

## استفاده از فاز در فیلم‌های ژلاتین-پولان علیه باکتری بیماری‌زای سالمونلا

اسما انتظاری<sup>۱</sup>، ناصر صداقت<sup>۲</sup>، گلشن شاکری<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دوره دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. پست الکترونیکی: sedaghat@um.ac.ir

۳- محقق فلوشیپ، مؤسسه دولتی ارزیابی ریسک آلمان، برلین

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۲

### چکیده

**سابقه و هدف:** با توجه به پیدایش گونه‌های مقاوم باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و عملکرد اختصاصی آن‌ها بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا که برای سلامت انسان خطرناک هستند، استفاده از باکتریوفازها یک جایگزین مناسب می‌باشد. موضوع دیگر استفاده از پلیمرهایی است که زیست تخریب پذیر هستند و می‌توانند به جای ترکیبات نفتی مورد استفاده قرار گیرند. در این مطالعه، اثر افزودن ژلاتین و باکتریوفاز بر خصوصیات فیلم پولان مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش اثر درصدهای مختلف ژلاتین (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰٪) و محلول باکتریوفاز بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ضد باکتریایی فیلم پولان بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج آزمایشات نشان دادند که ورود باکتریوفاز به فیلم‌ها بر ضخامت، تورم، نفوذ پذیری به بخار آب، مقاومت کششی و مدول یانگ تأثیر آماري معناداری نداشت، اما منجر به افزایش کشش پذیری در فیلم‌ها شد. هم‌چنین، شفافیت فیلم‌های خالص ژلاتین کاهش و پولان افزایش یافت در حالی که، در فیلم‌های ترکیبی ژلاتین-پولان نتایج متفاوتی مشاهده شد. اثر ضد باکتریایی فیلم‌های ژلاتین خالص و ترکیبی ژلاتین-پولان بر علیه پاتوژن بیشتر از فیلم پولان خالص بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان دادند که افزودن ژلاتین به فیلم پولان می‌تواند به تثبیت بهتر باکتریوفازها در فیلم پولان کمک کند و در نتیجه اثر ضد باکتریایی در برابر سالمونلا انتریتیدیس بهتری به دست آورد.

**واژگان کلیدی:** زیست تخریب پذیر، فیلم خوراکی، باکتریوفاز، ضد باکتریایی

### • مقدمه

استفاده از مواد شیمیایی افزایش یافته است (۳). باکتریوفازها ویروس اختصاصی باکتری‌ها هستند، و به عنوان بیوکنترل‌های اختصاصی علیه باکتری‌های بیماری‌زا در سیستم‌های غذایی مورد استفاده هستند (۴). فازهای کوکتیل (ترکیبی از چند فاز) می‌توانند به منظور غلبه بر محدودیت طیف میزبانی فاز مورد استفاده قرار گیرند (۵). فازهای تجاری مختلفی در بازار موجود هستند که از آن جمله می‌توان به فاز سالمونلکس (SALMONELEX™) اشاره کرد (۶). سالمونلکس یک فاز کوکتیل حاصل ترکیب دو فاز 0-1 Felix و S16 است که بر علیه طیف وسیعی از گونه‌های باکتری سالمونلا استفاده می‌شود (۷).

سالمونلا انتریتیکا یک عامل مهم در از بین رفتن مواد غذایی، اقتصاد، و سلامت انسان تلقی است. دو زیر گونه مهم آن سالمونلا تایفی موریوم و انتریتیدیس به عنوان عوامل مهم در شیوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی شناخته شده اند (۱). استفاده از بسته بندی‌های فعال دارای ترکیبات ضد میکروبی به منظور جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها در سطح مواد غذایی به عنوان یک تکنولوژی هردل (Hurdle Technology) می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۲). به کارگیری بسته بندی‌های حاوی ترکیبات ضد میکروبی به دلیل افزایش ایمنی و مدت ماندگاری مورد توجه قرار گرفته است. در سال‌های اخیر، توجه مصرف کنندگان به ترکیبات طبیعی به جای

### تهیه فیلم ژلاتین-پولان حاوی باکتریوفاز

۱۰ گرم از پودرهای ژلاتین و پولان به صورت جداگانه به ۱۰۰ میلی لیتر آب اضافه شدند، سپس گلیسرول ۲۰٪ (وزنی/وزنی) براساس وزن بیو پلیمر افزوده گردید و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس توسط هیتر هم زده شدند. در مرحله بعد، محلول فیلم‌های ژلاتین و پولان به ترتیب با نسبت‌های ۰-۱۰۰، ۲۰-۸۰، ۴۰-۶۰، ۶۰-۴۰، و ۸۰-۲۰، ۲۰-۱۰۰٪ با یکدیگر مخلوط شدند و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس هم مخلوط شدند تا محلول یکنواخت و همگنی به دست آید (۱۳). در نهایت محلول فاز به محلول فیلم‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس اضافه و مدت ۵ دقیقه با سرعت پایین هم زده شدند، سپس محلول فیلم‌ها به روش کستینگ قالب ریزی شدند و در درجه حرارت اتاق طی ۲ روز خشک شدند. فیلم‌های تهیه شده قبل از انجام آزمایشات برای مدت ۴۸ ساعت مشروط (دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰٪) شدند. فیلم‌های بدون فاز به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

### ضخامت فیلم‌ها

ضخامت هر یک از فیلم‌ها توسط میکرومتر دیجیتال در ۵ نقطه مختلف از فیلم‌ها انجام و میانگین آن‌ها به عنوان ضخامت نهایی در نظر گرفته شد.

### تورم

فیلم‌ها به ابعاد  $1 \times 5 \text{ cm}^2$  برش داده شده و وزن گردیدند (S1) و در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای اتاق برای مدت ۵ دقیقه فرو برده شدند. فیلم‌ها از آب برداشته شده و روی کاغذ واتمن قرار گرفتند تا به وزن ثابت برسند و در نهایت وزن نهایی آن‌ها ثبت شد (S2) و با توجه به فرمول زیر تورم محاسبه شد (۹):

$$\text{تورم} (\%) = (S2 - S1 / S1) \times 100$$

### حلالیت در آب

به منظور بررسی حلالیت در آب از روش دهناد و همکاران (۲۰۱۴) با مقداری اصلاحات استفاده شد. فیلم‌های برش داده شده به ابعاد  $1 \times 5 \text{ cm}^2$  در آون با دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و فیلم‌ها وزن گردیدند، سپس فیلم‌ها به صورت جداگانه در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای اتاق برای مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و وزن آن‌ها بعد از قرار گیری بر روی کاغذ واتمن ثبت شد. سپس مجدد فیلم‌ها در آون با دمای ۱۱۰ درجه برای مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و در نهایت وزن گردیدند و حلالیت در آب با توجه به

پولان یک اگزوپلی ساکارید است که توانایی خوبی در تشکیل فیلم دارد. فیلم‌های پولان ویژگی‌های خوبی مانند شفافیت، بی بویی، بی مزه گی، بی رنگی، حلالیت در آب، و نفوذ پذیری پایین به اکسیژن و چربی دارد اما دارای قیمت بالایی است، بنابراین یک استراتژی ترکیب کردن با دیگر پلیمرهاست. مطالعات متعددی در مورد ترکیب پلی ساکاریدها با پروتئین‌ها در راستای بهبود عملکرد و کاهش هزینه‌های فیلم‌های تولیدی انجام شده است. ژلاتین یک گزینه مناسب برای ترکیب با پولان به لحاظ خصوصیات مکانیکی خوب، کاهش نفوذ پذیری، و قیمت مناسب است (۸). مطالعات مختلفی به لحاظ استفاده از باکتریوفازها در پوشش‌ها و فیلم‌ها به عنوان ترکیبات ضد میکروبی انجام شده است، که برای مثال می‌توان به استفاده از آن‌ها در کنسواتره پروتئین آب پنیر، کربوکسی متیل سلولز، ژلاتین، و آلژینات سدیم اشاره کرد (۹-۱۱).

در این پژوهش، فیلم‌های ضد باکتریایی ژلاتین-پولان حاوی باکتریوفاز به لحاظ خصوصیات فیزیکی شیمیایی و ضد باکتریایی آن‌ها در برابر باکتری پاتوژن *سالمونلا*/تریپتیدیس مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت. به علاوه، رهایش باکتریوفازها از فیلم‌ها به محیط آبی در دو دمای ۴ درجه سلسیوس و دمای محیط بررسی شد.

### • مواد و روش‌ها

#### مواد

در این مطالعه ژلاتین، گلیسرول، و تریش-بیس از شرکت سیگما آلدریچ، پولان از شرکت هایاشیبارای ژاپن خریداری شدند. مواد شیمیایی زایلوز لیزین دکسیکولات، تریپتون سوی براث و آگار از شرکت اکسوید انگلیس، منیزیوم سولفات ۷ آبه ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) از اوتوگ آلمان، و کلرید سدیم از شرکت لب کم اسپانیا تهیه شدند.

#### تیتراسیون فاز سالمونلا

ابتدا فاز تجاری سالمونلکس (میکروئوس، هلند) توسط SM (Saline Magnesium) بافر رقت سازی شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کالچر *سالمونلا*/تریپتیدیس (SE 13) ۱۸ ساعته به تیوب‌های محیط تریپتون سوی براث (Tryptone TSB Soy Broth) حاوی ۰/۴٪ آگار منتقل کرده و بعد ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به آن‌ها اضافه شد و ورتکس گردیدند، سپس روی محیط تریپتون سوی آگار (Tryptone Soy TSA Agar) ریخته شدند و در نهایت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه و تعداد پلاک‌ها شمارش گردید (۱۲).

به منظور بررسی کدورت فیلم‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) استفاده شد. ابتدا، فیلم‌ها به ابعاد  $1 \times 4 \text{ cm}^2$  برش داده شدند و در سل اسپکتروفتومتر قرار گرفتند، و سل خالی به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. با استفاده از فرمول زیر کدورت فیلم‌ها محاسبه گردید (۱۷):

$$\text{کدورت} = \text{Abs}_{600} / X$$

$$\text{Abs}_{600} = \text{جذب در طول موج } 600 \text{ نانو متر}$$

$$X = \text{ضخامت فیلم (میلی متر)}$$

### ناحیه بازدارندگی فیلم‌ها

به منظور بررسی ناحیه بازدارندگی فیلم‌ها، ابتدا باکتری *سالمونلا/ینتیریتیدیس* در مرحله فاز لگاریتمی رشد تا رقت  $10^4$  (CFU/ml) در TSB رقیق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن با محیط تریپتون سوی برات حاوی ۰/۴٪ آگار مخلوط و روی تریپتون سوی برات دارای ۱/۵٪ آگار ریخته شد و صبر کرده تا در دمای محیط سفت شود. سپس، دیسک‌هایی از فیلم‌های حاوی باکتریوفاژ به قطر ۱۶ میلی متر بر روی آن‌ها قرار گرفت. دیسک‌های فیلم بدون باکتریوفاژ به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند (۱۸).

### طرح آماری

آزمایشات براساس طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل انجام شدند، و داده‌ها براساس روش تجزیه آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال آماری ۰/۵٪ انجام شدند. آزمایشات در سه تکرار انجام گرفتند.

### • یافته‌ها

#### خصوصیات فیزیکی

ضخامت، تورم، و حلالیت فیلم‌های با نسبت‌های مختلف ژلاتین-پولان فاقد و حاوی باکتریوفاژ در جدول ۱ نشان داده شده است. همان طور که نتایج نشان می‌دهند، افزودن ژلاتین به فیلم پولان منجر به افزایش ضخامت و تورم شد، در حالی که، حلالیت کاهش یافت ( $p < 0/05$ ). حلالیت فیلم ژلاتین در آب در دمای محیط ۲۹/۲۸٪ بود، در حالی که، یک پلی ساکارید مانند پولان به طور کامل در آب حل شد. با توجه به حلالیت بالا در پولان تورم در آن حاصل نشد. در فیلم‌های ترکیبی با افزایش غلظت پولان حلالیت افزایش یافت. افزودن باکتریوفاژ به فیلم‌های ژلاتین-پولان تغییری را در ضخامت، تورم، و حلالیت فیلم‌ها منجر نشد ( $p > 0/05$ ).

فرمول زیر محاسبه شد (۱۴).  $W_1$  و  $W_2$  به ترتیب وزن اولیه و وزن نهایی فیلم‌ها هستند.

$$\text{حلالیت (\%)} = (W_1 - W_2 / W_1) \times 100$$

### نفوذ پذیری به بخار آب

ابتدا فیلم‌ها به دیسک‌هایی به قطر ۱/۵ سانتی متر برش داده شده و روی ظروف آلومینیومی که حاوی کلرید کلسیم بدون آب بودند، قرار گرفتند (رطوبت نسبی صفر)، سپس داخل دسیکاتور حاوی محلول کلرید سدیم اشباع شده (رطوبت نسبی ۷۰٪) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند، و طی بازه‌های زمانی مختلف تا ۲۴ ساعت وزن گردیدند. اختلاف فشار در دو طرف فیلم ۱/۵۶۶/۱ پاسکال بود و نفوذ پذیری به بخار آب با توجه به فرمول زیر محاسبه شد (۱۵):

$$WVTR = \text{Slope}/A = \frac{\Delta m}{A \Delta t}$$

$$WVP = WVTR \times X / \Delta P$$

A نشان دهنده سطح فیلم ( $\text{m}^2$ ),  $\Delta m/\Delta t$  نشان دهنده تغییر وزن در هر ساعت (g/h), X نشان دهنده ضخامت (mm), و  $\Delta P$  اختلاف فشار نسبی (kpa) را نشان می‌دهند.

### خصوصیات بافتی

خصوصیات مکانیکی فیلم‌ها توسط روش استاندارد ASTM D638 و دستگاه بافت سنج (AMETEK Measurement & Calibration Technologies Division, Largo, FL, USA) استفاده شد (۱۶). ابتدا فیلم‌ها به ابعاد  $5 \times 1 \text{ cm}^2$  برش داده شدند و بین دو فک دستگاه به فاصله ۶۵ میلی متر و سرعت ۱۰ میلی متر بر دقیقه قرار گرفتند. ضخامت فیلم‌ها در قسمت‌های مختلف به صورت تصادفی توسط یک میکرومتر دیجیتال اندازه گیری شدند. آزمایشات در سه تکرار انجام شد. مقاومت کششی (TS)، مدول یانگ، و درصد ازدیاد طول (EAB) با توجه به فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

$$TS = F_{\max}/A$$

$$EAB = \frac{\Delta L}{L} \times 100$$

$F_{\max}$  نشان دهنده حداکثر نیروی مورد نیاز برای شکست فیلم (N) و A نشان دهنده سطح اولیه (ضخامت  $\times$  عرض،  $\text{m}^2$ ).  $\Delta L$  نشان دهنده اختلاف طول هنگام پاره شدن (mm)، و L هم نشان دهنده طول اولیه (mm) می‌باشند.

### کدورت فیلم‌ها

جدول ۱. مقایسه تغییرات ضخامت، تورم، و حلالیت فیلم‌های با نسبت‌های مختلف ژلاتین-پولان فاقد و حاوی باکتریوفاز

فیلم‌ها	ضخامت (mm)	تورم (%)	حلالیت (%)
ژلاتین	۰/۱۱۲ ± ۰/۰۱ <sup>AB</sup>	۳۹۱/۷۵ ± ۳۱/۸۵ <sup>A</sup>	۲۹/۲۸ ± ۱/۰۱ <sup>E</sup>
ژلاتین + فاز	۰/۱۱۶ ± ۰/۰۰۵ <sup>A</sup>	۴۱۳/۰۹ ± ۲۸/۶۲ <sup>A</sup>	۳۲/۴۹ ± ۰/۲۳ <sup>EF</sup>
پولان	۰/۸۹۹ ± ۰/۰۰۳ <sup>C</sup>	*ب.آ	۱۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>A</sup>
پولان + فاز	۰/۰۸۹ ± ۰/۰۰۸ <sup>C</sup>	*ب.آ	۱۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>A</sup>
۸۰ ژلاتین: ۲۰ پولان	۰/۱۱۳ ± ۰/۰۰۱ <sup>AB</sup>	۲۸۲/۳۲ ± ۵۷/۲۴ <sup>B</sup>	۲۴/۸۴ ± ۲/۱۴ <sup>F</sup>
۸۰ ژلاتین: ۲۰ پولان + فاز	۰/۱۱۲ ± ۰/۰۰۱ <sup>AB</sup>	۳۰۳/۰۲ ± ۹۸/۵۶ <sup>B</sup>	۲۶/۳۹ ± ۱/۴۱ <sup>F</sup>
۶۰ ژلاتین: ۴۰ پولان	۰/۱۱ ± ۰/۰۰۶ <sup>AB</sup>	۲۳۹/۴۷ ± ۲۴/۹۸ <sup>B</sup>	۵۳/۵۷ ± ۵/۰۴ <sup>D</sup>
۶۰ ژلاتین: ۴۰ پولان + فاز	۰/۱ ± ۰/۰۰۸ <sup>B</sup>	۲۲۵/۴۴ ± ۲۵/۸۸ <sup>B</sup>	۵۲/۴ ± ۱/۰۱ <sup>D</sup>
۴۰ ژلاتین: ۶۰ پولان	۰/۱۰۴ ± ۰/۰۰۱ <sup>AB</sup>	۴۹/۹۹ ± ۳۷/۴۴ <sup>C</sup>	۶۵/۶۶ ± ۲/۳۵ <sup>C</sup>
۴۰ ژلاتین: ۶۰ پولان + فاز	۰/۱۰۵ ± ۰/۰۰۱ <sup>AB</sup>	۵۰/۶ ± ۱۴/۹۹ <sup>C</sup>	۶۱/۸۱ ± ۲/۵۶ <sup>C</sup>
۲۰ ژلاتین: ۸۰ پولان	۰/۱۰۵ ± ۰/۰۰۳ <sup>AB</sup>	۴۷/۲۲ ± ۳۶/۰۵ <sup>C</sup>	۸۰/۴۸ ± ۱/۸۷ <sup>B</sup>
۲۰ ژلاتین: ۸۰ پولان + فاز	۰/۱۰۱ ± ۰/۰۰۰۷ <sup>B</sup>	۴۳/۰۵ ± ۲۶/۱۳ <sup>C</sup>	۷۹/۵۴ ± ۰/۸۴ <sup>B</sup>

مقادیر براساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنادار بین فیلم‌ها است ( $p < 0/05$ ).  
\*ب.آ: بدون آنالیز

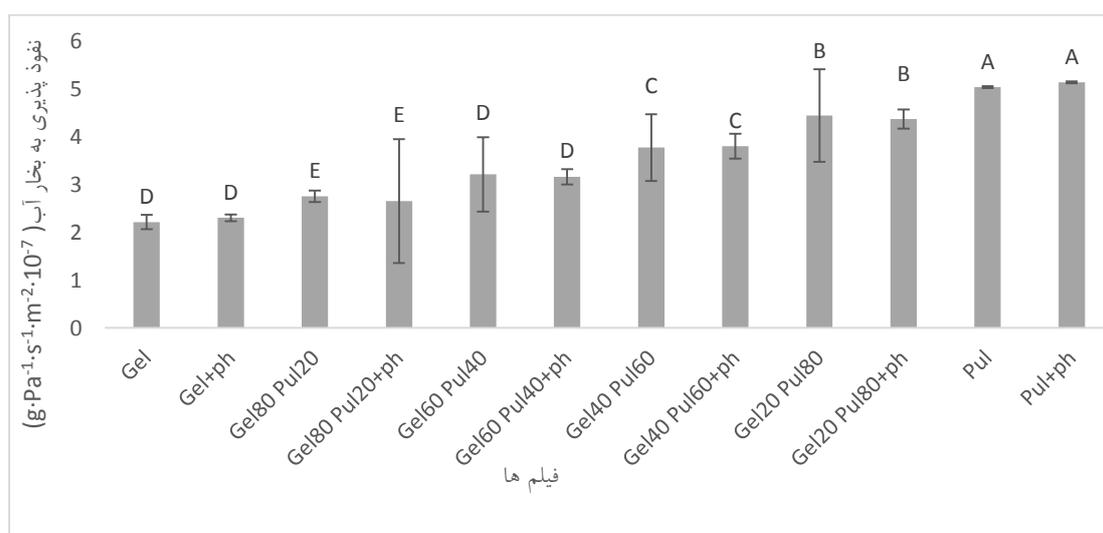
### نفوذ پذیری به بخار آب

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌کنید، افزودن باکتریوفاز به فیلم‌ها تغییر معنی‌داری در نفوذ پذیری به بخار آب ایجاد نکرد ( $p > 0/05$ ), در حالی که، افزودن ژلاتین به فیلم پولان نفوذپذیری به بخار آب را تغییر داد ( $p < 0/05$ ). بیشترین و کم‌ترین نفوذپذیری به بخار آب به ترتیب مربوط به فیلم‌های پولان و ژلاتین خالص بود.

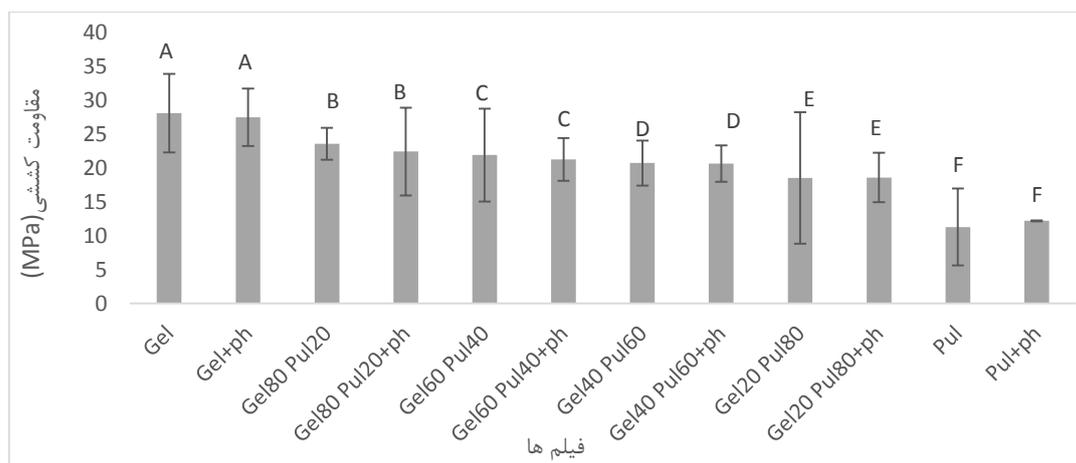
### خصوصیات مکانیکی

افزودن ژلاتین به فیلم پولان مقاومت کششی و مدول یانگ را افزایش داد به طوری که، فیلم ژلاتین خالص بیشترین

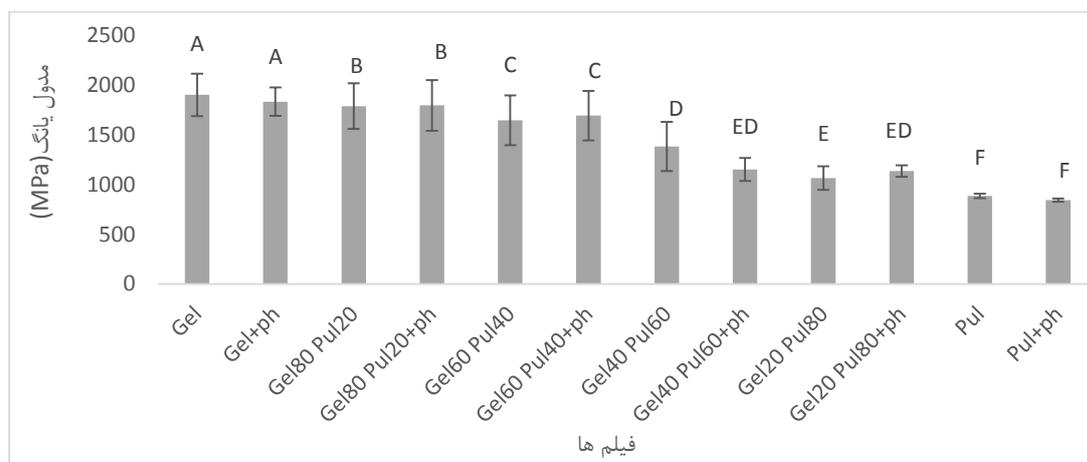
مقاومت کششی و مدول یانگ، و کم‌ترین کشش پذیری را در بین فیلم‌ها داشت اما بالاترین کشش پذیری مربوط به فیلم پولان خالص بود (شکل ۲). هم‌چنان که درصد ژلاتین در فیلم افزایش می‌یافت مقاومت کششی و مدول یانگ افزایش داشتند، اما کشش پذیری کاهش یافت.  
ورود باکتریوفازها به فیلم‌ها منجر به افزایش کشش پذیری شد ( $p < 0/05$ ), اما تغییری را در استحکام و مدول یانگ فیلم‌ها سبب نشد ( $p > 0/05$ ).



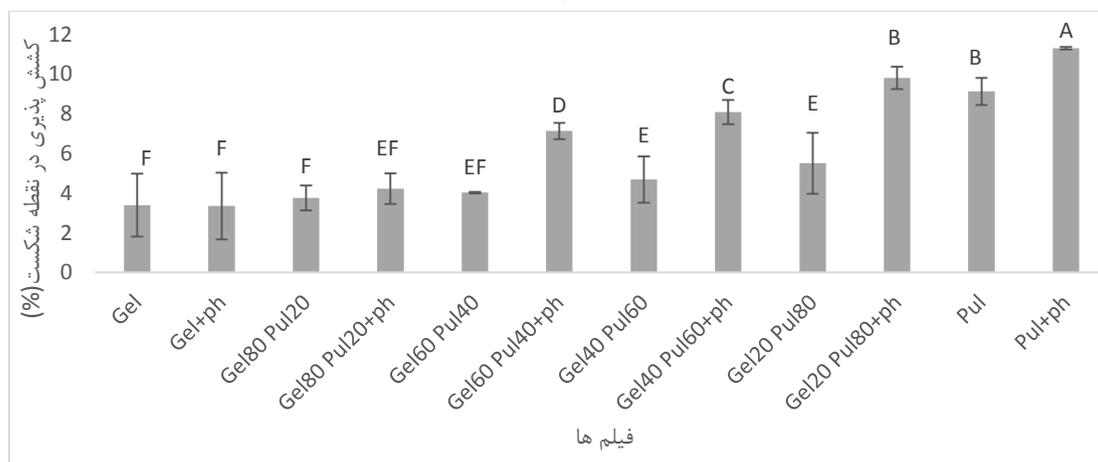
شکل ۱. مقایسه نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های ژلاتین-پولان فاقد و حاوی باکتریوفاز



(الف)



(ب)



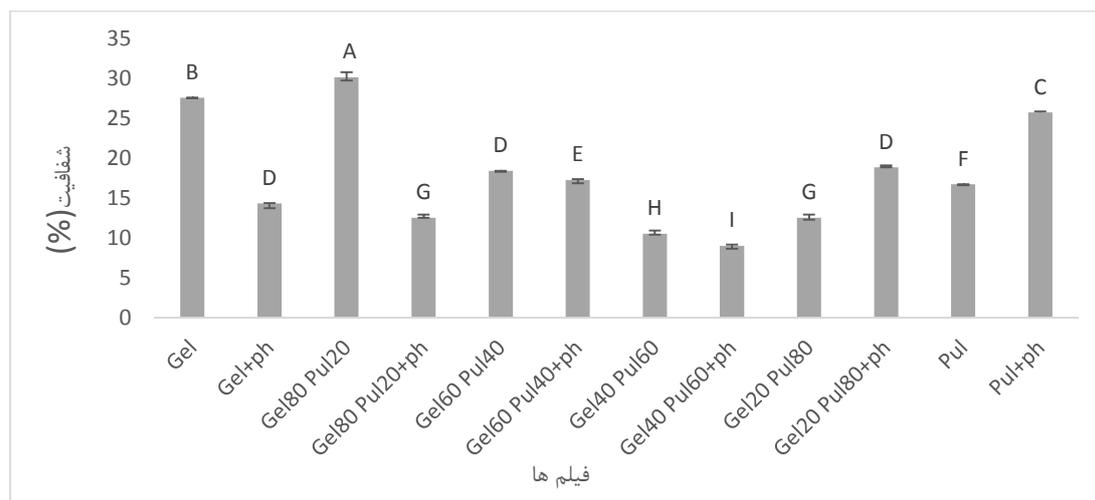
(ج)

شکل ۲. مقایسه مقاومت کششی (الف)، مدول یانگ (ب)، و کشش پذیری (ج) در فیلم‌های ژلاتین-پولوان فاقد و حاوی باکتریوفاز.

### شفافیت فیلم ها

مربوط باشد، در حالی که، فیلم ۸۰ ژلاتین-۲۰ پولوان بیشترین شفافیت ( $0.63 \pm 0.14 / 30\%$ ) را داشت. ورود باکتریوفاز به فیلم‌های ژلاتین خالص، ۸۰ ژلاتین-۲۰ پولوان، ۶۰ ژلاتین-۴۰ پولوان، و ۴۰ ژلاتین-۶۰ پولوان منجر به کاهش شفافیت شد در حالی که، در فیلم‌های پولوان خالص و ۸۰ پولوان-۲۰ ژلاتین شفافیت افزایش یافت.

همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌کنید، فیلم ۴۰ ژلاتین-۶۰ پولوان کمترین شفافیت در بین فیلم‌های فاقد باکتریوفاز نشان داد که می‌تواند به سطح خشن بالاتر در آن



شکل ۳. مقایسه شفافیت فیلم‌های با نسبت‌های مختلف ژلاتین-پولان فاقد و حاوی باکتریوفاز

جدول ۲. ناحیه بازدارندگی (بر حسب سانتی متر) فیلم‌های ژلاتین-پولان حاوی باکتریوفاز در طی ۵ هفته

فیلم ها	هفته اول	هفته سوم	هفته پنجم
ژلاتین+فاز	۲/۸۵ ± ۰/۰۷ <sup>AB</sup>	۲/۱۷ ± ۰/۱۴ <sup>B</sup>	۲/۵۷ ± ۰/۴۸ <sup>AB</sup>
۸۰ژلاتین:۲۰پولان+فاز	۲/۶۶ ± ۰/۰۷ <sup>AB</sup>	۲/۹۶ ± ۰/۱۹ <sup>A</sup>	۲/۶۵ ± ۰/۱۹ <sup>AB</sup>
۶۰ژلاتین:۴۰پولان+فاز	۲/۷۳ ± ۰/۲۶ <sup>AB</sup>	۲/۵۴ ± ۰/۰۴ <sup>AB</sup>	۲/۸۷ ± ۰/۱۷ <sup>AB</sup>
۴۰ژلاتین:۶۰پولان+فاز	۲/۴۹ ± ۰/۵۴ <sup>AB</sup>	۲/۶ ± ۰/۲۸ <sup>AB</sup>	۲/۲۶ ± ۰/۰۴ <sup>AB</sup>
۲۰ژلاتین:۸۰پولان+فاز	۲/۵۹ ± ۰/۰۷ <sup>AB</sup>	۲/۶۳ ± ۰/۵۲ <sup>AB</sup>	۲/۳۷ ± ۰/۲۴ <sup>AB</sup>
پولان+فاز	۰/۹۱ ± ۰/۰۱ <sup>C</sup>	۰/۳۸ ± ۰/۰۴ <sup>D</sup>	۰ ± ۰/۰۰ <sup>E</sup>

مقادیر براساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنادار بین فیلم ها است ( $p < 0.05$ ).

## ناحیه بازدارندگی

جدول ۲ ناحیه بازدارندگی فیلم‌های ژلاتین، پولان، و ژلاتین-پولان را در طی ۵ هفته نشان می‌دهد. ناحیه بازدارندگی تمام فیلم‌های فاقد فاز صفر بود. در بین تمام فیلم‌های حاوی باکتریوفاز، فیلم پولان خالص کم‌ترین ناحیه بازدارندگی را داشت، و این ناحیه بازدارندگی در طول زمان کاهش یافت، به طوری که در هفته پنجم، ناحیه بازدارندگی به صفر رسید اما در فیلم‌های دیگر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

## • بحث

### خصوصیات فیزیکوشیمیایی

تغییرات ضخامت، تورم، و حلالیت فیلم‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. ضخامت‌های متفاوت بین فیلم‌های ژلاتین و پولان می‌تواند مربوط به اندازه ذرات مختلف باشد، نتایج کووالکیک و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که اندازه ذرات در فیلم ژلاتین بیشتر از پولان است. هم‌چنین، آن‌ها بیان کردند که حضور پولان ماده خشک را کاهش می‌دهد که منجر به کاهش ضخامت در فیلم پولان می‌شود، که در توافق با مطالعات خدائی و همکاران (۲۰۲۰) است، آن‌ها مشاهده

کردند که افزودن تراگاکانت به ژلاتین و صمغ فارسی ضخامت را کاهش داد. ژلاتین برای افزایش حلالیت به دمای بیشتر از ۳۰-۳۵ درجه سلسیوس نیاز دارد، که دلیل آن دمای دانتوراسیون بالا و باندهای اندهیدرو موجود در شبکه ساختمانی هیدروژل است (۱۹). گروه‌های هیدروکسیل آزاد موجود در پولان می‌توانند باندهای هیدروژنی با مولکول‌های آب تشکیل دهند، که در نتیجه منجر به افزایش حلالیت در پولان می‌شود، که ساختار آمورف در پولان را نشان می‌دهد (۲۰). ژلاتین ماهیت هیدروفیلیک دارد و تخلخل در شبکه ساختاری آن منجر به جذب آب و نفوذ آن به ساختار ژلاتین شده و تورم را افزایش می‌دهد (۲۱). افزودن فاز به فیلم‌های آلژینات و کنسانتره آب پنیر-پولان تغییری را تورم، حلالیت، و ضخامت فیلم‌ها ایجاد نکرد (۹، ۲).

با توجه به نتایج شکل ۱ که نفوذ پذیری به بخار آب را در فیلم‌های ژلاتین-پولان فاقد و حاوی باکتریوفاز نشان می‌دهد، یک دلیل تفاوت نفوذ پذیری به بخار آب در فیلم‌های ژلاتین و پولان می‌تواند به خاطر تفاوت ضخامت در فیلم‌ها باشد، خصوصیات فیلم‌ها مانند نفوذپذیری به بخار آب و ویژگی‌های مکانیکی آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (۲۲). دلیل دیگر مربوط

شفافیت را کاهش داد، اما این تفاوت به اندازه کافی زیاد نبود که اثر قابل توجهی داشته باشد (۲۵).

### ناحیه بازدارندگی

فیلم پلوان به دلیل غلظت پایین تر باکتریوفازهای موجود در آن که ناشی از اثر استری آن می‌باشد (جدول ۲)، کم ترین باز دارندگی را داشت (۲۰). فاز ۱-0 Felix می‌تواند باندهایی با گیرنده‌های N-استیل گلوکزآمین‌های قرار گرفته در ترمینال زنجیره‌های پلی ساکاریدی تشکیل دهد، که روی مرکز سطح خارجی لیپوپلی ساکارید است و فاز S16 باندهایی با غشاء خارجی پروتئین C تشکیل می‌دهد، که در نهایت منجر به لیز شدن و مرگ سلول باکتری می‌شود. N-ستیل گلوکزآمین و پروتئین C ترکیبات متداول باقی مانده روی سطح غشاء باکتری *سالمونلا* هستند (۱۲). نتایج یک پژوهش نشان دادند که فیلم‌های ترکیبی پروتئین آب پنیر-پلوان ناحیه بازدارندگی داشتند و در طی ۶۰ روز اثر ضد باکتریایی کاهش یافت، هم چنین، در فیلم‌های پروتئین آب پنیر و پلوان خالص ناحیه بازدارندگی مشاهده نشد (۲۰).

### نتیجه گیری

در این پژوهش، باکتریوفاز *سالمونلکس* در فیلم‌های بر پایه ژلاتین، پلوان خالص، و فیلم‌های ترکیبی ژلاتین-پلوان مورد استفاده گرفت و خصوصیات فیزیکیوشیمیایی و اثر ضد باکتری آن‌ها در برابر باکتری *سالمونلا* بررسی شد. مطالعه حاضر نشان داد که تثبیت باکتریوفازها در فیلم‌های ژلاتین خالص و ترکیب ژلاتین-پلوان موفقیت آمیز بود در حالی که، در فیلم پلوان خالص به دلیل اثرات استری آن با کاهش تعداد باکتریوفازها همراه بود که منجر به کاهش اثر ضد باکتریایی در فیلم پلوان خالص در مقایسه با دیگر فیلم‌ها شد. به طور کلی، ورود باکتریوفاز استحکام کششی و مدول یانگ را در فیلم‌ها تحت تأثیر قرار نداد اما منجر به افزایش کشش پذیری در فیلم‌ها شد. به علاوه، ورود باکتریوفاز به فیلم‌ها با توجه به ماهیت هر پلیمر دارای اثرات مختلفی بر شفافیت بود. لذا، مطالعات بیشتری به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی و رهاش این فیلم‌ها بر روی ماتریس‌های مختلف غذایی در شرایط نگه داری مختلف مورد نیاز است. هم چنین، با توجه به قیمت مواد به کار رفته در تولید این فیلم‌های ضد باکتریایی بایستی بهینه ترین مقدار از هر یک از اجزاء تشکیل دهنده فیلم ضد باکتریایی را مورد مطالعه و بررسی قرار داد.

**سپاسگزاری:** این پژوهش با کد ۳/۵۲۶۱۴ با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد و دانشگاه کوردوبای اسپانیا انجام شده است، بدین وسیله از حمایت آنان تقدیر و تشکر می‌گردد.

به تفاوت ساختار است که ابتدا آب به ساختار آمورف انتشار می‌یابد (پلوان) در حالی که، در ژلاتین با ساختار نیمه کریستالی (فشرده‌گی بیشتر) نفوذ پذیری را کاهش می‌دهد (۲۳). در یک تحقیق، نتایج نشان دادند که استفاده از ژلاتین در فیلم لاکتات کیتوزان نفوذپذیری به بخار آب را کاهش داد، که با نتایج ما مطابقت دارد (۲۴). به علاوه، نتایج مطالعات نشان دادند که ورود فاز به فیلم ژلاتین تغییری را در نفوذپذیری به بخار آب ایجاد نکرد (۲۵).

شکل ۲ ویژگی‌های بافتی فیلم‌ها را نشان می‌دهد، ژلاتین دارای ساختار نیمه کریستالی است که بخش کریستالی آن با تشکیل پیوندهای کووالانسی دوگانه باعث افزایش استحکام در فیلم می‌شود (۲۶)، هم چنین، ساختار مارپیچ سه گانه در ژلاتین انعطاف پذیری را کاهش می‌دهد (۲۲)، اما پلوان با دارا بودن ساختار آمورف (اتصالات گلی کوزیدی  $\alpha$ -1-6) دارای حلالیت و انعطاف پذیری بالایی می‌باشد (۲۷). در یک پژوهش، اثر افزودن ژلاتین به پلی ساکاریدهایی از قبیل صمغ عربی، متیل سلولز، نشاسته اصلاح شده، و پلی ساکاریدهای محلول در آب سویا مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن‌ها نشان داد که استحکام و مدول یانگ افزایش و کشش پذیری کاهش یافت (۱۹).

ورود باکتریوفاز به فیلم‌ها کشش پذیری را در فیلم‌ها افزایش داد که این افزایش کشش پذیری می‌تواند به بر هم کنش‌های بین باکتریوفاز و فیلم مربوط باشد. در یک تحقیق، ورود فاز به فیلم ژلاتین تغییری در ویژگی‌های مکانیکی فیلم مشاهده نشد (۲۵)، در حالی که در مطالعه ای دیگر ورود فاز JN01 به فیلم ژلاتین منجر به کاهش استحکام و اندکی افزایش در کشش پذیری فیلم‌ها شد (۱۱).

فیلم ۴۰ ژلاتین-۶۰ پلوان در فیلم‌های فاقد باکتریوفاز پایین ترین شفافیت را نشان داد (شکل ۳) که می‌تواند به سطح خشن بالاتر در آن مربوط باشد. شفافیت فیلم‌ها با ضخامت، توزیع یکنواخت، و مرفولوژی فیلم‌ها در ارتباط است که بر پراکندگی نور اثر گذار است (۲۲).

ورود باکتریوفاز به فیلم‌های ژلاتین، پلوان، و ترکیب ژلاتین-پلوان نتایج مختلفی را در شفافیت فیلم‌ها داشت که می‌تواند متأثر از بر هم کنش‌های بین پلی مرها (ژلاتین و پلوان) با محلول باکتریوفاز باشد. در یک مطالعه، افزودن باکتریوفاز به پلیمرهای کازئینات سدیم، آلژینات سدیم + ژلاتین، و پلی وینیل الکل تغییری در کدورت فیلم‌ها نداشت (۲۸). هم چنین در مطالعه دیگری، افزودن غلظت‌های بالای باکتریوفاز در مقایسه با غلظت‌های پایین به فیلم ژلاتین اندکی

## ● References

- Shakeri, G., Hammerl, J.A., Jamshidi, A., Ghazvini, K., Rohde, M., Szabo, I., et al. The lytic siphophage vB\_StyS-LmqSP1 reduces the number of Salmonella enterica serovar Typhimurium isolates on chicken skin. *Applied and Environmental Microbiology*. 2021;87(24):e01424-21.
- Kashiri, M., Maghsoudlo, Y., Khomeiri, M., Behrooz, R. Evaluation antibacterial activity of Zataria multiflora Boiss. essential oil and Zein bioactive film. *Journal of Food Science & Technology*. 2016;12(50):184-95.
- Sezer, B., Tayyarcan, E.K., Boyaci, I.H. The use of bacteriophage-based edible coatings for the biocontrol of Salmonella in strawberries. *Food Control*. 2022;135(108812).
- Sillankorva, S.M., Oliveira, H., Azeredo, A.J. Bacteriophages and their role in food safety. *International Journal of Microbiology*. 2012;2012:13.
- O'Flynn, G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Coffey, A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of Escherichia coli O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(6):3417-24.
- Anany, H., Brovko, L.Y., El-Arabi, T., Griffiths, M.W. Bacteriophage as Antimicrobials in Food Products: History, Biology and Applications. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality: Woodhead publishing in Food Science, Technology and Nutrition*; 2014. p. 75.
- Yeh, Y., Moura, F.H.D., Broek, K.V.D., Mello, A.S.D. Effect of ultraviolet light, organic acids, and bacteriophage on Salmonella populations in ground beef. *Meat Science*. 2018;139: 44-8.
- Zhang, C., Gao, D., Ma, Y., Zhao, A.X. Effect of gelatin addition on properties of pullulan films. *Journal of Food Science*. 2013;78(6):C805-C10.
- Alves, D., Marques, A., Milho, C., Costa, M.J., Pastrana, L.M., Cerqueira, M.A., et al. Bacteriophage  $\phi$ IBB-PF7A loaded on sodium alginate-based films to prevent microbial meat spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. 2019;291(16):121-7.
- Kamali, S., Yavarmanesh, M., Najafi, M.B.H., Koocheki, A. Poly (lactic acid) and whey protein/pullulan composite bilayer film containing phage A511 as an anti-Listerial packaging for chicken breast at refrigerated temperatures. *LWT- Food Science and Technology*. 2022b;170:114085.
- Li, Y-X., Zhong, C., Zhang, H-Z., Zhao, Y-Y., Shu, M., Wu, G-P. Effectiveness of bacteriophage JN01 incorporated in gelatin film with protocatechuic acid on biocontrol of Escherichia coli O157:H7 in beef. *International Journal of Food Science and Technology* 2022;57:3503-14.
- Yeh, Y., Purushothaman, P., Gupta, N., Ragnone, M., Verma, S.C., Mello, A.S.D. Bacteriophage Application on Red Meats and Poultry: Effects on salmonella population in final ground products. *Meat Science*. 2017;127:30-4.
- Kowalczyk, D., Kordowska-Wiater, M., Karas, M., Zięba, E., Mężyńska, M., Wiącek, A.E. Release kinetics and antimicrobial properties of the potassium sorbate-loaded edible films made from pullulan, gelatin and their blends. *Food Hydrocolloids*. 2020;101:105539.
- Dehnad, D., Emam-Djomeh, Z., Mirzaei, H., Jafari, S-M., Dadashi, S. Optimization of physical and mechanical properties for chitosan-nanocellulose biocomposites. *Carbohydrate Polymers*. 2014;105(25):222-8.
- ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of material. ASTM International. West Conshohocken, PA, USA 1995. p. 14.
- ASTM. Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics. ASTM International. West Conshohocken: PA, USA; 2014. p. 1-15.
- Roy, S., Rhim, J.W. Gelatin/cellulose nanofiber-based functional films added with mushroom-mediated sulfur nanoparticles for active packaging applications. *Journal of Nanostructure in Chemistry*. 2022;12:979-90.
- Gouvea, D.M., Mendonça, R.C.S., Soto, M.L., Cruz, R.S. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;63(1):85-91.
- Kamali, S., Yavarmanesh, M., Najafi, M.B.H., Koocheki, A. Development of whey protein concentrate / pullulan composite films containing bacteriophage A511: Functional properties and anti-Listerial effects during storage. *Food Packaging and Shelf Life*. 2022a;33:100902-17.
- Łupina, K., Kowalczyk, D., Zięba, E., Kazimierzak, W., Mężyńska, M., Basiura-Cembala, M., et al. Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study. *Food Hydrocolloids*. 2019;96:555-67.
- Jahani, S., Shakiba, A., Azami, M. Functional properties, antibacterial and antioxidant activities of zataria multiflora encapsulated in gelatin nanofilms. *Journal of Microbiology, Biotechnology, and Food Sciences*. 2014;4(2):88-92.
- Kowalczyk, D., Skrzypek, T., Basiura-Cembala, M., Łupina, K., Mężyńska, M. The effect of potassium sorbate on the physicochemical properties of edible films based on pullulan, gelatin and their blends. *Food Hydrocolloids*. 2020;105:105837.
- Jenkins, M., Stamboulis, A. *Durability and reliability of medical polymers*. Cambridge: Elsevier Science; 2012.
- Kowalczyka, D., Kordowska-Wiater, M., Nowak, J., Baraniak, B. Characterization of films based on chitosan lactate and its blends with oxidized starch and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015;77:350-9.
- Weng, S., Lopez, A., Saez-Orviz, S., Marcet, I., García, P., Rendueles, M., et al. Effectiveness of bacteriophages incorporated in gelatine films against Staphylococcus aureus. *Food Control*. 2021;121:1-10.
- Jr, W.D.C., Rethwisch, D.G. Deformation and strengthening mechanisms. In: Jr WDC, Rethwisch DG, editors. *Fundamentals of materials science and engineering: An integrated approach*. 5th ed: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. p. 260-308.
- Farris, S., Unalan, I.U., Introzzi, L., Fuentes-Alventosa, J.M., A.Cozzolino, C. Pullulan-based films and coatings for food packaging: present applications, emerging opportunities, and future challenges. *Journal of Applied Polymer Science*. 2014;131(13):40539.
- Dicastillo, C.L.D., Settler-Ramírez, L., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., Carballo, A.G.L. Development of biodegradable films loaded with phages with antilisterial properties. *Polymers*. 2021;13(3):327.

## Use of Bacteriophages in Gelatin-pullulan Films against *Salmonella* Pathogen

Entezari A<sup>1</sup>, Sedaghat N\*<sup>2</sup>, Shakeri G<sup>3</sup>

1- Ph.D. student, Department of Food science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.

2- \*Corresponding author: Full professor, Department of Food science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran. Email: sedaghat@um.ac.ir

3- Fellowship researcher, German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Department of Chemicals and Product Safety, Berlin, German.

Received 2 May, 2023

Accepted 9 Aug, 2023

**Background and Objective:** Use of bacteriophages is an appropriate alternative due to the emergence of resistant bacterial species against antibiotics and their specific performance against pathogenic bacteria that are dangerous for human health. Furthermore, use of compounds that are biodegradable and do not harm the environment can help. In this study, effects of gelatin and bacteriophages on the characteristics of pullulan films were investigated.

**Materials and Methods:** To achieve anti-bacterial films, various percentages of gelatin (0, 20, 40, 60, 80 and 100%) and bacteriophage solutions were used in pullulan films.

**Results:** Results of the experiments showed that the introduction of bacteriophages into the films included no significant effects on the physical characteristics, tensile strength and Young modulus but increased elasticity of the films. Moreover, transparency of the pure gelatin films decreased and transparency of the pullulan increased, while various results were observed in mixed gelatin-pullulan films. Antibacterial effects of the pure gelatin and gelatin-pullulan composite films against the pathogen were higher than those of pure pullulan films.

**Conclusion:** Results of this study showed that adding gelatin to pullulan films could help stabilize bacteriophages in pullulan films and thus achieve better anti-bacterial effects against *Salmonella enteritidis*.

**Keywords:** Biodegradable, Edible film, Bacteriophage, Anti-bacterial