

Research Article
Vol. 20, No. 2, May-June 2024, p. 267-279

Production of Gelatin-Pullulan- Nanofibers Cellulose Film Containing *Salmonella* Phages and Effect Its Anti-*salmonella* Against *Salmonella typhimurium*

A. Entezari¹, N. Sedaghat^{1,2*}, G. Shakeri³

1 and 2- Ph.D. Student and Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: sedaghat@um.ac.ir)

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

Received: 04.05.2023

Revised: 12.08.2023

Accepted: 16.08.2023

Available Online: 19.08.2023

How to cite this article:

Entezari, A., Sedaghat, N., & Shakeri, G. (2024). Production of gelatin-pullulan-nanofibers cellulose film containing *salmonella* phages and effect its anti-*salmonella* against *Salmonella typhimurium*. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 20(2), 267-279. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.82253.1256>

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 a major cause of food borne illness 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 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, However, the major obstacle 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 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 to evaluate the antibacterial effectiveness of gelatin-pullulan-nanofibers cellulose composite film containing bacteriophage against *Salmonella typhimurium* at two different temperatures.

Materials and Methods

Gelatin and pullulan powders were weighted 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. The antibacterial effect of selected film on the poultry meat inoculated with *S. typhimurium* (10^4 CFU.g⁻¹) and several phages on the surface meat at 4 °C and 12 °C was also investigated.



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.82253.1256>

Results and Discussion

The results indicated that gelatin-pullulan films containing different percentages of cellulose were showed approximately 2 mm of zone inhibitory compare to films free of phages. Also, inhibitory among films at different percentage of nanofiber cellulose did not show significant change. 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 respectively, while at 12 °C, 1 log and around 2.55 log decrease was found after 1 and 9 days, respectively. In a study, beef inoculated with salmonella was treated by SALMONELEX™ bacteriophage and resulted in 1.29 log reduction of pathogenic 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 determined and found that at 10 °C, the number of pathogenic bacteria was decreased more than at 4 °C (Radford *et al.*, 2017). Kamali *et al.* (2022b) reported 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 4 °C and 10 °C, respectively, which means no significant difference, after one day at both temperatures.

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



مقاله پژوهشی

جلد ۲۰، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۳، ص. ۲۶۷-۲۷۹

تولید فیلم مرکب ژلاتین-پولان-نانوالیاف سلولز حاوی فاژ سالمونلا و بررسی اثر ضد سالمونلایی آن علیه سالمونلا تایفی موریوم

اسما انتظاری^۱ - ناصر صداقت^{۲*} - گلشن شاکری^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۵

چکیده

امروزه به دلیل وجود نگرانی‌های زیست‌محیطی و افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان برای محصولات غذایی با کیفیت و ماندگاری بیشتر، استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های زیست‌تخریب‌پذیر مورد توجه بسیاری واقع شده‌اند. در این مطالعه، اثر افزودن در صدهای مختلف نانوالیاف سلولز به فیلم مرکب ژلاتین-پولان و اثر ضدباکتریایی فیلم‌های حاوی باکتریوفاژ تو سط روش انتشار دیسک بررسی شد. به علاوه، اثر ضدباکتریایی فیلم مرکب ژلاتین-پولان-نانو فیبر سلولز روی گوشت مرغ در طول دوره نگهداری در دو دمای ۴ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد علیه باکتری سالمونلا تایفی موریوم مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش در صد نانوفیبرهای سلولز در فیلم ژلاتین-پولان ضخامت، حلالیت، تورم، مقاومت کششی، و در صد کشش پذیری فیلم‌ها به ترتیب افزایش، کاهش، افزایش، افزایش، و کاهش یافتند. فیلم‌های 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.

واژه‌های کلیدی: ایمنی غذا، بیوکنترل، پاتوزن، فیلم مرکب

مقدمه

استراتژی استفاده از بسته‌بندی‌های فعال به منظور کاهش بار میکروبی و یا جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها بر روی مواد غذایی است. در سال‌های اخیر بسته‌بندی‌های 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 باکتریوفاژها کارآمدی بسیار خوبی جهت کنترل باکتری‌های پاتوزن دارا می‌باشند. آن‌ها دارای ویژگی‌هایی از جمله عمل بر روی یک پاتوزن هدف، جداسازی و تولید آسان هستند. فاژهای کوکتیل می‌توانند به منظور غلبه بر محدودیت طیف میزبانی فاژ مورد استفاده قرار گیرند، فاژهای تجاری مختلفی در بازار موجود هستند که

منابع اصلی سالمونلا شامل گوشت خوک، گاو، مرغ، تخم مرغ، میوه‌جات، سبزیجات، و مشتقات به دست آمده از آن‌ها مانند مایونز، و کره بادام زمینی است. گونه‌های مختلف سالمونلا می‌توانند با شرایط مختلف محیطی سازگار شده، رشد کرده و یا زنده بمانند (Gouvea *et al.*, 2015). سالمونلا اتتریکا به عنوان یک عامل مهم در از بین رفتن مواد غذایی، اقتصاد، و سلامت انسان تلقی می‌شود، که دو سرووار مهم آن سالمونلا تایفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس بیشترین شیوع را در بیماری‌های ناشی از مواد غذایی دارند (Shakeri *et al.*, 2021). یک

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دوره دکتری تخصصی و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
 (*- نویسنده مسئول: Email: sedaghat@um.ac.ir)

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

(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 رقت‌سازی شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محیط سالمونلا تایفی موریوم (ATCC 704) ۱۸ ساعت کشت، به تیوب‌های محیط TSB حاوی ۰/۴٪ آگار منتقل و بعد ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به آن‌ها اضافه و ورتکس گردیدند سپس روی محیط تریپتون سوی آگار^۴ (TSA) ریخته شدند، و در نهایت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه و تعداد پلاک‌ها شمارش گردید (Yeh et al., 2017).

آماده‌سازی الیاف و نانوفیبر سلولز^۵

جهت تهیه نانوفیبر سلولز، فرآیند خمیرسازی سبوس برنج در یک دیگ پخت با ظرفیت ۱۵ لیتر انجام شد. دیگ پخت مجهز به یک گرم کننده خارجی، محور افقی چرخان، و سیستم‌های اندازه‌گیری دما و فشار بود که با هیدروکسید سدیم ۷٪ در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد 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 میلی‌متر 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 سانتی‌گراد 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 به‌طور 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 پی‌اف‌آی 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 میلی‌لیتر) حاوی 2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl radical (۰/۱۶ گرم، ۰/۱ میلی‌مول) و سدیم برمید (۰/۱ گرم، ۱

از آن جمله می‌توان به فاز سالمونلکس (SALMONELEX™) اشاره کرد (Alves et al., 2019). سالمونلکس یک کوکتیل فاز متشکل از دو باکتریوفاژ S16 و Felix 0-1 می‌باشد که علیه طیف وسیعی از گونه‌های باکتری سالمونلا مورد استفاده است (Yeh et al., 2018). پلوان یک آگزوپلی‌ساکارید است که توانایی خوبی به جهت تشکیل فیلم دارد. فیلم‌های پلوان ویژگی‌های خوبی مانند شفافیت، بی‌بویی، بی‌مزه‌گی، بی‌رنگی، حالیت در آب، و نفوذپذیری پایین به اکسیژن و چربی دارد اما دارای قیمت بالایی است، بنابراین یک استراتژی ترکیب کردن با دیگر پلی‌مرهاست. مطالعات متعددی به جهت ترکیب پلی‌ساکاریدها 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 نفوذپذیری، و قیمت مناسب است (Zhang et al., 2013). هم‌چنین، به‌منظور 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 باکتریوفاژها در پوشش‌ها و فیلم‌ها به‌عنوان ترکیبات ضدباکتریایی انجام شده است، که به‌عنوان مثال می‌توان به استفاده از آن‌ها در کنسانتره 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 زیست‌تخریب‌پذیر ژلاتین-پلوان-نانوفیبر سلولز حاوی باکتریوفاژ و ارزیابی خواص فیزیکی و ضدباکتریایی آن علیه باکتری سالمونلا تایفی موریوم روی گوشت مرغ در طول دوره نگهداری در دماهای ۴ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ژلاتین، گلیسرول، و تریش-بیس از شرکت سیگما آلدریج، و پلوان از شرکت هاباشیبارای ژاپن خریداری شدند. مواد شیمیایی از قبیل زایلوز لیزین دکسیکولات (XLD)، تریپتون سوی برات^۲ (TSB)، و آگار از شرکت اکساید انگلیس، منیزیوم سولفات ۷ به (MgSO_۴.7H_۲O) از اوتوگ آلمان، و کلرید سدیم از شرکت لب کم اسپانیا، TEMPO (2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyle) ۹۸٪، هیدروکسید سدیم (NaOH, > ۹۹٪) و هیدروکلریک اسید

4- Tryptone Soy Agar

5- Nanofibers Cellulose (NFCs)

1- Xylose Lysine Deoxycholate

2- Tryptone Soy Broth

3- Saline Magnesium

ضخامت هر یک از فیلم‌ها توسط میکرومتر دیجیتال (Mitutoyo, No, 293-561, Tokyo, Japan) در ۵ نقطه مختلف از فیلم‌ها انجام و میانگین آن‌ها در به‌عنوان ضخامت نهایی در نظر گرفته شد. به‌منظور تعیین مقدار رطوبت، فیلم‌ها به ابعاد $2 \times 2 \text{ cm}^2$ برش داده شده و وزن گردیدند (W_1) و در آون با دمای 105°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند زمانی که به وزن ثابت رسیدند، وزن نهایی آن‌ها ثبت گردید (W_2) و درصد افت وزن نمونه‌ها با توجه به رابطه (۲) محاسبه شد (González et al., 2018):

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

حلالیت در آب و تورم

فیلم‌ها به ابعاد $2 \times 2 \text{ cm}^2$ برش داده شده و وزن شدند (M_0) و در آون با دمای 105°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و وزن آن‌ها یادداشت گردید (M_1)، سپس فیلم‌ها به‌صورت جداگانه در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند و وزن آن‌ها بعد از قرارگیری بر روی کاغذ به‌منظور حذف آب اضافه، ثبت شد (M_2)، سپس مجدد فیلم‌ها در آون با دمای 105°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و در نهایت مجدد وزن گردیدند (M_3)، درصد حلالیت در آب و تورم فیلم‌ها به ترتیب با استفاده از رابطه‌های (۳) و (۴) محاسبه گردید (Kowalczyk et al., 2020):

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

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

خصوصیات بافتی

خصوصیات مکانیکی فیلم‌ها توسط روش استاندارد ASTM D638 و دستگاه بافت‌سنج انجام شد (ASTM, 2014). ابتدا فیلم‌ها به ابعاد $5 \times 1 \text{ cm}^2$ برش داده شدند و بین دو فک دستگاه به فاصله ۶۵ میلی‌متر و سرعت ۱۰ میلی‌متر بر دقیقه قرار گرفتند. ضخامت فیلم‌ها در قسمت‌های مختلف به‌صورت تصادفی توسط یک میکرومتر دیجیتال اندازه‌گیری شدند. آزمایشات در سه تکرار انجام شد. مقاومت کششی و کشش‌پذیری به ترتیب با توجه به رابطه‌های (۵) و (۶) محاسبه شدند:

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

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

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 می‌باشند (mm).

میلی‌مول) قرار گرفتند، سپس محلول NaClO (۱۲٪) با $\text{pH} = 10$ اضافه شد تا به قدرت اکسیداتیو ۵ میلی‌مول 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 تیمار شده ۱ درصد تحت یک فرآیند نانوفیبریلاسیون در یک هموژنایزر فشار بالا قرار گرفت تا نانوالیاف تشکیل دهنده الیاف سلولزی را جدا کند. برای جلوگیری از انسداد هموژنایزر، فیبریلایون 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 (۰/۱٪ ماده خشک) به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به‌منظور جداسازی بخش غیرنانوفیبریل شده از ماده نانوفیبریل شده سانتریفیوژ شد. سپس، بخش غیرنانوفیبر جمع‌آوری و در دمای 90°C درجه سانتی‌گراد 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):

$$100 \times \left\{ \left[\frac{\text{وزن نمونه رقیق شده} \times \text{مقدار ماده جامد نمونه ژل رقیق شده}}{\text{وزن بخش خشک شده}} - 1 \right] \right\} = \text{بازده} (\%)$$

تهیه فیلم مرکب ژلاتین-پولان-نانوفیبر سلولز حاوی فاز

۱۰ گرم از هر یک از پودرهای ژلاتین و پولان به‌صورت جداگانه به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب اضافه شدند، سپس گلیسرول ۲۰٪ (وزنی/وزنی) براساس وزن بیوپلیمر افزوده گردید و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای 90°C درجه سانتی‌گراد توسط گرم‌کن حرارت داده شده و به‌طور پیوسته توسط مگنت هم‌زده شدند و با نسبت ۲۰ژلاتین-۸۰ پولان با یکدیگر در دمای 50°C درجه سانتی‌گراد 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 35°C درجه سانتی‌گراد هم‌زده شدند و در نهایت محلول فاز اضافه گردید، سپس محلول فیلم‌های تهیه شده قالب‌ریزی شدند و در دمای اتاق برای مدت ۳ روز خشک گردیدند (Miraghaei & Cheguini, 2014). فیلم‌های تهیه شده قبل از انجام آزمایشات برای مدت ۴۸ ساعت مشروط شدند. فیلم‌های بدون فاز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

ضخامت و محتوای رطوبت فیلم‌ها

فاژ بارگذاری شده در فیلم‌ها

به‌منظور تعیین مقدار باکتریوفاژ بارگذاری شده در فیلم‌ها، ابتدا فیلم‌ها به ابعاد $2 \times 2 \text{ cm}^2$ برش داده شده و داخل میکروپلیت‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر SM بافر قرار گرفتند و توسط انکوباتور شیکردار به مدت یک ساعت (150 rpm) در دمای محیط قرار گرفتند. بعد از رقت‌سازی تعداد فاژها به روش آگار دو لایه تعیین شد (Kamali et al., 2022a).

ناحیه بازدارندگی فیلم‌ها

به‌منظور بررسی ناحیه بازدارندگی فیلم‌ها، ابتدا باکتری سالمونلا تیفی موریوم (ATCC 704) در مرحله فاز لگاریتمی رشد تا رقت 10^4 (CFU. ml⁻¹) در تربیتون سوی برات رقیق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن با محیط TSB حاوی ۰/۴٪ آگار مخلوط و بر روی TSB دارای ۱/۵٪ آگار ریخته شد و صبر کرده تا در دمای اتاق سفت شود. سپس، دیسک‌هایی از فیلم‌های حاوی باکتریوفاژ به قطر ۱۶ میلی‌متر بر روی آن‌ها قرار گرفت. دیسک‌های فیلم بدون باکتریوفاژ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند (Leung et al., 2017).

تلفیح باکتری سالمونلا به گوشت مرغ

گوشت مرغ از فروشگاه مواد غذایی تهیه و در ظرف حاوی کیسه یخ به سرعت به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های 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. گوشت‌ها 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) رقت‌سازی انجام و مقدار ۵۰ میکرولیتر از آن به سطح گوشت مرغ تلفیح شد و در نهایت غلظت 10^4 (CFU. g⁻¹) به دست آمد. بعد از ۲۰ دقیقه فیلم حاوی فاژ بر سطح گوشت قرار گرفت. نمونه‌های آماده شده در دماهای ۴ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و بعد از ۳۰ دقیقه، ۱، ۳، ۷، و ۹ روز تعداد باکتری‌های پاتوژن و تعداد فاژهای موجود بر سطح گوشت مورد بررسی قرار گرفتند. فیلم بدون فاژ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد (Weng et al., 2021).

شمارش باکتری سالمونلا تیفی موریوم

نمونه‌های گوشت مرغ مورد آزمایش در شرایط استریل داخل کیسه قرار گرفته و توسط ترازوی رقیق‌کننده حجم مناسبی از SM بافر با نسبت ۱ به ۱۰ رقیق‌سازی 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 سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند، و در نهایت تعداد باکتری‌ها شمارش گردید (Radford et al., 2017).

شمارش فاژهای سطح گوشت

جهت شمارش فاژهای موجود در سطح گوشت‌های 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 رقت‌سازی در SM بافر انجام و به روش آگار دو لایه تعداد فاژها تعیین گردید (Radford et al., 2017).

طرح آماری

آزمایشات براساس طرح فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی انجام شدند، و داده‌ها براساس روش تجزیه آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری ۵ درصد انجام شد. آزمایشات در سه تکرار انجام گرفتند.

نتایج و بحث

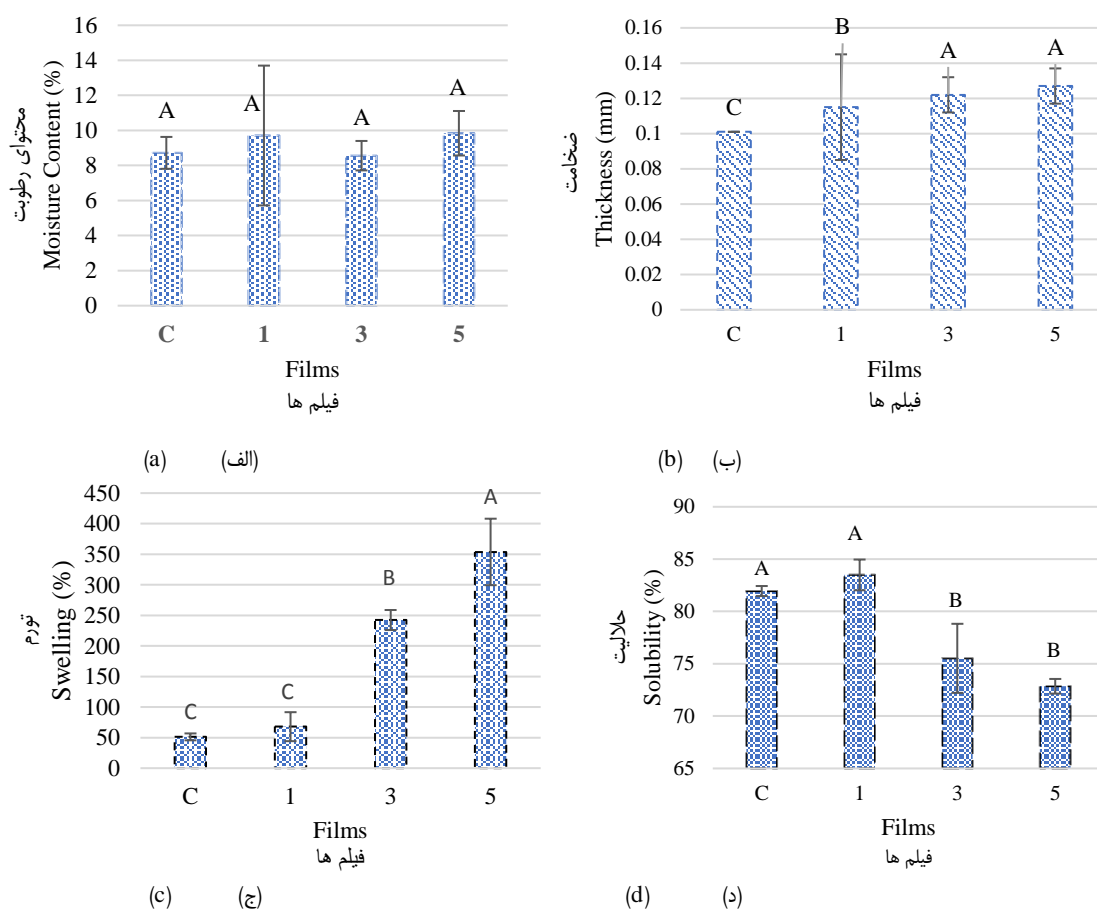
ضخامت، محتوای رطوبت، حالیت، و تورم فیلم‌ها

همان‌طور که در شکل ۱ (الف) مشاهده می‌کنید، فیلم ۲۰ ژلاتین-۸۰ پلوان (شاهد) کم‌ترین 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-پلوان حاوی مقادیر مختلف نانوالیاف سلولز در شکل ۱ (ب) نشان داده شده است. افزودن نانوالیاف سلولز تفاوت معناداری در محتوای رطوبت فیلم‌ها 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 نانوکریستال‌ها رابطه مستقیمی داشت (Ratna et al., 2022). هم‌چنین، آن‌ها نشان دادند که افزودن مقادیر مختلف نانوالیاف سلولز به فیلم ژلاتین، محتوای رطوبت فیلم‌ها را تحت تأثیر قرار نداد.

شکل ۱ اثر افزودن درصدهای مختلف نانوالیاف سلولز را بر حالیت (ج) و تورم (د) فیلم ژلاتین-پلوان نشان می‌دهد. افزودن مقادیر مختلف نانوالیاف سلولز به فیلم ژلاتین-پلوان تفاوت آماری معناداری را در حالیت و تورم فیلم‌ها نداشت ($P < 0.05$). بالاترین میزان حالیت مربوط به فیلم شاهد و فیلم حاوی ۱٪ نانوفیبر بود و با افزودن

نانوفیبر در فیلم پولان، پایداری در آب بیشتر شد (Yang et al., 2020). همان طور که در شکل ۱ (د) مشاهده می‌کنید، بیشترین و کمترین تورم را به ترتیب فیلم‌های 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 می‌دهد. در یک مطالعه، افزودن نانوفیبرهای سلولز باکتریایی به فیلم ژلاتین ماهی منجر به کاهش شاخص تورم در فیلم‌ها شد (Shabanpour et al., 2018).

۳٪ و ۵٪ نانوفیبر به فیلم شاهد حلالیت کاهش قابل ملاحظه‌ای پیدا کرد که یکی از دلایل آن مربوط به تفاوت در ضخامت فیلم‌ها است زیرا فیلم‌های خوراکی با ضخامت کم‌تر، حلالیت بیشتری را از خود نشان می‌دهند (Khodaei et al., 2020). دلیل دیگر مربوط به ساختار سه بعدی نانوفیبر سلولز است که از حرکت و جابه جایی پلیمر به آب محافظت می‌کند. به علاوه، با ورود نانوفیبر سلولز به فیلم خاصیت کریستالی افزایش می‌یابد که منجر به کاهش نفوذ آب به درون زنجیره های پلیمر می‌شود (Jahed et al., 2019). افزودن نانوفیبر اتیل سلولز به فیلم پولان منجر به افزایش پایداری در آب شد و با افزایش مقدار



شکل ۱- ضخامت (الف)، محتوای رطوبت (ب)، حلالیت (ج)، و تورم (د) فیلم های ژلاتین-پولان حاوی درصد های مختلف نانوفیبر سلولز
Fig. 1. Thickness (a), moisture content (b), solubility (c), and swelling (d) of gelatin-pullulan films containing at different percentages of NFCs

و شاهد به ترتیب ۳/۳۲، ۹۶/۲۷، ۲۶/۲۶، و ۱۷/۲۲ مگاپاسکال بود. فیلم دارای ۵٪ نانوفیبر استحکام کششی بالاتری نسبت به فیلم شاهد داشت که به برهم کنش های سطحی مناسب بین ماتریس پلیمر و نانوفیبر سلولز می‌تواند مربوط باشد، که منجر به انتقال کارآمد تنش توسط لایه های نانوفیبر-پلیمر می‌شود. فیلم‌های دارای نانوالیاف سلولز دارای درصد کشش پذیری پایین تری نسبت به فیلم شاهد بودند، که دلیل آن

خصوصیات مکانیکی

جدول ۱ اثر درصد های مختلف نانوفیبر را بر مقاومت کششی و کشش پذیری فیلم مرکب ژلاتین-پولان نشان می‌دهد. افزودن نانوفیبر به فیلم مرکب ژلاتین-پولان منجر به تغییر معناداری در مقاومت کششی و درصد کشش پذیری شد ($P < 0.05$). به طوری که مقدار مقاومت کششی در فیلم ژلاتین-پولان حاوی ۵، ۳، ۱٪ نانوفیبر،

همکاران (Trovatti *et al.*, 2012) نشان دادند که افزودن نانوفیبر به فیلم پلولان منجر به افزایش مقاومت کششی و کاهش کشش پذیری شد.

را می‌توان به افزایش ضخامت در فیلم‌ها مربوط دانست (Roy & Rhim, 2022)، و یا ایجاد باندهای هیدروژنی درون مولکولی بین گروه های ژلاتین-پلولان و نانوفیبر سبب افزایش مقاومت به کشش و کاهش کشش پذیری شده‌اند (Chen & Chi, 2022). تروواتی و

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

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

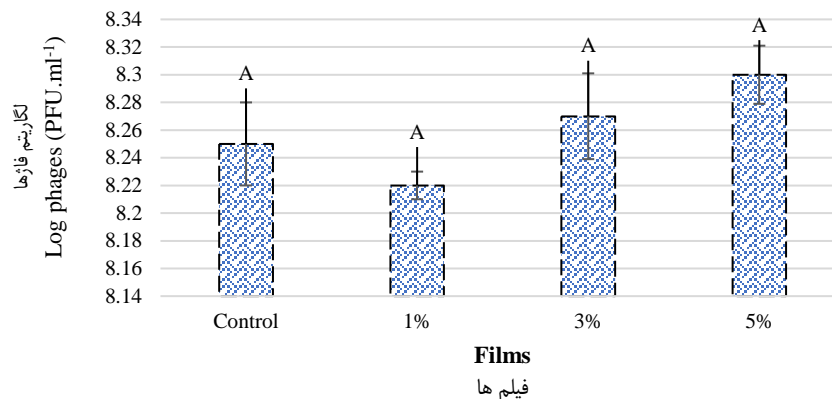
فیلم‌ها	مقاومت کششی	کشش پذیری
Films	Tensile strength (MPa)	Elongation (%)
Control	22.173 ± 6.39 ^C	5.50 ± 3.54 ^A
1%	26.27 ± 1.94 ^B	3.03 ± 0.59 ^B
3%	27.958 ± 3.25 ^B	3.36 ± 0.07 ^B
5%	32.3 ± 5.14 ^A	3.34 ± 0.78 ^B

* داده‌ها براساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. داده‌های 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).

باکتریوفاژ اثری در از بین رفتن فاژها در طی فرآوری و خشک کردن نداشت. درحالی‌که، 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.

فاژ بارگذاری شده در فیلم‌ها

همان‌طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌کنید، تفاوت آماری معناداری بین مقدار فاژ بارگذاری شده در فیلم‌های ژلاتین-پلولان حاوی مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز وجود ندارد (P>0.05). مطالعات گووا و همکاران (Gouvea *et al.*, 2015) نشان داد که فیلم استات سلولز حاوی



شکل ۲- فاژ بارگذاری شده در فیلم ژلاتین-پلولان حاوی مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز
Fig. 2. Loaded phages in gelatin-pullulan film containing at different percentages of NFCs

های N-استیل گلوکزآمین‌های قرار گرفته در ترمینال زنجیره‌های پلی ساکارییدی تشکیل دهد، که روی مرکز سطح خارجی لیپو پلی ساکاریید است و فاژ S16 باندهایی با غشاء خارجی پروتئین C تشکیل می‌دهد، که در نهایت منجر به لیز شدن و مرگ سلول باکتری می‌شود. N-استیل گلوکزآمین و پروتئین C ترکیبات متداول باقی‌مانده روی سطح غشاء باکتری سالمونلا هستند (Yeh *et al.*, 2017).

ناحیه بازدارندگی

جدول ۲ ناحیه بازدارندگی فیلم ژلاتین-پلولان حاوی درصدهای مختلف ۱، ۳، و ۵٪ نانوفیبر سلولز را در برابر باکتری سالمونلا تاییدی موربوم نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌کنید، تفاوت معناداری بین ناحیه بازدارندگی فیلم‌ها دیده نمی‌شود (P>0.05)، و در فیلم‌های فاقد فاژ (شاهد) ناحیه بازدارندگی صفر بود. مکانیسم عمل آن به صورت خلاصه این چنین است که فاژ Felix 0-1 می‌تواند باندهایی با گیرنده

جدول ۲- ناحیه بازدارندگی فیلم ژلاتین-پولان دارای درصدهای مختلف نانوفیبر سلولز در برابر باکتری سالمونلا تایفی موربوم
Table 2- Zone inhibitory of gelatin-pullulan film at different percentages of NFCs loaded with phages against *S. typhimurium* bacteria

فیلم‌ها Films	ناحیه بازدارندگی 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

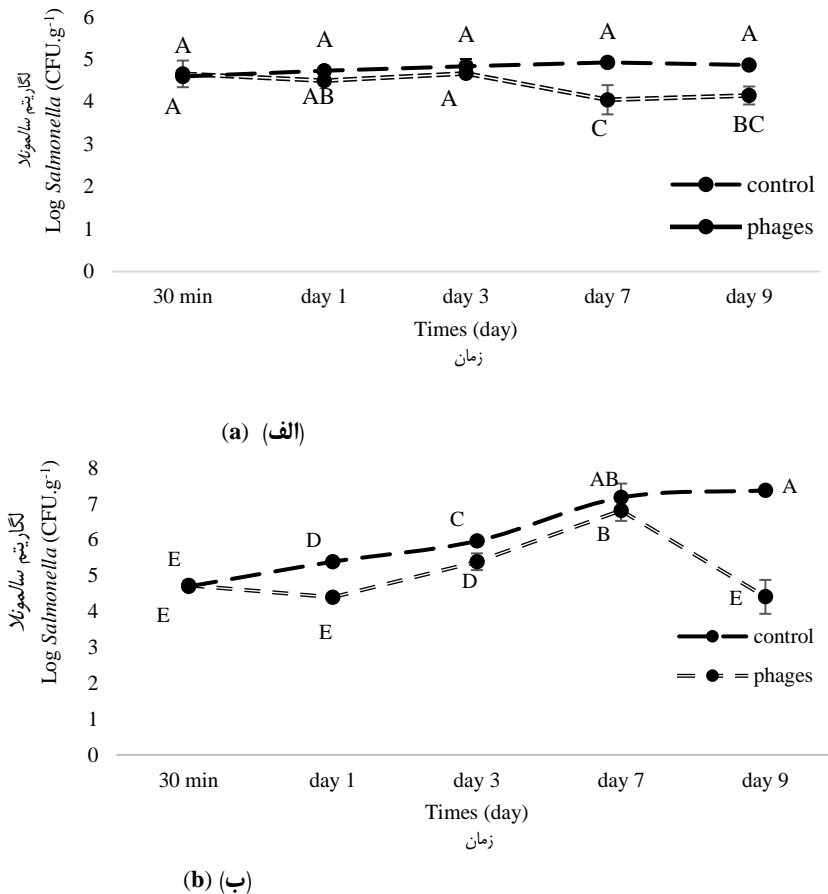
* داده‌ها براساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. داده‌های دارای حروف مشابه در یک ستون از لحاظ آماری اختلاف معنادار ندارند ($P < 0.05$).

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

۱۰ درجه سانتی‌گراد در روز سوم کاهش معناداری در مقایسه با نمونه های شاهد در شرایط هوایی و خلاء بسته‌بندی داشت و حتی در شرایط خلاء در روز ۱۴ کاهش بیشتری مشاهده شد و کاهش جمعیت بیشتری در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۴ درجه با گذشت زمان نشان داد. نتایج ونگ و همکاران (Weng et al., 2021) نشان داد که استفاده از فیلم ژلاتین حاوی فاز استافیلوکوکوس روی نمونه‌های پنیر نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در روز سوم منجر به کاهش قابل توجهی در جمعیت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شد که با افزایش میزان فاز بارگذاری شده در فیلم تعداد باکتری کاهش بیشتری داشت (Weng et al., 2021). کمالی و همکاران (Kamali et al., 2022b) گزارش کردند استفاده از فیلم دو لایه پلی‌لاکتیک اسید/کنسانتره پروتئین آب پنیر حاوی فاز لیستریا روی گوشت مرغ در دماهای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد 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 علیه باکتری لیستریا در دمای ۴ درجه نسبت به ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود (Kamali et al., 2022b). در یک مطالعه، گوشت گاو تلقیح شده به باکتری پاتوژن سالمونلا توسط باکتریوفاز 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).

شمارش باکتری پاتوژن

فیلم مرکب ژلاتین-پولان دارای ۵٪ نانوفیبر سلولز به دلیل داشتن خصوصیات فیزیکی شیمیایی مناسب‌تری جهت استفاده روی گوشت مرغ تلقیح شده به باکتری سالمونلا انتخاب شد. شکل‌های ۳ (الف) و (ب) اثر ضدباکتریایی فیلم‌های حاوی و فاقد فاز را در طول دوره نگهداری در دو دمای ۴ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهند. همان‌طور که مشاهده می‌کنید، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد است بنابراین فاز در دمای بالاتر نسبت به دمای پایین بهتر عمل می‌کند (Dicastillo et al., 2021). هم‌چنین، 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 سانتی‌گراد در برابر باکتری‌های پاتوژن سالمونلا و لیستریا با یکدیگر تفاوت داشته و در دمای بالاتر تعداد باکتری‌های پاتوژن کاهش بیشتری را داشتند. جمعیت باکتری سالمونلا در نمونه‌های تیمار شده با فیلم حاوی فاز سالمونلا در دمای

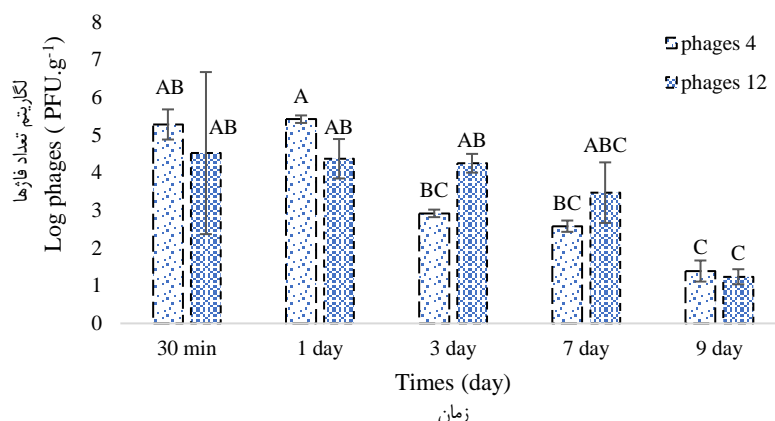


شکل ۳- تعداد باکتری *سالمونلا تایفی موریم* بر روی گوشت مرغ در دماهای ۴ (الف) و ۱۲ (ب) درجه سانتی‌گراد در طی زمان
 Fig. 3. Numbers of *S. typhimurium* bacteria on the chicken meat at 4 °C (a) and 12 °C (b) temperatures during times

لاکتیک اسید/زانتان حاوی باکتریوفاژهای *سالمونلا* و لیستریا در طی دوره نگهداری در دو دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد با یکدیگر تفاوت آماری معناداری ندارند (Radford *et al.*, 2017). نتایج یک مطالعه دیگر نشان داد که رهائش فاژها از فیلم با نسبت ۳۰ پلی‌لاکتیک 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 سانتی‌گراد بودند که با یکدیگر تفاوت معناداری نداشتند و در طی دوره ۵ روزه بعد از یک روز در هر دو دما تعداد فاژهای موجود بر سطح گوشت ثابت بود (Kamali *et al.*, 2022b). در مطالعه دیگر، درصد رهائش فاژهای انکپسوله شده در فیلم ایزوله پروتئین آب پنیر به سطح کاهو بعد از ۳ ساعت ۰/۳۷٪ بود. دلیل این تفاوت‌ها را می‌توان به ویژگی‌های فاژهای مختلف و پوشش‌ها مربوط دانست (Vonasek *et al.*, 2014).

شمارش فاژهای سطح گوشت

شکل ۴ تعداد فاژهای موجود در بر سطح گوشت مرغ را در دو دمای ۴ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌کنید، به‌طور کلی با گذشت زمان تعداد فاژها کاهش می‌یابد. تعداد فاژهای موجود بر سطح نمونه‌های گوشت مرغ در دو دما با یکدیگر تفاوت آماری معناداری نداشتند ($P > 0.05$). به‌طور کلی، پایداری فاژها به ماتریس غذایی که به‌عنوان بستر (سوبسترا) استفاده شده بستگی دارد (Robeson *et al.*, 2014). ترکیبات موجود در غذا و فاژ استفاده شده بر پایداری فاژ در سیستم‌های غذایی اثرگذار هستند و هرگونه تغییر می‌تواند نقطه ایزوالکتریک فاژ و مقاومت یونی محیط را تغییر دهد و منجر به تغییر ساختار و عملکرد فاژ شود (C.García-Anaya *et al.*, 2020). نتایج یک مطالعه نشان داد که استفاده از فیلم دو لایه پلی



شکل ۴- تعداد فازهای سالمونلا بر روی گوشت مرغ در دماهای ۴ و ۱۲ درجه سانتی گراد در طی زمان
Fig. 4. Numbers of *Salmonella* phages at 4 °C and 12 °C temperatures on the chicken meat during times

باکتری سالمونلا ۱۰ درجه سانتی گراد است تا باکتریوفاژ بتواند اثر آنتی باکتریال خود را بهتر نشان دهد. پیشنهاد ما این است که استفاده از این فیلم ضدباکتریایی در میوه‌ها و سبزیجات که در دمای بالاتری نسبت به گوشت نگهداری می‌شوند، مناسب‌تر است و اثربخشی بیشتری دارد، لذا بایستی مورد مطالعه بیشتر قرار گیرد.

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.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که فیلم مرکب ژلاتین-پولان-نانوفیبر سلولز می‌تواند به عنوان یک سیستم حامل باکتریوفاژ روی ماده غذایی می‌تواند کاربرد داشته باشد. اثر آنتی باکتریال فیلم‌های ژلاتین-پولان دارای مقادیر مختلف نانوفیبر سلولز حاوی باکتریوفاژ روی محیط آگار با یکدیگر تفاوت معناداری نداشتند. رهائش باکتریوفاژها 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 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

References

- 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. <https://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. <https://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. <https://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. <https://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-Muñoz, C. (2020). The role of food compounds and emerging technologies on phage stability. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64, 102436. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102436>
- Dicastillo, C.L., Settler-Ramírez, L., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., & Carballo, G.L. (2021). Development of biodegradable films loaded with phages withantilisterial properties. *Polymers*, 13(3), 327. <https://doi.org/10.3390/polym13030327>

8. 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. <https://doi.org/10.30699/ijmm.12.6.399>
9. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.051>
10. 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.014>
11. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.023>
12. 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. copiticum* essential oils and its application on the oxidative stability of Canola oil. *Iranian Food Science and Technology*, 14(5), 907-927. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v14i5.71229>
13. 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. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100902>
14. 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114085>
15. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.030>
16. 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108617>
17. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105539>
18. Leung, V., Szewczyk, A.Y., Chau, J., Hosseini-Doust, Z., Groves, L., Hawsawi, H., Filipe, C.D.M. (2017). Long-term preservation of bacteriophage antimicrobials using sugar glasses. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(11), 3802-3808. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.7b00468>
19. Miraghaei, S., & Cheguini, F.K. (2014). Paper presented at the International Conference on Natural Food Hydrocolloids, Mashhad.
20. Morcillo-Martín, R., Espinosa, E., Rabasco-Vílchez, L., Sanchez, L.M., Haro, J., & Rodríguez, 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. <https://doi.org/10.3390/biom12020232>
21. 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. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.015>
22. Ratna, Aprilia, S., Arahman, N., Bilad, M.R., Suhaimi, H., Munawar, A.A., & Nasution, 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. <https://doi.org/10.3390/polym14183738>
23. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.06.001>
24. Roy, S., Biswas, D., & Rhim, J.-W. (2022). Gelatin/cellulose nanofiber-based functional nanocomposite film incorporated with zinc oxide nanoparticles. *Journal Composites Science*, 6(8), 223. <https://doi.org/10.3390/jcs6080223>
25. 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. <https://doi.org/10.1007/s40097-022-00484-3>
26. Sezer, B., Tayyarcı, E.K., & Boyacı, I.H. (2022). The use of bacteriophage-based edible coatings for the biocontrol of *Salmonella* in strawberries. *Food Control*, 135(101812). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108812>

27. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.038>
28. Shakeri, G., Hammerl, J.A., Jamshidi, A., Ghazvini, K., Rohde, 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.01424-21>
29. Trovatti, E., Fernandes, S.C.M., Rubatat, L., Perez, 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. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2012.06.003>
30. Vonasek, E., Le, P., & Nitin, N. (2014). Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. *Food Hydrocolloids*, 37, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.017>
31. 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. <https://doi.org/10.1007/s11483-016-9459-y>
32. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107666>
33. Yeh, Y., Moura, F.H., Broek, K.V.D., & Mello, A.S. (2018). Effect of ultraviolet light, organic acids, and bacteriophage on *Salmonella* populations in ground beef. *Meat Science*, 139, 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.007>
34. 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. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116054>
35. Yeh, Y., Purushothaman, P., Gupta, N., Ragnone, M., Verma, S.C., & Mello, A.S. (2017). Bacteriophage application on red meats and poultry: Effects on *Salmonella* population in final ground products. *Meat Science*, 127, 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.001>
36. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02925.x>