Investigation of characteristics of alginate film containing probiotic *Lactobacillus plantarum* for sliced sausages coating

Dina Shahrampour[1*], Morteza Khomeiri[2], seyed Mohhamad Ali Razavi[3], Mahbobeh Kashiri[4]

1. Assistant Professor, Department of Food Safety and Quality Control, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*d.shahrampour@rifst.ac.ir

Introduction

Increasing public awareness of the impact of diet on health has increased the demand for healthy food products, especially probiotics. Probiotics are living and non-pathogenic microorganisms with beneficial effects on the host when consumed on a regular basis and sufficient amounts (10^6 cfu/gr or ml) . A significant number of probiotics become inactive during various food processes (thermal, mechanical and osmotic stress), storage condition (exposure to oxygen, UV light and low or high temperature) or during interaction with food ingredients. In addition, the breakdown and passage of food through the digestive system can also affect the survival and ability of probiotics to form colony in the intestine. Therefore, it is a challenge for food manufacturers to maintain and deliver live probiotic cells in sufficient quantities via food product. On the other hand, the variety of probiotic food products in the market, especially in Iran, is low and is mainly limited to dairy products, fermented drinks and pickles. Bioactive edible films and coatings are defined as biopolymer-based structures that carry bioactive components such as vitamins, enzymes, peptides, etc, and slowly release them on the food surface during storage. Biopolymers such as polysaccharides, proteins, and lipids are used in the preparation of edible films and coatings. Trapping probiotic bacteria in the structure of edible films and coatings is a new approach that has been proposed to increase the survival of these microorganisms and to develop new probiotic products in the food industry.

Materials and Methods

In this study, an alginate-based probiotic bioactive film containing *L. plantarum* was fabricated after centrifuging of overnight culture of probiotic bacterium from MRS medium and adding the bacterial cells into film forming solution. The effect of bacterial addition on physical, mechanical and prevention properties of alginate film was evaluated. In addition, the effect of two temperatures 4 ° C and 25 ° C on the survival of embedded probiotic bacterium in the film structure during one month of storage was also investigated by microbial count assay on MRS agar medium. Then, the model food was covered with probiotic film and the survival of probiotic bacterium during storage at 4 ° C was determined.

Results and Discussion

The results showed that the population of probiotic bacterium declined about 4.61%after drying of alginate film solution. Addition of probiotic bacterium to the alginate film increased the thickness, turbidity, and tensile strength of the film, while had no significant effect on solubility, water activity, Elongation(%) and microstructure of alginate film. In addition, the probiotic film containing bacteria had less Lightness (L*), and moisture content than the control film. Also, the incorporation of *L. plantarum* in alginate film could decrease the water vapor permeability (WVP) from 0.755 to 4.51 ($\times 10^{-10}$ g $m^{-1}s^{-1}pa^{-1}$). The total color difference (ΔE) of alginate film containing probiotic bacteria compared to control film without probiotic bacteria was 1.1. The SEM images were confirmed the proper and uniform distribution of probiotic *L. plantarum* cells on the surface of alginate film. The survival percentage of *L. plantarum* in alginate film after one

month of storage at 4 ° C and25 ° C was 96.84 and 47.29%, respectively. Also, the population of embedded bacteria in the film structure on the food model (sausage) surface after three weeks storage in refrigerator was in desired level of probiotic products (> 10^6 cfu / gr).

Conclusion

The viability of probiotic bacteria after the application of alginate film containing *L. plantarum* on the surface of food model (sausage) during cold storage remained at the optimal recommended level for three weeks. Therefore, alginate film is recommended as a suitable carrier for probiotic microorganisms to produce new functional products.

Keywords: Probiotic film, Permeability, Survival, *L. plantarum*

نسخه پیش انتشار

بررسی ویژگی‌های فیلم آلژینات حاوی باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* جهت پوشش‌دهی کالباس ورقه‌ای

دینا شهرام‌پور[۱*]، مرتضی خمیری[۲]، سیدمحمدعلی رضوی[۳]، محبوبه کشیری[٤]

چکیده

افزایش آگاهی مردم از تاثیر رژیم غذایی بر سلامتی، تقاضا برای محصولات غذایی فراسودمند به ویژه پروبیوتیک‌ها را افزایش داده است. با توجه تنوع کم محصولات غذایی پروبیوتیک ارائه راه کارهای مناسب برای عرضه محصولات جدید اهمیت دارد. به دام انداختن باکتری‌های پروبیوتیک در بستر پلیمری فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی رویکرد نوینی است که جهت افزایش زنده‌مانی این میکروارگانیسم‌ها و توسعه محصولات جدید پروبیوتیک در صنعت غذا مطرح شده است. در این مطالعه فیلم زیست فعال پروبیوتیک حاوی باکتری *L. plantarum* بر پایه آلژینات تولید شد. تاثیر افزودن باکتری بر ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی و ممانعت‌کنندگی فیلم آلژینات ارزیابی شد. علاوه بر این، تاثیر دو دمای $4^{o}C$ و $25^{o}C$ بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک محصور در ساختار فیلم در طی یک ماه نگهداری از طریق آزمون شمارش باکتری در سطح محیط کشت MRS agar بررسی شد. سپس بر این اساس پوشش‌دهی ماده غذایی مدل با فیلم پروبیوتیک انجام شده و زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در طول دوره نگهداری غذا تعیین شد. نتایج نشان داد که میزان افت جمعیت باکتری پروبیوتیک پس از خشک شدن محلول فیلم آلژینات حدود ۴/۶۱ درصد بود. افزودن باکتری پروبیوتیک به فیلم آلژینات منجر به افزایش ضخامت، کدورت، مقاومت در برابر کشش فیلم شد، در حالی که بر حلالیت، فعالیت آبی، افزایش طول و ریز ساختار فیلم آلژینات تاثیر معناداری نداشت. علاوه بر این فیلم پروبیوتیک حاوی باکتری نسبت به فیلم کنترل فاقد باکتری از درخشندگی، محتوای رطوبت و نفوذپذیری در برابر بخار آب کمتری برخوردار بود. درصد زنده مانی باکتری *L. plantarum* در فیلم آلژینات پس از یک ماه نگهداری در دمای $4^{o}C$ بیشتر از $25^{o}C$ و به ترتیب ۹۶/۸۴ و ۴۷/۲۹ درصد بود. همچنین جمعیت باکتری محصور در ساختار فیلم در سطح مدل غذایی (کالباس) پس از سه هفته نگهداری در یخچال در حد مطلوب محصولات پروبیوتیک ($< 10^{6}$ cfu/gr) بود. بنابراین فیلم آلژینات به عنوان حامل مناسب برای میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک جهت تولید محصولات غذایی فراسودمند جدید توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فیلم پروبیوتیک، نفوذپذیری، زنده‌مانی، *L. plantarum*

مقدمه [۱]

در طول دو دهه گذشته با توجه به آگاهی مردم از تاثیر رژیم غذایی بر سلامتی، تقاضا برای محصولات غذایی فراسودمند حاوی ریزمغذی-ها، پری‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها افزایش یافته است (Kanmani, & Lim., 2013). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و غیربیماری-زایی هستند که مصرف مداوم و کافی آن‌ها (10^{6}cfu/gr or ml)، اثرات مفیدی بر سلامت میزبان دارد (FAO., 2001). اثرات سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها عمدتا از طریق حفظ میکروفلور طبیعی روده، محافظت از روده در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، تولید ترکیبات ضدمیکروبی، تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول و فشارخون و فعالیت ضد سرطانی ایجاد می‌گردد. اثرات پروبیوتیک‌ها به نوع نژاد وابسته است، بنابراین اطلاع از جنس و گونه میکروارگانیسم پروبیوتیک برای آگاهی از اثرات مطلوب آن‌ها بر میزبان ضروری است.(Espitia et al., 2016) با توجه به روند رو به رشد بازار جهانی محصولات پروبیوتیک، توسعه غذاهای سلامتی بخش پروبیوتیک، یکی از اهداف اصلی صنعت غذا در دهه‌های اخیر در بسیاری از کشورهای پیشرفته محسوب می‌شود. مصرف میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک از طریق فراورده‌های غذایی نسبت به مکمل‌های دارویی از محبوبیت بیشتری در بین کودکان و حتی بزرگسالان برخوردار است. فرآورده‌های لبنی جزء مشهورترین و متداول‌ترین محصولات غذایی پروبیوتیک شناخته می‌شوند که خواص

[۱] ۱. استادیار، گروه پژوهشی ایمنی و کنترل کیفیت موادغذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
۲. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
*d.shahrampour@rifst.ac.ir

سلامتی بخش آن‌ها برای مصرف کنندگان به اثبات رسیده است. با این حال، بسیاری از افراد به دلیل مشکل عدم تحمل لاکتوز و یا کلسترول بالا تمایلی به مصرف این محصولات غذایی ندارند. بنابراین نیاز به تولید و عرضه محصولات غیر لبنی پروبیوتیک افزایش یافته است (Roble et al., 2010).

براساس نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف، میزان مصرف روزانه توصیه شده برای اطمینان از اثرات درمانی پروبیوتیک‌ها حدود 10^{6}-10^{9}cfu/day می‌باشد. با این حال رسانش سلول‌های زنده پروبیوتیک به میزان کافی ذکر شده برای تولید کنندگان مواد غذایی با محدودیت هایی همراه است. برای مثال تعداد قابل توجهی از پروبیوتیک‌ها در طول فرایندهای مختلف موادغذایی (استرس حرارتی، مکانیکی و اسمزی)، نگهداری (قرار گرفتن در معرض عوامل سمی حاد مانند اکسیژن) و یا در طی تعامل با ترکیبات ماده غذایی غیر فعال می‌شوند (Jankovic et al., 2010). علاوه بر این، تجزیه و عبور مواد غذایی از دستگاه گوارش نیز می‌تواند بر زنده‌مانی و توانایی تشکیل کلنی پروبیوتیک‌ها و همچنین ترکیب میکروب‌های روده موثر باشد (Cooket al., 2012). تلاش‌های بسیاری جهت مقابله با این موانع و افزایش حداکثر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک درطی تولید، انبارداری، توزیع در بازار و حتی در زمان مصرف و مواجهه با اسید و نمک‌های صفراوی صورت گرفته است و تا کنون ریزپوشانی رایج‌ترین فناوری جهت افزایش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در سیستم‌های غذایی معرفی شده است (Burgain et al., 2011). به دام انداختن باکتری‌های پروبیوتیک در بستر پلیمری فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی رویکرد نوینی است که در دهه اخیر جهت افزایش زنده‌مانی این میکروارگانیسم‌ها و توسعه محصولات جدید پروبیوتیک در صنعت غذا مطرح شده است که می‌تواند زمینه تولید و گسترش محصولات غذایی پروبیوتیک جدید را فراهم آورد. در زمینه فیلم‌های پروبیوتیک پژوهش-های مختلفی تاکنون انجام شده است به عنوان مثال Kanmani, & Lim (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای اثر افزودن نشاسته‌های مختلف (سیب زمینی، تاپیوکا و ذرت) در محلول فیلم‌سازی پولالان بر زنده‌مانی سه باکتری پروبیوتیک مختلف (*L. reuteri* و *L. rhamnosus* GG و *L. acidophilus*) در فیلم خشک شده در دو دمای ۴°C و ۲۵ را ارزیابی کردند.Romano و همکاران (۲۰۱۴)، اثر افزودن فروکتولوگوساکارید (FOS) به عنوان یک پری‌بیوتیک در فیلم‌های متیل سلولز حاوی دو سویه پروبیوتیک *L. delbrueckii bulgaricus* و *L. plantarum* بر زنده‌مانی باکتری مذکور را بررسی نمودند. Piermaria و همکاران(۲۰۱۵)، زنده‌مانی سلول‌های باکتری *L. plantarum* و مخمر *Kluyveromyces marxianus* را در فیلم‌های کفیران حاوی نرم کننده گلیسرول بررسی کردند. به علاوه تاثیر افزودن این میکروارگانیسم‌ها بر خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم کفیران ارزیابی شد. Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۸) نیز تاثیر چهار نوع باکتری پروبیوتیک را بر ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم کربوکسی متیل سلولز ارزیابی کردند. همچنین قابلیت زنده‌مانی این باکتری‌ها در ساختار فیلم مورد مقایسه قرار گرفت. در پژوهشی دیگر تاثیر نوع نرم کننده بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* در فیلم کامپوزیت آلژینات/ پکتین مورد مطالعه قرار گرفت (Shahrampour et al., 2019). Akman و همکاران (۲۰۲۰) نیز تاثیر کپسولاسیون را بر زنده-مانی باکتری پروبیوتیک محصور در ساختار فیلم آلژینات سدیم و همچنین ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم را بررسی کردند.

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تاثیر افزودن باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* بر خصوصیات فیزیکی، مکانیکی و ممانعت‌کنندگی فیلم آلژینات بود. علاوه بر این اثر خشک کردن محلول فیلم بر میزان افت جمعیت باکتری و همچنین قابلیت زنده‌مانی باکتری در طی یک ماه نگهداری فیلم در دو دمای ۴°C و ۲۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس قابلیت به کارگیری فیلم پروبیوتیک در سطح ماده‌غذایی مدل بررسی شد.

مواد و روش‌ها

فعال‌سازی باکتری پروبیوتیک

سویه باکتری *L. plantarum* KMJC4 که از محصول غذایی تخمیری پنیرکوزه جدا شده و قابلیت پروبیوتیکی آن قبلا توسط Mahmoudi و همکاران (۲۰۲۰) تایید شده بود از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی موادغذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. جهت فعال سازی باکتری پروبیوتیک میزان µ۱۰۰l از کشت ذخیره به ۱۰ml محیط کشت مایع استریل MRS منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت تا ظهور کدورت مطلوب در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری شد. پس از طی زمان مذکور جهت جداسازی سلول‌های باکتری کشت حاصل تحت سانتریفوژ (۴۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه) قرار گرفت و بعد از حذف روماند سلول‌های باکتری دو بار با آب مقطر استریل شست و شو داده شد و در مرحله بعدی در تهیه فیلم پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه فیلم‌ها

جهت تهیه محلول تشکیل دهنده فیلم میزان ۱/۵ g آلژینات سدیم (w/v) به ۱۰۰ ml آب مقطر اضافه شده و توسط همزن مغناطیسی تحت شرایط ثابت در دمای ۷۰°C به مدت ۳۰ min همزده شد. سپس سوربیتول به عنوان نرم‌کننده به میزان (w/w) ۶۰٪ اضافه شده و به

مدت ۱۰min همزدن ادامه یافت. در ادامه جهت حذف میکروارگانیسم-های بیماری‌زای احتمالی، محلول به مدت ۳۰ min در ۸۰ °C در بن ماری قرار گرفت. بعد از سرد شدن محلول فیلم سازی سوسپانسیون باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* با غلظت حدود 10^{10}cfu/ml به آن اضافه گردید. در این مطالعه از فیلم آلژینات فاقد باکتری به عنوان کنترل استفاده گردید. در نهایت محلول‌های فیلم سازی به روش قالب-ریزی در سطح پلیت پخش گردید و جهت خشک شدن در دمای ۳۸ °C به مدت ۱۸ ساعت در آون قرار گرفت.

تعیین درصد زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در فیلم خشک

جهت تعیین اثر تنش خشک کردن بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک شمارش جمعیت باکتری در محلول فیلم سازی پس از تهیه رقت سریالی به روش کشت آمیخته در محیط کشت MRS آگار انجام گرفت. همچنین جهت تعیین جمعیت زنده باکتری پروبیوتیک در فیلم خشک شده نیز میزان۰/۱ g از فیلم به ۱۰ml سرم فیزیولوژی استریل منتقل و برای حل شدن کامل به مدت ۱ ساعت در اینکوباتور شیکر دار قرار گرفت. پس از تهیه رقت سریالی از سوسپانسیون حاصل، کشت آمیخته در محیط کشت MRS آگار تهیه شد. کلنی های تشکیل شده در سطح محیط کشت پس از گرمخانه‌گذاری برای ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C توسط کلنی کانتر شمارش شدند و درصد زنده‌مانی محاسبه شد (Soukoulis et al., 2014).

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم‌ها

ضخامت

ضخامت فیلم‌ها توسط یک میکرومتر دستی دیجیتال با دقت mm ۰/۰۱ در حداقل ۵ نقطه تصادفی (۴ نقطه دراطراف و یک نقطه در مرکز فیلم) اندازه‌گیری و میانگین آن تعیین شد. داده‌های حاصل در آزمون ضخامت هر فیلم در محاسبات مربوط به خواص مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب مورد استفاده قرار گرفت (Soukoulis et al., 2014).

مقدار رطوبت و فعالیت آبی (a_w)

جهت تعیین میزان رطوبت فیلم‌های تهیه شده، ابتدا نمونه‌های فیلم با ابعاد ۳×۳ cm^2 توزین شد و در آون با دمای ۱۰۵ °C تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. سپس نمونه‌های خشک شده پس از سرد شدن در دسیکاتور مجدد توزین شدند و درصد رطوبت فیلم‌ها از طریق رابطه زیر بدست آمد. در این رابطه w_i و w_f به ترتیب وزن ابتدایی و نهایی فیلم‌های مورد آزمون قبل و پس از خشک شدن می‌باشد. علاوه بر این فعالیت آبی فیلم‌های خشک شده مختلف از دستگاه a_w متر استفاده شد. ابتدا هر نمونه قبل از قرار گرفتن در داخل کاپ مخصوص خرد شد و در تماس با صفحه سنسور دستگاه قرار گرفت. سپس میزان فعالیت آبی فیلم از روی صفحه نمایش دستگاه قرائت شد (Shahrampour et al., 2019).

$$= W_i - W_f \quad (۱)$$

درصد رطوبت $/W_i \times 100$

حلالیت در آب

در این آزمون پس از خشک شدن نمونه‌های فیلم با ابعاد cm^2 ۳×۳ در آون ۱۰۵ °C و تعیین وزن خشک اولیه آن‌ها پس از خروج از آون، نمونه‌ها در ۵۰ml آب مقطر به مدت ۶ ساعت در دمای ۲۵ °C غوطه‌ور شد. سپس محلول حاوی ذرات معلق فیلم روی کاغذ صافی واتمن ریخته شد و در آون با دمای ۱۰۵ °C به مدت ۱۲ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. پس از توزین نمون‌های خشک شده درصد حلالیت در آب نمونه‌های فیلم از طریق رابطه زیر تعیین شد. در این رابطه w_1 و w_2 به ترتیب وزن فیلم قبل و پس از غوطه‌وری در آب می‌باشند (Shahrampour et al., 2019).

$$= (W_1 - W_2 / W_1) \times 100 \quad (۲)$$

درصد مواد جامد محلول کل

رنگ

جهت تعیین رنگ فیلم‌ها از دستگاه رنگ سنج لاوی باند استفاده شد. قبل از اندازه‌گیری رنگ فیلم‌ها دستگاه توسط یک صفحه سفید استاندارد تنظیم شد و پارامترهای استاندار دستگاه به صورت L^*=۹۴/۷، a^*=۲/۷، b^*= −۰/۴ تعیین گردید. سپس نمونه‌ها روی صفحه سفید استاندارد قرار گرفتند و اندازه‌گیری پارامترهای رنگی L، a و b انجام شد. پارامترهایی که دستگاه اندازه می‌گیرد شامل وضوح یا L[۱] (۱۰۰ =L (سفید) و ۰=L (سیاه)) و پارامترهای رنگی a[۲] (قرمزی= +a تا سبزی= -a) و b[۳] (زردی= +b تا آبی= −b) می‌باشد. همچنین اختلاف رنگی کل (ΔE) و اندیس سفیدی (WI) از طریق روابط زیر محاسبه شد (Soukoulis et al., 2014).

$$\Delta E = \sqrt{(L^*-L)^2 + (a^*-a)^2 + (b^*-b)^2} \quad (۳)$$

[۱] lightness

[۲] Redness

[۳] Yellowness

$$WI=100-\sqrt{((100-L)+a^2+b^2)} \quad (۴)$$

کدورت

میزان کدورت نمونه‌های فیلم تولیدی پس برش با ابعاد مشخص (۰/۷×۱/۵ سانتی‌متر) و قرار گرفتن با دقت در سطح کووت پلاستیکی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر UV-VIS و اندازه‌گیری جذب در ۵۵۰nm از طریق رابطه زیر تعیین شد (نونز فلورس و همکاران، ۲۰۱۲).

$$\text{کدورت} = A_{550} / \text{thickness} \quad (۵)$$

نفوذپذیری به بخار آب (WVP)

آزمون نفوذپذیری به بخار آب (WVP) فیلم‌ها با استفاده از استاندارد سال ۱۹۹۵ (ASTM, E96-95)، با کمی تغییر انجام گرفت. فیلم‌های خشک شده که به اندازه قطر دهانه فنجانک‌های مخصوص این آزمون برش خورده بودند با استفاده از پارافین بین دو لبه فنجانک قرار گرفته و درزبندی شدند. داخل فنجانک‌ها از قبل با سلیکاژل پر شده بود. سپس نمونه‌ها به دسیکاتور حاوی نمک اشباع کلرید سدیم با رطوبت نسبی ۷۵ ٪ در دمای ۲۵ ° C منتقل شد. این اختلاف رطوبت نسبی فشاری معادل ۱۷۵۳/۵۵ پاسگال بین دو سوی فیلم در هر فنجانک ایجاد می‌نماید. فنجانک‌ها در فواصل زمانی معین به مدت ۷۲ ساعت توزین شدند. در نهایت تغییرات وزن ایجاد شده در اثر عبور بخار آب از عرض فیلم‌ها و جذب توسط سلیکاژل در طی مدت زمان تعیین شده ثبت گردید. نفوذپذیری به بخار آب از طریق رابطه زیر محاسبه شد (Soukoulis et al., 2016).

$$WVP = \Delta W \times X / \Delta T \times A \times \Delta P \quad (۶)$$

ΔW= تغییرات وزن ایجاد شده در هر فنجانک (گرم)، X= ضخامت فیلم (میلی‌متر)، A= سطح موثر فیلم (متر مربع)، ΔT = مدت زمان طی شده (ساعت)، ΔP = اختلاف فشار جزئی بین دو سطح فیلم (پاسگال).

اندازه‌گیری خواص مکانیکی فیلم‌ها

آزمون‌های مکانیکی شامل مقاومت کششی (TS[۱]) و میزان افزایش طول تا نقطه پارگی (E%[۲]) توسط دستگاه بافت سنج (آستام، ایران) انجام گرفت. جهت انجام آزمون نمونه‌های فیلم با ابعاد ۱۰ × ۰/۵ cm^2 بریده شد و پس از مشروط سازی به مدت ۴۸ ساعت در دسیکاتور حاوی محلول اشباع نیترات منیزیم با رطوبت نسبی ۵۲ درصد، بین دو فک دستگاه بافت سنج با فاصله ۵۰ mm قرار گرفت. میزان کشش و نیروی لازم برای کش آمدن فیلم‌ها با سرعت ۵ mm/min تا نقطه شکست فیلم در دستگاه تنظیم شد. در نهایت مقاومت در برابر کشش به صورت مگاپاسگال و ازدیاد طول به صورت درصد از طریق روابط زیر به دست آمد (Sánchez-González et al., 2013).

$$TS = F / A \quad (۷)$$

TS= مقاومت در برابر کشش (مگاپاسگال) ، F= نیروی لازم برای پاره شدن (نیوتن) ، A= سطح فیلم (میلی‌متر مربع)

$$E(\%) = \Delta L / L_0 \times 100 \quad (۸)$$

E (%) = درصد ازدیاد طول، L= مقدار ازدیاد طول تا نقطه پارگی (میلی‌متر) ، L_0 = فاصله بین دو فک دستگاه (میلی‌متر).

بررسی ریز ساختار فیلم‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM[۳])

جهت بررسی تغییرات سطح فیلم و ساختار درونی فیلم‌ها پس از افزودن باکتری از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) در مرکز پژوهش متالوژی رازی استفاده شد. به منظور تهیه تصاویر سطحی نمونه‌های فیلم با ابعاد مشخص برش خوردند و به کمک چسب دو طرفه بروی سطح پایه‌های آلومینیومی دستگاه جسبانده شدند. جهت تصویر برداری از مقطع عرضی نیز نمونه‌ها پس از شکسته شدن در ازت مایع، از قسمت شکسته شده بروی پایه آلومینیومی توسط چسب دو طرفه قرار گرفتند. سپس سطح نمونه‌ها در دستگاه پوشش دهنده به مدت ۵ min با طلا پوشش داده شد. تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی در بزرگنمایی‌های مختلف در ولتاژ ۳kw انجام گرفت (Romano et al., 2014).

بررسی اثر دمای نگهداری فیلم بر میزان زنده‌مانی باکتری *L. plantarum*

فیلم زیست فعال آلژینات حاوی باکتری *L. plantarum* پس از خشک شدن، در دو دمای ۴ °C و ۲۵ به مدت یک ماه نگهداری شدند و در طی این مدت پس از هر ۵ روز جهت تعیین میزان زنده مانی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* میزان ۰/۱ g از فیلم به ۱۰ml سرم فیزیولوژی استریل منتقل و برای حل شدن کامل به مدت ۱ ساعت در اینکوباتور شیکر دار قرار گرفت. جهت تعیین جمعیت زنده باکتری پس از تهیه رقت سریالی از سوسپانسیون حاصل ، کشت آمیخته در محیط کشت MRS آگار تهیه و گرمخانه‌گذاری برای ۴۸ ساعت در دمای °C

[۱] Tensile strenght

[۲] Elongation at break

[۳] Field Emission Scanning Electron Microscopy

۳۷ انجام شد. کلنی های تشکیل شده در سطح محیط کشت توسط کلنی کانتر شمارش شدند. پس از بررسی نتایج در این مرحله بهترین دما جهت نگهداری فیلم زیست فعال با بیشترین زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* مشخص گردید (Kanmani, P., & Lim., 2013).

استفاده از فیلم زیست فعال حاوی باکتری *L. plantarum* جهت پوشش‌دهی مدل غذایی

در این پژوهش ورقه‌های کالباس گوشت به عنوان مدل غذایی مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا نمونه کالباس گوشت (۸۰ درصد) متعلق به شرکت صنایع غذایی گوشتیران با تاریخ تولید روز از بازار گرگان خریداری شد و با حفظ زنجیره سرما به آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی منتقل گردید. سپس دو طرف هریک از ورقه‌های کالباس دایره-ای شکل توسط یک قطعه فیلم با همان ابعاد پوشیده شد و توسط دستگاه تحت خلاء بسته‌بندی در کیسه‌های مخصوص انجام گرفت. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ ^{o}C در یخچال به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. در این آزمون از نمونه‌های کالباس بدون پوشش فیلم به عنوان کنترل استفاده گردید.

بررسی زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* در مدل غذایی

جهت شمارش باکتری *L. plantarum* زنده در نمونه‌های کالباس پوشش‌دار و فاقد پوشش فیلم نگهداری شده در دمای ۴ ^{o}C به مدت ۴ هفته، هر هفته۱۰ g نمونه کالباس توزین و به کیسه استومیکر حاوی ۹۰ ml محلول سرم فیزیولوژی استریل منتقل گردید. پس از یکنواخت شدن محلول در استومیکر به مدت ۱ min ، رقت سازی و شمارش باکتری در محیط کشت MRS آگار به روش کشت آمیخته انجام گرفت. پلیت‌ها پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در دمای۳۷ ^{o}C توسط کلنی‌کانتر شمارش شدند(Tavera-Quiroz et al., 2015) .

آنالیز آماری

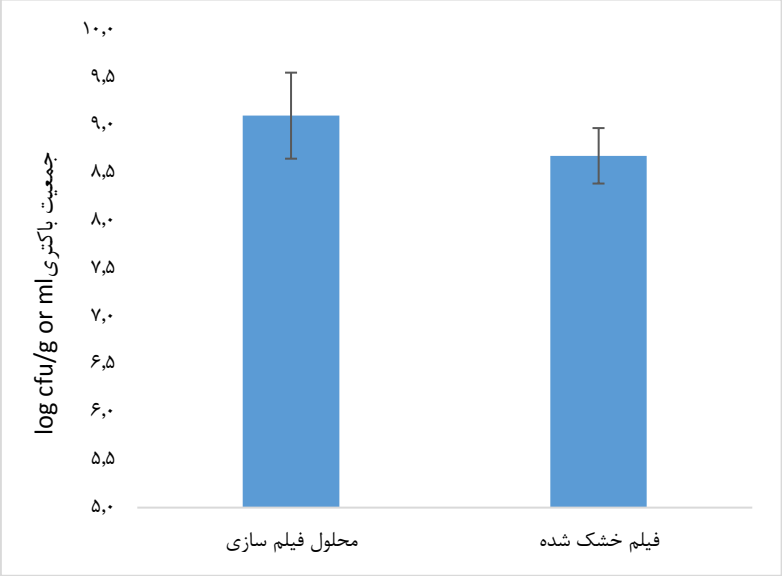
در این پژوهش تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. آنالیز و تجزیه تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون T- student استفاده شد و نمودارها به کمک نرم افزار Microsoft Office Excel نسخه ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج و بحث

اثر خشک کردن فیلم بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک

در تهیه فیلم‌های پروبیوتیک اثر اسمزی محلول فیلم‌سازی و اثر دهیدراسیون در مرحله خشک کردن فیلم در آون بر زنده‌مانی باکتری‌ها می‌تواند تاثیر گذار باشد (Romano et al., 2014). در این مطالعه نتایج شمارش باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* در محلول فیلم‌سازی و فیلم خشک شده در شکل ۱ نشان داده شده است. بر این اساس جمعیت در محلول فیلم سازی و فیلم خشک شده آلژینات به ترتیب CFU/g or ml ۹/۱ و ۸/۶۸ تخمین زده شد. میزان افت جمعیت باکتری پس از خشک شدن محلول‌های فیلم‌سازی ۴/۶۱ % و میزان زنده‌مانی باکتری ۹۵/۳۸ % محاسبه شد. درصد زنده‌مانی بالای باکتری پروبیوتیک پس از خشک شدن فیلم را می‌توان به pH حدود خنثی پلیمر آلژینات (۵/۶) مربوط دانست که از اعمال تنش اسیدی جلوگیری می‌کند (جدول ۱). به طور مشابه Soukoulis و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای اثر افزودن کنستانتره پروتئین آب پنیر به محلول فیلم‌سازی پلیمرهای زیستی آنیونی شامل کاپا- کاراژینان، ژلاتین، آلژینات و پکتین بر تولید فیلم پروبیوتیک بررسی نمودند. نتایج پژوهش آن ها نشان داد که باکتری *L. rhamnosus GG* از بیشترین زنده‌مانی به ترتیب در فیلم‌های خشک شده کاپا- کاراژینان، آلژینات، ژلاتین و پکتین برخوردار بود. این پژوهشگران زنده‌مانی کمتر در فیلم‌های حاصل از پکتین را به pH پایین (۴/۲-۳/۹ =pH) محلول‌های فیلم‌سازی آن در مقایسه با کاپا- کاراژینان و آلژینات (۶/۷-۵/۴=pH) مربوط دانستند. آن‌ها میزان زنده-مانی باکتری در فیلم‌های خشک شده را حدود ۹۸/۲-۷۰ % گزارش کردند. Kanmani, & Lim (۲۰۱۳) به نقش نوع پلیمر بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در ساختار فیلم اشاره نمودند. به طوری که در پژوهش آن‌ها بیشترین زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *L. rhamnosus GG* در طی خشک کردن در فیلم‌های یک جزئی پولالان حاصل شد و با افزایش میزان نشاسته زنده‌مانی باکتری کاهش یافت. علاوه بر این نوع نشاسته (کاساوا- ذرت- سیب زمینی) به کار رفته در ساخت فیلم بر زنده‌مانی باکتری مذکور اثر گذار بود. مشابه نتایج حاصل از مطالعه حاضر در پژوهشی کاهش جمعیت نژادی از باکتری *L. plantarum* پس از خشک شدن فیلم‌های متیل سلولز حاوی مقادیر مختلف فروکتوالیگوساکارید حدود ۱/۶۵-۱/۴۵ سیکل لگاریتمی گزارش شد (Romano et al., 2014). همچنین به مقاومت بالای باکتری *L. plantarum* در مقایسه با باکتری *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* از نظر زنده‌مانی در ساختار فیلم متیل سلولز اشاره گردید. Ma و همکاران (۲۰۱۹) ترکیب آلژینات و کربوکسی متیل سلولز را در محلول فیلم سازی را در مقایسه با ترکیب آلژینات و کلاژن و یا کربوکسی متیل سلولز و کلاژن را در زنده‌مانی باکتری *L. lactis* موثرتر دانستند و میزان افت جمعیت را پس از خشک کردن این فیلم را ۵ % گزارش کردند. Shahrampour و همکاران (۲۰۱۹) نیز در مطالعه‌ای دیگر تاثیر نوع نرم کننده بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* را در فیلم مرکب آلژینات/ پکتین را بررسی کردند. نتایج

حاکی از آن بود که نرم کننده سوربیتول نسبت به گلیسرول در حفظ زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در طی خشک کردن فیلم‌ها موفق تر عمل نمود. با توجه به این که اطلاعات دقیقی در مورد مکانیسم‌های دخیل در پایداری باکتری‌های پروبیوتیک در ساختار فیلم‌های پلیمری در دست نیست اما براساس گزارش Soukoulis و همکاران (۲۰۱۴) و Shahrampour و همکاران (۲۰۱۹) می‌توان عواملی مانند حضور مواد مغذی، نوع نرم کننده، pH محیط، جمعیت اولیه باکتری پروبیوتیک، ترکیبات محافظت کننده مانند مهارکننده‌های رادیکال‌های آزاد، انتقال رطوبت و اکسیژن، برقراری پیوند هیدروژنی با بخش‌های قطبی غشای فسفولیپیدی باکتری که به نوعی مرتبط با ساختار شیمیایی پلیمرها می‌باشد را در حفظ وضعیت فیزیکی غشاء سلولی و پایداری باکتری پروبیوتیک در ساختار فیلم بسیار موثر دانست.



شکل ۱- زنده مانی باکتری *L. plantarum* در طی خشک شدن فیلم آلژینات.

ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های آلژینات

ضخامت

ضخامت فیلم یک پارامتر مهم در ارزیابی ویژگی‌های مکانیکی، شفافیت و نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌ها محسوب می‌شود. ضخامت نهایی فیلم‌ها به روش آماده سازی و شرایط خشک کردن بستگی دارد (Galus & Lenart., 2013). در مطالعه حاضر نیز محلول‌های فیلم-سازی با حجم ثابت ۵۰ میلی‌لیتر در پلیت‌های یکبار مصرف با قطر ۱۰ سانتی‌متر ریخته شدند و تحت شرایط یکسان خشک گردیدند. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، ضخامت فیلم آلژینات با افزودن باکتری پروبیوتیک از mm ۰/۰۷۱ به ۰/۰۸۴ افزایش یافت. مطابق این نتایج Kanmani & Lim (۲۰۱۳) افزایش ضخامت فیلم‌های پولالان/ نشاسته، پس از افزودن باکتری پروبیوتیک به محلول فیلم سازی را گزارش کردند. نتایج مطالعه Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۸) نیز افزایش ضخامت فیلم‌های پروبیوتیک در مقایسه با فیلم کنترل کربوکسی متیل سلولز فاقد باکتری را تایید کرد. علاوه بر این نوع باکتری پروبیوتیک بر افزایش ضخامت فیلم تاثیر معناداری نداشت. برخلاف این نتایج در پژوهشی دیگر افزودن پکتین به محلول فیلم سازی آلژینات منجر به افزایش ضخامت فیلم‌ها شد و افزودن باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* در محلول فیلم‌سازی بر ضخامت فیلم‌های خشک تاثیر معناداری نداشت (Shahrampour et al., 2019). همچنین در مطالعه Khodaei و همکاران (۲۰۲۰) نیز تاثیر افزودن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مانند *L. plantarum* و *L. casei* و *Saccharomyces boulardii* بر ضخامت فیلم کامپوزیت ژلاتین/ پکتین را معنادار نبود.

رطوبت و فعالیت آبی

محتوای رطوبت فیلم عامل مهمی برای حفظ زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک و همچنین حفظ پایداری فیزیکی فیلم‌ها است. نتایج مربوط به محتوای رطوبت فیلم‌های تولید شده در جدول ۱ گزارش شده است. بر این اساس درصد رطوبت فیلم آلژینات با افزایش باکتری به محلول فیلم سازی از ۱۵/۲ به ۱۱/۹% کاهش یافت. کاهش محتوای رطوبت فیلم آلژینات پروبیوتیک را می‌توان به برهمکنش بین زنجیره‌های پلیمری و باکتری مربوط دانست که می‌تواند موجب کاهش دسترسی گروه‌های هیدروکسیل و در نتیجه کاهش تعاملات بین پلیمر آلژینات و آب از طریق پیوندهای هیدروژنی شود (Martins et al., 2012). نتایج

مربوط به اندازه‌گیری فعالیت آبی فیلم‌ها نیز نشان داد که هیچ‌گونه تفاوتی در بین فیلم‌های کنترل و فیلم‌های حاوی باکتری از این حیث وجود نداشت. علت عدم تفاوت مشاهده شده احتمالا به یکسان بودن شرایط تهیه و خشک کردن فیلم‌ها (دما و زمان یکسان) ارتباط دارد. علاوه بر این میزان فعالیت آبی اندازه‌گیری شده در فیلم‌ها پایین‌تر از حداقل فعالیت آبی (۰/۹۹) مورد نیاز جهت رشد باکتری بود که دلیل افت جمعیت باکتری پروبیوتیک پس از خشک کردن را توجیه می‌نماید. سوکولوس و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که نوع پلیمر به کار رفته در ساختار فیلم پروبیوتیک بر محتوای رطوبت آن موثر است. بر این اساس فیلم‌های تهیه شده از پکتین در مقایسه با سایر پلی‌ساکاریدها مانند کاراژینان و آلژینات از محتوای رطوبت بالاتری برخوردار بودند. به علاوه فعالیت آبی همه فیلم‌های پلی ساکاریدی پس از افزودن پروتئین آب پنیر در حد ۰/۵۳ ثابت باقی ماند. به طور مشابه Akman و همکاران (۲۰۲۰) کاهش رطوبت فیلم آلژینات را بعد از افزودن باکتری پروبیوتیک به فرم آزاد و کپسوله شده را مشاهده کردند. برخلاف این نتایج Ma و همکاران (۲۰۱۹) افزایش محتوای رطوبت فیلم های آلژینات/ کربوکسی متیل سلولز را بعد از افزودن باکتری پروبیوتیک *L. lactis* را گزارش کردند و دلیل این امر را وجود میزان جزئی محتوای رطوبت موجود در سلول باکتری‌ها دانستند.

حلالیت در آب

به طور کلی حلالیت فیلم‌ها به انتشار مولکول‌های آب بین زنجیره-های پلیمر، یونیزاسیون گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل و شکستن پیوندهای هیدروژنی و یونی مربوط می‌شود (Mathew et al., 2006). همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بین فیلم آلژینات کنترل و فیلم آلژینات پروبیوتیک از نظر حلالیت در آب اختلافی وجود نداشت. Kanmani & Lim (۲۰۱۳) نوع پلی‌ساکارید به کار رفته در تولید فیلم را در افزایش حلالیت فیلم‌ها موثر دانستند. به طوری که افزایش نشاسته به فیلم‌های پولالان حلالیت در آب را کاهش داد. همچنین این محققان پس از افزودن سه نوع باکتری پروبیوتیک به فیلم‌های پولالان و نشاسته تفاوت معناداری در حلالیت در آب آن‌ها مشاهده نکردند. در مطالعه Ma و همکاران (۲۰۱۹) نیز تاثیر افزودن باکتری پروبیوتیک *L. lactis* بر حلالیت فیلم مرکب معنادار نبود و افزودن کلاژن به فیلم آلژینات و کربوکسی متیل سلولز منجر به افزایش حلالیت آن‌ها شد.

جدول ۱- تاثیر افزودن باکتری *L. plantarum* بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی فیلم آلژینات

فیلم	ضخامت (میلی‌متر)	درصد حلالیت	درصد رطوبت	فعالیت آبی(aw)	pH محلول فیلم
A*	۰/۰۷۱ ±۰/۰۱۵	۸۵/۶۲ ±۱/۰۲	۱۵/۲ ±۱/۸۳	۰/۵۳ ±۰/۰۱	۵/۶
AB	۰/۰۸۴ ±۰/۰۲	۸۶/۸۸ ±۱/۰۱	۱۱/۹ ±۰/۶۱	۰/۵۳ ±۰/۰۱	۵/۶

A: فیلم آلژینات فاقد باکتری، AB: فیلم آلژینات حاوی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum*

رنگ و کدورت فیلم‌ها

رنگ یکی از فاکتورهای مهم است که در ظاهر و مرغوبیت محصولات غذایی تاثیر بسزایی دارد و در تکنولوژی تهیه فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی باید مد نظر قرار بگیرد. فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی باید در حد امکان بی‌رنگ بوده و ظاهری مشابه فیلم‌های پلیمری رایج داشته باشند (Rhim et al., 2002). در این مطالعه جهت ارزیابی اثر افزودن باکتری پروبیوتیک بر رنگ فیلم آلژینات، پارامترهای مختلف رنگی توسط دستگاه رنگ سنج هانترلب اندازه‌گیری و نتایج در جدول ۲ ثبت گردید. نتایج نشان داد که فیلم آلژینات درخشندگی بیشتری داشت و با افزودن باکتری مقدار پارامتر L یا درخشندگی از ۹۳ به ۹۱/۹ کاهش یافت. علاوه بر این دو پارامتر a و b تحت تاثیر افزودن باکتری قرار نگرفتند. اختلاف رنگ کل (ΔE) نیز نسبت به صفحه سفید استاندارد از ۵/۲۹ در فیلم کنترل به ۴/۵۱ در فیلم حاوی باکتری کاهش یافت. در حالی که اندیس سفیدی (WI) فیلم‌ها تفاوتی نداشت. همچنین افزودن باکتری پروبیوتیک منجر به افزایش کدورت فیلم آلژینات شد. به طور مشابه Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۸) کاهش درخشندگی و افزایش کدورت فیلم کربوکسی متیل سلولز را پس از افزودن باکتری‌های پروبیوتیک را مشاهده کردند. علاوه بر این بین چهار نوع باکتری از نظر تاثیر بر پارامترهای رنگی و کدورت فیلم تفاوت معناداری وجود نداشت. نتایج مشابه‌ای در مورد کاهش درخشندگی فیلم‌های مرکب آلژینات/ کربوکسی متیل سلولز و آلژینات/ کلاژن پس از افزودن باکتری پروبیوتیک *L. lactis* توسط Ma و همکاران (۲۰۲۰) گزارش شد. Akman و همکاران (۲۰۲۰) کاهش شاخص‌های L و a و افزایش شاخص b را پس از افزودن باکتری *L. plantarum* به فیلم آلژینات به دو فرم آزاد و کپسوله را مشاهده کردند.

جدول ۲- تاثیر افزودن باکتری *L. plantarum* بر شاخص‌های رنگی و کدورت فیلم آلژینات

فیلم	کدورت	L	a	b	WI	ΔE

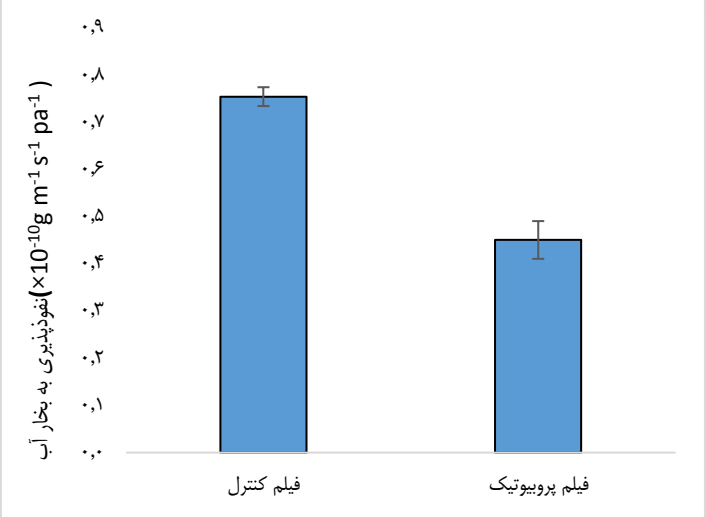
A*	۰/۶۵±۰/۳	۹۳±۲/۵۶	۱/۲±۰/۰۱	۳/۵±۰/۶۹	۸۹/۲۶±۰/۷۹	۵/۰۳±۰/۰۱
AB	۰/۷۱ ±۰/۲۳	۹۱/۹±۱/۱۳	۱/۲±۰/۰۱	۳/۵±۰/۶۹	۸۹/۲۱±۰/۸۵	۴/۵۱±۰/۱۳

A: فیلم آلژینات فاقد باکتری، AB: فیلم آلژینات حاوی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum*

نفوذپذیری به بخار آب (WVP)

ساختار بلوری و کریستالی فیلم بر نفوذپذیری نسبت به بخار آب تاثیر گذار است به طوری که با افزایش ساختار کریستالی فیلم پلی-ساکاریدی میزان WVP کاهش می‌یابد. Souza و همکاران (۲۰۱۰)، بیان کردند که نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های پلیمری به عوامل بسیاری از جمله ضریب حلالیت، یکپارچگی ماتریس فیلم، آب گریزی، سرعت انتشار، نسبت بین مناطق کریستالی و آمورف، ضخامت، تحرک زنجیره پلیمری و برهمکنش بین گروه‌های عاملی پلیمر بستگی دارد.

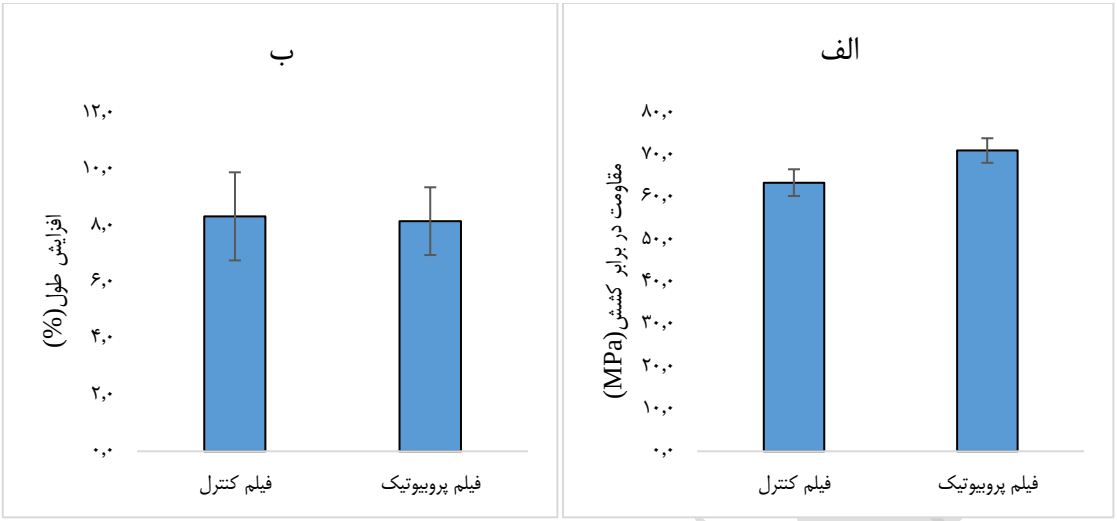
نتایج ارزیابی نفوذپذیری نسبت به بخار آب فیلم‌ها در این مطالعه نشان داد که افزودن باکتری پروبیوتیک توانست این پارامتر را به میزان ۴۰/۲۷ % کاهش دهد. برخلاف این نتایج Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۸) افزایش ۵۰ درصدی میزان WVP فیلم کربوکسی متیل سلولز را پس از افزودن باکتری‌های مختلف پروبیوتیک را گزارش نمودند و دلیل این امر را به احتمال حضور خلل و فرج بیشتر در ساختار فیلم در حضور باکتری دانستند. در مطالعه Khodaei و همکاران (۲۰۲۰) افزودن سه نوع باکتری پروبیوتیک مختلف بر ویژگی نفوذپذیری بر بخار آب فیلم ژلاتین و پکتین تاثیر معناداری نداشت.



شکل ۲- تاثیر افزودن باکتری *L. plantarum* بر نفوذپذیری در برابر بخار آب فیلم آلژینات.

ویژگی مکانیکی فیلم‌ها

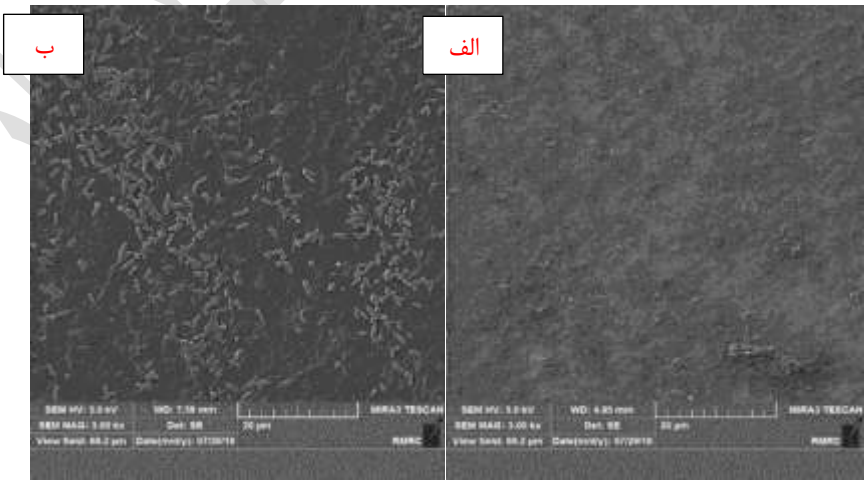
ویژگی مکانیکی بیانگر قابلیت فیلم جهت محافظت از ماده غذایی بسته‌بندی شده در برابر تنش‌های مکانیکی مختلف طی حمل و نقل است. خواص مکانیکی فیلم‌های پلیمری تحت تاثیر نوع و غلظت پلیمر، نوع حلال و نرم کننده، روش تولید فیلم و شرایط انجام آزمون از نظر دما و رطوبت نسبی قرار دارد. جهت بررسی خواص مکانیکی فیلم‌های پلیمری معمولا از آزمون‌های مقاومت کششی و افزایش طول تا نقطه پارگی استفاده می‌شود. در واقع مقاومت کششی، حداکثر نیروی لازم برای غلبه بر نیروی پیوستگی بین زنجیره‌ها را توصیف می‌کند در حالی که افزایش طول تا نقطه شکست، قابلیت گسترش فیلم قبل از پاره شدن را نشان می‌دهد (Da Silva etal., 2009). شکل ۳ ویژگی مکانیکی فیلم‌ها در این مطالعه را نشان می‌دهد. بر این اساس مقاومت در برابرکشش فیلم آلژینات از ۶۳/۴۳ Mpa به ۷۱/۰۱ در فیلم پروبیوتیک افزایش یافت. به علاوه افزایش طول فیلم آلژینات تحت تاثیر افزودن باکتری پروبیوتیک قرار نگرفت. در مطالعه Gialamas و همکاران (۲۰۱۰) عدم تاثیر افزایش باکتری به محلول فیلم‌سازی کازئینات سدیم بر ویژگی‌های مکانیکی فیلم گزارش شد. برخلاف این نتایج افزودن باکتری به فیلم‌های پولالان به طور قابل ملاحظه‌ای مقاومت کششی و افزایش طول را در مطالعه Kanmani & Lim (۲۰۱۳)، کاهش داد. Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۸) کاهش ویژگی-های مکانیکی فیلم کربوکسی متیل سلولز را پس از افزودن باکتری‌های پروبیوتیک مختلف را مشاهده کردند. همچنین در بین باکتری‌ها از نظر تاثیر بر خواص مکانیکی فیلم تفاوت معناداری وجود نداشت.



شکل۳- تاثیر افزودن باکتری*L. plantarum* بر ویژگی‌های مکانیکی فیلم آلژینات. الف) مقاومت در برابر کشش و ب) درصد افزایش طول.

ریزساختار فیلم‌ها

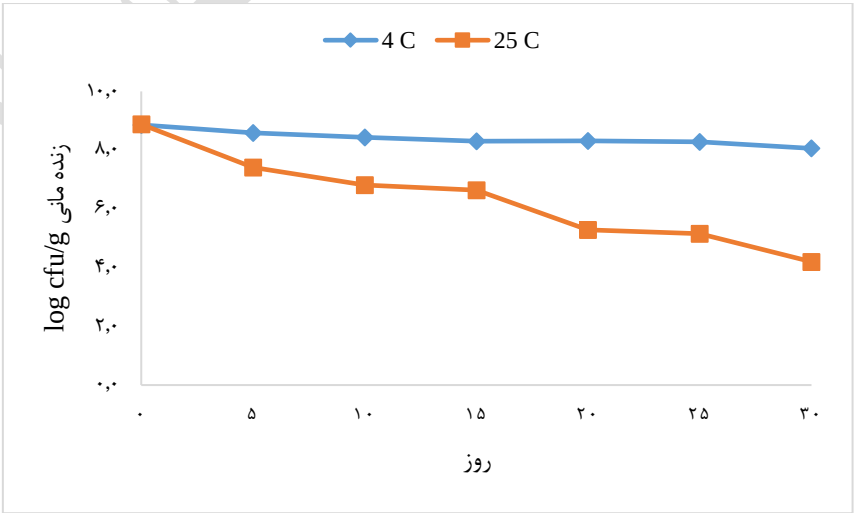
به منظور درک بهتر ساختار فیلم تهیه شده حاوی باکتری *L. plantarum* تصاویر میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفتند. برطبق شکل ۴، تصاویر سطحی نشان می دهد که تمامی فیلم‌ها ساختاری متراکم عاری از هرگونه شکاف و ترک داشته و باکتری‌ها به خوبی در بستر فیلم قرار گرفتند. علاوه بر این بررسی تصاویر نشان داد که مورفولوژی باکتری *L. plantarum* که به فرم میله‌ای شکل است، پس از قرار گرفتن در ساختار فیلم تغییر نکرده است. به طور مشابه Ma و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش نمودند که ساختار میکروسکوپی باکتری *L. lactis* پس از قرار گرفتن در بستر فیلم مرکب آلژینات/ کربوکسی متیل سلولز حفظ شد. Romano و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده کردند که افزودن باکتری پروبیوتیک تاثیری بر ساختار میکروسکوپی فیلم‌های متیل سلولز نداشت و فیلم‌ها همچنان ساختار همگن و متراکم خود را حفظ نمودند. Soukoulis و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای، ویژگی ساختاری فیلم‌های پروبیوتیک را بسته به نوع پلی‌مر متفاوت ارزیابی نمودند. به طوری که نتایج بررسی مقطع عرضی فیلم‌های مختلف نشان داد که فیلم‌های کاراژینان به ترتیب در مقایسه با آلژینات، پکتین و ژلاتین از بیشترین تراکم ساختاری برخوردار بودند که این موضوع به محافظت از باکتری در ساختار فیلم و زنده‌مانی بیشتر آن کمک نمود.



شکل ٤- تصاویر میکروسکوپ الکترونی- گسیل میدانی (SEM) از سطح فیلم‌های آلژینات تولید شده الف) فیلم بدون باکتری ب) فیلم حاوی باکتری *L. plantarum* (بزرگنمایی ۳۰۰۰×).

اثر دمای نگهداری فیلم بر زنده مانی باکتری *L. plantarum*

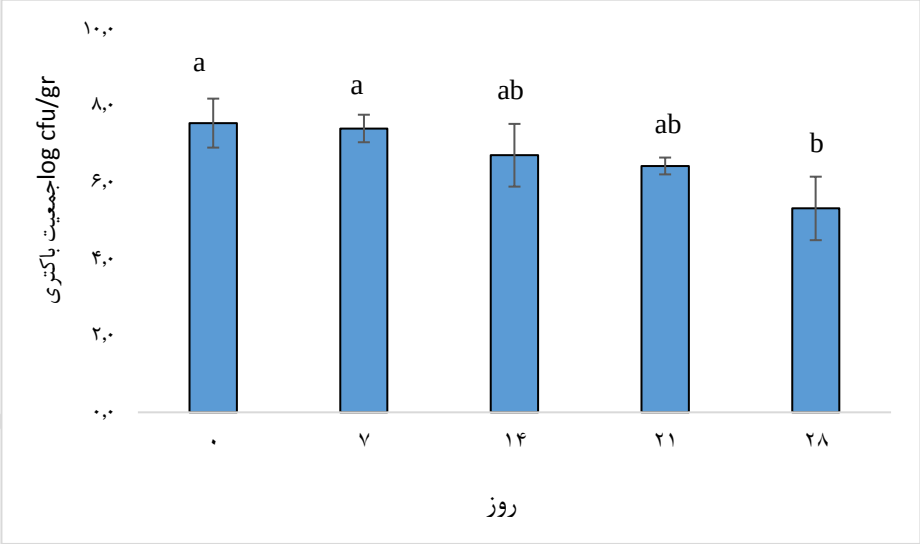
جهت بررسی اثر دمای بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* محصور در ساختار فیلم آلژینات تولیدی، این فیلم به مدت ۳۰ روز در دو دمای ۴ °C و ۲۵ °C نگهداری و پس از هر ۵ روز جمعیت باکتری در سطح محیط کشت شمارش شد. نتایج نشان داد که کمترین میزان افت جمعیت زنده باکتری پروبیوتیک در دمای ۴ °C رخ داد. علاوه بر این جمعیت زنده باکتری در فیلم پس از ۳۰ روز نگهداری در ۴ °C در محدوده پیشنهادی برای محصولات پروبیوتیک یعنی بالاتر از ۱۰^۶ cfu/ gr بود. این نتایج را می‌توان به کاهش واکنش‌های شیمیایی و آنزیمی و فعالیت متابولیک باکتری در دماهای پایین نسبت داد. همان طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، کمترین و بیشترین افت جمعیت باکتری به ترتیب به دمای ۴°C و ۲۵ اختصاص داشت. همچنین درصد زنده مانی باکتری *L. plantarum* در فیلم آلژینات پس از یک ماه نگهداری در دمای ۴°C و ۲۵ به ترتیب ۹۶/۸۴ و ۴۷/۲۹ % بود. این پدیده را احتمالا می‌توان به pH بالا و رطوبت پایین فیلم آلژینات ارتباط داد. با توجه به این که در مورد سیستم‌هایی با رطوبت متوسط (از جمله فیلم‌های خوراکی) حضور مقدار زیادی از محلول‌ها موجب تشدید واکنش‌های آنزیمی و شیمیایی و در نتیجه آسیب به ساختار دو لایه غشای فسفولیپیدی سلول باکتری می‌شود (Fu, N., & Chen., 2011). مطابق نتایج حاصل از این پژوهش، Gialamas و همکاران (۲۰۱۰) در پژوهشی افت جمعیت باکتری *L. sakei* اسپری شده در سطح فیلم سدیم کازئینات را در دمای ۲۵°C بیشتر از ۴°C گزارش نمودند. Kanmani & Lim (۲۰۱۳) دما را به عنوان فاکتور مهمی در زنده‌مانی باکتری‌های محصور شده در ساختار فیلم‌های پولالان/ نشاسته معرفی کردند. نتایج مطالعه آن ها نشان داد که زنده‌مانی سه نوع باکتری پروبیوتیک *L. rhamnosus GG*، *L. reuteri* و *L. acidophilus* در فیلم پولالان نسبت به فیلم‌های مرکب حاوی پولالان و نشاسته به خصوص در دمای ۴°C بیشتر از دمای ۲۵°C بود. همچنین برخلاف نتایج پژوهش حاضر، باکتری‌ها در هیچ یک از فیلم‌های پولالان/ نشاسته پس از ۳۰ روز نگهداری در دمای ۲۵°C قابل تشخیص نبودند. Soukoulis و همکاران (۲۰۱۴) نیز در بررسی اثر چند نوع ترکیب پری‌بیوتیک بر زنده‌مانی باکتری *L. rhamnosus GG* در فیلم ژلاتین در دو دمای ۴°C و ۲۵ به نتایج مشابه‌ای دست یافتند. Soukoulis و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهش دیگری بیان کردند که نرخ غیرفعال‌سازی باکتری *L. rhamnosus GG* در فیلم‌های پلیمری آنیونی شامل کاراژینان، آلژینات، ژلاتین و پکتین با افزایش دما افزایش می‌یابد. علاوه بر این با افزودن کنستانتره پروتئین آب پنیر و افزایش ظرفیت بافری و pH محلول‌های فیلم‌سازی زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک افزایش یافت. نتایج متفاوت به دست آمده احتمالا به دلیل تفاوت نوع باکتری پروبیوتیک، نوع پلیمر و شرایط تولید فیلم‌ها می‌باشد. عوامل خارجی مانند فعالیت آبی، درجه حرارت و حضور اکسیژن به طور معناداری بر قابلیت زنده‌مانی سلول‌های باکتریایی محصور در ساختار فیلم تاثیر می‌گذارد. علاوه بر این تحرک مولکولی ترکیبات حل شده و انتشارشان از ساختار بستر تثبیت شده فیلم می‌تواند پایداری پروبیوتیک-ها را تحت تاثیر قرار دهد. به دست آوردن بسترهایی با مقدار رطوبت پایین و نفوذپذیری پایین در برابر گازها جهت کنترل اکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی به عنوان یک استراتژی کارآمد برای بهبود پایداری پروبیوتیک‌ها در سیستم‌های غذایی گزارش شده است (Fu, N., & Chen., 2011).



شکل۵- زنده مانی باکتری *L. plantarum* محصور شده در ساختار فیلم آلژینات طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴°C و ۲۵.

زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* محصور در فیلم آلژینات در سطح ورقه‌های کالباس در طی نگهداری در ٤°C

باتوجه به نتایج فیلم آلژینات به عنوان فیلم پروبیوتیک منتخب با ویژگی‌های مطلوب جهت پوشش‌دهی یک ماده غذایی جامد یخچالی مناسب تشخیص داده شد. از این رو فیلم آلژینات در سطح ورقه‌های کالباس قرار گرفت و زنده‌مانی باکتری در طول مدت نگهداری آن در یخچال بررسی شد. بر طبق شکل ۶، در طی ۳۰ روز نگهداری در ۴°C ۲/۲۳، سیکل لگاریتمی کاهش جمعیت باکتری مشاهده گردید. این در حالی است که پس از سه هفته نگهداری جمعیت باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* همچنان بالاتر از 10^6 cfu/g بود. این میزان افت جمعیت باکتری پروبیوتیک را می‌توان به مهاجرت رطوبت و همچنین ترکیبات مختلف محلول در آب موجود در ورقه‌های کالباس مانند مواد بازدارنده از رشد باکتری (ادویه ها و موادنگهدارنده) به سطح فیلم، نسبت داد. در مورد استفاده از فیلم و پوشش‌های پروبیوتیک در سطح مواد غذایی گزارشات محدودی موجود است. در همین راستا Gialamas و همکارانش (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای باهدف کاهش جمعیت *L. monocytogenes* در سطح گوشت گاو از فیلم سدیم کازئینات حاوی *L. sakei* استفاده نمودند. جمعیت باکتری *L. sakei* پس از ۲۱ روز نگهداری از ۶ سیکل لگاریتمی به ۷ سیکل لگاریتمی در هر سانتی‌متر مربع در گوشت پوشش دار در دمای ۴°C افزایش یافت. همچنین بررسی زنده‌مانی باکتری‌های اسیدلاکتیک در فیلم‌های مرکب آلژینات و نشاسته حاوی یا فاقد نایزین در تماس با سطح ماهی نشان داد که جمعیت این باکتری‌ها در طول مدت زمان بررسی نه تنها کاهش نیافت بلکه ۰/۵ cfu/g سیکل لگاریتمی افزایش داشت. این موضوع احتمالا به دلیل نشت مواد مغذی از سطح ماهی و همچنین جذب رطوبت و به دنبال آن افزایش فعالیت آبی فیلم‌ها و همچنین بالا بودن ظرفیت بافری ماهی و افزایش pH فیلم می‌باشد (Concha-Meyer et al., 2011). Tavera-Quirozو همکاران (۲۰۱۵) کاهش ۱/۵ سیکل لگاریتمی جمعیت باکتری *L. plantarum* محصور شده در پوشش متیل سلولز سیب خشک را در طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۲۰ °C و رطوبت نسبی ۶۰ % را مشاهده نمودند که از این حیث با نتایج این تحقیق مطابقت داشت.



شکل ٦- زنده‌مانی باکتری *L. plantarum* محصور در فیلم آلژینات در سطح ورقه کالباس در طی نگهداری در ٤°C. (حروف کوچک ناهمسان نوشته شده هرستون تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهد.)

نتیجه گیری کلی

به دام انداختن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در ساختار پلیمری فیلم‌ها رویکرد جدیدی جهت توسعه محصولات جدید فراسودمند محسوب می‌شود. براساس نتایج حاصل از این مطالعه دما به عنوان عاملی موثر جهت حفظ جمعیت زنده باکتری پروبیوتیک در طی نگهداری طولانی مدت فیلم پروبیوتیک شناخته شد. بیشترین زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *L. plantarum* محصور در فیلم آلژینات در دمای ۴°C به دست آمد. همچنین افزودن باکتری به محلول فیلم سازی منجر به بهبود خصوصیات ممانعت کنندگی در برابر بخار آب و مکانیکی فیلم آلژینات پروبیوتیک در مقایسه با فیلم کنترل شد. زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک پس از به کار گیری فیلم آلژینات پروبیوتیک در سطح ماده غذایی مدل (کالباس) با گذشت سه هفته نگهداری سرد همچنان در حد مطلوب توصیه شده باقی ماند. بنابراین فیلم آلژینات به عنوان حامل مناسب برای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک برای توسعه محصولات

غذایی پروبیوتیک پیشنهاد می‌شود. بر این اساس باید پژوهش‌های بیشتری در مورد نوع میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک و محصولات غذایی دیگر در آینده نزدیک انجام گیرد.

منابع

Akman, P. K., Bozkurt, F., Dogan, K., Tornuk, F., & Tamturk, F. (2021). Fabrication and characterization of probiotic Lactobacillus plantarum loaded sodium alginate edible films. Journal of Food Measurement and Characterization, 15(1), 84-92.

Burgain, J. J., Gaiani, C. C., Linder, M. R., & Scher, J. J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. Journal of Food Engineering, 104(4),467–483.

Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C., & Fuentes, R. (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit Listeria monocytogenes growth on smoked salmon. Food Control, 22(3-4), 485-489.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. Journal of Controlled Release, 162(1), 56-67.

Da Silva, M. A., Bierhalz, A. C. K., & Kieckbusch, T. G. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca2+ ions: Effect of the plasticizer concentration. Carbohydrate polymers, 77(4), 736-742.

Ebrahimi, B., Mohammadi, R., Rouhi, M., Mortazavian, A. M., Shojaee-Aliabadi, S., & Koushki, M. R. (2018). Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. LWT-Food Science and Technology, 87,364 54-60.

Espitia, P. J., Batista, R. A., Azeredo, H. M., & Otoni, C. G. (2016). Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. Food Research International, 90, 42-52.

FAO/WHO, 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. Food Research International, 44(5), 1127-1149.

Galus, S., & Lenart, A. (2013). Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. Journal of Food Engineering, 115(4), 459-465.

Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G., & Koutsoumanis, K. P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of Lactobacillus sakei into sodium-caseinate films for controlling Listeria monocytogenes in foods. Food Research International, 43(10), 2402-2408.

Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. Current Opinion in Biotechnology, 21(2), 175-181.

Kanmani, P., & Lim, S. T. (2013). Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. Food chemistry, 141(2), 1041-1049.

Khodaei, D., Hamidi-Esfahani, Z., & Lacroix, M. (2020). Gelatin and low methoxyl pectin films containing probiotics: Film characterization and cell viability. Food Bioscience, 36, 100660.

Ma, D., Jiang, Y., Ahmed, S., Qin, W., & Liu, Y. (2019). Physical and antimicrobial properties of edible films containing Lactococcus lactis. International journal of biological macromolecules, 141, 378-386.

Mahmoudi, M., Khomeiri, M., Saeidi, M., & Davoodi, H. (2020). Lactobacillus Species from iranian jug cheese: identification and selection of probiotic based on safety and functional properties. Applied Food Biotechnology, 8(1), 47-56.

Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Souza, B. W., & Vicente, A. A. (2012). Synergistic effects between κ-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. Food Hydrocolloids, 29(2), 280-289.

Mathew, S., Brahmakumar, M., & Abraham, T. E. (2006). Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch–chitosan blend films. Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 82(2), 176-187.

Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martín, F., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2012). Role of lignosulphonate in properties of fish gelatin films. Food Hydrocolloids, 27, 60–71.

Piermaria, J., Diosma, G., Aquino, C., Garrote, G., & Abraham, A. (2015). Edible kefiran films as vehicle for probiotic microorganisms. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 32, 193-199.

Rhim, J. W., Gennadios, A., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2002). Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. Industrial Crops and Products, 15(3), 199-205.

Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. Food research international, 64, 560-566.

Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. Food Research International, 64, 560-566.

Roble, C., Auty, M. A., Brunton, N., Gormley, R. T., & Butler, F. (2010). Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 11(1), 203-209.

Sánchez-González, L., Saavedra, J. I. Q., & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing Lactobacillus plantarum. Food Hydrocolloids, 33(1), 92-98.

Shahrampour, D., Khomeiri, M., Razavi, S. M. A., & Kashiri, M. (2019). Development and characterization of alginate/pectin edible films containing Lactobacillus plantarum KMC 45. LWT, 118, 108758.

Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Macnaughtan, W., Parmenter, C., & Fisk, I. D. (2017). Stability of Lactobacillus rhamnosus GG incorporated in edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. Food hydrocolloids, 70, 345-355.

Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I. D. (2014). Stability of Lactobacillus rhamnosus GG in prebiotic edible films. Food chemistry, 159, 302-308.

Soukoulis, C., Singh, P., Macnaughtan, W., Parmenter, C., & Fisk, I. D. (2016). Compositional and physicochemical factors governing the viability of Lactobacillus rhamnosus GG embedded in starch-protein based edible films. Food Hydrocolloids, 52, 876-887.

Souza, B. W., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). The use of electric fields for edible coatings and films development and production: A review. Food Engineering Reviews, 2(4), 244-255.

Tavera-Quiroz, M. J., Romano, N., Mobili, P., Pinotti, A., Gómez-Zavaglia, A., & Bertola, N. (2015). Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing Lactobacillus plantarum. Journal of Functional Foods, 16, 164-173.