاردل برابر با ۸۵/۵۶ درصد بود و این مساله نشان دهنده تاثیرات مناسب این متغیرها در حذف آفلاتوکسین M1 بود.

همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود و با توجه به نتایج بدست آمده در بخش آنالیز واریانس، می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش شدت میدان الکتریکی پالسی، میزان ازن شدت تابش فرابنفش، میزان حذف آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر اسیدوفیلوس به طور معنی داری افزایش یافت. چون عبارتهای اثر متقابل بین متغیرهای مستقل همگی معنی دار بود، لذا می توان به تاثیر سینرژیستی این متغیرها بر روی حذف آفلاتوکسین M1 پی برد.



نمودار ۱. اثر متقابل میدان الکتریکی پالسی – ازن، میدان الکتریکی پالسی – تابش فرابنفش و ازن – تابش فرابنفش بر روی حذف آفلاتوکسین M1

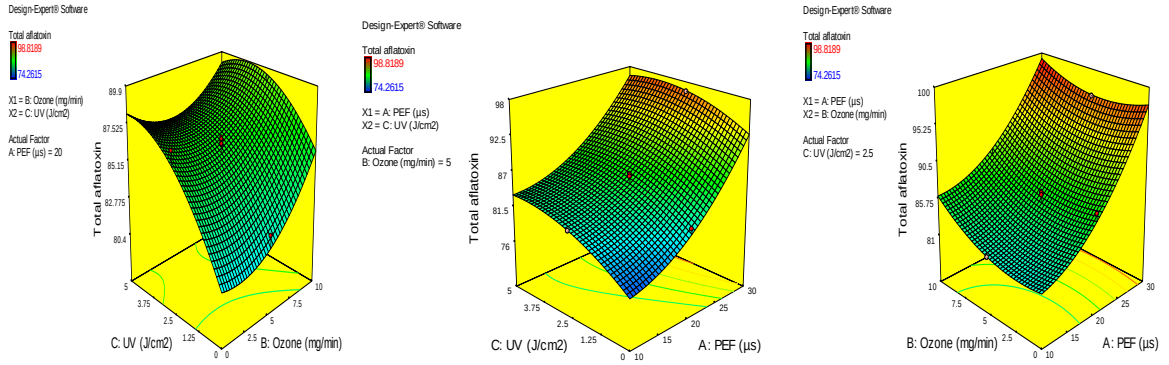
میزان حذف کلی آفلاتوکسین

نتایج حذف میزان کلی آفلاتوکسین‌ها حاکی از معنی دار بودن ($P<0.05$) تمامی متغیرهای مستقل شامل میدان الکتریکی پالسی، ازن و تابش فرابنفش بر حذف کل آفلاتوکسین موجود در نمونه‌های شیر اسیدوفیلوس بودند. اثر متقابل، بین متغیرهای مستقل میدان الکتریکی پالسی- ازن، میدان الکتریکی پالسی – تابش فرابنفش و میدان الکتریکی ازن – تابش فرابنفش در سطح ۹۵ درصد ($P<0.05$) معنی دار بود. این امر نشان دهنده تاثیرات سینرژیستی این متغیرها بر حذف کل آفلاتوکسین موجود در شیر اسیدوفیلوس بود. مقادیر ضریب تبیین (R^2) برابر با ۰/۹۸۸۸۷ و ضریب تبیین اصلاح شده (R^2_{adj}) برابر با ۰/۹۷۸۵ بوده و متناسب بودن مقادیر این دو فاکتور موید قدرت بالای مدل در پیش بینی می باشد.

از سوی دیگر، میانگین میزان حذف آفلاتوکسین در نمونه‌های شیر اسیدوفیلوس تیمار شده به روش هاردل برابر با ۸۷/۶۳ درصد بود و این مساله نشان دهنده

تاثیرات مناسب این متغیرها در حذف کل آفلاتوکسین موجود در شیر اسیدوفیلوس بود.

همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود و با توجه به نتایج بدست آمده در بخش آنالیز واریانس، می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش شدت میدان الکتریکی پالسی، میزان ازن شدت تابش فرابنفش، میزان حذف کل آفلاتوکسین در نمونه‌های شیر اسیدوفیلوس به طور معنی داری افزایش یافت. چون عبارتهای اثر متقابل بین متغیرهای مستقل همگی معنی دار بود، لذا می توان به تاثیر سینرژیستی این متغیرها بر روی حذف آفلاتوکسین پی برد.



نمودار ۲. اثر متقابل میدان الکتریکی پالسی – ازن، میدان الکتریکی پالسی – تابش فرابنفش و ازن – تابش فرابنفش بر روی حذف آفلاتوکسین

جدول ۱. آنالیز واریانس(ANOVA) و بررسی مدل های خطی، درجه دوم و اثر متقابل متغیرها

منبع	درجه آزادی	آفلاتوکسین M1 (٪)			آفلاتوکسین کل (٪)			زیست پذیری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (cfu/g)		
		coefficient	مجموع مربعات	P-Value	coefficient	مجموع مربعات	P-Value	coefficient	مجموع مربعات	P-value
Model	۹		۶۵/۰۵۸	< ۰/۰۰۰۱		۷۲/۳۱۳	< ۰/۰۰۰۱		۲/۲۵	۰/۰۰۰۲
Constant										
Linear										
A-PEF(µs)	۱		۵۱/۲۳۱	< ۰/۰۰۰۱		۵۴/۸۶۰	< ۰/۰۰۰۱		۲/۰۶	< ۰/۰۰۰۱
B-Ozone(mg/m)	۱		۲۲/۸۰	۰/۰۰۰۴		۲۳/۸۶	۰/۰۰۰۳		۰/۰۸۶	۰/۰۶۱۶
C-UV(J/cm2)	۱		۶۷/۶۰	< ۰/۰۰۰۱		۷۲/۹۰	< ۰/۰۰۰۱		۰/۰۰۴	۰/۶۶۰۴
Quadratic										
A*A	۱		۵/۲۸	۰/۰۳۱۶		۵/۴۶	۰/۰۲۸۱		۰/۰۲۰	۰/۳۳۵۳
B*B	۱		۴/۹۶	۰/۰۳۱۶		۵/۳۳	۰/۰۲۹۵		۰/۰۲۶	۰/۲۷۱۴

C*C	۱	۸/۶۱	/۰۰۹۷۰	۸/۹۵	/۰۰۸۲۰	/۰۰۰۸۰	/۸۴۳۶۰
Interaction							
A*B	۱	۱۸/۴۰	/۰۰۰۹۰	۲۸/۸۲	/۰۰۰۲۰	۰/۰۰۸	/۵۲۸۶۰
A*C	۱	۴/۵۵	/۰۴۳۰۰	۹/۹۲	/۰۰۶۱۰	۰/۰۲۲	/۳۱۰۵۰
B*C	۱	۶/۷۲	/۰۱۸۳۰	۱۰/۷۳	/۰۰۴۹۰	۰/۰۳۰	/۲۴۱۰۰
Residual	۱۰	۸/۴۷		۰/۸۳		۰/۲۰	
Lack- of-fit	۵	۵/۸۷	/۱۹۵۹۰	۵/۰۸	/۳۱۱۸۰	۰/۱۳	/۲۴۵۹۰
Pure error	۵	۲/۶۰		۳/۲۰		۰/۰۶۷	
Total	۱۹	۶۶/۵۳۶		۷۳/۶۰۱		۲/۴۴	
R^{2} (%)		۰/۹۸۷۳		۰/۹۸۸۷		۰/۹۲۰۱	

بهینه سازی عددی

تکنیک بهینه سازی عددی برای بهینه سازی فرایند تولید شیر اسیدوفیلوس تحت تاثیر تیمارهای بکار رفته استفاده شد. این در حالی بود که اهمیت همه پاسخها برابر در نظر گرفته شد (لی و همکاران ۲۰۱۳). بدین منظور در دامنه بدست آمده از نتایج آزمونهای مختلف، محصولی داری ویژگیهای بهینه است که، pH، ماده خشک، پذیرش کلی، زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس حداکثر باشد و اسیدیته و تغییر رنگ کلی آن حداقل باشد.

در حالتی که مدت زمان پالس ۱۳/۱۵ میکروثانیه و غلظت ازن بکار رفته ۹/۹۹ میلی گرم در دقیقه و شدت امواج فرابنفش ۴/۹۹ ژول بر سانتیمتر مربع بر روی شیر اسیدوفیلوس باشد شرایط بهینه تولید را خواهیم داشت. بنا به پیش بینی نرم افزار در سطح مطلوبیت ۰/۶۱۶، میزان pH برابر با ۶/۲۲ و اسیدیته ۱۹/۷۶ درجه دورنیک، ماده خشک ۱۰/۶۹ درصد، تغییر رنگ کلی برابر با ۸/۱۳ واحد و امتیاز پذیرش کلی نمونه برابر با ۴/۷۷ است. این در حالیست که در این محصول ۸۴/۶۱ درصد آفلاتوکسین M1 ۸۶/۷۶ درصد کل آفلاتوکسین‌ها نیز ازبین رفته و حاوی $5/2\times10^{6}$ cfu/g لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس است.

جدول ۲ -تعیین بهترین شرایط حذف آفلاتوکسین از شیر اسیدوفیلوس

پارامترها	هدف	کمینه	بیشینه	درجه اهمیت	شرایط بهینه
			بهترین شرایط		
میدان الکتریکی پالسی	در محدوده	۱۰	۳۰	۳	۱۳/۱۵
ازن	در محدوده	۰	۱۰	۳	۹/۹۹
تابش فرابنفش	در محدوده	۰	۵	۳	۴/۹۹
			مقادیر در بهترین شرایط		
pH	بیشترین	۶/۰۸	۶/۳۹	۳	۶/۲۲

ماده خشک	بیشترین	۹/۷۱۵۳۵	۱۱/۰۲۷۹	۳	۱۰/۶۹
اسیدیته	کمترین	۱۸/۰۵۴۲	۲۱/۱۴۱۳	۳	۱۹/۷۶
تغییر رنگ کلی	بیشترین	۸/۱۶	۹/۳۳	۳	۸/۱۳
پذیرش کلی	بیشترین	۴	۵	۳	۴/۷۷
زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	بیشترین	۵/۵۷	۶/۸۳	۳	۶/۵۰
حذف آفلاتوکسین M1	بیشترین	۷۲/۲	۹۶/۱	۳	۸۴/۶۱
حذف آفلاتوکسین کل	بیشترین	۷۴/۲۶۱۵	۹۸/۸۱۸۹	۳	۸۶/۷۶

بحث

افزایش شدت میدان الکتریکی به سبب از بین رفتن بخشی از باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک منجر به کاهش میزان تولید اسید گردیده و نتیجتاً میزان pH در نمونه‌ها به طور مشخصی افزایش یافته است. از سوی دیگر تاثیر افزایش میزان تابش فرابنفش نیز دارای تاثیر مشابهی بر روی این باکتریها داشته است. برخی محققین به نقش میدان الکتریکی پالسی بر روی کاهش تحمل باکتریهای اسید لاکتیک به اسید و صفرا و به تاخیر انداختن فاز log باکتری اشاره کرده اند، اما تاثیری بر روی فعالیت پروتئازی باکتری ندارد (Gomes et al., 2010). از سوی دیگر معنی دار نشدن تیمار ازن بالطبع بدلیل عدم تاثیر این تیمار بر روی ترکیبات شیر و نیز باکتریهای تولید کننده شیر بوده است.

تاثیر اعمال پیش تمیار ازن و شدت فرابنفش تاثیری بر روی میزان ماده خشک نمونه‌ها نداشت اما بیشتر تاثیرات آن بر روی باکتری‌ها و مایکوتوکسین‌های موجود در شیر بود. با این حال افزایش شدت میدان الکتریکی پالسی منجر به کمی افزایش در میزان ماده خشک نمونه‌ها گردید که احتمالا بدلیل تغییر در ماهیت پیوندهای پروتئینی و دناتوراسیون پروتئین‌ها بر اثر اعمال میدان الکتریکی پالسی بود. این تغییرات منجر به غیر محلول شدن پروتئین و نتیجتا سبب افزایش میزان ماده خشک فروارده گردیده است (Subramanian et al., 2016).

اسیدیته شیر ناشی از تخمیر لاکتوز موجود در شیر و بر اساس اسید لاکتیک است لذا تاثیر اعمال پیش تیمار میدان الکتریکی پالسی احتمالاً با مکانیسم مخرب بر روی باکتری اسیدلاکتیک سبب جلوگیری از تولید بیشتر اسید لاکتیک توسط این باکتری شده و به کاهش میزان اسید لاکتیک منجر گردیده است. از سوی دیگر چون ازن دهی و تابش فرابنفش تاثیری بر روی میزان باکتری-های اسید لاکتیک و یا لاکتوز ندارد لذا بر روی اسیدیته نمونه‌های شیر تاثیر معنی داری نداشته است (Gomes et al., 2010).

آنگونه که انتظار می رفت، رنگ نمونه‌ها بر اثر اعمال تیمار ازن و تابش فرابنفش تحت تاثیر قرار نگرفت، چون رنگ شیر بیشتر ناشی از وجود چربی و میسل‌های کازئین است و تنها میدان الکتریکی پالسی باعث ایجاد تغییر رنگ در نمونه‌های شیر اسیدوفیلوس گردید،که احتمالاً بخاطر حرارت ایجاد شده طی آن فرآیند می باشد. با این حال تغییر رنگ کلی تفاوت قابل توجهی در بین تیمارهای مختلف نداشت (حدود ۱/۵ واحد)(Subramanian et al., 2016). اما افزایش میزان ازن دهی در برخی از تحقیقات دیگر (بیشتر میوه‌ها و سبزیجات تازه) منجر به تغییر رنگ در محصول گردیده بود که می توان با بکار گیری حد بهینه ازن میزان آن را کاهش داد و یا به صفر رسانید. لذا چون ترکیب شیر کاملاً متفاوت از میوه‌ها و سبزیجات است و از سوی دیگر میزان ازن بکار رفته بر اساس حد بهینه اکثر مقالات و تحقیقات بکار گرفته شده بود، سبب تغییر رنگ زیادی در محصول نشده است. همچنین بدلیل آنکه اشعه فرابنفش تاثیری بر روی میسلهای کازئین و یا چربی شیر

نداشته، منجر به تغییر رنگ محسوس بر روی شیرهای اسیدوفیلوس نگردیده بود (Trombete et al., 2016). محققین به نقش ازن در کاهش میزان بوی محصولات لبنی و خصوصاً شیر اشاره زیادی داشته اند، احتمالا افزایش غلظت ازن در دامنه بکار رفته منجر به کاهش بوی شیر (که مورد پسند اکثر مصرف کننده‌ها نیست) گردیده و سبب شده این عامل در جهت بهبود میزان خصوصیات حسی شیر اسیدوفیلوس عمل نماید. از سوی دیگر تاثیر میدان الکتریکی پالسی و نیز تابش فرابنفش به دلیل عدم تاثیر خاص بر روی ترکیبات شیر و رنگ و سایر خصوصیات آن سبب شده این متغیرها تاثیر خاصی بر روی میزان خصوصیات حسی محصول نداشته باشند (Mallakian et al 2017;Trombete et al., 2016).

میدان الکتریکی پالسی علی رغم محاسن دارای معایبی از جمله تغییر در ساختمان پروتئین‌ها و نیز باکتریهای موجود دارد. افزایش شدت میدان الکتریکی پالسی منجر به برخی تغییرات نامطلوب در باکتریهای پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) گردیده و نیز ممکن است از طریق کاهش و یا تخریب ترکیباتی که به عنوان مواد مغذی برای این باکتریها، بکار می رود سبب کاهش زنده مانی این باکتری گردیده باشد (Subramanian et al., 2016).

تاکنون تحقیقات نادری بر روی زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک تحت تاثیر پیش تمیارهای ذکر شده انجام گرفته است. در سال ۲۰۱۰، کوئوا (۲۰۰۹) به بررسی تاثیرات میدان الکتریکی پالسی بر روی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس پرداخته بود. وی گزارش کرد که افزایش فاکتورهای موثر در تیمار میدان الکتریکی پالسی از قبیل طول پالس، مدت زمان قرار گیری در معرض پالس و نیز انرژی الکتریکی و سرعت جریان، سبب کاهش تحمل مقاومت باکتری در برابر اسید و صفرا و نیز طولانی شدن فاز لگاریتمی رشد باکتری می گردد، اما سبب تغییر در فعالیت پروتئازی باکتری نمی گردد. بنابراین اگرچه میدان الکتریکی پالسی از یک سو سبب کاهش تحمل باکتری به اسید و صفرا گردیده اما در کاهش سرعت رشد باکتری می تواند مفید واقع شود. چون منجر به رهاسازی کنترل شده آنزیم‌ها و کاهش توسعه بافت و طعم توسط باکتری می‌شود (Cueva, 2009).

افزایش شدت تابش فرابنفش گرچه سبب تغییراتی در زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس گردید که احتمالاً بدلیل تاثیرات خفیف این طیف نور بر زنده مانی سایرباکتریهای موجود در شیر بوده است اما در حالت کلی مطابق آنچه انتظار می رفت این تاثیرات خیلی محسوس نبود (Halima et al.,2015).

از سوی دیگر ازن به عنوان گازی خنثی تاثیری در ترکیبات موجود در شیر و نیز ترکیبات مغذی برای باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نداشته است و لذا زنده مانی این باکتری را تحت الشعاع قرار نداده است (Malakian et al.,2017).

محققین دیگری نیز به نقش کاهنده استفاده از تمیار پالس الکتریک اشاره کرده اند، اما در مورد مکانیزم تاثیر میدان الکتریکی پالسی بر روی میزان آفلاتوکسین اشاره ننموده اند. اما احتمالا تاثیر پالس‌های اعمال شده بر روی آفلاتوکسین منجر به تغییرات در ساختمان آن شده و در نتیجه منجر به کاهش میزان این توکسین در شیرهای اسیدوفیلوس گردیده است (Vijayalakshmi et al., 2018).

بشیری و همکاران (۱۳۹۲) طی پژوهش خود بر روی کاهش آفلاتوکسین پسته واریته واحدی به نتایج مشابهی دست یافتند و گزارش کردند که ازن محلول در آب می تواند سبب کاهش آفلاتوکسین پسته شود. کارایی ازن برای کاهش آفلاتوکسین بیشتر بر روی پسته بدون پوسته نرم (پسته با پوست سخت) نسبت به پسته‌ها با پوسته نرم، موثرتر است بیشترین میزان کاهش آفلاتوکسین وقتی حاصل شد که از غلظت ۸ پی‌پی‌ام و زمان تماس ۱۰ یا ۱۲ ساعت استفاده شد. بطور کلی حساسیت آفلاتوکسین جهت تخریب به این گونه است

که نوع B_1 و G_1حساس تر از نوع B_2 و G_2 می‌باشد (بشیری و همکاران ۱۳۹۲).

محققین دیگری تابش فرابنفش بر روی DNA و mRNA و پروتئین (شامل آنزیمها) که در اتباط با متابولیسم سلولی و نیز تشکیل ترکیبات حیاتی برای قارچ آسپرژیلوس است، را عامل کاهنده میزان آفلاتوکسین در نمونه‌ها دانسته‌اند، همچنین این امواج سبب جلوگیری از جوانه زنی و رشد اسپورها می‌گردند. از سوی دیگر، تابش فرابنفش در تقابل با ترکیبات حاوی پیوند S-H منجر به تشکیل ترکیبات پیچیده‌ای که باعث آسیب سلولی از مسیر تخریب کراتین آنزیم عمل می‌کند می‌گردد (Halima et al.,2015).

برخی محققین به نقش واکنش دهندگی ازن با پیوند دوگانه در محل ۸ و ۹ حلقه فوران در آفلاتوکسین اشاره نموده اند، که در طی این واکنش بازآرایی و مشتق شدن آن منجر به تولید آلدهید، کتون و اسیدهای ارگانیک می‌نماید که بر اساس روش ازن زنی (خشک، آبی و مرطوب) متغیر است. در این بین روش مرطوب بیشترین تاثیر را داشته و روش خشک کمترین تاثیرگذاری را دارد. همچنین محققین به نقش آب یا بخار آن در واکنش بین ازن و آفلاتوکسین اشاره نموده اند (Mallakian et al., 2017).

تاکنون تحقیقات بسیار کمی بر روی تاثیرات میدان الکتریکی پالسی بر روی میزان آفلاتوکسین در نمونه‌های مختلف غذایی انجام گرفته است و در معدود مقالات موجود، تنها به نقش کاهندگی میدان الکتریکی پالسی بر روی میزان آفلاتوکسین اشاره شده است، احتمالا کاهش میزان آفلاتوکسین در شیرهای اسیدوفیلوس که با پیش تیمار میدان الکتریکی پالسی تیمار شده بودند به دلیل مکانیزم مخرب اعمال پالس بر روی این توکسین و تغییر نمودار ساختاری بوده است. سایر محققین نیز به نقش تاثیر گذار امواج فرابنفش در کاهش میزان آفلاتوکسین و تولید سموم توسط آسپرژیلوس از طریق فتولیز مولکولهای آفلاتوکسین اشاره کرده‌اند (Vijayalakshmi et al., 2016).

محققین به نقش تخریب کنندگی آفلاتوکسین‌ها توسط ازن اشاره نموده اند و گزارش کردندکه ازن علاوه بر نقش حذف کنندگی آفلاتوکسین‌ها می‌تواند به حذف آفات تولید کننده آفلاتوکسین نیز کمک کند. همانطور که توسط اسپکترومتری جرمی ثابت شده است، با ازن دهی می‌توان سمیت آفلاتوکسین را به طور معنی داری کم یا حذف نمود، اما این تیمار سبب برخی تغییرات نامطلوب نیز می‌گردد که شامل کاهش میزان ترکیبات فنولیک، اسید آسکوربیک غیر فعال نمودن برخی آنزیم‌ها و نیز کمی تغییر رنگ (بخصوص در مورد میوه‌ها و سبزی‌های تازه) می باشد، اما با بهینه سازی میزان استفاده از ازن، می توان این تغییرات را بسیار کاهش داد (Trombete et al., 2016).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش اعمال تیمارهای میدان پالس الکتریکی، ازن دهی و تابش فرابنفش به شیر اولیه به منظور تولید شیر اسیدوفیلوس به عنوان یک محصول پروبیوتیک نشان داد که فرآیندهای مذکور به صورت توام و مجزا در کاهش آفلاتوکسین کل و M1 در سطح معنی داری ۵ درصد موفق عمل کرد به طوریکه در شرایط بهینه آن یعنی مدت زمان پالس ۱۳/۱۵ میکروثانیه، غلظت ازن بکار رفته ۹/۹۹ میلی گرم در دقیقه و شدت امواج فرابنفش ۴/۹۹ ژول بر سانتیمتر مربع به ترتیب به منظور به صورت توام و آزمونهای مختلفی بر روی فراورده تولید انجام گرفت.

استفاده و تلقیح باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان یک باکتری پروبیوتیک برای بهبود کیفیت شیر اسیدوفیلوس به طور موفقیت آمیزی می تواند استفاده شود. در مجموع تحقیق حاضر به معرفی نمونه ای جدید از یک فراورده لبنی برای تغذیه انسان پرداخته که بر

اساس خصوصیات تغذیه ای مناسب و برخورداری از پذیرش کلی مناسب می تواند به عنوان یک فراورده جدید در صنعت لبنیات به تولید تجاری برسد. بدین منظور استفاده از حالتی که مدت زمان پالس ۱۳/۱۵ میکروثانیه و غلظت ازن بکار رفته ۹/۹۹ میلی گرم در دقیقه و شدت امواج فرابنفش ۴/۹۹ ژول بر سانتیمتر مربع به ترتیب ۸۴/۶۱ و ۸۶/۷۶ درصد از آفلاتوکسینM1 و کل آفلاتوکسین‌ها کاهش یافت. همچنین محصول نهایی حاوی $5/2\times10^{6}$ Cfu/g لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود.

منابع

۱. امیرپور، منصوره.، امینی، محسن وخادمی شورمستی، داریوش. (۱۳۹۴). بررسی آفلاتوکسین M1 در کشک پاستوریزه توزیع شده در شهر تهران.، مجله سلامت و محیط، فصلنامه علمی پژوهشی، دوره هشتم، شماره ۱، صفحه۱۱۶-۱۰۹.

۲. جعفری مجتبی. (۱۳۸۵). تکنولوژی هردل. انتشارات آییژ.

۳. حسین زاده امین.، مرتضوی، سید علی.، مهربان ،معصومه.، الهامی راد، امیر حسین و صفری ،امید .،(۱۳۹۶). بهینه سازی تولید محصول سنتی گورماست پروبیوتیک به روش سطح پاسخ و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، پروفایل اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، ویژگیهای میکروبیولوژیکی و حسی آن طی زمان نگهداری. رساله دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار.

۴. فروغی، مرجان.، سرابی جماب، محبوبه.، کرامت،جواد و نجف نجفی، مسعود.(۱۳۹۵). تثبیت مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر سرامیک آلومین جهت کاهش آفلاتوکسین M1 در شرایط .In Vitro نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، 324-315 جلد ۵، شماره۳، صفحات ۳۲۴-۳۱۵.

۵. بشیری، پرویز.، حدادخداپرست ،محمد حسین.، صداقت، ناصر.، طباطبایی یزدی، فریده و نصیری محلاتی،مهدی. (۱۳۹۲). اثر ازن محلول در آب بر کاهش آفلاتوکسین پسته واریته اوحدی، نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، جلد ۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، صفحه ۲۲۱.

6. Akin, M. B., Akin, M. S., and Kirmaci, Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. Food Chemistry. 104: 93-99.

7. Cueva, O. A. 2009. Pulsed electric field influences on acid tolerance, bile tolerance, and protease activity and growth characteristics of Lactobacillus acidophilus LA-K. Master Degree Thesis. The Interdepartmental Program in the School of Animal Sciences. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.

8. Gomes de cruz A., Faria J., Saad S., Bolinnia H., Anderson S. 2010. High pressure processing and Cristinini M., pulsed electric fields:potential use in probiotic dairy foods processing. Trends in Food Science & Technology 21, 483e493.

9. Mallakian Sh, Rezanezhad R, JalaliALALI M, GHOBADI F. 2017. The effect of ozone gas on destruction and detoxification of aflatoxin., Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 86, special issue, p. 1 – 6

10. Moayednia N., Mazaheri A. F. 2012.The Shifts of Acidophilus Milk at the Refrigerator.*Journal of Food Biosciences and Technology*, 2, 65-70.

11. Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B. and Reinheimer, J. A. 2004. Incorporation of bifidobacterium into cheeses: challenges and rewards. International Dairy Journal, 14: 375-387.

12. Halima z., Royam H., Amna M. 2015. Study the effect of ozone gas and ultraviolet radiation and microwave on the degradation of aflatoxin B1 produce by Aspergillus flavus

on stored Maize grains. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS) e-ISSN: 2319-2380, p-ISSN: 2319-2372. Volume 8, Issue 5 Ver. I (May. 2015), PP 05-12

13. Heshmati, A., & Milani, J. M. 2010. Contamination of UHT milk by aflatoxin M1 in Iran. Food Control, 21(1), 19-22.

14. Ross, R. P., Fitzgerald, G., Collins, K. and Stanton, C. 2002. Cheese delivering biocultures probiotic cheese. Australian Journal of Dairy Technology, 57: 71-78.

15. Subramanian V., Shanmugam N., Ranganathan K., Ranganathan S., Reddy R. 2016. Effect of combination processing on aflatoxin reduction: process optimization by response surface methodology. Journal of food processing and preservation.

16. Topisirovic LJ, Kojic M, Fira D, Golic N, Strahinic I, Lozo J. 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology; 112: 230–235.

17. Tripathi, M.K. Giri, S.K. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, Journal of Functional Foods, Journal of Functional Foods; 9:225–241. · 2.63 Impact Factor.

18. Trombete, F. M., Freitas-Silva, O., Saldanha, T., Venâncio, A. A. and Fraga, M. E. 2016. Ozone against mycotoxins and pesticide residues in food: Current applications and perspectives. International Food Research Journal 23(6): 2545-2556.

19. Vijayalakshmi S, Nadanasabhapathi SH, Kumar R, Kumar S, Reddy R. 2016. Effect of combination processing on aflatoxin reduction: process optimization by response surface methodology. J Food Processing and Preservation.

20. Vijayalakshmi S, Nadanasabhapathi SH, Kumar R, Kumar S. 2018. Effect of pH and pulsed electric field process parameters on the aflatoxin reduction in model system using response surface methodology: Effect of pH and PEF on Aflatoxin Reduction. Journal of Food Science and Technology, 55:868-878.

Effect of Ozonation, UV light irradiation and pulsed electric field processes on reducing of Aflatoxin M1 and total Aflatoxin in Acidophilus milk

Khoori E[1], Hakimzadeh V[1*], Mohammadi Sani A[1], Rashidi H[2]

1. Department of food science and technology, Qucahn Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

2. Khorasan Razavi agricultural and natural resources research and education center, AREEO, Mashhad, Iran.

***Corresponding author:** *v.hakimzadeh@yahoo.com*

Accepted: 30 October 2019 Received: 28 January 2020

Abstract

One of the most critical challenges facing dairy products is decreasing or eliminating of Aflatoxins, especially Aflatoxin M1. On the other hand, the production of probiotic dairy products is another aim of the dairy industry. Therefore, in this study, using pulse electric field technology in the range of 10 to 30 microseconds, ozonation in the range of 0 to 10 mg/min and ultraviolet radiation in the range of 0 to 5 J/cm^2 in acidophilus milk attempted to obtain a probiotic-free aflatoxin product. To investigate the impact of the applied the mentioned processes, a central response method (RSM) was used in the full quadratic model so that these processes were considered as operational variables. For this purpose, the central composite design with three independent variables, including pulsed electric field, ozonation and UV irradiation to complete quadratic form has been used. The results showed a significant effect of independent variables and their synergistic effect at 0.05 levels on the reduction of aflatoxin in acidophilus milk. The best-operating conditions based on the lowest amount of aflatoxin in acidophilus milk consisted of 13.15-microsecond pulses in the electric field, 9.99 mg/min of ozone, and 4.99 J/cm^2 of UV waves. In optimum conditions, pH 6.22, Acidity 19.76 (Dornic), dry matter 10.69%, total color change 8.13, and overall acceptance score 4.77 were obtained. Finally, in optimum condition, 84.61% and 86.76% of aflatoxin M1 and total aflatoxins were reduced, and the final product contained 5.2×10^6 cfu/g Lactobacillus acidophilus, respectively.

Keywords: Acidophilus milk, Aflatoxin, Ozone, Pulsed electric field, UV.