

بسته‌بندی فعال پنیر ليقوان با فيلم‌های نانوکامپوزیت پلی اتیلن حاوی نانوذرات فلزی و مدل‌سازی مهاجرت نانوذرات نقره

پریسا عبدالستاری^۱، سیدهادی پیغمبردوست^{۲*}، آیناز مولایی^۱، سیدجمال‌الدین پیغمبردوست^۳، میریوسف هاشمی^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲. استاد تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳. استادیار علوم و تکنولوژی پلیمر، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه تبریز

۴. استادیار، گروه مهندسی مکانیک دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۸/۲)

چکیده

پنیر ليقوان از جمله معروف‌ترین پنیرهای ایرانی است که به دلیل روش‌های سنتی تولید همواره با مشکلات میکروبیولوژیکی فراوانی همراه است. در این پژوهش اثر بسته‌بندی با دو فیلم نانوکامپوزیت پلی‌اتیلن سبک حاوی نانوذرات نقره، اکسید مس و اکسید روی با درصدهای متفاوت بر افزایش عمر نگهداری پنیر در دمای 4°C بررسی شد. آزمون‌های میکروبی پنیر بسته‌بندی شده در بسته‌های فوق‌الذکر بلافاصله پس از تولید، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸ و ۶۰ روز پس از تولید صورت گرفتند. نتایج نشان دادند که بعد از ۶۰ روز نگهداری سرعت رشد کلی فرم و استافیلوکوکوس/اورئوس در پنیر تازه، با استفاده از فیلم ترکیبی حاوی درصدهای مساوی از نقره، اکسید مس و اکسید روی (نمونه شماره ۱) نسبت به سایر فیلم‌ها به صورت معنی‌داری ($P < 0.05$) کمتر است. در صورتی‌که تأثیری بر روند کلی تغییرات باکتری‌های اسیدلاکتیک نداشتند. نتایج آزمون مهاجرت نانوذرات فلزی از بسته‌های حاوی نانوذرات فلزی به مشابه ماده غذایی نیز با توجه به استانداردهای اتحادیه اروپا و اداره غذا و داروی آمریکا بر اینم بودن استفاده از نانوکامپوزیت‌های حاوی نانوذرات فلزی دلالت داشتند. همچنین مدل‌سازی مهاجرت برای نانوذره نقره در مدت ۱۲ ماه نیز صورت گرفت.

واژه‌های کلیدی: بسته‌بندی فعال، پنیر ليقوان، نانوکامپوزیت، مهاجرت نانوذرات فلزی، مدل‌سازی

مقدمه

پنیر ليقوان همواره جایگاه خاصی در سبد کالای مصرف‌کننده ایرانی داشته است اما به دلیل شرایط تولید سنتی و استفاده از شیرخام در تولید آن، تولیدکنندگان از درصدهای بالای نمک جهت کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها در آن بهره می‌جویند که استفاده از آن را برای افراد مبتلا به بیماری‌های قلبی عروقی و فشار خون بالا با محدودیت مواجه می‌کند. از طرفی شرایط بسته‌بندی فله‌ای نامناسب در ظروف حلبی و استفاده چندین و چند باره از این ظروف مزید بر علت شده است تا این پنیر همواره دارای مشکلات میکروبی عدیده باشد. بسته‌بندی مناسب می‌تواند تا حدود زیادی این مشکلات میکروبی را مرتفع سازد.

نانوکامپوزیت‌های فلزی نسل جدیدی از بسته‌بندی‌های فعال ضد میکروبی برای مواد غذایی است که از ترکیب نانوذرات فلزی به ماتریس پلیمری به دست می‌آید. کارایی بالای نانوذرات

به دلیل نسبت سطح به حجم بالای آن است که دلیل اصلی افزایش فعالیت ضد میکروبی نانوذرات فلزی است. فلزات می‌توانند به شکل نانوذرات جامد یا اکسید فلزات در انواع مختلف مواد پلیمری مثل پلی‌اتیلن، پلی‌پروپیلن، پلی‌وینیل کلراید و کیتوزان ترکیب شوند (Magana et al., 2008). برای قرن‌ها نقره برای درمان سوختگی‌ها و زخم‌های مزمن استفاده می‌شد (Rai and Yadav, 2009). در بین عناصر ضد میکروبی معدنی، یون‌های نقره و ترکیبات بر پایه نقره در سطح بالایی از رشد میکروبی جلوگیری می‌کنند و اثر میکروب‌کشی قوی روی گونه‌های زیادی از باکتری‌ها مثل *شریشیاکلی* از خود نشان می‌دهند. واکنش یون‌های نقره با ترکیبات سیتوپلاسمی و نوکلئیک اسیدهای میکروبی می‌تواند از عملکرد آنزیم‌های زنجیره تنفسی ممانعت کند و نیز در نفوذپذیری غشا مداخله نماید و رشد و توسعه باکتری‌ها و مخمرها را محدود نماید (Han, 2013). مس به دلیل اینکه برخلاف فلزات ضد میکروبی دیگر طیف گسترده‌ای از فعالیت‌ها را علیه باکتری و قارچ نشان می‌دهد، مورد توجه ویژه است. کارایی مس بستگی به شرایط

* نویسنده مسئول: peighambardoust@tabrizu.ac.ir

نوترینو چین، نانوذرات اکسید مس با درصد خلوص ۹۹٪ در اندازه کمتر از ۵۰ نانومتر و مساحت سطح مخصوص بیش از $80 \text{ m}^2/\text{g}$ با ظاهر تیره رنگ از شرکت نوترینو چین و نانوذرات روی از شرکت TECNAN اسپانیا خریداری شدند. این نانوذرات دارای رنگ سفید، خلوص ۹۹/۹۸۳٪، سطح مخصوص m^2/g ۳۵-۳۰ و میانگین اندازه ذرات ۲۰-۳۰ nm می‌باشند. محیط‌های کشت میکروبی شامل ام آر اس آگار^۳ جهت بررسی لاکتوباسیلوس‌ها، ویولت رد بایل آگار^۴ برای بررسی گروه کلی فرم و مانیتول سالت آگار^۵ جهت کشت استافیلوکوکوس/اورئوس بودند که همگی از شرکت شارلو^۶ اسپانیا تهیه گردید (استاندارد ملی ایران، ۲۴۰۶).

روش تهیه فیلم‌های نانوکامپوزیتی

برای مخلوط کردن مواد اولیه و انجام فرآیند اکستروژن و تهیه نانوکامپوزیت مورد نظر، از اکسترودر با نام تجاری پلاتک مدل اس ام (PLATEK SM) ساخت کشور کره جنوبی استفاده شد. درجه حرارت مناطق مختلف اکسترودر از قسمت تغذیه تا خروجی به ترتیب ۱۲۵، ۱۴۵، ۱۵۵، ۱۷۰، ۱۸۵، ۱۹۵، ۱۹۵ و ۲۰۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. دور فیدر 2000 rpm ، دور اکسترودر $1400-1420 \text{ rpm}$ ، فشار اکسترودر $12/5$ بار و دمای ذوب 200°C بوده است. پس از اطمینان از تمیز شدن مسیر و ایجاد شرایط مذکور، پلی‌اتیلن و نانوذرات فلزی با درصد‌های معین وزن شده به خوبی با هم مخلوط و از طریق کیف تغذیه وارد محفظه اکسترودر گردیدند. مواد طی عبور از داخل اکسترودر ذوب شده و با اعمال انواع نیروهای برشی و فشاری به طور کامل با هم مخلوط شدند. مذاب حاصل به صورت نوری از قالب انتهایی اکسترودر خارج شده و با عبور از حوضچه آب سرد، خنک شده و وارد دستگاه گرانول‌ساز گردید. برای تولید فیلم از اکسترودر دو پیچه با نام کستینی (Castiny) ساخت کشور ایتالیا استفاده شد. در این مرحله گرانول‌های تهیه شده از قسمت تغذیه وارد دستگاه شده و بعد از حرارت‌دهی و اختلاط، به صورت فیلمی نازک بر روی غلطک خنک‌کننده پخش شده و همزمان با خنک شدن به وسیله چند غلطک سرد متوالی (Chill-Rolls) کشیده شده و در انتهای دستگاه به دور لوله‌ای چرخانده می‌شود. دمای نواحی مختلف این اکسترودر نیز به ترتیب ۲۳۹، ۲۳۹، ۲۲۳، ۲۲۳، ۲۱۸، ۲۱۵، ۱۸۵ درجه سلسیوس بود. دور غلتک خنک‌کننده 8 rpm و دمای آن 26°C بود که با گردش آب سرد حاصل از چیلر بدست می‌آید.

محیطی، غلظت یون مس و نوع میکروارگانیسم دارد. عامل مهم در ایجاد خواص ضد میکروبی مس توانایی آن در دهنده‌گی و گیرنده‌گی الکترون است، به طوری که قابلیت زیادی در کاتالیز واکنش‌های اکسیداسیون و احیا دارد. زمانی که مس در حالت اکسیده قرار دارد، به علت تداخل با اسیدهای نوکلئیک، جایگاه فعال آنزیم‌ها و اجزای دیواره سلولی باعث مرگ سلول‌های میکروبی می‌شود (Bruna et al., 2012). در سال‌های اخیر نانوذرات اکسید روی به عنوان یکی از مواد معدنی چند منظوره توجه بسیاری را به خود جلب کرده اند که این به دلیل برخی از خواص مهم آن از جمله پایداری شیمیایی بالا، ثابت دی‌الکتریک کم، ضریب الکترومکانیکی بالا، فعالیت‌های کاتالیزوری بالا، جذب شدید اشعه‌های ماوراءبنفش و مادون قرمز می‌باشد (Sawai, 2003). علاوه بر این، در حال حاضر روی توسط سازمان غذا و داروی آمریکا به عنوان یک ماده ایمن^۱ شناخته شده است. ذرات اکسید روی هم بر روی باکتری‌های گرم مثبت و هم بر باکتری‌های گرم منفی اثر ممانعت‌کنندگی دارند. همچنین در فشار بالا و دمای بالا بر روی اسپورهای باکتریایی نیز اثر ممانعت‌کنندگی دارند (Llorens et al., 2012). بنابراین هدف از این پژوهش عبارت است از بررسی تاثیر نانوذرات فلزی و کاربرد بسته‌های پلیمری حاوی نانوذرات نقره، اکسید مس و اکسید روی جهت نگهداری پنیر لیقوان و بررسی ویژگی‌های میکروبی و رهاسازی نانوذرات فلزی و مدل‌سازی مهاجرت نانوذرات فلزی.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

پنیر از کارگاه تولید پنیر سنتی از روستای لیقوان تهیه شد درصد ترکیبات پنیر در جدول ۱ آمده است. دو نوع نانوکامپوزیت پلی‌اتیلن حاوی نانوذرات فلزی در پتروشیمی تبریز به روش برهمکنش مذاب در اکسترودر دو مارپیچ تهیه گردیدند و نتایج با فیلم شاهد (پلی‌اتیلن خالص) مقایسه شدند.

ترکیب فیلم‌های بکار رفته در جدول ۲ آمده است (IRIPO, 2014; Beigmohammadi et al., 2015) برای تهیه فیلم‌ها از پلی‌اتیلن دانسیته پایین نوع LH0075 (شرکت پتروشیمی بندر امام) بعنوان شبکه پلیمری استفاده شد. نانوذرات نقره با درصد خلوص ۹۹/۵٪ در اندازه ۳۵ نانومتر و سطح مخصوص^۲ $10/4 \text{ m}^2/\text{g}$ با ظاهر نقره‌ای رنگ از شرکت

3. Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar
4. Violet Red Bile Lactose Agar, (VRBA)
5. Mannitol Salt Agar, (MSA)
6. Scharlau

1. Generally Recognized As Safe (GRAS)
2. Specific Surface Area (SSA)

جدول ۱. درصد ترکیبات پنیر لیقوان به کار رفته در پژوهش

درصد چربی	اسیدیته (دورنیک)	درصد نمک	درصد خاکستر	پروتئین	pH	درصد ماده خشک
۱۹٫۵	۵۵٫۶	۲٫۵	۵٫۸	۱۲٫۲	۵٫۱۳	۳۹٫۹۸

جدول ۲. نام‌گذاری و نوع فیلم‌های به کار رفته در پژوهش

تیمار	ترکیب و درصد
۱	Ag 33%+ CuO 33%+ ZnO 33%
۲	CuO 67%+ ZnO 33%
۳	LDPEخالص (فاقد نانوذرات)

اندازه‌گیری رنگ

بررسی کمی رنگ پنیر لیقوان با روش تصویربرداری دیجیتالی انجام شد. به این ترتیب که پس از تصویربرداری با استفاده از دوربین عکاسی دیجیتالی (مدل SONY) ساخت ژاپن از نمونه های پنیر و انتقال تصاویر به رایانه، با استفاده از نرم افزار فتوشاپ (Adobe photoshop, 7.0 ME) نسخه ۷ شاخص‌های اصلی رنگ ($L^* a^* b^*$) محاسبه شدند (Yam et al., 2004).

روش آماری

این تحقیق در قالب آزمایشات فاکتوریل بر پایه طرح آماری کاملاً تصادفی در دو تکرار اجرا شد. فاکتور اول، نوع بسته بندی در سه سطح مختلف (نمونه شماره ۱ حاوی ۰/۳۳٪ نقره، ۰/۳۳٪ اکسید مس و ۰/۶۷٪ اکسید روی)، نمونه شماره ۲ (حاوی ۰/۶۷٪ اکسید مس، و ۰/۳۳٪ اکسید روی) و بسته‌های پلی‌اتیلنی، بدون افزودن نانوذرات، به عنوان نمونه شاهد) و فاکتور دوم، زمان انبارداری در ۵ سطح (بلافاصله پس از بسته‌بندی، روز ۷، روز ۱۴، روز ۲۱، روز ۲۸ و روز ۶۰ انبارداری) بود. وجود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها به کمک روش مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ و با استفاده از نرم افزار SPSS 19 تعیین شد.

آزمون مهاجرت نانوذرات فلزی

آزمون مهاجرت نانوذرات فلزی براساس قوانین اروپا برای مواد پلاستیکی در تماس با سطح غذا (قوانین 82/711/EEC و 85/572/EEC) انجام شد. آزمون مهاجرت با مشابه غذایی برای مواد غذایی اسیدی همچون پنیر با اسیداستیک ۳٪ (حجمی/حجمی) صورت گرفت. کیسه‌هایی با ابعاد $15 \times 15 \text{ cm}^2$ از فیلم‌های نانوکامپوزیتی تهیه شدند و با ۲۰۰ ml از محلول اسیداستیک (Merck Darmstadt, Germany) پر شده سپس دوخت حرارتی شد و در 40°C به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند (Huang et al., 2011; Echegoyen and Nerin, 2013). اندازه گیری غلظت نانوذرات فلزی توسط اسپکتروسکوپی جذب اتمی الکتروترمال انجام شد. کالیبراسیون دستگاه برای هر نوع نانوذره توسط محلول‌های استاندارد و سپس رسم منحنی استاندارد انجام شد. محلول استاندارد یون‌های فلزی توسط رقیق نمودن محلول‌های استاندارد تهیه شد. اسپکتروسکوپی جذب

روش تهیه بسته های پنیر

۵۰ گرم پنیر لیقوان تازه در ابعاد $7 \times 7 \times 1 \text{ cm}$ بریده شد سپس نسبت به بسته‌بندی آن در بسته‌های محتوی (۰/۳۳٪ نقره، ۰/۳۳٪ اکسید مس، ۰/۳۳٪ اکسید روی) به عنوان نمونه شماره ۱ و بسته حاوی (۰/۳۳٪ اکسید روی + ۰/۶۷٪ اکسید مس) به عنوان نمونه شماره ۲ و همچنین در فیلم پلی‌اتیلن سبک خطی به عنوان نمونه شماره ۳ یا شاهد قرار گرفت و دوخت بسته‌ها در ۳ تکرار توسط دستگاه پرس پلاست گروه صنعتی مانا ساخت ایران دارای تایمر صورت گرفت.

آزمون‌های میکروبی

آزمایش‌های میکروبی شامل لاکتوباسیلوس، کلی‌فرم و استافیلوکوکوس اورئوس بود. که بطور خلاصه به شرح زیر می‌باشند:

- ۱- تهیه رقت‌های اعشاری متوالی از نمونه با رقیق کننده رینگر؛
- ۲- انتقال ۱ میلی لیتر از رقت‌های ساخته شده به پلیت خالی استریل؛
- ۳- افزودن ۲۰-۱۵ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت مفروض و کشت به صورت پورپلیت؛
- ۴- گرمخانه گذاری در دمای 35°C بعد از بسته شدن آگار (کلی‌فرم ۴۸-۲۴ ساعت، لاکتوباسیلوس در داخل جار بی‌هوازی به مدت ۴۸-۷۲ ساعت و استافیلوکوکوس اورئوس ۴۸-۲۴ ساعت)؛
- ۵- شمارش کل کلنی‌های رشد یافته در یک پلیت (a)؛
- ۶- $a \times \text{عکس رقت} \times \text{عکس حجم} = \text{تعداد کلنی مورد نظر در هر گرم نمونه در هر پلیت}$ (Valipour Motlagh et al., 2012).

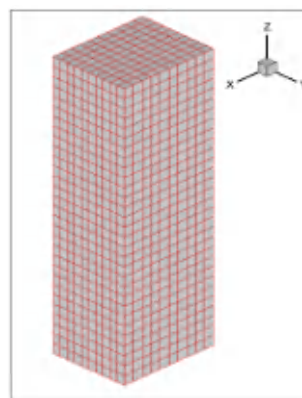
انمی (NOVAA400) ساخت شرکت ANALYTIKJENA آلمان مجهز به کوره گرافیتی برای تعیین یون‌ها به کار رفت.

مدل آزمون مهاجرت

مدل‌سازی مهاجرت نانوذرات نقره از ماتریس پلیمر به مواد غذایی به روش پیمایش از زمان و حل معادلات با استفاده از روش عددی حجم محدود، با توسعه برنامه کامپیوتری در زبان برنامه نویسی فرترن^۱ نسخه 5.1 صورت گرفته و نتایج با داده‌های تجربی موجود مقایسه شدند. برای یک بسته ماده غذایی که نه جرمی وارد و نه از آن خارج می‌شود و سیال داخل آن در شرایط استاتیک است معادله حاکم به صورت زیر خواهد بود:

$$D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) = \frac{dc_{cv}}{dt} \quad (\text{رابطه ۲})$$

در این تحقیق با توجه به اینکه معادله حاکم از قوانین بقاء استخراج شده است از روش حجم محدود استفاده می‌شود که در آن قوانین بقاء ارضاء می‌گردد. به همین منظور بسته مواد غذایی به المان‌های کوچک گسسته‌سازی شده و معادله حاکم نیز گسسته‌سازی شده و به روش عددی حل می‌شود. در شکل ۱ یک بسته ماده غذایی به شکل مکعب را که به المان‌های شش وجهی گسسته‌سازی شده، مشاهده می‌شود.



شکل ۱. گسسته‌سازی میدان به حجم‌های محدود شش وجهی.

با توجه به این امر که حداکثر زمان نگهداری پنیر لیقوان در حدود یک سال است مدل‌سازی بر این مبنا تعریف شد از طرفی به علت نگرانی در مورد مهاجرت عنصر نقره به ماده غذایی مدل‌سازی فقط برای این عنصر انجام شد.

نتایج و بحث

شمارش میکروبی

اکثر مطالعات مرتبط با فیلم‌های نانوکامپوزیتی بر روی یک یا دو نانوذره تمرکز کرده اند (Zapata et al., 2011; Emamifar et al., 2011).

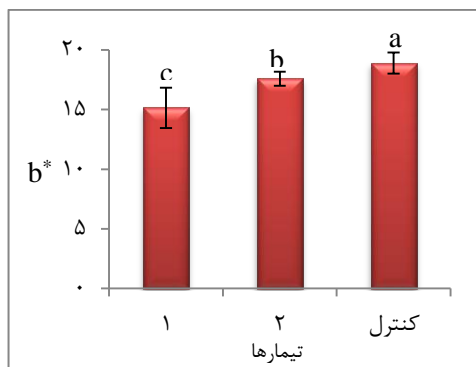
(al., 2010; Jokar et al., 2012)، در حالی که در این مطالعه از ۳ نوع نانوذره استفاده شده است که علت آن کاهش و یا حذف غلظت نانوذرات نقره در بسته‌بندی است که هم گرانتیمنت بوده و هم سمی است. بلافاصله پس از بسته‌بندی متوسط لگاریتم تعداد کلنی در گرم (Logcfu/g) کلی‌فرم، لاکتوباسیلوس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۵/۰۶، ۸/۰۳ و ۴/۱۶ شمارش شد. اثر بسته‌بندی‌های ضد میکروبی بر رشد میکروارگانیسم در مقایسه با نمونه کنترل در جدول ۲ آمده است. نتایج حاصل از شمارش کلی‌فرم، لاکتوباسیلوس و استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر لیقوان موجود در بسته‌بندی کنترل (پلی‌اتیلن خالص) با گذشت زمان افزایش نشان می‌دهد. این نتایج مطابق با یافته‌های Sinigaglia et al. (2008) و Panfil- (2006) است که در نمونه کنترل روند افزایشی در طی مدت زمان نگهداری پنیر دیده می‌شود، در حالی که در سایر نمونه‌ها روند کاهشی به صورت معنی‌داری ($p < 0.05$) قابل مشاهده است.

مطابق با استاندارد صنعتی ژاپن JIS Z 2801:2000 که از استاندارد ISO 22196:2007 مشتق شده است فعالیت ضد میکروبی $R > 2 \log cfu/cm^2$ لازم است تا فیلم نانوکامپوزیتی بسته‌بندی مواد غذایی خاصیت ضد میکروبی داشته باشند، R اختلاف غلظت بین لگاریتم بار میکروبی نمونه‌های تیمار شده و نمونه‌های شاهد است (Panea et al., 2013)

همچنین با توجه به جدول ۳ نمونه شماره ۱ (۰/۳۳٪) نقره، ۰/۳۳٪ اکسید مس، ۰/۳۳٪ اکسید روی) در مقایسه با نمونه شماره ۲ (۰/۳۳٪ اکسید روی، ۰/۶۷٪ اکسید مس) تاثیر معنی‌دار ($p < 0.05$) بیشتری بر کاهش کلی‌فرم و استافیلوکوکوس اورئوس داشته است و با گذشت ۲۸ روز از زمان نگهداری سبب کاهش نزدیک به ۳ سیکل لگاریتمی کلی‌فرم و استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به فیلم کنترل بعد از ۴ هفته نگهداری شده است که نشان‌دهنده فعالیت ضد میکروبی بالاتر نانوذرات نقره نسبت به سایر نانوذرات فلزی است، که با یافته‌های پژوهش Gumiero et al. (2013) که در نمونه شاهد روند افزایشی و در سایر نمونه‌ها روند ثابت و رو به کاهشی را مشاهده کردند، سازگاری دارد. همچنین (Incoronato et al., 2011) در پنیر سنتی فیوردیلاته^۲ گروه کلی‌فرم و استافیلوکوکوس اورئوس در همه نمونه‌ها ابتدا روند افزایشی سپس ثبات را نشان داد و در نمونه‌های حاوی نانوذرات فلزی روند افزایشی به مراتب کندتر از سایر نمونه‌ها بود.

2. Fior di Latte

1. Fortran



شکل ۴. مقایسه میانگین شاخصه b در نمونه‌های پنیر در روز ۱۶۰م

نتایج آزمون مهاجرت نانوذرات فلزی

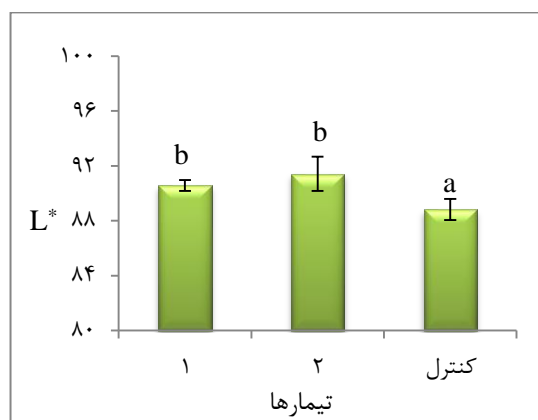
نتایج آزمون مهاجرت نانوذرات فلزی در جدول ۴ آمده است. نانوذرات نقره و اکسید مس در صورت مهاجرت در زیر حد مجاز بر روی سلول‌های یوکاریوت تأثیری ندارند. برای آشکار شدن خاصیت ضد میکروبی نقره در آب یا سیستم‌های بافری مقدار ۱۰۰-۱۵ ppb مورد نیاز است. اداره غذا و داروی آمریکا^۱ استفاده از نقره بعنوان ضد میکروب در آب‌های بطری شده با حداکثر غلظت ۱۷ ppb مجاز دانسته شده است. طبق استاندارد اتحادیه اروپا^۲ (EU, 2011) مقدار مجاز مهاجرت یون نقره ۵۰ ppb گزارش شده است. نقره از طریق واکنش با مواد سیتوپلاسمی و اسید نوکلئیک، تغییر فعالیت آنزیم و شلاته کردن گروه تیول پروتئین‌ها، واکنش با ریبوزوم و جلوگیری از نسخه‌برداری آنزیم، تداخل در نفوذپذیری غشا سلولی و تحریک خروج پروتون و اختلال در زنجیره تنفسی سبب مرگ میکروارگانیسم‌ها می‌شود. مس در اکثر غذاها مانند گوشت و سبزیجات سبز در غلظت کمتر از ۲ ppm وجود دارد. اما در کاکائو و کبد غلظت آن به ۳۹ ppm می‌رسد. در غلظت کم بعنوان کوفاکتور برای متالوآنزیم‌ها و پروتئین‌ها عمل می‌کنند. در مقایسه با نقره خاصیت ضد میکروبی کمی دارد و غلظت آن بایستی ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آب باشد تا ۱۰^۶ سلول ساکارومایسس سروریه را از بین ببرد (Llorens *et al.*, 2012a). موسسه مرجع ایمنی غذای اروپا^۳ در سال ۲۰۰۵ عنوان نمود که میزان مجاز یون مس در غذا ۵۰ ppm است. روی از ترکیبات ایمن^۴ بوده و برای بسیاری از متالوآنزیم‌ها ضروری است و با وجود دارا بودن خاصیت ضد میکروبی کمتر از نقره، ارزاتر می‌باشد.

در این تحقیق نیز میزان مهاجرت نانوذرات فلزی بسیار پایین بوده بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که خاصیت ضد

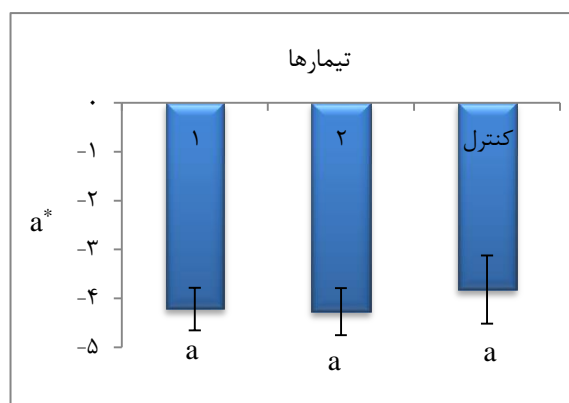
باکتری‌های لاکتوباسیلوس پنیر طی نگهداری در بسته‌های حاوی نانوذرات فلزی (نمونه شماره ۱ و نمونه شماره ۲) با گذشت زمان کاهش می‌یابد در حالی که در نمونه کنترل این روند در طی مدت زمان نگهداری افزایشی است که با مطالعه Dukalska *et al.* (2011) مطابقت دارد.

نتایج آزمون رنگ

اندازه‌گیری رنگ نمونه‌ها فقط در شصتیمین روز در مورد شاخص‌های L*، a و b صورت گرفت. نتایج به‌دست آمده از آنالیز رنگ و شاخص L* (شامل دو رنگ مکمل سیاه و سفید) در شکل ۲ آمده که تفاوت معنی‌داری بین نمونه شاهد با سایر تیمارها را نشان می‌دهد ($p < 0.05$). تفاوت معنی‌داری در مورد شاخص a (شامل دو رنگ مکمل قرمز و سبز) مشاهده نشد (شکل ۳). نتایج به‌دست آمده از آنالیز رنگ و شاخص b (شامل دو رنگ مکمل زرد و آبی) در شکل ۴ آمده است. تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌ها مشاهده می‌شود ($p < 0.05$). بالاترین رنگ زرد مربوط به نمونه شماره ۳ (شاهد) و کمترین مقدار مربوط به نمونه شماره ۱ (نقره، ۰.۳۳٪، اکسید مس، ۰.۳۳٪) است (Dukalska *et al.*, 2011).



شکل ۲. مقایسه میانگین شاخص L در نمونه‌های پنیر در شصتیمین روز.



شکل ۳. مقایسه میانگین شاخص a در نمونه‌های پنیر در شصتیمین روز.

1. FDA (Food and Drug Administration)
 2. European Union
 3. EFSA (European Food Safety Authority)
 4. GRAS (Generally Recognized as Safe)

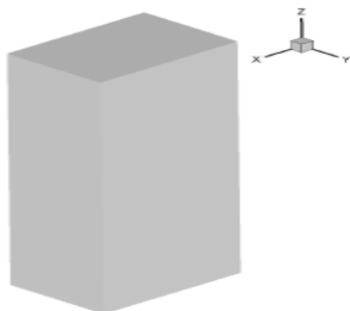
ویسکوزیته ارائه شده توسط رینولدز برای آب (رابطه ۱)، رابطه‌ای برای آب پنییر (رابطه ۲) به صورت زیر ارائه کرد (Reynolds, 1886):

$$\eta(T) = \frac{0.0177931}{1 + 0.0336794 \cdot T + 0.0002209936 \cdot T^2} \quad (\text{رابطه ۱})$$

* نامگذاری و ترکیبات فیلم‌ها در جدول ۲ آمده است.

$$\eta(T) = \frac{\eta_a}{1 + 0.034 \cdot (T - T_0) + 0.000725 \cdot (T - T_0)^2} \quad (\text{رابطه ۲})$$

در شکل ۵ نمونه هندسی بسته ماده غذایی مشاهده می‌شود. میدان مربوط به ماده غذایی به حجم محدودهای شش وجهی تقسیم‌بندی شده است و در کل دارای ۱۰ سلول است و شامل ۵۲۹۱ سطح است که ۹۲۲ عدد از سطوح شامل مرزها و به عبارتی در تماس با پوشش پلیمری می‌باشد. در شکل ۶ میدان شبکه‌بندی شده مشاهده می‌گردد.



شکل ۵. هندسه ظرف بسته‌بندی آب پنییر.

میکروبی این نانوکامپوزیت‌ها مربوط به نانوذرات فلزی تثبیت شده بر روی فیلم می‌باشد. این نتیجه قبلاً توسط محققین دیگر نیز بدست آمده بود (Nigmatullin *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2005).

نتایج مدل‌سازی مهاجرت نانوذرات فلزی طی ۱۲ ماه

به منظور بررسی برنامه کامپیوتری توسعه داده شده برای مدل‌سازی مهاجرت نانوذرات یک مدل استفاده شده در بررسی‌های آزمایشگاهی بصورت زیر منظور شده است:

یک بسته دارای ماده غذایی که با ابعاد $5 \times 3.5 \times 11.5$ که سطح بیرونی آن پلیمر پلی‌اتیلن با دانسیته پائین^۱ با گرید LH0075 با چگالی 921 kg/m^3 با ضخامت 80 mm می‌باشد در نظر گرفته شده است. قطر نانوذره نقره 35 nm و چگالی آن 10490 kg/m^3 است. قطر متوسط انتخاب شده براساس تصاویر میکروسکوپی تعیین شده و نانوذرات بصورت کروی منظور شده‌اند.

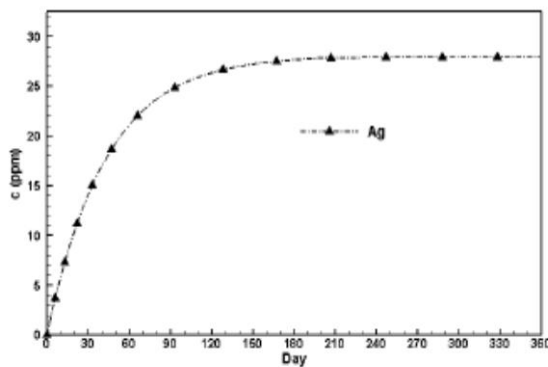
ماده غذایی منظور شده برای مدل‌سازی آب‌پنییر دارای لاکتوز (۵٪) است که در دماهای مختلف قرار گرفته است. با توجه به اینکه ویسکوزیته آب‌پنییر در دمای 20°C توسط Gonzalez-Tello *et al.* (2009) به ترتیب برابر $1/3 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$ گزارش شده است، می‌توان به کمک مقدار فوق و رابطه تعیین

1. LDPE (Low-density polyethylene)

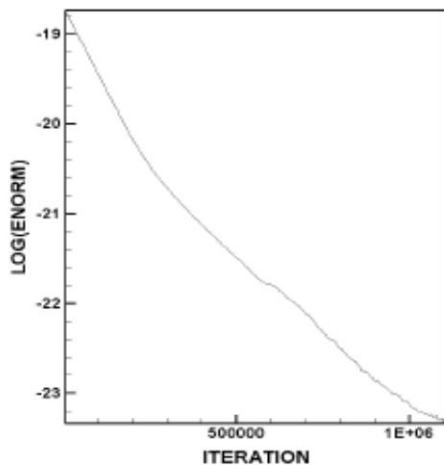
جدول ۳. اثر بسته‌بندی و زمان انبارداری بر ویژگی‌های میکروبی (کلی‌فرم، لاکتوباسیلوس و استافیلوکوکوس اورئوس) در پنییر

استافیلوکوکوس اورئوس (Log cfu/g)	لاکتوباسیلوس (Log cfu/g)	کلی فرم (Log cfu/g)	طول انبارداری (روز)	تیمار	نوع بسته‌بندی
4.16 ± 0.41^e	8.03 ± 0.23^j	5.06 ± 0.15^{ed}	۰		Ag 33% +
3.80 ± 0.73^f	8.15 ± 0.28^i	4.70 ± 0.97^f	۷		CuO 33% +
3.44 ± 0.79^g	8.29 ± 0.32^{hg}	3.95 ± 0.17^h	۱۴		ZnO 33%
3.12 ± 0.115^h	8.66 ± 0.60^f	3.60 ± 0.115^i	۲۱	۱	
2.55 ± 0.213^i	9.08 ± 0.23^c	2.97 ± 0.29^j	۲۸		
1.84 ± 0.132^j	8.78 ± 0.65^{ef}	2.16 ± 0.52^l	۶۰		
4.16 ± 0.41^e	8.03 ± 0.23^j	5.06 ± 0.15^{ed}	۰		Ag 0% +
3.86 ± 0.34^f	8.21 ± 0.27^h	4.89 ± 0.115^e	۷		CuO 67% +
3.66 ± 0.10^{fg}	8.39 ± 0.20^g	4.20 ± 0.52^g	۱۴	۲	ZnO 33%
3.28 ± 0.88^g	8.93 ± 0.59^d	3.81 ± 0.149^h	۲۱		
3.10 ± 0.22^h	9.03 ± 0.75^c	3.05 ± 0.124^j	۲۸		
2.06 ± 0.52^i	8.90 ± 0.110^{ef}	2.66 ± 0.43^k	۶۰		
4.16 ± 0.41^e	8.03 ± 0.23^j	5.06 ± 0.15^{ed}	۰		LDPE
8.24 ± 0.279^{ed}	8.38 ± 0.40^g	5.11 ± 0.109^d	۷		خالص (فاقد نانوذرات)
3.30 ± 0.08^d	9.01 ± 0.27^c	5.29 ± 0.46^d	۱۴		
8.56 ± 0.34^c	9.44 ± 0.03^b	5.59 ± 0.63^c	۲۱	۳	
8.14 ± 0.145^b	10.01 ± 0.27^a	5.90 ± 0.126^b	۲۸		
8.69 ± 0.09^a	9.59 ± 0.31^b	6.70 ± 0.102^a	۶۰		

*حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد می‌باشند ($p < 0.05$).



شکل ۷. تغییرات غلظت نقره بر حسب ppm در داخل آب پنیر در طول ۳۶۰ روز در فیلم ۱.



شکل ۸. نمودار همگرایی حل معادله نفوذ برای ماده غذایی بر حسب تکرار.

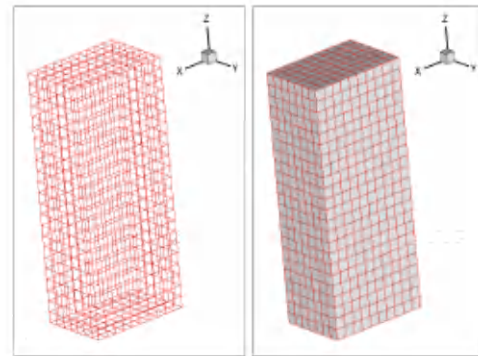
در پایان ماه‌های یک، ششم و دوازدهم غلظت نانوذرات نقره بصورت توزیعی در شکل ۹ نشان داده شده است. همانگونه که در شکل ۹ مشاهده می‌گردد در گوشه‌های ظرف بسته‌بندی ماده غذایی میزان تغییر غلظت نانوذرات نقره در داخل ماده غذایی بیشتر است و علت آن زیادی سطح تماس آن نواحی با پوشش پلیمری نسبت به بقیه نواحی می‌باشد. در نهایت میزان مهاجرت نانوذره نقره در فیلم ۱ را در دمای ۲۰ °C طبق مدل طی ۳۶۰ روز نگهداری ppm ۱۰/۳۰ به دست آمد.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از فیلم‌های پلی‌اتیلنی حاوی درصد مساوی نانوذرات نقره، اکسید مس و اکسید روی می‌تواند سبب کاهش بیشتر بار میکروبی پنیر شود. با توجه به اینکه شیر مصرفی در تولید این نوع پنیر سالم سازی نمی‌شود، این نوع بسته‌بندی می‌تواند نقطه قوت خوبی در کاهش بار کلی‌فرم‌ها باشد. در حالی که رشد لاکتوباسیلوس‌ها که باکتری‌های مفید و عملگرای پنیر لیقوان هستند و عامل ایجاد

جدول ۴. نتایج آزمون مهاجرت نانوذرات فلزی

مورد آنالیز تیمارها	نقره (ppb)	مس (ppm)	روی (ppm)
نمونه ۱*	۳۷,۴۲	۷,۴۵	۱,۵۵
نمونه ۲	-	۸,۴۴	۱,۸۳



شکل ۶. شبکه میدان مربوط به آب پنیر.

مدل‌سازی برای نگهداری فیلم ۱ در دمای ۲۰ °C برای نانوذره نقره

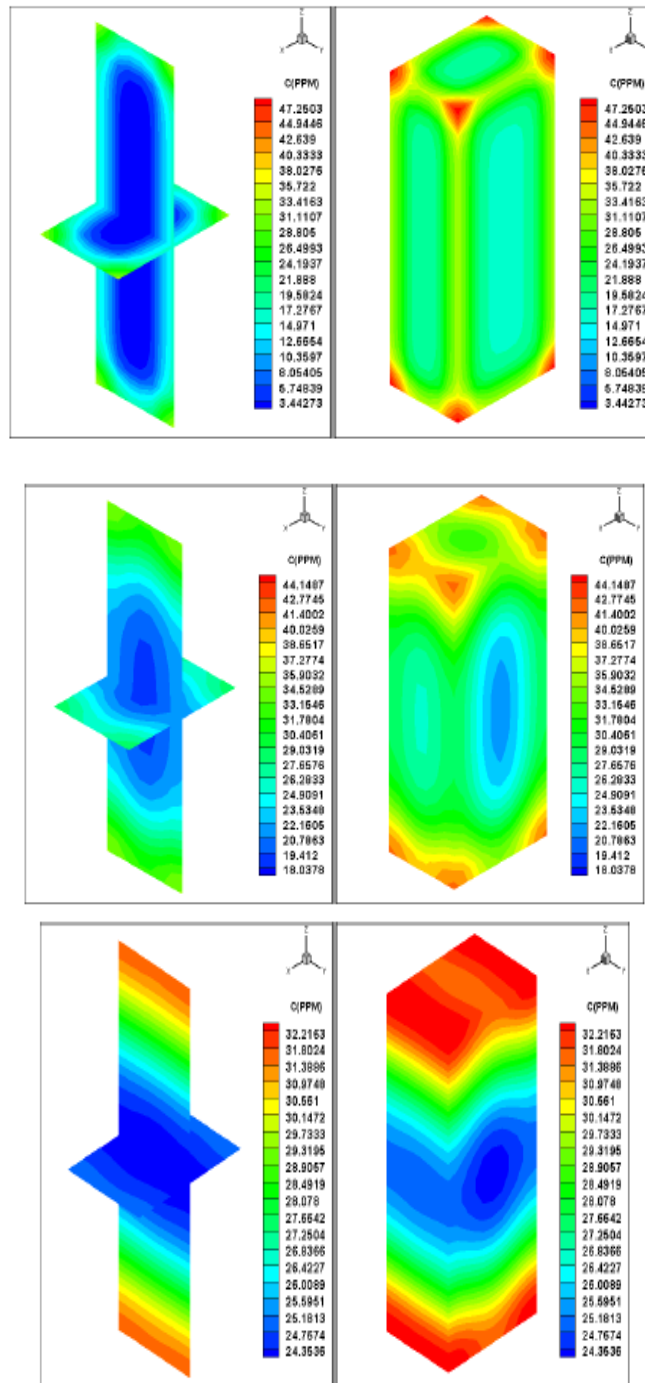
با توجه به اینکه دمای محیط استاندارد تقریباً ۲۰ °C منظور می‌شود در این قسمت از تحقیق به بررسی میزان مهاجرت نانوذرات از پوشش پلیمری بسته‌بندی به ماده غذایی در دمای ۲۰ °C پرداخته شده است. به همین منظور برنامه کامپیوتری اجرا شده و غلظت نانوذره نقره در ماده غذایی در شکل ۷ نشان داده شده است. همانگونه که در شکل ۷ مشاهده می‌گردد، بعد گذشت یک زمان مشخص (در حدود ۷ ماه) غلظت نانوذرات در ماده غذایی ثابت می‌ماند و علت آن تعادل غلظت نانوذرات در پوشش پلیمری و ماده غذایی می‌باشد. میزان مهاجرت نانوذرات از بسته پلیمری به داخل ماده غذایی به دو عامل اصلی یعنی غلظت اولیه در پوشش پلیمری و ضریب نفوذ نانوذره وابسته است. پوشش پلیمری فیلم ۱ یکسان می‌باشد. بنابراین میزان مهاجرت آنها به ضریب نفوذ و طبق رابطه حاکم به قطر نانوذرات بستگی دارد. در حل عددی معادله نفوذ برای ماده غذایی بصورت غیردائم، معیار همگرایی به صورت زیر (رابطه ۳) تعریف شده است:

$$\text{ENORM} = \frac{\sum |C_i^{(n+1)} - C_i^n|}{\Delta t \times NC} \quad (\text{رابطه ۳})$$

که در آن NC تعداد حجم محدودهای ایجاد شده داخل میدان است. نمودار همگرایی مربوط به معادله نفوذ نانوذره نقره در ماده غذایی در شکل ۸ نشان داده شده است.

استفاده مداوم از این نوع پنیر سبب مشکلات زیادی برای بیماران با فشار خون بالا و حتی افراد مسن می‌شود. بنابراین با کاربرد این نوع بسته‌بندی می‌توان از نمک فرآورده کاست. در مجموع با توجه به نتایج آزمون مهاجرت نانوذرات نقره و اکسید مس که کمتر از حد مجاز استانداردهای بین‌المللی بود استفاده از بسته‌بندی ضد میکروبی در صنعت غذا و بویژه برای محصولاتی مانند پنیر لیقوان که فرایند سالم‌سازی کمتری دارند، نوید بخش روش جدید باشد.

طعم و بو و خواص تغذیه‌ای در این نوع پنیر هستند تحت تاثیر این نوع بسته‌بندی قرار نگرفتند. شاید مهمترین دستاورد این بسته‌بندی نوین در تولید پنیر لیقوان کاهش بار میکروبی باکتری بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به محصول بسته‌بندی شده در فیلم شاهد است. تولیدکنندگان پنیر لیقوان برای کاهش بار این باکتری از درصد بالایی نمک استفاده می‌کنند. با توجه به اینکه این باکتری تا غلظت ۳ مول و باکتریهای نمک دوست تا غلظت ۶ مول نمک را تحمل می‌کنند،



شکل ۹. کانتور غلظت نانوذرات نقره در آب‌پنیر در ماه‌های ۱، ۶ و ۱۲.

REFERENCES

- Beigmohammadi F., Peighambaroust S. H., Hesari J., Azadmard-Damirchi S., Peighambaroust S. J. & Karimian Khosrowshahi N. (2015). Antibacterial properties of LDPE nanocomposite films in packaging of UF cheese. *LWT - Food Science and Technology*. doi: 10.1016/j.lwt.2015.07.059.
- Bruna J. E., Penloza A., Guarda A., Rodrdguez F. & Galotto, M. J. (2012). Development of MtCu²⁺/LDPE nanocomposites with antimicrobial activity for potential use in food packaging. *Applied Clay Science*, 58, 79-87.
- Commission Regulation (EU). (2011). Plastic Materials and Articles Intended to Come in Contact with Food. *Office Journal of the European Union*, 10/2011 of 14 of January 2011.
- Dukalska L., Muizniece-Brasava S., Murniece I., Dabina-Bicka I., Kozlinskis E. & Sarvi S. (2011). Influence of PLA Film Packaging on the Shelf Life of Soft Cheese Kleo. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 56, 295-301.
- Echegoyen Y. & Nerin C. (2013). Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 16-22.
- 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.
- European Commission. (1982). Council Directive 82/711/EEC of 18 October 1982 Laying down the basic rules necessary for testing migration of the constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Office Journal European Communication*, 297, 26-30.
- European Commission. (1985). Council Directive 85/572/EEC of 19 December 1985 Laying down the list of simulants to be used for testing migration of constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Office Journal European Communication*, 372, 14-21.
- Gonzalez-Tello P., Camacho F., Guadix E. M., Luzon G. & Gonzalez P. A. (2009). Density, viscosity and SURFACE tension of whey protein concentrate solution. *Journal of Food Process Engineering*, 32, 235-247.
- Gumiero M., Peressini D., Pizzarielo A., Sensidoni A., Lacumin L., Comi G. & Toniolo R. (2013). Effect of TiO₂ photocatalytic activity in a HDPE-based food packaging on the structural and microbiological stability of a short-ripened cheese. *Food Chemistry*, 138, 1633-1640.
- Han J. H. (2013). antimicrobial packaging systems. *Plastic Films in Food Packaging*, 151-180.
- Huang Y., Chen S., Bing X., Gao C., Wang T., & yuan, B. (2011). Nanosilver migrated into food-simulating solution from commercially available food fresh container. *Packaging Technology and Science*, 24, 291-297.
- Incoronato A. L., Conte A., Buonocore G. G. & Del Nobile M. A. (2011). Agar hydrogel with silver nanoparticles to prolong the shelf life of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science*, 94(4), 1697-1704.
- IRIPO. 83198. (2014). Manufacture of antimicrobial nanocomposite films for active packaging foodstuff.
- ISIRI. 2406. (1994). Microbiological Specification for milk products. Available on the Internet: <http://www.isiri.org>.
- Jokar M., Rahman R. A., Ibrahim N. A., Abdullah L. C. & Tan C. P. (2012). Melt production and antimicrobial efficiency of low density polyethylene (LDPE) silver nanocomposite films. *Food Bioprocess and Technology*, 5, 719-728.
- Llorens A., Lloret E., Picouet P. A., Trbojerich R. & Fernandez A. (2012a). Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 24, 19-29.
- Llorens A., Picouet P., Trbojevich R. & Fernandez A. (2012). Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends in Food Science and Technolog*, 24, 19-29.
- Magana S. M., Quintana P., Aguilar D. H., Toledo J. A., Angeles-Chavez M. A., Leon L., Freile-Pelegrin T. & Sanchez R. M. (2008). Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver. *Journal of Molecular Catalysis*, 281, 192-199.
- Nigmatullin R., Gao F. & Konovalova V. (2008). Polymer-layered silicate nanocomposites in the design of antimicrobial materials. *Journal of Material Science*, 43, 5728-5733.
- Panea B., Ripoll G., Gonzalez J., Fernandez-Cuello A. & Alberti P. (2013). Effect of nanocomposite packaging containing different proportions of ZnO and Ag on chicken breast meat quality. *Journal of Food Engineering*, 123, 104-112.
- Panfil-Kuncewicz H., Staniewski B., Szpendowski J. & Nowak, H. (2006). Application of active packaging to improve the shelf life of fresh white cheeses. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 15(56), SI 1, 165-168.
- Rai M. & Yadav A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advance*, 27(1), 76-83.
- Reynolds O. (1886). On the theory of lubrication and its application to Mr. Beauchamp Tower's experiments, including an experimental determination of viscosity of olive oil. *Phil Trans Royal Soc, London*. 177, 157-160.
- Sawai J. (2003). Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *Journal of Microbiological Methods*, 54, 177-182.
- Sinigaglia M., Bevilacqua a., Corbo M. R., pati S. & Del Nobile M. A. (2008). Use active compounds for prolonging the shelf life of Mozzarella cheese.

- International Dairy Journal*, 18, 624-630.
- Tong G., Yulong M., Peng G. & Zirong X. (2005). Antibacterial effects of the Cu (II)-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88 and *Salmonella choleraesuis*. *Veterinary Microbiology*, 105, 113-122.
- Valipour Motlagh N., Hamed Mosavian M. T. & Mortazavi S. A. (2012). Effect of Polyethylene Packaging Modified with Silver Particles on the Microbial, Sensory and Appearance of Dried Barberry. *Packaging Technology and Science*. DOI: 10.1002/pts.1966
- Yam K. L. & Papadakis S. E. (2004). A digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 61, 137-142.
- Zapata P. A., Tamayo L., Paez M., Cerda E., Azocar I. & Rabagliati F. M. (2011). Nanocomposite based on polyethylene and nanosilver particles produced by metallocenic "in situ" polymerization: synthesis, characterization and antimicrobial behavior. *European Polymer Journal*, 47, 1541-1549.