

## بررسی امکان کاربرد فیلم کازئینات سدیم حاوی نانورس و اسانس خوشاریزه در بسته بندی ماست قالبی پروبیوتیک

رقیه اشرفی یورقانلو<sup>۱</sup>، هاله همتی<sup>۲\*</sup>

۱- استادیار گروه صنایع غذایی آموزشکده فنی دختران ارومیه، دانشگاه فنی و حرفه ای استان آذربایجان غربی، ارومیه، ایران

۲- گروه صنایع غذایی موسسه آموزش عالی آفاق، ارومیه، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۰۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۱)

### چکیده

با توجه به میزان مصرف بالای ماست، این محصول بستری مناسب برای انتقال باکتری‌های پروبیوتیک به بدن انسان می باشد. شرط اساسی برای تاثیر مناسب این باکتری‌ها در بدن، زنده ماندن تعداد کافی از آن‌ها در طول نگهداری تا زمان مصرف می باشد. در این تحقیق به منظور امکان سنجی استفاده از بسته بندی های زیست تخریب پذیر و همچنین بررسی تاثیر آن در زنده ماندن باکتری های پروبیوتیک جهت پوشش ظروف حاوی ماست از فیلم کازئینات سدیم حاوی نانورس و اسانس خوشاریزه استفاده شد و نمونه ها در دمای ۴ و ۱۵ و به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. اثر جنس بسته بندی بر زنده ماندن باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس معنی دار نبود، در حالی که بر رشد باکتری بیفیدوباکتریوم انیمالیس معنی دار بود، بیشترین تعداد باکتری انیمالیس در پوشش حاوی ۱/۵ گرم نانورس و کمترین تعداد در ظروف حاوی ۰/۷۵ گرم نانورس مشاهده گردید. با افزایش دمای نگهداری تا ۱۵ °C و گذشت زمان تا ۲۱ روز به طور همزمان روند کاهش تعداد باکتری های زنده تسریع گردید و در مورد زمان نگهداری بیشترین کاهش در هفته آخر نگهداری بدست آمد، به طوری که میزان کاهش باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد پس از سه هفته نگهداری ۰/۷۹ سیکل لگاریتمی بود در حالی که در همین شرایط تعداد باکتری بیفیدو باکتریوم انیمالیس ۱/۳ سیکل کاهش نشان داد که حاکی از مقاومت بیشتر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به انیمالیس به شرایط اسیدی ماست در طول دوره نگهداری می باشد. در دمای ۴ درجه سانتی گراد تفاوتی در میانگین pH و اسیدیته بین نمونه های مختلف بسته بندی مشاهده نشد ولی در دمای ۱۵ °C بین تمامی نمونه های بسته بندی، تفاوت معنی داری وجود داشت. به طوری که بیشترین کاهش در میزان pH و بیشترین افزایش اسیدیته مربوط به بسته بندی پوشش حاوی ۱/۵ گرم نانورس در انتهای دوره نگهداری بود.

کلید واژگان: اسانس خوشاریزه، پروبیوتیک، سدیم کازئینات، ماست قالبی، نانورس

\* مسئول مکاتبات: Haleyeshab@gmail.com

## ۱- مقدمه

ماست یکی از فرآورده‌های تخمیری لبنی پرمصرف است که از تخمیر لاکتیکی شیر به وسیله‌ی باکتری‌های لاکتو باسیلوس دلبروکی زیر گونه‌ی بولگاریکوس و استروپتوکوکوس ترموفیلوس تهیه می‌شود. از مهم‌ترین عوامل افزایش مقبولیت ماست، طعم و مزه خاص این محصول، هضم راحت‌تر آن نسبت به شیر و قابلیت نگهداری برای مدت‌زمان طولانی نسبت به شیر می‌باشد [۲۱]. ماست در ایران از نظر ساختاری و فرایند تولید به صورت‌های ماست قالبی، ماست همزده، ماست آشامیدنی، ماست منجمد و ماست تغلیظ شده تقسیم بندی می‌شود. ماست قالبی یکی از انواع رایج ماست در کشور می‌باشد که گرمخانه‌گذاری و خنک کردن پس از بسته‌بندی در داخل ظروف بسته‌بندی انجام می‌گیرد و در اصطلاح ماست قابلیت قاشق خوری دارد [۴ و ۳].

در بین فرآورده‌های شیری تخمیری، ماست یکی از مهمترین حامل باکتریهای پروبیوتیک و عامل انتقال آن به مصرف کننده می‌باشد [۵ و ۶]. پروبیوتیک‌ها به‌عنوان میکروب‌های زنده‌ی مکمل‌های غذایی هستند که به‌وسیله بهبود تعادل میکروبی روده در حیوانات میزبان، باعث ایجاد اثرات سودمندی برای میزبان می‌گردد [۷]. پروبیوتیک‌ها اگر به تعداد  $10^6$  cfu/g به بدن وارد شوند، میتوانند به بهبود هضم لاکتوز [۸]، بهبود جذب کلسیم، سنتز ویتامین‌ها و پروتئین‌ها [۹]، تحریک و ارتقاء سیستم ایمنی بدن، کاهش سطح کلسترول سرم خون [۱۰]، کاهش تظاهرات آلرژیک [۱۱]، جلوگیری از انواع سرطان، بویژه سرطان روده بزرگ [۱۲]، بهبود تعادل میکروبی روده، جلوگیری از رشد و فعالیت میکروبهای بیماریزا و افزایش ارزش تغذیه‌ای [۱۱] کمک کنند.

امروزه عموماً از مواد پلاستیکی جهت بسته‌بندی استفاده می‌شود که غیرقابل تجزیه و بازیافت مجدد هستند. اما استفاده از مواد پلیمری خوراکی و قابل تجزیه زیستی این مشکل را تا حدودی برطرف کرده و می‌تواند جایگزین مواد پلاستیکی شود. پلیمرهای خوراکی (بسته‌بندی‌های خوراکی) می‌توانند حاوی مواد مغذی (مانند ویتامین‌ها)، آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها باشند و به این طریق خواص نگهداری و عملکردی آن‌ها را افزایش می‌دهند و از این راه مانع از ایجاد خواص نامطلوب مانند اکسیداسیون و فعالیت باکتری‌ها

میشوند. از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی تهیه شده از پروتئین‌های شیر خصوصیات کارکردی و کاربردهای بالقوه‌ای شناخته شده است. انتقال رطوبت، نفوذ اکسیژن، از دست دادن یا جذب آروما یا روغن نمونه‌هایی از مشکلاتی است که ماده غذایی میتواند در حین نگهداری یا بسته بندی با آنها مواجه شود. با استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌ها تا حدی میتوان این مشکلات را بهبود بخشید و موجب بهبود پایداری، بافت، طعم و آرومای ماده غذایی گردید [۵ و ۶].

دما و رطوبت نسبی هوا میتواند بر نفوذ پذیری گاز در ماده بسته بندی اثر گذار باشد و در نتیجه بر زنده مانگی باکتریهای اثر بگذارد. بیشترین محصولات لبنی در بسته بندی های پلاستیکی با قابلیت نفوذ اکسیژن بالا آماده و به فروش می‌رسند که این عامل سبب مشکلات جدی در رشد و بقای پروبیوتیکها میگردد. استفاده از فیلمهای پلاستیکی با خاصیت بازدارندگی اکسیژن بالا و بسته بندی های هوشمند جاذب اکسیژن در حال تحقیق میباشد. اثر بسته بندی های مختلف (شیشه‌ای، پلاستیکی و کوزه سفالی) بر زنده‌مانی باکتری‌های موجود در فرآورده تخمیری شیر بوفالو توسط جایان و آدام گزارش گردید. نتایج نشان داد که بهترین زنده مانگی به ترتیب متعلق به ظروف شیشه ای، بسته بندی پلاستیکی در نهایت کوزه های سفالی در دمای نگهداری  $29^{\circ}\text{C}$  می باشد [۱۳]. در تحقیقی بقایای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در طی ۳۵ روز در یک نمونه ماست در بسته بندی شیشه ای در مقایسه با ماست بسته بندی در ظروف پلاستیکی انجام شد. محتوای اکسیژن در ماست در بسته بندی پلاستیک به علت نفوذ پذیری بسته بندی بسیار افزایش داشت اما ماست در ظروف شیشه دارای سطح اکسیژن بسیار پایین بود. با وجود مؤثر بودن بسته بندی شیشه ای، استفاده از ظرف شیشه ای هم به علت وزن بالا و قابلیت کاربرد ضعیف، قیمت بالا و مشکلات حمل و نقل قانع کننده نیست [۱۴]. در پژوهشی که ناودون و فیسوت به مقایسه‌ی استفاده از فیلم‌های پلی لاکتیک اسید و پلی پروپیلن به عنوان بسته بندی ماست پرداخته اند گزارش کردند که استفاده از پلی لاکتیک اسید اثر مثبتی بر روی زنده مانگی باکتری های پروبیوتیک دارد و هم از لحاظ زیست محیطی و سلامتی بسته بندی های حاوی پلی پروپیلن بهتر از بسته بندی های حاوی پلی پروپیلن هستند [۱۵]. اثر مواد بسته بندی بر زنده مانگی پروبیوتیک‌ها می‌تواند وابسته به دمای نگهداری باشد به

بیفیدویاکتریوم انیمالیس زیر گونه بیفیدیوم به صورت خشک شده انجمادی و از نوع DVS از نمایندگی شرکت CHR.HANSEN دانمارک تهیه گردید. کنسانتره پروتئین شیر از شرکت Westland آمریکا، شیرخشک از شرکت پالود ایران، پودر آب پنیر از آذر سهند تیهو، کازئینات سدیم از شرکت لبن پودر مشهد و نانورس از شرکت سیگما ایران تهیه گردید. کیت آنتی بیوتیک bile از شرکت سیگما و محیط کشت های MRS agar، TOS agar و آنتی بیوتیک Mopirusin از نمایندگی شرکت مرک آلمان و محیط کشت PDA(Potato Dextrose Agar) از شرکت میرمدیا-ایتالیا خریداری گردید. اسانس خوشاریزه نیز از گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تهیه شد. ظروف پلاستیکی درب دار از جنس پلی اتیلن نیز از شرکت تک ظرف ایران خریداری شد.

این صورت که دمای انبارمانی پایین می تواند واکنش های بیوشیمیایی پروبیوتیک ها را به حداقل برساند [۱۶]. با توجه به اهمیت حفظ جمعیت باکتری های پروبیوتیک و توجه به مسائل زیست محیطی در محصول نهایی، هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر نوع بسته بندی، دما و زمان نگهداری بر قابلیت زیستی باکتری های پروبیوتیک بود.

## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- مواد اولیه مورد استفاده

شیر پاستوریزه مورد استفاده برای تولید ماست از شرکت شیر پگاه ارومیه تهیه شد (جدول ۱). سویه های میکروبی مورد استفاده شامل باکتری های استارتر ماست با مشخصه ABY-10 حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و

**Table 1** Properties of raw milk and standardized milk used in this study

milk Properties	Raw milk	standardized milk
Acidity (D°)	14.5±0.2	16±0.27
Solid Nonfat dry matter (%)	8.4±0.11	10.8±0.14
Fat (%)	3.4±0.08	1.5±0.007
pH	6.78±0.15	6.65±0.18
Antibiotic test	Negative	Negative

اضافه شدند. پس از اضافه شدن استارترهای ماست و پروبیوتیک همزن مخزن به مدت ۲۰ دقیقه کار کرده و سپس خاموش شد. شیر ماست ها در ظروف پلی اتیلنی به وزن ۷۰ گرم ریخته شده و با فیلم نانوکامپوزیت تهیه شده درب بندی شد و به گرمخانه با دمای ۴۳±۱°C منتقل شد. پس از اینکه pH ماست ها به ۴/۶ کاهش یافت، سریعاً به سردخانه ۴°C منتقل و در آن جا نگهداری شد.

### ۲-۲-۱- تهیه فیلم نانوکامپوزیت

۵۰ میلی لیتر از محلول سدیم کازئینات به آرامی به ۵۰ میلی لیتر محلول نانورس اضافه گردید و به مدت یک ساعت هم زده شد. سپس گلیسرول به میزان ۵۰٪ وزنی- وزنی سدیم کازئینات و توئین ۸۰ به میزان ۲ میلی لیتر به محلول فوق اضافه و به مدت نیم ساعت همزده شد. محلول نهایی به میزان ۱۰۰ سی سی به روی پلیت ریخته شد و در دمای ۲۵°C به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. سپس فیلم ها در دسیکاتور در دمای ۲۵°C نگهداری شدند تا برای انجام آنالیزها آماده گردند.

### ۲-۲- تهیه ماست پروبیوتیک

شیر خام دریافتی در محل کارخانه پس از انجام آزمایش های لازم، دریافت شده و مورد استفاده قرار گرفت. درصد چربی شیر با استفاده از روش ژربر اندازه گیری شد. ماده خشک شیر نیز با استفاده از دستگاه رطوبت سنج کرن اندازه گیری شد. همچنین شیر از لحاظ وجود آنتی بیوتیک نیز با استفاده از کیت های آماده بررسی شده و مورد تأیید قرار گرفت. سپس جهت تولید ماست، به شیر اولیه ۱٪ شیر خشک، ۰/۷٪ پودر کنسانتره پروتئین شیر و ۰/۷٪ پودر آب پنیر اضافه شد. سپس مدت ۴۰ دقیقه به شیر استراحت داده شد تا شرایط واقعی تولید ایجاد گردد. شیر استاندارد شده به دستگاه هموژنایزر منتقل و با فشار ۱۸۰ بار هموژن و به مخزن پروسس منتقل شد. در دمای ۸۵°C به مدت نیم ساعت حرارت دیده سپس دمای شیر تا ۳۷°C کاهش یافته و در همان مخزن جهت تولید ماست پروبیوتیک استارتر کالچر ماست و باکتری های پروبیوتیک به طور همزمان با رعایت اصول بهداشتی به مقدار ۰/۵ درصد

## ۲-۳-۲- آزمایشات

## ۲-۳-۲-۱- تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها

به منظور تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها از طریق قدرت ختشی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH از روش Siripatrawan و همکاران (2009) استفاده شد. میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 ساخت آمریکا در طول موج 517 nm ثبت شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها به صورت درصد بازدارندگی DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید [17].

رابطه‌ی (۳-۱)

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = \frac{[Abs]_{\text{control}} - [Abs]_{\text{film extract}}}{[Abs]_{\text{control}}} \times 100$$

$Abs_{\text{DPPH}}$ : میزان جذب نمونه شاهد

$Abs_{\text{film extract}}$ : میزان جذب نمونه حاوی اسانس

## ۲-۳-۲-۲- اندازه‌گیری ضخامت فیلم‌ها

برای تعیین ضخامت فیلم‌ها از میکرومتر با دقت 0.01 mm استفاده شد. اندازه‌گیری در 5 نقطه‌ی مختلف فیلم انجام گرفت و سپس میانگین آن‌ها محاسبه شد [18].

## ۲-۳-۲-۳- آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM

بررسی ریز ساختار فیلم‌های تولیدی به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی Tescan Vegan-3 موجود در دانشگاه علمی محقق اردبیل انجام پذیرفت. به منظور بررسی تاثیر نانورس بر روی ریزساختارهای فیلم تولید شده، تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح فیلم‌ها تهیه گردید. ابتدا فیلم‌ها به کمک چسب نقره بر روی پایه آلومینیومی چسبانده شدند. پایه‌ها در یک دستگاه پوشش دهنده/پاشنده تا نقطه بحرانی خشک شده و به مدت پنج دقیقه با طلا پوشش داده شدند. تصویربرداری از نمونه‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی با کاربری 20 کیلووات و در بزرگ‌نمایی 6 μm انجام پذیرفت [19].

## ۲-۳-۲-۴- ارزیابی اثر ضد میکروبی فیلم

به منظور اندازه‌گیری اثر ضد میکروبی فیلم‌ها از روش انتشار آگار استفاده شد. با استفاده از یک قالب، نمونه‌های فیلم به دیسک‌هایی به قطر 2 میلی‌متر تبدیل شدند قبل از قرار دادن دیسک‌ها روی سطح محیط کشت، عمل کشت سطحی با استفاده از 100 میکرولیتر محیط کشت مایع محتوای

تقریباً  $10^8$  SPOR/ML از قارچ اسپرژیلوس نیجر صورت گرفت. دیسک‌ها در شرایط کاملاً استریل بر روی محیط کشت PDA قرار گرفتند و در ادامه به مدت 24 ساعت در دمای 37°C نگهداری شدند. اختلاف هاله قطره‌های تشکیل شده از قطر دیسک‌ها به عنوان شاخص فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها در نظر گرفته شد مواردی که هاله‌ی تشکیل نشده بود یعنی فعالیت ضد میکروبی وجود نداشت [20].

## ۲-۳-۲-۵- نفوذپذیری نسبت به بخار آب (WVP)

اندازه‌گیری انتقال بخار آب طبق روش ASTM E96-92 استفاده شده در تحقیق Casariego و همکاران (2009) صورت گرفت. برای این کار از فالكون‌هایی مخصوص با قطر 2 cm استفاده شد. 10 میلی‌لیتر آب مقطر داخل فالكون‌ها ریخته شد. قطعه‌ای از فیلم بریده شده روی درپوش فالكون قرار گرفته و درب و یال بسته شد. سپس فالكون‌ها توزین شده و درون دسیکاتور حاوی سلیکاژل در دمای 20°C، صفر RH=% با فشار بخار آب صفر پاسکال قرار گرفتند. به مدت 10 ساعت هر 2 ساعت یک بار وزن فالكون‌ها اندازه‌گیری شد. مقدار بخار آب انتقال یافته از فیلم‌ها از روی کاهش وزن فالكون تعیین شد. منحنی کاهش وزن فالكون با گذشت زمان رسم شد و پس از محاسبه‌ی رگرسیون خطی، شیب خط حاصل محاسبه گردید. از تقسیم شیب خط کاهش وزن مربوط به هر یال به سطح فیلم که در معرض انتقال بخار آب قرار داشت، آهنگ انتقال بخار آب WVTR و نفوذپذیری به بخار آب WVP طبق روابط زیر محاسبه گردید

رابطه‌ی (۳-۲)

$$WVTR = \frac{\text{slope}}{A}$$

رابطه‌ی (۳-۳)

$$WVP = \frac{(WVTR \times L)}{\Delta P}$$

## ۲-۳-۲-۶- آزمون‌های فیزیکی شیمیایی

اندازه‌گیری pH نمونه‌های ماست با استفاده از pH متر (Metrohm) در دمای 25°C انجام شد [21]. اندازه‌گیری اسیدیته بر مبنای تیتراسیون، 10 میلی‌لیتر شیر با هیدروکسید سدیم 0.1 نرمال و در حضور فنل فتالین تا حصول رنگ ارغوانی انجام گرفت. داده‌ها بر اساس درجه دورنیک بیان گردید.

## ۲-۳-۷- شمارش باکتری های پروبیوتیک

شمارش و شناسایی گونه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک در دوره‌های زمانی تعیین شده انجام شد. بدین منظور در بازه‌های زمانی ۷ روزه (۱، ۷، ۱۴، ۲۱) از هر یک از ماست‌ها در ۳ تکرار کشت‌های میکروبی انجام گرفت. جهت کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از محیط کشت MRS آگار به همراه (۱/۵g/L) بایل استفاده شد که به مدت ۷۲ ساعت در دمای °C ۳۷ و در شرایط هوازی انکوبه گردید. جهت کشت بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه‌ی لاکتیس از محیط TOS به همراه آنتی بیوتیک موپروسین استفاده گردید. شرایط انکوباسیون به صورت بی‌هوازی و در داخل جار بی‌هوازی به مدت ۷۲ ساعت در دمای °C ۳۷ انجام شد. تمامی کشت‌های فوق به صورت کشت مخلوط انجام گردید. جهت رقیق‌سازی نمونه‌های ماست نیز از آب پپتونه ی ۰/۱٪ استفاده گردید. لازم به ذکر است که محیط‌های کشت انتخاب شده بر اساس پیشنهاد شرکت کریستین هانسن بوده که بهترین نتیجه از کشت گرفته شود [۲۲].

## ۲-۳-۸- نفوذپذیری به اکسیژن

نفوذپذیری پوشش‌ها نسبت به اکسیژن، به صورت غیر مستقیم و توسط روش ارائه شده توسط Ou و همکاران (2005) در سه تکرار، انجام شد. نمونه‌های ماست در فنانکها ریخته شده و روی دهانه آنها به وسیله یک پوشش، پوشانده شد. سپس فنانکها برای مدت ۱۵ روز در شرایط آزمایشگاه (دمای °C ۲۰±۲ و دسیکاتوری با رطوبت نسبی ۷۵ درصد) نگهداری شدند. در پایان زمان مذکور، عدد پراکسید اندازه‌گیری و با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شدند:

رابطه‌ی (۳-۴)

$$PV = V \times N \times 100 / M$$

PV عدد، عدد پراکسیداز، V: حجم تیوسولفات مصرفی (ml)، N: نرمالیت تیوسولفات (Normal/lit) و M: وزن نمونه (g) میباشند.

## ۲-۳-۹- روش تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی نتایج از طرح آماری کاملا تصافی به روش فاکتوریل استفاده شد. اطلاعات با استفاده از نرم افزار آماری

SAS نسخه ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال آلفا برابر با ۰/۰۵ با همین نرم افزار انجام گرفت. متغیرهای فرآیند شامل نوع پوشش بسته بندی (کازوینات سدیم حاوی ۵۰۰ ppm اسانس خوشاریزه و ۱/۵ و ۰/۷۵ گرم نانو رس)، دمای نگهداری (°C ۴ و ۱۵) و زمان نگهداری (۱، ۷، ۱۴، ۲۱ روز) می باشد که در سه تکرار انجام شد. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم افزار Microsoft Excel 2010 استفاده شد.

## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی

اسانس خوشاریزه ویژگی آنتی‌اکسیدانی بالایی را از خود نشان داد. فیلم حاوی ۵۰۰ ppm، حدود ۷۸/۲۵٪ قدرت به دام اندازی رادیکال دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) را دارا می‌باشد که به عنوان معیاری برای بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. اساس این تست بر پایه احیاء و تغییر رنگ رادیکال DPPH به رنگ زرد در حضور مواد آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. نتایج این آزمون حاکی از افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت اسانس خوشاریزه در ماتریکس نانو کامپوزیت می‌باشد (P<0/05). نتایج تحقیقات دیگری نیز حاکی از افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی در اثر افزودن اسانس و عصاره گیاهی به ماتریکس پروتئینی فیلم‌ها می‌باشد [۱۶].

## ۳-۲- آزمون ضخامت فیلم‌ها

ضخامت فیلم‌ها برای آزمون نفوذپذیری به اکسیژن جز عوامل تاثیرگذار بر روی خواص فیزیکی نانوکامپوزیت می‌باشد. فیلم‌های به دست آمده ضخامتی در حدود ۰/۲۰ میلی متر داشته و به آسانی از سطح پلیت‌ها جدا شدند. هم‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، ضخامت فیلم‌ها در اثر افزودن نانورس و همچنین افزایش درصد آن در محلول فیلم افزایش یافت. برهمکنش درون مولکولی بین زنجیره‌های پروتئینی کازئینات سدیم- نانورس و اسانس باعث افزایش دانسیته‌ی فیلم شد و افزایش دانسیته منجر به افزایش ضخامت فیلم‌ها

شد [۱۷].

سطح فیلم شاهد مشاهده میشود و برجستگی‌هایی که در قسمت‌هایی از فیلم وجود دارد به احتمال زیاد، به دلیل وجود گرانولهای پروتئینی میباشد [۲۳]. تراکم مناسب فیلم شاهد به دلیل برقراری اتصالات محکم بین ترکیبات کازئینات سدیم آب دوست هنگام خشک شدن فیلم‌ها میباشد. با افزودن نانورس به شبکه پروتئینی سطح کامپوزیت ناصاف و زبرتر و تراکم آن‌ها کمتر می‌شود. همانگونه که در تصویر ۲-a مشاهده می‌گردد با افزایش نانورس حالت صافی شبکه از بین رفته و غیر یکنواختی بیشتری نسبت به فیلم شاهد مشاهده می‌شود، این غیر یکنواختی با افزایش نانورس به مقدار ۱/۵ گرم منجر به ایجاد صفحات سیلیکاتی بر روی فیلم می‌گردد. این صفحات سیلیکاتی با ایجاد مسیر ماریچ مانع از نفوذ اکسیژن و بخار آب می‌شوند. ترکها و حفره‌هایی که در نمونه فیلم‌های a و b مشاهده می‌شود ممکناست ناشی از کاهش نیرو بین سطحی ماتریکس و نانورس، عدم پخش یکنواخت در سطح شبکه و کاهش چسبندگی بین نانورس و شبکه پروتئینی باشد [۲۴].

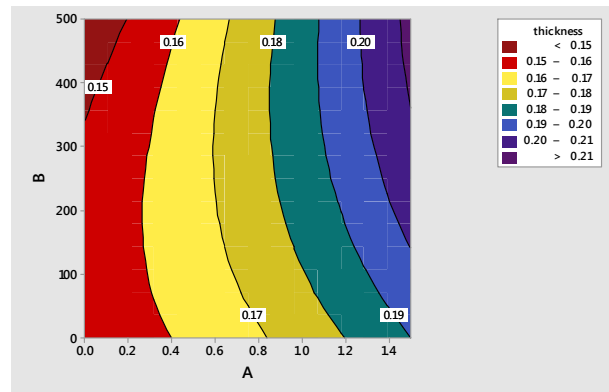


Fig 1 The simultaneous effect of nano-clay (A) and essential oil (B) on the film thickness

### ۳-۳- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

تصویر میکروسکوپی (SEM) گرفته شده از سطح فیلم شاهد (کازئینات سدیم خالص) و فیلم نانو کامپوزیتی حاوی ۱/۵ و ۰/۷۵ گرم نانورس در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که در تصویر نیز مشخص است سطح فیلم شاهد (C-۲) تقریباً صاف بوده و فاقد ترک و حفره میباشد. اندکی زبری که در

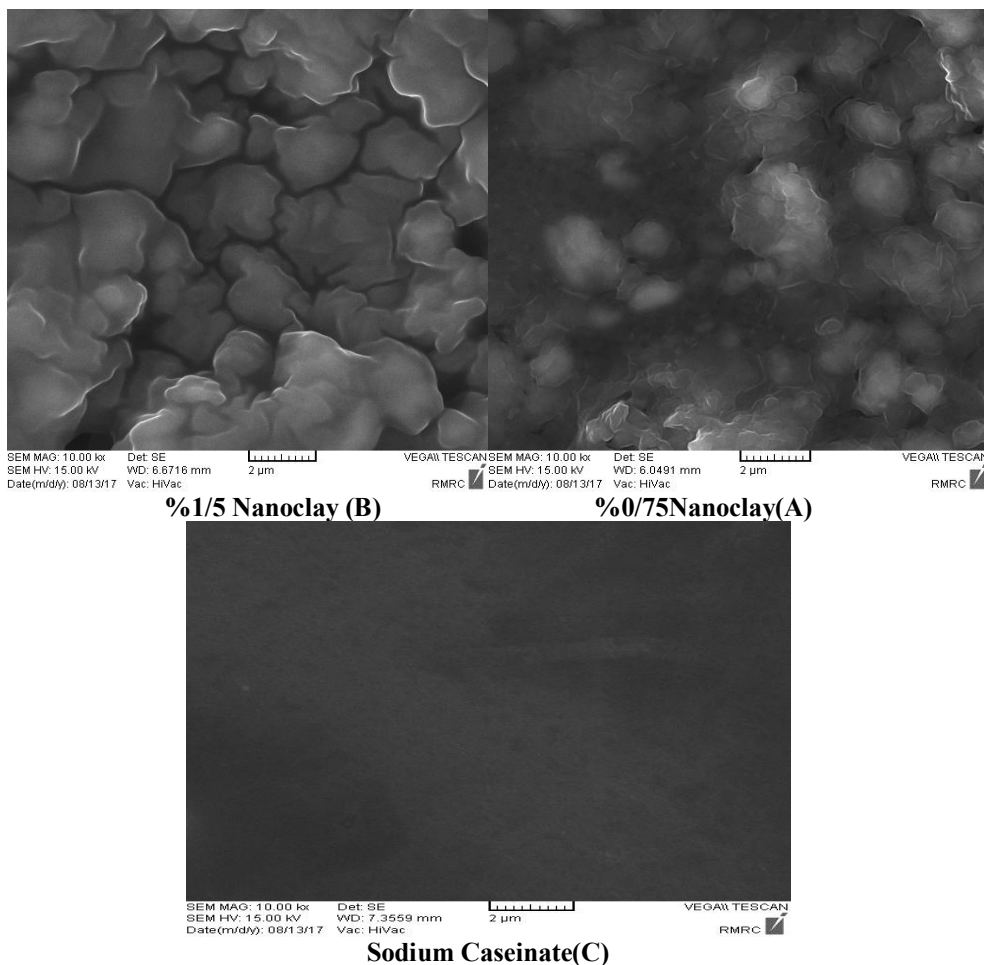


Fig 2 Related electron microscope image %0/75Nano-clay(A) , %1/5 Nan-oclay (B) and Sodium caseinate(C)

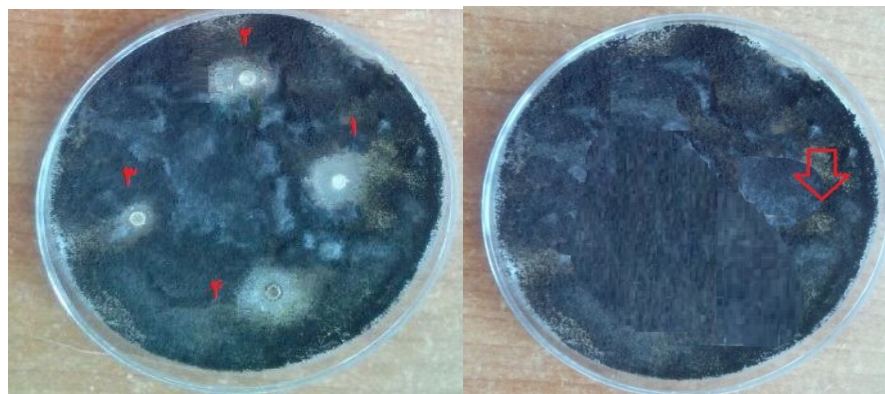
### ۳-۴- ارزیابی اثر ضد میکروبی فیلم

در جدول ۲ فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های تولید شده در برابر قارچ اسپرژیلوس نایجر مورد مطالعه نشان داده شده است. فیلم شاهد (کازئینات سدیم خالص)، اثر بازدارندگی بر روی قارچ اسپرژیلوس نشان نداد. افزودن اسانس خوش‌بوی منجر

به ایجاد نواحی شفاف بازدارندگی در اطراف فیلم‌ها شد. با افزایش غلظت اسانس، اثر ممانعت‌کنندگی فیلم‌ها در برابر قارچ اسپرژیلوس افزایش یافت. که علت این امر می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات فنولی موجود در اسانس خوش‌بوی منجر باشد [۲۵]. تصاویر مربوط به کشت میکروبی در شکل ۳ آورده شده است.

**Table 2** Antimicrobial activity of films produced against *Spergeus Naiger* fungi

Sample	Nano clay (%)	Essential oil (ppm)	Zone area (mm <sup>2</sup> )
Control Sample	0	0	0
1	0/75	500	14/94±0/02 <sup>a</sup>
2	0/75	250	12/20±0/02 <sup>b</sup>
3	0/75	150	10/83±0/04 <sup>c</sup>
4	0/75	100	7/03±0/02 <sup>d</sup>



**Fig 3** image of microbial culture

فیلم‌های نانو کامپوزیتی با افزایش غلظت نانو رس از صفر تا ۰/۷۵ گرم وزنی نانورس افزایش و پس از آن با افزایش غلظت نانورس به میزان ۱/۵ گرم وزنی، نفوذپذیری به بخار آب روند کاهشی پیدا کرد. در مجموع کمترین میزان نفوذپذیری در نانو کامپوزیت حاوی ۱/۵ گرم نانورس مشاهده شد. بهبود خصوصیت ممانعتی فیلم سدیم کازئینات به دلیل غیر مستقیم شدن مسیر عبور بخار آب توسط ذرات نانورس غیر قابل نفوذ و پراکنده شده در شبکه پروتئینی می‌باشد. این ذرات طول مسیر انتشار مولکولهای بخار آب را با پریچ و خم کردن مسیر عبور شان افزایش می‌دهند و از این رو سبب کاهش نفوذ پذیری به بخار آب فیلم‌ها میشوند [۱۶]. میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب در فیلم‌های نانو کامپوزیتی به نظر می‌رسد که به دلیل حضور نانورس با نسبت بالا بوده باشد که به طور

### ۳-۵- میزان نفوذپذیری فیلم‌ها در برابر بخار آب (WVP)

نفوذپذیری به بخار آب یک روش ساده برای اندازه‌گیری مقدار نفوذ و عبور رطوبت به داخل یک ماده است. انتقال بخار آب از فیلم‌ها به دو فاکتور حلالیت و نفوذپذیری مولکول‌های آب در ماتریکس فیلم بستگی دارد. WVP یکی از پارامترهای مهم فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر به شمار می‌رود. این پارامتر به منظور بررسی اثر ترکیبی نانورس و اسانس خوش‌بوی بر روی خواص ممانعتی فیلم کازئینات سدیم مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج ارائه شده نشان می‌دهد که میزان نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های نانو کامپوزیتی به طور معنی‌داری کمتر از فیلم شاهد می‌باشد (براساس شکل ۴). نفوذپذیری به بخار آب در

داشت که در دمای پایین باکتری‌ها کمتر در فاز رشد قرار دارند و به همین خاطر تاثیرات محیطی تاثیر کمتری بر روی آنها دارد ولی با افزایش دما و ورود باکتری‌ها به فاز رشد، نسبت به تغییرات محیطی نیز حساس تر می‌گردند [۲۷].

نتایج اثر دما و زمان نگهداری نشان داد که در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  تا دو هفته پس از نگهداری نمونه‌های ماست، میانگین تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس‌های زنده اختلاف معنی‌داری با روز اول نداشتند ( $p > 0.05$ ) و تنها در روز ۲۱ ام نگهداری تعداد این باکتری‌ها کاهش معنی‌داری یافت (جدول ۴). در حالیکه در دمای  $15^{\circ}\text{C}$  در تمامی روزهای نگهداری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد بدین صورت که با گذشت زمان نگهداری تعداد باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از مقدار  $8.41 \pm 0.09 \log \text{ cfu/ml}$  در روز اول تا  $0.79 \log \text{ cfu/ml}$  در روز ۲۱ ام کاهش یافت که معادل  $0.79 \log$  سیگل لگاریتمی کاهش در تعداد این باکتری می‌باشد. بنابراین همانطور که از نتایج پیداست با افزایش دمای نگهداری و گذشت زمان به طور همزمان روند کاهش تعداد باکتری‌های زنده تسریع یافت و در مورد زمان نگهداری بیشترین کاهش تعداد باکتری در هفته آخر نگهداری مشاهده گردید. در کل تعداد باکتری‌ها در تمامی موارد بالای  $10^7$  کلنی در میلی لیتر بود که مطابق با استاندارد محصولات پروبیوتیک می‌باشد. مرتضویان و همکاران (۲۰۰۶) به کاهش سریع لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست به هنگام نگهداری اشاره کرده و از آن به‌عنوان مرگ اسیدوفیلوس<sup>۲</sup> یاد کرده‌اند [۲۸]. دانکر و همکاران (۲۰۰۶) نیز کاهش بیش از یک سیکل لگاریتمی در تعداد این باکتری در طول نگهداری در سردخانه را گزارش کردند [۲۸ و ۱۴]. جیموند و همکاران (۲۰۰۴) اعلام کردند که در طی نگهداری ماست در سردخانه تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس معادل  $0.75$  الی  $1/85$  سیکل لگاریتمی کاهش یافته است [۱۳]. همچنین کرووز و همکاران (۲۰۱۳) بیان داشتند که تعداد این باکتری تا روز پانزدهم نگهداری در

یکنواختی در ماتریکس پلیمری پراکنده شده‌اند. میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب نانو کامپوزیت‌های پراکنشی کمتر از نانو کامپوزیت‌های ایترکالاتی می‌باشد. افزایش طول مسیر دیفیوژیون درون نانو کامپوزیت پراکنشی نسبت به کامپوزیت یکی دیگر از دلایل کاهش نفوذپذیری نسبت به بخار آب و افزایش خواص بازدارندگی فیلم به شمار می‌آید [۲۶].

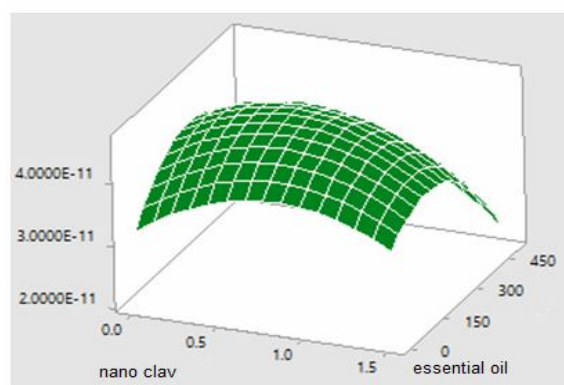


Fig 4 The simultaneous effect of nano clay and essential oil concentration on film on (WVP)

### ۳-۶- اثر نوع بسته بندی، دما و زمان نگهداری

#### بر زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

طبق نتایج آنالیز واریانس مشخص شد که در بین اثرات ساده و متقابل متغیرهای مورد بررسی تنها اثر ساده و متقابل دما و زمان نگهداری بر میزان زنده مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس معنی دار بود ( $p < 0.05$ ), در حالیکه اثر مستقل نوع پوشش بسته بندی و همچنین اثر متقابل آن با سایر متغیرها بر زنده مانی این باکتری معنی دار نبود ( $p > 0.05$ ). با توجه به اینکه قدرت رقابت باکتری‌های سنتی ماست نسبت به باکتری‌های پروبیوتیک در ماست بالاتر می‌باشد، با افزایش دما و افزایش فعالیت این باکتری‌ها، تاثیر منفی بر زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس افزایش می‌یابد. با افزایش دما و زمان نگهداری، pH کاهش و اسیدیته افزایش یافته که این تغییرات اثر بازدارنده‌ای بر رشد باکتری‌ها داشتند. باید توجه



سردخانه افزایش یافته و سپس کاهش می‌یابد [۳۰].

**Table 3** ANOVA of the process variables on the responses of probiotic yogurt

	Mean square	DF	Source
survival of <i>Bifidobacterium</i>	Acidity	pH	
2.30**	1.434**	256.05**	0.396**
0.55**	0.01 <sup>ns</sup>	1132.84**	0.212**
7.04**	2.00**	8103.32**	1.447**
0.001 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	53.79**	0.0003*
2.13**	0.88**	2372.7**	0.335**
0.08 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	172.3**	0.011**
0.006 <sup>ns</sup>	0.10 <sup>ns</sup>	19.39 <sup>ns</sup>	0.002 <sup>ns</sup>
0.020	2.17	86.0	0.02
			48
			Error

\*\* Significantly at level of  $p < 0.01$ ; \* Significantly at level of  $p < 0.05$ ; ns (not significant)**Table 4** mean comparison of interaction effect of temperature and storage time on the survival of *Lactobacillus acidophilus* (log cfu/ml)

21	14	7	1	Temperature/time
8.22±0.09 <sup>b</sup>	8.34±0.08 <sup>a</sup>	8.39±0.10 <sup>a</sup>	8.36±0.07 <sup>a</sup>	4 C°
7.62±0.21 <sup>d</sup>	7.99±0.10 <sup>c</sup>	8.21±0.10 <sup>b</sup>	8.41±0.09 <sup>a</sup>	15 C°

\*Non-similar alphabets in each column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

جدول شماره ۵ نشان داده شده می‌بیشترین شمارش باکتری در ظروف با پوشش حاوی و نانورس با غلظت ۱/۵ گرم به میزان  $\log \text{cfu/ml}$  ۷/۲۵ و کمترین تعداد در ظروف نمونه شاهد با میزان  $\log \text{cfu/ml}$  ۶/۹۵ بدست آمد. یکی از دلایل کاهش تعداد بیفیدی و باکتری‌ها اکسیژن محلول هست. به علت اینکه اکسیژن اثر سمی بر روی این باکتری دارد افزایش آن باعث تأثیر منفی بر زنده‌مانی این باکتری می‌گردد [۳۱].

### ۳-۷- اثر نوع بسته بندی، دما و زمان نگهداری

#### بر زنده ماننی بیفیدوباکتریوم انیمالیس

همانگونه که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود اثر ساده نوع بسته بندی، دما و زمان نگهداری روی زنده ماننی باکتری‌های بیفیدوباکتریوم انیمالیس تأثیر معنی دار ( $p < 0.05$ ) داشته است. در بین اثرات متقابل نیز تنها اثر متقابل دما و زمان نگهداری بر تغییرات این باکتری پروبیوتیک معنی دار بود. همان‌طور که در

**Table 5** mean comparison of interaction effect of temperature and storage time on the survival of *Bifidobacterium Animalis* (log cfu/ml)

21	14	7	1	Temperature/time
7.06±0.10 <sup>c</sup>	7.19±0.10 <sup>b</sup>	7.35±0.13 <sup>a</sup>	7.44±0.11 <sup>a</sup>	4 C°
6.14±0.09 <sup>c</sup>	6.86±0.13 <sup>d</sup>	7.16±0.2 <sup>bc</sup>	7.44±0.11 <sup>a</sup>	15 C°

\*Non-similar alphabets in each column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

اساس استاندارد ملی ایران pH دلمه‌ی ماست حداکثر باید ۴/۶ باشد و بیشتر از آن به‌عنوان ماست پذیرفته نمی‌شود. ثابت بودن pH در ابتدای گرمخانه‌گذاری و تأخیر در کاهش آن، می‌تواند به دلیل تنش وارد شده به باکتری‌ها و زمان لازم برای سازگاری آن‌ها با محیط باشد. ولی پس‌از آن به دلیل افزایش

### ۳-۸- اثر نوع بسته بندی، دما و زمان نگهداری

#### بر pH ماست

نتایج تغییرات pH نمونه‌های ماست طی گرمخانه‌گذاری تا رسیدن به pH برابر با ۴/۶، در شکل ۶ نشان داده شده است. بر

تعداد باکتری‌ها و افزایش تولید متابولیت‌های آن‌ها، pH به سرعت کاهش می‌یابد [۳۲].

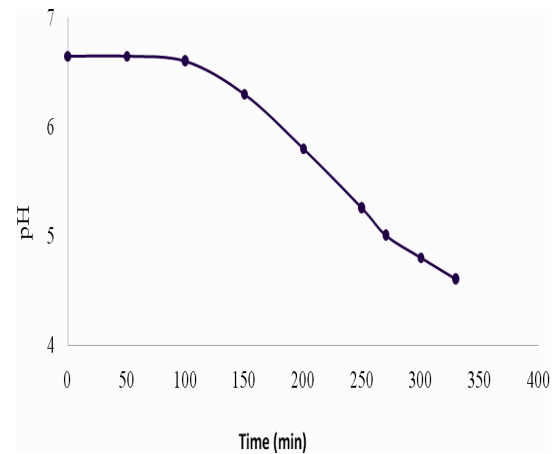


Fig 3 pH changes during incubation

نتایج آنالیز واریانس که در جدول شماره ۳ ارائه شده است نشان داد که اثر ساده متغیرهای نوع بسته بندی، دما و زمان نگهداری و همچنین اثرات متقابل دوتایی این متغیرها بر تغییرات pH نمونه های ماست تولیدی معنی دار بود ( $p < 0.05$ )، در حالی که اثر متقابل سه تایی این متغیرها بر pH ماست پروبیوتیک معنی دار نبود ( $p > 0.05$ ). همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  تفاوتی در میانگین pH بین بسته بندی‌ها مشاهده نمی‌گردد ولی در  $15^{\circ}\text{C}$  بین نمونه‌های بسته بندی تفاوت وجود دارد. همچنین میزان تغییرات pH در دو بسته بندی دیگر یکسان می‌باشد. همانگونه که مشخص می‌باشد با افزایش دما تغییرات pH شدیدتر می‌گردد.

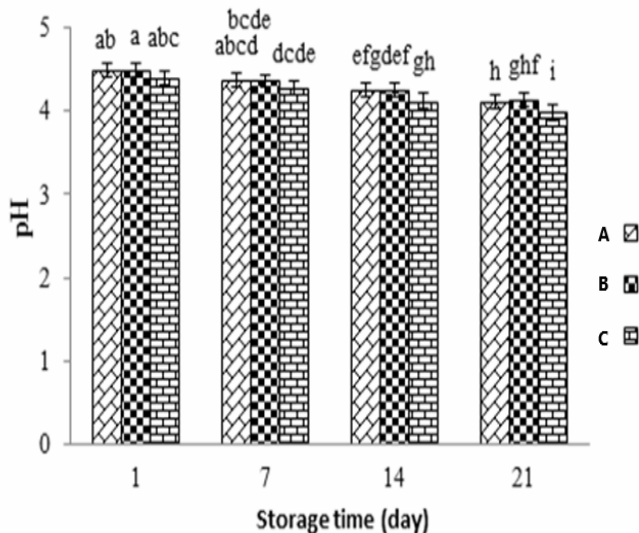


Fig 6 Mean comparisons of the packaging and storage time on yogurt pH  
A(Blank), B(%0/75 Nan-o clay), C(%1/5 Nano-clay)

در کل باتوجه به اینکه میزان pH در ماست‌ها در انتهای گرمخانه گذاری یکسان بود و همچنین میزان تغییرات حین سردخانه گذاری نیز به صورت یکسان کاهش یافته، می‌توان دلیل پایین بودن pH در نمونه پوشش ۱/۵٪ نانورس را به ضخیم بودن نوع بسته بندی و ماریپیچی شدن مسیر دیفوزیون عبور اکسیژن (باتوجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی) و تاثیر آن بر کاهش انتقال حرارت و متعاقباً افزایش زمان سرد شدن ماست مرتبط دانست که این موضوع زمان بیشتری برای رشد باکتری‌ها مهیا می‌کند [۳۰]. دماهای بالاتر باعث افزایش

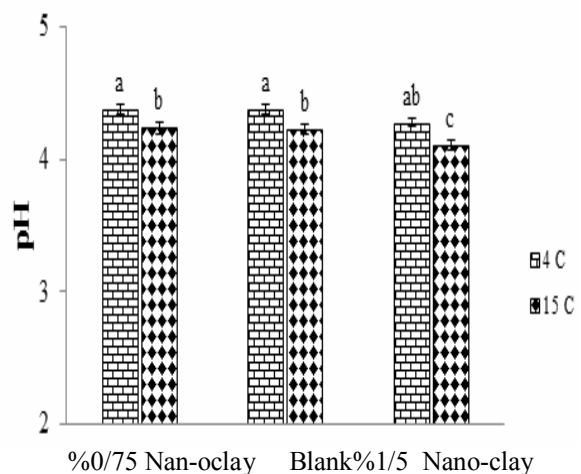


Fig 5 Interaction of packaging and storage temperature on yogurt pH

نگهداری °C ۴ و ۱۵، با گذشت زمان نگهداری میزان اسیدیته نمونه های ماست افزایش یافت بطوریکه بیشترین مقدار این پارامتر در روز ۲۱ ام نگهداری و بسته بندی پوشش ۱/۵ گرم نانورس نگهداری شده در دمای °C ۱۵ مشاهده گردید که برابر  $109.5 \pm 17.38$  درجه دورنیک بود.

همانگونه که گفته شد افزایش دما و زمان نگهداری باعث افزایش فعالیت باکتری ها می گردد که آن نیز به نوبه خود باعث افزایش تولید اسید لاکتیک و سایر اسیدها گردیده و سبب افزایش اسیدیته در ماست می گردد. افزایش اسیدیته در بسته بندی پوشش ۱/۵ نانورس احتمالاً به دلیل فعالیت بیشتر باکتری ها در این ظرف به دلیل زمان بیشتر برای فعالیت در شرایط دمایی مناسب و همچنین تا حدی غیر قابل نفوذ پذیر بودن بسته بندی نانو کامپوزیتی در برابر نفوذ اکسیژن می باشد.

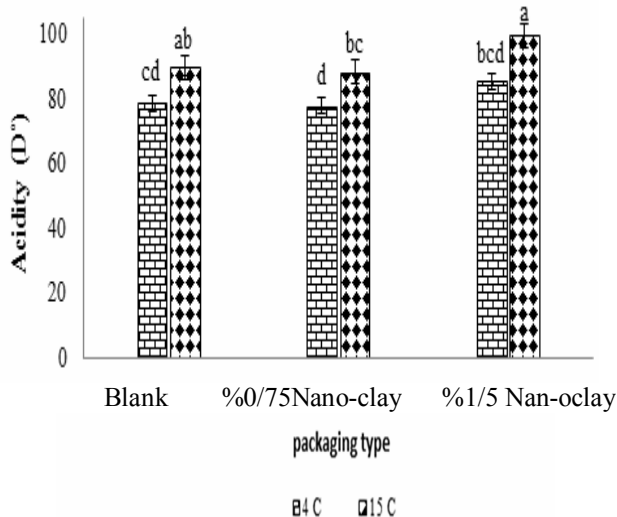


Fig 7 Interaction of packaging type and storage temperature on the yogurt acidity

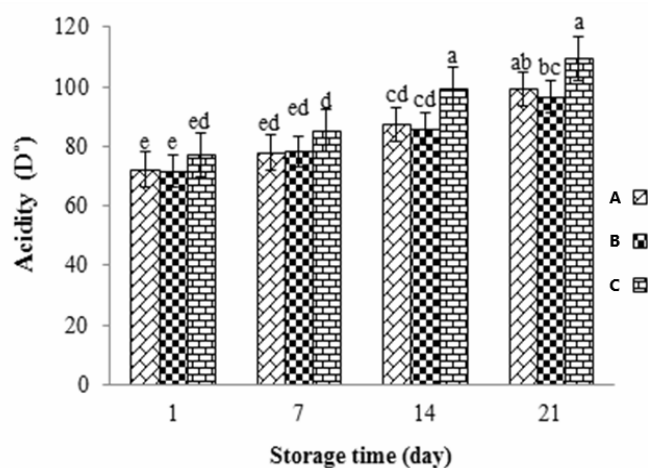


Fig 8 Mean comparisons of the packaging and storage time on the yogurt acidity

رشد و فعالیت باکتری ها می گردد، که این افزایش رشد هم در مورد باکتری های پروبیوتیک و هم در مورد باکتری معمولی ماست اتفاق می افتد. از طرفی گذشت زمان نیز فرصتی برای باکتری ها مهیا می سازد تا با شرایط محیطی سازگار شوند و شروع به فعالیت کنند. کارخانه های تولید ماست به دنبال بسته بندی هایی هستند که در طول بازه نگهداری کمترین تغییرات را در pH داشته باشد [۳۴].

### ۳-۹- اثر نوع بسته بندی، دما و زمان نگهداری

#### بر تغییرات اسیدیته ماست

نتایج آنالیز واریانس در جدول ۳ نشان می دهد که روی اسیدیته اثر ساده متغیرهای نوع بسته بندی، دما و زمان نگهداری و همچنین اثرات متقابل دوتایی این متغیرها بر تغییرات pH نمونه های ماست تولیدی معنی دار بود ( $p < 0.05$ ), در حالیکه اثر متقابل سه تایی این متغیرها بر pH ماست پروبیوتیک معنی دار نبود ( $p > 0.05$ ). نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد در دمای °C ۴ اختلاف معنی داری بین نوع پوشش بسته بندی های مختلف وجود نداشت در حالیکه در دمای °C ۱۵ پوشش ۱/۵ نانورس به طور معنی داری دارای اسیدیته بالاتری نسبت به دو پوشش دیگر (پوشش ۰/۷۵ نانورس و نمونه شاهد) بود ( $p < 0.05$ ). طبق نتایج مشخص شد بالاترین اسیدیته در بسته بندی پوشش ۱/۵ نانورس و دمای °C ۱۵ به میزان ۹۹/۸۷ درجه دورنیک بدست آمد، بدین صورت که پوشش ۱/۵ نانورس در هر دو دمای نگهداری اسیدیته بالاتری نسبت به بسته بندی های دیگر داشت که با نتایج تغییرات pH همخوانی دارد. کمترین میزان اسیدیته نیز مربوط به نمونه ای ماست قالبی در ظرف پلی اتیلن در دمای °C ۴ بود (شکل ۷).

نتایج اثر پوشش بسته بندی بر تغییرات اسیدیته ماست پروبیوتیک در طول ۲۱ روز نگهداری نیز در شکل ۸ آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود بطور کلی با گذشت زمان نگهداری بر میزان اسیدیته نمونه های ماست افزوده شد و در این بین نمونه های بسته بندی شده در ظروف بسته بندی پوشش ۱/۵ گرم نانورس با شیب بیشتری افزایش یافته است. طبق نتایج در روز تولید، میزان اسیدیته نمونه های موجود در بسته بندی پوشش ۱/۵ گرم نانورس با مقدار  $77 \pm 0.89$  درجه دورنیک بالاتر از میزان این پارامتر در ماست های بسته بندی در ظروف بسته بندی نمونه شاهد و بسته بندی با پوشش ۰/۷۵ گرم نانورس ( $p < 0.05$ ) در ادامه در هر دو دمای

ولی با ادامه افزایش زمان نگهداری در هر دو دمای نگهداری کاهش معنی داری مشاهده شد. با توجه به نتایج بدست آمده، یک روز نگهداری در دمای  $15^{\circ}\text{C}$  به اندازه ۷ روز نگهداری در دمای  $4^{\circ}\text{C}$ ، سبب کاهش زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک گردید. در بازه زمانی یکسان کاهش تعداد باکتری در دمای بالاتر بیشتر اتفاق افتاده است و در دماهای یکسان نیز با افزایش زمان نگهداری تعداد باکتری‌های زنده کاهش یافته است. همانگونه که مشخص می‌شود با تاثیر متقابل دما و زمان شدت کاهش باکتری‌ها افزایش یافته است.

بر اساس گزارش‌های قبلی وجود لاکتوباسیلوس بولگاریکوس باعث کاهش تعداد بیفیدوباکتریوم‌ها می‌شود که این به دلیل کاهش pH و همچنین تولید پراکسید هیدروژن توسط این باکتری است که بر روی زنده‌مانی بیفیدوباکتریوم تأثیر منفی دارد [۳۶].

در تحقیقاتی مشابه مودلر و همکاران (۱۹۹۰) گزارش کردند که بیفیدوها در ماست قدرت زنده‌مانی بسیار کمی دارند [۳۷]. دیو و شاه (۱۹۹۷) کاهش سریع در تعداد بیفیدوها را بعد از تولید ماست به وسیله‌ی استارترهای تجاری گزارش کردند. آن‌ها زنده‌مانی بیفیدو باکتریوم‌ها را در ماست گزارش کردند ولی در کل برای این باکتری‌ها کاهش تعداد در طول نگهداری را گزارش کردند [۱۴]. دانکور و همکاران (۲۰۰۶) نیز کاهش جزئی برای این باکتری‌ها در طول نگهداری را گزارش کردند [۲۹].

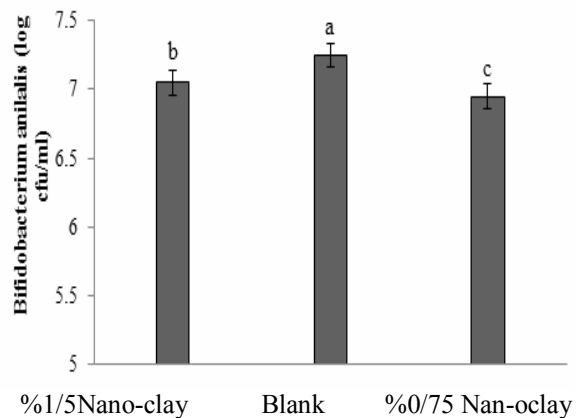
#### ۴- نتیجه گیری کلی

طبق نتایج بدست آمده با نگهداری نمونه‌های ماست در دمای  $4^{\circ}\text{C}$ ، تغییرات اندکی در میزان pH و اسیدیته نمونه‌های ماست در طول ۲۱ روز نگهداری صورت گرفت در حالی‌که این تغییرات در ماست‌های نگهداری شده در دمای  $15^{\circ}\text{C}$  به مراتب بیشتر بود. با افزایش دما و زمان نگهداری به طور همزمان روند کاهش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک بیشتر بود و در این بین سرعت کاهش بیفیدو باکتریوم انیمالیس نسبت به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشتر بود. بیشترین کاهش در میزان pH و بیشترین افزایش اسیدیته مربوط به بسته بندی پلی اتیلن بود. بهترین شرایط برای نگهداری ماست پروبیوتیک تولید شده در این تحقیق استفاده پلی اتیلن و پوشش حاوی ۱/۵ گرم نانورس برای تولید ماست و نگهداری آن در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  ولی

storage time on yogurt acidity  
A(Blank), B(%0/75 Nan-o clay), C(%1/5Nano-clay)

#### ۳-۱۰- بررسی نتایج نفوذ پذیری اکسیژن بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طول نگهداری

همانطور که در شکل ۹ مشاهده می‌شود، میزان نفوذپذیری ظروف بسته‌بندی پوشش ۱/۵٪ نانورس به اکسیژن  $\text{cm}^3 \text{m}^{-2} 24\text{h}^{-1}$  الی ۲۰۰۰، در ظروف بسته بندی پوشش ۰/۷۵٪ نانورس و در ظرف نمونه شاهد  $\text{cm}^3 \text{m}^{-2} 24\text{h}^{-1}$  ۴۵۰۰ تا ۶۰۰۰ بود. بنابراین با توجه به اینکه ظروف بسته بندی پوشش ۱/۵٪ نانورس در بین پوشش‌های مورد استفاده کمترین نفوذپذیری به اکسیژن را دارا می‌باشد و همچنین حساسیت بیفیدو باکتریوم به اکسیژن بیشتر از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس است، شاید بتوان این تاثیر را در مورد نوع پوشش بسته بندی در خور توجه قرار داد [۳۵ و ۳۰].



**Fig 9** The Independent Effect of Packing Containers on the survival of *Bifidobacterium Animalis* in Probiotic Yogurt

همان‌طور که در جدول شماره ۴ مشاهده می‌شود بدون در نظر گرفتن جنس پوشش ظروف بسته بندی، در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  پس از ۲۱ روز نگهداری نمونه‌های ماست، تعداد باکتری‌های بیفیدو باکتریوم انیمالیس کاهش یافت. این در حالی بود که با نگهداری نمونه‌ها در دمای  $15^{\circ}\text{C}$  میزان این کاهش به مراتب بیشتر بود بطوری‌که تعداد باکتری بیفیدو باکتریوم انیمالیس کاهش یافت که معادل ۱/۳ سیکل لگاریتمی می‌باشد. همانطور مشاهده می‌شود پس از ۷ روز نگهداری تغییر معنی داری در تعداد این باکتری در هر دو دمای  $4^{\circ}\text{C}$  و  $15^{\circ}\text{C}$  صورت نگرفت

2007. Probiotics – the friendly bacteria with market potential in global market. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 71-76.
- [11] Heenan, C. M., Adams, M. C., Hosken, R.W. & Fleet, G. H. 2004. Survival & sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *Lebensmittel Wissenschaft & Technology*, 37, 461-466.
- [12] Khurana, H.K. & Kanawjia, S.K. 2007. Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrition & Food Science*, 3, 91-108.
- [13] Jayamanne VS, Adams MR. 2004. Survival of probiotic bifidobacteria in buffalo curd and their effect on sensory properties. *International journal of food science & technology*. 39, 719-25.
- [14] Dave RI, Shah NP. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7, 31-41.
- [15] Nawdon, P., and Phisut, N. 2016. Influence of packaging material and storage time on physical, chemical and microbiological properties of set yogurt: a comparative study between modified biodegradable poly lactic acid and polypropylene. *Journal of Engineering Science and Technology*, 10, 1437 – 1449.
- [16] Senaka, C. R., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. 2013. Production of probiotic ice cream from goat's milk and effect of packaging materials on product quality. *Small Ruminant Research*, 112, 174–180.
- [17] Abdollahi, M., Alboofetileh, M., Behrooz, R., Rezaei, M., Miraki, R. 2013. Plasticizers for zein: their effect on tensile properties and water absorption of zein films. *Cereal Chemistry*, 81, 1-5.
- [18] Rhim, J. W., Lee, S. B., and Hong, S. I. 2011. Preparation and characterization of agar/clay nanocomposite films: the effect of clay type. *Journal of Food Science* 76, N40-N48.
- [19] Casariego, A., Souza, B., Cerqueira, M., Teixeira, J., Cruz, L., Diaz, R., and Vicente, 2009. Chitosan/clay films properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles concentrations. *Food Hydrocolloids*, 23, 1895-1902.
- [20] Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., German, J. B., Ghanati, K. and Khaksar, R. 2015. از آنجا که ظروف حاوی پوشش بیونانوکامپوزیتی کازئینات سدیم-نانورس بر خلاف ظروف سنتزی و پلی اتیلنی کاملاً تجزیه پذیر بوده و توانایی بازگشت به چرخه طبیعت را دارند پیشنهاد می شود برای حفظ محیط زیست از ظروف حاوی پوشش بیونانو کامپوزیتی استفاده شود.

## ۵- منابع

- [1] Modler, H. W., McKellar, R. C., Yaguchi, M. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors, *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 23, 29–41.
- [2] Cueva, O., & Aryana, K. J. 2008. Quality attributes of a heart healthy yogurt. *LWT*, 41, 537-544.
- [3] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2008 - yogurt - properties and Methods of Test, No. Food Science and Technology, 19, 203-210.
- [4] Kraskoop W, Bhandari B and Deeth HC, 2004. Survival of probiotic encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yogurt from UHT – and conventionally treated milk during storage. *Food Science and Technology* 39: 177-183.
- [5] Sanz, Y. 2007. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of Bifidobacterium, A way of selecting improved probiotic strains, *International Dairy Journal*, 17, 1284-1289.
- [6] Rasic, J. L., & Kurmann, J. A. 1983. Bifidobacteria and their role, *Basel Birkhauser*, 12, 13, 21, 42–50, 102–133, 144–158.
- [7] Huisin't Veld, J. H. J., & a Havenaar, R. 1991. are probiotics and other functional foods the medicines. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 51, 562–567.
- [8] Shahidi, F. & Mendosa, A. F. 2008. A perception to survival of Bifidobacterium spp. in bioyoghurt, simulated gastric juice & bile solution. *World Applied Sciences Journal*, 3, (1), 40-44.
- [9] Rasdhari, M., Parekh, T., Dave, N., Patel, V. & Subhash, R. 2008. Evaluation of various physico-chemical properties of Hibiscus safdariffa & L. casei incorporated probiotic yogurt. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11, 2101-2108.
- [10] Khan, S. H. & Ansari, F. A.

- yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 8-11.
- [29] Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage, *International Dairy Journal*, 16, 1181–1189.
- [30] Cruz, A. G., Castro, W. F., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A., Celeghini, R. M. S., Raices, R. S. L., Oliveira, C. A. F., Freitas, M. Q., Conte Júnior, C. A., & Mársico, E. T. 2013. Stability of probiotic yogurt added with glucose oxidase in plastic materials with different permeability oxygen rates during the refrigerated storage, *Food Research International*, 51, 723–728.
- [31] Korbekandi H, Mortazavian A, Irvani S. 2011. Technology and stability of probiotic in fermented milks. *Probiotic and Prebiotic Foods :Technology, Stability and Benefits to the Human Health* New York: Nova Science Publishers Ltd, 13, 160-169.
- [32] Donkor ON, Nilmini SLI, Stolic P, Vasiljevic T and Shah NP, 2007. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yogurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17, 657–665.
- [33] Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. 1999. *Yoghurt, science and technology*. Cambridge, Woodhead Publishers Ltd.
- [34] Hsiao HC, Lian WC, Chou CC. 2004. Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated bifidobacteria during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 134-9.
- [35] Da Cruz AG, de AF Faria J, Van Dender AG. 2007. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, 40, 951-6.
- [36] Rybka, S., Fleet, G. 1997. Populations of *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* species, Australian yoghurts, *Food Austr*, 49, 471–475.
- [37] Kumar, P., & Mishra, H. N. 2004. Storage stability of mango soy fortified yoghurt powder in two different packaging materials: HDPP and ALP, *Journal of Food Engineering*, 65, 569–576.
- Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 606-613.
- [21] AOAC. 2002. Official methods of analysis of the AOAC, 15th, ed. (Ed. S. Williams). Arlington, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- [22] Kailasapathy K, 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *Food Science and Technology*, 39, 1221-1227.
- [23] Kowalczyk, D., Baraniak, B. 2011. Effect of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. *Journal of applied polym science* 99, 170-176.
- [24] Pereda, M., Amica, G., Racez, I., Marcovich, N.E. 2011. Structure and properties of nanocomposite films based on sodium caseinate and nanocellulose fibers. *J. Food Eng.*, 103, 76-83.
- [25] Atef, M., Rezaei, M., and Behrooz, R. 2015. Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil, *Food Hydrocolloids*, 45:150-157.
- [26] Rhim, J. W. and Kirn. Y. T. 2014. Chapter 17 – Biopolymer-Based Composite Packaging Materials with Nanoparticles. In “Innovations in Food Packaging (Second Edition)” (I. H. Han, ed.). Academic Press. San Diego. 413-442.
- [27] Taheri, P., Ehsani, M. R., Khosravi Darani, K. 2009. Effect of *Lactobacillus acidophilus* La-5 probiotic bacteria on microbiological characteristics, sensory properties and stability of probiotic dough during storage. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 3, 15-24.
- [28] Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Reinheimer, J. A., Emamdjomeh, Z., Sohrabvandi, S., & Rezaei, K. 2006. Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of the probiotic micro - organisms in freshly made

## Study Feasibility usage of Film Based Sodium Caseinate-Nanoclay and *Echinophora Platyloba* Essential Oil using in packaging of probiotic yogurt

AshrafiYorghnanlu, R.<sup>1</sup>, Hemmati, H.<sup>2\*</sup>

1. Department of food science & technology, West Azarbayjan branch, Technica& Vocational university(TVU), Urmia, Iran

2. Department of food science & technology, Afagh higher education Institute, Urmia, Iran

(Received: 2018/04/24 Accepted:2019/03/02)

Due to the high consumption of yogurt, this product is suitable for transferring probiotic bacteria to humans. The survival of a sufficient number of these bacteria during storage until the consumption time is the basic limitation for the proper effect of these bacteria on the body. In this study the caseinate sodium film containing nanoclay and *Echinophora Platyloba* essential oil was used in order to possibility of using biodegradable packaging as well as its effect on the viability of probiotic bacteria to cover the contents of yogurt. The samples were stored at 4 and 15 ° C for 21 days. The effect of packing material on the survival of *Lactobacillus acidophilus* was not significant, while on the growth of *Bifidobacterium* was significant. The highest number of bacteria was observed in the coating containing 1.5 grams of nanoclay and the lowest number of containers containing 0.75 grams of nanoclay. By increasing storage temperature and time, simultaneously, the process of decreasing the number of live bacteria was accelerated. The reduction of *Lactobacillus acidophilus* bacteria at 15 ° C after three weeks of storage / 0 was a logarithmic cycle, while in the same situation, the number of *Bifidobacterium* analysis bacteria decreased by 1.3 times, indicating a higher resistance of *Lactobacillus acidophilus* to acidic conditions of yogurt during the storage time. At 4 ° C, there was no difference in mean pH and acidity between different packaging samples, but there was a significant difference between all packaging samples at 15 ° C. The highest decrease in pH and maximum acidity was due to the packing of 1.5 g of nanoclay in the end of the storage time

**Key word:** *Echinophora platyloba* essential oil, Probiotic, Sodium casheinate, Set yogurt, Nanoclay

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: Haleyeshab@gmail.com