علمی پژوهشی

بررسی اثرات فیلم بسته‌بندی ضدمیکروبی بر پایه پلی‌اتیلن سبک حاوی میکروکپسول‌های نایسین و لیمونن برروی زمان ماندگاری پنیر پروسس

نیر مداح[۱]، تکتم مستقیم[۲*]، اسماعیل حریریان[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه علوم‌وصنایع‌غذایی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- گروه داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸ /۰۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۲۳)

چکیده

هدف از این تحقیق استفاده از خصوصیات فیلم ضدمیکروبی پلی‌اتیلنی تهیه‌شده حاوی میکروکپسول‌های نایسین و لیمونن در بسته‌بندی پنیرپروسس بود. در این تحقیق میکروکپسول‌های دارای نایسین(۰/۵IU/mg، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵) و لیمونن (۵، ۷، ۱۰، ۱٤، ۲۱ و ۲۸ میکرولیتر بر میلی‌گرم) با روش ژلاسیون تهیه شدند. پس از بهینه‌سازی ، میکروکپسول‌های نایسین و لیمونن در فرمولاسیون فیلم بر پایه پوشش پلی‌اتیلنی استفاده شدند. پس از بسته‌بندی پنیرپروسس در این فیلم که حاوی میکروکپسول‌های اپتیمم شده حاوی غلظت‌های (۱، ۱/۵ و ۲ میکرولیتر بر میلی‌گرم نایسین و ۵، ۷ و ۱۰ میکرولیتر بر میلی‌گرم لیمونن)، جمعیت میکروبی کل، کپک و مخمر، استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت، اشرشیاکلی در روز های اول تولید، بیستم، چهلم و شصتم نگهداری بررسی شدند.

نتایج آزمایش با روش آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد آنالیز شدند. در طی شصت روز نگهداری میزان شاخص‌های میکروبی کل، کپک و مخمر، استافیلوکوکوس‌کواگولازمثبت و اشرشیاکلی با کاهش معنی‌داری مواجه بود($p\leq0.05$).

نتایج نشان داد که تیمار فیلم بسته‌بندی حاوی نایسین با غلظت IU/mg ۲ و لیمونن با غلظت ۱۰ میکرولیتر بر میلی‌گرم در طی دوره نگهداری منجر به حفظ کیفیت بالاتری در تیمارهای پنیر پروسس گردید و به عنوان تیمار بهینه انتخاب شدند.

کلید واژگان: پنیرپروسس، نایسین، لیمونن، فیلم بسته‌بندی ضدمیکروبی.

* مسئول مکاتبات: Toktammostaghim@yahoo.com

۱- مقدمه

هر روز اثرات زیان‌آور نگهدارنده‌های شیمیایی از جمله عوارض سرطانزایی و خواص تراتوژنیک و نیز باقیمانده‌های سمی آنها بر سلامت انسان به اثبات می‌رسد و تقاضا برای مصرف موادغذایی که عمر ماندگاری آنها به‌صورت طبیعی افزایش یافته، بیشتر می‌شود. لذا محققین مواد غذایی درصدد جایگزینی آنها با نمونه‌های طبیعی شده‌اند. در این تحقیق نیز به بررسی انواع نگهدارنده‌های شیمیایی در موادغذایی و روش شناسایی آنها پرداخته و چگونگی جایگزینی آنها با نگهدارنده‌های طبیعی ذکر شده است. در نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت نگهدارنده‌های طبیعی به دلیل داشتن خواص ضدمیکروبی مناسب می‌توانند به طورکامل باسطح موردنیاز نگهدارنده‌های شیمیایی جایگزین شوند و به مراتب اثرات مخرب آنها را به حداقل ممکن برسانند [۱].

با توجه به مطالب فوق‌الذکر و با تکیه بر یافته‌های جدید، روش‌های جدید به سمت استفاده از نگهدارنده‌های بیولوژیکی پیش می‌رود. در نگهداری بیولوژیکی، طول مدت نگهداری و ایمنی محصول با استفاده از میکروفلورطبیعی یا کنترل‌شده‌ای نظیر باکتری‌های‌لاکتیکی و مواد ضدباکتریایی آنها که طیف وسیعی از ترکیبات مانند اسیدهای‌آلی، پراکسیدهیدروژن و باکتریوسین‌ها را شامل می‌شود ، افزایش می‌یابد [۲].

باکتری‌های لاکتیکی به عنوان یک نگهدارنده طبیعی و یک عامل تخمیرقرن‌هاست که در موادغذایی استفاده می‌شوند، زیرا بطور قابل ملاحظه‌ای در ارزش غذایی محصولات غذایی مؤثرند و بدلیل برخی از متابولیت‌هایشان نقش مهمی را در صنعت غذا دارا هستند. از طرفی آنها درایجاد بافت و طعم محصول نیز شرکت می‌کنند. امروزه استفاده از این باکتری‌ها جهت افزایش طول‌عمر نگهداری موادغذایی بسیار رایج شده است. علاوه براین برخی از گونه‌های آنها پروبیوتیک می‌باشند. بسیاری از مطالعات، مفید بودن باکتری‌های لاکتیکی را به عنوان پروبیوتیک برای انسان نشان می‌دهند. یکی از شرایط پایه‌ای برای قراردادن یک باکتری لاکتیکی در گروه پروبیوتیک‌ها، داشتن فعالیت آنتاگونیستی علیه پاتوژن‌هاست که درکنار یکسری فاکتورهای دیگر حائز اهمیت می‌باشد [۳].

گنجور و همکاران (۱۳۸۵) اثر استفاده از باکتری *Streptococcus lactis*(نژاد مولد نایسین) بر مهار فساد گازی در پنیرسفیدایرانی را بررسی نمودند. آزمایشات نشان‌دادند که باکتری‌های اسپورزا از عوامل مهم تولید گاز در پنیر سفید ایرانی بودند. انجام آزمایشات متعدد نشان داد که به کارگیری بیش از ۲ درصد از آغازگری که حاوی باکتری استرپتوکوکوس لاکتیس (نژاد نایسین زا) بود نه تنها سبب مهار فسادگازی در پنیرهای بسته‌بندی شد بلکه شمارش تعداد اسپور در پنیرهایی که دارای غلظت‌های بیشتری از آغازگر مذکور بودند به طور معنی‌داری ($p<0.001$) باهم تفاوت داشت به طوری‌که تعداد اسپور در پنیرهایی که غلظت آغازگر آن‌ها بیشتر بود به میزان قابل‌ملاحظه‌ای کمتر از پنیرهای فاقد آغازگر بود. آزمایش ارگانولپتیکی نشان داد که پنیرهایی دارای بهترین طعم بودند که غلظت آغازگر آن‌ها بین ۱ الی ۲/۵ درصد بوده است.

قهرمانی‌فر و همکاران (۱۳۸۹) عوامل مؤثر بر ماندگاری ریزکپسول‌های حاصل از ریزپوشانی لیمونن توسط پروتئین آب‌پنیر تغلیظ شده را بررسی نمودند. در این تحقیق، تأثیر غلظت ماده دیواره، زمان همگن‌سازی امولسیون های تازه وخصوصیات امولسیون‌های بازسازی شده بر ماندگاری ریزکپسول‌های حاصل از ریزپوشانی، مورد بررسی قرار گرفت . بدین منظور سوسپانسیون‌های کلوئیدی با غلظت‌های ۱۵ ،۱۰ و ۲۰ درصد پروتئین آب‌پنیر تغلیظ‌شده به عنوان ماده دیواره و لیمونن به عنوان هسته در آب (امولسیون روغن در آب) تهیه گردید. سپس با کمک هموژنایزر و در زمان‌های همگن سازی ۳ ، ٦ و ۹ دقیقه، سوسپانسیون‌های کلوئیدی تبدیل به امولسیون گردیدند. این امولسیون‌ها با استفاده از فرآیند خشک‌کردن پاششی ریزپوشانی گردیده و ویژگی‌های آنها نظیر اندازه ذرات، مورد بررسی قرار گرفت. سپس به منظور بررسی پایداری و ثبات دیواره‌ها و تعیین سرعت رهایش لیمونن، ریز کپسول‌های تهیه شده به مدت ٦ هفته در دمای اتاق نگه‌داری شدند. نتایج نشان داد با افزایش غلظت ماده دیواره و زمان هموژنیزاسیون امولسیون‌های تازه، سرعت رهایش لیمونن کاهش می‌یابد. همچنین بررسی امولسیون‌های بازسازی شده نیز نشان داد سرعت رهایش لیمونن با افزایش اندازه ذرات امولسیون‌ها کاهش می‌یابد [٤].

Zohri و همکاران (۲۰۱۱) اثرات نانوذرات نایسین را درمیزان ماندگاری شیرخام و شیر پاستوریزه موردبررسی قرار دادند. در این بررسی نانوذرات نایسین در مقادیر ۱۰۰ میکرولیتر با

نانوذرات کیتوزان/ آلژینات حاوی نایسین بر علیه استافیلوکوکوس‌اورئوس ATCC 19117[1] استفاده شدند. میزان زنده‌مانی استافیلوکوکوس‌اورئوس در بازه زمانی صفر، ٦، ١٠، ١٤، ١٨ و ٢٤ ساعت بررسی شد. نتایج نشان دادکه سایزکلی نانوذرات ٢٠٥ نانومتر بود و در مقایسه با نایسین به فرم آزاد به طورمؤثری موجب کاهش رشد استافیلوکوکوس اورئوس در طی مدت زمان نگهداری در شیرخام وپاستوریزه گردید[٥].

Collins و همکاران (٢٠١١) اثرات نایسین را بر روی موتان-های لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر کاتیج بررسی نمودند. نایسین در درصدهای IU/ml ٥٠، ١٠٠، ١٥٠، ٢٠٠، ٤٠٠ و ٥٠٠ مورد استفاده قرار گرفت. به مدت ٦٠ روز خصوصیات آنتی-اکسیدانی و میکروبی بررسی‌شد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت نایسین به طور مؤثری از رشد وتکثیر کلیه موتان‌های لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر کاتیج ممانعت می‌کند. همچنین اثرات نامطلوبی بر روی خواص حسی پنیر نیز ندارد [٦].

٢- ٢- مواد و روش‌ها

٢-١- مواد

پنیرسفید آب‌نمکی، پنیرUF، خامه مورد استفاده از شرکت پگاه گلپایگان ایران، نمک فسفاته از شرکت *Adita Brila* تایلند، فیلم *LDPE* از شرکت بسپار نانوبن ایران تهیه گردید.

٢-٢- روش‌ها

٢-٢-١ تهیه میکروکپسول‌ها

٢-٢-١-١ آماده‌سازی محلول نایسین

از پودر نایسین ٢/٥ درصد (Sigma 5764) استفاده شد. این ماده تا زمان استفاده بایستی در دمای٢ تا ^{o}c ٨ نگهداری گردد. ٥٠ میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل را با ٨٠ میکرولیتر اسیدکلریدریک ٠/٠٢ نرمال حل کرده و در ظرف درداری که از قبل استریل شده بود مخلوط شد (اسید به آب اضافه شد) . سپس ٥٠٠ میلی‌گرم پودر نایسین را در ٥٠ میلی‌لیتر اسید آماده شده به خوبی حل کرده (تمامی موارد در زیر هودبیولوژیکی انجام‌شد) بطوری‌که در ظرف استریل دیگری این محلول از فیلتر ٠/٢ میکرومتری عبور داده و با استفاده از رابطه موجود N1V1=N2V2 مقدار مورد نظر از آن را برداشته و به ظروف دردار افزوده و پس از پخش‌شدن آن در آب در فرمولاسیون میکروکپسول نایسین مورد استفاده قرار گرفت[٥].

٢-٢-٢-ساخت رقت‌های مختلف نایسین

برای این منظور از محیط کشت *BHI broth*[2] استفاده شد. ابتدا درون لوله‌ها به میزان‌های مختلف شامل٢/٥، ٣، ٣/٥، ٤، ٤/٥و ٤/٧٥ میلی‌لیتر از محیط کشت ریخته و محیط‌ها اتوکلاو شد. سپس یک استوک mg /mL ١٠ ساخته شد .بدین ترتیب که ٠/١gr نایسین را در cc ١٠ اسیدکلریدریک٠/٠٢ نرمال حل کرده و سپس به محیط‌های کشتی که ساخته شده اضافه شده و حجم نهایی به cc ٥ رسانیده شد، بدین ترتیب به ترتیب رقت‌های ٥، ٤، ٣، ٢، ١و ٠/٥ mg/ mL از نایسین وجود داشت[٥].

٢-٢-٣- تهیه ریزکپسول‌های نایسین

میکروکپسول‌های نایسین با استفاده از روش ژلاسیون یونی[3] تولید شد. برای این منظور محلول آلژینات‌سدیم و صمغ گوار با نسبت ١:١به همراه نایسین با مخلوط‌کردن پودرخشک آلژینات با ویسکوزیته بالاتر از ٢٠٠٠ سانتی‌پوآز محلول ٢ درصد صمغ گوار و حل‌کردن پلیمرها در آب‌مقطر به طور شبانه با استفاده از مگنت استیرر با حرارت ملایم ٣٠ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. محلول نایسین (٠/١ در ٠/٠٢ نرمال هیدروکلریک اسید) مطابق باجدول کدبندی تیمارهای تحقیق در محلول پلیمری ١٠ درصد اضافه شد. محلول یون‌های کلسیم٢٠ میکرولیتر در ١٠٠٠ دور با محلول پلیمری مخلوط شده و به صورت قطره قطره با فیلتر سر سرنگی اضافه شد. پس از آن به مدت یک‌ساعت هم‌خورده و بعد از سانتریفیوژ ٥٠٠٠ دور به مدت ١٠ دقیقه برای جداسازی میکروکپسول‌ها از پلیمر آزاد استفاده شد [٧].

٢-٢-٤- کدبندی میکروکپسول‌های نایسین

جدول ١ کدبندی میکروکپسول‌های نایسین را نشان می‌دهد.

Table 1 Coding of nisin microcapsules

Nisin concentration (IU/mg)	Coding of nisin microcapsules
0/25	N1
0/5	N2
1	N3
1/5	N4
2	N5
2/5	N6

1. *ATCC - American Type Culture Collection*

2. *Brain Heart Infusion Broth*

3. Ionotropic Gelification

۲-۲-۵- تهیه ریزکپسول‌های لیمونن

امولسیون روغن در آب حاوی ۵ درصد وزنی د-لیمونن در ۱۰۰ گرم ماده دیواره (پودر آب‌پنیر تغلیظ‌شده) و ۰/۱ درصد توئین ۸۰ بدین صورت تهیه گردید: ابتدا تمامی اجزاء با استفاده از یک همزن مغناطیسی به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط گردید. سپس امولسیون اولیه با استفاده از همگن‌ساز اولتراتوراکس مدل T25 (شرکت *IKA* ، ساخت آلمان) با سرعت ۲٤۰۰۰ دور در دقیقه و در زمان‌های ۳ ، ٦ و ۹ دقیقه در دمای اتاق هموژن گردید. برای تهیه ریزکپسول‌ها از یک خشک‌کن پاششی (ساخت سوئیس، شرکت *Buchi* ، مدل B -۲۹۰ ، *mini spray dryer*) استفاده گردید. شرایط خشک‌کردن عبارت بودند از : دمای هوای ورودی ۱۰ ±۱۸۰درجه سانتی‌گراد و دمای هوای خروجی۱۰ ±۹۰ درجه سانتی‌گراد و برای جلوگیری از جذب رطوبت، پودرهای تهیه شده بلافاصله به قوطی‌های پلاستیکی درب‌دار منتقل و تا انجام آزمایش‌های بعدی در داخل دسیکاتور نگهداری شد [٤].

۲-۲-٦- کدبندی میکروکپسول‌های لیمونن

جدول ۲ کدبندی میکروکپسول‌های لیمونن را نشان می‌دهد.

Table 2 Coding of limonene microcapsules

Concentration of limonene (µl/mg)	Coding of limonene microcapsules
5	L1
7	L2
10	L3
14	L4
21	L5
28	L6

۲-۲-۷- تهیه فیلم‌های ضدمیکروبی پلی‌اتیلن سبک پوشش‌داده با میکروکپسول‌های نایسین/ لیمونن

مطالعات قبلی نشان داد که وارد کردن نایسین به طور مستقیم به فیلم‌های پلاستیکی *LDPE* (Low- density polyethylene) غیرممکن است و بنابراین یک محلول ٤۰ میلی‌لیتر از میکروکپسول‌های تهیه شده (نایسین و لیمونن) در ٤۰ میلی‌لیتر از اتانول ۹۵ درصد تهیه شد تا زمانی‌که به طور کامل حل نشده ٤۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل اضافه شد. سپس ۱/۲میلی‌لیتر از گلیسرول اضافه شد تا حل‌کردن ادامه یافت تا زمانی که ترکیب هموژن بدست آمد. حباب‌های هوا با یک ماشین بسته‌بندی تحت خلاء *model ultra- vac 225* حذف شد و سپس یک فیلم پلاستیکی با دانسیته کم *LDPE* به پلیت‌های شیشه ای ۲۰ ×۲۰ سانتی‌متر بسته شد و محلول پوشش دهنده با استفاده ازکروماتوگرافی لایه نازک قالب‌دهی شد. فیلم‌های پوشش‌داده شده سپس در طی یک شبانه‌روز در معرض هوا قرار گرفته و خشک شد به این ترتیب فیلم به دست آمد [۸].

۲-۲-۸- تهیه پنیر پروسس و بسته بندی

برای تولید پنیر از پایلوت کارخانه کاله استفاده گردید. پنیرپاستوریزه رسیده در آب‌نمک، پنیرسفید تازه تولید شده با روش فراپالایش وخامه‌پاستوریزه با درصد چربی بالا (۷۰ درصد) از شرکت شیرپاستوریزه و فرآورده‌های لبنی پگاه گلپایگان تهیه شد. از نمک کرینو (*Adita Brila, Thailand*) به عنوان نمک امولسیون‌کننده فسفاته در فرمول پنیر پروسس استفاده شد. ابتدا مواد اولیه شامل ۸۲ درصد وزنی/وزنی پنیرسفیدتازه و رسیده، ۱۲ درصد وزنی/وزنی خامه، ۱/۰۹۰ وزنی/وزنی نمک امولسیون کننده و آب برای هر فرمولاسیون توزین شدند و توسط همزن پره‌ای(هایدولف، آلمان) با سرعت ۵۰۰ دوردردقیقه به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند. پس از آن ظرف محتوی مخلوط در حمام آب‌جوش (۹۸-۹۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد تا دمای مخلوط به ۵۰ درجه سانتی‌گراد برسد. پس از آن نمک امولسیون‌کننده اضافه شده و محتویات ظرف توسط همزن پره‌ای با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت یک دقیقه توسط همزن همزده شده و در مرحله دوم هموژنیزاسیون توسط همزن ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ٤ دقیقه هموژن شد و پس از تهیه و فرمولاسیون پنیرپروسس از فیلم بسته‌بندی تهیه‌شده در بالا برای بسته‌بندی ضدمیکروبی و نگهداری استفاده شد[۹].

۲-۳-آزمون‌های ماندگاری پنیرپروسس

۲-۳-۱-ارزیابی جمعیت میکروبی کل

ابتدا به منظور تهیه سوسپانسیونی همگن، ۲۵ گرم نمونه پنیرپروسس به همراه ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول سیترات‌سدیم ۱ درصد وزنی – حجمی ساخت شرکت سیگما، داخل بسته‌بندی‌های مخصوص استریل (*Interscience*) منتقل گردید و توسط دستگاه استومکر (*Circulator* 400) به مدت ۵ دقیقه بطور کامل هموژن و سپس فیلتر شد تا ذرات معلق آن حذف شد، به این ترتیب رقت‌های ۰/۱ ، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ به کمک آب پپتونه استریل تهیه شد سپس از لوله‌های حاوی رقت‌های تهیه‌شده به میزان ۱/۹ میلی‌لیتر به وسیله

سمپلر (کشت سطحی) روی سطح محیط کشت منتقل گردید. ارزیابی فلورمیکروبی در ٤ بازه زمانی صفر، ۲۰، ٤۰ و ٦۰ روز پس از تولید و در سه تکرار انجام شد[۱۰].

۲-۳-۲- شمارش میکروارگانیسم‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس‌های‌کواگولاز مثبت وکپک ومخمر

برای شمارش میکروارگانیسم‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت، کپک و مخمر کلیه آزمون‌ها مطابق با استاندارد ۲٤۰٦ انجام گردید. پس از کشت در محیط‌های کشت اختصاصی پرگنه‌های تشکیل‌شده توسط دستگاه پرگنه شمارش گردید [۱۰].

۲-۳-۳-ارزیابی حسی

ارزیابی حسی توسط ۱۰ ارزیاب تعلیم‌دیده مؤسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی کرج انجام شد. آزمون امتیازدهی به بافت، طعم ، عطر، بو و رنگ پنیر در قالب مقیاس هدونیک ۵ امتیازی (ازخیل بد : ۱، تا خیلی‌خوب :۵) انجام شد. نمونه‌های ۱۰۰ گرمی مدتی قبل از سردخانه خارج شده و پس از رسیدن به دمای محیط، در قطعات ۵۰ گرمی در اختیار داوران قرار گرفت و داوران نمونه‌ها را از نظر طعم ومزه، بافت، عطر و بو، رنگ، پذیرش‌کلی مورد ارزیابی قرار دادند [۱۱].

۲-۳-٤- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از آزمایشات شیمیایی و فیزیکی از نرم‌افزار Minitab 17.1 ;vers انجام شد. طرح مورد استفاده در این بررسی طرح کاملاً تصادفی متعادل بود. نتایج آزمایشات شیمیایی و فیزیکی با روش آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد آنالیز شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-نتایج آزمون‌های میکروبی پنیرپروسس

۳-۱-۱-نتایج ارزیابی جمعیت میکروبی کل

با توجه به نمودار ۱ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین میزان جمعیت‌میکروبی‌کل تیمارهای پنیرپروسس بر اساس نوع پوشش بسته‌بندی در مقایسه با نمونه شاهد C مورداستفاده وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). با افزایش میزان نایسین و لیمونن در فرمولاسیون میکروکپسول‌ها و همچنین در فرمولاسیون پوشش بسته‌بندی ضد میکروبی میزان شاخص جمعیت میکروبی‌کل به طور معنی‌داری کاهش یافت($p\leq$۰/۰۵). تیمار دارای پنیرپروسس دارای پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های لیمونن به میزان ۱۰ میکرولیتر در میلی‌گرم دارای میزان شاخص جمعیت میکروبی‌کل کمتری از میکروکپسول‌های دارای ۵ و۷ میکرولیتر در میلی‌گرم لیمونن می‌باشد. همچنین میزان شاخص جمعیت میکروبی‌کل در تیمار دارای ۲ میکرولیتر در میلی‌گرم پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های نایسین کمتر از تیمارهای N3 و N4 می‌باشد.

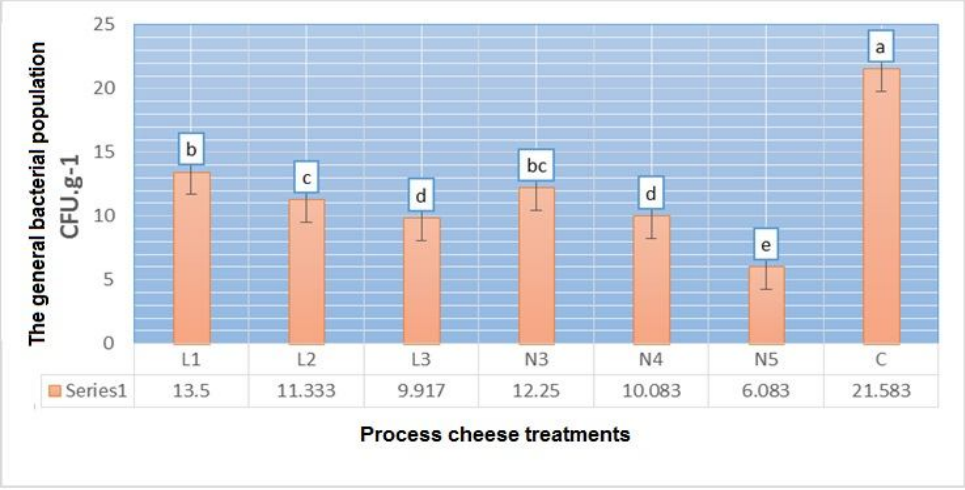

Fig 1 Comparison of mean bacterial population index of whole cheeses packaged with antimicrobial coating and control treatment at the significant level of 0.05

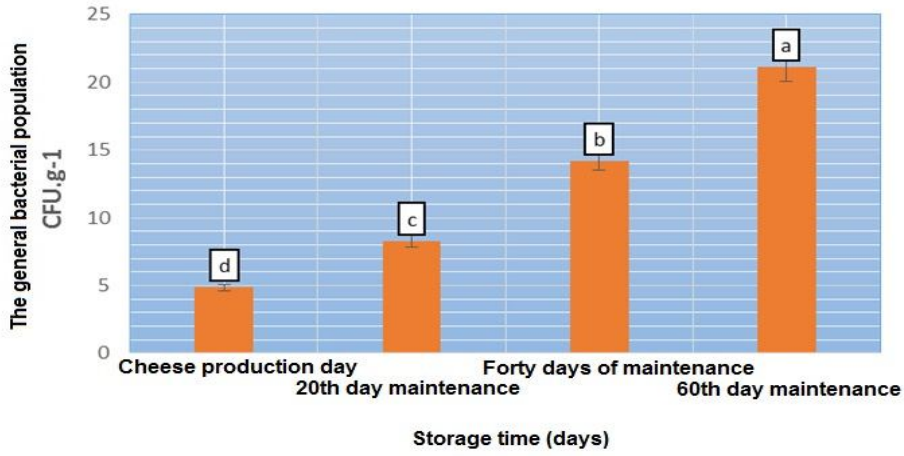

Fig 2 Comparison of mean microbial population index of whole processed cheese packed with antimicrobial coating and control treatment based on difference in storage time levels at the significant level of 0.05

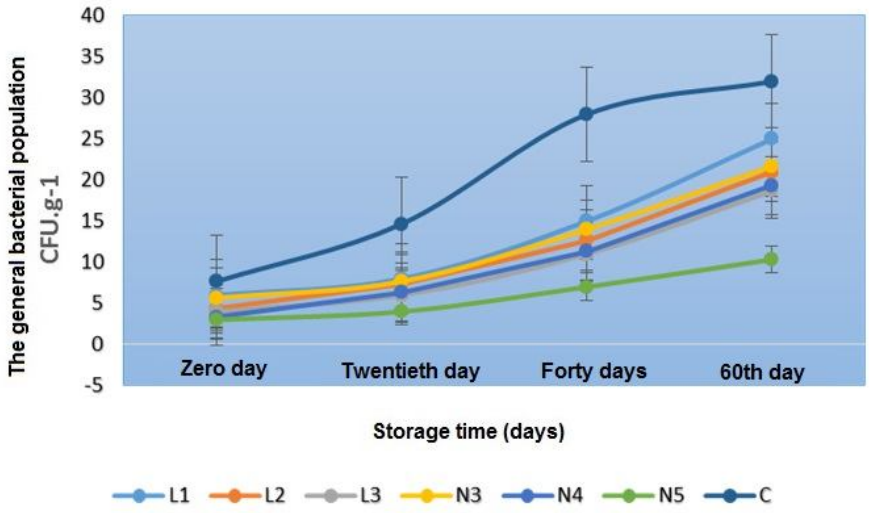

Fig 3 Comparison of mean microbial population index of whole processed cheeses packaged with antimicrobial coating and control treatment based on treatment interaction × storage time levels at significance level of 0.05

با توجه به نمودار ۲ مشاهده گردید که با افزایش مدت‌زمان نگهداری پنیرپروسس به مدت ٦٠ روز میزان شاخص جمعیت میکروبی کل تیمارهای پنیرپروسس با افزایش معنی‌داری مواجه بود ($p\leq$۰/۰۵). کمترین میزان جمعیت میکروبی‌کل در روز تولید و بالاترین آن در روز شصتم نگهداری مشاهده گردید روند افزایشی معنی‌داری در شاخص جمعیت میکروبی‌کل کلیه تیمارها تا روز شصتم نگهداری وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). میزان شاخص جمعیت میکروبی‌کل در طی زمان نگهداری در پوشش بسته‌بندی دارای میکروکپسول‌های نایسین با افزایش غلظت به ۲IU بر میلی‌گرم کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵).

با توجه به نمودار ۳ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین شاخص جمعیت میکروبی‌کل تیمارهای پنیرپروسس بر اساس پوشش بسته‌بندی مورد استفاده در طی شصت روز زمان نگهداری وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). با افزایش میزان نایسین و لیمونن در فرمولاسیون میکروکپسول‌ها و همچنین در فرمولاسیون پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی میزان شاخص جمعیت میکروبی‌کل در طی شصت روز نگهداری به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵). اما در طی دوره نگهداری تیمار دارای پنیرپروسس دارای پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های لیمونن به میزان ۱۰ میکرولیتر در میلی‌گرم دارای میزان شاخص جمعیت میکروبی‌کل کمتری از میکروکپسول‌های دارای ۵ میکرولیتر در میلی‌گرم لیمونن می‌باشد. در طی دوره نگهداری شصت روز شاخص جمعیت میکروبی‌کل در پوشش بسته بندی دارای میکروکپسول‌های نایسین با افزایش غلظت به ۲IU بر میلی‌گرم کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵).

۳-۱-۲- نتایج ارزیابی جمعیت اشرشیاکلی

تأثیر تیمار، زمان نگهداری و همچنین اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری بر روی میزان جمعیت اشرشیاکلی تیمارهای پنیرپروسس در مقایسه با تیمار شاهد c معنی‌دار بود (p≤۰/۰۵). با توجه به نمودار ٤ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین میزان جمعیت اشرشیاکلی تیمارهای پنیرپروسس بر اساس پوشش بسته‌بندی مورد استفاده وجود داشت (p≤۰/۰۵). با افزایش میزان نایسین و لیمونن در فرمولاسیون میکروکپسول‌ها و همچنین در فرمولاسیون پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی میزان جمعیت اشرشیاکلی به طور معنی‌داری کاهش یافت (p≤۰/۰۵). تیمار دارای پنیرپروسس دارای پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های لیمونن به میزان ۱۰ میکرولیتر در میلی‌گرم دارای میزان جمعیت اشرشیاکلی کمتری از میکروکپسول‌های دارای ۵و۷ میکرولیتر در میلی‌گرم لیمونن می‌باشد. همچنین میزان شاخص جمعیت میکروبی اشرشیاکلی در تیمار دارای ۲ واحد بین‌المللی در میلی‌گرم پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های نایسین N5 کمتر از تیمارهای N3 و N4 می‌باشد با توجه به نمودار ۵ مشاهده شد که با افزایش مدت زمان نگهداری پنیر پروسس به مدت ٦۰ روز میزان شاخص جمعیت اشرشیاکلی تیمارهای پنیرپروسس به طور معنی‌داری افزایش یافت (p≤۰/۰۵). کمترین میزان جمعیت اشرشیاکلی در روز تولید و بالاترین آن در روز شصتم نگهداری مشاهده گردید (p≤۰/۰۵). روند افزایشی معنی‌داری در جمعیت اشرشیاکلی کلیه تیمارها تا روز شصتم نگهداری وجود داشت (p≤۰/۰۵).

با توجه به نمودار ٦ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین جمعیت اشرشیاکلی تیمارهای پنیرپروسس بر اساس پوشش بسته‌بندی مورد استفاده در طی شصت روز زمان نگهداری وجود داشت (p≤۰/۰۵). با افزایش میزان نایسین و لیمونن در فرمولاسیون میکروکپسول‌ها و همچنین در فرمولاسیون پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی میزان شاخص جمعیت اشرشیاکلی در طی شصت روز نگهداری به طور معنی‌داری کاهش یافت (p≤۰/۰۵). اما در طی دوره نگهداری تیمار دارای پنیرپروسس دارای پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های لیمونن به میزان ۱۰ میکرولیتر در میلی‌گرم دارای میزان جمعیت اشرشیاکلی کمتری از میکروکپسول‌های دارای ۵ و۷ میکرولیتر در میلی‌گرم لیمونن می‌باشد. همچنین میزان جمعیت اشرشیاکلی در تیمار دارای ۲ واحد بین‌المللی در میلی‌گرم پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های نایسین کمتر از تیمارهای N3 و N4 می‌باشد.

در طی دوره نگهداری شصت روز شاخص جمعیت اشرشیاکلی در پوشش بسته‌بندی دارای میکروکپسول‌های نایسین با افزایش غلظت به ۲IU بر میلی‌گرم کاهش یافت (p≤۰/۰۵).

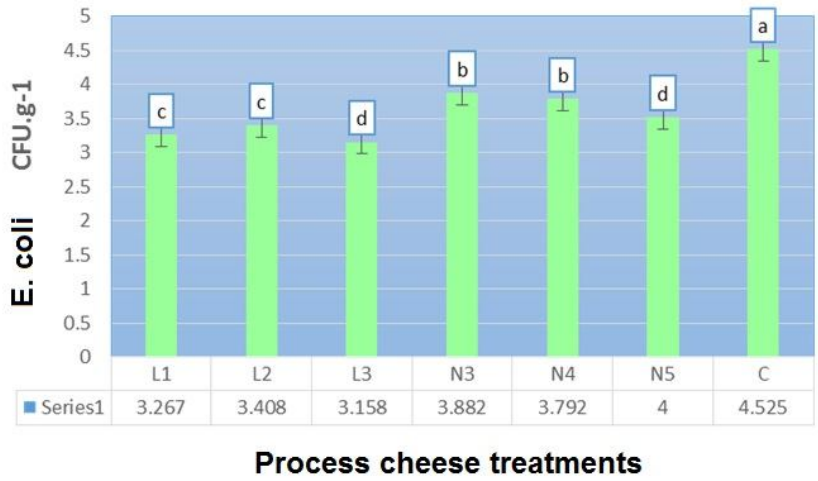

Fig 4 Comparison of Escherichia coli Mean Protein Cheese Packed with Antimicrobial Coating and Control at Significance Level 0.05

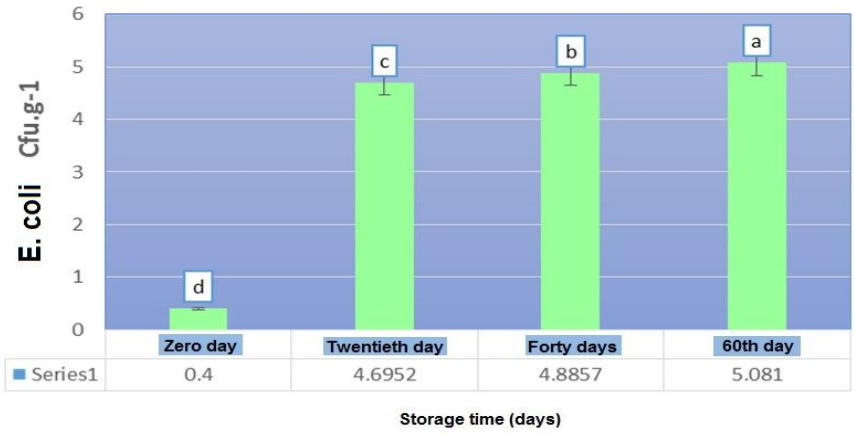

Fig 5 Comparison of Average Population Index of Escherichia coli Processed Cheese Treatments with Antimicrobial Coating and Control Treatment Based on Difference in Storage Time Levels at Significance Level 0.05

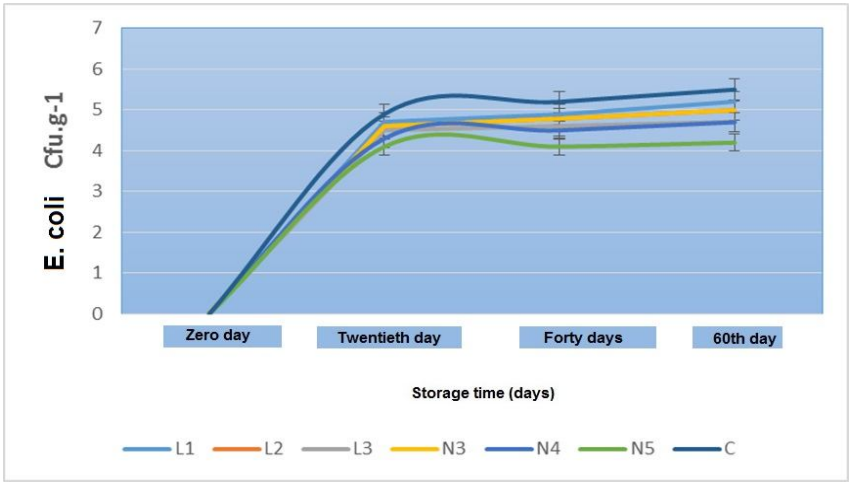

Fig 6 Comparison of Average Population Index of Escherichia coli with Antimicrobial Packaged Cheeseproof Treatments and Control Treatment Based on Treatment Interaction Effects* Storage Time Levels at Significance Level 0.05.

۳-۱-۳- نتایج ارزیابی جمعیت استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت

تأثیر تیمار، زمان نگهداری و همچنین اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری برروی میزان جمعیت استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت تیمارهای پنیرپروسس در مقایسه با تیمار شاهد c معنی‌دار بود ($p\leq$۰/۰۵).

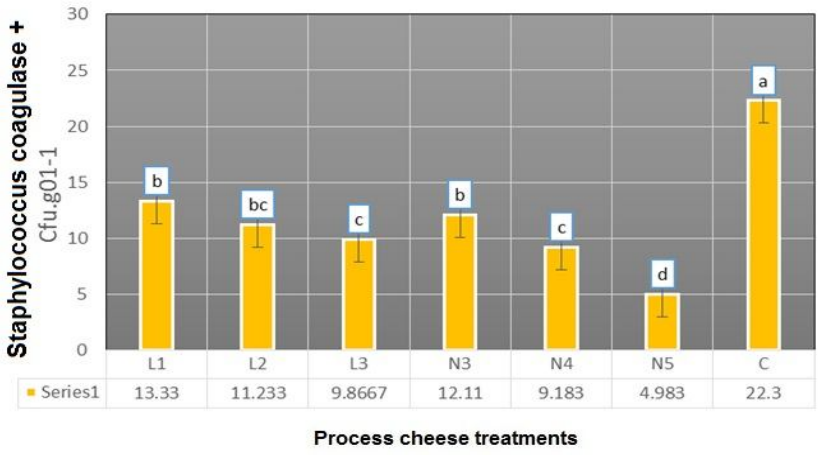

Fig 7 Comparison of Mean Staphylococcus Coagulase Positive in Antimicrobial Packaged CheeseProcesses and Control Treatments at Significance Level 0.05

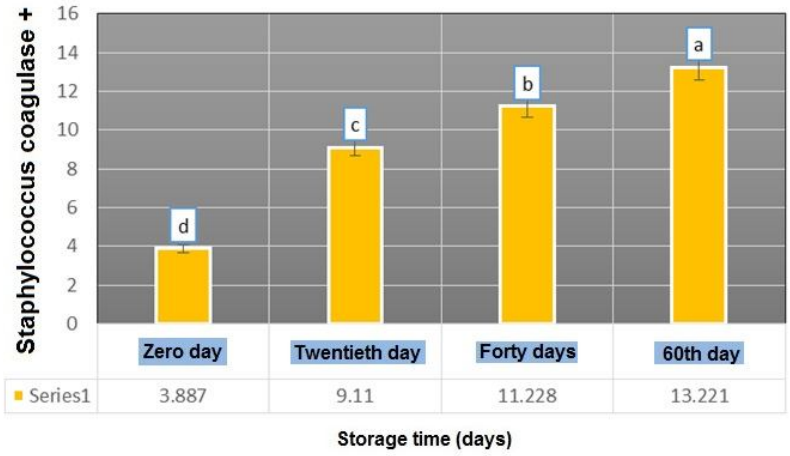

Fig 8 Comparison of Mean Population Index of Staphylococcus coagulase-Positive Antimicrobial-Packaged CheesePressures and Control Treatments Based on Difference in Storage Time Levels at Significance Level 0.05

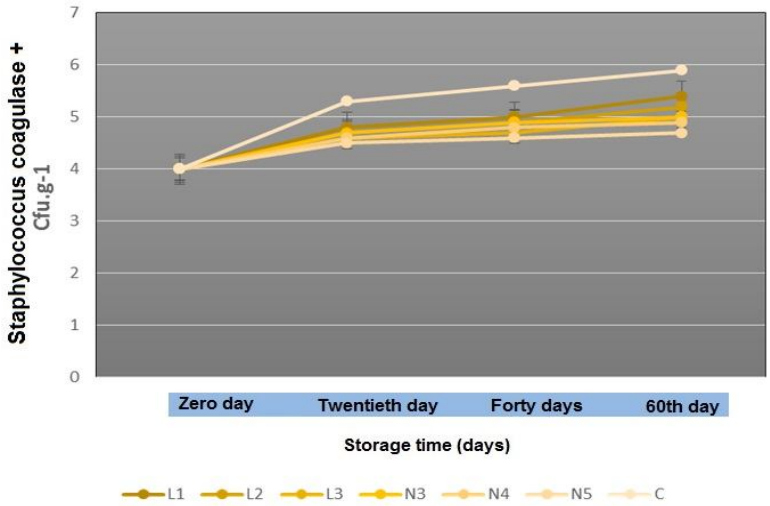

Fig 9 Comparison of Mean Population Index of Staphylococcus coagulase-Positive Antimicrobial-Packaged CheesePressures and Control Treatments Based on Treatment Interaction Effects* Storage Time Levels at Significance Level 0.05

با توجه به نمودار ۷ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین میزان جمعیت استافیلوکوکوس‌کواگولازمثبت تیمارهای پنیرپروسس براساس پوشش بسته‌بندی و در مقایسه با تیمار شاهد c مورد استفاده وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). با افزایش میزان نایسین و لیمونن در فرمولاسیون میکروکپسول‌ها و همچنین در فرمولاسیون پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی میزان جمعیت استافیلوکوکوس‌کواگولازمثبت به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵). تیمار دارای پنیرپروسس دارای پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های لیمونن به میزان ۱۰ میکرولیتر در میلی‌گرم دارای میزان جمعیت استافیلوکوکوس‌کواگولازمثبت کمتری از میکروکپسول‌های دارای ۵و۷ میکرولیتر در میلی‌گرم لیمونن میباشد. همچنین میزان شاخص جمعیت استافیلوکوکوس‌کواگولاز مثبت در تیمار دارای ۲ واحد بین‌المللی در میلی‌گرم پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های نایسین N5 کمتر از تیمارهای N3 و N4 می‌باشد با توجه به‌نمودار ۸ مشاهده‌شد که با افزایش مدت زمان نگهداری پنیر پروسس به مدت۶۰ روز میزان شاخص جمعیت استافیلوکوکوس‌کواگولازمثبت تیمارهای پنیرپروسس به طور معنی‌داری افزایش‌یافت ($p\leq$۰/۰۵). کمترین میزان جمعیت استافیلوکوکوس‌کواگولاز مثبت در روز تولید و بالاترین آن در روز شصتم نگهداری مشاهده گردید ($p\leq$۰/۰۵).روند افزایشی معنی‌داری در جمعیت استافیلوکوکوس‌کواگولازمثبت کلیه تیمارها تا روز شصتم نگهداری وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵).

باتوجه به نمودار ۹ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین جمعیت استافیلوکوکوس‌کواگولازمثبت تیمارهای پنیرپروسس

براساس پوشش بسته‌بندی مورداستفاده در طی شصت روز زمان نگهداری وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). با افزایش میزان نایسین و لیمونن در فرمولاسیون میکروکپسول‌ها و همچنین در فرمولاسیون پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی میزان شاخص جمعیت استافیلوکوکوس‌کواگولازمثبت در طی شصت روز نگهداری به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵). اما درطی دوره نگهداری تیمار دارای پنیرپروسس دارای پوشش بسته-بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های لیمونن به میزان ۱۰ میکرولیتر در میلی‌گرم دارای میزان جمعیت استافیلوکوکوس-کواگولاز مثبت کمتری از میکروکپسول‌های دارای ۵و۷ میکرولیتر در میلی‌گرم لیمونن می‌باشد.میزان شاخص جمعیت استافیلوکوکوس‌کواگولاز مثبت در طی زمان نگهداری در پوشش بسته‌بندی دارای میکروکپسول‌های نایسین با افزایش غلظت به ۲IU بر میلی‌گرم از تیمارهای پنیرپروسس به میزان ۱/۵ و ۱ میکرولیتر بر میلی‌گرم کمتر بود ($p\leq$۰/۰۵). در طی دوره نگهداری شصت روز شاخص جمعیت استافیلوکوکوس-کواگولاز مثبت در پوشش بسته‌بندی دارای میکروکپسول‌های نایسین با افزایش غلظت به ۲IU بر میلی‌گرم کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵).

۳-۱-٤- نتایج ارزیابی جمعیت کپک و مخمر

تأثیر تیمار، زمان نگهداری و همچنین اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری برروی میزان جمعیت کپک و مخمر تیمارهای پنیرپروسس در مقایسه با تیمار شاهد c معنی‌دار بود ($p\leq$۰/۰۵). با توجه به نمودار ۱۰ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین میزان جمعیت کپک و مخمر تیمارهای پنیرپروسس بر اساس پوشش بسته‌بندی مورد استفاده وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). با افزایش میزان نایسین و لیمونن در فرمولاسیون میکروکپسول‌ها و همچنین در فرمولاسیون پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی میزان جمعیت کپک و مخمر به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵).

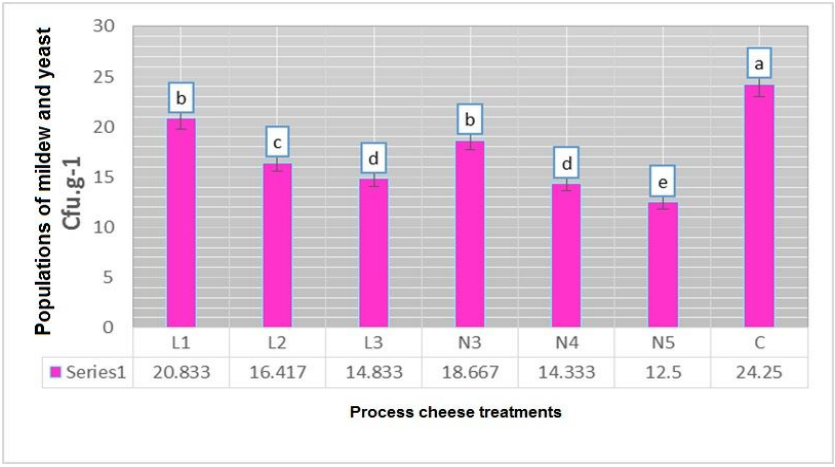

Fig10. Comparison of mean population of mold and yeast processed cheeses packaged with antimicrobial coatingand control treatment at the significant level of 0.05

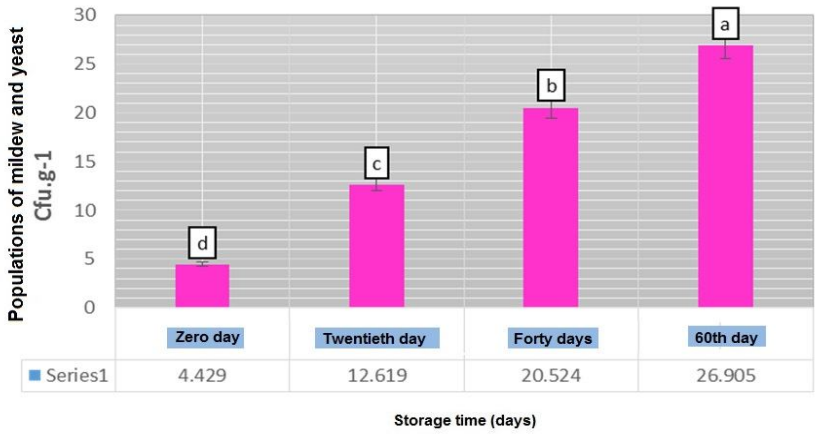

Fig 11 . Comparison of Mean Population Index of Yeast and Yeast Population-Packaged Cheeses with Antimicrobial Cover and Control Treatment Based on Difference in Storage Time at Significance Level 0.05

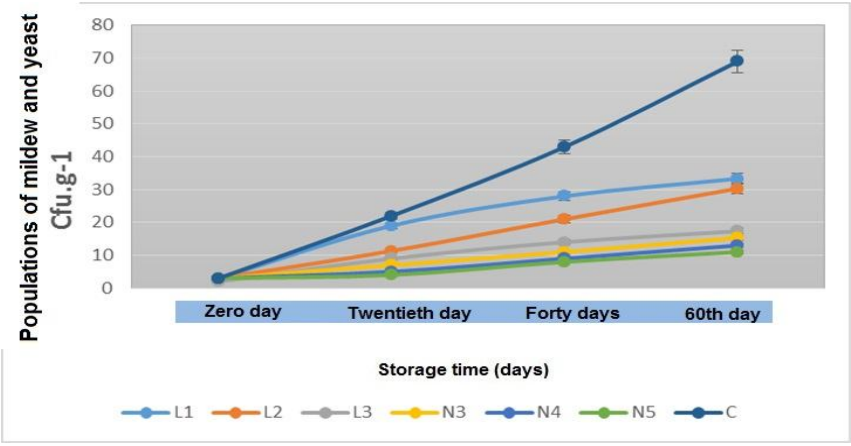

Fig 12. Comparison of mean population index of yeast and yeast packaged cheese-covered treatments Antimicrobial and control treatment based on interaction effects of treatment* levels of storage time at significance level of 0.05

تیمار دارای پنیرپروسس دارای پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های لیمونن به میزان ۱۰ میکرولیتر در میلی‌گرم دارای میزان جمعیت کپک و مخمر کمتری از میکروکپسول-های دارای ۷و۵ میکرولیتر در میلی‌گرم لیمونن می‌باشد. همچنین میزان شاخص جمعیت کپک و مخمر در تیمار دارای ۲ واحد بین‌المللی در میلی‌گرم پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های نایسین N5 پایین‌تر از تیمارهای N3 و N4 می‌باشد.

با توجه به نمودار ۱۱ مشاهده شد که با افزایش مدت زمان نگهداری پنیرپروسس به مدت ٦۰ روز میزان شاخص جمعیت کپک و مخمر تیمارهای پنیرپروسس به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p\leq$۰/۰۵). کمترین میزان جمعیت کپک و مخمر در روز تولید و بالاترین آن در روز شصتم نگهداری مشاهده گردید ($p\leq$۰/۰۵). روند افزایشی معنی‌داری در جمعیت کلیه تیمارها تا روز شصتم نگهداری وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). باتوجه به نمودار ٤-۲۹ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین جمعیت کپک و مخمر تیمارهای پنیرپروسس بر اساس پوشش بسته-بندی مورد استفاده در طی شصت روز زمان نگهداری وجود داشت ($p\leq$۰/۰۵). با افزایش میزان نایسین و لیمونن در فرمولاسیون میکروکپسول‌ها و همچنین در فرمولاسیون پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی میزان شاخص جمعیت کپک و مخمر در طی شصت روز نگهداری به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵). اما در طی دوره نگهداری تیمار دارای پنیرپروسس دارای پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های لیمونن به میزان ۱۰ میکرولیتر در میلی‌گرم دارای میزان جمعیت کپک و مخمر کمتری از میکروکپسول‌های دارای ۵ و ۷ میکرولیتر در میلی‌گرم لیمونن می‌باشد. همچنین میزان جمعیت کپک و مخمر در تیمار دارای ۲ واحد بین‌المللی در میلی‌گرم پوشش بسته‌بندی ضدمیکروبی با میکروکپسول‌های نایسین N3 و N4 می‌باشد. در طی دوره نگهداری شصت روز جمعیت کپک و مخمر در پوشش بسته-بندی دارای میکروکپسول‌های نایسین با افزایش غلظت به ۲IU بر میلی‌گرم به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵). میزان شاخص جمعیت کپک و مخمر در طی زمان نگهداری در پوشش بسته‌بندی دارای میکروکپسول‌های نایسین با افزایش غلظت به ۲IU بر میلی‌گرم کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵).

٤-تحلیل نتایج ارزیابی جمعیت میکروبی

بررسی نتایج ارزیابی شاخص‌های میکروبی نشان داد که پوشش‌های بسته‌بندی شده با میکروکپسول‌های نایسین و لیمونن به طور معنی‌داری در طی دوره شصت روز نگهداری میزان شاخص جمعیت کپک و مخمر، استافیلوکوکوس-کواگولاز مثبت، اشرشیاکلی به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵). با افزایش میزان غلظت نایسین ولیمونن در فرمولاسیون میکروکپسول‌های نایسین ولیمونن در پوشش بسته‌بندی، میزان کاهش معنی‌داری در رشد فلورمیکروبی مشاهده شد. نایسین با داشتن طیف مهارکنندگی وسیع علیه باکتری‌ها و اسپورهای مقاوم به حرارت نظیر اسپورهای جنس باسیلوس و کلستریدیوم و همچنین پایداری در برابر حرارت و pH پایین می‌تواند به عنوان افزودنی غذایی مناسب در صنایع‌غذایی مطرح باشد. این افزودنی غذایی دارای طعم خاصی نبوده و خصوصیات ارگانولپتیک غذا را تغییر نمی‌دهد. همچنین به راحتی توسط پروتئازهای دستگاه گوارش تجزیه شده و برای انسان مسمومیت‌زا نیست. در حال حاضر نایسین به عنوان یک افزودنی غذایی در بیش از ۵۰ کشور مجاز شناخته شده است. مقدار استفاده از نایسین در اغلب غذاها بین

۲/۵ تا ۱۰۰ پی‌پی‌ام است.

غشای سیتوپلاسمی، هدف اصلی برای عمل نایسین است که با ایجاد منفذ صورت می‌گیرد. طبیعت انعطاف‌پذیر و خصوصیات آمفی‌فیلیک مولکول نایسین نقش مهمی در عملکرد آن دارد. نایسین (با توجه به ماهیت کاتیونی) از طریق برهم‌کنش با ترکیبات فسفولیپیدی غشای سیتوپلاسمی توسط پیوندهای یونی عمل می‌کند. باکتریوسین‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک را می‌توان علاوه براساس ساختار، براساس نحوه عمل گروه‌بندی کرد. برخی از اعضای طبقه لانتی‌بیوتیک باکتریوسین‌ها، مانند نایسین نشان داده‌اند به یک حالت دوگانه عمل می‌کنند، آن‌ها می‌توانند به چربی موجود در ساختار دوم Π (انتقال‌دهنده اصلی زیر واحدهای پپتیدوگلیکان از سیتوپلاسم به دیواره سلولی) متصل شوند و در نتیجه باعث جلوگیری از سنتز دیواره‌سلولی شده و نهایتاً منجر به مرگ سلولی شوند. آن‌ها می‌توانند چربی موجود در ساختار دوم Π را به عنوان یک بخش اساسی غشاء خارج کرده و تشکیل منافذی در غشاء سلول دهند که منجر به مرگ سلولی سریع می‌شوند[۱۲].

۵- نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق فیلم ضدمیکروبی برپایه میکروکپسول‌های نایسین، لیمونن جهت بهبود افزایش ماندگاری پنیرپروسس در طی شصت روز نگهداری بررسی شد. نتایج کلی تحقیق نشان داد که در طی شصت روز نگهداری میزان شاخص‌های میکروبی کل، کپک و مخمر، استافیلوکوکوس‌کواگولازمثبت، اشرشیاکلی با کاهش معنی‌داری مواجه بودند ($p\leq$۰/۰۵). نتایج نشان داد که تیمار فیلم بسته‌بندی با نایسین ۲ IU/mg و لیمونن دارای ۱۰ میکرولیتر بر میلی‌گرم در طی دوره نگهداری منجر به حفظ کیفیت بالاتری در تیمارهای پنیرپروسس گردید و به عنوان تیمار بهینه انتخاب شد.

٦- منابع

[1] Briozzo, J., DeLagarde, E.A., Chirife, J., Parada, L. (2005). Clostridium botulinum type A growth and toxin production in media and process cheese spread. *Appl Environ Microbiol*. 45:1115-1152.

[2] Tanaka, Z., Sun, X., Lian, Z., Wang, X., Zhou, J., Ma, Z. (2003). The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the properties of soy protein isolate/microcrystalline wheat-bran cellulose film. *Journal of Food Engineering*.114: 183-191.

[3] Scott, C., Taylor, A. (2006). The antimicrobial activity of controlled-release chlorine dioxide gas on fresh blueberries. *Journal of Food Protection*. 77: 1127-1132.

[4] Ghahramanifar, M., Najafi, M., Mohammadisani, A., Ghahramanifar, A. (2010). Persistences on factors of tudy concentrated protein whey by limonene microovrlay of microcapsules. *Journal of Food Science and Technology*. 2(3): 45-51. [in persian]

[5] Zohri, M., Shafiee Alavidjeh, M., Haririan, I., Shafiee Ardestani, M., Sadat Ebrahimi, S.E., Tarighati Sani, H., Sadjadi ,S.K. (2011). A Comparative study between the Antibacterial Effect of Nisin and Nisin-Loaded Chitosan/Alginate Nanoparticles on the Growth of Staphylococcus aureus in Raw and Pasteurized Milk Samples, Probiotics Antimicrobial Protein. 2:258–266.

[6] Collins, B1., Cotter, PD., Hill, C., Ross, RP.(2011). The impact of nisin on sensitive and resistant mutants of Listeria monocytogenes in cottage cheese. *J Appl Microbiol*. 110(6):1509-14.

[7] Prombutaraa, P., Kulwatthanasal, Y., Supaka, N., Sramala, I., Chareonpornwattanaa, S.(2012). Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. *Food Control*. 24: 184-190.

[8] Rao, B., Rodriguez. (1989). Antimicrobial susceptibility of Nisin resistant Listeria monocytogenes of dairy origin. *FEMS Microbiology Letters*. 252: 67-72.

[9] (Abinide, N., Nruoprisa, A., Nihgeta, L. 2017). Effect of xanthan gum and soy protein isolate on processed cheese characteristics. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* .66 (14): 247-258. [naisreP nI]

[10] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Microbiology of milk and its products - Properties and methods of testing milk and its products. ISIRI no 2406, Karaj: ISIRI.(2016). [in persian]

[11] M., Rivaza, M., Ridihsa, H. Minarhetirehaza,(2014). Investigation and Optimization of Chemical and Sensory Properties of Different Formulations of Ultra-refined Analog Feta Cheese by Response Surface Method. *Journal of Research and Innovation in Food Science*, 10 (2) : 107-121. [in persian]

[12] Nayeri, N., Edalatian, R.M. (2014). Application and mechanism of action of nisin in food. 21st National Congress of Iranian Food Science and Technology. November 7-9, Shiraz University.

Investigate the effects Antimicrobial Packaging film Based on lightweight PE Contains Nisin and limonene microcapsules On the shelf life of process cheese

Maddah, N.[1], Mostaghim, T. [2], *Haririan, E. [3]

1. MSc in Food Science and Technology , Shahr-e-Qods Bhcnar, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2 . tnemtrapeD of Food Science and Tygolonhce , Shahr-e-Qods hcnarB, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Department of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Iran

(Received: 2019/11/01 Accepted: 2020/04/11)

The aim of this study was to investigate the properties of polyethylene antimicrobial film containing niacin and limonene microcapsules in cheese process packaging. In this study microcapsules containing nisin (0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5) and limonene (5, 7, 10, 14, 21 and 28 µg / mg) were prepared by gelation method. . After optimization, niacin and limonene microcapsules were used in polyethylene film based film formulation. After packaging cheese cheese in the film containing optimized microcapsules containing concentrations (1, 1.5 and 2 µg / mg nisin and 5, 7 and 10 µg / mg limonene), total microbial populations, mold and Yeast, Staphylococcus coagulase positive, Escherichia coli were examined on the first days of production, 20th, 40th, and 60th storage.
The results were analyzed by two-way ANOVA and Duncan tests at the significant level of 0.05. During 60 days of storage, total microbial indices, mildew and yeast, Staphylococcus coagulas positive and Escherichia coli significantly decreased ($p \leq 0.05$).
The results showed that treatment with Nisin containing 2 IU / mg concentration and limonene with concentration of 10 µg / mg resulted in higher quality of processed cheese during storage period and were selected as optimal treatment.

Keywords: Processed cheese, Nisin, Limonene, Antimicrobial packaging film.

* Corresponding Author E-Mail Address: yahoo.com@Toktammostaghim