



بررسی تأثیر آنتی اکسیدان‌های طبیعی کروستین و بیکسین در افزایش مدت ماندگاری پنیر چدار

شهناز خداوردی^۱، تکتّم مستقیم^{۲*}، اسماعیل حریریان^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۵	هدف از این تحقیق استفاده از خصوصیات آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی کروستین و بیکسین در فرمولاسیون پنیر چدار به فرم نانوذرات بود. در این تحقیق نانوذرات کیتوزان / آلژینات دارای بیکسین (۱۴، ۱۶ و ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کروستین (۰/۰۱، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد) که با روش ژلاسیون تهیه شدند. پس از تهیه پنیر چدار و افزودن نانوذرات، آزمون جمعیت میکروبی کل در روزهای اول تولید، بیستم، چهارم و شصتم نگهداری بررسی شدند. نتایج آزمایش با روش آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد آنالیز شدند. نتایج نشان داد که جمعیت میکروبی کل در طی زمان نگهداری به طور معنی‌داری افزایش یافت اما با افزایش میزان استفاده از نانوذرات بیکسین و کروستین شاخص جمعیت میکروبی کل به طور معنی‌داری کاهش یافت. بررسی نتایج ارزیابی آنالیز میکروسکوپی نیز حضور نانوذرات را در داخل شبکه ساختاری پنیر تأیید کرد. بررسی نتایج ارزیابی حسی نشان‌دهنده کاهش امتیازات ارزیابی حسی در طی شصت روز نگهداری بود اما در تیمارهای دارای مقادیر ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیکسین و کروستین میزان تغییرات شاخص حسی کمتر از بقیه تیمارها بود که نهایتاً تیمار دارای ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیکسین و ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروستین به عنوان تیمار بهینه انتخاب شد.
کلمات کلیدی: آلژینات، پنیر چدار، زمان نگهداری، کیتوزان، نانوذرات کروستین/ بیکسین.	
DOI: 10.29252/fsct.18.06.15 * مسئول مکاتبات: Toktammostaghim@yahoo.com	

۱- مقدمه

شیر و فرآورده‌های لبنی، به عنوان یکی از مواد غذایی فراویژه و حاوی آنتی‌اکسیدان، نقش مهمی در جلوگیری از تخریب اکسیداتیو در بدن ایفا می‌نمایند. فرآورده‌های اکسیداسیون در شیر و فرآورده‌های آن سبب ایجاد بو و طعم تند شده و منجر به کاهش کیفیت تغذیه‌ای و نیز کاهش ایمنی به علت ایجاد ترکیبات سمی می‌شوند. بنابراین، علاوه بر ترکیبات شیر، به کار بردن ترکیباتی که موجب افزایش پایداری اکسیداتیو شیر و محصولات لبنی شود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. پنیر به عنوان یکی از فرآورده‌های لبنی پرمصرف، از این قاعده مستثنی نمی‌باشد. مطالعات زیادی در مورد فعالیت آنتی-اکسیدانی شیر و محصولات لبنی انجام شده اما هنوز اطلاعات اندکی در ارتباط با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در این محصولات و به خصوص انواع پنیرها، جهت ارتقای پایداری اکسیداتیو این فرآورده‌ها وجود دارد [۱].

در دهه‌های اخیر، در راستای حذف یا کاهش ترکیبات سنتزی، تحقیقات متعددی برای جایگزینی مواد شیمیایی با طبیعی انجام و در گزارش‌های مختلف بیان شده که گیاهان دارویی دارای ترکیباتی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و یا آنتی‌رادیکالی می‌باشند. در سال‌های اخیر تولیدکنندگان مواد غذایی توجه زیادی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی با منشأ گیاهی و میکروبی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی در محصولات خود نموده‌اند. بیشتر اسانس‌های گیاهی به دلیل داشتن ترکیبات فیتوشیمیایی از قبیل ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی نشان می‌دهند. این ترکیبات به طور گسترده در گیاهان وجود داشته و علاوه بر افزایش کیفیت ماده غذایی، از عوامل ایجاد رنگ، طعم و مزه نیز می‌باشند. بیکسین و کروستین نیز از گیاهان با خصوصیات آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که می‌توانند به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در فرمولاسیون تیمارهای پنیرچدار در این تحقیق مورد مطالعه قرار گیرند [۲].

سحری و همکاران (۱۳۹۱)، ویژگی‌های ضدباکتریایی عصاره آناتو (نوروبیکسین) را در برابر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا بررسی نمودند. اثر بازدارندگی عصاره آناتو (نوروبیکسین ۱ درصد) بر توانایی رشد و جوانه‌زنی اسپور برخی از باکتری‌های بیماری‌زا (استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، کلوستریدیوم پرفرانجنز و اشیشاکلی)، مورد مطالعه قرار گرفت. مطابق نتایج به‌دست‌آمده، عصاره آناتو بر رشد باکتری‌های

استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و کلوستریدیوم پرفرانجنز اثر بازدارندگی داشته اما بر اشیشاکلی بی‌اثر است. به علاوه عصاره آناتو در غلظت‌های ذکر شده می‌تواند از جوانه‌زنی اسپورهای باسیلوس سرئوس و کلوستریدیوم پرفرانجنز نیز پیشگیری نماید. بنابراین عصاره آناتو می‌تواند به عنوان یک افزودنی غذایی طبیعی ضدباکتریایی، در بیشتر فرآورده‌های غذایی استفاده شود [۳].

یلمه و همکاران (۱۳۹۲)، اثر ضدباکتریایی رنگ آناتو بر باکتری‌های استرپتوکوکوس پیوژنس، اشیشاکلی، اتروکوکوس فکالینس و باسیلوس سوبتیلیس را بررسی نمودند. در این مطالعه رنگ آناتو به روش خیساندن استخراج و پس از فیلتراسیون، با آن تحت‌خلاء به شکل پودر درآورده شد. نتایج آزمایش نشان داد رنگ آناتو بر رشد تمام باکتری‌های مورد آزمون مؤثر است. باسیلوس سوبتیلیس و اشیشاکلی به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را به رنگ آناتو نشان دادند. با توجه به نتایج آزمایش می‌توان از رنگ آناتو به عنوان یک ممانعت‌کننده از رشد باکتری استفاده کرد [۴].

Han و همکاران (۲۰۱۱)، اثرات مواد پلی‌فنولی را بر کیفیت پنیر بررسی نمودند. در تولید پنیر ترکیبات پلی‌فنولی شامل کاتچین^۱، گالت^۲، اپی‌گالوکاتچین^۳، تانیک اسید^۴، هومووالینیک اسید^۵، هسپریدین^۶ و فلاون^۷، عصاره انگور در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در فرمولاسیون استفاده شدند. از بین ترکیبات فنولی به کاررفته، ترکیبات عصاره انگور و تانیک اسید دارای بالاترین اثر نگهدارندگی بودند [۵].

Ritota و همکاران (۲۰۱۸) اثرات کروستین‌ها را در پنیر تهیه‌شده با زعفران به روش HPLC بررسی نمودند. زعفران در صنایع لبنی برای افزایش رنگ و طعم در پنیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق محلول متانول/آب برای استخراج ترکیبات عصاره زعفران مورد استفاده قرار گرفت. پس از اضافه‌کردن کروستین به پنیر در دمای اتاق به مدت یک ساعت در مکان تاریک قرار گرفت و نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

1. Catechins
2. Gallate
3. Epigallocatechin
4. Tannic acid
5. Homovanillic acid
6. Hesperidin
7. Flavone

۲-۲-۲- تهیه نانوذرات حاوی بیکسین

نانوذرات بیکسین با تکنیک تداخلی پلیمرها بر طبق روش Venturini et al., 2011 تهیه شد. پلیمرهای (کیتوزان و آلژینات) (۲۵۰ میلی گرم)، تری گلسیرید (۴۰۰ میکرولیتر)، Span 60 (۹۵ میلی گرم) و بیکسین در مخلوط استون (۶۰ میلی لیتر) و اتانول (۷/۵ میلی لیتر) تحت هم زدن در ۴۰ درجه سانتی گراد حل شد. بعد از هم خوردن پلی مرها، تری گلسیریدها و Span 60، فاز آلی با فاز آبی (۱۳۰ میلی لیتر) حاوی توئین ۸۰ (۱۹۵ میلی گرم) اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه باقی ماند و محلول به حجم نهایی ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. حلال ها با اوپراتور تحت خلاء خارج شد [۸].

۲-۲-۳- تهیه و فرمولاسیون پنیر چدار

در ابتدا شیر ۳/۵ درصد چربی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد با استفاده از دستگاه بن ماری پاستوریزه شد. پس از تثبیت دما در ۳۲ درجه، نانوذرات بیکسین و کروستین مطابق با جدول کدبندی تیمارهای تحقیق اضافه شد و سپس مایه پنیر رنت به مقدار ۲/۵ درصد به شیر اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه به آرامی هم زده شد تا رنت به طور کامل پخش شود و ۴۵ دقیقه شیرهای حاوی کشت آغازگر و رنت در حالت ساکن در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد نگهداری شد. بعد از ۴۵ دقیقه استراحت لخته ها تشکیل گردید. سپس لخته ها به آرامی به ابعاد ۱ سانتی متر مکعب برش داده شد و به لخته های برش خورده ۱۵ دقیقه زمان داده شد تا ته نشین شوند. سپس درجه حرارت ظرف را توسط بن ماری طی مدت ۳۰ دقیقه از ۳۰ به ۳۹ درجه سانتی گراد رسانیده و در دمای ۳۹ درجه به مدت ۱۵ دقیقه نگاه داشته شد. مخلوط لخته ها و آب پنیر به وسیله توری جدا گردید و عملیات چدارینگ تا pH=۵/۴۲ ادامه یافت و به لخته ها به میزان ۰/۲۰ درصد وزنی/وزنی نمک زده شد. لخته های پنیر تحت نیروی پرس ۱۰ کیلوگرمی به مدت ۱۲ ساعت فشرده شد و سپس در کیسه های وکیوم بسته بندی و در انکوباتور یخچال دار در دمای ۸ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ روز نگهداری شد. آزمون های ماندگاری مورد نظر روی پنیرهای مورد آزمون در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ نگهداری انجام شد [۹].

۲-۲-۴- کدبندی تیمارهای تحقیق

کدبندی تیمارهای تحقیق مطابق با جدول ۱ انجام شد.

نگهداری شد. ارتباط خطی بین مقدار پیکروکروستین و کروستین و همچنین میزان ماندگاری و بقای آن در پنیر و خصوصیات کیفی پنیر در طی نگهداری نیز وجود داشت. آنها دریافتند که کروستین می تواند به عنوان ترکیب آنتی اکسیدانی مؤثر در پنیر مورد استفاده قرار گیرد [۶].

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

شیر خام پاستوریزه مورد استفاده از شرکت پگاه گلپایگان ایران، استارترکالچر و رنت از شرکت کریستین هانسن استرالیا، کروستین و بیکسین شرکت سیگما آلمان تهیه گردید.

۲-۲- روش ها

۲-۲-۱- تهیه نانوذرات حاوی کروستین

کیتوزان با وزن مولکولی پایین (۱۹۰-۵۰ کیلودالتون) با درجه استیلاسیون ۷۵-۸۵ درصد، آلژینات سدیم (وزن مولکولی=۱۲۰-۸۰ کیلودالتون) مانورونیک/گلوکورونیک با نسبت (M/G=۱/۵۶) و کروستین به صورت کروستین آلدئید از شرکت سیگما-آلد ریچ خریداری شد. تهیه نانوذرات بر اساس روش Tsai و همکاران (۲۰۰۸)، با اندکی تغییر بدست آمد. غلظت ۰/۰۲ درصد محلول کیتوزان با حل کردن در گلاسیال استیک ۱ درصد وزنی/وزنی و آلژینات سدیم نیز با حل شدن در آب دیونیزه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد تهیه شد. کروستین با درصد وزنی ۰/۰۶ وزنی/حجمی به محلول آلژینات در حال هم خوردن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه هم خورد. سپس محلول آلژینات سدیم/کروستین به صورت قطره قطره به محلول کیتوزان در حال هم خوردن در ۱۰۰۰ دور به مدت یک ساعت اضافه شد. نانوذرات حاصله با سونیکاتور (probe type sonicator, Misonix Sonicator, S4000, USA) در ۲۰ کیلوهرتز به مدت ۳ دقیقه با توان ۱۰۰ درصد بر روی یخ سونیکه شد. نانوذرات به مدت ۴۰ دقیقه در ۳۱۲۰۰g سانتریفیوژ شد و در خشک کن انجمادی (Operon, Korea) برای بررسی های بعدی نگهداری شد. کلیه محلول ها با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرومتر فیلتر شده و در تهیه و فرمولاسیون نانوذرات استفاده شد و حلال ها با اوپراتور تحت خلاء خارج شد [۷].

Table 1. Coding of Research treatments

Coding of treatments	Crocetin concentration (µg/ml)	Bixin concentration (µg/ml)
T1	0.01	14
T2	0.03	14
T3	0.05	14
T4	0.01	16
T5	0.03	16
T6	0.05	16
T7	0.01	18
T8	0.03	18
T9	0.05	18
Control Treatment (T)	0	0

۲-۳-آزمون‌های پنیرپروسس

۲-۳-۱-ارزیابی جمعیت میکروبی کل

ابتدا به منظور تهیه سوسپانسیون همگن، ۲۵ گرم نمونه پنیرچدار به همراه ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول سیترات سدیم ۱ درصد وزنی/ حجمی ساخت شرکت سیگما، داخل بسته‌بندی-های مخصوص استریل (Interscience) منتقل گردید و توسط دستگاه استومکر به مدت ۵ دقیقه بطور کامل هموژن و فیلتر شد تا ذرات معلق آن حذف شود، به این ترتیب رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ به کمک آب پیتونه استریل تهیه شد، سپس از لوله‌های حاوی رقت‌های تهیه شده به میزان ۱/۹ میلی‌لیتر به وسیله سمپلر (کشت سطحی) روی سطح محیط کشت پلیت کانت‌آگار^۸ منتقل گردید. ارزیابی فلور میکروبی در ۴ بازه زمانی صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ روز پس از تولید و در سه تکرار انجام شد [۱۰].

۲-۳-۲-ارزیابی عدد پراکسید

اندازه‌گیری عددپراکسید طبق روش AOCS^۹ به شماره 53-Cd8 انجام شد. عدد پراکسید به روش یدومتری تعیین شد. در نهایت عدد پراکسید طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$PV = (S - B) \times N \times 1000 / W$$

PV: عدد پراکسید بر حسب میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم نمونه پنیرچدار

S: میزان تیترآزول مصرفی در نمونه

B: میزان تیترآزول مصرفی در شاهد

N: نرمالیه تیترآزول مصرفی بر حسب اکی‌والان بر لیتر

W: وزن نمونه پنیر بر حسب گرم [۱۱].

۲-۳-۳-ارزیابی حسی

ارزیابی حسی توسط ۱۵ ارزیاب آموزش‌دیده انجام شد. آزمون امتیازدهی به ویژگی‌های بافت، طعم و مزه، عطر و بو، رنگ ظاهری و پذیرش کلی پنیر در قالب مقیاس هدونیک ۵ امتیازی (از خیلی بد ۱، تا خیلی خوب 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. داوران، نمونه‌ها را از نظر طعم، بافت، بو، رنگ و پذیرش کلی مور ارزیابی قرار دادند [۱۱].

۲-۳-۴-تجزیه و تحلیل آماری

از طرح کاملاً تصادفی برای تجزیه و تحلیل استفاده شد و برای این منظور، نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۸ به کاربرده شد. برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها، از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. برای بررسی نتایج ارزیابی حسی (آزمون غیرپارامتری) از آزمون کروسکال - والیس^{۱۰} استفاده گردید.

۳-نتایج و بحث

۳-۱-نتایج آزمون‌های پنیر چدار

۳-۱-۱-نتایج ارزیابی جمعیت میکروبی کل

ملاحظه گردید که تأثیر تیمار، زمان نگهداری و همچنین اثرات متقابل تیمار و زمان نگهداری در سطوح ۰/۰۵ درصد و همچنین ادرصد بر روی میزان شاخص جمعیت میکروبی کل معنی‌دار بود ($p \leq 0.05$). با توجه به نمودار ۱ مشاهده گردید که اختلافات معنی‌داری بین میزان جمعیت میکروبی کل تیمارهای پنیر چدار بر اساس اختلاف در تیمار وجود داشت ($p \leq 0.05$). همان‌گونه که در نمودار ۱ قابل مشاهده است میزان جمعیت

10. Kruskal-Wallis one-way analysis of variance

8. Phate count agar

9. AOCS (American Oil Chemists' Society)

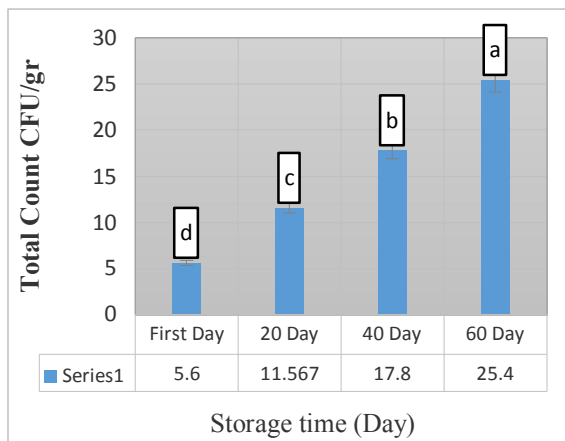


Fig 2 Comparison of mean microbial population of cheddar cheese based on storage time at significant level ($p \leq 0.05$)

۳-۱-۲- نتایج ارزیابی عدد پراکسید

مشاهده شد که تأثیر تیمار، زمان نگهداری و همچنین اثرات متقابل تیمار در زمان نگهداری بر میزان شاخص عددپراکسید تیمارهای پنیرچدار معنی دار بود ($p \leq 0.05$). باتوجه به نمودار ۳ ملاحظه شد که تأثیرات غلظت‌های مختلف نانوذرات کروستین/ بیکسین بر روی میزان شاخص پراکسید تیمارهای پنیرچدار معنی دار بود ($p \leq 0.05$). بررسی نتایج نشان داد که میزان عددپراکسید در تیمار پنیرچدار فروموله شده با استفاده از نانوذرات با میزان ۰/۰۱، ۰/۰۳، و ۰/۰۵ درصد کروستین و بیکسین به میزان ۱۴ میکروگرم در میلی‌لیتر از میزان پراکسید تیمارشاهد کمتر بود ($p \leq 0.05$). اما اختلافات معنی‌داری بین تیمارهای پنیرچدار با مقادیر مساوی بیکسین وجود نداشت ($p > 0.05$). با افزایش میزان استفاده از بیکسین به میزان ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر میزان شاخص پراکسید تیمارهای پنیرچدار به طور معنی‌داری درمقایسه با تیمارهای پنیرچدار دارای مقادیر ۱۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری کاهش داشت ($p \leq 0.05$). همچنین افزایش میزان بیکسین به مقدار ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری میزان شاخص عددپراکسید را به طور معنی‌داری کاهش داد به‌طوری‌که تیمار پنیرچدار دارای کروستین ۰/۰۵ درصد میکروگرم/ میلی‌لیتر شاخص پراکسید تیمارهای پنیرچدار دارای کمترین میزان شاخص عددپراکسید در بین تیمارها بود ($p > 0.05$). باتوجه به نمودار ۴ مشاهده شد که اختلافات معنی‌داری بین میزان شاخص پراکسید تیمارهای پنیرچدار بر اساس زمان

میکروبی کل در پنیر چدار شاهد در بالاترین میزان در مقایسه با سایر تیمارهای پنیرچدار می‌باشد و روند کاهشی معنی‌داری بین میزان جمعیت میکروبی کل با افزایش میزان استفاده از نانوذرات بیکسین/کروستین وجود داشت ($p \leq 0.05$). بالاترین میزان شاخص درصد میزان جمعیت میکروبی کل به تیمار شاهد و کمترین آن نیز به تیمار پنیرچدار دارای ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروستین و ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیکسین متعلق بود ($p \leq 0.05$). باتوجه به نمودار ۲ ملاحظه شد که زمان نگهداری نیز تأثیرات معنی‌داری بر روی شاخص میزان جمعیت میکروبی کل داشته و با افزایش مدت‌زمان نگهداری میزان جمعیت میکروبی کل به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p \leq 0.05$). به‌طوری‌که بالاترین میزان درصد میزان جمعیت میکروبی کل در روز شصتم و کمترین آن نیز در روز تولید پنیرچدار مشاهده گردید ($p \leq 0.05$). مشاهده گردید که اختلافات معنی‌داری بین میزان شاخص میزان جمعیت میکروبی کل تیمارهای پنیرچدار بر اساس اختلاف در نوع تیمار و درصد بیکسین و کروستین مورد استفاده و همچنین مدت‌زمان نگهداری پنیرچدار وجود دارد ($p \leq 0.05$). در طی مدت‌زمان نگهداری شصت روز میزان میزان جمعیت میکروبی کل به طور معنی‌داری در کلیه تیمارها افزایش یافت ($p \leq 0.05$). اما در طی شصت روز نگهداری تیمارهای دارای مقادیر بالاتر کروستین و بیکسین دارای میزان جمعیت میکروبی کل پایین‌تری درمقایسه با تیمارشاهد و همچنین تیمارهای دارای مقادیر کمتر کروستین و بیکسین بودند ($p \leq 0.05$).

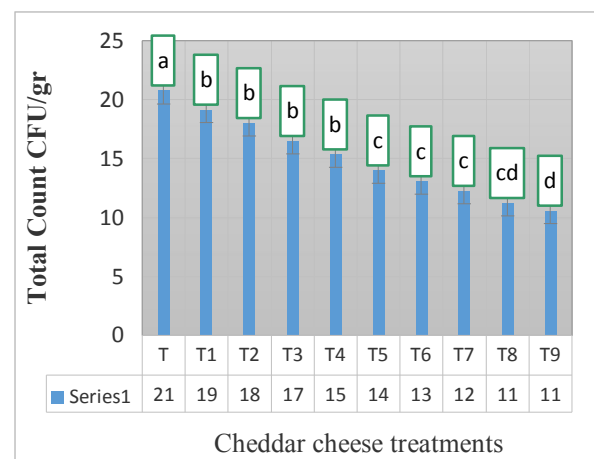


Fig 1 Comparison of mean total microbial population Cheddar cheeses based on the treatment at significant level ($p \leq 0.05$)

نمودار ۴ قابل مشاهده است روند افزایشی معنی‌داری در میزان شاخص پراکسید کلیه تیمارها در طی زمان نگهداری شصت روز وجود داشت ($p \leq 0.05$). اما تیمارهای دارای مقادیر ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیکسین دارای مقادیر ۰/۰۳ و ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروستین دارای میزان شاخص پراکسید کمتری در مقایسه با تیمار شاهد و همچنین سایر تیمارهای پنیرچدار در انتهای روز شصتم نگهداری بودند ($p \leq 0.05$).

۳-۲- تحلیل نتایج ارزیابی جمعیت میکروبی کل

بررسی نتایج ارزیابی جمعیت میکروبی کل نشان داد که اختلافات معنی‌داری در میزان جمعیت میکروبی کل تیمارهای پنیرچدار وجود داشت و به طور معنی‌داری نیز در طی زمان نگهداری افزایش یافت ($p \leq 0.05$). اما با افزایش میزان استفاده از نانوذرات کیتوزان و آلژینات دارای کروستین و بیکسین میزان جمعیت میکروبی کل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p \leq 0.05$). اغلب مطالعات انجام شده در خصوص اثر اسانس‌های روغنی بر روی ارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن‌ها نشان می‌دهند که اثر اسانس‌های گیاهی بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت قدری بیشتر از تأثیر آنها بر روی باکتری‌های گرم‌منفی است. به عبارت دیگر گرم‌مثبت‌ها نسبت به اثر آنتی‌باکتریال ترکیبات ضد میکروبی حساس‌ترند. علت حساسیت کمتر گرم‌منفی‌ها شاید به علت وجود غشاء خارجی در باکتری‌های گرم‌منفی باشد که سبب محدود شدن انتشار اجزاء هیدروفوبیک اسانس به لایه لیپوپلی‌ساکارید می‌شود. در این راستا نیز تحقیقات مشابهی نیز وجود داشت. در مورد نحوه عمل نانوذرات کروستین/ بیکسین در مرگ باکتری‌های بیماری‌زا چنین اظهار نظر شده است که یکی از ویژگی‌های مهم این مواد و ترکیب‌های آنها، خاصیت آبگریزی است که سبب می‌شود در بخش‌های لیپیدی دیواره سلولی و میتوکندری باکتری توزیع شده و موجب تغییر و تخریب ساختمان و نفوذپذیری بیشتر آنها گردد. به دنبال آن بخش زیادی از یون‌ها و دیگر محتویات حیاتی سلول به بیرون تراوش می‌نماید که در نهایت به مرگ باکتری منجر می‌شود [۱۲].

کیتوزان، پلیمر ترکیبی گلوکز آمین و ان-استیل گلوکز آمین است که به وسیله پیوندهای ۱و۴ گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند. امروزه خواص ضدباکتری و ضدقارچی کیتوزان علیه طیف

نگهداری وجود داشت ($p \leq 0.05$). به طور کلی روند افزایشی معنی‌داری با مدت زمان نگهداری بر میزان شاخص پراکسید تیمارهای پنیرچدار وجود داشت ($p \leq 0.05$). به طوری‌که کمترین میزان شاخص پراکسید در روز اول نگهداری و بالاترین میزان شاخص پراکسید در روز چهارم نگهداری وجود داشت ($p \leq 0.05$). از روز چهارم تا روز شصتم نگهداری شاخص پراکسید با کاهش معنی‌داری مواجه بود ($p \leq 0.05$).

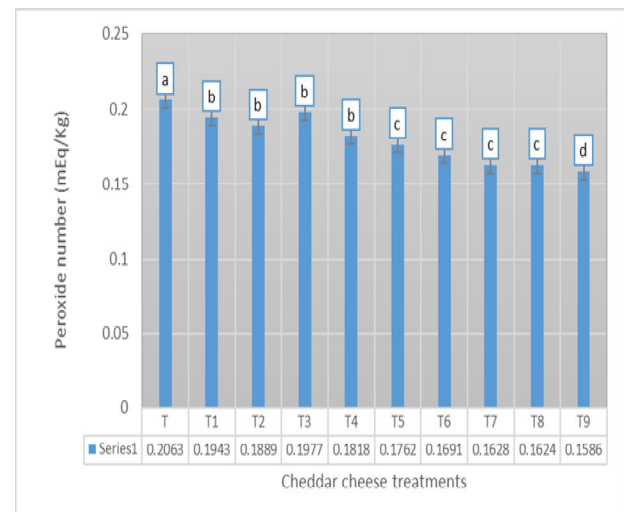


Fig 3 Comparison of Mean Peroxide Index of Cheddar Cheese Treatments by Treatment at significant level ($p \leq 0.05$)

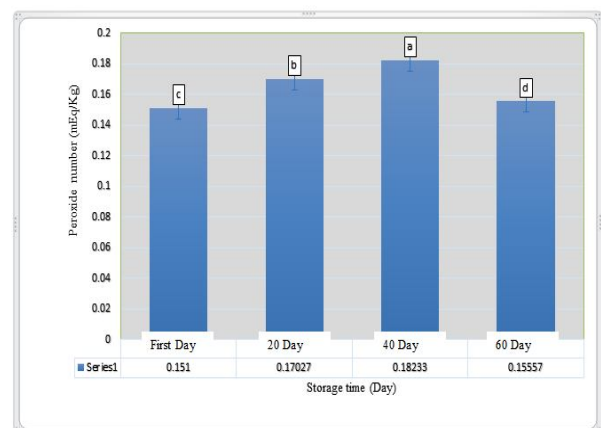


Fig 4. Comparison of mean peroxide index of cheddar cheese based on storage time at significant level ($p \leq 0.05$)

همچنین مشاهده شد که اختلافات معنی‌داری بین میزان میانگین شاخص پراکسید تیمارهای پنیرچدار براساس اختلاف در میزان کروستین و بیکسین مورد استفاده و همچنین مدت زمان نگهداری وجود داشت ($p \leq 0.05$). همان‌گونه که در

گسترده‌ای از سویه‌های باکتریایی و قارچی گزارش شده است، البته کیتوزان به دلیل انحلال اندک در آب و محلول بودن در اسید، محدودیت‌هایی برای استفاده دارد. در سالهای اخیر مطالعاتی برای تولید کیتوزان محلول در آب با خواص آنتی‌باکتریایی صورت گرفته است [۱۳].

در این مطالعات، از هیدروکسی‌اتیل‌آکریل - کیتوزان، اتیل‌آمین - هیدروکسی‌اتیل‌کیتوزان، کربوکسی‌متیل - کیتوزان، هیدروکسی‌پروپیل - کیتوزان استفاده شده است، اما تحقیق روی تولید کیتوزان محلول در آب همچنان ادامه دارد. کیتوزان با داشتن طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد میکروبی، بازده مهارتی متفاوتی در برابر قارچ، باکتری گرم مثبت و منفی نشان می‌دهد. فعالیت ضدباکتری، مرحله پیچیده‌ای است که بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، به علت مشخصات سطح-سلولی، تفاوت دارد [۱۳].

گزارش شده است که کیتوزان عموماً اثر باکتری‌کشی قوی‌تری روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی دارد. این مسئله شاید به خاطر سد غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی باشد. کیتوزان در pH کمتر از ۶ پلی‌کاتیونیک است و به سهولت با ترکیبات دارای بار منفی مثل پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدهای آنیونی، اسیدهای چرب و فسفولیپیدها واکنش می‌دهد. کیتوزان به دلیل این خواص پلی‌کاتیونیک باعث تخریب غشای باکتری می‌شود و خاصیت ضدباکتریایی دارد [۱۴].

درواقع، خاصیت ضدباکتریایی کیتوزان بستگی به پروتون-دهندگی گروه‌های آمینو دارد که می‌تواند با بار منفی سطح سلول واکنش دهد و منجر به تخریب سلول باکتری شود. وزن مولکولی و درجه داستیلایسیون کیتوزان نقش‌های متفاوتی را در شرایط کیتوزان محلول نشان داده‌اند. با افزایش میزان استفاده از کروسیتین و بیکسین میزان به دام‌اندازی نیز کاهش یافته و میزان کروسیتین و بیکسین آزاد بر روی سطح نانوذرات نیز افزایش می‌یابد که در غلظت‌های بالای استفاده می‌تواند از طریق واکنش سطحی با کیتوزان نیز میزان اثرات کشندگی آن را کاهش دهد [۱۵].

Ritota و همکاران (۲۰۱۸)، در بررسی اثر کروسیتین در پنیر نیز به نتایج مشابهی دست یافتند که استفاده از ماده مؤثره کروسیتین شاخص جمعیت میکروبی کل به طور معنی‌داری کاهش یافت که با نتایج تحقیق حاضر در توافق داشت.

Zohri و همکاران (۲۰۱۳)، اثرات نانوذرات کیتوزان/ آلژینات حاوی نایسین را بر روی میزان ماندگاری پنیر فتا بررسی نمودند و دریافتند که استفاده از کیتوزان می‌تواند میزان ماندگاری پنیر را به همراه نایسین افزایش دهد و همچنین اثرات سینرژیستی این دو ترکیب می‌تواند میزان ماندگاری را به طور معنی‌داری افزایش دهد که با نتایج تحقیق حاضر نیز در توافق بود. [۱۶].

۳-۳- تحلیل نتایج ارزیابی شاخص پراکسید

اندیس پراکسید به صورت میلی‌اکی‌والان پراکسید در ۱۰۰۰ گرم نمونه که یدیدپتاسیم را تحت شرایط آزمون اکسید می‌کند بیان می‌شود و شاخصی برای اندازه‌گیری میزان اکسیداسیون چربی است. عوامل مختلفی مانند نور، یونهای فلزی و اکسیژن قادر به بالا بردن اندیس پراکسید می‌باشند. بطوری که افزایش عددپراکسید باعث کاهش پایداری اکسیداتیو می‌شود. یکی از پرکاربردترین شاخص‌های کیفی است که مقدار کل پراکسیدهای موجود در روغن را به عنوان فرآورده‌های اولیه حاصل از اکسایش نشان می‌دهد [۱۷].

کاهش عددپراکسید پس از رسیدن به حد بیشینه آن طی مراحل ابتدایی اکسایش گزارش شده‌است که بیانگر ناپایدار بودن پراکسیدها و شکست آن‌ها به فرآورده‌های ثانویه طی مراحل بعدی است. پیوندهای غیراشباع موجود در تمامی چربی‌ها و روغن‌ها مراکز فعالی را تشکیل می‌دهند که ممکن است با اکسیژن واکنش دهند. این واکنش منتهی به تشکیل محصولات اولیه، ثانویه و ثالث اکسیداسیون می‌شود. بیکسین یک دی-آپوکاروتنوئید منحصر به فرد C25 است که در حالت طبیعی به فرم ایزومر سیس بوده، یکی از گروه‌های کربوکسیلیک‌اسید آن متیله شده است. کاروتنوئیدها از جمله بیکسین و نوربیکسین ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و از بین‌برندگی رادیکال‌های آزاد، فرونشاندن اکسیژن یگانه، پاک‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن و در نتیجه دارای پتانسیل بالای ضد جهش و فرونشاندن ضدسرطان هستند [۱۸].

افزایش درصد استفاده از بیکسین در فرمولاسیون تیمارهای پنیرچدار در طی دوره نگهداری به مهار رادیکال‌های آزاد ناشی از اکسیداسیون و همچنین افزایش گسترش فرآیندهای ثانویه اتواکسیداسیون و تولید ترکیبات ثانویه کمک می‌کند. در روز شصتم نگهداری میزان ترکیبات پراکسید به دلیل تبدیل به مالون‌آلدئید و افزایش شاخص تیوباربیتوریک اسید نیز کاهش می‌یابد. دلیل افزایش عددپراکسید در تمام تیمارها به دلیل

تجزیه ترکیبات اولیه ناپایدار اکسیداسیون به ترکیبات ثانویه شامل آلدهیدها، کتون‌ها، الکل‌ها و اسیدهای چرب است. افزایش عددپراکسید در طول زمان نگهداری ناشی از شدت- یافتن اکسیداسیون با افزایش مدت زمان فرآیند است. اکسیداسیون یکی از مهم‌ترین فرآیندهای تولید رادیکال‌های آزاد در ماده‌غذایی، سیستم‌های شیمیایی و حتی سیستم‌های زیستی است. آنتی‌اکسیدان‌ها از عوامل اصلی خشی‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند. لذا تأمین ذخایر آنتی‌اکسیدان، به منظور کاهش آثار تنش اکسایشی امری مهم تلقی می‌شود. هم‌چنین در طی‌زمان به دلیل اینکه در طی زمان نگهداری شصت روز نیز میزان هیدرولیز آبی و تغییرات درجه حرارت محیطی نیز باعث بالارفتن میزان عددپراکسید تیمارها می‌شود. با افزایش عددپراکسید سرعت تبدیل هیدروپراکسیدها به محصولات ثانویه (آلدئیدها، کتون‌ها و...) افزایش یافته و نیز سرعت تشکیل محصولات سوم اکسیداسیون و متعاقب آن تجزیه این محصولات افزایش یافته و در نتیجه پایداری اکسیداسیون تیمارهای پنیرچدار نیز کاهش می‌یابد. در زعفران ترکیبات کروسین، کروستین و سافرانال خاصیت ازبین- برنده رادیکال‌های آزاد و قدرت مهارکنندگی دارند بنابراین افزایش درصد حضور این ترکیبات می‌تواند باعث افزایش میزان مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش شاخص‌پراکسید شود [۱۹].

Ritota و همکاران (۲۰۱۸)، در بررسی اثر کروستین در پنیر نیز به نتایج مشابهی دست یافتند که استفاده از ماده مؤثره کروستین با افزایش میزان مهار رادیکال‌های آزاد می‌تواند بر میزان تولید ترکیبات ثانویه پنیر اثرات معنی‌داری داشته باشد و با نتایج تحقیق حاضر نیز در توافق بود.

۴- نتیجه‌گیری کلی

نانوذرات کروستین/ بیکسین در این تحقیق جهت استفاده در نانوذرات تهیه و فرموله شد. شاخص‌پراکسید با افزایش میزان استفاده از نانوذرات کروستین/بیکسین به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p \leq 0/05$). جمعیت میکروبی کل در طی‌زمان نگهداری به طور معنی‌داری افزایش یافت اما با افزایش میزان استفاده از نانوذرات بیکسین و کروستین شاخص جمعیت میکروبی کل به طور معنی‌داری کاهش یافت. بررسی نتایج ارزیابی حسی نشان‌دهنده کاهش امتیازات ارزیابی حسی در طی

شصت روز نگهداری بود اما در تیمارهای دارای مقادیر ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیکسین و کروستین میزان تغییرات شاخص فیزیکوشیمیایی کمتر از بقیه تیمارها بود اما باتوجه به کاهش امتیازات حسی رنگ ظاهری که در نتیجه کاهش شاخص روشنایی در نتیجه پرشدن فضاهای درونی بافت پنیر صورت می‌گیرد. هم‌چنین کیتوزان و آلژینات دارای قابلیت جذب رطوبت محیطی بوده که با افزایش سایز نانوذرات در اثر جذب رطوبت، امتیازات شاخص روشنایی و هم‌چنین امتیازات بافت کاهش می‌یابد که کاهش امتیازات بافت به دلیل افزایش سایز از نانو به میکرو و هم‌چنین احساس دانه‌ای بودن در بافت سبب می‌شود که نهایتاً تیمار دارای ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیکسین و ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروستین به عنوان تیمار بهینه انتخاب شد.

۵- منابع

- [1] Dolatyari, R., Tajik, S., Zarrinkamar, F., Bothani, S. (2017). Evaluation of carotenoid pigment content of crocin, picrocrocin, safranal in saffron species *Crocus Sativus L.* In Cain and Tabas. *Iran biology magazine*. 25(3): 423-429. [in persian]
- [2] Cardarelli, C.R., Toledo Benassi, M., Mercadante, A.Z. (2009). Characterization of different amantto based on antioxidant and colour properties. *Food Science & Technology*, 11(3): 213-229.
- [3] Sahari, M.A., Zarringhalami, S., Sattari, M. (2012). Antibacterial Characterization of Anatox Extract (Norbixin) against Some Pathogenic Bacteria. 35(9): 17-23. [in persian]
- [4] Yalmeh, M., Habibi Najafi, M.B., Hosseini, F., Farhoush, R. (2013). Evaluation of the Antibacterial Effect of Anatox Color on Salmonella enteridis in Mayonnaise Sauce. *Journal of Food Science and Nutrition*. 11(4): 17-22. [in persian]
- [5] Han, J., Britten, M., St-Gelais, D., Champagne, C. P., P. Salmieri, S., Lacroix, M. (2011). Effect of polyphenolic ingredients on physical characteristics of cheese. *Food Research International*. 44: 494-497.
- [6] Ritota, M., Mattera, M., Gabriella, Di., Costanzo, M., Manzi, P. (2018). Evaluation of Crocins in Cheeses Made with Saffron by

- [13] Wei, D., Sun, W., Qian, W., Ye Y, Ma, X. (2009). The synthesis of chitosan based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research*; 344(17):2375-2387.
- [14] Alishahi, M., Bagherpour Najafzadeh, H., Najafabadi, M. (2010). Extracts herbal Some of Effect Antibacterial of hydrophyla Aeromonas, rukeri Yersinia, iniai Streptococcus. 2(6) : 21-30. [in persian]
- [15] Caballero-Ortega, H., Pereda-Miranda, R., and Abdullaev, F.I. (2007). HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. *Food Chemistry*. 100 (3): 1126–1131.
- [16] Zohri M., Shafie Alavidjeh M., Mirdamadi S.S., Behmadi h., Hossaini Nasr S.M., Jabbari Arabzadeh A. (2013). Nisin-Loaded Chitosan/Alginate Nanoparticles: A Hopeful Hybrid Biopreservative, 33(1):40-49.
- [17] Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I., C.F.R. (2015). Natural food additives. *Food Science & Technology*. 45:284-295.
- [18] Boschetto, D.L., Aranha, E.M., Ulson de Souza, A.A., Guelli U. Souza, S.M.A., Ferreira, S. R.S., Priamo, W.L., Oliveira, J.V. (2014). Encapsulation of bixin in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. *Industrial Crops and Products*. 60:22–29.
- [19] Shahi, T., Ghorbani, M.M. (2013). Replacing saffron pigments as antioxidant compounds with synthetic colours. 21st National Congress of Food Science and Technology. University of Tehran.
- UHPLC, *J. Braz. Chem. Soc.*, 29 (2): 248-257.
- [7] Tsai, A., Chaprutinunab, Th., Udomsupa, Ch., Luadthonga, S., Wanich, w. (2008). Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 374(1): 119-124.
- [8] Brito de Sousa Lobato, K., Paese, K., Forgearini, J.C., Staniscuaski Guterr, S., Jablonski, A., de Oliveria Rios, A. (2015). Characterization and stability evaluation of bixin nanocapsules. *Food Chemistry*. 141:3906-3912.
- [9] Nateghi, L. (2017). Investigation of physicochemical, sensory and microbiological characteristics of probiotic cheddar during storage. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*. 9(2): 27-39. [in persian]
- [10] Mortazavi, S.A., Milani, A. (2015). Evaluation of microbial population profiles of traditional Kurdish cheese and its relation to physicochemical and sensory characteristics Product during the ripening period. *Iranian Journal of Food Science and Technology Research*. 11(2): 140-151. [in persian]
- [11] Rashidi, H., Mazaheri Tehrani, M., Razavi, S.A., Ghods Rouhani, M. (Effect of fat percentage reduction and calcium chloride content on sensory and tissue properties of ultrafiltrated Feta cheese obtained from milk ultrafiltration. *Iranian Journal of Food Science and Technology Research*. 7 (3) : 218-226. [in persian]
- [12] Carson, A. (2012). *The Encyclopedia of Medicinal Plants*, Dorling Kindersley. London.: p. 227.



Evaluation of the effect of natural antioxidants of Crocetin and Bixin on the shelf life in Cheddar cheese

Khodaverdi, Sh¹., Mostaghim, T^{2*}., Haririan, E³.

1. MSc in Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Department of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received 2020/ 02/ 27

Accepted 2020/ 12/ 04

Keywords:

Alginate,
Cheddar,
Storage Time,
Chitosan,
Crocetin / Bixin Nanoparticles.

DOI: 10.29252/fsct.18.06.15

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

The aim of this study was to investigate the effect of natural antioxidant properties of crocetin and bixin on nanoparticle formulation of cheddar cheese. In this study, chitosan / alginate nanoparticles containing bixin (14, 16 and 18 µg / ml) and crocetin (0.01, 0.03 and 0.05%) were prepared by gelation method. After preparation of cheddar cheese and addition of nanoparticles, total microbial population test was evaluated 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. The results showed that the total microbial population increased significantly during storage, but the total microbial population index decreased significantly with increasing levels of Bixin and Crocetin nanoparticles. Examination of the results of the microscopic analysis also confirmed the presence of nanoparticles inside the cheese structural network. Evaluation of sensory evaluation results showed a decrease in sensory evaluation scores over 60 days of storage. However, in the treatments with 18 µg / ml Bixin and Crocetin the sensory index changes were less than the other treatments. Finally, the treatment with 16 µg / ml bixin and 0.05 µg / ml crocetin was selected as the optimal treatment.