

# اثر فراصوت و بسته بندی‌های ضد میکروبی حاوی نانو اکسید روی بر غیر فعال سازی ساکارومایسز سرویزیه و اثرشیاکلی در آب توت فرنگی طی انبار داری

آریو امامی فر<sup>1\*</sup>، مهری محمدی زاده<sup>2</sup>

1- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان (نویسنده مسئول)

2- گروه صنایع غذایی، دانشگاه آزاد واحد سنندج، سنندج

(تاریخ دریافت: 98 /12/13 تاریخ پذیرش: 99/02/13)

## چکیده

تأثیر ترکیبی استفاده از فراصوت با شدت 400 وات و فرکانس 24 کیلوهرتز (4 و 12 دقیقه) به همراه بکارگیری بسته بندی‌های ضد میکروبی ساخته شده از پلی اتیلن سبک حاوی نانوذرات اکسیدروی (3 درصد وزنی-وزنی) شامل تیمارهای، 4 دقیقه تیمار فراصوت و بسته بندی پلی اتیلنی خالص، 12 دقیقه تیمار فراصوت و بسته بندی پلی اتیلنی خالص، 4 دقیقه تیمار فراصوت و بسته بندی ضد میکروبی نانو ساختار، 12 دقیقه تیمار فراصوت و بسته بندی ضد میکروبی نانو ساختار و بسته بندی پلی اتیلنی خالص (شاهد)، بر میزان غیر فعال سازی ساکارومایسز سرویزیه (شاخص فساد) و اثرشیاکلی (شاخص بیماری زایی) تلقیح شده در آب توت فرنگی در دمای 4 درجه سانتی گراد و طی 4، 8، 12، 16 و 20 روز انبارداری بررسی گردید. تیمار فراصوت (در هر دو زمان 4 و 12 دقیقه) تأثیر معنی داری بر کاهش جمعیت ساکارومایسز سرویزیه و اثرشیاکلی داشت ( $p < 0.05$ ). همچنین مقاومت ساکارومایسز سرویزیه بر اساس (D value)، نسبت به نمونه‌های فاقد تیمار فراصوت به امواج فراصوت در مقایسه با اثرشیاکلی در محیط آب توت فرنگی بیشتر بود. استفاده از تیمار 12 دقیقه فراصوت و بسته بندی ضد میکروبی نانو ساختار بیشترین کاهش را در جمعیت ساکارومایسز سرویزیه و اثرشیاکلی تلقیح شده در آب توت فرنگی طی 20 روز انبارداری در مقایسه با سایر تیمارها و نمونه شاهد نشان داد ( $p < 0.05$ ). استفاده از بسته بندی‌های ضد میکروبی حاوی نانوذرات اکسید روی به عنوان یک هردل پس از تیمار فراصوت کوتاه مدت به عنوان هردل دوم اثر هم افزایی مناسبی در به تاخیر انداختن رشد میکروارگانیسم‌ها در آب توت فرنگی طی نگهداری در دمای 4 درجه سانتی گراد داشت.

**کلید واژگان:** آب توت فرنگی، فراصوت، بسته بندی ضد میکروبی، نانو اکسید روی

\*مسئول مکاتبات: a.emamifar@basu.ac.ir

## 1- مقدمه

امروزه ترجیح مصرف‌کنندگان به مصرف غذاهایی با حداقل فرایند، مشابه با عطر و طعم غذای تازه و با حداقل مواد نگهدارنده سوق یافته است [1]. آب توت فرنگی محصولی با خواص تغذیه‌ای مطلوب و حاوی مقادیر فراوانی از ترکیبات فراسودمند نظیر ویتامین ث، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، فولات‌ها، املاح معدنی، فسفر و اسیدهای آمینه می‌باشد که مصرف آن را بیشتر مورد توجه قرار داده است [2]. کاهش کیفیت آب میوه‌های تازه غیر پاستوریزه که امروزه توجه زیادی را به خود معطوف ساخته است، در نتیجه فعالیت میکروارگانیسم‌ها، آنزیم‌ها، تغییرات فیزیکی و شیمیایی طی تولید و انبارداری رخ می‌دهد. امروزه مسمومیت غذایی ناشی از حضور میکروارگانیسم‌ها و یا سموم تولید شده توسط آنها در مواد غذایی و از سوی زیان اقتصادی ناشی از حضور و فعالیت میکروارگانیسم‌های مولد فساد در مواد غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است [3]. بار میکروبی آب میوه تازه ترکیبی از فلور میکروبی طبیعی روی پوست میوه تازه و آلودگی میکروبی ایجاد شده طی مراحل پس از برداشت میوه و یا فراوری آب میوه است [4]. مخمرها مهم ترین میکروارگانیسم‌های مولد فساد آب میوه‌ها در شرایط اسیدی هستند که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به کاندیدا<sup>1</sup>، هانسیناسپورا<sup>2</sup>، پی‌کیا<sup>3</sup>، ساکارومایسز و رودوترولا<sup>4</sup> اشاره کرد. همچنین کپک‌های رشته‌ای از جمله پنی‌سیلیوم<sup>5</sup>، اسپرژیلوس<sup>6</sup>، بایسوکلامیس<sup>7</sup>، آلترناریا<sup>8</sup>، موکور<sup>9</sup>، فوزاریوم<sup>10</sup> و بوتریتیس<sup>11</sup> نیز اغلب در آب میوه‌ها رشد می‌کنند. از جمله باکتری‌های مولد فساد می‌توان به باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و اسید استیک اشاره کرد. رشد مخمرها با تولید دی‌اکسید کربن، الکل و عطر و طعم نامناسب ناشی از اسیدهای آلی و استالدئید همراه است. ریسه‌های کپکی نیز ظاهر نامناسبی را به همراه عطر و طعم

نامناسب و بوی کهنگی در آب میوه ایجاد می‌کنند. همچنین رشد کپک‌ها حالت ابری آب میوه را با تولید آنزیم‌های شکننده پکتین کاهش داده و با تولید برخی سموم، سلامت مصرف‌کننده را به خطر می‌اندازد [5]. شیوع و انتقال باکتری‌های بیماری‌زایی نظیر *اشرشیاکلی* و *سالمونلا* با مصرف آب میوه‌هایی نظیر توت فرنگی علی‌رغم اسیدی بودن آن، گزارش شده است [6]. به هر ترتیب چهار عامل، عوامل درونی موثر بر رشد میکروارگانیسم‌ها (ترکیبات غذایی، اسیدیته، پتانسیل اکسید و احیا و (pH)، روش‌های فرایند، حمل و نقل و نگهداری و عوامل محیطی در ایجاد فساد و گسترش فساد میکروبی در مواد غذایی و آب‌میوه‌ها موثر هستند [3]. دو میکروارگانیسم *ساکارومایسز سرویزیه* و *اشرشیاکلی* به عنوان دو شاخص اصلی مولد فساد و بیماری‌زایی در سنجش آلودگی آب‌میوه‌ها طی نگهداری و در شرایط یخچال همواره مورد توجه هستند [7]. استفاده از فرایند حرارتی به عنوان راه حلی مناسب برای چالش مرتبط با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و یا مولد فساد در صنایع آبمیوه‌سازی همواره مطرح و مورد استفاده بوده است اما به دلیل مواردی نظیر کاهش ویژگی‌های کیفی و ارزش تغذیه‌ای، یافتن جایگزینی مناسب برای این نوع فرآیند در صنایع آب میوه‌سازی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است [8]. برای این منظور کاهش شدت فرایندهای حرارتی با هدف کاهش اثر نامطلوب این نوع فرایندها بر کیفیت و مشتری‌پسندی آب میوه‌ها توصیه شده است. اخیراً استفاده از فرآیند‌های نوین نظیر فشار هیدرواستاتیک بالا، میدان مغناطیسی، امواج فرابنفش و امواج فراصوت در تولید آب میوه‌های سالم از نظر میکروبی و از طرفی با ارزش تغذیه‌ای و فراسودمندی مناسب مورد توجه قرار گرفته است [6]. استفاده از فناوری امواج فراصوت در صنعت غذا در شدت بالا (فرکانس 100 کیلوهرتز تا 1 مگاهرتز و قدرت کمتر از یک وات بر متر مربع) و شدت پایین (فرکانس 16 تا 100 کیلوهرتز و قدرت 100 تا 1000 وات بر متر مربع) رایج است. امواج با شدت بالا به دلیل اثر غیر مخرب بیشتر در بررسی ویژگی‌های کیفی مواد غذایی مورد استفاده بوده و امواج با شدت پایین در فرآیند‌های غذایی نظیر پوست‌کندن، استخراج، کریستاله کردن، و غیر فعال کردن میکروب‌ها و آنزیم‌ها استفاده می‌گردند [9]. امواج فراصوت با شدت پایین با ماهیت طولی و متناوب در محیط‌های مایع و یا

1. *Candida*
2. *Hanseniasspora*
3. *Pichia*
4. *Rodotrolla*
5. *Penicillium*
6. *Aspergillus*
7. *Byssochlamys*
8. *Alternaria*
9. *Mucor*
10. *Fusarium*
11. *Botrytis*

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، حسی و فراسودمندی، عمر نگهداری ماده غذایی را نیز افزایش دهند [18]. استفاده از بسته‌های ضد میکروبی در ترکیب با فراصوت در خصوص آب میوه‌ها به عنوان دو مانع مطلوب می‌تواند مفید واقع شود. اخیراً استفاده از بسته بندی‌های ضد میکروبی حاوی نانو ذرات اکسید روی با هدف افزایش عمر نگهداری مواد غذایی رو به گسترش است. نانوذرات اکسید روی یکی از مشهورترین مواد با خواص ضد میکروبی، قیمت ارزان، خواص حرارتی مناسب و واکنش دهندگی شیمیایی مطلوب هستند [19]. از سوی دیگر این ترکیب از سوی سازمان غذا و داروی آمریکا به عنوان محصول ایمن شناخته شده است [20]. کاربرد بسته بندی های ضد میکروبی حاوی نانو ذرات اکسید روی با هدف افزایش عمر نگهداری و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب پرتقال [21]، آب لیمو [22] و میوه توت فرنگی [23] به اثبات رسیده است. اگر چه استفاده از فرآیند فراصوت بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و زنده مانی انواعی از میکروارگانیسم‌ها در بسیاری از آب میوه‌ها گزارش شده است اما تا کنون اثر ترکیبی امواج فراصوت با مدت زمان کوتاه و در ادامه بسته بندی آب میوه حاوی میکروارگانیسم‌های مولد فساد و یا بیماری زا مورد مطالعه قرار نگرفته است که در این پژوهش به آن پرداخته خواهد شد.

## 2- مواد و روش ها

### 2-1- تهیه آب توت فرنگی

توت فرنگی های تازه رقم پاروس (*Fragaria X ananassa Duch*)، در اوایل صبح برداشت و در ظروف کوچک با عمق 15 سانتی متر به آزمایشگاه منتقل گردیدند. پس از جداسازی میوه های لهیده، نارس و ترک خورده، میوه‌های سالم جهت آب گیری انتخاب شدند. تقریباً 10 کیلوگرم توت فرنگی تازه با استفاده از آب میوه‌گیری دستی (مدل پارس خزر، ایران) آب‌گیری شده و پس از جداسازی ذرات معلق با عبور از پارچه های تنظیف دولایه، درون بطری های شیشه‌ای ریخته و پس از استریل کردن در اتوکلاو (دمای 121 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه) خنک شده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند [24].

گاز منتشر شده و با ایجاد فازهای نوسانی تراکم و انبساط، طی عمل کاویتاسیون منجر به تولید حباب‌های بسیار ریز با فشارهای نوسانی می‌گردند که در نهایت ترکیدن این حباب‌ها دما و فشار محیط را افزایش داده و با ایجاد نیروی برشی شدید اثر مخربی بر دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها داشته و آنها را نابود می‌کند. از طرفی، این امواج همچنین با ایجاد آسیب فیزیکی بر پیکره میکروارگانیسم‌ها مقاومت آن‌ها را نسبت به سایر عوامل ضد میکروبی نیز کاهش می‌دهند [10، 11]. همچنین امواج فراصوت با ایجاد رادیکال آزاد و تولید پراکسید هیدروژن سبب غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها می‌شوند. پژوهش‌ها نشان داده است که باکتری‌های گرم منفی به دلیل ضخامت کمتر دیواره سلولی پپتیدوگلیکانی (پروتئین، چربی، پلی ساکاری و موکوپپتید) نسبت به امواج فراصوت حساس تر از گرم مثبت‌ها هستند. از طرفی وجود کپسول مقاومت باکتری‌های کپسول دار را به امواج فراصوت را افزایش می‌دهد. این درحالی است که مخمرها با داشتن دیواره سلولی از جنس پروتئین‌های تکی که با اتصالات بتا گلوکان به هم متصل هستند، در مقایسه با باکتری‌ها مقاومت بیشتری به فراصوت نشان داده اند [12، 13]. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که فرآیند با امواج فراصوت نه تنها تاثیر نامطلوبی کمی بر کیفیت آب میوه‌هایی نظیر آب پرتقال [14]، آب توت فرنگی [15] و آب میوه گواوا [16] داشته، بلکه در مواردی به بهبود ویژگی‌های حسی و یا ظاهری آن‌ها منتهی گشته است. اگر چه تحقیقات نشان داده است که استفاده از فرآیند فراصوت در مقایسه با فرآیند حرارتی حداقل تاثیر منفی بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و فراسودمندی آب میوه‌ها دارد اما افزایش شدت و زمان امواج فرآیند فراصوت افت ویژگی‌های حسی و برخی خواص فیزیکوشیمیایی آب میوه‌ها را ایجاد کرده است [17]. از طرف دیگر استفاده از امواج فراصوت در محدوده زیر کشندگی نه تنها کفایت لازم برای تولید آب میوه کاملاً سالم و ایمن برای مصرف کننده را ندارد، بلکه احتمال رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های آسیب دیده در اثر فرآیند فراصوت طی نگهداری در شرایط یخچال را افزایش می‌دهد [6]. فناوری هردل عبارت است از استفاده هوشمندانه از ترکیب عوامل نگهدارنده با اثر تشدیدکنندگی بر هم به نحوی که ضمن حفظ

## 2-2- تهیه تلقیح میکروبی

سویه‌های باکتری و مخمر مورد استفاده در این آزمایش به ترتیب شامل *اشرشیاکلی* و *ساکارومایسز سرویزیه* بودند که به صورت منجمد در محیط کشت حاوی 20 درصد گلیسرول از آزمایشگاه میکروبی دانشکده علوم دانشگاه کردستان تهیه شدند. مایع تلقیح بر اساس روش فراریو و همکاران در سال 2013 با کمی تغییر تهیه شد [25] به این ترتیب که ابتدا هر دو سویه باکتری و مخمر بر روی محیط کشت شیب دار *تریپتیکاز سوی آگار (Trypticase Soy Agar, Merck, Germany)* کشت داده شدند. سپس یک حلقه (Loop) از کلنی *اشرشیاکلی* و *ساکارومایسز سرویزیه* رشد یافته بر روی محیط مادر اشاره شده در شرایط استریل و زیر هود میکروبی به ترتیب به 20 میلی‌لیتر محیط کشت مایع *تریپتیکاز سوی برات (Trypticase Soy Broth, Merck, Germany)* و محیط کشت ساپرود دکستروز برات (*Sabouraud Dextrose Broth, Merck, Germany*) منتقل و به مدت 18 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد برای *اشرشیاکلی* و 24 ساعت در دمای 27 درجه سانتی‌گراد برای *ساکارومایسز سرویزیه* نگهداری شدند. از کشت فعال شده هر سویه به میزان یک درصد حجمی حجمی به 50 میلی‌لیتر محیط کشت مخصوص هر سویه منتقل و تا رسیدن به نیم مک فارلند ( $1/5 \times 10^8 \text{CFU/mL}$ ) گرمخانه‌گذاری (در دو دمای 37 و 27 درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای *اشرشیاکلی* و *ساکارومایسز سرویزیه*) شدند. سوسپانسیون مخمری و باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار (*Universal 320, Hettich, Germany*) (5000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه) از محیط کشت جدا شده و پس از شستشو با بافر فسفات به ترتیب و جداگانه و در شرایط استریل به 500 میلی‌لیتر آب توت‌فرنگی استریل برای تمام تیمارها منتقل و به عنوان کشت پایه میکروبی مورد استفاده قرار گرفتند. 500 میلی‌لیتر آب توت‌فرنگی حاوی میکروارگانیزم‌های فوق به 4500 میلی‌لیتر آب توت‌فرنگی استریل منتقل و به عنوان آب توت‌فرنگی تلقیح شده مورد استفاده قرار گرفتند. بلافاصله پس از تلقیح از آب توت‌فرنگی نمونه برداری شد و برای شمارش مخمرها از روش کشت سطحی و محیط کشت ساپرود دکستروز آگار (*Sabouraud Dextrose*)

استفاده شد. از محیط کشت *تریپتیکاز سوی آگار (Trypticase Soy Agar, Merck, Germany)* و روش کشت آمیخته برای شمارش *اشرشیاکلی* استفاده شد. کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و پس از شمارش کلنی‌ها نتایج به صورت لگاریتم تعداد واحد کلنی میکروارگانیزم‌ها در هر میلی‌لیتر آب میوه  $\log \text{CFU/mL}$  گزارش گردید.

## 2-3- فرآیند فراصوت

60 میلی‌لیتر از نمونه آب توت‌فرنگی تلقیح شده با هر میکروارگانیزم به طور جداگانه به یک مخزن شیشه‌ای مجهز به سیستم گردش آب سرد منتقل و توسط دستگاه فراصوت (*UP400S, Hielscher, Germany*) با شدت امواج 400 وات، قطر پروب 7 میلی‌متر و با عمق نفوذ پروب 25 میلی‌متر طی دو زمان 4 و 12 دقیقه به طور پیوسته تیمار و بلافاصله در شرایط استریل بسته بندی و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. منحنی بقاء هر یک از میکروارگانیزم‌ها با ترسیم لگاریتم تعداد کلنی‌ها در واحد زمان فرآیند فراصوت ترسیم و بهترین برازش در نمودار بقاء مشخص شد. مقدار عددی *D value* یا همان زمان لازم بر حسب دقیقه برای کاهش تعداد میکروارگانیزم‌ها تا 90 درصد مقدار اولیه که معادل منفی عکس شیب منحنی بقاء است نیز محاسبه گردید.

## 2-4- بسته بندی و انبار

در این تحقیق از بسته‌هایی از جنس نانوکامپوزیت پلی اتیلن سبک حاوی 3 درصد وزنی - وزنی نانوذرات اکسیدروی که بر طبق روش امامی فر و محمدی زاده در سال 2015 تهیه شدند [23] و پلی اتیلن سبک (*LDPE*) به عنوان نمونه شاهد با طول 10 و عرض 8 سانتی‌متر استفاده گردید. بسته بندی‌های مورد نظر به روش دستی تهیه و پس از ضد عفونی (حرارت 95 درجه سانتی‌گراد طی 2 دقیقه) و سرد شدن، در زیر هود استریل با 60 میلی‌لیتر آب توت‌فرنگی تلقیح شده و فراصوت شده (4 و 12 دقیقه) پر و دربندی شد.

## 2-5- انبارداری

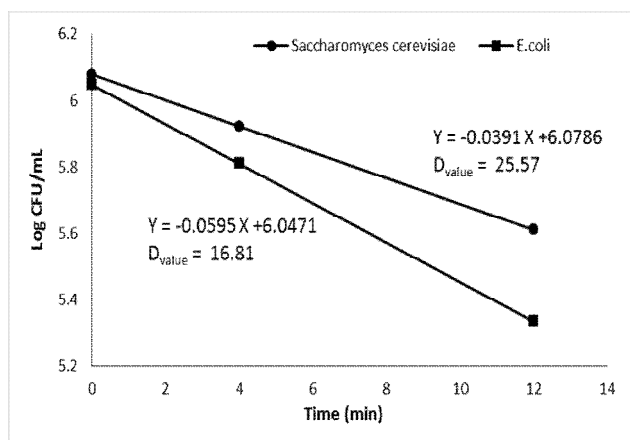
تیمارها (180 بسته در دو گروه 90 تایی جداگانه که به ترتیب با *اشرشیاکلی* و *ساکارومایسز سرویزیه* تلقیح شده بودند و هر بسته

### 3- نتایج و بحث

#### 3-1- زنده‌مانی اشرشیاکلی و ساکارومایسز

##### سرویزیه

همان طور که در شکل 1 مشاهده می‌گردد غیر فعال سازی سویه‌های ساکارومایسز سرویزیه و اشرشیاکلی بر اساس امواج فراصوت از مدل خطی پیروی می‌کند و همچنین مقاومت ساکارومایسز سرویزیه بر اساس ارزش عدد دی (D value)، نسبت به امواج فراصوت بالاتر از اشرشیاکلی است. علی‌قورچی و همکاران در سال 2014 تأثیر امواج فراصوت به عنوان فناوری غیرحرارتی بر غیرفعال‌سازی اشرشیاکلی و ساکارومایسز سرویزیه را در آب انار بررسی و اعلام کردند که ساکارومایسز سرویزیه نسبت به اشرشیاکلی در برابر امواج فراصوت مقاومت بیشتری دارد [28]. این مقاومت بالاتر را می‌توان به استحکام بیشتر دیواره سلولی مخمرها (شبه‌کای از اتصالات بتا گلوکان و مانو پروتئین‌ها و مقدار اندکی کیتین) نسبت به باکتری‌های غیر اسپور دار (پپتیدوگلیکان) در برابر امواج فراصوت مرتبط دانست. همچنین در بسیاری از موارد، علت نابودی مخمرها طی فرایند فراصوت تولید رادیکال‌های آزاد حاصل از هیدرولیز مولکول‌های آب اعلام شده است [29 و 12]. کودا و همکاران در سال 2009 نیز اعلام کردند که احتمال نقش واکنش‌های شیمیایی در نابودی باکتری‌ها و به ویژه اشرشیاکلی طی فرایند فراصوت با شدت بالای 500 کیلوهرتز در مقایسه با پدیده فیزیکی ناشی از حفرگی بسیار بیشتر است [30].



**Fig 1** Survival curves models for (■) *E. coli* (●) *S. cerevisiae* treated with ultrasound at 25 °C during 12 minutes.

حاوی 60 میلی لیتر آب میوه بود) شامل بسته‌های پلی اتیلن سبک حاوی 3 درصد نانو اکسید روی حاوی آب توت فرنگی تلقیح شده و فراصوت شده به مدت 4 دقیقه (Nano packaging + US4). بسته‌های پلی اتیلن سبک حاوی 3 درصد نانو اکسید روی حاوی آب توت فرنگی تلقیح شده و فراصوت شده به مدت 12 دقیقه (Nano packaging + US12). بسته‌های پلی اتیلن سبک حاوی آب توت فرنگی تلقیح شده و فراصوت شده به مدت 4 دقیقه (Pure packaging + US4). بسته‌های پلی اتیلن سبک حاوی آب توت فرنگی تلقیح شده و فراصوت شده به مدت 12 دقیقه (Pure packaging + US12) و بسته‌های پلی اتیلن سبک حاوی آب توت فرنگی تلقیح شده و بدون فراصوت (Pure packaging) به عنوان نمونه شاهد (کنترل)، در دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

#### 2-6- آزمون‌ها

در زمان‌های بلافاصله پس از بسته‌بندی (لحظه صفر) و 4، 8، 16 و 20 روز پس از انبارداری از هر بسته نمونه برداری و شمارش میکروبی به روش ارائه شده در بخش 2-3 انجام گرفت. مقدار مواد جامد محلول با استفاده از رفاکتومتر دیجیتالی اندازه‌گیری و براساس درصد گزارش شد [26]. اندازه‌گیری اسیدیته به روش خنثی‌سازی آب میوه، با استفاده از سود یک دهم نرمال تا رسیدن به pH معادل 8/1 با استفاده از pH متر انجام و میزان سود مصرفی در محاسبه مقدار اسید بر حسب اسید تارتاریک استفاده شد [27].

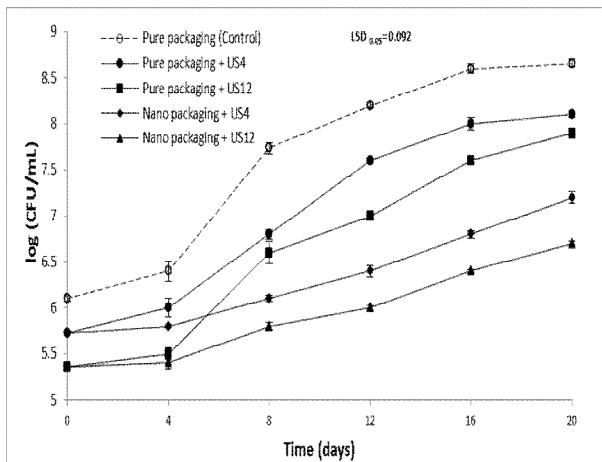
#### 2-7- روش آماری

این تحقیق در قالب آزمایشات فاکتوریل بر پایه طرح آماری کاملاً تصادفی برای هر میکروارگانیسم اشرشیاکلی و ساکارومایسز سرویزیه به صورت جداگانه و در سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول نوع تیمار و فاکتور دوم زمان انبارداری بود. اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها به کمک روش آماری مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح 5 درصد و با استفاده از نرم افزار SAS بررسی شد.

### 3-2- جمعیت اشرشیاکلی و ساکارومایسز سرویزیه طی انبارداری

متوسط جمعیت اشرشیاکلی و ساکارومایسز سرویزیه در نمونه های آب توت‌فرنگی استریل شده پیش از تیمار با فراصوت، تقریباً معادل  $6/1 \text{ Log CFU/mL}$  شمارش شد. همان طور که در شکل های 2 و 3 نشان داده شده است، فراصوت تاثیر معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بر کاهش جمعیت اشرشیاکلی و ساکارومایسز داشته به نحوی که پس از فرایند فراصوت به مدت 4 دقیقه متوسط تعداد اشرشیاکلی و ساکارومایسز سرویزیه به ترتیب در نمونه های آب توت فرنگی استریل شده به  $5/73 \text{ CFU/mL}$  و  $5/89 \text{ Log CFU/mL}$  رسید ( $p < 0.05$ ). افزایش زمان فرایند فراصوت از 4 به 12 دقیقه تاثیر معنی‌داری بر جمعیت میکروارگانیسم‌ها داشت به نحوی که تعداد اشرشیاکلی و ساکارومایسز سرویزیه به ترتیب در نمونه های آب توت‌فرنگی استریل شده به  $5/36 \text{ Log CFU/mL}$  و  $5/62 \text{ CFU/mL}$  رسید ( $p < 0.05$ ). تاثیر مثبت افزایش زمان فرایند فراصوت بر کاهش تعداد میکروارگانیسم‌هایی نظیر اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس<sup>1</sup> [31]، آنروباژیدیدوم پولانز<sup>2</sup> و انتروباکتر آنروژنز<sup>3</sup> [12]، بیان شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. بررسی رشد میکروبی در بسته‌های پلی اتیلن خالص حاوی آب توت‌فرنگی پس از 4 روز بیانگر افزایش سریعتر تعداد مخمرها در مقایسه با باکتری های اشرشیاکلی است (شکل های 2 و 3). از طرف دیگر با افزایش زمان انبارداری نیز تعداد متوسط ساکارومایسز در مقایسه با اشرشیاکلی روند افزایشی بالاتری را طی کرد به طوری که در پایان 20 روز انبارداری متوسط جمعیت ساکارومایسز سرویزیه و اشرشیاکلی در نمونه های شاهد (Pure packaging) به ترتیب به  $8/66 \text{ Log CFU/mL}$  و  $10/12 \text{ CFU/mL}$  رسید. بنابراین می توان نتیجه گرفت که ساکارومایسز سرویزیه در مقایسه با اشرشیاکلی در محیط آب توت فرنگی و در شرایط انبار سرد سازگارتر است که با گزارش های لوردو و همکاران در سال 2015 هماهنگی دارد [7]. تاثیر مطلوب استفاده از امواج فراصوت بر بهبود ویژگی های فیزیکوشیمیایی و به تاخیر انداختن رشد

میکروارگانیسم‌ها در انواع آب میوه شامل پرتقال، گریپ فروت، توت فرنگی و هلو به اثبات رسیده است [32]. با افزایش زمان انبارداری متوسط جمعیت میکروارگانیسم‌ها در تمامی بسته بندی‌ها، روند افزایشی معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) را نشان داد (شکل‌های 2 و 3) و همچنین پیش تیمار فراصوت و از طرفی حضور نانوذرات اکسید روی در بسته‌ها بر کاهش جمعیت اشرشیاکلی و ساکارومایسز سرویزیه طی انبارداری در شرایط یخچال اثر معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ). بنابر این می توان چنین نتیجه گرفت که استفاده از بسته بندی‌های ضد میکروبی حاوی نانوذرات اکسیدروی به عنوان یک هردل پس از تیمار فراصوت کوتاه مدت به عنوان هردل دوم اثر هم افزایی مناسبی در به تاخیر انداختن رشد میکروارگانیسم‌ها در آب توت‌فرنگی دارد. استفاده از تیمار (Nano packaging + US4) در مقایسه با (Pure packaging + US12) اثر معنی‌داری بیشتری در به تاخیر انداختن رشد اشرشیاکلی و ساکارومایسز سرویزیه در آب توت‌فرنگی طی انبارداری دردمای 4 درجه سانتی‌گراد نشان داد. این موضوع نشان دهنده تاثیر بیشتر هردل بسته‌بندی ضد میکروبی در برابر هردل فراصوت بر ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌ها در آب میوه توت‌فرنگی طی نگهداری در یخچال است. بیشترین ممانعت کنندگی رشد میکروبی با استفاده از تیمار (Nano packaging + US12) در مقایسه با سایر تیمارها و شاهد برای هر دو سویه میکروبی حاصل شد ( $p < 0.05$ ).



**Fig 2** Effect of sonication and nanocomposite packaging containing nano-ZnO on *E.coli* populations in strawberry juices stored at 4 °C during 20 d. Vertical bars represent standard deviation (n= 3).

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Aureobasidium pullulans*
3. *Enterobacter aerogenes*

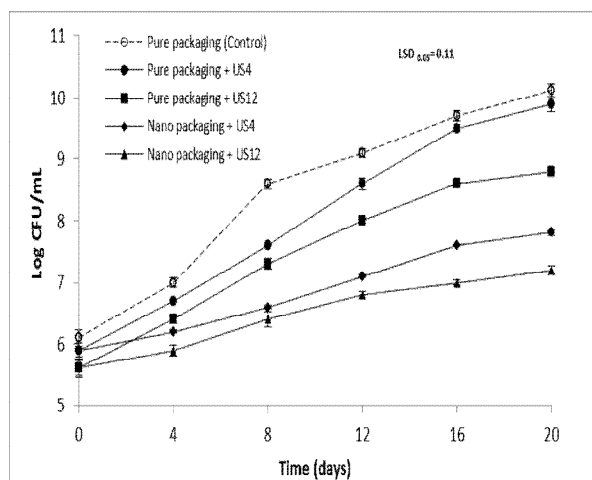
نیز با بررسی پودر اکسیدهای روی، مس و منیزیم خاصیت ضد میکروبی این سه اکسید فلزی را در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها تایید کردند [35].

### 3-3- میزان اسیدیته و مواد جامد محلول

#### بسته‌های آب توت فرنگی طی انبارداری

میزان مواد جامد محلول و اسیدیته در نمونه‌های آب توت فرنگی استریل شده قبل از فراصوت به ترتیب 9/65 و 0/91 درصد اندازه گیری شد. همان طور که در شکل های 4 و 5 مشاهده می گردد استفاده از امواج فراصوت اثر معنی داری بر میزان مواد جامد محلول و اسیدیته آب توت فرنگی تلقیح شده با اشرشیاکلی و ساکارومایسز سرویزیه ندارد. با افزایش زمان انبارداری، افزایش میزان تولید اسید و کاهش مواد جامد محلول در بسته‌های ساده و نانوکامپوزیتی آب توت فرنگی فراصوت شده و بدون اعمال تیمار فراصوت مشاهده گردید ( $p < 0.05$ ). میزان تولید اسید و همچنین مصرف مواد جامد محلول طی مراحل انبارداری در تمامی آب میوه‌های تلقیح شده با ساکارومایسز سرویزیه بیشتر از اشرشیاکلی بود به طوری که در پایان 20 روز انبارداری اسیدیته و مواد جامد محلول به ترتیب در نمونه های شاهد حاوی ساکارومایسز به 1/96 و 5/87 درصد و در نمونه های شاهد حاوی اشرشیاکلی به 1/62 و 7/66 درصد رسید (شکل های 4 و 5). این موضوع نشان دهنده فعالیت بیشتر و سازگاری رشد بیشتر مخمرها در مقایسه با باکتری‌ها در محیط آب میوه است [21]. افزایش تولید اسید در محیط آب میوه با کاهش میزان مواد جامد محلول همراه است که نشان از ادامه یافتن فرایند تخمیر طی دوره انبارداری آب میوه دارد (شکل های 4 و 5).

مطالعات نشان داده است که ساکارومایسز سرویزیه در دامنه دمایی گسترده تری نسبت به اشرشیاکلی در محیط‌هایی نظیر آب میوه‌ها و سبزی‌های زنده می ماند و رشد می کند. آب میوه‌ها به دلیل دارا بودن محیط اسیدی و دارا بودن مقادیر فراوانی از قندهای ساده محیط بسیار مناسبی برای رشد مخمرها و تولید محصولات تخمیری هستند. ساکارومایسز سرویزیه یکی از مهم ترین مخمرهای موثر در ایجاد فساد در آب میوه‌ها و نوشیدنی‌ها بوده و به عنوان معیار تشخیص فساد این نوع محصولات شناخته شده است.

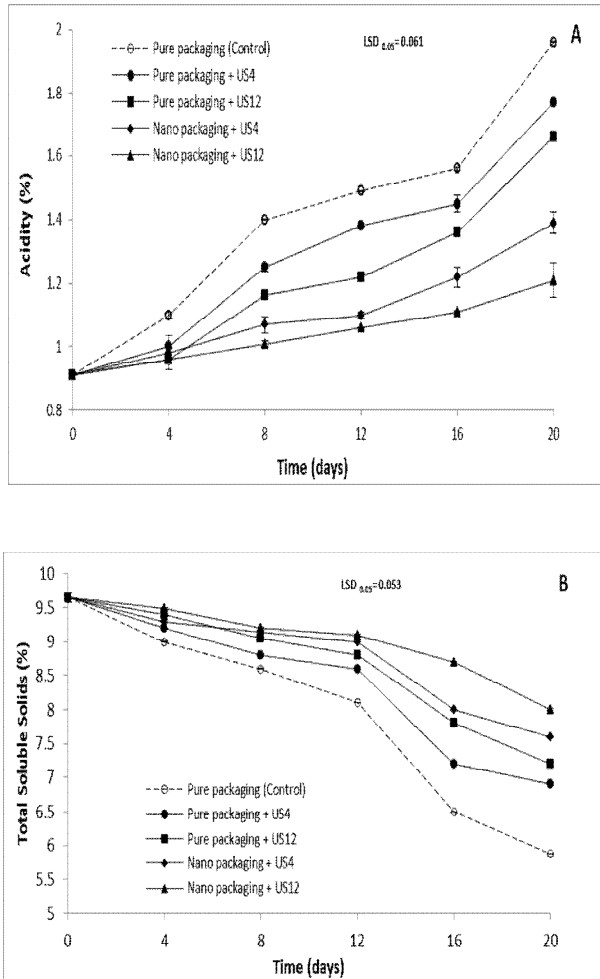


**Fig 3** Effect of sonication and nanocomposite packaging containing nano-ZnO on *S. cerevisiae* populations in strawberry juices stored at 4 °C during 20 d. Vertical bars represent standard deviation (n=3).

بسیاری از تحقیقات اثر ترکیبی فراصوت به عنوان یک هردل با سایر عوامل نگهدارنده و یا ضد میکروبی را به عنوان روشی مناسب برای افزایش کیفیت و یا کاهش بار میکروبی آب میوه بیان نموده اند. لویز مالو و همکاران در سال 1999 اعلام نمودند که مقاومت حرارتی ساکارومایسز سرویزیه با ترکیب فراصوت به همراه فرایند حرارتی با شدت کم، تا 30 برابر کاهش می یابد [33].

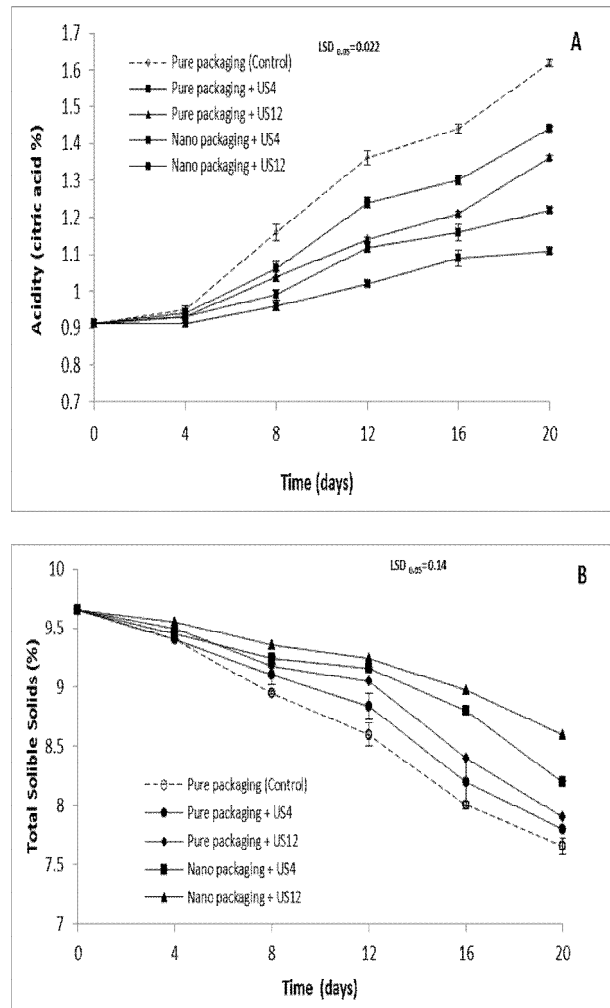
غیر فعال سازی میکروارگانیسم‌ها تحت تابش امواج فراصوت بر اساس دو پدیده فیزیکی و شیمیایی استوار است که در پدیده فیزیکی تشکیل حباب‌های ریز و افزایش حجم آن‌ها طی زمان و در نهایت شکستن و ایجاد نیروی برشی حاصل سبب شکستن دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها می گردد و در پدیده شیمیایی تولید یون های مثبت هیدروژن، رادیکال آزاد هیدروکسیل و یا تولید پراکسید هیدروژن که در اثر هیدرولیز مولکول های آب طی فراصوت تولید می گردد، به عنوان عامل ضد میکروبی اعلام گردیده است [34]. خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدروی را می توان به عواملی نظیر، القای تنش اکسیداتیو به دلیل آزاد سازی گونه‌های اکسیژن فعال حاصل از نانوذرات در سطح غشاء سلول میکروبی و از هم گسیختن آن، انهدام غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها به دلیل تجمع نانوذرات و یا اتصال کاتیون‌های روی بر سطح غشاء مرتبط دانست [23]. ساوای و یوشیکاوا

محلول در پایان 20 روز انبارداری به ترتیب در بسته های Nano packaging + )، (Nano packaging + US12)، (Pure packaging + US4)، (Pure packaging + US12)، (Pure packaging) در مقایسه با شاهد (Pure packaging) با رشد هر دو سویه میکروبی حاصل شد.



**Fig 5** Effect of sonication and nanocomposite packaging containing nano-ZnO on the acidity (A) and Total soluble solids (B) of strawberry juices inoculated with *E. coli* stored at 4 °C during 20 d. Vertical bars represent standard deviation (n= 3)

افزایش معنی دار اسیدیته و کاهش مواد جامد محلول به ترتیب در بسته‌های حاوی ساکارومایسز در مقایسه با اشرشیاکلی در آب میوه با افزایش زمان انبارداری نشان از تاثیر کمتر بسته بندی‌های حاوی نانواکسیدروی بر مخمرها در مقایسه با باکتری‌ها دارد که با نتایج امامی فر و همکاران در سال 2010 هماهنگی دارد.



**Fig 4** Effect of sonication and nanocomposite packaging containing nano-ZnO on the acidity (A) and Total soluble solids (B) of strawberry juices inoculated with *S. cerevisiae* stored at 4 °C during 20 d. Vertical bars represent standard deviation (n= 3)

رشد این نوع میکروارگانیسم‌ها اغلب با مصرف قندهای ساده نظیر گلوکز و فروکتوز در آب میوه‌ها افزایش یافته که طی فرایند تخمیر محصولاتی نظیر انواع اسیدها، الکل و دی اکسید کربن تولید می کنند که در نهایت با ایجاد عطر و طعم نامناسب کاهش مشتری پسندی را به دنبال خواهد داشت [36]. به هر ترتیب استفاده از بسته بندی‌های ضد میکروب حاوی نانو اکسیدروی با ممانعت از رشد سریع ساکارومایسز سرویزیه و اشرشیاکلی، طی دوره انبارداری به صورت معنی داری درمقایسه با شاهد، روند تولید اسید و کاهش مواد جامد محلول را در آب میوه به تاخیر انداختند به طوری که کمترین مقدار اسید و بیشترین مواد جامد



- tangerine and grapefruit juices through ultrasonic atomization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 39, 7-12.
- [2] Odriozola-Serrano, I., Puigpinos, J., Oliu, G. O., & Herrero, E. (2016). Antioxidant activity of thermal or non-thermally treated strawberry and mango juices by *Saccharomyces cerevisiae* growth-based assays. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 55-61.
- [3] Raybaudi Massilia, R., M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín Belloso, O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 157-180.
- [4] Tournas, V. H., Heeres, J., & Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, 23, 684-688.
- [5] Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., Kumar, V., & Kaur, M. (2014). Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *International Journal of Food Science*, Article ID 408085.
- [6] Yildiz, S., Pokhrel, P. R., Unluturk, S., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2019). Identification of equivalent processing conditions for pasteurization of strawberry juice by high pressure, ultrasound, and pulsed electric fields processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 57, 102195.
- [7] Loreda, A. B. G., Guerrero, S. N., & Alzamora, S. M. (2015). Inactivation kinetics and growth dynamics during cold storage of *Escherichia coli* ATCC 11229, *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Saccharomyces cerevisiae* KE162 in peach juice using aqueous ozone. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 271-279.
- [8] Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., & Aneja, A. (2014). Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices. *International Journal of Food Science*, Article ID 758942.
- [9] Cruz-Cansino, N., S., Reyes-Hernández, I., Delgado-Olivares, L., Jaramillo-Bustos, D. P., Ariza-Ortega, J. A., & Ramírez-Moreno, E. (2016). Effect of ultrasound on survival and growth of *Escherichia coli* in cactus pear juice

ساوای و همکاران نیز با بررسی اثر ضد میکروبی پودرهای اکسیدروی، اکسید مس و اکسید منیزیم گزارش کردند که این سه اکسید فلزی دارای قدرت ضد میکروبی مطلوبی در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها بوده اما قدرت ضد میکروبی اکسیدروی بر مخمر ساکارومایسز سرویزیه در مقایسه با باکتری ها بسیار کمتر است [35].

#### 4- نتیجه گیری

اخیراً استفاده از فرایندهای غیر حرارتی در ترکیب با سایر فرایندها با هدف کاهش اثرات نامطلوب فرایندهای حرارتی بر کیفیت و ارزش تغذیه‌ای آب میوه‌ها و حفظ ارزش فراسودمندی آنها رو به افزایش است. استفاده از فناوری هردل به عنوان روشی مناسب با هدف ممانعت از افزایش بار میکروب های مولد فساد و بیماری زا، راهکاری بسیار مناسب در جهت بهبود شرایط تغذیه‌ای و سلامتی جامعه در خصوص مصرف انواع آب میوه‌ها است. لذا در این تحقیق از بسته بندی‌های ضد میکروبی از جنس پلی اتیلن سبک حاوی نانو ذرات اکسید روی (3 درصد وزنی- وزنی) پس از فرایند فراصوت (4 و 12 دقیقه) آب توت فرنگی تلقیح شده با ساکارومایسز سرویزیه به عنوان میکروارگانیسم شاخص مولد فساد و اشرشیاکلی به عنوان میکروارگانیسم شاخص مولد بیماری استفاده شد. نتایج نشان داد که می توان با بکارگیری بسته بندی‌های ضد میکروبی حاوی نانو اکسید روی در مقایسه با بسته بندی‌های معمولی زمان فرایند فراصوت را کاهش و کیفیت میکروبی آب توت فرنگی را تا 20 روز طی انبارداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد حفظ کرد.

#### 5- تشکر و قدردانی

از کلیه عزیزانی که در این تحقیق با ما همکاری داشتند و به ویژه دانشگاه کردستان کمال تشکر به عمل می آید.

#### 6- منابع

- [1] Antonio-Gutiérrez, O., López-Malo, A., Ramírez-Corona, N., & Palou, E. (2017). Enhancement of UVC-light treatment of

- (2018). Optimization of mechanical and color properties of polystyrene/nanoclay/nano-ZnO based nanocomposite packaging sheet using response surface methodology. *Food Packaging and Shelf life*, 17, 11-24.
- [20] Jin, T., Sun, D., Su, J. Y., Zhang, H., & Sue, H. J. (2009). Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, and *Escherichia coli O157:H7*. *Journal of Food Science*, 74, 46-52.
- [21] Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M., & Soleimani-Zad, S. (2010). Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 742-748.
- [22] Polat, S., Fenercioglu, H., Unal Turhan, E., & Guclu, M. (2018). Effects of nanoparticle ratio on structural, migration properties of polypropylene films and preservation quality of lemon juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, e13541.
- [23] Emamifar, A., & Mohamadizadeh, M. (2015). Preparation and application of LDPE/ZnO nanocomposites for extending shelf life of fresh strawberries. *Food Technology and Biotechnology*, 53, 488-495.
- [24] Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M., & Soleimani-Zad, S. (2010). Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice. *Food Control*, 22, 408-413.
- [25] Ferrario, M., Alzamora, S. M., & Guerrero, S. (2013). Inactivation kinetics of some microorganisms in apple, melon, orange and strawberry juices by high intensity light pulses. *Journal of Food Engineering*, 118, 302-311.
- [26] AOAC. (2002). Solids (Soluble) in Fruits and Fruit Product: Refractometer Method. Gaithersburg, MD: Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 932.12.
- [27] AOAC. (2002). Acidity (Titratable) of Fruit Products. Gaithersburg, MD: Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 942.15.
- [28] Alighourchi, H. R., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Abbasi, S. (2014). Evaluation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* during storage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 431-437.
- [10] Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 323-331.
- [11] Soltani Firouz, M., Farahmandi, A., & Hosseinpour, S. (2019). Recent advances in ultrasound application as a novel technique in analysis, processing and quality control of fruits, juices and dairy products industries: A review. *Ultrasonics – Sonochemistry*, 57, 73-88.
- [12] Gao, S., Lewis, G. D., Ashokkumar, M., & Hemar, Y. (2014). Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 2. A simple model for the inactivation mechanism. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 454-460.
- [13] Drakopoulou, S., Terzakis, S., Fountoulakis, M. S., Mantzavinos, D., & Manios, T. (2009). Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal waste water. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 16, 629-634.
- [14] Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Munoz, N., Martic, N. & Lizama, V. (2007). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80, 509-516.
- [15] Tomadoni, B., Cassani, L., Viacava, G., Moreira, M. R., & Ponce, A. (2017). Effect of ultrasound and storage time on quality of strawberry juice. *Journal of Food Processing Engineering*, 4(5), e12533.
- [16] Cheng, L. H., Soh, C. Y., Liew, S. C., & Teh, F. F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chemistry*, 104, 1396-1401.
- [17] Nguyen, C. L., & Nguyen, H. V. H. (2018). Ultrasonic effects on the quality of mulberry juice. *Beverages*, 4, 56, 4030056.
- [18] Khan, I., Tango, C.N., Miskeen, S., Lee, B. H., & Oh, D.H. (2017). Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review. *Food Control*, 73, 1426-1444.
- [19] Fakhri, L. A., Ghanbarzadeh, B., Dehghannya, J., Abbasi, F., & Ranjbar, H.

- [33] Lopez-Malo, A., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. (1999). *Saccharomyces cerevisiae*, thermal inactivation kinetics combined with ultrasound. *Journal of Food Protection*, 62, 1215–1217.
- [34] Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Saeeduddin, M., & Zeng, X. (2015). Qualitative assessment of sonicated apple juice during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39, 1299-1308.
- [35] Sawai, J., Yoshikawa, T. (2004). Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 803–809.
- [36] Patil, S., Valdramidis, V. P., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Bourke, P. (2011). Quantitative assessment of the shelf life of ozonated apple juice. *European Journal of Food Research and Technology*, 232, 469–477.
- inactivation in sonicated pomegranate juice. *Food Science and Technology*, 11, 23-33.
- [29] Adekunle, O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M., & O'Donnell, C. P. (2009). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122, 500-507.
- [30] Koda, S., Miyamoto, M., Toma, M., Matsuoka, T., & Maebayashi, M. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500 kHz. *Ultrasonics-Sonochemistry*, 16, 655–659.
- [31] Sesal, N. C., & Kekeç, Ö. (2014). Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by ultrasound. *J journal of Ultrasound in Medicine*, 33, 1663-1668.
- [32] Nadeem, M., Ubaid, N., Qureshi, T. M., Munir, M., & Mehmood, A. (2018). Effect of ultrasound and chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage. *Ultrasonics – Sonochemistry*, 45, 1-6.

# Influence of sonication and antimicrobial packaging-based nano-ZnO on inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* in strawberry juice during storage

Emamifar, A. <sup>1\*</sup>, Mohamadizadeh, M. <sup>2</sup>

1. Department of Food Sciences and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2. Department of Food Science and Technology, Azad University of Kurdistan, Iran

(Received: 2020/03/03 Accepted:2020/05/02)

The beneficial impact of coupling sonication with 400 W and 24 kHz (4, and 8 min) with LDPE antimicrobial nanocomposite packaging containing nano-ZnO (3:100 w/w) (Pure packaging + US 4, Pure packaging + US 12, Nano packaging + US 4, Nano Packaging + US 12, and Pure packaging (Control)) on inactivation of inoculated *saccharomyces cerevisiae* (spoilage index) and *E.coli* (pathogen index) in strawberry juices during 4, 8, 12, 16., and 20 days (4 °C), was evaluated. Ultrasound technology (both 4 and 12 min) significantly ( $p < 0.05$ ) reduced the population of *saccharomyces cerevisiae* and *E.coli*. Also, the D-value of *S. cerevisiae* was higher than *E. coli* in strawberry juice indicating its higher resistance to sonication. Application of Nano Packaging + US 12 showed the highest-ranked antimicrobial activity to the other sample and control on the population of the both *S. cerevisiae* and *E. coli* inoculated in strawberry juice during 20 days of storage. These achievements paved the way for hurdle technology applications involving combination of antimicrobial packaging containing nano-ZnO with short time sonication in retarding of microbial growth in strawberry juice during cold storage (4 °C).

**Keywords:** Strawberry juice, Sonication, Antimicrobial packaging, Nano ZnO.

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: a.emamifar@basu.ac.ir