

Production of gelatin-pullulan- nanofibers cellulose film containing salmonella phages and effect its anti-*salmonella* against *Salmonella typhimurium*

Asma Entezari¹, *Nasser Sedaghat², Golshan Shakeri³

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

2- *Corresponding author: Full professor, Department of Food science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
ORCID: 0000000295648410. sedaghat@um.ac.ir

3. Fellowship researcher, German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Department of Chemicals and Product Safety, Berlin, German.
golshan.skakeri@gmail.com

Introduction

The main sources of *Salmonella* for humans are pork, beef, chicken, eggs, fruits, vegetables, and their derivatives such as mayonnaise, and peanut butter. Different species of *Salmonella* can adapt, grow or survive at different environmental conditions. *Salmonella enterica* is one of the main global agents caused by food in humans, and *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* serovars are the most prevalent. One strategy is to use active packaging to reduce the microbial load or prevent the growth of microorganisms on food. Recently, antimicrobial active packaging has received much attention in due to maintaining food quality, safety, and increasing shelf life. Among the antimicrobials used in the food industry, bacteriophages have a very good efficiency to control pathogenic bacteria. Pullulan has a good ability to form a film, its film has good characteristics such as transparency, odorlessness, tastelessness, solubility in water, and low permeability to oxygen and fat, but its problem is related to its price. The combination of polysaccharides with proteins has been done in order to improve the performance and reduce the costs of production films. Gelatin is a suitable option to combine with pullulan in terms of good mechanical properties, reduced permeability, and its good price. Different ratios of gelatin and pullulan were studied and suitable film selected, but it needed to modify, so nanofibers cellulose was added in order to improve the mechanical properties and water resistance, adding cellulose nano fiber can be a good and appropriate option. The aim of this research was evaluated the

effectiveness of gelatin-pullulan- nanofibers cellulose antibacterial composite film containing bacteriophage against *Salmonella Typhimurium* bacteria at two different temperatures during over time.

Materials and Methods

10 gr of each gelatin and pullulan powders were prepared separately and mixed together (20gelatin-80pullulan). Nanofiber cellulose was extracted from rice bran and was used at three different levels (1%, 3%, and 5%). Commercial bacteriophage solution was added to each of the films separately and the films were prepared by molding method. Thickness, moisture content, solubility, swelling, tensile strength, and elongation of gelatin-pullulan film containing nanofibers were studied. Zone inhibitory of films containing different percentage of cellulose nanofibers on the agar media against *Salmonella typhimurium* (10^4 CFU.ml⁻¹) was evaluated. As well as, antibacterial effect of selected film on the poultry meat inoculated to *S. typhimurium* (10^4 CFU.g⁻¹) and numbers of phages on the surface meat at different 4 °C and 12 °C temperatures during times were investigated.

Results and Discussion

The results indicated that gelatin-pullulan film containing different percentages of cellulose were showed approximately 2 mm of zone inhibitory compare to films free phages. Also, inhibitory among films at different percents of nanofibers cellulose did not observe significant changing. Antibacterial effect on poultry meat was dependent on temperature, films loaded with bacteriophages at higher temperature (12 °C) was more effective compare to lower temperature (4 °C). The populations of *S. typhimurium* were decreased 1 log and 0.7 log than control samples at 4 °C after 7 and 9 days, while at 12 °C, after 1 and 9 days decreased 1 log and around 2.55 log rather than control samples, respectively. In a study, beef inoculated with salmonella bacteria was treated by SALMONELEX™ bacteriophage and resulted in decrease 1.29 log reduction of pathogen bacteria compared to the control sample (Yeh *et al.*, 2017). In another study, the antibacterial effect of double-layer poly lactic acid/xanthan film at 10 °C compared to 4 °C against pathogenic bacteria of *Salmonella* and *Listeria* was different and at higher temperature, the number of pathogenic bacteria decreased more (Radford *et al.*, 2017). The numbers of phages were decreased during times at both temperatures, as well as, their numbers did not have significantly changing at both temperatures. Kamali

et al. (2022b) displayed that the release of phages from the film of 30 poly lactic acid/70 whey protein to the meat surface after one hour was 63.22 % and 63.18 % at temperatures of 4 °C and 10 °C, respectively, which presents they did not have significantly difference, after one day at both temperatures.

Keywords: Bio-control, Composite film, Food safety, Pathogen bacteria.

مجله علمی پژوهشی
فصلنامه علمی پژوهشی
پژوهش‌های نوین

تولید فیلم مرکب ژلاتین-پولان-نانوالیاف سلولز حاوی فاز سالمونلا و بررسی اثر

ضد سالمونلایی آن بر علیه سالمونلا تایفی موریوم

اسما انتظاری^۱، ناصر صداقت^۲، گلشن شاکری^۳

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

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

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

چکیده

امروزه به دلیل وجود نگرانی های زیست محیطی و افزایش تقاضای مصرف کنندگان برای محصولات غذایی با کیفیت و ماندگاری بیشتر، استفاده از فیلم ها و پوشش های زیست تخریب پذیر مورد توجه بسیاری واقع شده اند. در این مطالعه، اثر افزودن درصد های مختلف نانوالیاف سلولز به فیلم مرکب ژلاتین-پولان و اثر ضدباکتریایی فیلم های حاوی باکتریوفاژ توسط روش انتشار دیسک بررسی شد. به علاوه، اثر ضدباکتریایی فیلم مرکب ژلاتین-پولان-نانو فیبر سلولز روی گوشت مرغ در طول دوره نگه داری در دو دمای ۴ و ۱۲ درجه سانتی گراد بر علیه باکتری سالمونلا تایفی موریوم مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش درصد نانوفیبرهای سلولز در فیلم ژلاتین-پولان ضخامت، حلالیت، تورم، مقاومت کششی، و درصد کشش پذیری فیلم ها به ترتیب افزایش، کاهش، افزایش، افزایش، و کاهش یافتند. فیلم های حاوی باکتریوفاژ روی محیط آگار ناحیه بازدارندگی خوبی داشتند. استفاده از فیلم ضدباکتریایی روی سطح گوشت مرغ در دمای ۱۲ °C بعد از یک روز منجر به کاهش یک سیکل لگاریتمی شد در حالی که در دمای ۴ °C در روز هفتم یک سیکل لگاریتمی کاهش را در جمعیت باکتری سالمونلا منجر شد.

کلمات کلیدی: ایمنی غذا، بیوکنترل، پاتوژن، فیلم مرکب.

مقدمه

منابع اصلی سالمونلا شامل گوشت خوک، گاو، مرغ، تخم مرغ، میوه جات، سبزیجات، و مشتقات به دست آمده از آن ها مانند مایونز، و کره بادام زمینی است. گونه های مختلف سالمونلا می توانند با شرایط مختلف محیطی سازگار شده، رشد کرده و یا زنده بمانند (Gouvea et al., 2015). سالمونلا انتریکا به عنوان یک عامل مهم در از بین رفتن مواد غذایی، اقتصاد، و سلامت انسان تلقی می شود، که دو سروار مهم آن سالمونلا تایفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس بیشترین شیوع را در بیماری های ناشی از مواد غذایی دارند (Shakeri et al., 2021). یک استراتژی استفاده از بسته بندی های فعال به منظور کاهش بار میکروبی و یا

جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها بر روی مواد غذایی است. در سال‌های اخیر بسته بندی‌های فعال ضد میکروبی به دلیل حفظ کیفیت، ایمنی غذا، و افزایش ماندگاری مورد توجه زیادی واقع شده اند (Alves et al., 2020; Sezer et al., 2022). در بین ضد میکروب‌های مورد استفاده در صنعت غذا باکتریوفازها کارآمدی بسیار خوبی جهت کنترل باکتری‌های پاتوژن‌دارا می‌باشند. آن‌ها دارای ویژگی‌هایی از جمله عمل بر روی یک پاتوژن هدف، جداسازی و تولید آسان هستند. فازهای کوکتیل می‌توانند به منظور غلبه بر محدودیت طیف میزبانی فاز مورد استفاده قرار گیرند، فازهای تجاری مختلفی در بازار موجود هستند که از آن جمله می‌توان به فاز سالمونلکس (SALMONELEX™) اشاره کرد (Alves et al., 2019). سالمونلکس یک کوکتیل فاز متشکل از دو باکتریوفاز Felix 0-1 و S16 می‌باشد که بر علیه طیف وسیعی از گونه‌های باکتری *سالمونلا* مورد استفاده است (Yeh et al., 2018). پلوان یک آگرو پلی ساکارید است که توانایی خوبی به جهت تشکیل فیلم دارد. فیلم‌های پلوان 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 پلی مرهاست. مطالعات متعددی به جهت ترکیب پلی ساکاریدها با پروتئین‌ها در راستای بهبود عملکرد و کاهش هزینه‌های فیلم‌های تولیدی انجام شده است. ژلاتین یک گزینه مناسب برای ترکیب با پلوان به لحاظ خصوصیات مکانیکی خوب، کاهش نفوذ پذیری، و قیمت مناسب است (Zhang et al., 2013). هم‌چنین، به منظور بهبود ویژگی‌های مکانیکی و مقاومت به آب افزودن نانوفیبر سلولز می‌تواند یک گزینه خوب و مناسب باشد (Roy et al., 2022). نانوفیبرهای سلولز می‌توانند نیروی بین مولکولی را در ترکیبات تشکیل دهنده افزایش داده و منجر به بهبود خصوصیات عملکردی فیلم‌ها شوند (Wang et al., 2016). مطالعات مختلفی به لحاظ استفاده از باکتریوفازها در پوشش‌ها و فیلم‌ها به عنوان ترکیبات ضدباکتریایی انجام شده است، که به عنوان مثال می‌توان به استفاده از آن‌ها در کنساتره پروتئین آب پنیر، کربوکسی متیل سلولز، کیتوزان، و آلژینات سدیم اشاره کرد (Sezer et al., 2022). هدف از انجام پژوهش حاضر، تولید فیلم فعال و زیست تخریب پذیر ژلاتین - پلوان - نانوفیبر سلولز حاوی باکتریوفاز و ارزیابی خواص فیزیکی و ضدباکتریایی آن بر علیه باکتری *سالمونلا تایفی موریوم* روی گوشت مرغ در طول دوره نگه داری در دماهای ۴ و ۱۲ درجه سانتی گراد بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ژلاتین، گلیسرول، و تریس-بیس از شرکت سیگما آلدریج، و پلوان از شرکت هایاشیبارای ژاپن خریداری شدند. مواد شیمیایی از قبیل زایلوز لیزین دکسیکولات (XLD)، تریپتون سوی براث^۲ (TSB)، و آگار از شرکت اکسوید انگلیس، منیزیم سولفات ۷ آبه (MgSO₄.7H₂O) از اوتوگ آلمان، و کلرید سدیم از شرکت لب کم اسپانیا، 2,2,6,6-tetramethyl-TEMPO) از اوتوگ آلمان، و کلرید سدیم از شرکت لب کم اسپانیا،

¹ Xylose Lysine Deoxycholate

² Tryptone Soy Broth

piperidin-1-oxyle، ۹۸٪)، هیدروکسید سدیم (> ۹۹٪ NaOH) و هیدروکلریک اسید (۳۷٪) از شرکت سیگما آلدریج، سدیم برمید از Hoynewell آمریکا، هیپوکلریت سدیم (NaClO) از شرکت Panreac تهیه شدند.

تیتراسیون فاز سالمونلا

به منظور تیتراژ به روش آگار دولایه، ابتدا فاز تجاری سالمونلکس (میکروئوس، هلند) در SM^۲ بافر رقت سازی شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محیط سالمونلا تایفی موریوم (ATCC 704) ۱۸ ساعت کشت، به تیوب های محیط TSB حاوی ۰/۴٪ آگار منتقل و بعد ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به آن ها اضافه و ورتکس گردیدند سپس روی محیط تریپتون سوی آگار^۴ (TSA) ریخته شدند، و در نهایت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه و تعداد پلاک ها شمارش گردید (Yeh et al., 2017).

آماده سازی الیاف و نانوفیبر سلولز^۵

جهت تهیه نانوفیبر سلولز، فرآیند خمیر سازی سبوس برنج در یک دیگ پخت با ظرفیت ۱۵ لیتر انجام شد. دیگ پخت مجهز به یک گرم کننده خارجی، محور افقی چرخان، و سیستم های اندازه گیری دما و فشار بود که با هیدروکسید سدیم ۷٪ در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد برای مدت زمان ۱۵۰ دقیقه در تماس قرار گرفت. نسبت مایع پخت به وزن خشک نمونه ۸ به ۱ در نظر گرفته شد. پس از زمان مذکور، مخلوط به دست آمده از الک با مش ۰/۱۴ میلی متر عبور داده شد. خمیر سلولزی جهت حذف آب اضافه سانتریفیوژ و تا زمان استفاده در دمای محیط قرار گرفته تا خشک شود. از بین رفتن لیگنین موجود در فیبرها با افزودن کلریت سدیم (NaClO_۲) در شرایط اسیدی در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد و مدت زمان یک ساعت انجام شد، به این صورت که ۰/۳ گرم کلریت سدیم به ازای هر گرم فیبر با اسید استیک ۲٪ (حجمی:حجمی) مخلوط تا سوسپانسیون فیبری ۳٪ (وزنی:حجمی) به دست آید. این عمل سه مرتبه تکرار شد تا به طور کامل فیبرها رنگ بری شوند (Morcillo-Martín et al., 2022).

دو پیش تیمار مکانیکی و اکسیداسیون به وسیله TEMPO به منظور تسهیل تولید الیاف سلولز به نانو الیاف استفاده شد. در پیش تیمار مکانیکی، الیاف سلولز معلق در آب در پالایشگر پی اف آی با سرعت ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفت تا به درجه روانی ۹۰ شوپر-ریگلر برسد. در اکسیداسیون به وسیله TEMPO، الیاف سلولز (۱ گرم) در آب (۱۰۰ میلی لیتر) حاوی 2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl radical (۰/۱۶ گرم، ۰/۱ میلی مول) و سدیم برمید (۰/۱ گرم، ۱ میلی مول) قرار گرفتند، سپس محلول NaClO (۱۲٪) با pH = ۱۰ اضافه شد تا به قدرت اکسیداتیو ۵ میلی مول در هر گرم فیبر برسد و در دمای محیط با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه هم زده شد و اسیدیته با افزودن سود (۰/۵ مولار) در مقدار ۱۰ ثابت نگه داشته شد. در نهایت، زمانی که اسیدیته بدون تغییر باقی ماند واکنش به پایان رسید و سلولز اکسید شده با آب شسته و صاف شد. یک سوسپانسیون از الیاف پیش

³ Saline Magnesium

⁴ Tryptone Soy Agar

⁵ Nanofibers Cellulose (NFCs)

تیمار شده ۱ درصد تحت یک فرآیند نانوفیبریلایسیون در یک هموژنایزر فشار بالا قرار گرفت تا نانوالیاف تشکیل دهنده لیاف سلولزی را جدا کند. برای جلوگیری از انسداد هموژنایزر، فیبریلایسیون تدریجی به ترتیب زیر انجام شد: ۴ مرتبه در ۳۰۰ بار، ۳ مرتبه در ۶۰۰ بار و ۳ مرتبه در ۹۰۰ بار (Morcillo-Martín *et al.*, 2022).

بازده نانوالیاف سلولز

جهت تعیین عملکرد نانوفیبرسلاسیون نانوفیبر سلولز، ژل رقیق شده (۱/۰٪ ماده خشک) به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به منظور جداسازی بخش غیرنانوفیبریل شده از ماده نانوفیبریل شده سانتریفیوژ شد. سپس، بخش غیرنانوفیبر جمع آوری و در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۴ ساعت در آون قرار داده گرفت تا خشک شده و به وزن ثابت برسد. با توجه به رابطه (۱) بازده بخش نانوفیبریل شده محاسبه گردید (Besbes *et al.*, 2010):

$$(1) \quad \left[\frac{\text{وزن نمونه رقیق شده} \times \text{مقدار ماده جامد نمونه ژل رقیق شده}}{\text{وزن بخش خشک شده}} - 1 \right] = \text{بازده}(\%)$$

تهیه فیلم مرکب ژلاتین-پولان-نانوفیبر سلولز حاوی فاز

۱۰ گرم از هر یک 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 سانتی گراد توسط توسط گرمکن حرارت داده شده و به طور پیوسته توسط مگنت هم زده شدند و با نسبت ۲۰٪ژلاتین-۸۰٪ پولان با یکدیگر در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شدند. مقادیر ۱، ۳، و ۵٪ نانو فیبر سلولز(بازده ۹۶٪) جداگانه به فیلم مرکب حاصل اضافه شدند و مخلوط حاصل برای مدت ۳ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد هم زده شدند و در نهایت محلول فاز اضافه گردید، سپس محلول فیلم های تهیه شده قالب ریزی شدند و در دمای اتاق برای مدت ۳ روز خشک گردیدند (Miraghaei and Cheguini, 2014). فیلم های تهیه شده قبل از انجام آزمایشات برای مدت ۴۸ ساعت مشروط شدند. فیلم های بدون فاز به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

ضخامت و محتوای رطوبت فیلم ها

ضخامت هریک از فیلم ها توسط میکرومتر دیجیتالی (Mitutoyo, No, 293-561, Tokyo, Japan) در ۵ نقطه مختلف از فیلم ها انجام و میانگین آن ها در به عنوان ضخامت نهایی در نظر گرفته شد. به منظور تعیین مقدار رطوبت، فیلم ها به ابعاد $2 \times 2 \text{ cm}^2$ برش داده شده و وزن گردیدند (W_1) و در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند زمانی که به وزن ثابت رسیدند، وزن نهایی آن ها ثبت گردید (W_2) و درصد افت وزن نمونه ها با توجه به رابطه (۲) محاسبه شد (González *et al.*, 2018):

$$(2) \quad \text{مقدار رطوبت}(\%) = (W_1 - W_2 / W_1) \times 100$$

حلالیت در آب و تورم

فیلم ها به ابعاد $2 \times 2 \text{ cm}^2$ برش داده شده و وزن شدند (M_0) و در آون با دمای 105 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت قرار گرفتند و وزن آن ها یادداشت گردید (M_1)، سپس فیلم ها به صورت جداگانه در 50 میلی لیتر آب مقطر به مدت 24 ساعت در دمای محیط قرار گرفتند و وزن آن ها بعد از قرار گیری بر روی کاغذ به منظور حذف آب اضافه، ثبت شد (M_2). سپس مجدد فیلم ها در آون با دمای 105 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت قرار گرفتند و در نهایت مجدد وزن گردیدند (M_3). درصد حلالیت در آب و تورم فیلم ها به ترتیب با استفاده از رابطه های (۳) و (۴) محاسبه گردید (Kowalczyk *et al.*, 2020):

$$(3) \quad (\%) \text{ حلالیت در آب} = (M_1 - M_3 / M_1) \times 100$$

$$(4) \quad (\%) \text{ تورم} = (M_1 - M_2 / M_1) \times 100$$

خصوصیات بافتی

خصوصیات مکانیکی فیلم ها توسط روش استاندارد ASTM D638 و دستگاه بافت سنج انجام شد (ASTM, 2014). ابتدا فیلم ها به ابعاد $5 \times 1 \text{ cm}^2$ برش داده شدند و بین دو فک دستگاه به فاصله 65 میلی متر و سرعت 10 میلی متر بر دقیقه قرار گرفتند. ضخامت فیلم ها در قسمت های مختلف به صورت تصادفی توسط یک میکرومتر دیجیتال اندازه گیری شدند. آزمایشات در سه تکرار انجام شد. مقاومت کششی و کشش پذیری به ترتیب با توجه به رابطه های (۵) و (۶) محاسبه شدند:

$$(5) \quad F_{\max} / A = \text{مقاومت کششی (مگاپاسکال)}$$

$$(6) \quad (\%) \text{ کشش پذیری} = \frac{\Delta L}{L} \times 100$$

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

فاژ بارگذاری شده در فیلم ها

به منظور تعیین مقدار باکتریوفاژ بارگذاری شده در فیلم ها، ابتدا فیلم ها به ابعاد $2 \times 2 \text{ cm}^2$ برش داده شده و داخل میکروپلیت های حاوی 2 میلی لیتر SM بافر قرار گرفتند و توسط انکوباتور شیکردار به مدت یک ساعت (150 rpm) در دمای محیط قرار گرفتند. بعد از رقت سازی تعداد فاژها به روش آگار دو لایه تعیین شد (Kamali *et al.*, 2022a).

ناحیه بازدارندگی فیلم ها

به منظور بررسی ناحیه بازدارندگی فیلم ها، ابتدا باکتری *سالمونلا تایفی موربوم* (ATCC 704) در مرحله فاز لگاریتمی رشد تا رقت 10^4 (CFU. ml^{-1}) در تریپتون سوی براث رقیق شد و 100 میکرو لیتر از آن با محیط TSB حاوی 0.4% آگار مخلوط و بر روی TSB دارای $1/5\%$ آگار ریخته شد و صبر کرده تا در دمای اتاق سفت شود. سپس، دیسک هایی از فیلم های حاوی باکتریوفاژ به قطر 16 میلی متر بر روی آن ها قرار گرفت. دیسک های فیلم بدون باکتریوفاژ به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند (Leung *et al.*, 2017).

تلقیح باکتری سالمونلا به گوشت مرغ

گوشت مرغ از فروشگاه مواد غذایی تهیه و در ظرف حاوی کیسه یخ به سرعت به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه های گوشت مورد آزمایش میکروبی تشخیص سالمونلا قرار گرفتند تا به لحاظ عدم حضور باکتری پاتوژن سالمونلا بررسی شوند. نتایج نشان داد که گوشت مورد آزمایش عاری از باکتری سالمونلا است. گوشت ها در زیر هود لامینار در شرایط استریل به قطعاتی با وزن ۵ گرم برش داده شدند، سپس از سوسپانسیون باکتری که دارای غلظت 10^8 (CFU. ml⁻¹) بود تا غلظت 10^5 (CFU. ml⁻¹) رقت سازی انجام و مقدار ۵۰ میکرولیتر از آن به سطح گوشت مرغ تلقیح شد و در نهایت غلظت 10^4 (CFU. g⁻¹) به دست آید. بعد از ۲۰ دقیقه فیلم حاوی فاژ بر سطح گوشت قرار گرفت. نمونه های آماده شده در دماهای ۴ و ۱۲ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و بعد از ۳۰ دقیقه، ۱، ۳، ۷، و ۹ روز تعداد باکتری های پاتوژن و تعداد فاژهای موجود بر سطح گوشت مورد بررسی قرار گرفتند. فیلم بدون فاژ به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (Weng et al., 2021).

شمارش باکتری سالمونلا تایفی موریوم

نمونه های گوشت مرغ مورد آزمایش در شرایط استریل داخل کیسه قرار گرفته و توسط ترازوی رقیق کننده حجم مناسبی از SM بافر با نسبت ۱ به ۱۰ رقیق سازی انجام شد و توسط بلندر مخلوط شدند. سپس جهت شمارش باکتری پاتوژن در محلول کلرید سدیم (۰/۰۸۵٪) رقت سازی انجام و بر روی محیط XLD آگار کشت خطی داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند، و در نهایت تعداد باکتری ها شمارش گردید (Radford et al., 2017).

شمارش فاژهای سطح گوشت

جهت شمارش فاژهای موجود در سطح گوشت های مرغ، از کیسه های حاوی نمونه گوشت و محلول SM بافر حجمی از بخش مایع برداشته و توسط فیلتر سیرینگ (۰/۲۲ میکرومتر) مخلوط باکتری و فاژ از یکدیگر جدا گردیدند و از بخش مایع فیلتر شده رقت سازی در SM بافر انجام و به روش آگار دولایه تعداد فاژها تعیین گردید (Radford et al., 2017).

طرح آماری

آزمایشات براساس طرح فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی انجام شدند، و داده ها براساس روش تجزیه آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح آماری ۵ درصد انجام شد. آزمایشات در سه تکرار انجام گرفتند.

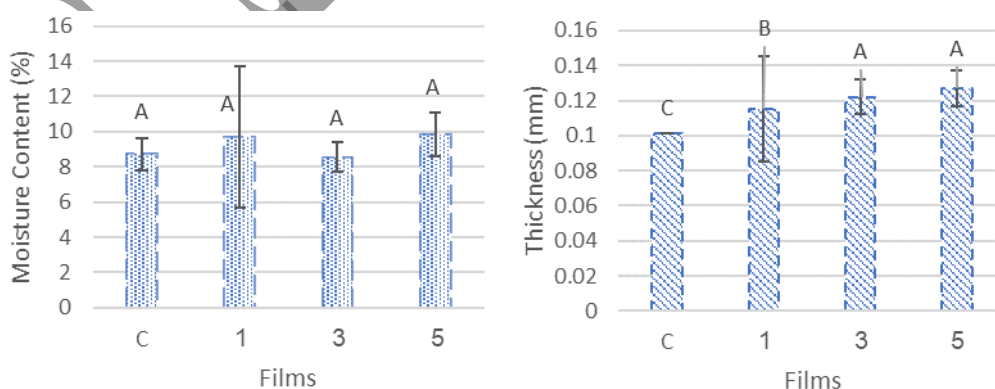
نتایج و بحث

ضخامت، محتوای رطوبت، حالیت، و تورم فیلم ها

همان طور که در شکل ۱ (الف) مشاهده می کنید، فیلم ۲۰ ژلاتین-۸۰ پلوان (شاهد) کم ترین ضخامت را داشت و استفاده از ۳ و ۵٪ نانوفیبر سلولز در آن ضخامت بیشتری را در مقایسه با فیلم حاوی ۱٪ نانوفیبر سلولز ایجاد کرد ($P < 0.05$) که دلیل این

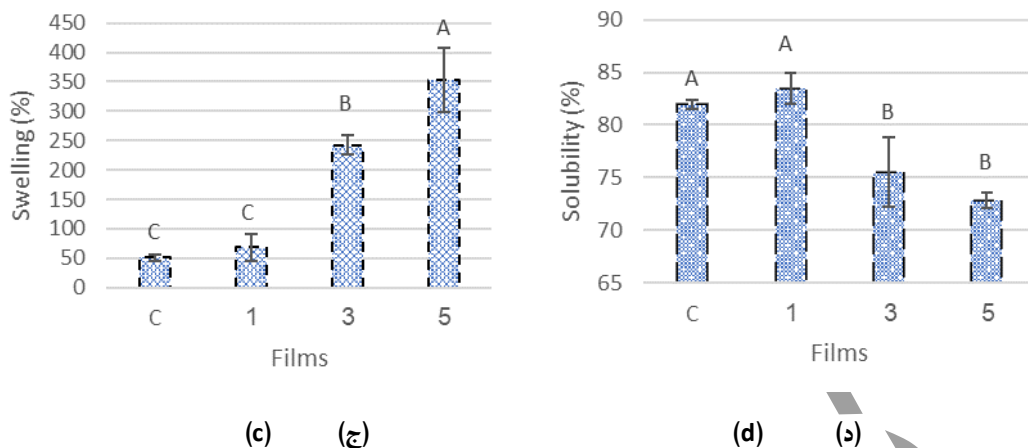
افزایش ضخامت مربوط به افزایش مقدار مواد جامد است (Kassab *et al.*, 2019). محتوای رطوبت فیلم ژلاتین-پولان حاوی مقادیر مختلف نانوالیاف سلولز در شکل ۱ (ب) نشان داده شده است. افزودن نانوالیاف سلولز تفاوت معناداری در محتوای رطوبت فیلم ها نداشت ($P>0.05$). در یک مطالعه، نتایج نشان داد که افزودن نانوبلور سلولز به فیلم ژلاتین منجر به افزایش ضخامت شد و این افزایش ضخامت با افزایش درصد نانوکریستال ها رابطه مستقیمی داشت (Ratna *et al.*, 2022). هم چنین، آن ها نشان دادند که افزودن مقادیر مختلف نانوالیاف سلولز به فیلم ژلاتین، محتوای رطوبت فیلم ها را تحت تأثیر قرار نداد.

شکل ۱ اثر افزودن درصدهای مختلف نانوالیاف سلولز را بر حلالیت (ج) و تورم (د) فیلم ژلاتین - پولان نشان می دهد. افزودن مقادیر مختلف نانوالیاف سلولز به فیلم ژلاتین - پولان تفاوت آماری معناداری را در حلالیت و تورم فیلم ها نشان داد ($P<0.05$). بالاترین میزان حلالیت مربوط به فیلم شاهد و فیلم حاوی ۱٪ نانوفیبر بود و با افزودن ۳٪ و ۵٪ نانوفیبر به فیلم شاهد حلالیت کاهش قابل ملاحظه ای پیدا کرد که یکی از دلایل آن مربوط به تفاوت در ضخامت فیلم ها است زیرا فیلم های خوراکی با ضخامت کم تر، حلالیت بیشتری را از خود نشان می دهند (Khodaei *et al.*, 2020). دلیل دیگر مربوط به ساختار سه بعدی نانوفیبر سلولز است که از حرکت و جابه جایی پلیمر به آب محافظت می کند. به علاوه، با ورود نانوفیبر سلولز به فیلم خاصیت کریستالی افزایش می یابد که منجر به کاهش نفوذ آب به درون زنجیره های پلیمر می شود (Jahed *et al.*, 2019). افزودن نانوفیبر اتیل سلولز به فیلم پولان منجر به افزایش پایداری در آب شد و با افزایش مقدار نانوفیبر در فیلم پولان، پایداری در آب بیشتر شد (Yang *et al.*, 2020). همان طور که در شکل ۱ (د) مشاهده می کنید، بیشترین و کم ترین تورم را به ترتیب فیلم های دارای ۵٪ نانوفیبر سلولز و فیلم شاهد نشان دادند. افزودن نانوفیبر تورم را افزایش داد زیرا استفاده از نانوفیبر سلولز تخلخل را در ساختار فیلم افزایش می دهد. در یک مطالعه، افزودن نانوفیبرهای سلولز باکتریایی به فیلم ژلاتین ماهی منجر به کاهش شاخص تورم در فیلم ها شد (Shabanpour *et al.*, 2018).



(a) (الف)

(b) (ب)



شکل ۱- تأثیر افزودن مقادیر مختلف نانوالیاف سلولز بر ضخامت (الف)، محتوای رطوبت (ب)، حلالیت (ج)، و تورم (د) فیلم های ژلاتین-پولولان.

Figure 1- Thickness (a), moisture content (b), solubility (c), and swelling (d) of gelatin-pullulan films containing at different percentages of NFCs.

خصوصیات مکانیکی

جدول ۲ اثر درصدهای های مختلف نانوفیبر را بر مقاومت کششی و کشش پذیری فیلم مرکب ژلاتین-پولولان نشان می دهد. افزودن نانوفیبر به فیلم مرکب ژلاتین-پولولان منجر به تغییر معناداری در مقاومت کششی و درصد کشش پذیری شد ($P < 0.05$)، به طوری که مقدار مقاومت کششی در فیلم ژلاتین-پولولان حاوی ۵، ۳، ۱٪ نانوفیبر، و شاهد به ترتیب ۳۲/۳، ۲۷/۹۶، ۲۶/۲۷، و ۲۲/۱۷ مگا پاسکال بود. فیلم دارای ۵٪ نانوفیبر استحکام کششی بالاتری نسبت به فیلم شاهد داشت که به بر هم کنش های سطحی مناسب بین ماتریس پلیمر و نانوفیبر سلولز می تواند مربوط باشد، که منجر به انتقال کارآمد تنش توسط لایه های نانوفیبر-پلیمر می شود. فیلم های دارای نانوالیاف سلولز دارای درصد کشش پذیری پایین تری نسبت به فیلم شاهد بودند، که دلیل آن را می توان به افزایش ضخامت در فیلم ها مربوط دانست (Roy and Rhim, 2022)؛ و یا ایجاد باندهای هیدروژنی درون مولکولی بین گروه های ژلاتین-پولولان و نانوفیبر سبب افزایش مقاومت به کشش و کاهش کشش پذیری شده اند (Chen and Chi, 2022). تروواتی و همکاران (Trovatti et al., 2012) نشان دادند که افزودن نانوفیبر به فیلم پولولان منجر به افزایش مقاومت کششی و کاهش کشش پذیری شد.

جدول ۱- تأثیر مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز بر مقاومت کششی و کشش پذیری فیلم ژلاتین-پولولان

Table 1. The effect of cellulose nanofibers on tensile strength and elongation of gelatin-pullulan film

فیلم ها	مقاومت کششی (مگاپاسکال)	کشش پذیری (درصد)
Films	Tensile strength (MPa)	Elongation (%)
control	22.173 ± 6.39^C	5.50 ± 3.54^A
1%	26.27 ± 1.94^B	3.03 ± 0.59^B
3%	27.958 ± 3.25^B	3.36 ± 0.07^B

5%

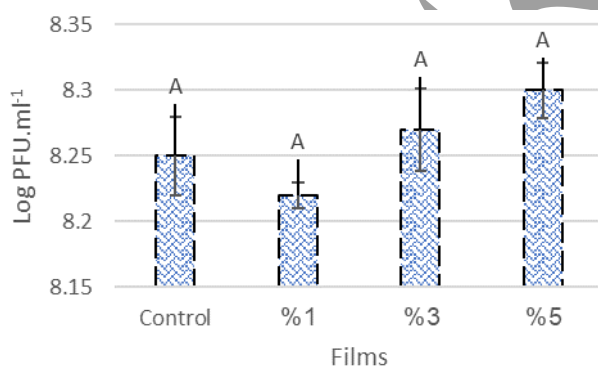
 32.3 ± 5.14^A 3.34 ± 0.78^B

* داده ها براساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است. داده های دارای حروف مشابه در یک ستون از لحاظ آماری اختلاف معنادار ندارند ($P < 0.05$).

*Results are reported as mean \pm SD. Mean with different letters in each column present significant difference ($P < 0.05$).

فاژ بارگذاری شده در فیلم ها

همان طور که در شکل ۲ ملاحظه می کنید، تفاوت آماری معناداری بین مقدار فاژ بارگذاری شده در فیلم های ژلاتین-پولان حاوی مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز وجود ندارد ($P > 0.05$). مطالعات گووآ و همکاران (Gouvea *et al.*, 2015) نشان داد که فیلم استات سلولز حاوی باکتریوفاژ اثری در از بین رفتن فاژها در طی فرآوری و خشک کردن نداشت. درحالی که، نتایج آزمایشات فرجی و همکاران (Faraji *et al.*, 2019) نشان داد که تولید فیلم استات سلولز حاوی فاژ بدون تیمار پلاسما، تعداد فاژ بارگذاری شده در فیلم کاهش یافت که این تفاوت مربوط به روش افزودن فاژ به فیلم و نوع فاژ به کار رفته است.



شکل ۲- مقدار فاژ بارگذاری شده در فیلم ژلاتین-پولان حاوی مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز

Figure 2- Loaded phages in gelatin-pullulan film containing at different percentages of NFCs

ناحیه بازدارندگی

جدول ۲ ناحیه بازدارندگی فیلم ژلاتین-پولان حاوی درصد های مختلف ۱، ۳، و ۵٪ نانوفیبر سلولز را در برابر باکتری سالمونلا تایفی موریوم نشان می دهد. همان طور که مشاهده می کنید، تفاوت معناداری بین ناحیه بازدارندگی فیلم ها دیده نمی شود ($P > 0.05$)، و در فیلم های فاقد فاژ (شاهد) ناحیه بازدارندگی صفر بود. مکانیسم عمل آن به صورت خلاصه این چنین است که فاژ Felix 0-1 می تواند باندهایی با گیرنده های N-استیل گلوکز آمین های قرار گرفته در ترمینال زنجیره های پلی ساکاریدی تشکیل دهد، که روی مرکز سطح خارجی لیپو پلی ساکارید است و فاژ S16 باندهایی با غشاء خارجی پروتئین C تشکیل می دهد، که در نهایت منجر به لیز شدن و مرگ سلول باکتری می شود. N-استیل گلوکز آمین و پروتئین C ترکیبات متداول باقی مانده روی سطح غشاء باکتری سالمونلا هستند (Yeh *et al.*, 2017).

جدول ۲- ناحیه بازدارندگی فیلم ژلاتین-پولان دارای مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز در برابر باکتری سالمونلا تایفی موریوم

Table 2- Zone inhibitory of gelatin-pullulan film at different percentages of NFCs loaded with phages against *S. typhimurium*

فیلم ها Films	ناحیه باز دارندگی (سانتی متر) Zone inhibitory (cm)
Control+Phage	2.17 ± 0.136 ^A
Control	0 ^B
Control +1%+Phage	2.01 ± 0.369 ^A
Control +1%	0 ^B
Control +3%+Phage	2.23 ± 0.118 ^A
Control +3%	0 ^B
Control +5%+Phage	2.12 ± 0.354 ^A
Control +5%	0 ^B

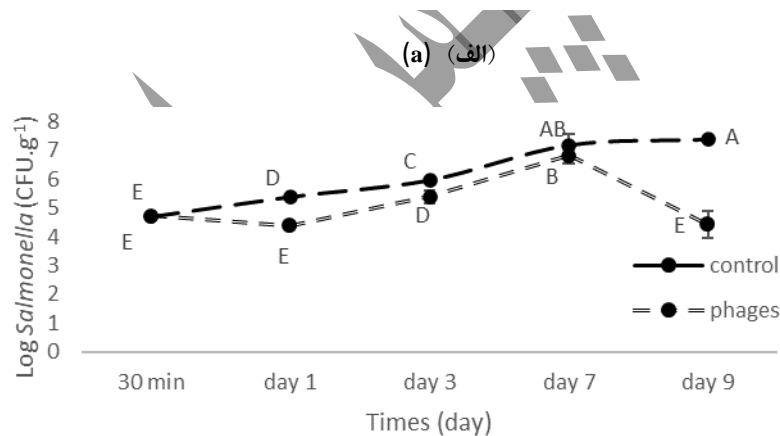
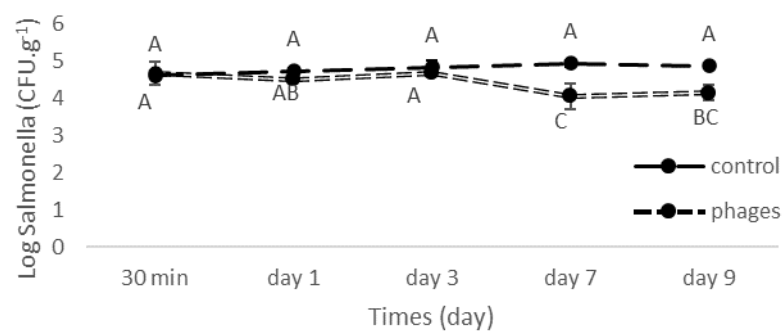
* داده ها براساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. داده های دارای حروف مشابه در یک ستون از لحاظ آماری اختلاف معنادار ندارند (P<0.05).

*Results are reported as mean ± SD. Mean with different letters in each column present significant difference (P<0.05).

شمارش باکتری پاتوژن

فیلم مرکب ژلاتین - پلولان دارای ۵٪ نانوفیبر سلولز به دلیل داشتن خصوصیات فیزیکیوشیمیایی مناسب تری جهت استفاده روی گوشت مرغ تلقیح شده به باکتری سالمونلا انتخاب شد. شکل های ۳ (الف) و (ب) اثر ضدباکتریایی فیلم های حاوی و فاقد فاز را در طول دوره نگه داری در دو دمای ۴ و ۱۲ درجه سانتی گراد نشان می دهند. همان طور که مشاهده می کنید، در دمای ۴ درجه سانتی گراد فیلم ضدباکتریایی در روزهای اول و سوم تفاوت معناداری در مقایسه با شاهد نداشت (P>0.05)، در حالی که در روزهای هفتم و نهم نزدیک به یک و ۰/۷ سیکل لگاریتمی کاهش در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده شد (P<0.05)، در حالی که در دمای ۱۲ درجه (شکل ۳ ب) فیلم حاوی فاز بعد از یک روز ۱ سیکل لگاریتمی و در روز نهم ۲/۳۵ سیکل لگاریتمی کاهش در مقایسه با شاهد داشت (P<0.05). دمای بهینه برای فازها ۳۰ درجه سانتی گراد است بنابراین فاز در دمای بالاتر نسبت به به دمای پایین بهتر عمل می کند (Dicastillo et al., 2021). هم چنین، توزیع یکنواخت و توانایی انتشار کارآمد ذرات فاز، ساختار و ترکیبات شیمیایی غذاهای مختلف بر خاصیت ضد میکروبی فاز تأثیر دارند (Guenther et al., 2012). نتایج رادفورد و همکاران (Radford et al., 2017) نشان داد که اثر ضدباکتریایی فیلم دولایه پلی لاکتیک اسید/ زانتان در دمای ۱۰ درجه نسبت به دمای ۴ درجه سانتی گراد در برابر باکتری های پاتوژن سالمونلا و لیستریا با یکدیگر تفاوت داشته و در دمای بالاتر تعداد باکتری های پاتوژن کاهش بیشتری را داشتند. جمعیت باکتری سالمونلا در نمونه های تیمار شده با فیلم حاوی فاز سالمونلا در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد در روز سوم کاهش معناداری در مقایسه با نمونه های شاهد در شرایط هوازی و خلاء بسته بندی داشت و حتی در شرایط خلاء در روز ۱۴ کاهش بیشتری مشاهده شد و کاهش جمعیت بیشتری در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد نسبت به دمای ۴ درجه با گذشت زمان نشان داد. نتایج ونگ و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که استفاده از فیلم ژلاتین حاوی فاز استافیلوکوکوس روی نمونه های پنیر نگه داری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد در روز سوم منجر به کاهش قابل توجهی در جمعیت باکتری

استافیلوکوکوس اورئوس شد که با افزایش میزان فاژ بارگذاری شده در فیلم تعداد باکتری کاهش بیشتری داشت (Weng et al., 2021). کمالی و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند استفاده از فیلم دو لایه پلی لاکتیک اسید / کنسانتره پروتئین آب پنیر حاوی فاژ لیستریا روی گوشت مرغ در دماهای ۴ و ۱۰ درجه سانتی گراد بعد از ۲۴ ساعت کاهش معناداری را در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد و اثر ضدباکتریایی در روز پنجم به حداکثر رسید و بعد از آن تفاوت معناداری نداشت، به علاوه، اثر ضدباکتریایی فیلم فعال بر علیه باکتری لیستریا در دمای ۴ درجه نسبت به ۱۰ درجه سانتی گراد بیشتر بود (Kamali et al., 2022b). در یک مطالعه، گوشت گاو تلقیح شده به باکتری پاتوژن سالمونلا توسط باکتریوفاژ سالمونلکس تیمار شد و نتیجه آزمایش بعد از ۲۴ ساعت ۱/۲۹ سیکل لگاریتمی کاهش را در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد (Yeh et al., 2017).



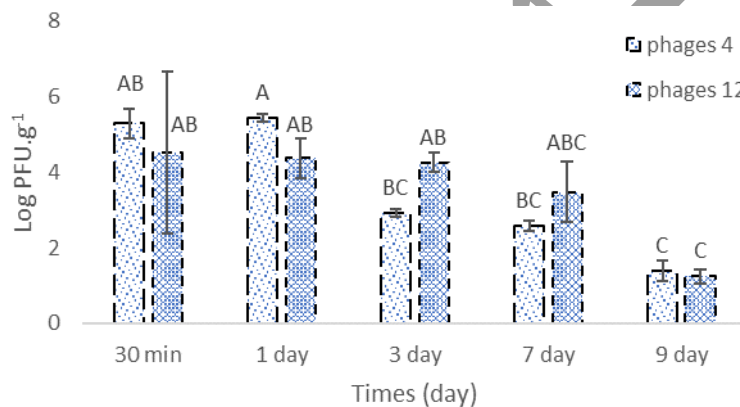
شکل ۳- تعداد باکتری سالمونلا تایفی موریموم بر روی گوشت مرغ در دماهای ۴ (الف) و ۱۲ (ب) درجه سانتی گراد در طی زمان

Figure 3. Numbers of *S. typhimurium* on the chicken meat at 4 °C (a) and 12 °C (b) temperatures during times

شمارش فازهای سطح گوشت

شکل ۴ تعداد فازهای موجود در بر سطح گوشت مرغ را در دو دمای ۴ و ۱۲ درجه سانتی گراد نشان می دهد. همان طور که ملاحظه می کنید، به طور کلی با گذشت زمان تعداد فازها کاهش می یابد. تعداد فازهای موجود بر سطح نمونه های گوشت مرغ در دو دما با یکدیگر تفاوت آماری معناداری نداشتند ($P>0.05$). به طور کلی، پایداری فازها به ماتریس غذایی که به عنوان

بستر(سوبسترا) استفاده شده بستگی دارد (Robeson *et al.*, 2014). ترکیبات موجود در غذا و فاز استفاده شده بر پایداری فاز در سیستم های غذایی اثرگذار هستند و هر گونه تغییر می تواند نقطه ایزوالکتریک فاز و مقاومت یونی محیط را تغییر دهد و منجر به تغییر ساختار و عملکرد فاز شود (C.García-Anaya *et al.*, 2020). نتایج یک مطالعه نشان داد که استفاده از فیلم دو لایه پلی لاکتیک اسید/زانتان حاوی باکتریوفازهای سالمونلا و لیستریا در طی دوره نگه داری در دو دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتی گراد با یکدیگر تفاوت آماری معناداری ندارند (Radford *et al.*, 2017). نتایج یک مطالعه دیگر نشان داد که رهائش فازها از فیلم با نسبت ۳۰ پلی لاکتیک اسید / ۷۰ پروتئین آب پنیر به سطح گوشت بعد از یک ساعت ۶۳/۲۲٪ و ۶۳/۱۸٪ به ترتیب در دماهای ۴ و ۱۰ درجه سانتی گراد بودند که با یکدیگر تفاوت معناداری نداشتند و در طی دوره ۵ روزه بعد از یک روز در هر دو دما تعداد فازهای موجود بر سطح گوشت ثابت بود (Kamali *et al.*, 2022b). در مطالعه دیگر، درصد رهائش فازهای انکپسوله شده در فیلم ایزوله پروتئین آب پنیر به سطح کاهو بعد از ۳ ساعت ۰/۳۷٪ بود. دلیل این تفاوت ها را می توان به ویژگی های فازهای مختلف و پوشش ها مربوط دانست (Vonasek *et al.*, 2014).



شکل ۴- تعداد فازهای سالمونلا بر روی گوشت مرغ در دماهای ۴ و ۱۲ درجه سانتی گراد در طی زمان

Figure 4. Numbers of phages at 4 °C and 12 °C temperatures on the chicken meat during times

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که فیلم مرکب ژلاتین-پولان-نانوفیبر سلولز می تواند به عنوان یک سیستم حامل باکتریوفاز روی ماده غذایی می تواند کاربرد داشته باشد. اثر آنتی باکتریال فیلم های ژلاتین-پولان دارای مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز حاوی باکتریوفاز روی محیط آگار با یکدیگر تفاوت معناداری نداشتند. رهائش باکتریوفازها از فیلم مرکب به سطح گوشت مرغ منجر به کاهش جمعیت باکتری سالمونلا شد. اثر آنتی باکتریال فیلم ترکیبی ژلاتین-پولان-نانوفیبر سلولز روی گوشت مرغ بر علیه باکتری پاتوژن سالمونلا در دمای ۱۲ درجه موفقیت آمیزتر از دمای ۴ درجه سانتی گراد بود و در دمای ۴ °C کاهش آهسته تری را در جمعیت سالمونلا شاهد بودیم، زیرا حداقل دمای رشد برای باکتری سالمونلا ۱۰ درجه سانتی گراد است تا باکتریوفاز بتواند اثر آنتی باکتریال خود را بهتر نشان دهد. پیشنهاد ما این است که استفاده از این فیلم ضدباکتریایی در میوه ها و سبزیجات که در

دمای بالاتری نسبت به گوشت نگه داری می شوند، مناسب تر است و اثر بخشی بیشتری دارد، لذا بایستی مورد مطالعه بیشتر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با کد ۲/۵۲۶۱۴ با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد و دانشگاه کوردوبای اسپانیا انجام شده است، بدین وسیله از حمایت آنان تقدیر و تشکر می گردد.

منابع

- Alves, D., Cerqueira, M. A., Pastrana, L. M., & Sillankorva, S. (2020). Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis*. *Food Research International*, 128, 108791 . doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108791
- Alves, D., Marques, A., Milho, C., Costa, M. J., Pastrana, L. M., Cerqueira, M. A., & Sillankorva, S. M. (2019). Bacteriophage ϕ IBB-PF7A loaded on sodium alginate-based films to prevent microbial meat spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 291(16), 121-127 . doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.026
- ASTM. (2014). Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics. In *ASTM International* (Vol. ASTM D638-14, pp. 1–15). West Conshohocken: PA, USA.
- Besbes, I., Alila, S., & Boufi, S. (2010). Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres: Effect of the carboxyl content. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 975–983 . doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.052
- Chen, F., & Chi, C. (2022). Development of pullulan/carboxylated cellulose nanocrystal/tea polyphenol bionanocomposite films for active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186(1), 405–413. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.025
- C.García-Anaya, M., R.Sepúlveda, D., ClaudioRios-Velasco, B.Zamudio-Flores, P., I.Sáenz-Mendoza, A., & H.Acosta-Muñiz, C. (2020). The role of food compounds and emerging technologies on phage stability. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64, 102436 . doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102436
- Dicastillo, C. L. d., Settler-Ramírez, L., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., & Carballo, a. G. L. (2021). Development of biodegradable films loaded with phages with antilisterial properties. *Polymers*, 13(3), 327. doi:10.3390/polym13030327
- Faraji, S., Maghsoudlou, Y., Khomeiri, M., Kashiri, M., & Babaei, A. (2019). In vitro biocontrol of *Escherichia coli* through the immobilization of its specific lytic bacteriophage on cellulose acetate biodegradable film. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 12(6), 399-408 . doi:10.30699/ijmm.12.6.399
- González, A., Gastelú, G., Barrera, G. N., Ribotta, P. D., & Igarzabal, C. I. Á. (2018). Preparation and characterization of soy protein films reinforced with cellulose nanofibers obtained from soybean by-products. *Food Hydrocolloids*, 89, 758-764. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.051
- Gouvea, D. M., Mendonça, R. C. S., Soto, M. L., & Cruz, R. S. (2015). Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 85-91 . doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.014
- Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J., & Loessner, M. J. (2012). Biocontrol of salmonella typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2.

- International Journal of Food Microbiology*, 154(1-2), 66-77.
doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.023
- Jahed, E., Almasi, H., & khaledabad, M. A. (2019). Producing and optimizing the properties of chitosan-organic nanofiber biodegradable nanocomposite based containing *O. vulgare* subsp. *gracile* and *C. copticum* essential oils and its application on the oxidative stability of Canola oil. *Iranian Food Science and Technology*, 14(5), 907-927. doi.org/10.22067/ifstrj.v14i5.71229
- Kamali, S., Yavarmanesh, M., Najafi, M. B. H., & Koocheki, A. (2022a). Development of whey protein concentrate / pullulan composite films containing bacteriophage A511: Functional properties and anti-Listerial effects during storage. *Food Packaging and ShelfLife*, 33, 100902-100917 . doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100902
- Kamali, S., Yavarmanesh, M., Najafi, M. B. H., & Koocheki, A. (2022b). 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*, 170, 114085 .doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114085
- Kassab, Z., Aziz, F., Hannache, H., Youcef, H. B., & Achaby, M. E. (2019). Improved mechanical properties of k-carrageenan-based nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 1248-1256 . doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.030
- Khodaei, D., Oltrogea, K., & Hamidi-Esfahani, Z. (2020). Preparation and characterization of blended edible films manufactured using gelatin, tragacanth gum and, Persian gum. *LWT- Food Science and Technology*, 117, 108617 . doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108617
- Kowalczyk, D., MonikaKordowska-Wiater, Karas, M., Zięba, E., MonikaMężyńska, & Wiącek, A. E. (2020). Release kinetics and antimicrobial properties of the potassium sorbate-loaded edible films made from pullulan, gelatin and their blends. *Food Hydrocolloids*, 101, 105539. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105539
- Leung, V., Szewczyk, A. Y., Chau, J., Hosseini-Doust, Z., Groves, L., Hawsawi, H., Filipe, a. C. D. M. (2017). Long-term preservation of bacteriophage antimicrobials using sugar glasses. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(11), 3802-3808 . doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00468
- Miraghaei, S., & Cheguini, F. K. (2014). Paper presented at the International Conference on Natural Food Hydrocolloids, Mashhad .
- Morcillo-Martín, R., Espinosa, E., Rabasco-Vílchez, L., Sanchez, L. M., Haro, J. d., & Rodríguez, a. A. (2022). Cellulose nanofiber-based aerogels from wheat straw: influence of surface load and lignin content on their properties and dye removal capacity. *Biomolecules*, 12(2),32 . doi.org/10.3390/biom12020232
- Radford, D., Guild, B., Strange, P., Ahmed, R., Lim, L.-T., & Balamurugan, S. (2017). Characterization of antimicrobial properties of Salmonella phage Felix O1 and Listeria phage A511 embedded in xanthan coatings on Poly(lactic acid) films. *Food Microbiology*, 66, 117-128 . doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.015
- Ratna, Aprilia, S., Arahman, N., Bilad, M. R., Suhaimi, H., Munawar, A. A., & Nasution, a. I. S. (2022). Bio-nanocomposite based on edible gelatin film as active packaging from *Clarias gariepinus* fish skin with the addition of cellulose nanocrystalline and nanopropolis. *Polymers*, 14(18), 3738 .doi.org/10.3390/polym14183738
- Robeson, J., Turra, G., Huber, K., & Borie, C. (2014). A note on stability in food matrices of Salmonella enterica serovar Enteritidis-controlling bacteriophages.

Electronic Journal of Biotechnology, 17(4), 189-191. doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.06.001

Roy, S., Biswas, D., & Rhim, a. J.-W. (2022). Gelatin/cellulose nanofiber-based functional nanocomposite film incorporated with zinc oxide nanoparticles. *Journal Composites Science*, 6(8), 223. doi.org/10.3390/jcs6080223

Roy, S., & Rhim, J. W. (2022). Gelatin/cellulose nanofiber- based functional films added with mushroom- mediated sulfur nanoparticles for active packaging applications. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 12, 979–990. doi.org/10.1007/s40097-022-00484-3

Sezer, B., Tayyarcan, E. K., & Boyaci, I. H. (2022). The use of bacteriophage-based edible coatings for the biocontrol of Salmonella in strawberries. *Food Control*, 135(101812). doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108812

Shabanpour, B., Kazemi, M., Ojagh, S. M., & Pourashouri, P. (2018). Bacterial cellulose nanofibers as reinforce in edible fish myofibrillar protein nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117(1), 742-751 . doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.038

Shakeri, G., Hammerl, J. A., Jamshidi, A., Ghazvini, K., Röhde, M., Szabo, I., Kittler, S. (2021). The lytic siphophage vB_StyS-LmqS-SP1 reduces the number of Salmonella enterica serovar Typhimurium isolates on chicken skin. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(24), e01424-01421 . doi.org/10.1128/AEM.01424-21

Trovatti, E., Fernandes, S. C. M., Rubatat, L., Perez, D. d. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2012). Pullulan–nanofibrillated cellulose composite films with improved thermal and mechanical properties. *Composites Science and Technology*, 72(13), 1556–1561 . doi.org/10.1016/j.compscitech.2012.06.003

Vonasek, E., Le, P., & Nitin, N. (2014). Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release . *Food Hydrocolloids*, 37, 7-13 . doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.017

Wang, W., Liu, Y., Jia, H., Liu, Y., Zhang, H., He, Z., & Ni, Y. (2017). Effects of cellulose nanofibers filling and palmitic acid emulsions coating on the physical properties of fish gelatin films. *Food Biophysics*, 12, 23-32 . doi.org/10.1007/s11483-016-9459-y

Weng, S., Lopez, A., Saez-Orviz, S., Marcet, I., García, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2021). Effectiveness of bacteriophages incorporated in gelatine films against Staphylococcus aureus. *Food Control*, 121, 1-10. doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107666

Yeh, Y., Moura, F. H. d., Broek, K. V. D., & Mello, A. S. d. (2018). Effect of ultraviolet light, organic acids, and bacteriophage on Salmonella populations in ground beef. *Meat Science*, 139, 44-48 . doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.007

Yang, Y., Xie, B., Liu, Q., Kong, B., & Wang, H. (2020). Fabrication and characterization of a novel polysaccharide based composite nanofiber films with tunable physical properties. *Carbohydrate Polymers*, 236(15), 116054. doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116054

Yeh, Y., Purushothaman, P., N.Gupta, M.Ragnone, S.C.Verma, & Mello, A. S. d. (2017). Bacteriophage application on red meats and poultry: Effects on salmonella population in final ground products. *Meat Science*, 127, 30-34 . doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.001

Zhang, C., Gao, D., Ma, Y., & Zhao, a. X. (2013). Effect of gelatin addition on properties of pullulan films. *Journal of Food Science*, 78(6), C805-C810 .

نسخه پیش انتشار