



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

کاربرد فیلم نانوکامپوزیت ایزوله پروتئین گاودانه - صمغ چرخک حاوی میکروکپسول‌های عصاره خارمریم و نانوذرات اکسیدگرافن جهت بسته‌بندی پنیر کوپه

سوژین سرای ترکاشه^۱، محمد علیزاده^{۲*}، صابر امیری^۳، ایرج کریمی ثانی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴- بخش تحقیقات فنی و مهندسی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ‌های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۰

کلمات کلیدی:

میکروانکپسولاسیون،

بسته‌بندی فعال،

فیلم خوراکی،

پنیر کوپه.

DOI:10.48311/fsct.2025.83793.0.

* مسئول مکاتبات:

malizadeh@outlook.com

پنیر به دلیل ویژگی‌ها و تنوع زیاد، به‌عنوان چالش‌برانگیزترین فرآورده لبنی شناخته می‌شود که باعث می‌شود پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی به طور گسترده‌ای برای افزایش عمر مفید آن استفاده شوند. بنابراین این پژوهش با هدف کاربرد فیلم نانوکامپوزیت ایزوله پروتئین گاودانه - صمغ چرخک حاوی میکروکپسول‌های عصاره خارمریم در سطوح متفاوت (۰ و ۱۵ حجمی / حجمی) و نانوذرات اکسیدگرافن در سطوح متفاوت (۰ و ۴/۰ وزنی / حجمی) جهت بسته‌بندی پنیر کوپه انجام شد. دو فاکتور زمان نگهداری و نمونه‌فیلم‌های تولید شده (فیلم شاهد، فیلم حاوی ماکسیم مقادیر نانوذره و میکروکپسول عصاره خارمریم و فیلم بهینه حاوی ۳/۴۱٪ وزنی / حجمی نانوذره و ۱۱/۳۵ حجمی / حجمی میکروکپسول عصاره خارمریم) در بسته‌بندی پنیر کوپه و نمونه پنیر کوپه بدون پوشش فیلم طبق روش سطح پاسخ طرح فاکتوریل مورد بررسی قرار گرفتند. ویژگی‌های فیزیکیوشیمایی (pH، اسیدیته، نمک، چربی، پروتئین)، میکروبی (شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها، کپک و مخمر) و ارزیابی حسی پنیر در طی ۶۰ روز نگهداری بررسی شد. تاثیر بسته‌بندی فیلم روی پنیر کوپه طی دوره نگهداری، باعث کاهش pH و چربی، افزایش اسیدیته و نمک شد. همچنین نتایج نشان داد که افزایش زمان نگهداری و نوع بسته‌بندی تاثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین و ارزیابی حسی نمونه‌های پنیر نداشت ($P>0.05$). ویژگی‌های میکروبی پنیر طی ۶۰ روز نگهداری در محدوده مجاز استاندارد ملی بود. به طور کلی، فیلم‌های نانوکامپوزیتی ایزوله پروتئین گاودانه-صمغ چرخک حاوی میکروکپسول‌های عصاره خارمریم و نانوذره اکسیدگرافن ممکن است برای استفاده به عنوان مواد بسته‌بندی سازگار با محیط زیست در صنایع غذایی مناسب باشند و همچنین ایمنی محصولات غذایی را در زمان نگهداری افزایش دهند.

۱-مقدمه

اسیدهای آمینه اصلی موجود در گاودانه شامل اسیدهای گلوتامیک و آسپارتیک، آرژنین و لوسین می‌باشد اما در اسیدهای آمینه متیونین و سیستئین کمبود دارد بطور کلی مشخصات این اسیدهای آمینه به آرد سویا غنی از لیزین بسیار نزدیک می‌باشد [9]. بنابراین گاودانه به دلیل محتوای بالای پروتئین یک منبع مقرون به صرفه برای تولید فیلم‌های خوراکی با خصوصیات عملکردی و ظاهری مناسب برای کاربردهای بسته‌بندی مواد غذایی می‌باشد [10].

صمغ چرخک گیاهی یک ساله با نام علمی *Launaea acanthodes* و از تیره *Lactuceae* خانواده *Asteraceae (Compositae)* می‌باشد در اثر بریدن و آسیب‌های فیزیکی شاخه‌های نزدیک به زمین این گیاه، شیره سفید رنگی ترشح می‌شود که به ماده زرد غیر شفاف پس از تماس با هوا تبدیل می‌شود که دارای طعم تند و ظاهری موم مانند می‌باشد [11]. این گیاه با نام‌های ملک ازرق، چرخان و چرخه نیز شناخته می‌شود که دارای ساقه‌های بوته‌ای و شاخه‌ای بدون کرک می‌باشد که در مناطق کم آبی مانند مناطق مرکزی (کویری) می‌روید [12]. ماده مترشح از این گیاه که در درمان اختلالات گوارشی، ترمیم زخم و زخم معده استفاده می‌شود حاوی ترکیباتی با وزن مولکولی کم و نسبتاً زیاد می‌باشد. ترکیبات شیمیایی این گیاه حاوی ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین و همچنین پروتئین و پلی ساکارید می‌باشد [13]. گالاکتوز، رامنوز، آرابینوز و باقی مانده‌های اسید گالاکتورونیک مونوساکاریدهای تشکیل دهنده و آرابینوگالاکتان ترکیب اصلی در زنجیره ی صمغ چرخک می‌باشد [11]. به طور کلی این صمغ به دلیل حلالیت و ویسکوزیته بالایی که دارد می‌تواند در کاربردهای غذایی، قابلیت‌های متفاوتی داشته باشد. با این حال، مواد بسته‌بندی زیستی در حال حاضر دارای محدودیت‌هایی هستند و نمی‌توانند به طور کامل با ویژگی‌های مواد مبتنی بر نفت مطابقت داشته باشند [۱۴].

غلظت بالای اکسیژن باعث رشد میکروبی و اکسیداسیون محصولات لبنی می‌شود. قرار گرفتن در معرض نور همچنین می‌تواند منجر به تغییر رنگ، از بین رفتن مواد مغذی و تشکیل طعم بد شود و وجود رطوبت باعث فاسد شدن بسیار سریعتر محصولات لبنی می‌شود. به دلیل ویژگی‌ها و تنوع زیاد پنیر، به عنوان چالش برانگیزترین فرآورده لبنی شناخته می‌شود که باعث می‌شود پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی به طور گسترده‌ای برای افزایش عمر مفید آن اعمال شوند. مواد بسته بندی مورد استفاده برای محصولات لبنی و به ویژه پنیر باید کاملاً در برابر دی‌اکسید کربن نفوذپذیر باشند تا عمر مفید آن افزایش یابد و از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری شود [۱]. پنیر کو په جزء پنیرهای سنتی با بافت نیمه سخت، کرم رنگ، دارای مقدار زیادی چربی و عطر و طعم تندی می‌باشد و با نام‌های *Pot cheee* یا *Juge cheese* شناخته شده است. بیشترین میزان تولید این نوع پنیر در یونان، ترکیه و در شمال غرب کشور ایران با نام‌های پنیر کوزه یا کوپه پنیر شناخته شده است [5, 2-4].

گاودانه از خانواده حبوبات و متعلق به جنس *Vicia* است که این جنس شامل ۱۶۰ گونه می‌باشد که در مناطق معتدل اروپا، غرب و مرکز آسیا، شمال آفریقا و آمریکا در حدود ۵۴۰۷۶۱ هکتار کشت می‌شود [6, 7]. یکی از گونه‌های یک ساله جنس *Vicia ervilia*، *Vicia* است که نام علمی گاودانه می‌باشد که معمولاً برای علوفه، پوشش گیاهی خاک‌های شور و همچنین به دلیل ارزش غذایی و عملکرد بالا، مقاومت در برابر خشکسالی و حشرات، کشت و برداشت ساده، عدم نیاز به کود، وجود باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن در ریشه به طور گسترده در مناطق مدیترانه‌ای کشت می‌شود [6, 8]. گاودانه حاوی ۲۶٪ پروتئین که برخی منابع تا ۳۲٪ هم گزارش کرده‌اند یعنی تقریباً دو برابر مقدار پروتئین غلات می‌باشد و دارای ۱/۶٪ چربی، ۶۱/۲٪ کربوهیدرات، ۵/۹٪ فیبرخام و ۳/۷٪ خاکستر می‌باشد [6].

اکسیدگرافن به دلیل فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی یکی از بهترین عوامل تقویت کننده در کامپوزیت های پلیمری می باشد [24]. همچنین این نانوذره به دلیل زیست سازگاری و خواص فیزیکوشیمیایی منحصربه فرد در کاربردهای بیولوژیکی مانند دارورسانی، مهندسی بافت و سنجش گلوکز به کار گرفته شده است [25]. تاکنون هیچ موضوعی تحت عنوان فیلم نانوکامپوزیت ایزوله پروتئین گاودانه - صمغ چرخک فیلم حاوی میکروکپسول عصاره خارمریم و نانوذره اکسیدگرافن کار نشده است و این نوآوری مقاله است. فرضیه این تحقیق این است که فیلم حاوی میکروانکپسولاسیون عصاره خارمریم و نانوذره اکسید گرافن منجر به افزایش زمان ماندگاری پنیر کوبه می شود. هدف از این تحقیق کاربرد فیلم نانوکامپوزیت ایزوله پروتئین گاودانه-صمغ چرخک حاوی میکروکپسول های عصاره خارمریم و نانوذرات اکسیدگرافن جهت بسته بندی پنیرکوبه می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

دانه های گاودانه و خارمریم از بازار ارومیه - ایران و صمغ چرخک از تهران تهیه شدند. نانوذره اکسیدگرافن از برند شرکت US-Nano (آمریکا) با خلوص ۹۹٪ و اندازه ذرات ۴-۷ nm، نشاسته گندم از شرکت مرک آلمان و پنیر کوبه از کارخانه پگاه ارومیه (pH=۴/۶۲، %۰/۸ اسیدلاکتیک) / %۰/۳۶ نمک، %۲۵ چربی، %۲۱ پروتئین، سویه باکتری / شرشیاکلی (ATCC 25922) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) (کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران)، گلیسرول و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

گیاه خارمریم گیاهی دارویی با نام علمی *Silybum marianum (L.) Gaertn* و نام انگلیسی *Milk thistle* و از خانواده *Asteraceae* و تیره کاسنی می باشد [15]. [16] گیاه خارمریم معمولا بومی نواحی مدیترانه ای می باشد اما اکنون در مناطق گرم و خشک و نواحی غربی ایران، آبادان، بوشهر، گرگان، گنبد و همچنین در کشورهای آسیایی، اروپایی و آمریکا رویش دارد [17]. خارمریم گیاهی یک یا دوساله به صورت بوته خاردار و با ساقه های ایستاده به بلندی ۷۰-۵۰ سانتی متر می باشد، دارای برگ های سبز رنگ با حاشیه های دنداندار، گل هایی ارغوانی رنگ و درشت و میوه این گیاه سیاه رنگ و دارای نقطه های زرد رنگی می باشد [18]. خارمریم منبعی غنی از ترکیبات فیتوشیمیایی می باشد. سیلیمارین عصاره استاندارد شده این گیاه می باشد که حاوی سه ترکیب اصلی سیلی بین، سیلی دیانین و سیلی کریستین است که سیلی بین بیشترین فعالیت بیولوژیکی را دارد اما ایزوسیلیبین، سیلاندرین، سیلی هرمین و نئوسیلی هرمین از دیگر فلاونوئیدهای موجود می باشند [19]. بذر این گیاه دارای بیشترین درصد سیلی مارین است که یک ضد اکسایش قوی می باشد؛ بنابراین دانه خارمریم به دلیل فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی به عنوان منبع غنی از آنتی اکسیدان برای جایگزینی آنتی اکسیدان های مصنوعی و نگهدارنده های غذایی استفاده می شود [20]. که به منظور حفظ ترکیبات حساس و مطلوب خارمریم و جلوگیری از فراریت بالای عصاره، این ترکیب را می توان با روش های مختلف انکپسوله کرده و منجر به حفظ و تولید محصولات جدید با ویژگی های نوآورانه شد [21]. نانوذرات اکسیدگرافن به دلیل نسبت سطح به حجم بالا، افزایش خواص مکانیکی-حرارتی و پایداری شیمیایی برای بهبود خواص فیلم ها مورد توجه قرار گرفته است [22]. اکسیدگرافن به دلیل وجود گروه های عاملی هیدروکسیل، کربوکسیل و اپوکسی در سطح خود یک ترکیب هیدروفیل می باشد بنابراین توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی و جذب فلزات یا دیگر پیش سازهای معدنی را دارد [22, 23]. علاوه بر این

۲-۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۲-۱- تهیه فیلم نانوکامپوزیت جهت بسته‌بندی پنیر

کوپه

برای تولید فیلم نانوکامپوزیت، مقدار ۲ گرم پودر ایزوله پروتئین گاودانه در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به کمک NaOH ۱ مولار pH را به ۱۲ رسانده و روی همزن مغناطیسی با سرعت ۵۰۰ rpm به مدت ۱ ساعت بدون اعمال دما همزده شد؛ سپس ۲ گرم صمغ چرخک وزن شده و در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد روی همزن مغناطیسی با سرعت ۵۰۰ rpm همزده شد و پس از حل شدن صمغ، جهت جداکردن ناخالصی‌ها و مواد نامحلول، مخلوط حاصله با دور ۳۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس این دو پلیمر به مدت ۱-۲ ساعت با هم کامپوزیت شدند؛ نانوذره اکسیدگرافن با توجه به طرح آماری در مقادیر متفاوت به محلول فیلم افزوده و روی همزن مغناطیسی به مدت ۱۵ دقیقه همزده، سپس به مدت ۴۵ دقیقه، بدون دما در حمام اولتراسوند (Model Soner203, Rocker Taiwan) قرار داده شد و بعد از آن میکروکپسول عصاره با

توجه به طرح آماری افزوده و مجدداً روی همزن مغناطیسی بدون دما به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد. در ادامه به میزان ۴۰٪ وزن ماده خشک کل، گلیسرول به عنوان نرم‌کننده اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه عمل همزنی انجام شد و در نهایت به وسیله پی‌پت ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول فیلم را در ظرف یکبار مصرف به ابعاد مشخص (۱۷×۱۱ سانتی‌متر) ریخته و در آون در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد خشک گردید [26-28]. از فیلم نانوکامپوزیت خشک شده، برای بسته‌بندی ضد میکروبی و نگهداری پنیر کوپه استفاده شد. بدین منظور تقریباً ۳۵ گرم از پنیر کوپه تهیه شده، تحت شرایط استریل وزن شده و در فیلم‌های حاوی در صدهای مختلف میکروانکپسول‌اسیون عصاره خارمریم و نانوذره اکسیدگرافن طبق طرح آماری در جدول (۱) بسته‌بندی شد و طبق شکل (۱) در ظرف‌های یکبار مصرف درب دار به مدت ۶۰ روز در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آزمون‌های مربوطه در طی مدت زمان‌های مشخص نگهداری (بلافاصله پس از بسته‌بندی، روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۰ و ۶۰) بر روی نمونه‌ها انجام شد.



Figure (1): Koupeh cheese samples packed in composite films

۲-۳-آزمون‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های پنیر کوپه

بسته‌بندی شده

۲-۳-۱-اسیدیته

نمونه پنیر در هاون کاملاً نرم و مخلوط شد و به یک ظرف در دار مناسب انتقال داده شد، سپس مقدار ۲۰ گرم از آزمایش توزین شد و در مقداری آب مقطر حل شد و بعد از وارد کردن تمامی محتویات، در بالن ژوژه ۲۵۰ میلی لیتری به حجم رسانده شد و با استفاده از صافی، صاف شده و ۲۵ میلی لیتر از محلول صاف شده به یک بشر مناسب انتقال داده شد و به آن ۰/۵ میلی لیتر فنل فتالین افزوده شد و با هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال عیار سنجی شد. این عمل تا ظهور رنگ صورتی کم رنگ و پایداری رنگ به مدت ۵ ثانیه ادامه داده شد و در آخر مقدار اسیدیته پنیر برحسب اسید لاکتیک با استفاده از فرمول (۱) به شرح زیر محاسبه گردید [۲۹]:

$$A = \frac{N \times 0.009}{M_1} \times 100 \quad (1)$$

که در آن: N مقدار میلی لیتر سود ۰/۱ نرمال مصرف شده؛
M₁ وزن آزمایش؛ A درصد اسیدیته

۲-۳-۲-pH

در یک بشر، ۱۰ گرم از پنیر خرد شده با دقت توزین شد و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد، آزمون کاملاً همگن و یکنواخت گردید و سپس با اسپاتول چربی جمع شده در سطح آزمون برداشته شد و سپس pH پنیر در حین همزدن به وسیله pH متر کالیبره خوانده شد و یادداشت گردید (دمای آزمون حدود ۲۰ درجه سانتی گراد باشد) [۳۰].

۳-۶-۳-اندازه‌گیری نمک

جهت اندازه‌گیری مقدار نمک در پنیر از روش تیتروسینجی موهر استفاده می‌شود. طبق این روش ۱۰ گرم نمونه پنیر در یک هاون آزمایشگاهی له می‌شود و مقداری آب مقطر جوشیده را به آن اضافه کرده و سپس سوپانسیون را به خوبی همزده و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و بعد از صاف شدن محتویات بالن با استفاده از یک کاغذ صافی،

۲۵ میلی لیتر از محلول صاف شده را به یک ارلن انتقال داده و ۱ میلی لیتر شناساگر پتاسیم کرومات ۰/۳٪ به آن اضافه شد و با محلول نیترات نقره ۰/۱ مولار تا رسیدن به رنگ قرمز آجری تیترو گردید [۳۱] و مقدار نمک به وسیله فرمول (۲) محاسبه شد.

$$V = \frac{V \times 0.1 \times 58.5}{5} \quad (2)$$

V مقدار میلی لیتر نیترات نقره ۰/۱ نرمال مصرف شده

۲-۳-۴-اندازه‌گیری پروتئین

مقدار پروتئین کل پنیر کوپه‌ای با استفاده از روش ماکروکلدال اندازه گرفته شد. در این روش میزان نیتروژن موجود در نمونه محاسبه می‌شود و سپس با استفاده از فاکتور پروتئین که برای پنیر ۶.۳۸ است میزان پروتئین نمونه پنیر مشخص می‌گردد. ۱/۲ گرم از نمونه پنیر برداشته و به همراه ۲ عدد قرص (حدود ۲۰ گرم) کاتالیزور کلدال و ۲۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ زیر هود به لوله هضم دستگاه کلدال اضافه شد. لوله را به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه هضم که از قبل دمای آن به ۴۲۰ درجه سانتی گراد رسیده بود، قرار داده شد تا رنگ محلول کاملاً به رنگ سبز روشن در آمد. پس از هضم اسیدی لوله از اجاق هضم خارج و سرد شده و سپس به وسیله آب مقطر رقیق شده است. لوله به همراه نمونه هضم و رقیق شده در دستگاه تقطیر قرار داده شد. یک ارلن مایر حاوی شناساگر میتل رد در زیر قسمت خروجی مبرد قرار داده شد، سپس اسید بوریک و هیدروکسید سدیم به طور اتوماتیک توسط دستگاه وارد ارلن مایر و لوله هضم شده و عمل تقطیر به مدت ۴ دقیقه انجام شد. محلول بورات آمونیوم تشکیل شده بوسیله اسید کلریدریک ۰/۱ M تیترو شد تا زمانیکه رنگ خاکستری متمایل به ارغوانی تشکیل شد و سپس با استفاده از مقدار تیترو شده و فرمول‌های (۳ و ۴) میزان پروتئین در نمونه پنیر مشخص شد [۳۲].

$$\text{درصد ازت موجود در پنیر} = \frac{0.14 \times A}{M} \quad (3)$$

(۴)

$$X \times \text{درصد ازت} = \text{درصد پروتئین موجود در نمونه}$$

6.38

۲-۳-۵-اندازه‌گیری چربی

برای اندازه‌گیری چربی از دستگاه سوکسله (مدل Universal Extractor E-800) استفاده شد که بدین منظور ۵ گرم از نمونه پنیر ابتدا در آون خشک شد و سپس آن را در هاون خورد کرده و به مدت ۴ ساعت عمل چربی زدایی در دستگاه سوکسله با استفاده از حلال آن-هگزان انجام شد [33] و سپس مقدار چربی با استفاده از فرمول (۵) محاسبه گردید.

(۵)

$$\text{درصد چربی} = \frac{X_2 - X_1}{M} \times 10$$

M وزن نمونه خشک شده؛ X_1 وزن اولیه کاپ؛ X_2 وزن کاپ به همراه روغن

۲-۳-۶-آزمون ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه‌های پنیر توسط ۵ نفر ارزیاب از دانشجویان کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه ارومیه به روش هدونیک ۵ نقطه‌ای برای ویژگی‌های رنگ، بو، طعم و مزه، احساس دهانی، بافت و پذیرش کلی مورد بررسی قرار گرفت. عدد ۱ نشان دهنده پایین‌ترین امتیاز و عدد ۵ بالاترین امتیاز بود [34].

۲-۴-آزمون‌های میکروبی نمونه‌های پنیر کو په

بسته‌بندی شده

۲-۴-۱-شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها

برای شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها از هر نمونه پنیر به میزان ۱۰ گرم برداشته و تحت شرایط استریل با هاون استریل کاملاً خرد شده و با ۹۰ میلی‌لیتر سدیم سیترات (۲٪ وزنی/حجمی) مخلوط شده و در مرحله بعد ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل برداشته شده و با ۹ میلی‌لیتر از سرم فیزیولوژیک استریل مخلوط شد و این کار تا به دست آوردن رقت 10^{-7} ادامه یافت. برای شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها

از روش کشت پورپلیت و با استفاده از محیط کشت نوترینت آگار انجام شد. محیط کشت در اتوکلاو استریل شده و سپس تا دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خنک شد. در مرحله بعدی در کنار شعله مقدار ۱ میلی‌لیتر از دو رقت متوالی آخر را در پلیت‌های استریل ۹ سانتی‌متری پشت‌نویسی شده ریخته و تقریباً ۳۰ میلی‌لیتر از محیط کشت را در آن ریخته و مطابق روش استاندارد همزده و پس از اینکه محیط کشت در کنار شعله جامد شد به طور وارونه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. شمارش کلنی‌ها با استفاده از کلنی‌کانت‌ر صورت گرفت و نتایج به صورت لگاریتم تعداد واحد کلنی میکروارگانیسم‌ها در هر گرم پنیر گزارش شد [35].

۲-۴-۲-شمارش کپک و مخمر

برای شمارش کلی کپک و مخمر از هر نمونه پنیر به میزان ۱۰ گرم برداشته و تحت شرایط استریل با هاون استریل کاملاً خرد شده و با ۹۰ میلی‌لیتر سدیم سیترات (۲٪ وزنی/حجمی) مخلوط شده و در مرحله بعد ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل برداشته شده و با ۹ میلی‌لیتر از سرم فیزیولوژیک استریل مخلوط شد تا رقت ۰/۱ به دست آید. برای شمارش کپک و مخمر از روش کشت سطحی و با استفاده از محیط کشت پتیتودکستروز آگار (Potato Dextrose Agar) (PDA, Scharlau chemie, Barcelona, Spain) انجام شد. محیط کشت در اتوکلاو استریل شده و سپس تا دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خنک شد. در مرحله بعدی در کنار شعله مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده (۰/۱ و ۰/۰۱) را در پلیت‌های استریل حاوی محیط کشت جامد تا ارتفاع نصف پلیت، ریخته سپس با میله ال-شکل استریل به طور یکنواخت پخش شد به طور وارونه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز در انکوباتور قرار داده شد. شمارش کلنی‌ها با استفاده از کلنی‌کانت‌ر صورت گرفت و نتایج به صورت لگاریتم تعداد واحد کلنی میکروارگانیسم‌ها در هر گرم پنیر گزارش شد [35].

۳-جامعه آماری

مدل‌ها از روش رگرسیون و آنالیز واریانس استفاده و سطح خطای نوع اول در این مطالعه برابر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

طبق جدول (۱) دو متغیر مستقل زمان نگهداری و نوع بسته بندی، هر کدام در پنج سطح در ۱۵ تیمار با روش طرح فاکتوریل مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی برازش

Table (1): Statistical scheme of Koupeh cheese packaging

Run	Time (days)	Packaging type
1	60	Blank Film
2	0	Blank Film
3	15	NO Film
4	60	Max MEX/NPs
5	15	Max MEX/NPs
6	60	Optimum Film
7	60	NO Film
8	40	Max MEX/NPs
9	15	Max MEX/NPs
10	40	Optimum Film
11	40	NO Film
12	30	Blank Film
13	15	Optimum Film
14	15	NO Film
15	15	Optimum Film

Blank Film: شاهد فیلم

Max NPS+EX Film: فیلم حاوی بیشترین مقادیر نانوذره اکسیدگرافن (۰/۰۴٪وزنی/حجمی) و میکروکپسول عصاره خارمریم (۱۵ میلی‌لیتر/حجمی) (حجمی/حجمی)

Film EX Film: فیلم حاوی بیشترین مقدار میکروکپسول عصاره خارمریم (۱۵ میلی‌لیتر/حجمی/حجمی)

Max NPS Film: فیلم حاوی بیشترین مقدار نانوذره اکسیدگرافن (۰/۰۴٪وزنی/حجمی)

OPTIMUM Film: فیلم حاوی ۱۱/۳۵ میلی‌لیتر (حجمی/حجمی) میکروکپسول عصاره خارمریم و ۳/۴۱٪ (وزنی/حجمی) نانوذره اکسیدگرافن

NO Film: نمونه پنیر فاقد فیلم بسته‌بندی

ایزوله پروتئین گاودانه-صمغ چرخک حاوی نانوذرات

اکسیدگرافن و عصاره انکپسوله شده خارمریم معنی‌دار بود

($P < 0.05$). همانطور که در شکل (۳و۲) مشاهده می‌کنید

میزان pH و اسیدیته نمونه‌های پنیر کوپه بسته‌بندی شده با

فیلم نانوکامپوزیت با گذشت زمان نگهداری به ترتیب

کاهش و افزایش یافت ($P < 0.05$). در طی ۶۰ روز نگهداری

کمترین میزان pH و بیشترین میزان اسیدیته مربوط به

نمونه‌های پنیر بدون بسته‌بندی بود. نتایج نشان داد که در

طی ۶۰ روز نگهداری در تمامی تیمارهای مورد آزمون به

۴-نتایج و بحث

۴-۱-نتایج آزمون‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های

پنیر کوپه بسته‌بندی شده با فیلم‌های نانوکامپوزیت

۴-۱-۱-میزان pH و اسیدیته پنیر کوپه بسته‌بندی شده

با فیلم‌های نانوکامپوزیت

با توجه به نتایج آنالیز آماری، تاثیر زمان بر pH و اسیدیته

نمونه‌های پنیر کوپه بسته‌بندی شده با فیلم نانوکامپوزیتی

میزان کازئین، سیترات و فسفات است نیز در آن نقش دارد [37]. نتایج مشابهی توسط Kavas و همکاران [۳۰] گزارش شد که بیان کردند pH و اسیدیته در پنیر کاشار (Kashar) پوشش داده شده با فیلم‌های خوراکی غنی شده با اسانس آویشن و میخک به ترتیب کاهش و افزایش یافت؛ همچنین Ríos-de-Benito و همکاران [38] نتایج مشابهی را در ارتباط با کاهش pH و افزایش اسیدیته روی پنیر پانلا (Panela) پوشش داده شده با پوشش خوراکی بر پایه کیتوزان و سدیم کازئینات حاوی اسانس پونه کوهی و نانوذرات سیلیکا گزارش کردند. مدل پیش‌بینی‌کننده برای pH و اسیدیته نمونه‌های پنیر در معادلات (۶) و (۷) آورده شده است:

شکل معنی‌داری میزان pH کاهش و میزان اسیدیته افزایش یافت. فعالیت استارترها و باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک با تخمیر لاکتوز، اسیدلاکتیک تولید کرده و در نتیجه این امر اسیدیته افزایش و pH کاهش یافته است [36]. اما کمترین تغییر کاهش pH و کمترین تغییر افزایش اسیدیته مربوط به نمونه‌های پنیر موجود در فیلم بهینه و فیلم حاوی ماکسیم متغیرهای نانوذره اکسیدگرافن و میکروکپسول عصاره خارمریم بود که احتمالاً ترکیبات فنلی موجود در عصاره خارمریم به حفظ pH و اسیدیته پنیر کمک می‌کند [34]. ارتباط بین pH و اسیدیته پنیر فقط به اسیدلاکتیکی که توسط فلور میکروبی تولید می‌شود وابسته نیست بلکه ظرفیت بافری دلمه که خود ناشی از

$$A \quad pH = 4.63 - 2.50 \times \text{Time} \quad (\text{Adj-R}^2 = 93\%)$$

معادله (۶)

$$pH = 4.65 - 2.78 \times \text{Time}$$

B

$$C \quad pH = 4.66 - 3.08 \times \text{Time}$$

$$D \quad pH = 4.70 - 6.70 \times \text{Time}$$

A: Blank Film B: Max MEX/NPs Film C: Optimum Film D: NO Film

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

pH

● Design Points
--- 95% CI Bands

X1 = A: Time

X2 = B: Film type

B1 Blank Film
B2 Max MEX/NPs
B3 Optimum Film
B4 NO Film

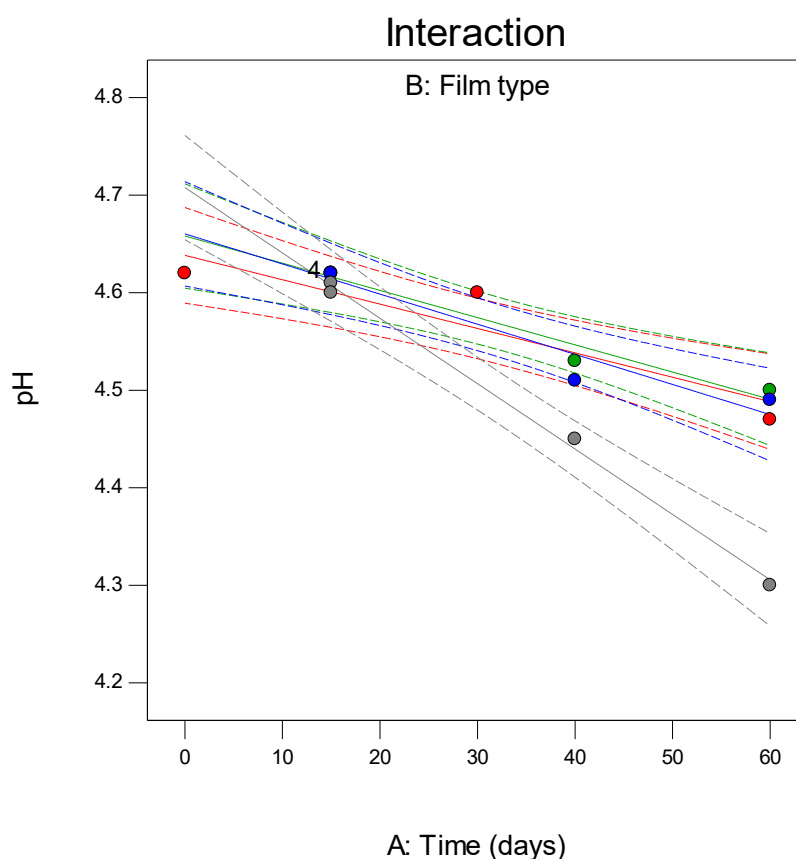


Figure (2): PH interaction of unpackaged and packaged Koupeh cheese with nanocomposite films

A	Acidity(%)=0.80+1.33× Time	(Adj-R ² =89%)	معادله (۷)
B	Acidity(%)=0.78+1.75×Time		
C	Acidity(%)=0.78+1.75× Time		
D	Acidity(%)=0.77+3.29× Time		
A: Blank Film B: Max MEX/NPs Film C: Optimum Film D: NO Film			

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Acidity(%)

● Design Points

--- 95% CI Bands

X1 = A: Time

X2 = B: Film type

B1 Blank Film

B2 Max MEX/NPs

B3 Optimum Film

B4 NO Film

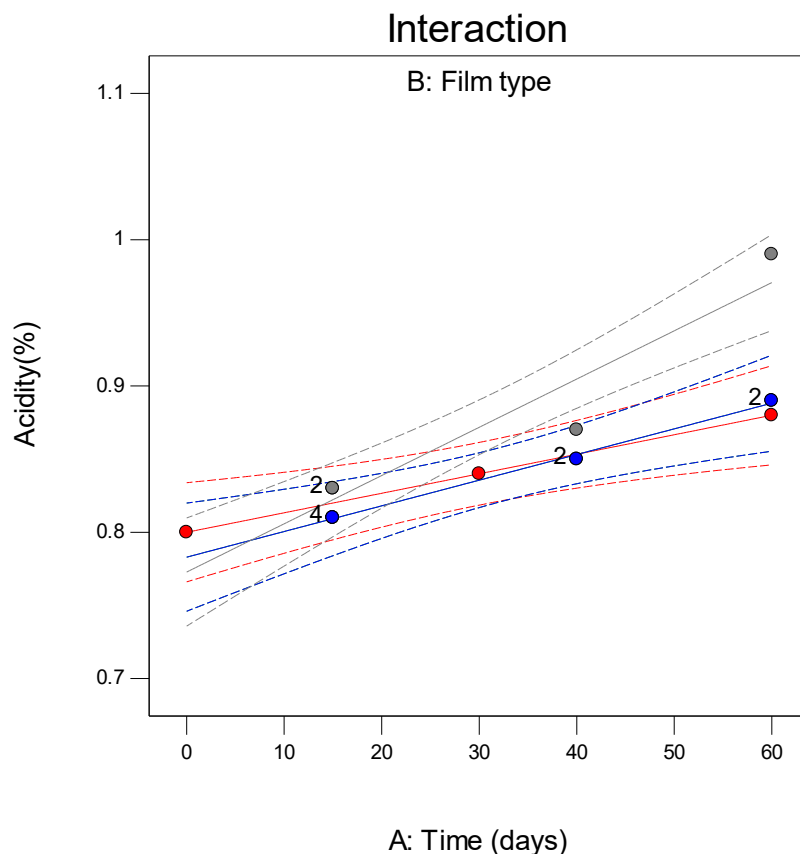


Figure (3): Acidity interaction of unpackaged and packaged Koupeh cheese with nanocomposite films

تغییرات بیوشیمیایی در طی رسیدن پنیر و در ایجاد همزمان عطر و طعم مطلوب دخالت می‌کند [36, 39]. میزان رطوبت پنیر بر میزان جذب نمک و یا انتشار تاثیر می‌گذارد همچنین میزان انتشار نمک در پنیر به نسبت چربی به ماده جامد بدون چربی^۱ (SNF) و رطوبت به SNF بستگی دارد [40]. با توجه به شکل (۳) میزان نمک نمونه‌های پنیر کوپه بسته‌بندی شده با فیلم نانوکامپوزیتی با گذشت زمان و طی مدت زمان نگهداری افزایش یافت اما میزان افزایش نمک در طی ۳۰ روز اول نگهداری کم بود و کمترین و بیشترین مقدار نمک در روز ۶۰ ام نگهداری پنیر به ترتیب مربوط به پنیر کوپه بسته‌بندی شده با فیلم نانوکامپوزیتی حاوی ماکسیمم متغیرهای نانوذره اکسید گرافن و عصاره انکپسوله خارمریم و نمونه پنیر بدون بسته‌بندی بود. به دلیل اینکه پلیمرهای تشکیل‌دهنده فیلم به همراه پرکننده‌هایی

۴-۱-۲- میزان نمک پنیر کوپه بسته‌بندی شده با فیلم‌های نانوکامپوزیت

تاثیر زمان نگهداری و نوع فیلم‌ها بر میزان نمک نمونه‌های پنیر کوپه بسته‌بندی شده با فیلم نانوکامپوزیتی ایزوله پروتئین گاودانه-صمغ چرخک حاوی نانوذرات اکسیدگرافن و عصاره انکپسوله شده خارمریم معنی‌دار بود ($P < 0.05$). با توجه به شکل (۴) میزان نمک نمونه‌های پنیر کوپه بسته‌بندی شده با فیلم نانوکامپوزیتی با گذشت زمان و طی مدت زمان نگهداری افزایش یافت. عملکرد نمک در پنیر به عنوان ماده‌ای نگهدارنده در آب و هوای گرم و موثر بر عطر و طعم پنیر می‌باشد و یک عامل مهم در فعالیت آبی می‌باشد و بدین ترتیب بر رشد و فعالیت میکروبی، فعالیت آنزیم‌ها، کاهش میزان محتوای رطوبتی،

1- Solid non fat

مربوط به پنیر بسته‌بندی شده با فیلم نانوکامپوزیتی حاوی ماکسیمم متغیرهای نانوذره اکسید گرافن و میکروکپسول عصاره خارمریم و نمونه پنیر بدون بسته‌بندی بود [41]. خزایی و همکاران [45] برای پنیر کوپه بسته‌بندی شده در فیلم زیست تخریب‌پذیر بر پایه پلی‌وینیل الکل و نشاسته لوبیا چیتی حاوی اسانس‌های سیر، زنجبیل و دارچین و همچنین El-Sisi و همکاران [46] برای پنیر با پوشش کیتوزان نتایج مشابهی را گزارش کردند. مدل پیش بینی کننده برای نمک نمونه‌های پنیر در معادلات (۸) آورده شده است:

مانند نانوذرات به عنوان یک مانع طبیعی عمل کرده و در نتیجه تبادل گاز و آب بین پنیر بسته‌بندی شده و محیط را کاهش می‌دهد [41]. که احتمالاً علت افزایش میزان نمک در طی ۶۰ روز نگهداری، کم بودن رطوبت نسبی محیط نگهداری پنیرها و انتقال رطوبت از پنیر به محیط و همچنین تبخیر مقداری آب از پنیر منجر به کاهش رطوبت و افزایش نمک در ماده خشک می‌شود [42]. همچنین طبق تحقیقات انجام شده توسط Fox و همکاران [43] و Mistry & Atweh و همکاران [44] دلیل افزایش سرعت جذب نمک را می‌توان کاهش میزان چربی دانست. به همین دلیل طی ۶۰ روز نگهداری کمترین و بیشترین میزان نمک به ترتیب

A	$\text{Salt}(\%) = 3.59 + 1.40 \times \text{Time}$ (Adj-R ² =96%)	معادله (۸)
	$\text{Salt}(\%) = 3.58 + 1.40 \times \text{Time}$	B
	$\text{Salt}(\%) = 3.59 + 1.40 \times \text{Time}$	C
	$\text{Salt}(\%) = 3.60 + 1.40 \times \text{Time}$	D

A: Blank Film B: Max MEX/NPs Film C: Optimum Film D: NO Film

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Salt(%)

● Design Points

--- 95% CI Bands

X1 = A: Time

X2 = B: Film type

B1 Blank Film

B2 Max MEX/NPs

B3 Optimum Film

B4 NO Film

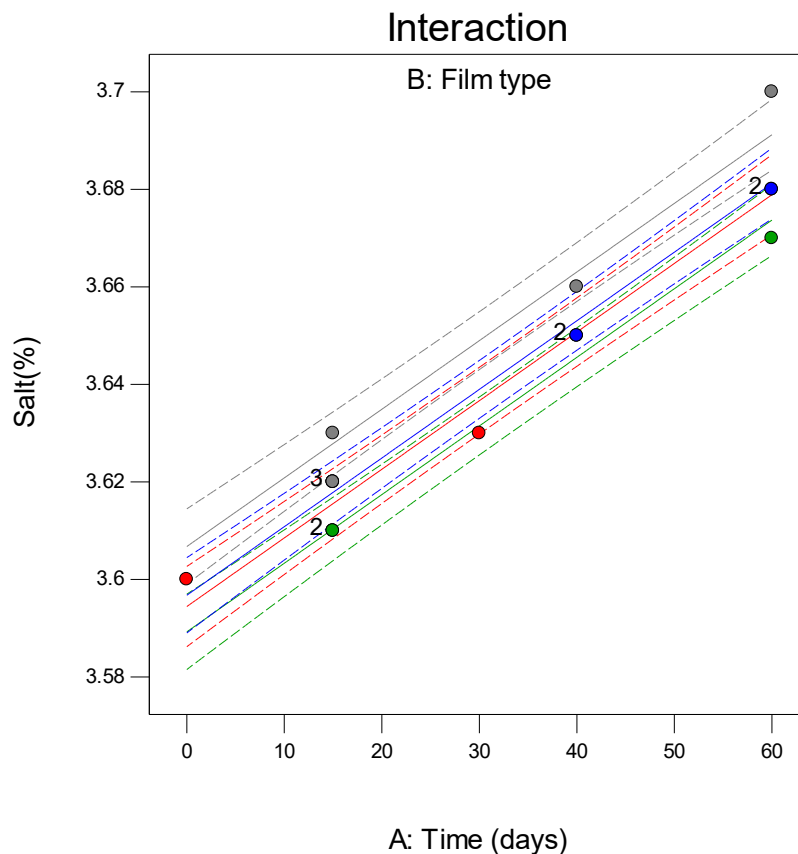


Figure (4): Interaction of unpackaged and packaged coupe cheese salt with nanocomposite films

نمونه پنیر فاقد بسته‌بندی و کمترین کاهش در صد چربی به ترتیب مربوط به نمونه پنیر کوپه بسته‌بندی شده در فیلم ماکس و بهینه و شاهد بود و در طی این مدت نگهداری اختلاف خیلی جزئی بین چربی نمونه‌های پنیر بسته‌بندی شده در فیلم ماکسیمم و فیلم بهینه وجود داشت. بطور کلی مقادیر چربی نمونه‌های پنیر موجود در فیلم نانوکامپوزیت نسبت به نمونه پنیر فاقد بسته‌بندی کاهش جزئی تری داشته اند که ممکن است ساختار فیلم نانوکامپوزیت و وجود نانوپرکننده‌هایی مانند نانوذرات باعث کاهش کمتر محتوی رطوبت و در نتیجه افزایش کمتر ماده خشک نسبت به نمونه پنیری که فاقد بسته‌بندی است باشد [48]. از طرفی دیگر ممکن است، کاهش جزئی در مورد چربی نمونه‌های پنیر موجود در فیلم نانوکامپوزیت در دوره طی نگهداری (۶۰ روز؛ $P < 0.05$)، احتمالاً به دلیل مهار لیپولیز در پنیر کوپه باشد [35]. عامل موثر در این نتیجه می‌تواند مربوط به شرایط متفاوت تولید، چربی شیر پنیرسازی، نوع بسته‌بندی،

۴-۱-۳- میزان چربی و پروتئین پنیر کوپه بسته‌بندی شده با فیلم‌های نانوکامپوزیت

با توجه به مقدار پروتئین پنیر کوپه تازه تهیه شده (۲۱/۲٪)، مقدار پروتئین نمونه‌های پنیر بسته‌بندی شده با فیلم و پنیر بدون بسته‌بندی (۲۱/۲٪) در طی دوره نگهداری ۶۰ روزه بدون تاثیر قابل توجهی در مورد نوع فیلم ثابت باقی ماند ($P > 0.05$). بنابراین، بسته‌بندی با فیلم هیچ تاثیری بر مقدار پروتئین نمونه‌های پنیر کوپه نداشت. نتایج مشابهی در مورد عدم تاثیر فیلم روی مقدار پروتئین پنیر توسط Nemati و همکاران [۴۷] با استفاده از فیلم خوراکی پروتئین آب پنیر همراه با اسانس زیره سبز در پنیر گزارش کردند. با توجه به شکل (۵) در طی دوره نگهداری با گذشت زمان مقدار چربی نمونه‌های پنیر به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P < 0.05$). مقدار چربی نمونه‌های پنیر در طی ۱۵ روز اول نگهداری روند تقریباً ثابتی داشته و در روز ۴۰ و ۶۰ نگهداری بیشترین کاهش درصد چربی مربوط به

کیتوزان حاوی عصاره بولدو (Boldo) گزارش شد. مدل پیش بینی کننده برای چربی نمونه های پنیر در معادلات (۹) آورده شده است:

A $Fat = +25.00 - 4.16 \times$

B $Fat = 25.03 - 2.40 \times \text{Time}$

C $Fat = 25.03 - 2.62 \times \text{Time}$

D $Fat = 25.10 - 6.42 \times \text{Time}$

A: Blank Film

B: Max MEX/NPs Film

C: Optimum Film

D: NO Film

وجود منافذ در ظرف بسته بندی و ... باشد [49]. نتایج مشابهی توسط Bonilla و همکاران [۳۵] برای کاهش در صد چربی پنیر بسته بندی شده با فیلم خوراکی ژلاتین-

(Adj-R²=95%)

معادله (۹)

Time

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Fat (%)
● Design Points
--- 95% CI Bands

X1 = A: Time
X2 = B: Film type

B1 Blank Film
B2 Max MEX/NPs
B3 Optimum Film
B4 NO Film

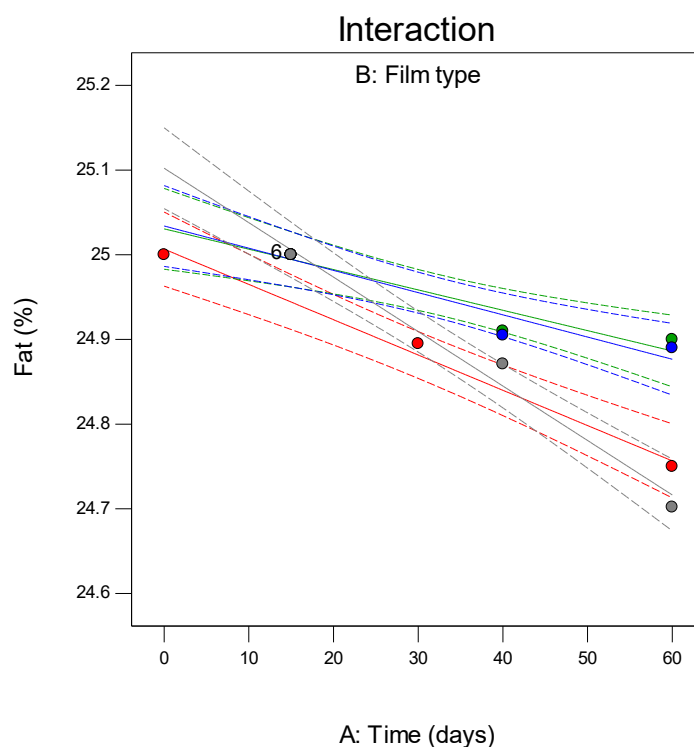


Figure (5): Fat interaction of unpackaged and packaged Koupeh cheese with nanocomposite films

طی مدت زمان نگهداری (۶۰ روز) در شکل (۶) نشان داده شده است و نتایج نشان داد که افزایش زمان نگهداری و نوع بسته بندی تاثیر معنی داری بر ارزیابی حسی نمونه های پنیر نداشت ($P > 0.05$).

۴-۱-۴- ارزیابی حسی پنیر کوپه بسته بندی شده با فیلم های نانوکامپوزیت

ارزیابی حسی پنیر کوپه ای فاقد بسته بندی و پنیر کوپه ای بسته بندی شده در یک فیلم نانوکامپوزیتی مبتنی بر ایزوله پروتئین گاودانه و صمغ چرخک حاوی نانوذرات اکسیدگرافن و عصاره انکپسوله خارمریم و فیلم شاهد در

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Sensory Score
● Design Points
--- 95% CI Bands

X1 = A: Time
X2 = B: Film type

B1 Blank Film
B2 Max MEX/NPs
B3 Optimum Film
B4 NO Film

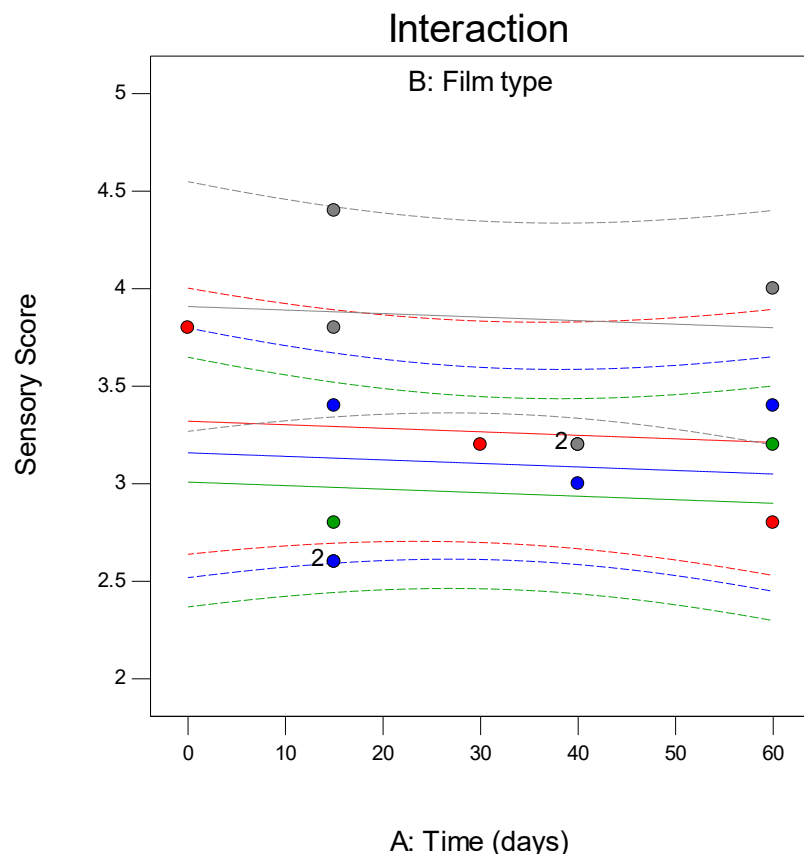


Figure (6): Sensory evaluation interaction of unpackaged and packaged Koupeh cheese with nanocomposite films

تعداد کل باکتری‌ها در نمونه‌های پنیر کوپه بسته‌بندی شده در فیلم حاوی ماکسیمم متغیرها، فیلم بهینه، فیلم شاهد و در نهایت نمونه پنیر کوپه فاقد بسته‌بندی مشاهده شد. کاهش تعداد کل میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های پنیر ممکن است به دلیل عصاره و نانوذره مورد استفاده در فیلم نانوکامپوزیت به همراه کاهش pH و تولید اسید در طی دوره نگهداری باشد [45]. اما نانوذرات اکسیدگرافن باعث اکسیداسیون شیمیایی ترکیبات سلولی، سوراخ شدن دیواره سلولی باکتری‌ها و به دام افتادن سلول‌ها در ساختار اکسیدگرافن می‌شود که باعث مرگ سلول‌های باکتری می‌شود؛ همچنین گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار اکسیدگرافن، غشای سلولی را از طریق استرس اکسیداتیو از بین می‌برند در نتیجه مواد درون سلولی و عملکردهای متابولیکی سلول‌های باکتری از بین می‌رود [25]. همچنین عصاره خارمریم به دلیل اینکه حاوی ترکیبات فنلی هستند و این ترکیبات از طریق تخریب غشای سلولی، تغییر در زنجیره انتقال الکترون، انعقاد مواد پروتئینی

۴-۲- نتایج آزمون‌های میکروبی نمونه‌های پنیر کوپه بسته -
بندی شده با فیلم‌های نانوکامپوزیت

۴-۲-۱- شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های
پنیر کوپه بسته‌بندی شده با فیلم‌های نانوکامپوزیت

تجزیه و تحلیل میکروبیولوژیکی نمونه‌های پنیر در شکل (۷) نشان داده شده است. آنالیزهای میکروبیولوژیکی تفاوت آماری معنی‌داری را بین نمونه‌های پنیر نشان داد ($P < 0.05$). این مطالعه روی نمونه‌های پنیر فاقد بسته‌بندی، نمونه‌های پنیر کوپه بسته‌بندی شده با فیلم شاهد، فیلم بهینه و فیلم حاوی ماکسیمم متغیرها انجام شد. همانطور که در شکل (۷) مشاهده می‌کنید تعداد کل باکتری‌ها در طی دوره نگهداری ۶۰ روزه کاهش یافت اما روند کاهش در طی ۳۰ روز اول کمتر بود و از روز چهارم به بعد در تعداد کل باکتری‌ها کاهش بیشتری مشاهده شد. بطور کلی به ترتیب کاهش بیشتری در

همکاران [۵۱] برای پنیر هیمالیا (Himalayan) تازه بسته-بندی شده با فیلم زئین حاوی عصاره پوست انار گزارش کردند. همچنین Kouser و همکاران [۵۲] بیان کردند که فیلم خوراکی زیست فعال مبتنی بر آلژینات/لئوئو باربادنسیس باعث بهبود کیفیت میکروبی پنیر می‌شود. مدل پیش بینی کننده برای شمارش کلی میکروارگانیسم‌های نمونه‌های پنیر در معادله (۱۰) آورده شده است:

$$A \quad \log_{10}(TC(cfu/g)) = 2.56 - 1.44 \times \text{Time}$$

$$B \quad \log_{10}(TC(cfu/g)) = 2.61 - 4.45 \times \text{Time}$$

$$C \quad \log_{10}(TC(cfu/g)) = 2.60 - 3.69 \times \text{Time}$$

$$D \quad \log_{10}(TC(cfu/g)) = 2.58 - 1.79 \times \text{Time}$$

سیتوپلاسم و همچنین تولید گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS) باعث ایجاد خاصیت ضد میکروبی می‌شوند [50]. بنابراین تعداد کل میکروارگانیسم‌ها در فیلم ماکسیمم از $3/58 \text{ CFU/g}$ به $2/30 \text{ CFU/g}$ ، در فیلم بهینه به ترتیب از $3/60 \text{ CFU/g}$ به $2/50 \text{ CFU/g}$ و در نمونه بدون بسته‌بندی از $3/62 \text{ CFU/g}$ به $2/95 \text{ CFU/g}$ به ترتیب در روز ۱۵ و روز ۶۰ نگهداری رسید. نتایج مشابهی توسط Mushtaq و (۱۰) ($\text{Adj-R}^2=91\%$)

A: Blank Film B: Max MEX/NPs Film C: Optimum Film D: NO Film

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Original Scale
TC(cfu/g)
● Design Points
--- 95% CI Bands

X1 = A: Time
X2 = B: Film type

B1 Blank Film
B2 Max MEX/NPs
B3 Optimum Film
B4 NO Film

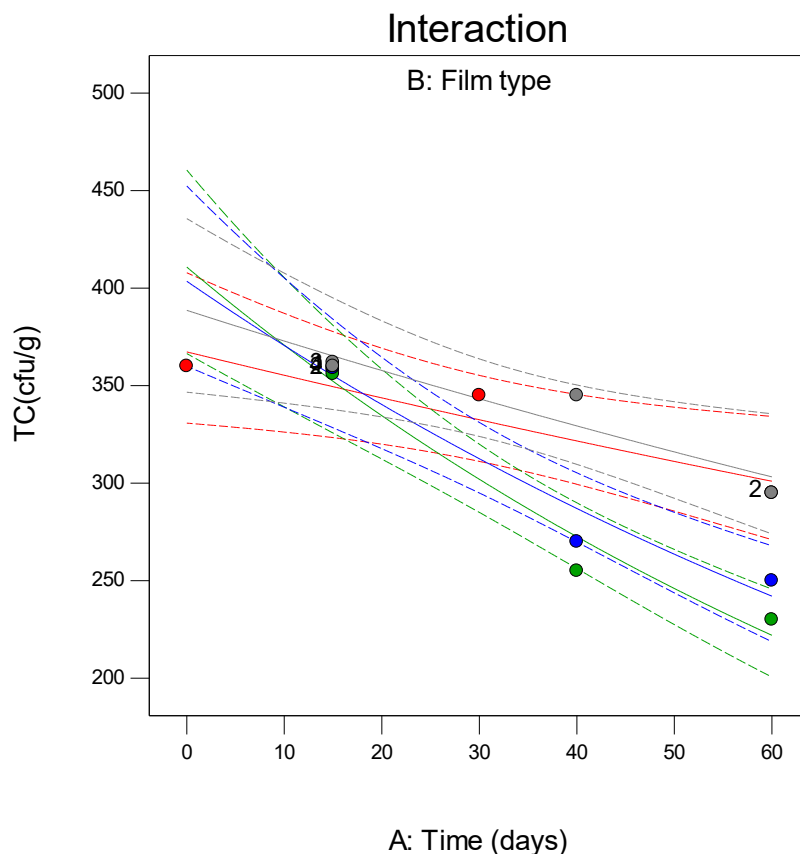


Figure (7): Interaction of the total count of microorganisms of Koupeh cheese without packaging and packaged with nanocomposite films

ماکسیمم، فیلم بهینه و فیلم شاهد در طی دوره نگهداری ۶۰ روزه نشان داده شده است. در تمامی نمونه‌ها در طی ۳۰ روز اول نگهداری روند افزایشی در تعداد کپک و مخمرها دیده شد و سپس میزان کپک و مخمر در ۳۰ روز بعدی

۲-۲-۴- شمارش کپک و مخمرها در نمونه‌های پنیر کویه بسته‌بندی شده با فیلم‌های نانوکامپوزیت در شکل (۹و۸) نتایج شمارش کپک و مخمر نمونه‌های پنیر کویه فاقد بسته‌بندی، پنیر کویه بسته‌بندی شده با فیلم

کپک‌ها، باعث کاهش اسیدیته می‌شود [۵۳]. حداکثر حد مجاز کپک و مخمر در انواع پنیر طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۴۰۶، ۱۰۲ CFU/g می‌باشد. مقدار کپک و مخمر در تمام نمونه‌های پنیر کویه‌ای بسته‌بندی شده در فیلم نانوکامپوزیتی ایزوله پزوتئین گاو دانه-صمغ چرخک حاوی عصاره انکپسوله‌شده خارمریم و نانوذرات اکسیدگرافن در طی ۶۰ روز نگهداری در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محدوده مجاز استاندارد قرار داشت [45]. نتایج مشابهی توسط Fajardo و همکاران [۵۴] برای کاهش کپک و مخمر نمونه‌های پنیر سالیو (Saloio) بسته‌بندی شده با فیلم خوراکی مبتنی بر کیتوزان به عنوان حامل ناتامایسین گزارش شد، همچنین Hassas و همکاران [۵۵] از عصاره اتانولی پونه کوهی در فرمولا سیون پنیر کویه‌ای استفاده کردند و گزارش کردند که میزان کپک و مخمر در نمونه‌های مذکور نسبت به نمونه شاهد که عصاره نداشته به طور معنی‌داری کاهش یافته است. مدل پیش‌بینی‌کننده برای شمارش کپک و مخمر نمونه‌های پنیر به ترتیب در معادله (۱۱) و (۱۲) آورده شده است:

دوره نگهداری بطور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش یافت. بطوریکه در روز ۶۰ نگهداری تعداد کپک به ترتیب برای فیلم ماکسیم ۲ CFU/g، فیلم بهینه ۴ CFU/g، فیلم شاهد ۳۵ CFU/g و نمونه فاقد فیلم ۲۵ CFU/g و تعداد مخمر به ترتیب برای فیلم ماکسیم ۲۵ CFU/g، فیلم بهینه ۳۵ CFU/g، فیلم شاهد ۵۱ CFU/g و نمونه فاقد فیلم ۴۱ CFU/g رسید. این نتایج احتمالاً به دلیل وجود نانوذرات اکسیدگرافن و عصاره خارمریم که حاوی ترکیبات فنلی است و این ترکیبات از طریق تخریب غشای سلولی، تغییر در زنجیره انتقال الکترون، انعقاد مواد پروتئینی سیتوپلاسم و همچنین تولید گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS) باعث ایجاد خاصیت ضد میکروبی می‌شوند [50]. همچنین ممکن است به دلیل مقاومت این میکروارگانیسم‌ها در مقابل کاهش رطوبت و مصرف لاکتوز توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک و اسیدی شدن محیط باشد (به دلیل قدرت تجزیه اسید توسط آن‌ها) که منجر به مساعد شدن رشد کپک و مخمر شد. در نتیجه در ۳۰ روز اول نگهداری در نمونه‌های پنیر روند افزایشی کپک و مخمر دیده شد. تولید و شرایط نگهداری نامناسب و عدم شرایط بهداشتی تولید از عوامل افزایش کپک و مخمر می‌باشد که در نتیجه افزایش زیاد کپک و مخمر، به دلیل مصرف اسید لاکتیک توسط

$$A \quad \text{Mold count(cfu/g)} = 42.98 + 0.83 \times \text{Time} - 0.01 \times \text{Time}^2 \quad (\text{Adj-R}^2 = 92\%) \quad (11)$$

$$B \quad \text{Mold count(cfu/g)} = 45.43 + 0.32 \times \text{Time} - 0.01 \times \text{Time}^2$$

$$C \quad \text{Mold count(cfu/g)} = 46.86 + 0.33 \times \text{Time} - 0.01 \times \text{Time}^2$$

$$D \quad \text{Mold count(cfu/g)} = 40.32 + 0.72 \times \text{Time} - 0.01 \times \text{Time}^2$$

$$A \quad \text{Log}_{10}(\text{Yeast(cfu/g)}) = 1.82 + 2.65 \times \text{Time} - 7.71 \times \text{Time}^2 \quad (\text{Adj-R}^2 = 97\%) \quad (12)$$

$$B \quad \text{Log}_{10}(\text{Yeast(cfu/g)}) = 1.90714 - 3.57 \times \text{Time} - 7.71 \times \text{Time}^2$$

$$C \quad \text{Log}_{10}(\text{Yeast(cfu/g)}) = 1.86655 - 8.44 \times \text{Time} - 7.71 \times \text{Time}^2$$

$$D \quad \text{Log}_{10}(\text{Yeast(cfu/g)}) = 1.84126 + 5.27 \times \text{Time} - 7.71 \times \text{Time}^2$$

A: Blank Film B: Max MEX/NPs Film C: Optimum Film D: NO Film

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Mold count(cfu/g)
● Design Points
--- 95% CI Bands

X1 = A: Time
X2 = B: Film type

B1 Blank Film
B2 Max MEX/NPs
B3 Optimum Film
B4 NO Film

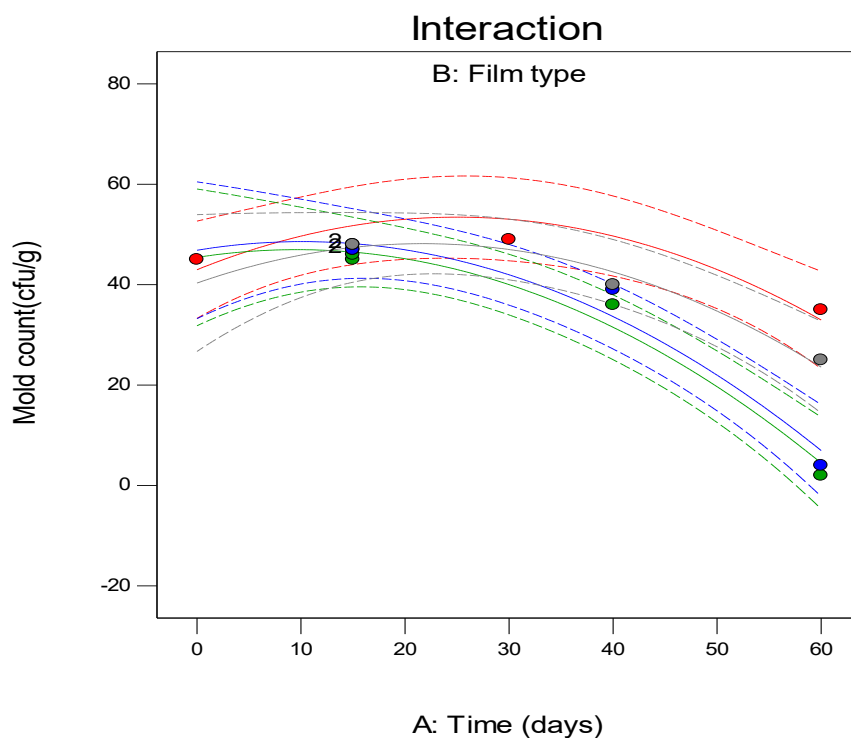


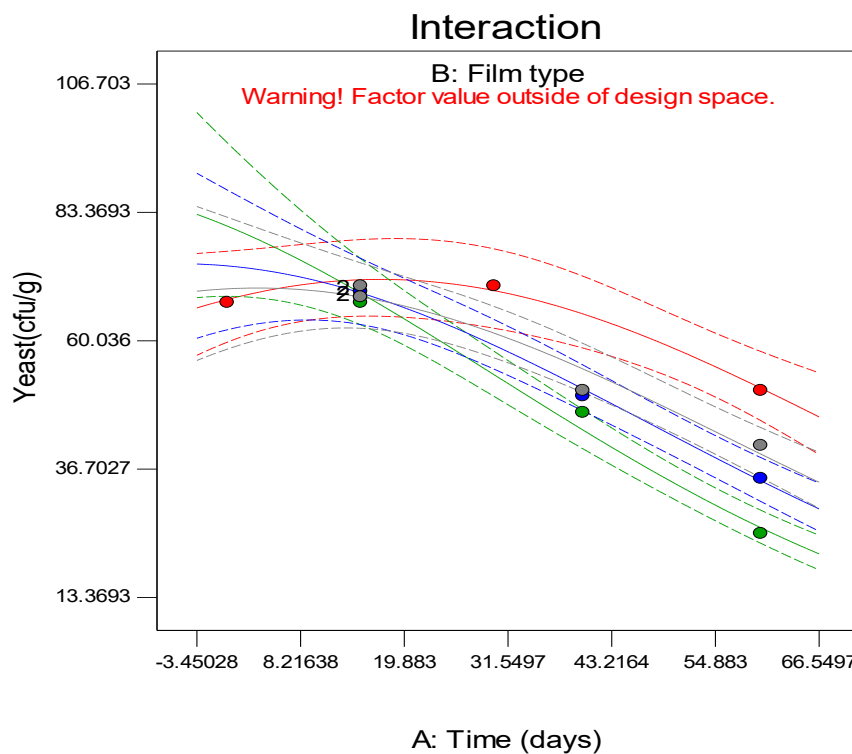
Figure (8): The mold interaction of unpackaged and packaged Koupeh cheese with nanocomposite films

Figure (9): The yeast interaction of Koupeh cheese

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Original Scale
Yeast(cfu/g)
● Design Points
--- 95% CI Bands

X1 = A: Time
X2 = B: Film type

B1 Blank Film
B2 Max MEX/NPs
B3 Optimum Film
B4 NO Film



without packaging and packaged with
nanocomposite films

۵- نتیجه گیری کلی

استاندارد ملی ایران بود. همچنین نتایج نشان داد که افزایش زمان نگهداری و نوع بسته‌بندی تاثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین و ارزیابی حسی نمونه‌های پنیر نداشت ($P>0.05$). ویژگی‌های میکروبی پنیر طی ۶۰ روز نگهداری در محدوده مجاز استاندارد ملی بود. در نتیجه خواص فیزیکی‌شیمیایی و میکروبی پنیر کوبه بسته‌بندی شده با فیلم نانوکامپوزیت ایزوله پروتئین گاودانه - صمغ چرخک حاوی میکروکپسول‌های عصاره خارمریم و نانوذرات اکسیدگرافن طی ۶۰ روز نگهداری بهبود یافت.

در این پژوهش پنیر کوبه با فیلم نانوکامپوزیت ایزوله پروتئین گاودانه - صمغ چرخک حاوی میکروکپسول‌های عصاره خارمریم و نانوذرات اکسیدگرافن بسته‌بندی شد و خواص فیزیکی‌شیمیایی و میکروبی پنیر طی ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. تاثیر بسته‌بندی فیلم روی پنیر کوبه طی دوره نگهداری، باعث کاهش معنی‌دار pH و چربی، افزایش معنی‌دار اسیدیته و نمک شد و مقادیر آن در محدوده مشخص شده در

۶- منابع

- [1] Hadidi, M., et al., *Plant protein-based food packaging films; recent advances in fabrication, characterization, and applications*. Trends in Food Science & Technology, 2022. **120**: p. 154-173.
- [2] Dehnavi, F., A.A. KHOSROWSHAHI, and S. Zomorodi, *Viability of Lactobacillus Acidophilus and its effect on characteristics of Jug cheese*. 2013.
- [3] Ghaderi, M., et al., *Isolation and identification of Lactic Acid Bacteria in traditional Pot cheese*. 2013.
- [4] Edalatian Dovom, M.R., et al., *Isolation and Identification of the Indigenous Lactic acid Bacteria of Koozeh Cheese and Its Changes during Ripening (Fresh and Ripened) Using Cultural Methods and Carbohydrate Fermentation Profiles*. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 2013. **9**(2).
- [5] Alizadeh, M., M. Hamed, and A. Khosroshahi, *Optimizing sensorial quality of Iranian white brine cheese using response surface methodology*. Journal of food science, 2005. **70**(4): p. S299-S303.
- [6] Tarahi, M., F. Shahidi, and S. Hedayati, *A Novel starch from bitter vetch (Vicia ervilia) seeds: a comparison of its physicochemical, structural, thermal, rheological and pasting properties with conventional starches*. International Journal of Food Science & Technology, 2022. **57**(10): p. 6833-6842.
- [7] Arabestani, A., et al., *Properties of a new protein film from bitter vetch (Vicia ervilia) and effect of CaCl₂ on its hydrophobicity*. International Journal of Biological Macromolecules, 2013. **57**: p. 118-123.
- [8] Porta, R., et al., *Blend films of pectin and bitter vetch (Vicia ervilia) proteins: Properties and effect of transglutaminase*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016. **36**: p. 245-251.
- [9] Porta, R., et al., *Microstructure and properties of bitter vetch (Vicia ervilia) protein films reinforced by microbial transglutaminase*. Food Hydrocolloids, 2015. **50**: p. 102-107.
- [10] Abdolsattari P, Rezazadeh-Bari M, Pirsa S. *Smart film based on polylactic acid, modified with polyaniline/ZnO/CuO: Investigation of physicochemical properties and its use of intelligent packaging of orange juice*. Food and Bioprocess Technology. 2022, **15**(12):2803-25.
- [11] Piazza, L., S. Bertini, and J. Milany, *Extraction and structural characterization of the polysaccharide fraction of Launaea acanthodes gum*. Carbohydrate polymers, 2010. **79**(2): p. 449-454.
- [12] Ghaderian, S. and A. Baker, *Geobotanical and biogeochemical reconnaissance of the ultramafics of Central Iran*. Journal of Geochemical Exploration, 2007. **92**(1): p. 34-42.
- [13] Nergard, C.S., et al., *Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from Vernonia kotschyana Sch. Bip. ex Walp*. Journal of Ethnopharmacology, 2004. **91**(1): p. 141-152.
- [14] Amiri S, Roshani Saray F, Rezazad-Bari L, Pirsa S. *Optimization of extraction and characterization of physicochemical, structural, thermal, and antioxidant properties of mucilage from Hollyhock's root: a functional heteropolysaccharide*. Journal of Food Measurement and Characterization. 2021, **15**:2889-903.
- [15] Sahi, S., H. Djidjelli, and A. Boukerrou, *Study of the properties and biodegradability of the native and plasticized corn flour-filled low density polyethylene composites for food packaging applications*. Materials Today: Proceedings, 2021. **36**: p. 67-73.
- [16] Rahimi, A. and M. Kamali, *Different planting date and fertilizing system effects on the seed yield, essential oil and nutrition uptake of milk thistle (Silybum marianum (L.) Gaertn.)*. Advances in Environmental Biology, 2012. **6**(5): p. 1789-1796.

- [17] Fallah Huseini, H., A. Hemati, and S. Alavian, *A review of herbal medicine: Silybum marianum*. Journal of Medicinal Plants, 2004. **3**(11): p. 14-24.
- [18] Tooiserkani, F., A. Hormati, and H. Moradi, *A Glimpse of Silybum marianum from the Perspective of Iranian Traditional Medicine and Modern Studies*. Qom University of Medical Sciences Journal, 2019. **13**(1): p. 78-86.
- [19] Lucini, L., et al., *Phenolic profile and in vitro antioxidant power of different milk thistle [Silybum marianum (L.) Gaertn.] cultivars*. Industrial Crops and Products, 2016. **83**: p. 11-16.
- [20] Serçe, A., et al., *Assessment of the antioxidant activity of Silybum marianum seed extract and its protective effect against DNA oxidation, protein damage and lipid peroxidation*. Food technology and biotechnology, 2016. **54**(4): p. 455-461.
- [21] Tang, Y., et al., *Electrospun gelatin nanofibers encapsulated with peppermint and chamomile essential oils as potential edible packaging*. Journal of agricultural and food chemistry, 2022. **70**(12): p. 2227-2234.
- [22] Gautam, S., et al., *Antibacterial efficacy of poly (vinyl alcohol) nanocomposites reinforced with graphene oxide and silver nanoparticles for packaging applications*. Polymer Composites, 2021. **42**(6): p. 2829-2837.
- [23] Xie, Y.-Y., et al., *Development and antibacterial activities of bacterial cellulose/graphene oxide-CuO nanocomposite films*. Carbohydrate Polymers, 2020. **229**: p. 115456.
- [24] Usman, A., et al., *Enhanced mechanical, thermal and antimicrobial properties of poly (vinyl alcohol)/graphene oxide/starch/silver nanocomposites films*. Carbohydrate polymers, 2016. **153**: p. 592-599.
- [25] Das, M., et al., *Synergetic reinforcing effect of graphene oxide and nanosilver on carboxymethyl cellulose/sodium alginate nanocomposite films: Assessment of physicochemical and antibacterial properties*. International Journal of Biological Macromolecules, 2023. **239**: p. 124185.
- [26] Ghasemzad S, Pirsas S, Amiri S, Abdosatari P. *Optimization and characterization of bioactive biocomposite film based on orange peel incorporated with gum arabic reinforced by Cr2O3 nanoparticles*. Journal of Polymers and the Environment. 2022, **30**(6):2493-506.
- [27] Pirsas S, Bener M, Şen FB. *Biodegradable film of carboxymethyl cellulose modified with red onion peel powder waste and boron nitride nanoparticles: Investigation of physicochemical properties and release of active substances*. Food Chemistry. 2024, **1**:445:138721.
- [28] Pirsas S, Mahmudi M, Ehsani A. *Biodegradable film based on cress seed mucilage, modified with lutein, maltodextrin and alumina nanoparticles: Physicochemical properties and lutein controlled release*. International Journal of Biological Macromolecules. 2023, **1**:224:1588-99.
- [29] Alizadeh, M., *Packaging of UF cheese with edible film of nanocomposite isolated mung bean protein-apple pectin containing microencapsulation of cardamom extract and serum oxide nanoparticles and quantum carbon Graphite dots: Investigation of its physicochemical properties*. Journal of food science and technology (Iran), 2022. **49**(2): p. 235-247.
- [30] Kavas, G., N. Kavas, and D. Saygili, *The effects of thyme and clove essential oil fortified edible films on the physical, chemical and microbiological characteristics of kashar cheese*. Journal of food quality, 2015. **38**(6): p. 412-16.
- [31] Momeni Sarvestani, M. and H. Lashkari, *Effect of black cumin essential oil on physicochemical, microbial and sensorial characteristics of ultrafiltered Feta cheese*. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 2020. **16**(4): p. 409-42.
- [32] Amiri S, Kohneshahri SR, Nabizadeh F. *The effect of unit operation and adjunct probiotic culture on physicochemical, biochemical, and textural properties of Dutch Edam cheese*. LWT. 2022, **1**:155:112859.
- [33] Pirsas S, Abdolsattari P, Peighambari SH, Fasihnia SH, Peighambari SH. *Investigating microbial properties of traditional Iranian white cheese packed in active LDPE films incorporating metallic and organoclay nanoparticles*. Chemical Review and Letters. 2020, **1**:3(4):168-74. Karunamay, S., S.R. Badhe, and V. Shulka, *Effect of Edible Packaging Film Treated with Essential Oil of Clove in Extending the Shelf Life of Paneer*. 2020.
- [34] Pirsas S, Dalili R, Yazdani I. *Effects of quince seed mucilage and guar gum on the physicochemical and sensory properties of Doogh*. Journal of Agricultural Science and Technology. 2018, **20**(3):485-94.
- [35] Motelica, L., et al., *Antibacterial biodegradable films based on alginate with silver nanoparticles and lemongrass essential oil-innovative packaging for cheese*. Nanomaterials, 2021. **11**(9): p. 2377.
- [36] Macedo, A.C., F.X. Maccata, and J.C. Oliveira, *Effect of production factors and ripening conditions on the characteristics of Serra cheese*. International journal of food science & technology, 1997. **32**(6): p. 501-511.
- [37] Rios-de-Benito, L.F., et al., *Design of an active edible coating based on sodium caseinate, chitosan and oregano essential oil reinforced with silica particles and its application on panela cheese*. Coatings, 2021. **11**(10): p. 1212.
- [38] Kaplan, N.M., *The dietary guideline for sodium: should we shake it up? No*. The American

- journal of clinical nutrition, 2000. **71**(5): p. 1020-1026.
- [39] Geurts, T.J., P. Walstra, and H. Mulder, *Brine composition and the prevention of the defect'soft rind'in cheese*. 1973.
- [40] Mahcene, Z., et al., *Home-made cheese preservation using sodium alginate based on edible film incorporating essential oils*. Journal of food science and technology, 2021. **58**: p. 2406-2419.
- [41] Cooke, D., A. Khosrowshahi, and P. Mcsweeney, *Effect of gum tragacanth on the rheological and functional properties of full-fat and half-fat Cheddar cheese*. Dairy Science & Technology, 2013. **93**(1): p. 45-62.
- [42] Fox, P.F., et al., *Fundamentals of cheese science*. Vol. 1. 2017: Springer.
- [43] Mistry, S.J. and G.F. Atweh, *Stathmin inhibition enhances okadaic acid-induced mitotic arrest: a potential role for stathmin in mitotic exit*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(33): p. 31209-31215.
- [44] Khazaei, A., L. Nateghi, and N. Zand, *Evaluation of Microbial and Sensory Properties of Jug Cheese Packed in the Biodegradable Film of Polyvinyl Alcohol and Pinto Bean Starch-Containing Garlic, Ginger, and Cinnamon Essential Oils*. Iran. J. Chem. Chem. Eng. Research Article Vol, 2022. **41**(11).
- [45] El-Sisi, A.S., A. Gapr, and K. Kamaly, *Use of chitosan as an edible coating in RAS cheese*. Biolife, 2015. **3**(2): p. ۵۷۰-۵۶۴.
- [46] Nemati, V., et al., *Application of a Whey Protein Edible Film Incorporated with Cumin Essential Oil in Cheese Preservation*. Coatings, 2023. **13**(8): p. 1470.
- [47] Hayaloglu, A., M. Guven, and P. Fox, *Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese 'Beyaz Peynir'*. International Dairy Journal, 2002. **12**(8): p. 635-648.
- [48] Ceylan, Z., H. Turkoglu, and K. Dayisoğlu, *The microbiological and chemical quality of sikma cheese produced in Turkey*. Pakistan Journal of Nutrition, 2003. **2**(2): p. 95-97.
- [49] Gohargani, M., H. Lashkari, and A. Shirazinejad, *Study on biodegradable chitosan-whey protein-based film containing bionanocomposite TiO₂ and Zataria multiflora essential oil*. Journal of Food Quality, 2020. **2020**: p. 1-11.
- [50] Mushtaq, M., et al., *Use of pomegranate peel extract incorporated zein film with improved properties for prolonged shelf life of fresh Himalayan cheese (Kalari/kradi)*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018. **48**: p. 25-32.
- [51] Kouser, F., et al., *Aloe barbadensis based bioactive edible film improved lipid stability and microbial quality of the cheese*. Foods, 2023. **12**(2): p. 229.
- [52] Nateghi, *Investigation of the effect of essential oil of the sap of the betel tree on the physicochemical, microbial and sensory properties of jarred cheese*. Food Industry Research, 2021. **31**(2): p. 67-87.[In persian]
- [53] Fajardo, P., et al., *Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese*. Journal of food engineering, 2010. **101**(4): p. 349-356.
- [54] Hassas, B., L. Nateghi, and A. Lavasani, *Investigation of physicochemical, microbial and sensory properties of low-fat jug cheeses containing β -glucan powder and ethanolic extract of menthe longifolia*. Iranian Food Science & Technology Research Journal, 2019. **15**(1): p. 181-198.



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

The application of *Vicia ervilia* protein isolate - *Launaea acanthodes* gum nanocomposite film containing *Silybum marianum* extract microcapsule and graphene oxide nanoparticle for packing Koupeh cheese

Sozhin Saray Tarkasheh¹, Mohammad Alizadeh^{2*}, Saber Amiri³, Iraj Karimi Sani⁴

1-MSc in Food Chemistry, Department of Food Science and Industry, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2-Professor, Department of Food Science and Industry, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

3-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, P.O. Box 57561-51818, Urmia, Iran

4-Agricultural Engineering Research Department, West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Urmia, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received:2024/05/25

Accepted:2024/12/30

Keywords:

Microencapsulation,

active packaging,

edible film,

Koupeh cheese

DOI: [10.48311/fsct.2025.83793.0](https://doi.org/10.48311/fsct.2025.83793.0).

*Corresponding Author E-

malizadeh@outlook.com

Cheese is known as the most challenging dairy product due to its characteristics and diversity, which makes edible coatings and films widely applied to extend its shelf life. Therefore, this research aims to application of *Vicia ervilia* protein isolate - *Launaea acanthodes* gum nanocomposite film containing *Silybum marianum* extract microcapsule at different levels (0 and 15 V/V) and graphene oxide nanoparticle at different levels (0 and 4 W/V) for packing Koupeh cheese was done . Two storage time factors and samples of produced films (control film, film containing maximum amounts of nanoparticles and *Silybum marianum* extract microcapsule and optimal film containing 3.41% W/V of nanoparticles and 11.35% V/V of *Silybum marianum* extract microcapsule) in the packaging of Koupeh cheese and Koupeh cheese samples without film coating, were investigated according to the response surface method of the factorial design. Physicochemical characteristics (pH, acidity, salt, fat, protein), microbial (total count of microorganisms, mold and yeast) and sensory evaluation of cheese during 60 days of storage were investigated. The effect of film packaging on coupe cheese during the storage period caused a decrease in pH and fat, an increase in acidity and salt. Also, the results showed that the increase in storage time and type of packaging had no significant effect on the amount of protein and sensory evaluation of cheese samples ($P>0.05$). The microbial characteristics of cheese during 60 days of storage were within the permissible limits of the national standard. In general, *Vicia ervilia* protein isolate - *Launaea acanthodes* gum nanocomposite films containing *Silybum marianum* extract microcapsule and graphene oxide nanoparticles may be suitable for use as environmentally friendly packaging materials in the food industry and also increase the safety of food products during storage.