



بررسی ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم نانوکامپوزیتی پلی‌لاکتیک اسید-نانوسلولز حاوی باکتری

پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی

معصومه خانجانی<sup>۱</sup>، پیمان آریایی\*<sup>۱</sup>، لیلا نجفیان<sup>۲</sup>، مهرو اسماعیلی<sup>۱</sup>

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ... املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۴	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۲	
کلمات کلیدی:	
نانوکامپوزیت،	
نانوسلولز،	
فیلم خوراکی،	
پروبیوتیک،	
زنده‌مانی	
DOI: 10.22034/FSCT.21.147.34.	
مسئول مکاتبات: *	

امروزه بالا بردن زنده ماننی پروبیوتیک‌ها از طریق افزودن مستقیم آنها به فیلم‌های خوراکی برای جلوگیری از مرگ و میر آنها، بسیار مورد توجه است. در این مطالعه، بقای باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی اضافه شده به فیلم نانوکامپوزیتی پلی‌لاکتیک اسید-نانو سلولز در یخچال بررسی شد. بدین منظور ۳ فیلم خوراکی شامل، پلی‌لاکتیک اسید، پلی-لاکتیک اسید + نانوسلولز، پلی‌لاکتیک اسید+ نانو سلولز+ لاکتوباسیلوس کازئی (log CFU/g) تهیه و ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم‌ها و همچنین بقای باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بررسی شد. نتایج آزمون مکانیکی نشان داد استفاده از باکتری پروبیوتیک سبب کاهش مقاومت کششی و ازدیاد طول تا نقطه شکست، فیلم پلی‌لاکتیک اسید- نانوسلولز شد ( $P < 0.05$ ) اما افزودن نانوسلولز سبب بهبود ویژگی‌های مکانیکی فیلم پلی‌لاکتیک اسید شد. نتایج حاصل از آزمون‌های فیزیکی شامل رطوبت، حلالیت، نفوذپذیری به بخار آب نشان داد افزودن باکتری پروبیوتیک و نانوسلولز سبب بهبود خواص فیزیکی فیلم شد، اما کدورت فیلم‌ها افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). براساس نتایج مطالعه حاضر، با افزایش زمان نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد، بقای باکتری‌های پروبیوتیک در نانوفیلم کاهش یافت به طوریکه، باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی از  $8.25 \log CFU/g$  در روز صفر مطالعه به  $6 \log CFU/g$  در ۶/۱۲ در پایان مطالعه (روز ۱۶) رسید، اما از محدوده مجاز ( $6 \log CFU/g$ ) برخوردار بود. بنابراین، افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی به فیلم نانوکامپوزیتی پلی‌لاکتیک اسید- نانو سلولز، می‌تواند حامل مناسب آن در دمای یخچال باشد.

## ۱- مقدمه

تولیدی بوده است. علاوه بر این، ترکیب عوامل فعال زیستی مانند پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در فیلم‌های نانوکامپوزیتی باعث بهبود عملکرد آن‌ها می‌شود. به این نوع فیلم‌های نانوکامپوزیت "فیلم‌های نانوکامپوزیت زیست‌فعال" گفته می‌شود [۴، ۱۰]. در این راستا، باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های آنها در جهت بهبود ایمنی میکروبی و افزایش ماندگاری مواد غذایی تحت عنوان نگهدارنده‌های زیستی معرفی شده‌اند. باکتری‌های اسید لاکتیک معمولاً به دلیل عملکردهای ضد میکروبی ناشی از فعالیت پپتیدهای کوچک و مقاوم به حرارت به نام باکتریوسین به عنوان ارگانسم‌های محافظ غذایی در نظر گرفته می‌شوند [۱۱، ۱۲]. علاوه بر این، کاربرد فیلم‌های خوراکی حاوی باکتری‌های لاکتیکی در ماتریس مواد غذایی از نظر انتقال این باکتری‌ها به مصرف‌کنندگان و تولید مواد ضد میکروبی و یا رقابت با میکروارگانسم‌های عامل فساد و ایجاد پتانسیل ضد میکروبی بالا حائز اهمیت است [۱۳، ۱۴]. یکی از معمول‌ترین کشت‌های میکروبی که در تولید انواع فرآورده‌های پروبیوتیک به کار می‌روند می‌توان به باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس *(L. casei)* کازئی<sup>۲</sup> اشاره کرد [۱۵]. لاکتوباسیلوس کازئی یکی از پروبیوتیک‌های مهم در فرآورده‌های غذایی است. این باکتری گرم مثبت، مزوفیل، میله‌ای شکل، میکروآئروفیل، کاتالاز منفی و بدون اسپور بود می‌باشد. اسید لاکتیک تولید شده توسط لاکتوباسیلوس کازئی از نوع L+ است و به ونکومایسین مقاوم می‌باشد [۱۶].

بنابراین، باتوجه به موارد بیان شده، در این مطالعه، بقای باکتری پروبیوتیک و خواص فیزیکی و مکانیکی فیلم خوراکی پروبیوتیک بر پایه پلی‌لاکتیک اسید-نانو سلولز مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش

## ۲-۱- مواد اولیه

پلی‌لاکتیک اسید (PLA)، یک پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر است که از سوی اداره غذا و داروی ایالات متحده در لیست محصولات GRAS<sup>۱</sup> قرار داده شد و برای بسته‌بندی تمام مواد غذایی ایمن شناخته شده است [۱، ۲]. PLA، علاوه بر داشتن ویژگی‌های مطلوبی مثل استحکام مکانیکی زیاد، شفافیت و بازدارندگی در مقابل عبور نور فرابنفش، معایبی نیز از جمله شکنندگی زیاد، پایداری حرارتی کم و بازدارندگی ضعیف در مقابل رطوبت و اکسیژن دارد که کاربرد آن را به عنوان جایگزین پلیمرهای سنتزی در صنعت بسته‌بندی محدود کرده است [۲، ۳]. لذا به منظور بهبود این خواص اصلاح‌کننده‌هایی مثل نانوذرات در ساختار آن به کار می‌رود. استفاده از نانوتقویت‌کننده‌ها و تولید نانوکامپوزیت‌های پلیمری از روش‌های مؤثری است که برای تقویت خواص پلیمرها طی سال‌های اخیر رواج یافته است. سلولز (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>) یکی از فراوان‌ترین (۷۰۰ میلیارد تن در هر سال) مواد آلی موجود روی کره زمین است و بطور گسترده از منابع مختلفی نظیر چوب، کتان، کنف و باکتری‌ها تهیه می‌شود. پتانسیل کاربرد نانوفیبرهای سلولز به عنوان تقویت‌کننده مواد پلیمری، مسیر جدیدی را برای تولید و توسعه کامپوزیت‌های بهتر همراه با ایجاد ارزش افزوده فراهم می‌کند. نانوفیبرهای سلولز با قطر زیر ۱۰۰ نانومتر از دیواره سلولی منابع مختلف طبیعی (از قبیل چوب و پالپ پنبه) بوسیله تیمارهای شیمیایی، مکانیکی و یا ترکیبی از این تیمارها استخراج می‌شوند. بطور کلی خواص نانوذرات سلولز علاوه بر ماده اولیه می‌تواند تحت تاثیر عواملی نظیر روش آماده‌سازی و همچنین درجه و حالت هموزنی‌اسیون آن‌ها متغیر باشد [۴، ۵]. نانوفیبرهای سلولز تاکنون به عنوان تقویت‌کننده در پلیمرهای مختلفی از قبیل کربوکسی متیل سلولز [۶]، کیتوزان [۷]، پلی‌لاکتیک اسید [۸] و پلی‌لاکتیک اسید-کیتوزان [۹] به کار رفته‌اند که حاصل آن تقویت و بهبود ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی نانوکامپوزیت‌های

برای اندازه‌گیری ضخامت از میکرومتر با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر استفاده شد. میزان ضخامت در ۵ نقطه از فیلم اندازه‌گیری و میزان میانگین آن گزارش شد [۱۹].

### ۲-۲-۳ اندازه‌گیری میزان رطوبت فیلم‌ها

نمونه‌های فیلم با وزن مشخص درون پلیت‌های شیشه‌ای که از قبل به وزن ثابت رسیده و توزین شده بودند (W1) قرار داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آون خشک گردید. نمونه همراه با پلیت پس از این مدت خارج شده و پس از سرد شدن در دسیکاتور مجدداً توزین گردید (W2). محتوای رطوبت فیلم‌ها بر پایه وزن مرطوب از رابطه ۱ محاسبه گردید [۲۰].

رابطه ۱

$$\text{درصد رطوبت} = (W1 - W2) / W1 \times 100$$

### ۲-۳-۳-۳ ارزیابی حلالیت فیلم‌ها در آب

برای اندازه‌گیری میزان حلالیت فیلم‌ها قطعات مربعی شکل ۲ سانتی‌متری از فیلم‌ها تهیه شد. میزان وزن خشک نمونه‌ها با خشک کردن آن‌ها در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت به دست آمد. سپس نمونه‌ها در محفظه ۵۰ میلی‌لیتری آب به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس فیلم از آب خارج شده و در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت به منظور خشک شدن قرار داده شدند. در نهایت میزان وزن نهایی اندازه‌گیری شد [۱۹].

### ۲-۳-۴ نفوذپذیری در برابر بخار آب

به‌منظور سنجش میزان نفوذپذیری فیلم‌ها نسبت به بخار آب (ASTME 96-02) ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون سلول-های اندازه‌گیری نفوذپذیری ریخته شد و سپس سلول‌های شیشه‌ای که سطح آنها توسط فیلم و به کمک گریس درزبندی شده بود، درون دسیکاتور حاوی سیلیکاژل قرار گرفتند. آب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رطوبت ۱۰۰ درصد ایجاد میکند. اختلاف رطوبت در دو سمت فیلم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اختلاف فشار بخاری معادل  $2/337 \times 10^3$  پاسکال ایجاد می‌نماید. سنجش تغییرات وزن سلول‌ها در طی زمان

در این تحقیق از گرانول‌های پلی‌لاکتیک اسید (PLA) از شرکت فکیور آلمان، نانوفیبر سلولز (با متوسط قطر ۳۵ نانومتر و میانگین طول ۵ میکرومتر با خلوص ۹۹ درصد، از شرکت نانو نوین پلیمر، ایران)، محیط کشت MRS برات و MRS آگار (از شرکت مرک آلمان) و سویه باکتری لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC ۱۶۰۸) از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران در تهیه فیلم‌ها استفاده گردید. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده، دارای درجه خلوص آزمایشگاهی بوده و از شرکت مرک (درمادشت، آلمان) خریداری شدند.

### ۲-۲-۲ تهیه نانو کامپوزیت حاوی پروبیوتیک

آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری *L. casei* در زیر هود بیولوژیک شکسته شد. حدود ۱ گرم از باکتری لیوفیل شده در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر در محیط کشت MRS برات تهیه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سلول‌های باکتریایی با سانتریفیوژ با شدت  $9000 \times$  به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند [۱۷].

برای تهیه فیلم خالص PLA، از روش ریخته‌گری محلول ۳ (روش قالب ریزی) استفاده شد. برای این منظور بایستی محلول ۱ درصد PLA (وزنی / حجمی) در کلروفرم (حلال) تهیه و به کمک دستگاه مگنت استیرر به مدت ۸ ساعت در دمای محیط هم زده تا گرانول‌های PLA بخوبی حل شوند. نانو سلولز (۰ و ۱ درصد وزنی / حجمی) به محلول مذکور اضافه و همچنین نمونه‌های فیلم بعد از تلقیح باکتری *L. casei* (تا رسیدن به مقدار نهایی  $10^9$  CFU/g) روی پلیت شیشه‌ای ریخته شد تا حلال (کلروفرم) در زیر هود شیمیایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی ۴۸ ساعت تبخیر شد. بعد از این مرحله فیلم از روی قالب شیشه‌ای جدا شد و تا زمان استفاده در ظرف حاوی سیلیکاژل قرار داده شد [۱۸].

### ۲-۳-۲ اندازه‌گیری خواص فیزیکی فیلم‌ها

#### ۱-۲-۳-۳ اندازه‌گیری ضخامت فیلم‌ها:

(۵۰ درصد) قرار داده شد. نمونه‌هایی در ابعاد ۱۰ سانتی-متر در ۱ سانتی متر تهیه و بین فک‌ها با فاصله ۵۰ میلی‌متر قرار گرفت و با بارسل ۵۰ کیلوگرم با سرعت ۱۰ میلی‌متر بر ثانیه تا نقطه شکست مورد آزمون قرار داده شدند. آزمون حداقل با ۵ تکرار برای هر فیلم انجام شد و مقادیر مقاومت کششی از دیاد طول تا نقطه شکست از روی منحنی‌های تنش کرنش به دست آمدند [۱۹].

## ۲-۶- بررسی بقای باکتری‌های پروبیوتیک در فیلم‌های

### مرکب

در بازه‌های زمانی ۴ روزه تا ۱۶ روز، فیلم‌ها در شرایط اسپتیک از زیپ کیپ به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محلول بافر فسفات انتقال داده و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه-گذاری شدند تا باکتری‌ها فرصت آزاد شدن از فیلم را داشته باشند. رقت‌های مختلف از کل نمونه محلول ساخته و پس از کشت دادن به صورت پور پلیت در محیط کشت MRS آگار، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد [۲۲]. سلول‌های زنده باکتری‌ها مطابق روش (SEM) Subtractive enumeration method به-صورت انتخابی شمارش شد.

## ۲-۸- ارزیابی آماری

آزمایش‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن (One way Anova) با سطح احتمال خطای ۰.۰۵ انجام شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 انجام پذیرفت.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- ویژگی‌های فیلم

#### ۳-۱-۱- ویژگی‌های فیزیکی فیلم

ضخامت فاکتور مهمی در تعیین خصوصیات مکانیکی، نفوذپذیری به بخار آب و شفافیت فیلم می‌باشد. با توجه به نتایج کمترین مقادیر ضخامت (جدول ۱) در فیلم PLA بوده

با استفاده از یک ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم صورت گرفت. نرخ انتقال بخار آب بر حسب (گرم)-متر-ثانیه معادل با شیب خطوط حاصله تقسیم بر سطح سلول بود و از رابطه ۲ حاصل شد [۱۹]. سطح سلول‌ها ۰/۰۰۲۸۷ متر مربع بود. از ضرب نمودن نرخ انتقال بخار آب (WVTR) در ضخامت فیلم‌ها (L) و تقسیم آن در اختلاف فشار موجود در دو سمت فیلم (AP) میزان نفوذپذیری بخار آب (WVP)  $(10^{-11} \text{ gs}^{-1}\text{m}^{-1}\text{Pa})$  بدست آمد [۱۹].

### رابطه ۲

سطح سلول (متر) / شیب خط (گرم/ثانیه) = نرخ انتقال بخار آب (گرم<sup>-۱</sup> ثانیه<sup>-۲</sup> متر)

## ۲-۳-۵- کدورت

برای تعیین کدورت، فیلم‌های تهیه شده به صورت قطعاتی با ابعاد  $1 \times 4 \text{ cm}^2$  بریده شد. سپس این قطعات درون سل دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و جذب آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد از رابطه ۳ برای تعیین کدورت استفاده شد [۲۱].

### رابطه ۳

$100 \times \text{مقدار جذب} = \text{کدورت}$

## ۲-۴- طیف‌سنج پراش اشعه ایکس (XRD)

در این تحقیق با استفاده از تابش CuKα در محدوده‌ی زاویه (۲θ) ۵ تا ۵۰، الگوی پراش اشعه ی ایکس فیلم‌های تهیه شده ثبت شد. درصد تبلور با استفاده از رابطه شرر توسط نرم افزار origin محاسبه شد [۲].

### رابطه ۴

$$X (\%) = \frac{Ac}{Ac + Aa} \times 100$$

که در این رابطه AC مساحت ناحیه بلوری ( $m^2$ ) و Aa مساحت ناحیه آمورف ( $m^2$ ) است.

## ۲-۵- اندازه‌گیری خواص مکانیکی فیلم

میزان مقاومت کششی و ازدیاد طول تا پارگی با استفاده از دستگاه (Testometric, M350-10CT, England) و طبق استاندارد ASTM D882 ارزیابی شد. نمونه‌ها قبل از آزمون در دسیکاتور حاوی نیترات منیزیم برای ایجاد رطوبت نسبی

سلولزی در ماتریس پلیمری، باعث ایجاد یک مسیر طولانی تر برای عبور مولکول‌های آب می‌شود. افزایش میزان بلورینگی پلیمر در اثر حضور نانوذرات سلولزی باعث افزایش انسجام و تراکم بین زنجیرهای پلیمر و کاهش فضاهای آزاد بین آن‌ها می‌شود که این امر یکی دیگر از دلایل کاهش میزان عبورپذیری فیلم‌های زیست نانوکامپوزیتی محسوب می‌شود [۲۶، ۲۷]. این نتایج با نتایج Mirabolghasemi (۲۰۲۱) در ارتباط با مقادیر نفوذپذیری به بخار آب فیلم زیست نانوکامپوزیت PLA تقویت شده با نانوبلور سلولز هم‌خوانی دارد [۲۶]. مقادیر نفوذ پذیری به بخار آب با افزودن باکتری پروبیوتیک نیز کاهش یافت و کمترین مقادیر در تیمار PLA+ نانوسلولز + *L. casei* مشاهده شد ( $1/48 \times 10^{-11} \text{ gs}^{-1}\text{m}^{-1}\text{Pa}$ ) ( $P < 0/05$ ). بر اساس مطالعه Souza و همکاران (۲۰۱۰) میزان نفوذپذیری به بخار آب و اکسیژن فیلم‌های خوراکی به عوامل مختلفی نظیر ضخامت، پیوندهای شیمیایی بین پلیمر و مولکول‌های آب، اندازه حفرات موجود در ساختار فیلم و همچنین میزان انعطاف-پذیری زنجیره پلیمری بستگی دارد [۲۸]. به نظر می‌رسد باکتری‌های پروبیوتیک موجود در ماتریس فیلم موجب کاهش میزان انعطاف‌پذیری در زنجیره پلیمری می‌گردند [۱۳].

شفافیت یک ویژگی بسیار مهم برای فیلم‌هایی است که به عنوان پوشش یا بسته‌بندی برای مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به نتایج کمترین مقادیر کدورت (جدول ۱) در فیلم PLA بوده است ( $0/96$ ) ( $P < 0/05$ ) و با افزودن نانوسلولز و باکتری پروبیوتیک به فیلم PLA میزان کدورت افزایش یافت و بیشترین مقادیر در تیمار PLA+ نانوسلولز+ *L. casei* مشاهده شد ( $1/21$ ) ( $P < 0/05$ ). افزودن نانوسلولز به فیلم PLA سبب مسدود شدن مسیر عبور نور از میان شبکه فیلم و در نتیجه کاهش شفافیت شد. علاوه بر این افزودن سلول‌های باکتریایی به فیلم نانوکامپوزیت می‌تواند بر نور عبوری از فیلم از طریق افزایش پراکندگی نور تاثیر بگذارد [۲۹]. نتایج مشابهی توسط Bekhit و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است، که اعلام نمودند باکتری‌های

است ( $0/43$  میلی متر) با افزودن نانوسلولز و باکتری پروبیوتیک به فیلم PLA میزان ضخامت به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین مقادیر در تیمار PLA+ نانوسلولز+ *L. casei* مشاهده شد ( $0/057$  میلی متر) ( $P < 0/05$ ). علت افزایش ضخامت پس از افزودن نانوسلولز و باکتری پروبیوتیک، می‌تواند به قرارگیری این پرکننده‌ها و افزایش ماده جامد در لایه‌های مختلف ماتریس فیلم PLA مرتبط باشد [۲۳، ۲۴].

حلالیت و محتوای رطوبت دو فاکتور مهم فیلم‌های زیست-تخریب‌پذیر می‌باشند که بر مقاومت فیلم به آب به ویژه در محیط‌های مرطوب تاثیرگذار می‌باشند. نتایج مربوط به رطوبت و حلالیت (جدول ۱) فیلم‌های مختلف، باهم هم-خوانی داشت. با توجه به نتایج بیشترین مقادیر رطوبت و حلالیت در فیلم PLA بوده است (به ترتیب  $18/51$  و  $23/02$  درصد) ( $P < 0/05$ ). با افزودن نانوسلولز به فیلم PLA میزان رطوبت و حلالیت کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). بر اساس مطالعات ترکیب نانوسلولزها در ماتریس PLA موجب کاهش جذب رطوبت به علت ایجاد پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های الکترواستاتیکی بین نانوذرات سلولز و PLA می‌گردد [۷، ۲۴]. اما مقادیر رطوبت و حلالیت با افزودن باکتری پروبیوتیک تغییر معنی‌داری نداشت ( $P < 0/05$ ). این نتایج با نتایج Salimirad و همکاران (۲۰۲۲) هم‌خوانی دارد، آنها نیز اعلام نمودند افزودن باکتری‌های *L. casei* و باسیلوس کواگولانس و ترکیب این دو باکتری تاثیر معنی‌داری بر میزان رطوبت و حلالیت فیلم‌ها نداشت [۴]. همچنین La Storia و همکاران (۲۰۲۰) نیز اعلام نمودند افزودن باکتری لاکتوباسیلوس کورواتوس به فیلم پروتئین آب پنیر تاثیر معنی‌داری بر رطوبت فیلم ندارد [۲۵].

با توجه به نتایج بیشترین مقادیر نفوذپذیری به بخار آب (جدول ۱) در فیلم PLA بوده است ( $1/60 \times 10^{-11} \text{ gs}^{-1}\text{m}^{-1}\text{Pa}$ ). با افزودن نانوسلولز به فیلم PLA میزان نفوذ پذیری به بخار آب کاهش یافت ( $1/52 \times 10^{-11} \text{ gs}^{-1}\text{m}^{-1}\text{Pa}$ ) ( $P < 0/05$ ). دلیل این امر درجه تبلور بالای نانوسلولز است. که به عنوان یک عامل هسته‌زا در ماتریس پلیمر عمل می‌کند. حضور نانوذرات

پروبیوتیک، با ضریب شکست متفاوت، شفافیت فیلم را به دلیل افزایش پراکندگی نور کاهش می‌دهند [۳۰]. افزایش کدورت فیلم‌ها ممکن است سبب کاهش تقاضای مصرف کننده‌ها باشد، اما کاهش شفافیت توسط فیلم‌ها می‌تواند به

عنوان یک مزیت در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی باشد، زیرا سبب کاهش عبور نورهای مرئی و فرابنفش از فیلم می‌شود و در نتیجه سبب کاهش واکنش‌های شیمیایی ناخواسته مانند اکسیداسیون لیپیدها و کاهش ارزش غذایی می‌شود [۲، ۳۱].

**Table 1.** Physical properties of PLA/nano cellulose (NC) composite films containing *L. casei*

Film	Thickness (mm)	Moisture (%)	Solubility (%)	WVP ( $10^{-11} \text{ gs}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}$ )	Turbidity
PLA	0.043± 0.001 <sup>b</sup>	18.51± 0.50 <sup>a</sup>	23.02± 0.50 <sup>a</sup>	1.60± 0.02 <sup>a</sup>	0.96± 0.02 <sup>c</sup>
PLA+ NC	0.050± 0.001 <sup>a</sup>	17.04± 0.19 <sup>b</sup>	20.42± 0.56 <sup>b</sup>	1.52± 0.03 <sup>b</sup>	1.05± 0.03 <sup>b</sup>
PLA+ NC+ <i>L. casei</i>	0.057± 0.002 <sup>a</sup>	16.55± 0.49 <sup>b</sup>	19.44± 0.60 <sup>b</sup>	1.48± 0.01 <sup>c</sup>	1.21± 0.03 <sup>a</sup>

Different letters in the each column show a significant difference between treatments at  $p < 0.05$ .

Data are shown as mean value± standard deviation.

نتایج Mirabolghasemi (۲۰۲۱) در ارتباط با مقادیر

استحکام کششی فیلم زیست نانوکامپوزیت های PLA تقویت شده با نانوبلور سلولز هم خوانی دارد [۲۶]. نتایج مربوط به حداکثر کشش تا قبل از نقطه پارگی با نتایج مربوط به مقاومت کششی نسبت عکس داشت، افزودن نانوسلولز، سبب کاهش حداکثر کشش تا قبل از نقطه پارگی شد (P<۰/۰۵) که این امر نشان‌دهنده افزایش استحکام فیلم پس از افزودن نانوسلولز می‌باشد. اما با افزودن باکتری پروبیوتیک به فیلم PLA مقاومت کششی و حداکثر کشش تا قبل از نقطه پارگی کاهش یافت. علت کاهش ویژگی‌های مذکور پس از افزودن باکتری پروبیوتیک، به دلیل قرارگیری سلول‌های میکروبی در داخل ماتریس نانوکامپوزیت و متعاقباً کاهش پیوندهای منسجم موجود در ساختار فیلم می‌باشد [۴].

### ۳-۱-۲- ویژگی‌های مکانیکی فیلم

همان‌طور که ملاحظه می‌شود (جدول ۲) با افزودن نانوسلولز به فیلم PLA، مقاومت کششی افزایش یافته است (P<۰/۰۵). به‌طور کلی عملکرد مکانیکی کامپوزیت‌ها، به ویژه زیست نانوکامپوزیت‌ها، به عواملی همچون سازگاری بین ماتریس پلیمر و تقویت‌کننده، انتقال تنش به تقویت‌کننده، کسر حجمی تقویت‌کننده، نسبت منظر تقویت‌کننده، جهت‌گیری تقویت‌کننده و بلورینگی ماتریس بستگی دارد [۳۲]. بهبود خواص مکانیکی زیست نانوکامپوزیت‌ها با افزودن نانوبلور سلولز به ماتریس PLA را می‌توان به درجه تبلور زیاد و خواص مکانیکی خوب این نانوذره نسبت داد. افزایش مقدار کریستالی ماتریس پلیمری منجر به بهبود مدول کششی و استحکام نانوکامپوزیت‌ها می‌شود [۲۶، ۳۳]. این نتایج با

**Table 2.** Mechanical properties of PLA/nano cellulose (NC) composite films containing *L. casei*

Film	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)
PLA	43.26± 0.74 <sup>b</sup>	2.96± 0.03 <sup>a</sup>
PLA+ NC	48.34± 0.47 <sup>a</sup>	2.71± 0.03 <sup>b</sup>
PLA+ NC+ <i>L. casei</i>	42.39± 0.58 <sup>b</sup>	2.43± 0.09 <sup>c</sup>

Different letters in the each column show a significant difference between treatments at  $p < 0.05$ .

Data are shown as mean value± standard deviation

PLA پس از افزودن NC می‌باشد [۲]. اما با افزودن باکتری پروبیوتیک، تغییر محسوسی در شدت پیک‌ها مشاهده نشد. این نتایج با نتایج Dai و همکاران (۲۰۱۸) هم‌خوانی دارد که گزارش نمودند الگوی XRD فیلم بر پایه هیدروکسی متیل سلولز آرد lonjac حاوی *Lactobacillus paracasei* هیچگونه تفاوت قابل ملاحظه‌ای با گروه کنترل نداشته است [۳۴]. همچنین نتایج مشابهی توسط Mozaffarzogh و همکاران (۲۰۲۰) گزارش شد که اعلام نمودند باکتری پروبیوتیک تاثیری بر الگوی XRD فیلم ندارد [۱۳].

### ۳-۱-۳- آزمون پراش اشعه X (XRD)

با توجه به آزمون پراش پرتو ایکس (نمودار ۱) برای فیلم‌های مختلف مشخص شد همه فیلم‌ها بلندترین پیک خود را در زاویه  $2\theta = 9.12^\circ$  نشان دادند. همانطور که مشاهده می‌شود، فیلم خالص PLA ماهیت آمورف از خود نشان داد، بنابراین می‌توان PLA را یک پلیمر نیمه کریستالی به حساب آورد. پس از افزودن نانوسلولز شدت پیک ظاهر شده در  $9.12^\circ$  افزایش یافت که نشان‌دهنده افزایش در میزان بلورینگی فیلم

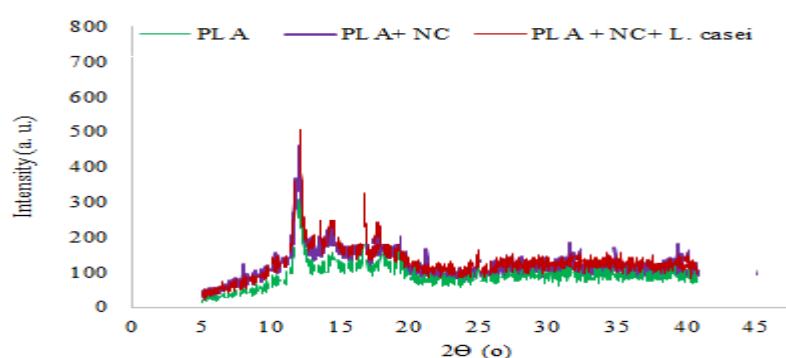
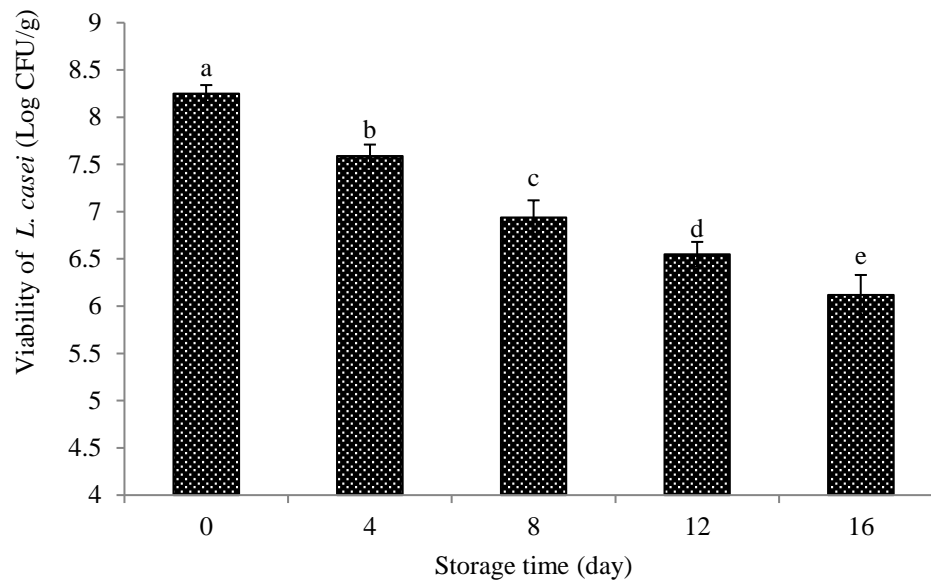


Figure 1: X-ray diffraction of different films.

تعداد باکتری پروبیوتیک در سطح فیلم باید حداقل  $\log$  CFU/g ۶ باشد [۳۵]، که در این مطالعه تا انتهای دوره نگهداری از مقدار مجاز برخوردار بود. در واقع طی دوره نگهداری، باکتری پروبیوتیک به میزان  $2 \log$  CFU/g کاهش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد، فیلم PLA- نانوسلولز، می‌تواند حامل خوبی برای سلول‌های زنده پروبیوتیکی باشد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند، تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در فیلم‌های بر پایه پروتئینی و پلی‌ساکاریدی در طی نگهداری در دمای یخچال  $1-2 \log$  CFU/g کاهش می‌یابد [۴، ۱۳، ۳۱].

۳-۲- بقای باکتری‌های پروبیوتیک در فیلم نانوکامپوزیت شرایط اصلی برای تضمین اثربخشی فیلم‌های فعال پروبیوتیکی، اطمینان از بقا و عملکرد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک‌های گنجانده شده در ماتریس زیست پلیمرها، می‌باشد [۲۵]. براساس نتایج مطالعه حاضر (نمودار ۲)، با افزایش زمان نگهداری، بقای باکتری‌های پروبیوتیک در فیلم کاهش یافت. به طوریکه تعداد باکتری *L. casei* از  $\log$  CFU/g  $8/25$  در روز صفر مطالعه به  $6/12 \log$  CFU/g در پایان مطالعه (روز ۱۶) رسید. بر طبق قانون تصویب شده سازمان خواروبار و کشاورزی ملل متحد FAO (۲۰۱۸)



**Figure 2:** Viability of *Lactobacillus casei* in the nano composite films during storage at 4 °C.

Different letters in the each day show a significant difference between treatments at.

به نانو فیلم مشاهده شد. در مجموع فیلم نانو فیلم کامپوزیت PLA/نانوسلولز می‌تواند به عنوان یک حامل مناسب برای باکتری پروبیوتیک *L. casei* در بسته‌بندی مواد غذایی در دمای یخچال باشد. مطالعات آینده می‌تواند با هدف بررسی اثر افزودن پروبیوتیک‌ها به فیلم خوراکی بر روی ویژگی‌های حسی به منظور کاربرد آن‌ها در بسته‌بندی مواد غذایی انجام شود.

#### ۴- نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، نانو فیلم کامپوزیت خوراکی PLA/نانوسلولز حاوی باکتری *L. casei* ذخیره شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا انتهای دوره نگهداری ۱۶ روزه از مقادیر مجاز باکتری پروبیوتیک برخوردار بود. افزایش معنی‌داری در ضخامت، شفافیت و کاهش معنی‌داری در مقاومت کششی، رطوبت و حلالیت در نانوکامپوزیت‌های پروبیوتیک نسبت

#### ۵- منابع

- [1] Rezaeigolestani, M., Misaghi, A., Khanjari, A., Basti, A. A., Abdulkhani, A. Fayazfar, S. 2017. Antimicrobial evaluation of novel polylactic acid based nanocomposites incorporated with bioactive compounds in vitro and in refrigerated vacuum-packed cooked sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 260, 1-10.
- [2] Shakour, N., Khoshkhoo, Z., Akhondzadeh Basti, A., Khanjari, A., Mahasti Shotorbani, P. 2021. Investigating the properties of PLA-nanochitosan composite films containing Ziziphora Clinopodioides essential oil and their impacts on oxidative spoilage of *Oncorhynchus mykiss* fillets. *Food Science and Nutrition*. 00:1-13.
- [3] Heydari-Majd, M., Ghanbarzadeh, B., Shahidi-Noghabi, M., Najafi, M. A. Mohammadyar, H., 2019. A new active nanocomposite film based on PLA/ZnO nanoparticle/essential oils for the preservation of refrigerated *Otolithes ruber* fillets. *Food Packaging and Shelf Life*. 19: 94-103.
- [4] Salimiraad, S., Safaeian, S., Akhondzadeh Basti, A., Khanjari, A., Mousavi Nadoushan, R. 2022. Characterization of novel probiotic nanocomposite films based on nano chitosan/ nano cellulose/ gelatin for the preservation of fresh chicken fillets. *LWT - Food Science and Technology*. 162. 113429.
- [5] Jensen, A., Lim, L. T., Barbut, S., and Marcone, M. 2015. Development and characterization of soy protein films incorporated with cellulose fibers using a hot surface casting technique. *LWT-Food Science and Technology*. 60 (1). 162-170.
- [6] Zabihollahi, N., Alizadeh, A., Almasi, H., Hanifian, S., & Hamishekar, H. 2020. Development and characterization of carboxymethyl cellulose based probiotic nanocomposite film containing cellulose nanofiber and inulin for chicken fillet shelf



- life extension. *International Journal of Biological Macromolecules*. 160 (1). 409-417.
- [7] Soni, E.B. Hassan, M.W. Schilling, B. Mahmoud, Transparent bionanocomposite films based on chitosan and TEMPO-oxidized cellulose nanofibers with enhance mechanical and barrier properties, *Carbohydrate Polymers*. 151. 779–789.
- [8] Abdulkhani, A., Hosseinzadeh, J., Ashori, A., Dadashi, S., and Takzare, Z. 2014. Preparation and characterization of modified cellulose nanofibers reinforced polylactic acid nanocomposite. *Polymer Testing*. 35. 73-79.
- [9] Niu, Y. Liu, Y. Song, J. Han, H. Pan. 2018. Rosin modified cellulose nanofiber as a reinforcing and co-antimicrobial agents in polylactic acid /chitosan composite film for food packaging, *Carbohydrate Polymers*. 183. 102–109.
- [10] Odila Pereira, J. Soares, S. Sousa, A.R. Madureira, A. Gomes, M. Pintado. 2016. Edible films as carrier for lactic acid bacteria, *LWT - Food Science and Technology*. 73. 543–550.
- [11] Aymerich, T., Rodríguez, M., Garriga, M., Bover-Cid, S. 2019. Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8° C. *Food microbiology*. 83. 64-70.
- [12] Espitia, P. J. P., Batista, R. A., Azeredo, H. M. C., Otoni, C. G. 2016. Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International*. 90. 42–52.
- [13] Mozaffarzogh, M., Misaghi, A., Shahbazi, Y., & Kamkar, A. 2020. Evaluation of probiotic carboxymethyl cellulose-sodium caseinate films and their application in extending shelf life quality of fresh trout fillets. *LWT - Food Science and Technology*. 126. 109305.
- [14] Pavli, F., Tassou, C., Nychas, G. J. E., & Chorianopoulos, N. 2018. Probiotic incorporation in edible films and coatings: Bioactive solution for functional foods. *International Journal of Molecular Sciences*. 19. 1–17.
- [15] Atallah, A. A. 2016. The production of bio-yoghurt with probiotic bacteria, Royal jelly and Bee pollen grains. *Journal of Nutrition & Food Sciences*. 6 (3). 510.
- [16] Ghasemi, Zh., Alizadeh Khaled-Abad, M., Almasi, H., Nikoo, M. 2022. Carboxymethyl cellulose based bioactive edible films with *Lactobacillus casei* and fish protein hydrolysates. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 17 (6). 85-102
- [17] Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., Fisk, I. D. 2014a. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. *Food Chemistry*. 159. 302–308.
- [18] Erdohan, Z. Ö., Çam, B., Turhan, K. N. 2013. Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. *Journal of Food Engineering*. 119 (2). 308- 315.
- [19] ASTM. 1996. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-91. Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American society for Testing and Material.
- [20] Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., Hosseini, S. M. H. 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*. 122 (1). 161-166.
- [21] Bertan, L. C., Tanada-Palmu, P. S., Siani, A. C. Grosso, C. R. F. 2005. Effect of fatty acids and Brazilian elemi on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids* 19: 73- 82.
- [22] Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H.H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C. Fisk, I. 2014b. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*. 39. 231–242.
- [23] 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
- [24] Shahosseini, S.R. 2023. Evaluation of Physical, Mechanical and Antimicrobial Properties of Pullulan Films Enriched with Free and Encapsulated *Tragopogon graminifolius* DC. Extract for use in Food Packaging. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*. 15 (3). 57-76.
- [25] La Stora, A., Di Giuseppe, F. A., Volpe, S., Oliviero, V., Villani, F., & Torrieri, E. 2020. Physical properties and antimicrobial activity of bioactive film based on whey protein and *Lactobacillus curvatus* 54M16 producer of bacteriocins. *Food Hydrocolloids*. 105959.
- [26] Mirabolghasemi S, Najafi M, Azizi A, Haji Bagherian M. 2021. Preparation and study of physical and mechanical behavior of polylactic acid bionanocomposites reinforced with Cellulose Nanocrystal and silver nanoparticles. *Journal of Applied Research of Chemical -Polymer Engineering*. 5 (3). 25-13.
- [27] Paralikar S. A., Simonsen J., Lombardi J., 2008. Poly (Vinyl Alcohol)/ Cellulose

- Nanocrystal Barrier Membranes. *Journal of Membrane Science*. 320. 258-248.
- [28] 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.
- [29] Kanmani, P., Lim, S. T. 2013. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. *Food chemistry*. 141(2). 1041-1049.
- [30] Bekhit, M., Arab-Tehrany, E., Kahn, C. J. F., Cleymand, F., Fleutot, S., Desobry, S. 2018. Bioactive films containing alginate-pectin composite microbeads with *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*: Physicochemical characterization and antilisterial activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(2). 1-12.
- [31] 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. 54-60.
- [32] Jonoobi M., Mathew A. P., Abdi M. M., Makinejad M. D., Oksman K., 2012. A Comparison of Modified and Unmodified Cellulose Nanofiber Reinforced Polylactic Acid (PLA) Prepared by Twin Screw Extrusion, *Journal of Polymers and the Environment*. 20 (4). 997-991.
- [33] Kord B., Jari E., Najafi A., Tazakorrezaie V. 2014. Effect of Nanoclay on the Decay Resistance and Physicomechanical Properties of Natural Fiber-Reinforced Plastic Composites against White-Rot Fungi (*Trametes versicolor*), *Journal of Thermoplastic Composite Materials*. 8 (27). 1096-1085.
- [34] Dai, L., Yuan, Y., Song, Z., Qiu, Y., Yue, T. 2018. Preparation and characterization of Lactobacilli-loaded composite films with sustaining antipathogenic activity and preservation effect. *Journal of Food Science*. 83(10). 2511-2519.
- [35] FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018-Meeting the sustainable development goals. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.



## Scientific Research

### Investigating the physical and mechanical properties of polylactic acid-nanocellulose nanocomposite film containing *Lactobacillus casei* probiotic bacteria

Masoumeh Khanjani<sup>1</sup>, Peiman Ariaai<sup>1\*</sup>, Leila Najafian<sup>2</sup>, Mahro Esmaeili<sup>1</sup>

1- Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

2- Department of Food Science & Technology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b></p> <p>Received: 2023/3/15 Accepted: 2024/1/2</p> <hr/> <p><b>Keywords:</b></p> <p>Nanocomposite, Nanocellulose, Edible film, Probiotics, Viability.</p> <hr/> <p><b>DOI:</b> 10.22034/FSCT.21.147.34.</p> <hr/> <p>*Corresponding Author E-Mail:</p>	<p>Nowadays, increasing the viability of probiotics by directly adding them to edible films to prevent their mortality is of great interest. In this study, the survival of <i>Lactobacillus casei</i> probiotic bacteria added to polylactic acid-nanocellulose nanocomposite film was investigated. For this purpose, three edible films including polylactic acid, polylactic acid + nanocellulose, polylactic acid + nanocellulose+ <i>L. casei</i> (9 log CFU/g) were prepared and the physical and mechanical characteristics of the film, as well as the survival of <i>L. casei</i> bacteria, as well as the survival of <i>L. casei</i> bacteria were investigated. The results of the mechanical test showed that the use of probiotic bacteria decreased the tensile strength and elongation at the break of the polylactic acid-nanocellulose film (<math>P &lt; 0.05</math>), but the addition of nanocellulose improved the mechanical properties of the polylactic acid film. The results of physical tests including humidity, solubility, and water vapor permeability showed that the addition of probiotic bacteria and nanocellulose improved the physical properties of the film, but the opacity of the films increased (<math>P &lt; 0.05</math>). Based on the results of the present study, during storage at 4°C, the survival of probiotic bacteria in the nanofilm decreased, so that <i>Lactobacillus casei</i> bacteria decreased from 8.25 log CFU/g on the zero-day of the study to 6.12 log CFU/g reached at the end of the study (day 16), but it was within the permissible range (6 log CFU/g). Therefore, adding <i>L. casei</i> probiotic to polylactic acid-nanocellulose nanocomposite film can be a suitable carrier at refrigerator temperature.</p>