

## اثرات فیلم خوراکی حاوی آب پنیر و اسانس زنیان (به فرم آزاد و پیکرینگ امولسیون) بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، میکروبی و حسی گوشت گاو

ویدا ساغری<sup>۱</sup>، حسین جلالی<sup>۲\*</sup>، نبی شریعتی<sup>۳</sup> فر<sup>۳</sup> و مونا بلندی<sup>۲</sup>

- ۱- دانشجوی دوره دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
  - ۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
  - ۳- استاد، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
  - ۴- مرکز تحقیقات طراحی و توسعه دارو، پژوهشکده علوم دارویی (TIPS)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- نویسنده رابط : drmagjalali@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۶/۶

### چکیده

**زمینه و هدف:** فیلم‌های خوراکی به عنوان یک راهکار نوین در نگهداری گوشت (به منظور کاهش فساد و افزایش ماندگاری) استفاده می‌شوند. هدف این مطالعه بررسی تاثیر فیلم خوراکی حاوی آب پنیر و فرم آزاد و پیکرینگ امولسیون اسانس زنیان بر ویژگی‌های گوشت گاو در طول نگهداری در دمای یخچال بود.

**روش کار:** در مطالعه حاضر فیلم‌های خوراکی حاوی پروتئین آب پنیر و اسانس زنیان (به فرم های آزاد و پیکرینگ امولسیون) تهیه و ویژگی‌های فیزیکی، میکروبی، شیمیایی و نیز ارزیابی حسی بررسی شد.

**نتایج:** نتایج تست‌های فیزیکی نشان از تهیه خوب فیلم خوراکی داشت به طوری که میانگین قطر Z نانولیپوزوم‌ها از ۷۳/۹۱ تا ۱۱۰/۵۳ نانومتر، شاخص چند پراکندگی از ۰/۴۵۱ تا ۰/۴۷۱، پتانسیل زتا از ۵/۱۲- میلی ولت تا ۳/۶۴- میلی ولت و راندمان کپسولاسیون از ۴۹/۶۱ تا ۶۴/۲۳٪ متغیر بود. همچنین، بهترین نتایج در آزمون‌های میکروبی، شیمیایی و حسی در تیمار حاوی پروتئین آب پنیر با نانو اسانس (پیکرینگ امولسیون) مشاهده شد (نسبت به نمونه‌های کنترل و اسانس آزاد).

**نتیجه‌گیری:** باتوجه به نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که فیلم‌های خوراکی حاوی پروتئین آب پنیر و نانو اسانس زنیان می‌تواند تکنیک مناسبی در نگه‌داری گوشت گاو در دمای یخچال باشد و باعث افزایش زمان نگه‌داری این محصولات می‌شود.

**واژگان کلیدی:** اسانس گیاهی، آزمون‌های فیزیکی شیمیایی، آزمون‌های میکروبی، ارزیابی حسی، ایمنی غذا، پوشش‌های نانو

### مقدمه

گوشت گاو یکی از مهم‌ترین منابع پروتئینی در تغذیه انسان‌ها به‌شمار می‌رود و به دلیل طعم و ارزش غذایی بالای آن، در بسیاری از فرهنگ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروتئین موجود در ۱۰۰ گرم نیز ۲۴/۴ گرم است. میزان چربی ذخیره شده در ۱۰۰ گرم از آن ۷/۵۶ گرم است. همچنین در ۱۰۰ گرم از این گوشت میزان کلسیم ۱۷ میلی‌گرم بوده و ۰/۹۹ میلی‌گرم آهن در آن ذخیره شده است، از طرفی ۲۴ میلی‌گرم منیزیم و ۲۱۷ میلی‌گرم فسفر از دیگر ویژگی‌ها، خواص و فواید گوشت گوساله در ۱۰۰ گرم است. با این حال، نگهداری و حفظ کیفیت این محصول در طول زمان، چالش‌های خاص

گوشت گاو یکی از مهم‌ترین منابع پروتئینی در تغذیه انسان‌ها به‌شمار می‌رود و به دلیل طعم و ارزش غذایی بالای آن، در بسیاری از فرهنگ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروتئین موجود در ۱۰۰ گرم نیز ۲۴/۴ گرم است. میزان چربی ذخیره شده در ۱۰۰ گرم از آن ۷/۵۶ گرم است. همچنین در ۱۰۰ گرم از این گوشت میزان کلسیم ۱۷ میلی‌گرم بوده و ۰/۹۹ میلی‌گرم آهن در آن ذخیره شده است، از طرفی ۲۴ میلی‌گرم منیزیم و ۲۱۷ میلی‌گرم فسفر از دیگر ویژگی‌ها، خواص و فواید گوشت گوساله در ۱۰۰ گرم است. با این حال، نگهداری و حفظ کیفیت این محصول در طول زمان، چالش‌های خاص

مواد اضافه کند. در زمینه پوشش‌های خوراکی، نانوذرات می‌توانند به عنوان حامل‌هایی برای مواد فعال عمل کنند و موجب افزایش پایداری و جذب بهتر آن‌ها در سطح محصول شوند. این ویژگی‌ها باعث می‌شود که پوشش‌های نانو بتوانند عملکرد بهتری در حفظ کیفیت و ماندگاری مواد غذایی داشته باشند (۱۱، ۱۰، ۷، ۱).

پیکرینگ امولسیون نیز یک تکنیک نوین است که در آن از ذرات جامد (مانند نانوذرات) برای تثبیت قطرات مایع در یک امولسیون استفاده می‌شود. این روش به ویژه در صنایع غذایی برای ایجاد امولسیون‌های پایدار و با کیفیت بالا کاربرد دارد. در این نوع امولسیون‌ها، ذرات جامد به عنوان عامل پیکرینگ عمل کرده و مانع از جدا شدن فازهای مایع می‌شوند. این امر نه تنها باعث افزایش پایداری امولسیون می‌شود بلکه می‌تواند خواص حسی و عملکردی آن را نیز بهبود بخشد (۱۲، ۱۰).

ترکیب پوشش آب پنیر با اسانس زنیان به صورت پیکرینگ امولسیون می‌تواند منجر به ایجاد یک پوشش پایدار و مؤثر برای گوشت گاو گردد. این پوشش نه تنها خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس زنیان را حفظ می‌کند بلکه با استفاده از فناوری نانو، قابلیت نفوذ و توزیع یکنواخت آن را در سطح گوشت افزایش می‌دهد (۱۰، ۶، ۵).

از آنجایی که مصرف گوشت در ایران و جهان بسیار زیاد است و از طرفی به دلیل فساد پذیر بودن این ماده غذایی، استفاده از روش‌های طبیعی و جدید در این حوزه ضروری به نظر می‌رسد. این مقاله به بررسی تاثیر فیلم خوراکی آب پنیر حاوی فرم آزاد و پیکرینگ امولسیون اسانس زنیان بر ویژگی‌های فیزیکی (اندازه نانولپوزوم ها، پتانسیل زتا، ارزیابی راندمان کپسولاسیون % و شاخص چند پراکندگی)، شیمیایی (DPPH و pH)، میکروبی (MIC و MBC) و حسی (بوی بد، تغییر رنگ و رنگ قرمز) گوشت گاو در طول نگهداری در دمای یخچال می‌پردازد. هدف اصلی این تحقیق ارزیابی اثرات مختلف این فیلم خوراکی بر روی کیفیت گوشت گاو در شرایط نگهداری مختلف است. با توجه به

خود را دارد. یکی از روش‌های مؤثر برای افزایش ماندگاری و بهبود ویژگی‌های کیفی گوشت، استفاده از پوشش‌های خوراکی است. در این راستا، پوشش آب پنیر به عنوان یک گزینه طبیعی و غنی از پروتئین، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است (۴-۱).

آب پنیر، که به عنوان محصول جانبی فرآیند تولید پنیر به دست می‌آید، حاوی پروتئین‌ها، لاکتوز، و مواد معدنی است که می‌تواند به عنوان یک پوشش طبیعی برای گوشت استفاده شود. این پوشش نه تنها به حفظ رطوبت و جلوگیری از اکسیداسیون کمک می‌کند، بلکه می‌تواند ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی گوشت را نیز بهبود بخشد (۸-۵).

زنیان دارای برگ‌هایی با بریدگی‌های نازک و ظریف و گل‌هایی به رنگ سفید و مجتمع به صورت چتر مرکب است. میوه این گیاه، کوچک بیضی شکل و به رنگ قهوه ای مایل به زرد است که روی آن خط طولی نخی مانند به رنگ روشن‌تر و دو تار نازک تک سلولی قابل مشاهده است. میوه زنیان دارای مقدار زیادی تیمول است. در ایران این گیاه در تبریز، اصفهان، خراسان، کرمان، خوزستان و بلوچستان رشد می‌کند. زنیان خواص متعدد فراوانی دارد که عبارتند از آنتی‌اکسیدان، پایین آورنده فشار خون، بیماری‌های معده، ضد تب، ضد میکروب، ضد نفخ، ضد آسم، قاعده آور و مسهل است (۵، ۱، ۱۱-۹).

از سوی دیگر، استفاده از اسانس‌های گیاهی مانند اسانس زنیان به عنوان یک افزودنی طبیعی در صنایع غذایی، به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی آن‌ها، اهمیت ویژه‌ای دارد. اسانس زنیان با ترکیبات فعال خود می‌تواند به کاهش بار میکروبی و افزایش ماندگاری گوشت کمک کند. ترکیب این اسانس با پوشش آب پنیر به شکل پیکرینگ امولسیون، می‌تواند اثرات مثبتی بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و میکروبی گوشت گاو داشته باشد (۵، ۱، ۱۱-۹).

فرم نانو به معنای استفاده از نانوذرات یا نانومواد در فرایندهای مختلف است که می‌تواند ویژگی‌های خاصی را به

استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۶۵۳۸) و اشیریشیا کلی (ATCC ۲۵۹۲۲) را تهیه شد. برای فعال سازی مجدد سوبه ها، آنها را در ویال های شیشه ای حاوی ۲۰ (w/v) % گلیسرول در BHI تلقیح و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس کشت ها در ۱۵ میلی لیتر BHI به مدت ۲۴ ساعت (۳۷ درجه سانتیگراد) در ۱۵۰ دور در دقیقه با دو پاساژ متوالی رشد کردند. سلول های باکتریایی با سانتریفیوژ سه گانه با دور ۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه از BHI جدا شدند. در طی ۲ مرحله آخر سانتریفیوژ، مایع رویی جدا شد و با سرم فیزیولوژیکی جایگزین شد. تعداد سلول های باکتریایی با اندازه گیری چگالی نوری (OD) در ۶۰۰ نانومتر، با جمعیت  $1 \times 10^8$  cfu/mL (بر اساس پیش آزمون،  $0.1-0.8 \times 10^8$  OD برابر با  $1 \times 10^8$  cfu/mL) تعیین شد. در نهایت گوشت با  $1 \times 10^8$  cfu/mL از ۴ باکتری اشاره شده پس از رقیق سازی تلقیح شد (۱، ۱۳، ۱۴).

مواد گیاهی و تهیه اسانس: بذر گیاه زنیان یا *Trachyspermum copticum L.* از بازار مولوی تهران خریداری و توسط متخصص فارماکوگنوزی دانشگاه علوم پزشکی تهران احراز هویت شد. بر اساس مطالعه قبلی، بذر زنیان با آب مقطر شسته و در دمای محیط در سایه خشک شد، سپس پودر و اسانس توسط دستگاه تمام شیشه ای از نوع کلونجر (Clevenger) به مدت ۴ ساعت استخراج شد. عملکرد اسانس با روش کلونجر (۲/۲٪) به دست آمد. رنگ اسانس زرد بود (۵-۱).

تهیه امولسیون پیکرینگ امولسیون اسانس زنیان: پروتئین زئین (۱ گرم) در محلول اسید گالیک (۷۰ میلی لیتر، ۱۵٪ حجمی بر حجم) در دمای اتاق حل شد تا محلول های استوک زین تشکیل شود. سپس محلول های استوک زین به صورت قطره ای به آب دیونیزه (۱۳۰ میلی لیتر) اضافه شد و با هموژنایزر با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و سپس با یک پنخش کننده اولتراسونیک (مدل XC-5L، Nanjing Ningkai Instrument Co., Ltd چین) زیر

افزایش تقاضا برای محصولات غذایی سالم و طبیعی، این مطالعه می تواند راهکارهای جدیدی برای بهبود ماندگاری و کیفیت گوشت ارائه دهد و به توسعه فناوری های نوین در صنایع غذایی کمک کند.

در نهایت، با توجه به اهمیت روزافزون حفظ کیفیت مواد غذایی و استفاده از مواد اولیه طبیعی در صنایع غذایی، نتایج این تحقیق می تواند به عنوان یک منبع اطلاعاتی ارزشمند برای پژوهشگران و تولیدکنندگان در زمینه نگهداری و فرآوری گوشت گاو محسوب شود.

## روش کار

مواد شیمیایی و معرف ها: پودر آب پنیر با خلوص ۸۰٪ (وزنی/وزنی) از شرکت Fonterra, Ltd. (اوکلند، استرالیا) خریداری شد. اتانول، اسید استیک، سولفات سدیم بی آب ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )، گلیسرول (با خلوص بیش از ۹۷٪)، هیدروکسید سدیم (NaOH)، معرف folin-Ciocalteu و زئین، از شرکت Merck (Darmstadt، آلمان) خریداری شد. سایر معرف ها و حلال های مورد استفاده از درجه تحلیلی یا خلوص بالا بودند و از شرکت Merck خریداری شدند. معرف های BHI (Broth Heart Infusion) و بیرد پارکر آگار (Baird Parker agar) به ترتیب از شرکت Scharlua (اسپانیا) و Merck (آلمان) خریداری شد. Sterile stomacher bag، آب پپتون بافر، TSA (Triple Soy agar)، کروموکولت کلیفرم آگار (Chromocult Coliform-agar) و citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS) به ترتیب از شرکت های VWR (بلژیک)، Oxoid (بلژیک)، Merck (آلمان)، Merck (آلمان) و Merck (آلمان) خریداری شدند.

تهیه و نگهداری باکتری ها: از مرکز ملی منابع ژنتیکی و بیولوژیکی ایران سوبه های لیستریا مونوسیتوژنز (۱۹۱۱۸ ATCC)، و بیرو پاره مولتیپلیکوس (۱۷۸۰۲ ATCC)،

لامپ UV قرار گرفت، سپس گوشت گاو خام در حالت استریل با چاقوی استریل و ظروف استریل جدا شد. گوشت خام به قطعات ۱۰۰ گرمی در بسته های زیپ استریل تقسیم شد. نمونه های گوشت با  $1 \times 10^4$  CFU/g از ۴ باکتری اشاره شده (به طور جداگانه) تلقیح شدند و از این گوشت تلقیح شده برای تهیه تمامی تیمارها استفاده شد. همزمان اسانس دانه در سطوح ۲٪ (به صورت آزاد و نانو) هر کدام به طور جداگانه به گوشت خام حاوی باکتری های یاد شده  $1 \times 10^4$  CFU/g به طور جداگانه اضافه شد و سپس مخلوط شد. تیمار شاهد بدون باکتری و حاوی تیمار گوشت به طور جداگانه در نظر گرفته شد. پس از آن، تیمارهای تلقیح شده به مدت ۳ دقیقه در ۲۰۰ دور در دقیقه همگن شدند. سپس در ظروف پلی استر قرار داده شده و با فیلم کششی (پلی پروپیلن) پوشانده شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. این تیمارها در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و ۱۸ برای انجام آزمایشات میکروبی و شیمیایی مورد آزمایش قرار گرفتند (آزمایش ها سه بار تکرار شد) (۱، ۱۰).

اندازه نانولپوزوم ها، ارزیابی EE (راندمان کپسولاسیون)، پتانسیل زتا و شاخص چند پراکندگی (PDI): با توجه به مطالعه پیشین، یک آنالایزر اندازه ذرات (Shimadzu، SALD 2101، ژاپن) با روش DLS (پراکندگی نور پویا) برای ارزیابی توزیع اندازه ذرات و میانگین قطر لیپوزوم ها استفاده شد. همچنین طبق مطالعه پیشین، با اسپکتروفتومتر در UV (Pharmacia biotech ultraspec 2000, UK) در ۷۵۰ نانومتر، درصد EE لیپوزوم اندازه گیری شد. از نور پس پراکنده برای تعیین PDI استفاده شد. اندازه گیری با استفاده از یک سیستم DLS (پراکندگی نور پویا) مجهز به آشکارساز پس پراکندگی و پراش سنج لیزری با طول موج ۶۳۳ نانومتر (۲۵ درجه سانتی گراد) (Malvern Nano ZS, Instruments Ltd, انگلستان) انجام شد. در کووت (cuvette) های پلی استایرن، نمونه ها (۱:۱۰۰) با آب دوبار

۴۵۰ وات و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز برای تولید زئین کلونیدی ذرات با اندازه کوچک تشکیل شد. در نهایت پیکرینگ امولسیون با اختلاط سوسپانسیون زئین و اسانس در غلظت ۲ درصد تهیه و سپس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه همگن شد (۱۲، ۱۰).

تولید پروتئین آب پنیر: ابتدا پودر آب پنیر (۸ گرم) در آب مقطر (۱۰۰ میلی لیتر) حل شد و با افزودن سدیم هیدروکسید (۱٪)، pH محلول روی ۸ قرار گرفت و سپس مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد (۱۰-۵).

تهیه فیلم خوراکی: پروتئین آب پنیر ۱٪ (w/v) در ۱٪ اسید استیک (w/w) همراه با آب مقطر و گلیسرول به عنوان نرم کننده حل شد و با سرعت ۳۵۰ دور در دقیقه به مدت ۳ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد روی میکسر صفحه داغ مغناطیسی مخلوط شد. در مرحله بعد ۴۰ میلی لیتر از محلول به دست آمده در دو ظرف پتری به قطر ده سانتی متر ریخته شد و سپس اسانس و نانو اسانس (پیکرینگ امولسیون) در مخلوط ۵ درصد (وزنی) به مخلوط اضافه و به مدت ۴۸ ساعت باقی ماند و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد خشک شد و تا زمان آزمایش در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد (در دسیکاتور) نگهداری شد (۱۲).

سنجش SEM (میکروسکوپ الکترونی روبشی): با استفاده از تحلیلگر SEM (KYKY-EM ۳۲۰۰؛ KYKY Technology Development Ltd. پکن، چین)، ساختار و مورفولوژی اسانس و نانو اسانس مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه های تهیه شده در ولتاژ تحریک ۲۵ کیلوولت مشاهده شدند (۵-۱).

تهیه گوشت گاو خام و تهیه تیمارها: ده کیلوگرم گوشت گاو تازه (خام) از سوپر مارکت های شهر تهران (ایران) خریداری شد. گوشت در کول باکس به آزمایشگاه منتقل شد. ابتدا برای از بین بردن تمام میکروارگانیسم های سطح کل گوشت گاو خام به مدت پانزده دقیقه در معرض

مدت ۲ دقیقه همگن شد. روش صفحه پخش (spreading plate method) با Chromocult Coliform-agar برای انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد.

برای شمارش لیستریا مونوسیوتوزنز در هر بار زمان نمونه گیری به پنج گرم گوشت همگن شده ۴۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک اضافه و پس از هموژن سازی رقت های سریال ساخته شد و با پخش ۰/۱ میلی لیتر رقت های سریال بر روی محیط کشت CHROMagar™ Listeria تعداد لیستریا مونوسیوتوزنز مورد ارزیابی قرار گرفت. در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، تمام پلیت ها انکوبه شدند. برای اندازه گیری رشد باکتری در گوشت همگن تحت تیمار حرارتی، تیمارها هر سه روز یک بار روی محیط کشت CHROMagar™ Listeria کشت داده شدند. برای شمارش، کلنی هایی با رنگ آبی و هاله سفید روی صفحات بودند.

برای شمارش ویبریو پاراهمولیتیکوس: گوشت (۰/۱ گرم) از هر گروه تیمار همگن شده و به صورت متوالی تا رقت ۱۰<sup>-۳</sup> رقیق شد و بارهای ویبریو پاراهمولیتیکوس با روش شمارش پلیت روی TCBS اندازه گیری شد. صفحات (TCBS) پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، کلنی های باکتری شمارش شدند. کلنی های آبی تا سبز برای شمارش انتخاب شدند. برای هر ۴ باکتری تعداد باکتری در گرم گوشت به صورت log cfu/g گزارش شد.

تجزیه و تحلیل شیمیایی: سنجش DPPH (۲،۲-دیفنیل-۱-پیکریل هیدرازیل): اساس سنجش رایج فعالیت آنتی اکسیدانی، ارزیابی رادیکال آزاد DPPH است. این آزمایش بر اساس توانایی آنتی اکسیدانها در احیای رادیکال DPPH یا ۲،۲-دیفنیل-۱-پیکریل هیدرازیل) و کاهش جذب آن در طول موج مشخص (معمولاً ۵۱۷ نانومتر) بر طبق مطالعات قبلی انجام شد (۱).

تقطیر تهیه شد تا از اثرات پراکندگی متعدد جلوگیری شود (۵، ۱).

تجزیه و تحلیل میکروبیولوژیکی: تجزیه و تحلیل MIC و MBC: ما از توصیه NCCLS پیروی کردیم و از تکنیک میکرو رقت (micro dilution) برای ارزیابی تأثیر اسانس (اشکال آزاد و نانو) بر ۴ باکتری مورد اشاره استفاده کردیم. تقریباً غلظت ۱۰<sup>۸</sup> CFU/g از باکتری ها به لوله های آزمایشی، همراه با محلول های اسانس و نانو اسانس (هر کدام ۰/۲ میلی لیتر) در دی متیل سولفوکسید (DMSO) و آب دوبار تقطیر اضافه شد. سپس لوله ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و MIC به عنوان پایین ترین سطح غلظت که در آن هیچ کدورتی مشاهده نشد تعیین شد. برای تعیین MBC، ۰/۱ میلی لیتر از لوله های شفاف (بدون کدورت پس از ۲۴ ساعت) به عنوان سطحی روی TSA آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. اولین سطحی که در آن هیچ رشد باکتری صورت نگرفت به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱، ۱۳، ۱۵).

شمارش تست میکروبی: آماده سازی نمونه ها برای شمارش میکروبی ۴ باکتری مورد نظر مطابق مطالعات پیشین صورت گرفت (۱، ۱۵-۱۳). برای شمارش استافیلوکوکوس اورئوس از محیط کشت برد پارکر آگار استفاده شد. مخلوطی از گوشت (۱۰ گرم) و ۹۰ میلی لیتر محلول کلرید سدیم استریل هموژنیزه شد و ۱ میلی لیتر از رقت مورد نظر روی محیط برد پارکر آگار کشت و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. تشکیل کلنی های براق سیاه رنگ با لبه سفید نازک و ناحیه شفاف در اطراف آنها مشخصه استافیلوکوکوس اورئوس است. برای هر رقت دو صفحه در نظر گرفته شد.

برای شمارش اشیریشیا کلی، ۱۰ گرم نمونه گوشت در ۱۰۰ میلی لیتر آب پیتون بافر با استفاده از Sterile stomacher bag در (فیلتر با اندازه منافذ ۰/۵ میلی متر) به

سنجش SEM: شکل A1 و B1 به ترتیب عکس های میکروسکوب الکترونی روبشی از فیلم خوراکی حاوی پروتئین آب پنیر و فیلم خوراکی حاوی پروتئین آب پنیر+نانو اسانس را نشان می دهد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، ذرات نانولیپوزوم به شکل نیمه کروی تشکیل شده اند.

ارزیابی های میکروبی: شاخص های MIC و MBC: همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، نتایج MIC برای اسانس و نانو اسانس در باکتری/اشریشیا کلی به ترتیب ۰/۶۲ mg/ml و ۰/۶۲، در باکتری لیستریا مونوسیوتوزنر به ترتیب ۰/۶۲ mg/ml و ۰/۶۲، در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۰/۶۳ mg/ml و ۰/۶۳ و در باکتری پاراهمولیتیکوس به ترتیب ۲۱ mg/ml و ۱۶ بود. همچنین نتایج MBC برای اسانس و نانو اسانس در باکتری/اشریشیا کلی به ترتیب ۲۵ mg/ml و ۲۵، در باکتری لیستریا مونوسیوتوزنر به ترتیب ۱/۲۵ mg/ml و ۱/۲۵، در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱/۲۷ mg/ml و ۱/۲۷ و در باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس به ترتیب ۱۷ mg/ml و ۱۵ بود (جدول ۲).

اثر ضد میکروبی اسانس و نانو اسانس ۴ باکتری بیماری زا تلقیح شده به گوشت: همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، در طول زمان آزمایش (۱۸-۰ روز)، رشد ۴ باکتری در تیمارهای اسانس و نانو اسانس کاهش یافت ( $p < 0/05$ )، در حالی که در نمونه های شاهد افزایش یافت. نتایج نشان داد که در طول آزمایش، میزان رشد باکتری لیستریا مونوسیوتوزنر ( $\log CFU/g$ ) در نمونه های نانو اسانس، اسانس و کنترل به ترتیب از ۵/۵ به ۲، از ۵/۵ به ۲/۴ و از ۵/۵ به ۶/۸ رسید؛ میزان رشد باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس ( $\log CFU/g$ ) در نمونه های نانو اسانس، اسانس و کنترل به ترتیب از ۴/۲ به ۲، از ۴/۲ به ۲/۱ و از ۴/۲ به ۵/۹ رسید؛ میزان رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ( $\log CFU/g$ ) در نمونه های نانو اسانس، اسانس و کنترل به ترتیب از ۸/۱ به ۲/۰، از ۸/۱ به ۲/۴ و از ۸/۱ به ۷/۹ رسید؛ و در آخر میزان رشد باکتری اشریشیا

سنجش pH: بر اساس تحقیقات گذشته، با استفاده از pH متر دیجیتال (HANNA، آلمان)، مقدار pH تیمارها و نمونه های شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت (۱).

ارزیابی حسی: با توجه به تحقیقات Pabast و همکاران، تمام نمونه های تیمار توسط شش نفر از اعضای آموزش دیده مورد سنجش قرار گرفت (۱۶). همه کارشناسان پانل در ارزیابی حسی گوشت در دانشگاه علوم پزشکی تهران تجربه داشتند و در گذشته در تحقیقات پیشین شرکت کرده بودند. بر اساس مطالعه قبلی، با استفاده از پرسشنامه با مقیاس ترتیبی ۵ امتیازی (۵ تا ۱)، صفات «بوی بد»، «تغییر رنگ» و «رنگ قرمز» ارزش گذاری شد به طوری که شماره ۱ بالاترین امتیاز (بیشترین کیفیت) را داشت و عدد ۵ کمترین امتیاز را داشتند (کمترین کیفیت)، و زمانی که ویژگی های حسی بالای ۳ باشد غیر قابل پذیرش محسوب می شد (۱، ۱۶).

تجزیه و تحلیل آماری: تمام داده های به دست آمده به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شد. با استفاده از آزمون آماری ANOVA (با استفاده از SPSS ورژن ۲۴)، نتایج ما ارزیابی شد. علاوه بر این، تفاوت معنی دار با آزمون آماری چند دامنه ای دانکن ( $p < 0/05$ ) ارزیابی شد. تمام آنالیزهای فیزیکی و شیمیایی، میکروبی سه بار تکرار شد.

## نتایج

ارزیابی ویژگی های نانولیپوزومها (قطر میانگین  $Z$ ، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و راندمان کپسولاسیون): جدول ۱ ویژگی های نانولیپوزومها آماده شده را نشان می دهد. بر اساس یافته های ما، میانگین قطر نانولیپوزومها، شاخص چند پراکندگی (PDI)، ZP نانولیپوزومها و درصد EE نانولیپوزومها به ترتیب از ۷۳/۹۱ تا ۱۱۰/۵۳ نانومتر، از ۰/۴۵۱ تا ۰/۴۷۱، Mw/Mn از ۵/۱۲- میلی ولت تا ۳/۶۴- میلی ولت و از ۴۹/۶۱ تا ۶۴/۲۳٪ متغیر بود (جدول ۱).

(۱)

کنترل در هر سه پارامتر در روز ۱۸ ام به امتیاز ۵ رسیدند. همچنین مطابق نتایج بدست آمده در روز ۱۸ ام، امتیاز تیمارهای اسانس و نانو اسانس در پارامتر رنگ قرمز به ترتیب ۴ و ۳، در پارامتر تغییر رنگ به ترتیب ۴ و ۳ و در پارامتر بوی بد به ترتیب ۴ و ۲ بود.

## بحث

ارزیابی ویژگی‌های نانولیپوزوم‌ها (قطر میانگین Z، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و راندمان کپسولاسیون): اندازه ذرات یا قطر متوسط Z نانولیپوزوم‌های آماده شده برای ثابت و موثر بودن نانولیپوزوم‌ها در آزادسازی ترکیبات احاطه شده در هسته آن، قطر متوسط Z یک مورد اصلی است (۱۸-۱۶). در تحقیقات قبلی توسط Rodea-González و همکاران که اسانس چیا (*Salvia hispanica L.*) را در پروتئین آب پنیر محصور کردند، آنها میانگین قطر ذره را در تیمارها از ۱۳/۱۷ تا ۲۸/۲۰ میکرومتر اعلام کردند (۱۹). همچنین این مطالعه توسط مطالعات Pabast و همکاران (با اندازه ذرات ۹۳ تا ۹۶ نانومتر) (۱۶) و مطالعه Homayonpour و همکاران (با اندازه ذرات ۱۴۰ تا ۱۶۴ نانومتر) تایید شد (۱۷). همچنین Azizi و همکاران اثر پوشش پروتئین آب پنیر حاوی نانولیپوزوم اسانس شوید (*Anethum graveolens L.*) بر محافظت از ماهی قزل آلائی رنگین کمان را بررسی و اندازه ذرات را از ۱۴۲ تا ۱۵۹ نانومتر گزارش کردند (۵).

شاخص چند پراکندگی (PDI) معیاری برای سنجش ناهمگنی یک نمونه بر اساس اندازه است (۱۸-۱۶). این پارامتر می‌تواند به دلیل توزیع اندازه در یک نمونه یا تراکم/تجمع نمونه در حین تجزیه و تحلیل یا جداسازی اتفاق بیفتد (۲۰، ۵). در مطالعه مشابه، Otoni و همکاران. اثر لایه‌های خوراکی متیل سلولز و نانومولسیون‌های اسانس جوانه میخک (*Syzygium aromaticum*) را در نان برش خورده تجزیه و تحلیل کردند و مقدار PDI را از ۰/۱۶۲ تا ۰/۸۶۳ گزارش

کلی (log CFU/g) در نمونه‌های نانو اسانس، اسانس و کنترل به ترتیب از ۳/۴ به ۲/۰، از ۳/۴ به ۲/۰ و از ۳/۴ به ۵/۸ رسید.

آنالیزهای شیمیایی: سنجش DPPH نتایج جدول ۴ نشان داد که فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در ۲۰۰ BHT بالاترین (۹۴/۶) و در نانو اسانس پایین‌ترین بوده است (۳۴/۱).

سنجش pH: مقادیر pH تیمار شاهد و سایر تیمارها در ابتدا افزایش یافت و سپس در روز هجدهم مجدداً کمی کاهش یافت، همانطور که در جدول ۵ نشان داده شده است. بیشترین افزایش در مقدار pH در در گروه شاهد مشاهده شد که دلیل آن رشد باکتری‌ها بود. نتایج نشان داد که در طول آزمایش (روز صفر تا روز ۱۸)، میزان pH در زمان رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های نانو اسانس، اسانس و کنترل به ترتیب از ۶/۲ تا ۶/۶، از ۶/۲ تا ۶/۸ و از ۶/۲ تا ۷/۵ بود؛ میزان pH در زمان رشد باکتری لیستریا مونوسیژنز در نمونه‌های نانو اسانس، اسانس و کنترل به ترتیب از ۶/۲ تا ۶/۸، از ۶/۲ تا ۶/۸ و از ۶/۲ تا ۷/۴ بود؛ میزان pH در زمان رشد باکتری اشیریشیاکلی در نمونه‌های نانو اسانس، اسانس و کنترل به ترتیب از ۶/۲ تا ۶/۹، از ۶/۲ تا ۶/۹ و از ۶/۲ تا ۷/۵ بود و در نهایت میزان pH در زمان رشد باکتری ویبرو پارارهمولیتیکوس در نمونه‌های نانو اسانس، اسانس و کنترل به ترتیب از ۶/۲ تا ۶/۹، از ۶/۲ تا ۶/۹ و از ۶/۲ تا ۷/۱ بود.

ارزیابی حسی: جدول ۶ تغییرات ارزیابی حسی را در طول نگه داری نشان می‌دهد (روز ۰ تا ۱۸). مطابق این جدول بالاترین امتیاز در هر سه پارامتر بعد از ۱۸ روز مربوط به تیمار نانو اسانس بوده است و پایین‌ترین امتیاز هم مربوط به نمونه‌های کنترل بوده است. مطابق این جدول در روز صفر تمامی نمونه‌ها دارای بالاترین کیفیت (امتیاز=۱) بودند ولی بعد از گذشت روزهای آزمون کیفیت‌ها پایین‌تر آمدند و به سمت امتیازهای بالاتر رفتند، به طوری که نمونه‌های

پنیر+نانو اسانس، تصویر SEM (با اندازه قطرات کمتر و بالاترین درصد EE (۶۰:۰۰ کلسترول / لسیتین) استفاده شد. مطابق بافته های ما، ذرات نانولیپوزوم به شکل نیمه کروی تشکیل شده اند. یافته های ما مشابه یافته های قبلی بود (۵، ۱۸-۱۶).

ارزیابی های میکروبی: شاخص های MIC و MBC

یافته های ما نشان داد که نانو اسانس بر ۴ باکتری مذکور نسبت به اسانس مؤثرتر بود. علاوه بر این، نتایج نشان داد که مقادیر MIC و MBC در باکتری های گرم مثبت کمتر از باکتری های گرم منفی بود. باکتری های گرم مثبت (مانند استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوزنز) به دلیل عدم وجود لایه لیپولی ساکارید در دیواره سلولی خود به ترکیبات ضد باکتری حساس هستند. برعکس، باکتری های گرم منفی (مانند اشیشیا کلی و ویبریوپاراهمولیتیکوس) دارای این لایه هستند که می تواند از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری کند (۲۲، ۲۰). علاوه بر این، سطح آبدوست غشای خارجی در باکتری های گرم منفی می تواند آنها را در برابر ترکیبات ضد باکتری مقاوم کند. این به این دلیل است که لایه لیپولی ساکارید دیواره سلولی از نفوذ آنزیم های مختلف و مولکول های آنتی بیوتیکی که مولکول های وارد شده به فضای پری پلاسمیک را تجزیه می کنند، جلوگیری می کند (۲۲، ۲۰). تحقیقات قبلی نشان داده است که ترکیبات های فلاونوئید و فنولیک با فعالیت آنتی باکتریال مرتبط هستند. به نظر می رسد که فعالیت آنتی باکتریایی اسانس های گیاهی تحت تأثیر این ترکیبات است (۲۳، ۱۸، ۱۷). علاوه بر این، این تحقیقات تایید می کنند که فعالیت اسانس های ضد میکروبی با تغییرات غشاهای سلولی ناشی از نفوذ ترکیبات فنلی و عدم تعادل الکتریکی غشاهای سلولی که منجر به نشت ترکیبات درون سلولی و در نهایت مرگ سلولی می شود، مرتبط است. در نتیجه، افزایش سطح ترکیبات فنلی منجر به افزایش ۱۸- سینئول (1,8-cineole) می شود که به طور قابل توجهی اثر ضد میکروبی را افزایش می دهد (۲۳، ۱۸، ۱۷). در مطالعه

کردند (۲۱). نتایج ما توسط مطالعات قبلی نیز تایید شده است (۱۸-۱۶).

پتانسیل زتا (ZP) یک مورد اصلی در محاسبه بار سطحی ذرات (الکتریکی)، خصوصیات سیستم های کلونیدی و ارزیابی پایداری نانولیپوزومها است. هر چه ZP مطلق بالاتر باشد، پایداری شیمیایی و فیزیکی تعلیق کلونیدی به دلیل نیروهای دافعه بزرگی که سرعت همجوشی و تجمع را کاهش می دهد بیشتر می شود (۲۰، ۵). دلیل منفی بودن ZP می تواند به دلیل وجود پایانه های لیپیدی باشد. بر اساس یافته های ما، با افزایش نسبت کلسترول، بار منفی (-) نانولیپوزوم نیز به طور معنی داری افزایش یافت. در مطالعه مشابه Azizi و همکاران اثر پوشش پروتئین آب پنیر حاوی نانولیپوزوم اسانس شوید (Anethum graveolens L) بر حفاظت از ماهی قزل آلی رنگین کمان را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند و ZP را از ۱۶/۳- میلی ولت تا ۱۱/۷- میلی ولت گزارش کردند (۵). نتایج یافته های ما توسط سایر تحقیقات تأیید شد (۲۰، ۵).

سه مورد مهم در مقدار درصد راندمان کپسوله سازی (EE) شامل نسبت چربی، حجم داخلی وزیکول ها و نوع آن است (۱۶-۱۸). نانولیپوزوم از دو بخش آبریز و آب دوست تشکیل شده است. از میان دو لایه فسفولیپیدها، کامپوزیت های آبریز احاطه شده و کامپوزیت های آب دوست در محیط آبی لیپوزوم ها قرار دارند، بنابراین لایه های دولایه فسفولیپید (برای نانولیپوزوم ها) به عنوان یک مخزن عمل می کنند (۵، ۲۰). در تحقیقات قبلی توسط Rodea González و همکاران که اسانس چیا (Salvia hispanica L) را در پروتئین آب پنیر محصور کردند، آنها EE تیمارها را از ۷۰/۷۰ تا ۸۰/۷۰٪ اعلام کردند (۱۹). یافته های ما همچنین مشابه مطالعات Pabast و همکاران (۱۶) و Shahbazi بود (۲۲).

سنجش SEM: برای ارزیابی مورفولوژی فیلم خوراکی حاوی پروتئین آب پنیر و فیلم خوراکی حاوی پروتئین آب

تیمارها می شود و نیز افزایش غلظت اسانس (از ۰/۱٪ تا ۰/۵٪) باعث افزایش اثر ضد میکروبی در نمونه های ماهی می شود (۲۴). همچنین Abdollahzadeh و همکاران پوشش اسانس آویشن را بر روی رشد لیستریا مونوسیتوژنز طی ۱۲ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد در نمونه های ماهی مورد تجزیه و تحلیل قرار داد و بیان کرد که افزایش مقدار اسانس باعث افزایش اثر ضد میکروبی در نمونه های ماهی می شود و نمونه های کنترل فاقد اثر ضد میکروبی می باشند (۲۵). یافته های مطالعه حاضر همچنین توسط Anvar و همکاران مورد تایید قرار گرفت (۱).

آنالیز های شیمیایی: سنجش DPPH: این شاخص در اسانس کمی بیشتر از نانو اسانس بود. اسانس گیاه به دلیل داشتن ترکیبات فنلی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی است. فعالیت ترکیبات فنلی آنتی اکسیدان عمدتاً به دلیل ویژگی های اکسید کننده-احیا کننده آنها است، بنابراین به عنوان یک عامل کاهنده، جاذب اکسیژن و اهداکننده هیدروژن عمل می کند (۱). این نتایج مشابه نتایج Pabast و همکاران و Homayonpour و همکاران بود که با اسانس و نانو اسانس فعالیت آنتی اکسیدانی را بیان کردند (۱۶، ۱۷). همچنین Polatoğlu و همکاران گزارش داد که اسانس *Lathyrus ochrus* L. فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری در مقایسه با BHT و  $\alpha$ -توکوفرول داشت (۲۶).

سنجش pH: نتایج نشان داد که تیمارهای اسانس (گروه نانو و فرم آزاد) به دلیل اثر آنتی باکتریایی اسانس ها دارای اثر بهتری بر روی کنترل pH نسبت به گروه کنترل بودند. همچنین گروه نانو دارای اثر بهتری بر روی کنترل pH نسبت به گروه اسانس آزاد بودند که احتمالاً به دلیل غلبه بر فرارایت و ناپایداری بالای اسانس ها در این گروه بوده است (۱۶، ۱۷، ۱). افزایش مقدار pH در طول ذخیره سازی طولانی مدت عموماً به فرآیند اتولیز آنزیم های درونزا (مانند پروتئازها و لیپازها)، تولید مواد قلبایی (مانند هیستامین، تری متیل آمین، ایندول و آمونیاک) یا فعالیت آنزیم های میکروبی که منجر به افزایش pH می شود

Shahbazi، ۴ نوع اسانس (*Allium rotundum*، *Falcaria vulgaris*، *Mentha longifolia* و *Tragopogon graminifolius*) بر علیه شش باکتری بیماری زا (استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، اشیشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم، باسیلوس سرئوس و باسیلوس سابتیلیس) مورد ارزیابی قرار گرفت که آزمون MIC و MBC در باکتری گرم مثبت کمتر از باکتری های گرم منفی بود که با یافته های ما مشابه بود (۲۲). این یافته ها همچنین توسط تحقیقات Tometri و همکاران با ارزیابی عصاره برگ *Laurus nobilis* در برابر باکتری *E. coli* (گرم منفی) و *S. aureus* (گرم مثبت) تایید شده است (۲۳). اثر ضد میکروبی اسانس و نانو اسانس ۴ باکتری بیماری زا تلقیح شده به گوشت: همانطور که بیان شد، تیمارهای حاوی نانو اسانس تأثیر بهتری نسبت به اسانس آزاد (در هر ۴ باکتری) داشتند. شکل نانو ترکیباتی مانند نانوامولسیون یا نانولیوزوم ها تمایل به کپسوله کردن ترکیبات (زیست فعال) به دلیل سطح بالاتر و نزدیکی بیشتر به سلول های باکتریایی دارند و تأثیر ضد میکروبی بیشتر و تأثیر اندازه کوانتومی در فرمولاسیون اسانس ایجاد می کنند (۲۳، ۲۲، ۱). بنابراین، پوشش های نانو ممکن است برای افزایش عمر مفید گوشت ایده آل باشند. یافته های مطالعه حاضر مشابه مطالعه Tometri و همکاران بود، که نتایج آنها نشان داد، در طول مدت نگهداری، کلنی های استافیلوکوکوس اورئوس در تیمار شاهد افزایش یافته و در اکثر تیمارهای حاوی عصاره برگ *Laurus nobilis* کاهش یافت. همچنین در روز چهارم نگهداری، هیچ کلونی استافیلوکوکوس اورئوس در نانو عصاره با غلظت ۱۵۰۰ ppm مشاهده نشد که نشان دهنده تأثیر بهتر نانو تیمارها است (۲۳). علاوه بر این، Mazhar و همکاران که اسانس پونه را در سطوح مختلف در رشد سالمونلا پاراتیفی و سالمونلا تیفی موریوم در ماهی چرخ کرده انکوبه کردند و بیان کردند که افزودن اسانس نسبت به نمونه های کنترل سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی

پنیر حاوی نانولیپوزوم اسانس شوید بر حفاظت از ماهی قزل آلابی رنگین کمان و گزارش در تمامی موارد ارزیابی حسی (بافت، بد بو، تغییر رنگ و رنگ قرمز)، بهترین نتیجه پس از ۲۱ روز. مربوط به تیمار آب پنیر نانو اسانس (با امتیاز ۱) بود (۵). سایر مطالعات هم این نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر را تایید نمودند (۱، ۵، ۱۶).

### نتیجه گیری

در این مطالعه از اسانس زنیان (*Trachyspermum copticum L*) به همراه پروتئین آب پنیر به عنوان فیلم خوراکی برای نگهداری گوشت گاو استفاده شد. تصاویر SEM تولید این فیلم خوراکی را تایید کرد. بر اساس یافته‌های ما، ارزیابی‌های میکروبی و شیمیایی نشان داد که تیمارهای حاوی پروتئین آب پنیر و نانو اسانس زنیان منجر به تاخیر در فساد شیمیایی و میکروبی و افزایش ماندگاری گوشت گاو در طول نگهداری در دمای یخچال می‌شود. پیکرینگ امولسیون اسانس سبب آزادسازی کنترل شده عوامل زیست فعال روی گوشت می‌شود و فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی را در طی ۱۸ روز نکه داری نسبت به فرم آزاد اسانس افزایش می‌دهد و این نتایج نشان می‌دهد که پوشش آب پنیر با نانو اسانس می‌تواند به عنوان یک پوشش فعال در صنعت گوشت گاو استفاده شود. از محدودیت‌های این تحقیق می‌توان به عدم مقایسه اسانس با عصاره‌های آبی و اتانولی و استفاده از غلظت-های مختلف اسانس در تحقیق اشاره کرد که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده انجام شود.

### تشکر و قدردانی

از آزمایشگاه شیمی و میکروبی شناسی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر و قدر دانی می‌شود.

نسبت داده می‌شود. در پایه‌های فرار علاوه بر این، فرض بر این است که افزایش مقدار pH در طول ذخیره سازی سرد به دلیل دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه و در نتیجه تشکیل آمین‌ها است (۱۷، ۱۶، ۱). این یافته با مطالعات قبلی، مانند Homayonpour و همکاران، که گزارش کردند نانو فرم اسانس از *Cuminum cyminum L* اثر بهتری (در طول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد) نسبت به فرم آزاد اسانس دارد (۱۷). همچنین Azizi و همکاران اثر پوشش پروتئین آب پنیر حاوی نانولیپوزوم اسانس شوید (*Anethum graveolens L*) بر حفاظت از ماهی قزل آلابی رنگین کمان را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد و مقدار pH را از ۶/۳ (آب پنیر-نانو اسانس) تا ۷/۵ (نمونه شاهد) گزارش کردند (۵). علاوه بر این، در یک تحقیق مشابه در مورد ویژگی‌های قزل آلابی رنگین کمان (در طول نگهداری به مدت ۱۵ روز) پوشش داده شده با کیتوزان و اسانس آویشن، Chamanara و همکاران بیان کردند که تیمارهای حاوی کیتوزان و اسانس کمترین مقدار pH و تیمار شاهد (بدون پوشش) دارای بیشترین مقدار pH بودند (۲۷).

ارزیابی حسی: مطابق نتایج بدست آمده، بالا ترین امتیاز در هر سه پارامتر بعد از ۱۸ روز مربوط به تیمار نانو اسانس بوده است (زیرا برای غلبه بر نوسانات و بی‌ثباتی بالای اسانس‌ها ایجاد شده‌اند) (۱، ۱۶) و پایین ترین امتیاز هم مربوط به نمونه‌های کنترل بوده است (که به دلیل عدم پوشش دهی بوده است) (۱، ۱۶). در مطالعه مشابه، این نتایج توسط El-Hanafy و همکاران تایید شد، آنها بیان کردند که نمونه‌های تیمار با عصاره چای سبز ویژگی‌های کیفی خوبی را از نظر ارزیابی حسی در مقایسه با گروه کنترل حفظ کردند (۲۸). در مطالعه مشابه توسط Socaciu و همکاران با بررسی اثرات لایه آب پنیر ترکیب شده با اسانس ترخون، پارامترهای حسی تیمارها پس از ۱۵ روز بهتر از نمونه‌های شاهد بود (۸). همچنین Azizi و همکاران بررسی اثر پوشش پروتئین آب

## References

1. Anvar N, Nateghi L, Shariatifar N, Mousavi SA. The effect of essential oil of *Anethum graveolens* L. seed and gallic acid (free and nano forms) on microbial, chemical and sensory characteristics in minced meat during storage at 4° C. *Food Chemistry: X*. 2003; 19:100842.
2. Kanatt SR, Rao MS, Chawla SP, Sharma A. Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT-Food science and technology*. 2013;53(1):321-6.
3. Kurtu MY. An Assessment of the Productivity for Meat and the Carcase Yield of Camels (*Camelus dromedarius*) and of the Consumption of Camel Meat in the Eastern Region of Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*. 2004;36(1):65-76.
4. Van Haute S, Raes K, Van Der Meeren P, Sampers I. The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control*. 2016;68:30-9.
5. Azizi M, Jahanbin K, Shariatifar N. Evaluation of whey protein coating containing nanoliposome dill (*Anethum graveolens* L.) essential oil on microbial, physicochemical and sensory changes of rainbow trout fish. *Food Chemistry: X*. 2024;21:101110.
6. Bahram S, Rezaei M, Soltani M, Kamali A, Ojagh SM, Abdollahi M. Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential oil. *Journal of Food Processing and preservation*. 2014;38(3):1251-8.
7. Boghori P, Latifi Z, Ebrahimi P, Mohamadi Kartalaei N, Dehghan L. Effect of whey protein concentrate-Shiraz thyme (*Zataria multiflora*) essential oil coating on the shelf life of peanut. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research* | Oct-Dec. 2020;10(S4).
8. Socaciu M-I, Fogarasi M, Simon EL, Semeniuc CA, Socaci SA, Podar AS, et al. Effects of whey protein isolate-based film incorporated with tarragon essential oil on the quality and shelf-life of refrigerated brook trout. *Foods*. 2021;10(2):401.
9. Abdeldaiem MH, Ali HGM, Ramadan MF. Impact of different essential oils on the characteristics of refrigerated carp (*Cyprinus carpio*) fish fingers. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2017;11:1412-20.
10. Saghari V, Jalali H, Shariatifar N, Ziaolhagh S. Evaluation of whey protein coating containing free and Pickering emulsion forms of *Trachyspermum copticum* L. essential oil on quality of refrigerated beef. *Food Science & Nutrition*. 2024;12(11):9187-97.
11. Shahidi F, Hossain A. Preservation of aquatic food using edible films and coatings containing essential oils: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022;62(1):66-105.
12. Zomorodian N, Javanshir S, Shariatifar N, Rostamnia S. The effect of essential oil of *Zataria multiflora* incorporated chitosan (free form and Pickering emulsion) on microbial, chemical and sensory characteristics in salmon (*Salmo trutta*). *Food Chemistry: X*. 2023;20:100999.
13. Pouryousef N, Ahmady M, Shariatifar N, Jafarian S, Shahidi S-A. The effects of essential oil *Mentha pulegium* L. and nisin (free and nanoliposome forms) on inoculated bacterial in minced silver carp

- fish (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2022;16(5):3935-45.
14. Shabani M, Ghorbani-HasanSaraei A, Shariatifar N, Savadkoohi F, Shahidi S-A. Effect of *Urtica dioica* L. Essential oil (forms of free and nanoliposome) on some inoculated pathogens (*Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*) in minced camel meat. *Food Chemistry: X*. 2023;20:101050.
  15. Pouryousef N, Ahmady M, Shariatifar N, Shahidi SA. The effects of poneh essential oil (free and nonliposomes forms) on chemical, biological and sensory characteristics of minced silver carp fish at 4° C. 2022; 14(4): 563-576.
  16. Pabast M, Shariatifar N, Beikzadeh S, Jahed G. Effects of chitosan coatings incorporating with free or nano-encapsulated *Satureja* plant essential oil on quality characteristics of lamb meat. *Food Control*. 2018;91:185-92.
  17. Homayonpour P, Jalali H, Shariatifar N, Amanlou M. Effects of nano-chitosan coatings incorporating with free/nano-encapsulated Cumin (*Cuminum cyminum* L.) essential oil on quality characteristics of sardine fillet. *International Journal of Food Microbiology*. 2021; 341:109047.
  18. Homayounpour P, Jalali H, Shariatifar N, Amanlou M, Khanjari A. Protective Effect of Nanochitosan Incorporated with Free/nanoliposome Cumin (*Cuminum cyminum* L.) Aqueous Extract on Sardine Fish. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2020;29(9):949-61.
  19. Rodea-González DA, Cruz-Olivares J, Román-Guerrero A, Rodríguez-Huezo ME, Vernon-Carter EJ, Pérez-Alonso C. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*. 2012;111(1):102-9.
  20. Anvar N, Nateghi L, Shariatifar N, Mousavi SA. The effect of essential oil of *Anethum graveolens* L. seed and gallic acid (free and nano forms) on microbial, chemical and sensory characteristics in minced meat during storage at 4° C. *Food Chemistry: X*. 2023;19:100842.
  21. Otoni CG, Pontes SF, Medeiros EA, Soares ND. Edible films from methylcellulose and nanoemulsions of clove bud (*Syzygium aromaticum*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils as shelf life extenders for sliced bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(22):5214-9.
  22. Shahbazi Y. Antibacterial and Antioxidant Properties of Methanolic Extracts of Some Native Edible Plants Collected from Kermanshah, Western Iran. *Journal of food quality and hazards control*. 2017;4(4):93-8.
  23. Tometri SS, Ahmady M, Ariaii P, Soltani MS. Extraction and encapsulation of *Laurus nobilis* leaf extract with nanoliposome and its effect on oxidative, microbial, bacterial and sensory properties of minced beef. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2020;14(6):3333-44.
  24. Mazhar SF, Aliakbari F, KARAMI OR, Morshedi D, Shariati P, Farajzadeh D. Inhibitory effects of several essential oils towards *Salmonella typhimurium*, *Salmonella paratyphi A* and *Salmonella paratyphi B*. 2014.
  25. Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H. Antibacterial activity of plant essential oils

- and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food control*. 2014;35(1):177-83.
26. Polatoğlu K, Aarsal S, Demirci B, Başer KH. DPPH scavenging, PRAP activities and essential oil composition of edible *Lathyrus ochrus* L.(Cyprus Vetch, Luvana) from Cyprus. *Journal of oleo science*. 2015;64(3):309-14.
27. Chamanara V, Shabanpour B, Gorgin S, Khomeiri M. An investigation on characteristics of rainbow trout coated using chitosan assisted with thyme essential oil. *International journal of biological macromolecules*. 2012;50(3):540-4.
28. El-Hanafy AI. Storage stability and quality evaluation of fish patties produced from common carp and catfish flesh. *Abbassa Int. J. Aqua*. 2013;6(3):577-96.

جدول ۱- مشخصات فیلم خوراکی ساخته شده در مطالعه اثرات فیلم خوراکی حاوی آب پنیر و اسانس زنیان (به فرم آزاد و پیکرینگ امولسیون) بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، میکروبی و حسی گوشت گاو

کلیستروئول:لستین	راندمان کپسوله سازی (%)	پتانسیل زتا (mV)	شاخص PDI	قطر متوسط z (nm)
۶۰:۰۰	۵۷/۳۱±۱/۲۲	-۳/۶۴±۰/۲۰	۰/۴۷۱ ± ۰/۰۲	۷۳/۹۱±۱/۰۵
۵۰:۱۰	۶۴/۲۳±۱/۱۸	-۴/۲۴±۰/۳۲	۰/۴۶۲ ± ۰/۰۲	۸۷/۹۹±۱/۲۵
۴۰:۲۰	۵۱/۴۰±۱/۳۷	-۴/۹۷±۰/۱۱	۰/۴۵۱ ± ۰/۰۳	۹۷/۹۳±۱/۶۳
۳۰:۳۰	۴۹/۶۱±۱/۰۶	-۵/۱۲±۰/۴۳	۰/۴۷۰ ± ۰/۰۴	۱۱۰/۵۳±۱/۱۲

جدول ۲- شاخص های MIC و MBC در انواع درمان های اسانس به فرم آزاد و نانو در برابر برخی از پاتوژن های غذایی

تیمار ها	MIC and MBC	V. parahaemolyticus	S. aureus	L. monocytogenes	E.coli
اسانس	MIC	۲۱ <sup>aA</sup> ± ۰/۹	۰/۶۳ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۳	۰/۶۲ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۲	۰/۶۲ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۲
نانو اسانس	MIC	۱۶ <sup>bA</sup> ± ۰/۹	۰/۶۳ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۳	۰/۶۲ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۲	۰/۶۲ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۲
اسانس	MBC	۱۷ <sup>aA</sup> ± ۰/۹۵	۱/۲۷ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۵	۱/۲۵ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۸	۲۵ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۷
نانو اسانس	MBC	۱۵ <sup>bA</sup> ± ۰/۹۵	۱/۲۷ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۵	۱/۲۵ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۸	۲۵ <sup>aA</sup> ± ۰/۰۷

حروف بزرگ مختلف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین افزودنی های مختلف و حروف کوچک نشان دهنده تفاوت معنی دار در هر گروه است ( $p < ۰/۰۵$ ).

جدول ۳- اثر ضد میکروبی اسانس و نانو اسانس بر ۴ باکتری تلقیح شده به گوشت (log CFU/g)

کنترل	اسانس	نانو اسانس	روز	باکتری ها	
۵/۵ <sup>Ab</sup> ± ۰/۲	۵/۵ <sup>Bb</sup> ± ۰/۱	۵/۵ <sup>Bb</sup> ± ۰/۲	۰	L.monocytogenes	
۵/۷ <sup>Ac</sup> ± ۰/۱	۴/۹ <sup>Bc</sup> ± ۰/۱	۴/۸ <sup>Bb</sup> ± ۰/۱	۳		
۶/۴ <sup>Ab</sup> ± ۰/۲	۳/۵ <sup>Db</sup> ± ۰/۲	۲/۸ <sup>Bb</sup> ± ۰/۱	۶		
۶/۲ <sup>Ab</sup> ± ۰/۲	۳/۲ <sup>Cb</sup> ± ۰/۱	۲/۴ <sup>Bb</sup> ± ۰/۲	۹		
۶/۸ <sup>Ab</sup> ± ۰/۱	۲/۹ <sup>Ce</sup> ± ۰/۲	۲/۵ <sup>Ce</sup> ± ۰/۱	۱۲		
۶/۹ <sup>Ab</sup> ± ۰/۲	۲/۴ <sup>Ef</sup> ± ۰/۱	۲ <sup>Ef</sup> ± ۰/۱	۱۵		
۶/۸ <sup>Ac</sup> ± ۰/۲	۲/۴ <sup>Df</sup> ± ۰/۱	۲ <sup>Df</sup> ± ۰/۱	۱۸		
۴/۲ <sup>Af</sup> ± ۰/۲	۴/۲ <sup>Aa</sup> ± ۰/۲	۴/۲ <sup>Aa</sup> ± ۰/۲	۰		
۴/۶ <sup>Aa</sup> ± ۰/۲	۴/۱ <sup>Bb</sup> ± ۰/۱	۴/۰ <sup>Bb</sup> ± ۰/۲	۳		
۵/۳ <sup>Ad</sup> ± ۰/۱	۳/۴ <sup>Dc</sup> ± ۰/۲	۳/۲ <sup>Ec</sup> ± ۰/۱	۶		
۶/۰ <sup>Ab</sup> ± ۰/۲	۳/۲ <sup>Ed</sup> ± ۰/۱	۲/۹ <sup>Dd</sup> ± ۰/۲	۹	V. parahaemolyticus	
۶/۳ <sup>Aa</sup> ± ۰/۲	۲/۹ <sup>Ce</sup> ± ۰/۲	۲/۶ <sup>Ce</sup> ± ۰/۱	۱۲		
۶/۰ <sup>Ab</sup> ± ۰/۲	۲/۱ <sup>Ef</sup> ± ۰/۱	۲/۰ <sup>Ef</sup> ± ۰/۱	۱۵		
۵/۹ <sup>Ac</sup> ± ۰/۲	۲/۱ <sup>Df</sup> ± ۰/۱	۲/۰ <sup>Df</sup> ± ۰/۱	۱۸		
۸/۱ <sup>Ad</sup> ± ۰/۱	۸/۱ <sup>Ab</sup> ± ۰/۲	۸/۱ <sup>Ab</sup> ± ۰/۱	۰		
۸/۲ <sup>Ab</sup> ± ۰/۱	۷/۹ <sup>Aa</sup> ± ۰/۲	۷/۸ <sup>Db</sup> ± ۰/۱	۳		
۸/۹ <sup>Aa</sup> ± ۰/۲	۷/۶ <sup>Da</sup> ± ۰/۲	۷/۳ <sup>Ba</sup> ± ۰/۱	۶		
۸/۶ <sup>Ab</sup> ± ۰/۱	۷/۲ <sup>Cc</sup> ± ۰/۱	۶/۶ <sup>Ec</sup> ± ۰/۱	۹		
۸/۵ <sup>Ac</sup> ± ۰/۲	۵/۸ <sup>Cda</sup> ± ۰/۱	۵/۲ <sup>Dd</sup> ± ۰/۲	۱۲		
۸/۲ <sup>Ad</sup> ± ۰/۱	۴/۵ <sup>De</sup> ± ۰/۲	۳/۴ <sup>Be</sup> ± ۰/۲	۱۵		
۷/۹ <sup>Ae</sup> ± ۰/۲	۲/۴ <sup>Df</sup> ± ۰/۲	۲/۰ <sup>Ff</sup> ± ۰/۲	۱۸		
۴/۳ <sup>Af</sup> ± ۰/۱	۴/۳ <sup>Aa</sup> ± ۰/۱	۴/۳ <sup>Aa</sup> ± ۰/۲	۰	S. aureus	
۴/۴ <sup>Aa</sup> ± ۰/۱	۴/۱ <sup>Bb</sup> ± ۰/۲	۴/۰ <sup>Bb</sup> ± ۰/۲	۳		
۴/۹ <sup>Ad</sup> ± ۰/۲	۳/۶ <sup>Dc</sup> ± ۰/۲	۳/۲ <sup>Ec</sup> ± ۰/۱	۶		
۵/۷ <sup>Ab</sup> ± ۰/۱	۳/۱ <sup>Ed</sup> ± ۰/۱	۲/۸ <sup>Dd</sup> ± ۰/۲	۹		
۶/۰ <sup>Aa</sup> ± ۰/۱	۲/۶ <sup>Ce</sup> ± ۰/۲	۲/۵ <sup>Ce</sup> ± ۰/۱	۱۲		
۵/۹ <sup>Ab</sup> ± ۰/۱	۲/۱ <sup>Ef</sup> ± ۰/۲	۲/۰ <sup>Ef</sup> ± ۰/۱	۱۵		
۵/۸ <sup>Ac</sup> ± ۰/۲	۲/۰ <sup>Df</sup> ± ۰/۱	۲/۰ <sup>Df</sup> ± ۰/۲	۱۸		
					E.coli

جدول ۴- سنجش DPPH در اسانس، نانو اسانس و BHT ها در مطالعه اثرات فیلم خوراکی حاوی آب پنیر و اسانس زنیان (به فرم آزاد و پیکرینگ امولسیون) بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، میکروبی و حسی گوشت گاو

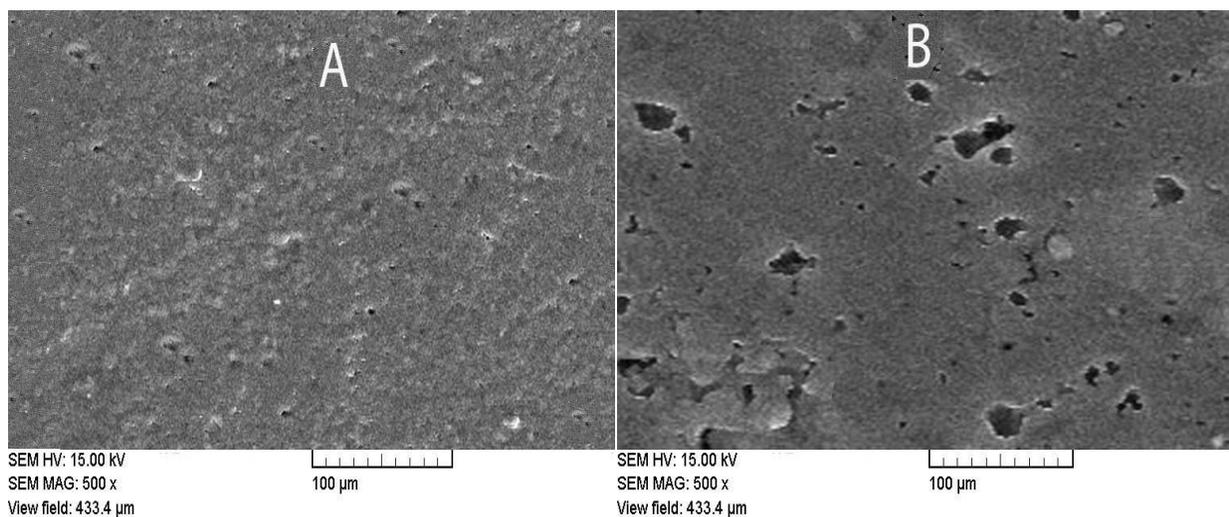
اسانس	نانو اسانس	BHT۱۰۰	BHT۲۰۰
۳۵/۲±۰/۹	۳۴/۱±۱/۲	۹۲/۸±۲/۱	۹۴/۶±۱/۷

جدول ۵- مقدار pH در باکتری‌های مختلف با تیمارهای مختلف در مطالعه اثرات فیلم خوراکی حاوی آب پنیر و اسانس زنیان (به فرم آزاد و پیکرینگ امولسیون) بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، میکروبی و حسی گوشت گاو

۱۸	۱۵	۱۲	۹	۶	۳	۰	تیمارها	pH
۷/۵	۷/۹	۷/۸	۷/۵	۷/۲	۶/۶	۶/۲	کنترل	S. aureus
۶/۸	۷/۲	۷/۳	۷/۴	۷/۱	۶/۴	۶/۲	اسانس	
۶/۶	۷/۰	۷/۷	۷/۲	۷/۰	۶/۴	۶/۲	نانو	
							اسانس	
۷/۴	۷/۵	۷/۶	۷/۵	۷/۲	۶/۶	۶/۲	کنترل	L.monocytogenes
۶/۸	۷/۱	۷/۳	۷/۴	۷/۱	۶/۴	۶/۲	اسانس	
۶/۸	۷/۰	۷/۳	۷/۲	۷/۰	۶/۴	۶/۲	نانو	
							اسانس	
۷/۵	۷/۷	۷/۸	۷/۵	۷/۳	۶/۸	۶/۲	کنترل	E.coli
۶/۹	۷/۲	۷/۵	۷/۱	۶/۸	۶/۵	۶/۲	اسانس	
۶/۹	۷/۲	۷/۳	۷/۰	۶/۸	۶/۴	۶/۲	نانو	
							اسانس	
۷/۱	۷/۵	۷/۹	۷/۶	۷/۳	۶/۷	۶/۲	کنترل	V. parahaemolyticus
۶/۹	۷/۲	۷/۳	۷/۰	۶/۸	۶/۵	۶/۲	اسانس	
۶/۹	۷/۰	۷/۱	۶/۹	۶/۸	۶/۶	۶/۲	نانو	
							اسانس	

جدول ۶- ارزیابی حسی نمونه‌های گوشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مدت ۱۸ روز

روز های نگه داری							گروه ها	پارامتر ها
هیجدهم	پانزدهم	دوازدهم	نهم	ششم	سوم	صفر		
۵	۵	۵	۵	۴	۲	۱	کنترل	رنگ قرمز
۴	۳	۲	۲	۱	۱	۱	اسانس	
۳	۲	۲	۱	۱	۱	۱	نانو اسانس	
۵	۵	۵	۵	۴	۲	۱	کنترل	تغییر رنگ
۴	۴	۳	۲	۲	۱	۱	اسانس	
۳	۳	۲	۲	۱	۱	۱	نانو اسانس	
۵	۵	۵	۵	۴	۳	۱	کنترل	بوی بد
۴	۳	۳	۲	۱	۱	۱	اسانس	
۲	۲	۲	۲	۱	۱	۱	نانو اسانس	



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از فیلم خوراکی حاوی پروتئین آب پنیر (A) و فیلم خوراکی حاوی پروتئین آب پنیر+نانو اسانس (B)

## Effects of Edible Film Containing Whey and *Trachyspermum Copticum* Essential Oil (in Free Form and Pickering Emulsion) on Physical, Chemical, Microbial and Sensory Properties of Beef

Vida Saghari<sup>1</sup>, Hossein Jalali<sup>2\*</sup>, Nabi Shariatifar<sup>3,4</sup>, Mona Belandi<sup>2</sup>

1. Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2. Ph.D. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
3. Ph.D. Professor, Department of Environmental Health, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Drug Design and Development Research Center, The Institute of Pharmaceutical Sciences (TIPS), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding Author: drmagjalali@yahoo.com

Received: Aug 28, 2025

Accepted: Sep 22, 2025

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Edible films represent an innovative solution for meat preservation, helping to reduce spoilage and extend shelf life. This study aimed to investigate the effect of edible films containing whey protein and free-form or Pickering emulsion of *Trachyspermum copticum* L. essential oil on the properties of beef during refrigerated storage.

**Materials and Methods:** Edible films containing whey protein and *T. copticum* L. essential oil (in free and Pickering emulsion forms) were prepared. Their physical, microbial, and chemical properties, as well as sensory attributes, were evaluated.

**Results:** Physical tests demonstrated successful film preparation, with the average zeta diameter of nanoliposomes ranging from 73.91 to 110.53 nm, polydispersity index (PDI) from 0.451 to 0.471, zeta potential from -5.12 mV to -3.64 mV, and encapsulation efficiency from 49.61% to 64.23%. The best performance in microbial, chemical, and sensory evaluations was observed in the treatment containing whey protein with nano-essential oil (Pickering emulsion), compared to the control and free essential oil samples.

**Conclusion:** The results indicate that edible films containing whey protein and nano-essential oil of *T. copticum* L. can be an effective strategy for storing beef under refrigerated conditions, improving product shelf life.

**Keywords:** Plant Essential Oil, Physicochemical Tests, Microbial Tests, Sensory Evaluation, Food Safety, Nano-Coatings

Copyright © 2025 Tehran University of Medical Sciences. Published by Tehran University of Medical Sciences.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.