DOI: http://dx.doi.org/10.22104/jift.2020.4227.1983

فصلنامه فناوری‌های جدید در صنعت غذا، دوره۸، شماره۲، صفحه ۱۹۷-۱۷۳، زمستان ۱۳۹۹

مقاله مروری

فیلم‌ها و پوشش‌های حاوی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک: رویکردی جدید جهت تولید فرآورده‌های پروبیوتیک

دینا شهرام‌پور[۱*]، مرتضی‌خمیری[۲]

۱. دانش آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۴، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۳۹۹/۰۴/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۳)

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف کافی آن‌ها منجر به بروز اثرات سلامتی بخش در میزبان می‌گردد. با توجه به افزایش آگاهی مردم و تغییر سبک زندگی آن‌ها در سال‌های اخیر تمایل به مصرف فرآورده‌های پروبیوتیک در سراسر جهان افزایش یافته است. تولید فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک با چالش‌هایی مواجه است زیرا تعداد قابل توجهی از میکرارگانیسم‌های پروبیوتیک در طول فرایندهای مختلف از مرحله تولید تا نگهداری مواد غذایی و همچنین در طی تعامل با ترکیبات ماده غذایی غیر فعال می‌شوند. علاوه بر این، تجزیه و عبور مواد غذایی از دستگاه گوارش نیز می‌تواند بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها مؤثر باشد؛ بنابراین حفظ جمعیت زنده میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به میزان کافی ($<10^6$ cfu/ml or g) تا زمان مصرف فرآورده‌ها، باید مد نظر تولیدکنندگان قرار گیرد. به دام انداختن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در بستر پلیمری فیلم‌ها و پوشش‌ها رویکرد نوینی است که در دهه اخیر جهت تولید فیلم‌های زیست فعال با خواص ضدمیکروبی و سلامتی بخش به منظور ارائه فرآورده‌های جدید غیرلبنی پروبیوتیک مطرح شده است. هدف از این مطالعه مروری، بررسی پژوهش‌هایی است که تاکنون در زمینه فیلم‌ها و پوشش‌های پروبیوتیک انجام گرفته است تا با توجه به نتایج حاصل از آنها زمینه تحقیقات بیشتر در آینده فراهم شود.

کلید واژه‌ها: میکروارگانیسم پروبیوتیک، فیلم و پوشش، زنده‌مانی، مواد غذایی.

* نویسنده مسئول: shahrampour@gau.ac.ir

۱. مقدمه

در طول دو دهه گذشته با توجه به آگاهی مردم از تأثیر رژیم غذایی بر سلامتی، تقاضا برای محصولات غذایی فراسودمند حاوی ریزمغذی‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها افزایش یافته است [۱]. بر طبق آمارهای ارائه شده، بازار جهانی فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک از ۱۵ میلیارد دلار در سال ۲۰۰۷ به ۶۳ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۴ رشد پیدا کرده است. همچنین پیش‌بینی شده است که میزان فروش محصولات پروبیوتیک در بازارهای جهانی در سال ۲۰۲۰ به ۹۶ میلیارد دلار برسد [۲] ؛ بنابراین توسعه غذاهای سلامتی بخش به ویژه پروبیوتیک، یکی از اهداف اصلی صنعت غذا در دهه‌های اخیر محسوب می‌شود. فرآورده‌های لبنی جزء مشهورترین و متداول‌ترین محصولات غذایی پروبیوتیک شناخته می‌شوند که اثر آنها بر سلامت مصرف کنندگان به اثبات رسیده است. با این حال، بسیاری از افراد به دلیل تمایل به گیاهخواری و همچنین مشکل عدم تحمل لاکتوز و آلرژی به پروتئین‌های شیر یا کلسترول بالا تمایلی به مصرف این فرآورده‌های غذایی ندارند؛ بنابراین نیاز به توسعه فرآورده‌های غیرلبنی پروبیوتیک افزایش یافته است[۳]. از سویی دیگر مصرف میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک از طریق فرآورده‌های غذایی نسبت به مکمل‌های دارویی از محبوبیت بیشتری در بین کودکان و حتی بزرگسالان برخوردار است.

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 محدودیت‌هایی همراه است. برای مثال تعداد قابل توجهی از پروبیوتیک‌ها در طول فرایندهای مختلف مواد غذایی (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 [۴]. علاوه بر این، عبور و تجزیه مواد غذایی در دستگاه گوارش نیز می‌تواند بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها و همچنین ترکیب میکروبیوم روده مؤثر باشد [۵]. تلاش‌های بسیاری جهت مقابله با این موانع و افزایش حداکثر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک درطی تولید، انبارداری، توزیع در بازار و حتی زمان مصرف و مواجهه با اسید و نمک‌های صفراوی صورت گرفته است و تاکنون ریزپوشانی رایج‌ترین فناوری جهت افزایش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در سیستم‌های غذایی معرفی شده است [۶]. به دام انداختن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در بستر پلیمرهای مختلف رویکرد نوینی است که در دهه اخیر جهت تولید فیلم‌ها و پوشش‌های زیست فعال با خواص ضدمیکروبی و سلامتی بخش به منظور ارائه فرآورده‌های جدید پروبیوتیک مطرح شده است. هدف از این مطالعه مروری، آشنایی با پروبیوتیک‌ها و اثرات سلامتی بخش آن‌ها و همچنین بررسی تحقیقاتی است که تاکنون در زمینه فیلم‌ها و پوشش‌های پروبیوتیک و ویژگی‌های آن‌ها منتشر شده است. این اطلاعات برای شناسایی قابلیت‌های این‌گونه از بسته‌بندی‌ها و همچنین مشکلات موجود در تثبیت میکروارگانیسم‌ها در بستر فیلم‌ها و پوشش‌ها و ارائه راهکارهای جدید در آینده نزدیک می‌تواند راه‌گشا باشد.

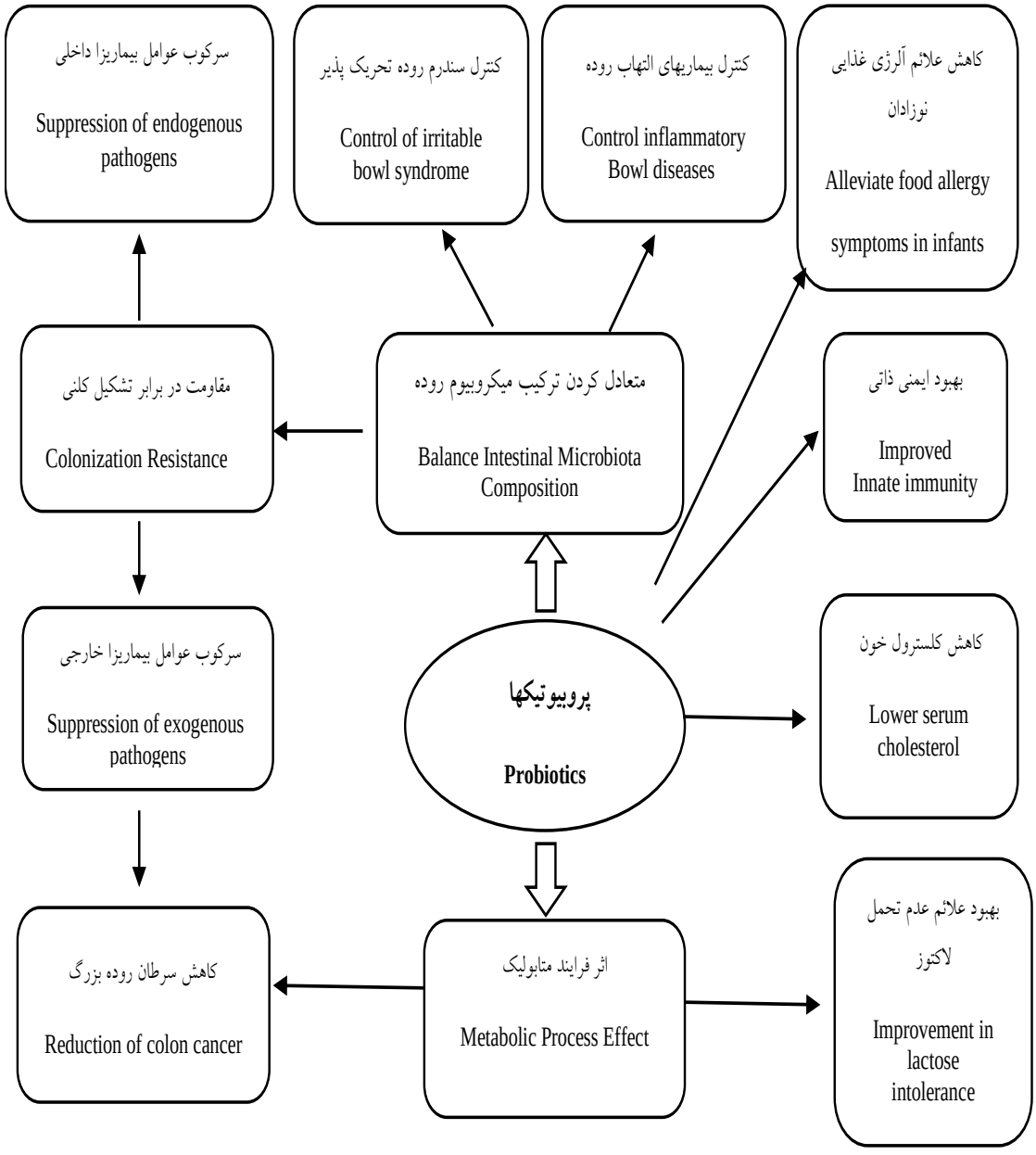
۲. پروبیوتیک‌ها:تاریخچه، تعریف، اثرات سلامتی بخش

تاریخچه پروبیوتیک‌ها به سال ۱۹۰۸ برمی‌گردد که الی متچنیکوف[1]، برای اولین بار مفهوم پروبیوتیک به معنای «طول عمر» را پس از اطلاع از طول عمر و سلامت دهقانان بلغاری در اثر مصرف فراورده شیر تخمیری، به کار برد. او بعدها دریافت که ماست حاوی میکروارگانیسم‌هایی است که از روده در برابر آسیب باکتری‌های مضر محافظت می‌کند. همچنین واژه پروبیوتیک برای اولین بار توسط لیلی و استیلول در سال ۱۹۶۵ به معنای حیات بخش[2] که از واژه یونانی پروبیوس[3] اقتباس شده بود، وارد واژگان منابع علمی گردید. در سال ۱۹۷۴ این اصطلاح توسط پارکر به معنای گسترده‌تری برای اشاره به تعاملات میکروارگانیسم با میزبان حیوان یا انسان، مورد استفاده قرار گرفت و دستگاه گوارش به عنوان نقطه اثر این میکروارگانیسم‌ها معرفی شد. در سال ۲۰۰۱، فائو[4] و سازمان بهداشت جهانی[5] تعریف واحدی برای پروبیوتیک‌ها ارائه کردند که در آن پروبیوتیک‌ها را

1. Élie Metchnikoff
2. For life
3. Probios
4 Food and agriculture organization(FAO)
5. World health organization(WHO)

میکروارگانیسم‌های زنده و غیربیماری‌زایی معرفی نمودند که در صورت مصرف مداوم و کافی ($۱۰^{۶}$cfu/gr or ml)، اثرات مفیدی بر سلامت میزبان دارند [۷].

اثرات سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها عمدتاً از طریق حفظ میکروفلور طبیعی روده، محافظت از روده در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای، تولید ترکیبات ضدمیکروبی، تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول و فشارخون و فعالیت ضد سرطانی ایجاد می‌گردد (شکل ۱). 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 [۸-۹].



شکل (۱) اثرات سلامتی بخش مصرف پروبیوتیک‌ها (پاروز و همکاران، ۲۰۰۶)

Fig 1. Health effects of probiotics(Parvez et al, 2006

۱.۲. میکروارگانیسم‌های رایج پروبیوتیک

طیف گسترده‌ای از جنس‌ها و گونه‌های میکروبی به عنوان پروبیوتیک‌های بالقوه در نظر گرفته می‌شوند که عمده آن‌ها به دو جنس *لاکتوباسیلوس*[1] و *بیفیدوباکتریوم*[2] از گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک که ساکنان اصلی روده انسان نیز هستند، تعلق دارد (جدول ۱). باکتری‌های اسیدلاکتیک به دلیل سابقه طولانی مصرف در لیست مواد GRAS[3] قرار گرفته‌اند و به طور کلی ایمن شناخته می‌شوند. علاوه بر این، گونه‌های میکروبی دیگر متعلق به جنس‌های *استرپتو کوکوس*[4]، *انتروکوکوس*[5] و همچنین مخمرهای *ساکارو مایسس سرویزیه*[6] و *ساکارومایسس بولاردی*[7] نیز به دلیل اثرات سلامتی بخش‌شان به عنوان پروبیوتیک مطرح شده‌اند [۹-۱۰].

جدول (۱) فهرست گونه‌های مختلف میکروبی معرفی شده به عنوان پروبیوتیک.

Table 1. List of different microbial species introduced as probiotics.

جنس genus	گونه species
Lactobacillus spp.	*L. acidophilus, L. rhamnosus, L. casei, L. delbrueckii, L. bulgaricus, L. cellobiosus, L. curvatus, L. fermentum, L. lactis, L. plantarum, L. reuteri, L. brevis, L. paracasei.*
Bifidobacterium spp.	*B. bifidum, B. adolescentis, B. animalis, B. infantis, B. thermophilum, B. longum, B. lactis, B. breve.*
Enterococcus spp.	*Ent. Faecalis, Ent. Faecium*
Streptococcus spp.	*S. cremoris, S. salivarius, S. diacetylactis, S. intermedius, S. thermophilus*
other	*Bacillus cereus, Bacillus coagulans, saccharomyces boulardii, saccharomyces cerevisiae*

۲.۲. معیار انتخاب پروبیوتیک‌ها

نخستین ضرورت برای تولید یک محصول غذایی پروبیوتیک انتخاب سویه پروبیوتیک مناسب می‌باشد. زنده‌مانی در طول فرایند تولید و انبارمانی، زنده‌مانی طی عبور از دستگاه گوارش و پتانسیل ایجاد اثرات سلامتی بخش بر فرد مصرف‌کننده از جمله معیارهای اصلی انتخاب سویه‌های پروبیوتیک است. بقای باکتری‌ها در برابر عوامل مضر در طی فراوری و تولید محصول به نوع گونه و نژاد وابسته است [۱۱-۱۲]. بر اساس تحقیقات انجام شده لاکتوباسیلوس‌ها نسبت به بیفیدوباکترها در غذاهای تخمیری سنتی از مقاومت بالاتری برخوردار بودند و همچنین سازگاری خوبی با بسیاری از ترکیبات غذایی نشان دادند؛ بنابراین بسیاری از گونه‌های باکتریایی پروبیوتیک با قابلیت تکنولوژیکی مطلوب به جنس لاکتوباسیلوس اختصاص دارد [۱۳]. معیارهای متعددی برای انتخاب ارگانیسم‌های پروبیوتیک پیشنهاد شده است. جدول (۲) برخی از ویژگی‌های مختلف فیزیولوژیکی، تکنولوژیکی و عملکردی سویه‌های پروبیوتیک را به عنوان معیار انتخاب پروبیوتیک‌ها در برنامه تجاری به تصویر کشیده است [۱۴].

1 Lactobacillus
2 Bifidobacterium
3. Generally Recognized As Safe

4. Streptococcus
5. Enterococcus
6. Saccharomyces cerevisiae
7. Saccharomyces boulardii

جدول (۲) معیارهای انتخاب پروبیوتیک‌ها برای کاربردهای تجاری
Table 2. Criteria for selecting probiotics for commercial use.

معیار Criteria	ویژگی‌ها Properties
معیارهای ایمنی Safety criteria	عوامل بیماری‌زایی، منشأ بیماری‌زایی، فاکتورهای بیماری‌زایی (سمیت، فعالیت متابولیک و خواص ذاتی مانند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها) Pathogenicity and infectivity Origin Virulence factors (toxicity, metabolic activity and intrinsic properties, i.e., antibiotic resistance)
معیارهای تکنولوژیکی Technological criteria	سویه‌های پایدار ژنتیکی، زنده ماندن در طی فراوری و نگهداری، خواص حسی مطلوب، تولید در مقیاس بالا، مقاومت در برابر فاژها Genetically stable strains desired viability during processing and storage good sensory properties large-scale production phage resistance
معیارهای عملکردی Functional criteria	مقاومت در برابر اسید معده، مقاومت در برابر صفرا، چسبیدن به سطح سلول‌های مخاطی روده Tolerance to gastric acid bile tolerance adhesion to mucosal surface
معیارهای فیزیولوژیکی Physiological criteria	فعالیت آنتاگونیستی سیستم ایمنی، متابولیسم کلسترول، متابولیسم لاکتوز، خواص ضد سرطان‌زایی، خواص ضد جهش‌زایی Immunomodulation antagonistic activity cholesterol metabolism lactose metabolism antimutagenic and anticarcinogenic properties

۳.۲. مقدار مصرف پروبیوتیک‌ها

فواید سلامتی بخش مورد توجه پروبیوتیک ها تنها زمانی می‌تواند به دست آید که مواد غذایی حاوی حداقل تعداد قابل قبول میکرو ارگانیسم‌های پروبیوتیک در زمان مصرف باشد. به طورکلی در صنعت غذا حداقل میزان $۱۰^{۶}$cfu/ml or g در زمان مصرف توصیه شده است. سازمان غذا و دارو امریکا نیز حداقل مقدار پروبیوتیک در مواد غذایی پروبیوتیک را $۱۰^{۶}$cfu/g or ml توصیه نموده است. بسته به میزان مصرف و با در نظر گرفتن تأثیر زمان نگهداری بر بقای پروبیوتیک‌ها، مصرف روزانه $۱۰^{۹}$- $۱۰^{۸}$ میکروارگانیسم پروبیوتیک برای دستیابی به عملکرد مناسب پروبیوتیک‌ها در ارگان‌های مختلف بدن ضروری است. همچنین اعلام شده که محصولات پروبیوتیک باید به طور منظم با مقدار تقریبی ۱۰۰g در روز مصرف شوند تا حدود $۱۰^{۹}$ سلول زنده را به روده برسانند [۸].

۳. عوامل مؤثر بر بقای پروبیوتیک‌ها در محصولات غذایی

میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک معمولاً به شکل فرآورده‌های غذایی (تخمیری یا غیرتخمیری) و یا مکمل‌های غذایی (فرآورده‌هایی به شکل پودر، کپسول یا قرص) مصرف شوند. در طی چند دهه گذشته بیش از ۵۰۰ نوع فرآورده غذایی پروبیوتیک در بازار جهانی معرفی شده است و این فهرست به طور مداوم گسترش می‌یابد [۱۵]. به منظور حفظ اعتماد مصرف‌کنندگان به تأثیرگذاری فرآورده‌های پروبیوتیک باید جمعیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در طول تولید و نگهداری فرآورده غذایی بالا در نظر گرفته شود. عوامل بسیاری بر پایداری میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در فرآورده‌های غذایی مؤثر هستند. از جمله می‌توان به pH، اسیدیته، اکسیژن مولکولی، فعالیت آبی، حضور نمک، شکر و مواد شیمیایی مانند پراکسید هیدروژن، باکتریوسین‌ها، طعم دهنده‌های مصنوعی و رنگ‌ها اشاره کرد. همچنین عوامل مرتبط با فرایند تولید شامل عملیات حرارتی، دمای نگهداری، سرعت خنک کردن فرآورده، مواد بسته‌بندی، شرایط نگهداری مانند دمای نگهداری، رطوبت نسبی، میزان اکسیژن و قرار گرفتن در معرض نور و مقیاس تولید تأثیر قابل توجهی بر بقای پروبیوتیک‌ها دارند. از جمله عوامل میکروبیولوژیک مؤثر بر پایداری میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک نیز می‌توان نوع سویه پروبیوتیک و نسبت تلقیح را ذکر کرد [۱۶-۱۷].

۱.۳. ترکیب ماده غذایی

ترکیبات غذایی موجود در غذا می‌توانند به عنوان یک عامل محافظت کننده، بدون تأثیر و یا مضر در ثبات پروبیوتیک‌ها عمل کنند، از این رو سازگاری پروبیوتیک‌ها با ترکیبات مختلف مواد غذایی نقش مهمی در بقای آن‌ها دارد. مواد افزودنی که به طور کلی در صنایع غذایی استفاده می‌شوند شامل انواع مختلفی از شیرین کننده‌ها، نمک‌ها، ترکیبات معطر، طعم‌دهنده‌های طبیعی و مصنوعی، رنگ‌ها، نایسین، ناتامیسین، لیزوزیم و نیتریت هستند. این مواد افزودنی می‌توانند به شدت بر رشد و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک مورد استفاده در محصولات تخمیری و غیرتخمیری تأثیر منفی گذارند [۱۸]. ترکیبات مختلف تقویت‌کننده رشد مانند گلوکز، ویتامین‌ها، مواد معدنی، کازئین، پروتئین آب پنیر، عصاره مخمر و آنتی اکسیدان‌ها برای افزایش رشد گونه‌های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکترها) در محصولات لبنی به کار می‌روند و اثرات قابل توجهی بر بقای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در طول ذخیره سازی دارند برخی از مشتقات پروتئین (کنسانتره پروتئین آب پنیر، کازئین هیدرولیز شده و تریپتون) همچنین برای بهبود رشد پروبیوتیک‌ها از طریق تأمین مواد مغذی برای سلول‌ها، افزایش ظرفیت بافری محیط پیشنهاد شده است [۱۹]. برخی از مطالعات حاکی از آن است که حضور دی ساکاریدها می‌تواند به پایداری غشای سلول در طی ذخیره‌سازی کمک نماید. برای مثال سوربیتول از آسیب دیدن غشاء از طریق برهم‌کنش با آن و حفظ عملکرد و ساختار پروتئین‌ها، جلوگیری می‌کند. برخی از مواد غذایی غیرقابل هضم یا با قابلیت هضم پایین که به عنوان پری بیوتیک شناخته می‌شوند به طور انتخابی توسط باکتری‌های مفید روده متابولیز می‌شوند و بدین طریق فعالیت و رشدشان افزایش می‌یابد. تعدادی از این ترکیبات مانند فروکتوالیگوساکاریدها و گالاکتوساکاریدها تأثیر مثبتی بر حفظ پروبیوتیک‌ها به خصوص بیفیدوباکترها در طی نگهداری فرآورده‌های غذایی دارند [۲۰].

۲.۳. میزان اکسیژن

میزان اکسیژن و پتانسیل اکسیداسیون یکی از فاکتورهای مهم تأثیرگذار بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها به ویژه در طی ذخیره‌سازی است اکسیژن مولکولی برای رشد و بقای پروبیوتیک‌ها از آنجائی که اکثر گونه‌ها بی‌هوازی مطلق یا بی‌هوازی اختیاری هستند، مضر است. اکسیژن سلول‌های پروبیوتیک را از سه طریق تحت تأثیر قرار می‌دهد: اکسیژن مسقیماً برای برخی از سلول‌ها سمی است، تولید پراکسیدها در حضور اکسیژن، رادیکال‌های آزاد تولید شده از اکسیداسیون ترکیبات مختلف مثل چربی‌ها. سطح اکسیژن موجود در بسته‌بندی در طی نگهداری فرآورده‌های پروبیوتیک باید تا حد امکان پایین باشد تا از اثرات سمی و کشنده بر میکروارگانیسم‌ها و افت عملکرد محصول جلوگیری نماید. میزان حساسیت به اکسیژن در میان گونه‌ها و سویه‌های مختلف پروبیوتیک متفاوت است. بیفیدوباکترها به دلیل طبیعت بی‌هوازی‌شان نسبت به اکسیژن آسیب‌پذیرتر هستند. در میان گونه‌های مختلف بیفیدوباکتر، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*[1] که از شیر تخمیری جدا شده است یک گونه نسبتاً مقاوم در برابر اکسیژن محسوب می‌شود. به طور کلی لاکتوباسیلوس‌ها نسبت به بیفیدوباکترها به اکسیژن مقاوم‌ترند تا جائی‌که میزان اکسیژن به ندرت در حفظ بقای لاکتوباسیلوس‌ها مهم است. میزان بالای آنزیم‌های NAD- اکسیداز و NADH- پراکسیداز در گونه‌های مقاوم به اکسیژن گزارش شده است که این آنزیم‌ها مسئول حذف اکسیژن از محیط داخل سلول هستند. علاوه بر میزان اکسیژن موجود در محصول، مقداری از آن می‌تواند از طریق بسته‌بندی نفوذ کند و در تماس با محصول قرار گیرد. افت زنده‌مانی به دلیل اکسیداسیون لیپیدهای غشاء رخ می‌دهد. محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها باعث آسیب به DNA باکتری مدل شد؛ بنابراین به منظور کاهش اکسیداسیون و افزایش بقای سلول‌های پروبیوتیک در طول نگهداری، حضور آنتی‌اکسیدان‌ها همراه با نگهداری تحت خلاء علاوه بر کنترل فعالیت آبی می‌تواند مؤثر باشد. روش‌های مختلفی برای کاهش میزان اکسیژن در طی

1. B. lactis

بسته‌بندی و ذخیره‌سازی محصولات پروبیوتیک وجود دارد، از جمله بسته‌بندی تحت خلأ، استفاده از مواد بسته‌بندی با نفوذپذیری پایین نسبت به اکسیژن، افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها و گیرنده‌های اکسیژن به محصول، کنترل فرایند تولید به طریقی که حداقل اکسیژن وارد محصول شود. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند کاتچین‌ها جهت محدود ساختن اثرات منفی قرار گرفتن در معرض اکسیژن بر باکتری‌ها در طول رشد و ذخیره‌سازی در محصولات غذایی به کار می‌روند [۲۱-۲۲].

۳.۳. محتوای رطوبت/ فعالیت آبی

محتوای رطوبت محصولات پروبیوتیک عامل دیگری است که بر پایداری باکتری‌های زنده تأثیرگذار است. حضور اکسیژن و رطوبت در طی نگهداری برای بقا پروبیوتیک مضر تلقی می‌شود. مقدار آب باقی مانده پس از خشک شدن، نه تنها بر پایداری باکتری‌ها بلافاصله بعد از فرآیند مؤثر است، بلکه بر میزان زنده‌مانی در طول ذخیره‌سازی در مراحل بعدی نیز تأثیر می‌گذارد. مقدار رطوبت بهینه جهت ذخیره‌سازی کشت *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*[1] که به صورت انجمادی خشک شده، بین ۵/۶- ۲/۸٪ گزارش شده است. افزایش رطوبت نسبی محیطی که در آن نمونه‌های غذایی نگهداری می‌شود، موجب افزایش تحرک آب و گسترش واکنش‌های شیمیایی و افزایش نرخ مرگ و میر باکتری‌ها می‌گردد. وین بریک و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که فعالیت آبی ۰/۷ منجر به ۱۰ سیکل لگاریتمی کاهش در جمعیت زنده *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG[2] در طی دو هفته نگهداری شد [۲۳-۲۴].

۴.۳. دمای نگهداری

زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طول نگهداری، به دمای محیط نگهداری ارتباط دارد و فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک ترجیحاً باید در دمای ۴°C تا ۵ نگهداری شوند. بیفیدوباکترها نسبت به لاکتوباسیلوس‌ها مقاومت کمی در برابر دمای پایین یخچال نشان داده‌اند [۲۵]. با این حال، برای نگهداری طولانی مدت کشت ذخیره پروبیوتیک‌ها، دمای بسیار پایین‌تر از ۱۸- °C توصیه شده است که باعث افزایش زنده‌مانی بیفیدوباکترها می‌شود. در حالی که دمای نگهداری ۲۰°C باعث کاهش قابل توجه در تعداد این گونه باکتریایی در محصولات خشک شده، می‌شود. نتایج مشابهی توسط سیمپسون و همکاران (۲۰۰۵) در هنگام نگهداری از گونه‌های بیفیدوباکتر که به صورت پاششی خشک شدند در دمای ۱۵ °C و ۲۵ گزارش شد [۲۶-۲۷].

۵.۳. pH و اسیدیته

بقای پروبیوتیک‌ها در طول نگهداری به طور قابل توجهی تحت تأثیر pH و اسیدیته قابل تیتر فرآورده‌های غذایی قرار می‌گیرد [۱۹]. مقدار بسیار پایین pH باعث افزایش غلظت اسیدهای آلی تفکیک نشده در محصولات تخمیر شده می‌شود، در نتیجه اثر ضد باکتری این اسیدها با افزایش امکان ورود به سلول باکتری افزایش می‌یابد. نوشیدنی‌هایی مانند آب میوه‌ها با pH پایین با چالش بقاء پروبیوتیک‌ها در طی نگهداری روبرو هستند. محدوده بهینه pH برای رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[3] و *بیفیدوباکتر*[4] در محدوده بین ۶-۵/۵ و ۷-۶ می‌باشد. لاکتوباسیلوس‌ها قادر به رشد و بقا در محصولات تخمیری با مقادیر pH بین ۴/۳-۳/۷ هستند [۲۸]. گونه‌های مختلف بیفیدوباکترها مقاومت کمی در برابر شرایط اسیدی دارند و pH پایین‌تر از ۴/۶ برای بقای آن‌ها مضر تلقی می‌گردد. مقاومت در برابر اسید *بیفیدوباکتریوم*[5] به نوع سویه و خصوصیات سوبسترا بستگی دارد. برای مثال، *بیفیدو باکتریوم لانگوم*[6] در شرایط بهینه در حضور اسیدهای آلی و نمک صفراوی و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*[7] در شیر تخمیری زنده می‌مانند [۲۵]. شیهان و همکاران (۲۰۰۷) تفاوت فاحشی در مقاومت در برابر اسید لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکترها پس از اضافه کردن آن‌ها به آبمیوه‌های مختلف مانند پرتقال، آناناس و زغال اخته مشاهده نمودند. زنده‌مانی تمامی سویه‌ها در آب پرتقال و آناناس بهتر از آب زغال اخته

1. L. salivarius
2. L. rhamnosus GG
3. L. acidophilus
4. Bifidobacteria
5. Bifidobacterium spp
6. B. longum
7. B. lactis

گزارش شد. در میان سویه‌های مختلف جمعیت *لاکتوباسیلوس کازئی*[1]، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[2] و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*[3] برای حداقل ۱۲ هفته در آب پرتقال و آناناس در بالاتر از ۶ سیکل لگاریتمی حفظ شد [۲۹]. به علاوه کاهش pH در محصولات گوشتی تخمیری نیز چالشی برای بقای پروبیوتیک‌ها محسوب می‌گردد. کاهش pH از ۵/۶ تا ۴/۹ پس از تخمیر، بر بقای پروبیوتیک‌ها در سوسیس‌های تخمیر شده تأثیر می‌گذارد [۳۰]. نتایج قبلی نشان می‌دهد که انتخاب سویه مناسب در تولید غذاهای پروبیوتیک بسیار ضروری است که برای حفظ منافع واقعی مصرف‌کننده باید این فرآورده‌ها در زمان تعیین شده مورد استفاده قرار گیرند. تحمل شرایط صفراوی و اسیدی، نشان‌دهنده مفید بودن عملکرد تکنولوژیکی سویه‌ها در غذاهای پروبیوتیک است [۳۱].

۶.۳. شرایط بسته‌بندی

جنبه‌های مختلف بسته‌بندی، مانند نوع و ضخامت مواد بسته‌بندی، نفوذپذیری نسبت به نور و گازها (اکسیژن، دی اکسیدکربن و بخار آب) و روش بسته‌بندی می‌تواند بر بقای پروبیوتیک‌ها تأثیر بگذارد [۲۵]. دما و رطوبت نسبی جو ممکن است، نفوذپذیری نسبت به گاز مواد بسته‌بندی را تحت تأثیر قرار دهند و در نتیجه بر روی قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها تأثیر داشته باشند. بیشتر فرآورده‌های پروبیوتیک لبنی و سایر محصولات در بسته‌های پلاستیکی با نفوذپذیری بالا نسبت به اکسیژن نگهداری و در بازار عرضه می‌شوند. استفاده از فیلم‌های پلاستیکی با خاصیت ممانعت‌کنندگی در برابر اکسیژن و بسته‌های فعال با جذب اکسیژن در بسیاری از مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است [۳۲]. نفوذپذیری مواد پلیمری با افزایش میزان بلورینگی مواد کاهش می‌یابد. نفوذپذیری بسیار کم بسته‌های شیشه‌ای نسبت به اکسیژن، منجر به بهبود زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها می‌شود. با این حال، با توجه به هزینه بالای تهیه ظروف شیشه‌ای و خطرات مربوط به شکستن آن، تولیدکنندگان ترجیح می‌دهند که محصولات پروبیوتیک را در بسته‌های پلاستیکی به فروش برسانند. در این زمینه، روش‌های جایگزین در بسته‌بندی فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک مانند بسته‌بندی تحت خلأ، اضافه کردن ترکیبات جاذب اکسیژن، بسته‌بندی‌های فعال دارای مواد ممانعت کننده در برابر اکسیژن باید مورد توجه ویژه قرار گیرد [۸].

۴. راه کاری جهت افزایش پایداری پروبیوتیک‌ها و تولید فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک جدید

امروزه تلاش‌های بسیاری جهت ارائه فناوری‌های کارآمد جهت مقابله با موانع مذکور در بخش قبل و افزایش حداکثر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در طی تولید، انبارداری، توزیع در بازار و حتی در زمان مصرف و مواجهه با اسیدها و نمک‌های صفراوی سیستم گوارش صورت گرفته است و تا کنون ریزپوشانی باکتری‌های پروبیوتیک توسط پلیمرهای طبیعی رایج‌ترین فناوری برای افزایش زنده‌مانی و حفظ فعالیت فیزیولوژیک این میکروارگانیسم‌ها در سیستم‌های غذایی می‌باشد [۳۳-۳۴]. به دام انداختن باکتری‌های پروبیوتیک در بستر پلیمری فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی رویکرد نوینی است که اخیراً جهت افزایش زنده‌مانی این میکروارگانیسم‌ها و تولید فرآورده‌های جدید پروبیوتیک در صنعت غذا مطرح شده است. افزودن پروبیوتیک‌ها به پوشش‌های خوراکی برای اولین بار در سال ۲۰۰۷ توسط تاپیا و همکاران پیشنهاد شد؛ اما تحقیق و توسعه در زمینه فیلم‌ها و پوشش‌های حاوی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک تا به امروز ادامه دارد. در تعدادی از مطالعات از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به عنوان جایگزین قابل قبولی برای انتقال پروبیوتیک یاد شده است. باید توجه داشت که بسته حاوی پروبیوتیک علاوه بر اینکه کیفیت و ماندگاری غذا را افزایش دهد، می‌تواند به سلامت مصرف‌کنندگان کمک نماید.

۱.۴. فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی

فیلم‌های خوراکی، پوششی یکنواخت و یکپارچه از بیوپلیمرهای طبیعی با ضخامت کمتر از ۲۵۰μm هستند که معمولاً بر روی یا بین اجزای غذایی یا سطح داخلی

1. L. casei
2. L. rhamnosus
3. L. paracasei

بسته‌بندی قرار می‌گیرند و نمی‌توانند به طور کامل جایگزین بسته‌های غیرقابل خوراکی قدیمی شوند. از مزایای این گونه پوشش‌ها می‌توان به زیست تخریب‌پذیری و زیست سازگار بودنشان برخلاف فیلم‌های سنتزی، اشاره نمود [۳۵]. فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی در کاهش میزان انتقال رطوبت و گازها بین موادغذایی و محیط اطراف آن، کاهش آلودگی میکروبی، حفظ عطر و رایحه ماده غذایی، حفاظت فیزیکی و افزایش زمان ماندگاری فرآورده‌های غذایی نقش مؤثری دارند. همچنین به کار گیری پوشش‌خوراکی در سطح موادغذایی، می‌تواند در طی سرخ کردن به طور چشمگیری جذب بیش از حد روغن به بافت و یا خروج بیش از حد آب میان بافتی از غذا را کاهش دهد [۳۶].

علاوه بر عملکرد محافظتی، فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی می‌توانند نقش فعال یا زیست فعال نیز داشته باشند. بسته‌بندی‌های فعال حاوی ترکیبات ضدمیکروبی مختلف مانند اسیدهای آلی، باکتریوسین‌ها و اسانس‌های گیاهی هستند که به مرور در طی مدت زمان نگهداری ماده غذایی در سطح آن انتشار می‌یابند و در پاسخ به تقاضای مصرف‌کنندگان برای غذای ایمن‌تر با فرآوری کمتر و ماندگاری بیشتر توسعه یافته است [۳۷]. از سوی دیگر، سیستم‌های بسته‌بندی زیست فعال به بسته‌هایی گفته می‌شود که حاوی ترکیبات زیستی از جمله ویتامین‌ها، پپتیدها، آنتی‌اکسیدان‌ها، آنزیم‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها است که معمولاً نیازی به انتشار آنها در سطح موادغذایی نیست زیرا پس از قرار گیری در سطح ماده غذایی همراه آن مصرف می‌شوند و می‌تواند به ارتقاء سلامت مصرف‌کنندگان کمک شایانی نمایند. جهت کارایی بهتر بسته بندی‌های زیست فعال در طول زمان، باید توجه شود که مواد مورد استفاده جهت این نوع بسته‌بندی به خوبی از عوامل زیست فعال محافظت کنند. درسال‌های اخیر این نوع از بسته‌بندی رویکردی جدید جهت توسعه غذاهای فراسودمند به شمار می‌رود [۳۸].

به طور کلی اجزای اصلی فیلم‌های خوراکی را می‌توان به سه بخش شامل حلال، پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا و نرم‌کننده تقسیم کرد. کلیه مواد باید ضمن این که GRAS هستند در حلال محلول بوده و نیز با آن قابل امتزاج باشند.

تولید فیلم‌های خوراکی مستلزم وجود دست کم یک ترکیب پلیمری است که قادر به ایجاد ساختار با پیوستگی و استحکام کافی باشد. پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و لیپیدها از جمله بیوپلیمرهایی هستند که در ساخت فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به کار می‌روند. در جدول (۳) رایج‌ترین مواد مورد استفاده در ساخت فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی مشاهده می‌گردد. گزارش‌ها حاکی از نفوذپذیری بسیار کم فیلم‌های خوراکی بر پایه پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها در برابر اکسیژن و اما نفوذپذیری بالا آنها در برابر بخار آب (WVP)[1] است. دانشمندان تلاش‌های بسیاری برای رفع این نواقص انجام داده‌اند. به طور کلی، افزودن لیپیدها استراتژی انتخاب شده برای اکثر محققان جهت کاهش سرعت انتقال بخار آب بود. راه حل دیگر برای کاهش تعامل با مولکول‌های آب، اصلاح ساختار پلیمر از طریق ایجاد پیوندهای جانبی و یا واکنش با یون‌های چند ظرفیتی است [۳۹].

عوامل مختلفی بر کیفیت فیلم نهایی تأثیرگذار هستند که باید در طی تولید فیلم‌های خوراکی مد نظر قرار گیرند. از جمله می‌توان به عواملی نظیر نوع و غلظت پلیمر و افزودنی‌ها، نوع ترکیب فیلم از نظر ساده یا مرکب بودن و مخلوط یا لایه‌ای بودن (به معنی قرارگیری دو یا چند لایه مجزا روی یکدیگر یا مخلوط شدن اجزا)، خواص شیمیایی حلال و هریک از اجزای فیلم‌سازی، حضور الکترولیت‌ها و تکنولوژی تولید فیلم اشاره کرد [۴۰].

۱.۱.۴. فرایند تولید فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی

تشکیل فیلم‌های خوراکی به دو روش اصلی موسوم به فرایند مرطوب و فرایند خشک انجام می‌گیرد. اساس روش مرطوب که به حذف حلال یا کاستینگ نیز معروف است، خشک کردن محلول تشکیل دهنده فیلم بیوپلیمری است. این روش معمول‌ترین روش تولید فیلم‌های بیوپلیمری به خصوص در سطح آزمایشگاه می‌باشد و شامل مراحل حل کردن پلیمرها و مواد افزودنی، کاستینک و خشک کردن می‌باشد.

1. Water vapor permeability

جدول (۳) مواد رایج مورد استفاده در تولید فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی

Table 3. The materials commonly used in the production of edible films and coatings

نرم‌کننده‌ها **Plasticizers**	لیپیدها **Lipids**	پروتئین‌ها **Proteins**	پلی ساکاریدها **Polysaccharides**
گلیسرول Glycerol	موم‌ها (موم زنبور عسل، موم کارنوبا، پارافین، موم کاندلیلا) Waxes (Bees wax, Carnauba wax, Paraffin, Candelilla wax)	کازئین Casein	کاراژینان Carrageenan
پروپیلن گلایکول Propylene glycol	اسیدهای چرب Free fatty acids	پروتئین سویا Soy protein	کربوکسی متیل سلولز Carboxymethyl cellulose
پلی اتیلن گلایکول Polyethylene glycol	رزین‌ها (لاک شیشه‌ای، ترپن) Resins (Shellac resin, Terpene resin)	پروتئین آب پنیر Whey protein	صمغ عربی Gum acacia (Arabic)
تری آستین Triacetin سوربیتول sorbitol	استوگلیسریدها Acetoglycerides	ژلاتین Gelatin	هیدروکسی پروپیل متیل سلولز Hydroxypropyl methylcellulose نشاسته اصلاح شده Modified starches پکتین Pectin پولالان pullulan آلژینات سدیم Sodium alginate صمغ زانتان Xanthan gum پلی اتیلن اکساید Polyethylene oxide پلی ونیل پیرولیدون Polyvinylpyrrolidone

در مرحله اول جهت آماده‌سازی محلول فیلم، پلیمرها باید به درستی در یک حلال مانند آب، الکل، اسید رقیق شده و یا مخلوط آنها حل شده یا پراکنده شوند. در برخی موارد، برای حل کردن ماکرومولکول‌ها، گرم کردن یا تنظیم pH محلول حاوی هیدروکلوئیدها انجام می‌شود [۴۱]. افزودن موادی که دارای خاصیت نرم کنندگی هستند، جهت انعطاف‌پذیری و بهبود خواص مکانیکی فیلم‌ها در مرحله بعدی ضروری است. در واقع نرم کننده‌ها از طریق تضعیف نیروهای بین مولکولی بین زنجیره پلیمری مقاومت مکانیکی را کاهش و نفوذپذیری به گاز و بخار آب را افزایش می‌دهند. نرم‌کننده گلیسرول به دلیل پایداری و سازگاری بهتر با زنجیره‌های آب‌دوست بیوپلیمرها در مقایسه با سوربیتول، پلی اتیلن گلیکول و سایرقندها کاربرد بیشتری در ساخت فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی دارد. پس از پراکنده شدن هیدروکلوئیدها، می‌توان

مواد دیگری مانند ترکیبات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدان‌ها، طعم دهنده‌ها، رنگ‌ها و حتی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک را به محلول تشکیل فیلم اضافه نمود و خاصیت عملکردی مورد نظر را در فیلم یا روکش ایجاد کرد. در طی تهیه محلول‌های امولسیونی فیلم دارای چربی باید دقت شود که دما بالاتر از دمای ذوب چربی باشد و همچنین پایین‌تر از دمای ژلاتینه شدن پلی‌ساکارید یا دناتوره شدن پروتئین و همچنین نقطه فراریت حلال باشد [۴۰،۴۲،۴۳].

در مرحله بعد محلول فیلم‌سازی بر روی یک صفحه صاف و مسطح از جنس تفلون ریخته شده و سپس خشک می‌شود؛ اما پوشش‌های خوراکی با روش‌های غوطه‌وری[1]، افشانی[2] و یا برس زنی[3] در سطح ماده غذایی تشکیل شده و سپس خشک می‌شوند. روش‌های مختلفی مانند خشک کردن با هوای داغ، خشک کردن با سطوح داغ، مادون قرمز و مایکروویو برای خشک کردن فیلم‌ها وجود دارد. در اغلب موارد خشک کردن فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت صورت می‌گیرد؛ اما ممکن است به دلیل سرعت بخشیدن به کار از دماهای بالاتر برای خشک کردن فیلم استفاده شود. استفاده از دماهای بالا به دلیل تبخیر سریع و بیش از اندازه از سطح فیلم و پیدایش نقایصی همچون منافذ ریز، ناهمگنی، کدر شدن و گاه تغییر رنگ فیلم‌ها مطلوب نمی‌باشد. مرحله خشک کردن مرحله‌ای بحرانی در تشکیل شبکه سه بعدی به هم پیوسته از طریق برهم کنش قوی بین پلیمرها و سایر اجزاء تشکیل دهنده جهت تولید فیلم منسجم می‌باشد. ماهیت و نوع برهم کنش‌های شکل گرفته در ساختار فیلم به نوع پلیمر و شرایط تشکیل فیلم مانند دما، زمان و سرعت خشک کردن، محتوای رطوبت، نوع حلال و غلظت نرم‌کننده و pH بستگی دارد [۴۴]. ضخامت فیلم‌های خوراکی برحسب روش خشک کردن و ویسکوزیته محلول فیلم‌سازی می‌تواند متفاوت باشد. فیلم‌های قالب‌ریزی شده به این شکل دارای معایبی هستند از آن جمله می‌توان به دشواری صنعتی شدن در مقیاس کلان و دشواری چسبندگی فیلم بر سطح مواد غذایی به دلیل ماهیت شیمیایی آنها اشاره نمود [۲۴]. با توجه به اینکه فیلم‌های هیدروفیلی چسبندگی ضعیفی بر سطوح هیدروفوبی دارند، برای رفع این مشکل گاه از فعال کننده‌های سطحی در سطح ماده غذایی یا در ترکیب محلول فیلم سازی استفاده می‌شود [۴۵].

در فرایند خشک برای تشکیل فیلم از خواص ترموپلاستیک برخی از بیوپلیمرها مانند نشاسته و پروتئین‌ها استفاده می‌شود. بدین منظور بیوپلیمرها در محتوای رطوبتی کم تا دمای بالاتر از دمای انتقال شیشه‌ای توسط روش اکستروژن یا روش‌های حرارتی- فشاری، حرارت داده می‌شود. حرارت دادن مواد در دماهای بالاتر از دمای انتقال شیشه‌ای باعث تغییر شکل آنها به حالت نرم و لاستیکی شده و امکان فرم‌دهی آن‌ها پیش از سرد شدن را فراهم می‌کند. در این روش انرژی مکانیکی، نیروی برشی، پلاستس سایزر، زمان و دما مهم‌ترین پارامترها در تعیین میزان تغییرات ساختاری و اتصالات عرضی به وجود آمده در حین فرایند می‌باشند. اگرچه روش خشک نیاز به تجهیزات زیادی دارد اما نسبت به روش مرطوب دارای مزایایی است که عبارت‌اند از امکان صنعتی شدن و تولید فیلم‌هایی با درصد حلالیت پایین به دلیل تشکیل شبکه با اتصالات عرضی بسیار زیاد. از این روش برای تولید بسته‌بندی‌های نیمه سخت مانند سینی و فنجان‌ها و غیره استفاده می‌گردد و در تولید فیلم‌های زیست فعال خوراکی به دلیل به کارگیری دماهای بسیار بالا کاربردی ندارد [۴۴].

۵. فیلم‌ها و پوشش‌های پروبیوتیک

معمولاً سیستم‌هایی که برای انتقال پروبیوتیک‌ها به بدن در نظر گرفته شده بیشتر فرآورده‌های دارویی و تا حدودی فرآورده‌های غذایی را شامل می‌شوند [۴۶]. فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی حاوی پروبیوتیک‌ها که در دهان یا معده و روده تجزیه می‌شوند می‌توانند به همراه یک فراورده غذایی به طور منظم مصرف شوند و به عنوان یک حامل پروبیوتیک عمل نمایند. در واقع فیلم‌ها و پوشش‌هایی پروبیوتیک به فیلم‌ها و پوشش‌هایی زیست فعالی اتلاق می‌شود که می‌توانند حامل انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک باشند. پروبیوتیک‌ها در مراحل مختلف تولید فیلم

1. Dipping/immersion
2. Spraying
3. Brushing

مانند تهیه محلول فیلم سازی یا پس از خشک شدن فیلم به صورت پاششی یا غوطه‌وری در سطح به فیلم‌ها اضافه می‌گردند [۵۱].

۱.۵. زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در فیلم‌های خوراکی

نقش اصلی فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی حاوی پروبیوتیک و میزان تأثیرگذاری آن‌ها به عنوان ایجاد کننده اثرات سلامتی بخش، به توانایی آنها در انتقال میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به فرم زنده در دستگاه گوارش بستگی دارد که تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله مواد تشکیل دهنده فیلم، شرایط خشک کردن فیلم، دمای نگهداری فیلم و همچنین نوع سویه پروبیوتیک قرار دارد [۱۸،۴۷]. تاکنون پژوهش‌های مختلفی در مورد پایداری و بقاء پروبیوتیک‌ها در شرایط مختلف تولید و نگهداری فیلم‌های پلیمری به شرح زیر انجام شده است.

- **فیلم‌های پلی ساکاریدی**

کانمانی و لیم (۲۰۱۳) اثر نوع پلیمرهای به کار رفته در ساختار فیلم و دمای نگهداری بر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران از پولالان و نشاسته‌های مختلف (سیب زمینی، تاپیوکا و ذرت) برای تولید فیلم‌های خوراکی حاوی مخلوطی از پروبیوتیک‌ها شامل *لاکتوباسیلوس روتری*[1] و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[2] و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[3] با غلظت اولیه ۱۲ cfu/ml استفاده کردند. فیلم‌های تهیه شده از پولالان و مخلوط‌های مختلف نشاسته و پولالان (۰:۱۰۰،۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰، ۲۵:۷۵، ۱۰۰:۰)، به مدت یک ماه در دمای ۲۵ °C و ۴ نگهداری شدند. بیشترین زنده‌مانی در طی ۳۰ روز نگهداری، در دمای ۴ °C در فیلم پولالان خالص و نشاسته/ پولالان (۷۵:۲۵) گزارش شد. زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در فیلم پولالان خالص پس از ۱۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ °C، حدود ۸۰٪ بود که پس از ۲۰ روز نگهداری به ۳۵٪ کاهش یافت. نتایج نشان داد که با افزایش محتوای نشاسته در فیلم‌ها، زنده‌مانی باکتری‌ها کاهش یافت. دلیل تأثیر منفی افزودن نشاسته در ساختار فیلم بر زنده‌مانی باکتری‌ها مشخص نبود و احتمالاً به ضخامت کمتر و محتوای رطوبت پایین‌تر این فیلم‌ها در مقایسه با فیلم پولالان مربوط می‌شد. علاوه بر این در میان نشاسته‌های مختلف، نشاسته سیب‌زمینی در حفظ زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها بهتر عمل نمود که احتمالاً به محتوای رطوبت بالاتر این فیلم‌ها و همچنین بزرگ‌تر بودن اندازه گرانول‌های نشاسته سیب‌زمینی ارتباط دارد [۱].

رومانو و همکاران (۲۰۱۴)، اثر افزودن فروکتولوگوساکارید به عنوان یک پری‌بیوتیک در فیلم‌های متیل سلولز حاوی دو سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس دلبروگی بولگاریکوس*[4]، *لاکتوباسیلوس پلانتارم*[5] را بررسی نمودند. افزودن فروکتو لوگوساکارید تا غلظت ۳٪ به محلول فیلم‌سازی اثر مثبتی بر حفاظت از باکتری‌های پروبیوتیک در طی فرایند خشک کردن فیلم‌های متیل سلولزی داشت اما افزایش غلظت آن تا ۵٪ تأثیر معناداری بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک نداشت؛ بنابراین غلظت بهینه فروکتولوگوساکارید براساس تعادل بین این اثرات انتخاب شد. اثر محافظتی فروکتولوگوساکارید بر باکتری‌های پروبیوتیک در طی دهیدراسیون فیلم‌ها به برهمکنش آنها با گروه‌های فسفات موجود در غشاء و کاهش نقطه ذوب و حفظ سیالیت آن مربوط می‌باشد. همچنین مقاومت دو سویه پروبیوتیک محصور در ساختار فیلم متفاوت ارزیابی شد و بیشترین زنده‌مانی مربوط به سویه *لاکتوباسیلوس پلانتارم*[6] بود [۴۸].

در پژوهشی دیگر، اینولین، کیتوزان، الیگوساکارید، گالاکتوالیگوساکارید و فروکتوالیگوساکارید به فیلم‌های خوراکی بر پایه نشاسته ذرت به عنوان پری‌بیوتیک اضافه شدند و رشد باکتری‌های پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم اینفنتیس*[7] و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*[8] موجود در ساختار فیلم را بهبود دادند. علاوه بر اثر پری‌بیوتیکی این ترکیبات، ویژگی‌های فیزیکی فیلم‌ها تحت تأثیر قرار گرفت، به طوری که در مقایسه با فیلم‌های کنترل مقاومت کششی کاهش و

1. Lactobacillus reuteri
2. Lactobacillus rhamnosus GG
3. Lactobacillus acidophilus
4. Lactobacillus delbrueckii bulgaricus
5. Lactobacillus plantarum
6. Lactobacillus plantarum
7. Bifidobacterium infantis
8. Lactobacillus fermentum

گسترش‌پذیری افزایش یافت [۴۹].

پیرماریا و همکاران (۲۰۱۵)، سلول‌های باکتری *لاکتو باسیلوس پلانتارم* و مخمر *کلاوروماییسس مارسیانوس*[1] را به فیلم‌های کفیران حاوی نرم‌کننده گلیسرول افزودند. این محققان بیان کردند که خصوصیات فیزیکی و نوری فیلم‌ها پس از افزودن میکروارگانیسم‌ها به محلول فیلم‌سازی تغییر نکرد. به علاوه سلول‌های مخمر نسبت به باکتری در برابر تنش اسمزی ناشی از خشک کردن فیلم از مقاومت بالاتری برخوردار بودند. پس از ۳۵ روز نگهداری فیلم‌ها در دمای ۲۰°C میزان افت جمعیت زنده *لاکتوباسیلوس پلانتارم* حدود ۱/۳ سیکل لگاریتمی و مخمر *کلاوروماییسس مارسیانوس* حدود ۰/۷ سیکل لگاریتمی تخمین زده شد. همچنین مقاومت میکروارگانسیم‌های مذکور پس از قرارگیری در ساختار فیلم کفیران نسبت به فرم آزاد آن‌ها در مواجه با تیمار اسید- نمک صفراوی که شرایط شبیه سازی شده گوارشی بود، به طور قابل توجهی بهبود پیدا کرد [۵۰].

در مطالعه سانگ و همکاران (۲۰۱۹) باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[2] به دو روش به فیلم‌های مرکب کربوکسی متیل سلولز/ هیدروکسی اتیل سلولز و اسید سیتریک اضافه شد. از آنجایی که استفاده مستقیم باکتری پروبیوتیک در محلول فیلم سازی و سپس خشک کردن فیلم به روش حذف حلال استرس‌زا است، بنابراین قرار دادن فیلم‌های خشک شده در سوسپانسیون باکتری پروبیوتیک به روش غوطه‌وری و سپس شست‌وشوی فیلم با آب پس از ۳۰ دقیقه زنده‌مانی باکتری را افزایش داد. علاوه بر این نوع پلیمر به کار رفته در تولید فیلم و همچنین pH محلول در آزادسازی باکتری پروبیوتیک در محلول‌های شبیه سازی شده غذایی مؤثر بود [۵۱].

در مطالعه‌ای دیگر اثر محافظتی فیلم‌های کفیران/ کنستانتره پروتئین آب پنیر بر زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*[3] و مخمر *کلاوروماییسس مارسیانوس*[4] در طی عبور عبور از شرایط شبیه‌سازی شده گوارشی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاکی از عملکرد خوب این فیلم به عنوان حامل پروبیوتیک‌ها بود و تنها ۰/۶ سیکل لگاریتمی کاهش جمعیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در طی ۵۷ روز نگهداری و قرارگیری در شرایط گوارشی مشاهده گردید [۵۲].

شهرام‌پور و همکاران (۲۰۲۰) تأثیر ترکیب نسبت‌های مختلف دو بیوپلیمر آلژینات/ پکتین را بر زنده‌مانی و فعالیت ضدمیکروبی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتارم* در فیلم‌های تولیدی را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که با افزایش نسبت آلژینات به پکتین pH محلول فیلم‌سازی افزایش می‌یابد که در زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک در فیلم‌های خشک شده مؤثر بود به طوری که بیشترین زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتارم* در فیلم یک جزئی آلژینات نسبت به فیلم مرکب آلژینات/ پکتین مشاهده شد. علاوه بر این دمای ۴ °C جهت نگهداری طولانی مدت (۳۰ روز) فیلم‌های پروبیوتیک نسبت به دمای محیط به دلیل کاهش فعالیت متابولیک باکتری مطلوب‌تر تشخیص داده شد. در حالی که فعالیت ضد باکتریایی فیلم‌های پروبیوتیک در محیط کشت مایع در دمای ۲۵ °C نسبت به ۴ °C بیشتر بود [۵۳].

- **فیلم‌های پروتئینی**

سوکولیس و همکاران (۲۰۱۴)، اثر محافظت‌کنندگی چهار نوع پری‌بیوتیک مختلف (اینولین، پلی دکستران، گلیکو الیگو ساکارید و دکستران گندم) در فیلم‌های پروتئینی ژلاتین بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که پری‌بیوتیک‌ها ساختار فیلم را غیریکنواخت کردند و گلیکوالیگوساکارید بهترین اثر محافظت کنندگی را بر باکتری در طول خشک کردن فیلم در ۳۷ °C با حفظ ۶۰٪ سلول‌ها به فرم زنده را داشت. از سویی دیگر، اینولین بیشترین اثر محافظت کنندگی را بر بقاء باکتری پروبیوتیک در طی نگهداری فیلم ژلاتینی داشت. به طوری که کاهش یک سیکل لگاریتمی در جمعیت باکتری پروبیوتیک در فیلم‌های حاوی اینولین پس از ۱۰۰ روز رخ داد، در حالی که در سایر فیلم‌ها این میزان از افت جمعیت پس از ۸۳-۶۳ روز صورت گرفت [۵۴].

در مطالعه‌ای دیگر فیلم‌های خوراکی بر پایه نشاسته (برنج و ذرت) و پروتئین (ژلاتین، کازئینات سدیم و پروتئین سویا)

1. Kluyveromyces marxianus
2. Lactobacillus rhamnosus GG
3. Lactobacillus paracasei
4. Kluyveromyces marxianus

حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در یخچال و دمای اتاق نگهداری شدند. هر دو عامل دما و ترکیب فیلم نقش مهمی در زنده‌مانی باکتری در طول نگهداری فیلم‌ها داشتند. از سویی دیگر میزان افت جمعیت باکتری در فرایند خشک کردن در فیلم‌های پروتئینی کمتر از فیلم‌هایی بر پایه نشاسته بود. در نهایت زمان ماندگاری فیلم‌ها براساس بقاء *L. rhamnosus* GG به میزان ۶ سیکل لگاریتمی، به ترتیب برای دمای ۴ °C و ۲۵ بین ۹۶-۲۷ روز و ۲۴-۱۵ روز تعیین شد [۵۵].

سوکولوس و همکاران (۲۰۱۷)، تأثیر افزودن کنستانتره پروتئین آب پنیر به فیلم‌های آنیونی (ژلاتین، کاراژینان، پکتین و آلژینات) بر زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در دو دمای ۴ °C و ۲۵ را بررسی نمودند. نتایج نشان داد که افزودن کنستانتره پروتئین آب پنیر باعث بهبود زنده‌مانی باکتری در هر دو دما شد و همچنین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی فیلم را تحت تأثیر قرار داد. بیشترین زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به ترتیب در فیلم ژلاتین، کاراژینان، آلژینات و پکتین مشاهده شد. علت مقاومت پایین باکتری پروبیوتیک مذکور در فیلم پکتین، پایین بودن pH محلول فیلم‌سازی آن در مقایسه با سایر پلیمرها بیان گردید [۵۶].

ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۸) زنده‌مانی چهار سویه باکتری پروبیوتیک شامل *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتو باسیلوس کازئی*[1]، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *بیفیدو باکتریوم بیفیدم* پس از قرار گرفتن در ساختار فیلم کربوکسی متیل سلولز را پس از ۴۲ روز نگهداری در دو دمای ۴ °C و ۲۵ را مقایسه کردند. بیشترین میزان بقاء ($۱۰^{۷}$ cfu/g) در طول مدت زمان نگهداری در دمای ۴ °C مربوط به سویه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتو باسیلوس رامنوسوس* بود. علاوه بر این افزودن تمامی سویه‌های پروبیوتیک به محلول فیلم منجر به تغییر خواص فیزیکی و مکانیکی فیلم متیل سلولز گردید، به طوری که نفوذپذیری به بخار آب افزایش، مقاومت در برابر کشش و افزایش طول آن کاهش یافت [۷۰].

براساس نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف نوع پلیمر، نوع نرم‌کننده، نوع سویه پروبیوتیک و دما در طی فرآیند خشک کردن فیلم‌ها و همچنین نگهداری آنها بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌های موجود در فیلم مؤثر بوده است. به طوری که فیلم‌های پروتئینی در مقایسه با فیلم‌های پلی‌ساکاریدی در این زمینه موفق‌تر عمل نمودند. به علاوه افزودن پری‌بیوتیک‌ها در محلول فیلم‌سازی منجر به بهبود زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در برابر تنش خشک کردن فیلم شد. همچنین بهترین دما برای نگهداری فیلم‌های پروبیوتیک دمای ۴ °C بود.

۲.۵. فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها و پوشش‌های پروبیوتیک

در تعدادی از مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر به فعالیت ضدباکتریایی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک محصور در ساختار فیلم‌ها و پوشش‌های پلیمری اشاره شده است. برای مثال، گیلاماس و همکاران (۲۰۱۰)، در پژوهشی به ارزیابی فعالیت ضد لیستریایی فیلم‌های کازئینات سدیم حاوی *لاکتوباسیلوس ساکئی*[2] در سطح محیط کشت (TSA) و ماده غذایی مدل (گوشت گاو تازه) پرداختند. آن‌ها سلول‌های باکتری را به دو روش افزودن مستقیم به محلول فیلم‌سازی و یا اسپری کردن در سطح فیلم خشک شده به ماتریس کازئینات اضافه نمودند. پس از ۱۲ روز نگهداری محیط کشت TSA کاهش جمعیت باکتری بیماری‌زای *لیستریا مونوسیتوژنز*[3] به میزان ۳ و ۳/۶ سیکل لگاریتمی به ترتیب در فیلم‌های حاوی باکتری پروبیوتیک به روش آمیخته و اسپری شده مشاهده شد. در مورد نمونه‌های گوشت گاو بسته‌بندی شده دارای پوشش فیلم پروبیوتیک نیز میزان افت جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* در مقایسه با نمونه کنترل فاقد پوشش فیلم ۲ سیکل لگاریتمی محاسبه شد، در حالی که جمعیت باکتری *L. sakei* در طی ۲۱ روز در دمای ۴ °C بیش از $۱۰^{۶}$ cfu/g بود [۵۷].

کونچه مایر و همکاران (۲۰۱۰) نیز اثر ضدمیکروبی فیلم‌های مرکب آلژینات و نشاسته حاوی دو باکتری

1. L. casei

2. Lactobacillus sakei
3. Listeria monocytogenes

اسیدلاکتیک و باکتریوسین نایزین را در سطح محیط کشت و تکه‌های ماهی آلوده شده با باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (10^4cfu/g) بررسی نمودند. آن‌ها بیان داشتند که جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* در سطح ماهی‌های پوشیده شده با این فیلم‌ها پس از ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ °C بر خلاف هریک از فیلم‌های حاوی نایزین یا یک سویه از باکتری اسیدلاکتیک به طور معناداری کاهش یافت که نشان از اثر هم‌افزایی آن‌ها داشت و منجر به ۰/۵ log cfu/g کاهش این باکتری بیماری‌زا شد. همچنین بررسی زنده‌مانی باکتری‌های اسیدلاکتیک در فیلم‌های حاوی یا فاقد نایزین در تماس با سطح ماهی نشان داد که جمعیت این باکتری‌ها در طول مدت زمان مطالعه نه تنها کاهش نیافت بلکه ۰/۵ log cfu/g افزایش داشت. این موضوع احتمالاً 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 از ۴ به ۵/۶، می‌باشد [۵۸].

در مطالعه‌ای دیگر توسط دی لاسی و همکاران (۲۰۱۲)، از فیلم‌هایی بر پایه آگار حاوی عصاره چای سبز به همراه دو باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*[1] و *بیفیدو باکتریوم لاکتیس* جهت پوشش‌دهی فیله ماهی‌هایی که قبلاً سطح آن با دو باکتری استرپتوکوکوس پوتریفیکانس[2] و *فوتو باکتریوم فسفریوم*[3] (10^3-10^4 cfu/g) تلقیح شده بود، استفاده نمودند. باکتری‌های پروبیوتیک به سطح ماهی مهاجرت کرده و منجر به تکثیر جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک شدند. فیلم‌های حاوی پروبیوتیک و یا عصاره چای سبز منجر به کاهش شاخص‌های فساد شیمیایی (بازهای فرار کل، تری متیل آمین و تغییرات pH) و کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های تولیدکننده H_2S در مقایسه با ماهی بدون پوشش و یا فاقد عوامل می‌شود. ترکیب پروبیوتیک‌ها با عصاره چای سبز در فیلم‌ها موجب بهبود پایداری شیمیایی و میکروبی در مقایسه با فیلم‌های حاوی پروبیوتیک به تنهایی شد که افزایش طول عمر حداقل یک هفته فیله ماهی را به دنبال داشت. همچنین اثر نوع پلیمر بر توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط پروبیوتیک‌های محصور در ساختار فیلم مورد بررسی قرار گرفت [۵۹].

بیوپلیمرهای مختلف مانند کازئینات سدیم، پروتئین نخود، متیل سلولز و هیدروکسی پروپیل متیل سلولز برای ترکیب با *لاکتوباسیلوس پلانتارم* و تولید فیلم‌های خوراکی پلی‌ساکاریدی یا پروتئینی آزمایش شدند. بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه بیشترین زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتارم* در فیلم‌های پروتئینی و بیشترین قابلیت تولید باکتریوسین و اثر ضدمیکروبی در فیلم‌های پلی ساکاریدی مشاهده شد. علاوه بر این، رشد *لیستریا اینوکوا*[4] در سطح محیط کشت پس از ۸ روز نگهداری در دمای ۴ °C توسط فیلم‌های هیدروکسی پروپیل متیل سلولز و متیل سلولز حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتارم* کاملاً مهار شد [۶۰].

همچنین بیوپلیمرهای سدیم کازئینات و متیل سلولز برای تولید فیلم‌های حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس روتری* استفاده شدند. بقای هر دو باکتری پروبیوتیک و خواص ضد میکروبی آن‌ها در برابر *لیستریا اینوکوا* مورد ارزیابی قرار گرفت. زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در هر دو ماتریس پلیمری نسبت به *لاکتوباسیلوس روتری* بیشتر بود که حساسیت بیشتر *لاکتوباسیلوس روتری* را در برابر استرس‌های موجود نشان داد. بیشترین فعالیت ضد لیستریایی ۳ روز پس از نگهداری در فیلم‌های متیل سلولزی مشاهده شد؛ اما هیچ تفاوت معناداری در میان فیلم‌های مختلف پس از ذخیره سازی طولانی مدت، وجود نداشت و میزان افت جمعیت *لیستریا اینوکوا* در مقایسه با نمونه کنترل پس از ۱۲ روز نگهداری، تقریباً ۱/۵ سیکل لگاریتمی بود [۶۱].

در پژوهشی دیگر باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس*[5] در ساخت فیلم زیست فعال پلی وینیل الکل یک جزئی و مرکب در ترکیب با پروتئین هیدرولیز شده (ژلاتین و کازئین) و عصاره مخمر به کار رفت. بررسی فعالیت ضدمیکروبی این فیلم‌ها در محیط کشت مایع در دمای ۳۷ °C نشان داد که فیلم مرکب پلی وینیل الکل حاوی پروتئین هیدرولیز شده ژلاتین و کازئین بیشترین اثر ضدمیکروبی را داشتند و توانستند تا ۳

1. Lactobacillus paracasei
2. S. Putrefaciens
3. Photobacterium phosphoreum
4. Listeria innocua
5. L. lactis

سیکل لگاریتمی جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* را نسبت به بقیه فیلم‌ها کاهش دهند. وجود ترکیبات پروتئینی به عنوان منبع کربن و نیتروژن برای فعالیت متابولیک باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس* و تولید متابولیت‌هایی مثل اسیدلاکتیک و باکتریوسین مؤثر بود [۶۲].

ما و همکاران (۲۰۱۹) اثر ضدباکتریایی فیلم‌های مرکب کربوکسی متیل سلولز/ آلژینات سدیم، کربوکسی متیل سلولز/ کلاژن و آلژینات سدیم/ کلاژن حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس* را علیه باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* در سطح محیط کشت TSA بررسی نمودند. بیشترین فعالیت ضدباکتری توسط فیلم کربوکسی متیل سلولز/ آلژینات سدیم پس از ۷ روز نگهداری محیط‌های کشت در یخچال حدود ۲/۰۸ سیکل لگاریتمی مشاهده گردید [۶۳].

در مطالعه شهرام پور و همکاران (۲۰۲۰) باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتارم* محصور در فیلم آلژینات نسبت به فیلم پکتین از فعالیت ضدمیکروبی بیشتری در سطح محیط کشت جامد TSA برخوردار بود. به علاوه، فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های پروبیوتیک در محیط کشت مایع علیه باکتری‌های بیماری‌زا *اشرشیا کلای* و *لیستریا مونوسیتوژنز* علاوه بر ترکیب فیلم به دما وابسته بود. بیشترین فعالیت ضد باکتریایی فیلم‌ها در دمای C ° ۲۵ مشاهده گردید [۶۴].

بنابراین با توجه به مطالعات پیشین نوع پلیمر، نوع میکروارگانیسم پروبیوتیک به کار رفته در ساختار فیلم و دما در بروز خواص ضدمیکروبی فیلم‌های پروبیوتیک مؤثر بود. به طور کلی بیشترین قابلیت تولید ترکیبات ضدمیکروبی و انتشار آنها در سطح ماده غذایی یا محیط کشت توسط میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در فیلم‌های پلی‌ساکاریدی به دلیل افزایش تنش‌های وارده به آنها مشاهده شد. همچنین دمای°C ۲۵ در مقایسه با °C ۴ به دلیل افزایش فعالیت متابولیسمی و توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی مانند اسیدهای آلی، آنزیم‌ها و پپتیدهای ضدمیکروبی توسط میکروارگانیسم‌ها در بروز فعالیت ضدمیکروبی پروبیوتیک‌های محصور در ساختار فیلم مؤثرتر بود.

۳.۵. کاربرد فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی پروبیوتیک در مواد غذایی

در گذشته از فرآورده‌های لبنی به عنوان حامل میکرو ارگانیسم‌های پروبیوتیک یاد می‌شد، در حالی که اخیراً پتانسیل سایر فرآورده‌های غذایی مانند گوشت، شکلات و نوشیدنی‌ها در پژوهش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌است. خواص فیزیکی و شیمیایی و همچنین ویژگی‌های عملکردی فرآورده‌های غذایی نقش کلیدی در تضمین زنده ماندن پروبیوتیک‌ها دارد. در این رابطه، رانداهیرا و همکاران (۲۰۱۵)، نشان دادند که ترکیب ماده غذایی می‌تواند بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها مؤثر باشد. ترکیبات اصلی مواد غذایی شامل پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و برهم‌کنش بین آن‌ها مهم‌ترین عوامل مؤثر بر رشد میکروبی پروبیوتیک‌ها به شمار می‌روند [۶۵]؛ بنابراین مواد غذایی به دو روش ۱- استفاده مستقیم پروبیوتیک‌ها در ترکیب ماده غذایی، ۲- استفاده غیرمستقیم پروبیوتیک‌ها در سطح ماده غذایی از طریق ماتریس پلیمری بسته، می‌توانند حامل مناسبی برای پروبیوتیک‌ها باشند. در مورد اخیر، توسعه مواد مورد استفاده در بسته خوراکی که شرایط مناسبی برای زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها فراهم آورند، مد نظر قرار گرفته است. علاوه بر این، مدت ماندگاری مواد غذایی به نگهدارنده‌های شیمیایی و شیوه تولید وابسته است. بسته‌های فعال حاوی ترکیبات طبیعی، پتانسیل جایگزینی برای نگهدارنده‌های شیمیایی جهت نگهداری موادغذایی را دارند. در بسیاری از مطالعات انجام شده به توانایی فیلم‌ها و پوشش‌های پروبیوتیک در افزایش زمان ماندگاری برخی از مواد غذایی از جمله گوشت، میوه و نان پرداخته شده است.

تاپیا و همکاران (۲۰۰۷) برای اولین بار از پوشش‌های آلژینات و ژلان حاوی آنتی‌اکسیدان و روغن آفتابگردان و باکتری *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* برای پوشش دهی تکه‌های سیب و انبه استفاده نمودند. نتایج نشان داد که پس از ۱۰ روز نگهداری میوه‌ها در °C ۲ جمعیت باکتری در سیب و انبه پوشش‌دهی شده تقریباً ثابت ماند و این میزان بیش از $۱۰^{۶}$ cfu/gr تخمین زده شد. همچنین میزان کاهش جمعیت باکتری در طی نگهداری در میوه سیب به دلیل ماهیت اسیدی‌اش بیشتر از میوه انبه گزارش شد [۶۶].

در مطالعه‌ای دیگر گیلاماس و همکاران (۲۰۱۰) باهدف کاهش جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* در سطح گوشت گاو از فیلم

سدیم کازئینات حاوی *لاکتوباسیلوس ساکئی* استفاده نمودند. جمعیت باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی* پس از ۲۱ روز نگهداری از ۶ سیکل لگاریتمی به ۷ سیکل لگاریتمی در هر سانتی‌متر مربع در گوشت پوشش‌دار در دمای ۴ °C افزایش یافت که احتمالاً به دلیل انتشار ترکیبات مغذی از سطح گوشت به ساختار فیلم بود [۵۷].

آلتامیرانو و همکاران (۲۰۱۲) از محلول نشاسته حاوی باکتری کپسوله شده *لاکتوباسلوس اسیدوفیلوس* به عنوان پوشش نان استفاده کردند. پوشش مذکور قبل از پخت نان به روش اسپری کردن روی خمیر نان به صورت تک لایه و چند لایه قرار گرفت. نتایج نشان داد که زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* پس از پخت نان و در طی ۲۴ ساعت نگهداری آن در دمای محیط در تمام تیمارها حدود ۳ سیکل لگاریتمی کاهش یافت که نشان از ناکارامدی پوشش نشاسته در حفاظت از باکتری پروبیوتیک داشت. از سویی دیگر این نوع پوشش دهی بر خواص فیزیکی نان تأثیر مثبت داشت و باعث افزایش فعالیت آبی و نرمی بافت نان گردید [۷۱].

پوشش‌های آلژینات و آلژینات/ کنستانتره پروتئین آب پنیر (WPC) حاوی*لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG رای پوشش دهی نان توسط سوکولوس و همکاران (۲۰۱۴) استفاده شد. خشک کردن با هوای داغ در دمای ۶۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۱۸۰ °C به مدت ۲ دقیقه انجام گرفت. زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک پس از خشک شدن به نوع ماتریس پلیمری وابسته بود در حالی که شرایط خشک کردن تأثیر معناداری بر آن نداشت و افزودن کنستانتره پروتئین آب پنیر باعث بهبود زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG شد. همچنین میزان افت جمعیت در شرایط گوارشی در مورد پوشش آلژینات ۰/۷ سیکل لگاریتمی و در پوشش آلژینات/ کنستانتره پروتئین آب بین ۱/۶-۱/۵ سیکل لگاریتمی بود. این نتایج نشان از اثر محافظت کنندگی بیشتر پوشش آلژینات بر بقاء *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG در شرایط گوارشی بود. به علاوه میزان مصرف نان پروبیوتیک جهت انتقال کافی سلول پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG به روده، ۴۰-۳۰ گرم تخمین زده شد [۶۷].

تاورا کروز و همکاران (۲۰۱۵) کاهش ۱/۵ سیکل لگاریتمی جمعیت باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتارم* 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. این محققان شرایط خشک کردن سیب را در زنده‌مانی باکتری پروبیوتیک و حفظ جمعیت آن به میزان کافی در طی دوره نگهداری مؤثر دانستند و دمای ۵۰ °C و زمان ۹۰ دقیقه را نسبت به ۱۴۰ °C و زمان ۳ دقیقه برای خشک کردن سیب‌های پوشش‌دهی شده مناسب‌تر تشخیص دادند. نکته قابل توجه این است که در هر حال، سیستم حمل کننده پروبیوتیک‌ها باید قابلیت محافظت از سلول‌ها در برابر عوامل خارجی مانند شرایط گوارشی معده و روده را داشته باشد [۶۸].

نتایج پوشش‌دهی ورقه‌های کالباس با فیلم‌های آلژینات حاوی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتارم* (10^{8} cfu/ g) در طی یک ماه نگهداری معمول آن‌ها در یخچال نشان داد که جمعیت باکتری پروبیوتیک ۲/۲۳ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. این در حالی بود که پس از ۳ هفته جمعیت باکتری پروبیوتیک در کالباس بیش از 10^{6}CFU/g بود [۶۴].

در مطالعه دیگر شهرام‌پور و همکاران (۲۰۲۰) اثر استفاده از پوشش چندلایه آلژینات کلسیم حاوی باکتری پروبیوتیک بومی *لاکتوباسیلوس پلانتارم* و سوسپانسیون باکتری مذکور در آب مقطر بر برخی ویژگی‌های کیفی میوه توت‌فرنگی پروبیوتیک تولیدی در طی دو هفته نگهداری در دمای یخچال را مورد ارزیابی قرار دادند. استفاده از پوشش چندلایه آلژینات کلسیم حاوی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتارم* ضمن اینکه توانست افت وزن، نرم شدن بافت توت‌فرنگی را به تأخیر بیاندازد، میزان افت جمعیت باکتری پروبیوتیک در طی نگهداری را نیز به مقدار قابل توجهی کاهش داد [۶۹].

جدول (۴) مطالعات مختلف انجام شده در زمینه فیلم‌ها و پوشش‌های پروبیوتیک.

Table 4. Various studies about probiotic films and coatings.

نوع پلیمر Polymer type	سایر مواد افزودنی Other additives	میکروارگانیسم پروبیوتیک Probiotic microorganism	ماده غذایی مورد مطالعه Studied food	منبع reference
آلژینات و ژلان Alginate and gellan	روغن آفتابگردان Sunflower oil	*B. bifidum*	سیب و انبه برش خورده Sliced apples and mangoes	[45]
کازئینات سدیم Sodium caseinate	سوربیتول sorbitol	*L. sakei*	گوشت خام Raw meat	[36]
آلژینات Alginate	نشاسته Starch نایزین Nisin گلیسرول Glycerol	دو گونه باکتری اسیدلاکتیک Two lactic acid bacteria	فیله ماهی سالمون Salmon fillet	[37]
ژلاتین Gelatin	گلوکز Glucose سیستئین Cysteine گلیسرول Glycerol سوربیتول sorbitol	*L. acidophilus* *B. bifidum*	ماهی Fish	[72]
نشاسته Starch	-	*L. acidophilus*	نان Bread	[71]
متیل سلولز (MC) Methylcellulose هیدروکسی پروپیل متیل سلولز (HPMC) Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) پروتئین نخودفرنگی Pea protein کازئینات سدیم Sodium caseinate	گلیسرول Glycerol	*L. plantarum*	-	[39]
نشاسته (کاساوا، ذرت و سیب‌زمینی) Starch (Cassava, corn and potato)	پولالان Pollalan	*L. acidophilus* *L. plantarum* *L. reuteri*	-	[1]
آلژینات سدیم Sodium alginate	کنستانتره پروتئین آب پنیر Whey Protein Concentrate گلیسرول Glycerol	*L. rhamnosus GG*	نان Bread	[46]

ژلاتین Gelatin	پری بیوتیک‌ها (اینولین، پلی‌دکستروز، گلوکزالیگوساکارید و دکسترین گندم) Prebiotics (inulin, poly-dextrose, glucosalicyacaride and wheat dextrin) گلیسرول Glycerol	*L. rhamnosus GG*	-	[33]
متیل سلولز Methylcellulose	فروکتوالیگوساکارید Fructooligosaccharide سوربیتول Sorbitol	*L. bulgaricus* *L. plantarum*	-	[27]
آگار Agar	چای سبز Green tea گلوکز glucose گلیسرول Glycerol	*L. paracasei* *B. lactis*	فیله ماهی Fish fillet	[38]
متیل سلولز Methylcellulose	فروکتوالیگوساکارید Fructooligosaccharide سیتریک اسید Citric acid سوربیتول Sorbitol	*L. plantarum*	ورقه‌های سیب خشک Dried apple slices	[47]
کفیران Kefiran	گلیسرول Glycerol	*L. plantarum* *Kluyveromyces marxianus*	-	[29]
نشاسته (ذرت و برنج) Starch(corn, rice)	پروتئین (ژلاتین، کازئینات سدیم و پروتئین سویا) Protein (gelatin, sodium caseinate and soy protein)	*L. rhamnosus GG*	-	[34]
کاپا-کاراژینان، ژلاتین، آلژینات سدیم با ویسکوزیته بالا و پایین، پکتین Capa-Caraginine, Gelatin, Sodium Alginate with High and Low Viscosity, Pectin	کنسانتره پروتئین آب پنیر Whey Protein Concentrate	*L. rhamnosus GG*	-	[35]
کربوکسی متیل سلولز Carboxymethylcellulose	گلیسرول Glycerol	*L. rhamnosus GG* *L. casei* *L. acidophilus* *B. bifidum*	-	[70]
کربوکسی متیل سلولز (CMC) Carboxymethylcellulose هیدروکسی اتیل سلولز (HEC) Hydroxyethylcellulose	اسید سیتریک Citric acid	*L. rhamnosus GG*	-	[30]

کربوکسی متیل سلولز/ آلژینات سدیم Carboxymethylcellulose / alginate	گلیسرول Glycerol	*L. lactis*	-	[42]
کربوکسی متیل سلولز/ کلاژن Carboxymethylcellulose / collagen				
آلژینات سدیم/ کلاژن Alginate/ collagen				
کفیران/کنستانتره پروتئین آب پنیر Kefiran / whey protein concentrate	گلیسرول Glycerol	*L. paracasei* *Kluyveromyces marxianus*	-	[31]
آلژینات/ پکتین Alginate/ pectin	گلیسرول یا سوربیتول Glycerol or sorbitol	*L. plantarum*	-	[32]
آلژینات Alginate	سوربیتول sorbitol کلرید کلسیم Calcium chloride	*L. plantarum*	توت‌فرنگی Strawberry	[48]

۶. قوانین مربوط به بسته‌بندی‌های فعال

پیش از تولید تجاری یک فراورده غذایی محافظت شده با فیلم یا پوشش خوراکی، شرکت تولید کننده باید وضعیت نظارتی و قوانین موجود در این رابطه را مد نظر قرار دهد. اولین نکته توجه به خوراکی بودن تمام اجزای تشکیل دهنده فیلم‌ها و پوشش‌ها و همچنین ایمن بودن آن‌هاست و از سوی دیگر رعایت کلیه اصول بهداشتی در به کارگیری تجهیزات در طی مراحل فرایند تولید می‌باشد. فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی و ترکیبات آن‌ها به عنوان افزودنی غذایی و یا حتی بسته‌بندی فعال غذا باید بر روی برچسب فراورده ذکر شوند. مسئله مهم دیگر امکان حضور ترکیبات آلرژن در فیلم‌ها و پوشش‌هاست، مانند پروتئین‌های شیر (کازئین و آب پنیر)، پروتئین گندم (گلوتن)، پروتئین سویا، بنابراین حضور آن‌ها در فراورده غذایی باید عنوان گردد. فیلم‌ها و پوشش‌های زیست فعال بیشتر از پلیمرهای طبیعی زیست تخریب پذیر و زیست سازگار با طبیعت تهیه می‌گردند که منجر به کاهش مواد سمی زیست محیطی که در صنعت بسته‌بندی به کار می‌رود، می‌شوند. هنگامی که فیلم‌ها و پوشش‌ها حاوی پروبیوتیک‌ها هستند، موضوعات بیشتری در رابطه با قوانین بسته‌بندی فعال مطرح می‌شود. در اتحادیه اروپا، هیچ چهارچوب قانونی برای تعیین باکتری‌های پروبیوتیک یا طبقه‌بندی مواد غذایی پروبیوتیک وجود ندارد. حتی اگر بسیاری از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به عنوان اجزای غذایی ایمن مورد استفاده قرار گیرند و ایمنی آن‌ها مورد بحث نباشد، طبق آیین نامه شماره ۱۹۲۴/۲۰۰۶ اخذ نظر مساعد از EFSA برای تعیین مجوز توسط کمیسیون اروپا لازم است. با این حال شرایط در ایالات متحده متفاوت است و قانون استفاده از پروبیوتیک‌ها با توجه به دامنه استفاده آن‌ها به عنوان مکمل دارویی و یا غذایی وضع شده است. در کشور ما ایران نیز استانداری برای شناسایی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک (شماره استاندارد ۱۹۴۵۹) و همچنین معیار انتخاب پروبیوتیک‌ها در محصولات غذایی (شماره استاندارد ۲۲۰۱۵) وضع شده است، بنابراین جهت تولید محصولات جدید پروبیوتیک باید

به آن مراجعه نمود و مقررات و الزامات لازم را رعایت کرد. براساس استاندارد ملی شماره ۱۹۴۵۹، سویه پروبیوتیک باید کاتالاز منفی، فاقد فعالیت همولتیک، مقاوم به اسید، مقاوم به نمک صفراوی، مقاوم به آنزیم‌های گوارشی بوده و پس از تیمار در شرایط شبیه‌سازی شده گوارشی شمارش سلول‌های زنده آن بیشتر از 10^6 cfu/ml باشد. علاوه بر این سویه پروبیوتیک باید توانایی اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده را داشته باشد. همچنین اثرات ضدمیکروبی و کاهش کلسترول آنها باید مورد آزمون قرار گیرد. از معیارهای اساسی جهت انتخاب سویه‌های پروبیوتیک در غذا بر طبق استاندارد ملی شماره ۲۲۰۱۵، شناسایی سویه‌های میکروبی در حد جنس، گونه و زیر گونه و همچنین ارزیابی توانایی سویه پروبیوتیک در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی می‌باشد.

۷. پیش‌بینی کاربردهای آتی فیلم‌ها و پوشش‌های پروبیوتیک

به کارگیری پروبیوتیک‌ها در فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی فناوری نو ظهوری است که اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است و تحقیقات در این زمینه همچنان ادامه دارد. به‌کارگیری فیلم‌ها و پوشش‌های پروبیوتیک در آینده نزدیک در سطح مواد غذایی به عوامل مختلفی بستگی دارد. از جمله رعایت چهار چوب قوانین مربوط به غذاهای پروبیوتیک که باید تولیدکنندگان را برای تولید فراورده غذایی سالم ترغیب نماید. مطالعات آتی باید جنبه‌های جدید فناوری فیلم‌های خوراکی پروبیوتیک را مدنظر قرار دهند به عنوان مثال ارزیابی پتانسیل پلیمرهایی که در پژوهش‌های پیشین مورد استفاده قرار نگرفته‌اند (مانند پروتئین زئین، صمغ‌های گیاهان بومی، موم زنبورعسل و ...)، ارزیابی قابلیت‌های سایر میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک جهت استفاده در فیلم و پوشش، ارزیابی مطلوب بودن انواع فیلم‌های پلیمری در هنگام به‌کارگیری در مواد غذایی مختلف و رسانش تعداد کافی پروبیوتیک‌ها به سیستم گوارش. علاوه بر این ترکیب پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها در فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی موضوع جالبی است که مطالعات محدودی در این زمینه ارائه شده است. از سویی دیگر، مطالعات درون تنی جهت ارزیابی میزان زنده‌مانی و همچنین رهایش پروبیوتیک‌ها در شرایط مختلف گوارشی و توانایی اتصال آن‌ها به سلول‌های اپیتلیال روده باید انجام گیرد تا مزایایی سلامتی بخش این میکروارگانیسم‌ها پس از قرار گیری در ساختار فیلم‌ها و پوشش‌ها مشخص گردد.

منابع

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

[2] 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 Res Int., 90*, 42-52.

[3] Rößle, C., Auty, M. A., Brunton, N., Gormley, R. T., & Butler, F. (2010). Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. *Innov Food Sci & Emerg Technol., 11(1)*, 203-209.

[4] Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Curr Opin Biotechnol., 21(2)*, 175-181.

[5] Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Control Release., 162(1)*, 56-67.

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

[7] FAO/WHO, (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada.

[8] Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J functl foods., 9*, 225-241.

[9] Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol., 100*, 1171–1185.

[10] Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res Int., 36(9-10)*, 895-904.

[11] Tamime, A. Y., Saarela, M. A. K. S., Sondergaard, A. K., Mistry, V. V., & Shah, N. P. (2005). Production

and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. *Probiotic Dairy Prod., 1*, 39-63.
[12] Talwalkar, A., Miller, C. W., Kailasapathy, K., & Nguyen, M. H. (2004). Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *Int J Food Sci Technol., 39(6)*, 605-611.
[13] Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *J Appl Microbiol., 98(6)*, 1410-1417.
[14] Shah, N. P. (2006). Manufacturing yogurt and fermented milks. In: Chandan, R.c., white, H. C., Kilara, A., and Hui, Y.H. *Health benefits of yogurt and fermented milks* (2nd ed.,). Blackwell Publishing. pp. 327-340.
[15] Sveje, M. (2007). Probiotic and prebiotics–improving consumer health through food consumption. *Nutracoss.*, 28-31.
[16] Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Saad, S. M. I., Bolini, H. M. A., Sant'Ana, A. S., & Cristianini, M. (2010). High pressure processing and pulsed electric fields: Potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends Food Sci Technol., 21*, 483–493.
[17] Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J., 12(2-3)*, 173-182.
[18] Vinderola, C. G., Costa, G. A., Regenhardt, S., & Reinheimer, J. A. (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *Int Dairy J., 12(7)*, 579-589.
[19] Mortazavian, A. M., Khosrokhavar, R., Rastegar, H., & Mortazaei, G. R. (2010). Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of freshly made probiotic Doogh (Iranian fermented milk drink). *Italian J Food Sci., 22(1)*, 98-102.
[20] Nobakhti, A. R., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., & Mortazavian, A. M. (2009). Influence of lactulose and Hi-maize addition on viability of probiotic microorganisms in freshly made synbiotic fermented milk drink. *Milchwissenschaft., 64(2)*, 191-193.
[21] Lee, Y. K., & Salminen, S. (2009). Handbook of probiotics and prebiotics (2nd ed.). Hoboken, NJ: JohnWiley and Sons, Inc.
[22] Gaudreau, H., Champagne, C. P., Remondetto, G. E., Bazinet, L., & Subirade, M. (2013). Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria. *Food res int., 53(2)*, 751-757.
[23] Zayed, G., & Roos, Y. H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of Lactobacillus salivarius subjected to freeze drying and storage. *Process Biochem., 39*, 1081–1086.
[24] Weinbreck, F., Bodnár, I., & Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products?. *Int J food microbial., 136(3)*, 364-367.
[25] Korbekandi, H., Mortazavian, A. M., & Iravani, S. (2011). Technology and stability of probiotic in fermented milks. In: Shah, N.P., da Cruz, A.G., de Assis Fonseca Faria, J (Eds). *Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to the human health*. (1st.,). New York: Nova Science Publishers, pp. 131-167
[26] Bruno, F. A., & Shah, N. P. (2003). Viability of Two Freeze-dried Strains of Bifidobacterium and of Commercial Preparations at Various Temperatures During Prolonged Storage. *J food sci.*, 68(7), 2336-2339.
[27] Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2005). Intrinsic tolerance of Bifidobacterium species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *J Appl Microbiol., 99(3)*, 493-501.
[28] De Vuyst, L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technol Biotechnol., 38(2)*, 105-112.
[29] Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Inno Food Sci Emerg Technol., 8(2)*, 279-284.
[30] Kołozyn-Krajewskaa, D., & Dolatowski, Z. J. (2012). Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochem., 47*, 1761–1772.
[31] Park, H. K., So, J. S., & Heo, T. R. (1995). Acid adaptation promotes survival of Bifidobacterium breve against environmental stress. *Food Biotechnol., 4*, 226–230.
[32] Cruz, A. G., Faria, J. A. F., & Van Dender, A. G. F. (2007). Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Res Int., 40*, 951–956.
[33] Burgain, J. J., Gaiani, C. C., Linder, M. R., & Scher, J. J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J Food Enginer., 104(4)*, 467–483.
[34] Dianawati, D., Mishra, V., & Shah, N. P. (2015). Survival of microencapsulated probiotic bacteria after processing and during storage: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr., 56(10)*, 1685–1716.
[35] da Cruz, A. G., Faria, J. D. F., & Van Dender, A. G. F. (2007). Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Res Int., 40*, 951–956.
[36] Mortazavian, A. M., Azizi, M. H., & Sohrabvandi, S. (2010). Edible Films: Qualitative Parameters and Production Methods. *JFST., 7(4)*, 107-117. [In Persian]
[37] Ahvenainen, R. (2003). Novel food packaging techniques.. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited, pp. 12-15.

[38] Lopez-Rubio, A., Gavara, R., & Lagaron, J. M. (2006). Bioactive packaging: Turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends Food Sci Technol.*, *17*, 567–575.
[39] Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food biopro tech*., *4(6)*, 849-875.
[40] Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Dalla Rosa, M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends Food Sci Technol.*, *19(12)*, 634-643.
[41] Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D. J., & Gonzalez-Martinez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Crit rev food sci nutria.*, *48(6)*, 496-511.
[42] Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2017). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydro.*, *68*, 136-148.
[43] Embuscado, M. E., & Huber, K. C. (2009). Edible films and coatings for food applications (Vol. 222).. London: Springer, pp. 1-23.
[44] Rhim, J. W. (2007). Potential use of biopolymer-based nanocomposite films in food packaging applications. *Food Sci Biotech.*, *16(5)*, 691-709.
[45] Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O., & Baker, R. A. (1995). Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Crit Rev Food Sci Nutri.*, *35(6)*, 509-524.
[46] da Silva, B. V., Barreira, J. C., & Oliveira, M. B. P. (2016). Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends Food* Sci *Technol.*, *50*, 144-158.
[47] Corona-Hernandez, R. I., Álvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A. R., de la Rosa, L. A., & Wall-Medrano, A. (2013). Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A review. *Compre Rev Food Sci Food Safety.*, *12(6)*, 614–628.
[48] 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 Res Int.*, *64*, 560-566.
[49]Tang, Y., Xie, F., Zhang, D., Zhu, M., Liu, L., Liu, P., & Gu, C. (2015). Physical properties and prebiotic activity of maize starch-based functional films. *Starch – Stärke.*, *67*, 124–131.
[50] Piermaria, J., Diosma, G., Aquino, C., Garrote, G., & Abraham, A. (2015). Edible kefiran films as vehicle for probiotic microorganisms. *Innov Food Sci Emerg Technol.*, *32*, 193–199.
[51] Singh, P., Magalhães, S., Alves, L., Antunes, F., Miguel, M., Lindman, B., & Medronho, B. (2019). Cellulose-based edible films for probiotic entrapment. *Food hydrocoll.*, *88*, 68-74.
[52] Gagliarini, N., Diosma, G., Garrote, G. L., Abraham, A. G., & Piermaria, J. (2019). Whey protein-kefiran films as driver of probiotics to the gut. *LWT.*, *105*, 321-328.
[53] Shahrampour, D., Khomeiri, M., Razavi, S. M. A., & Kashiri, M. (2020). Development and characterization of alginate/pectin edible films containing *Lactobacillus plantarum* KMC 45. *LWT-Food Sci Technol.*, *118*, 108758.
[54] Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C., & Fisk, I. D. (2014). Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. *Food chem.*, *159*, 302-308.
[55] 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 hydrocoll.*, *52*, 876-887.
[56] 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 hydrocoll.*, *70*, 345-355.
[57] 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 Res Int.*, *43(10)*, 2402-2408.
[58] 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*, 485–489.
[59] De Lacey, A. L., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2014). Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life. *LWT-Food Sci Technol.*, *55(2)*, 559-564.
[60] Sánchez-González, L., Saavedra, J. I. Q., & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocoll.*, *33(1)*, 92-98.
[61] Sánchez-González, L., Saavedra, J. I. Q., & Chiralt, A. (2014). Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. *Food Cont.*, *35(1)*, 200-206.
[62] Settier-Ramírez, L., López-Carballo, G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2019). Antilisterial properties of PVOH-based films embedded with *Lactococcus lactis* subsp. Lactis. *Food Hydrocoll.*, *87*, 214-220.
[63] Ma, D., Jiang, Y., Ahmed, S., Qin, W., & Liu, Y. (2019). Physical and antimicrobial properties of edible films containing *Lactococcus lactis*. *Int journal*

biol macro., *141*, 378-386.
[64] Shahrampour, D. (2019). Production of bioactive edible film based on pectin / sodium alginate containing *Lactobacillus plantarum* and evaluation of its viability and antimicrobial properties. PhD thesis. Dept of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. [In Persian]
[65] Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2015). Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus LA-5, Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 and Propionibacterium jensenii by spray drying in goat's milk. *Small Ruminant Res.*, *123(1)*, 155–159.
[66] Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Rodríguez, F. J., Ramírez, J., Carmona, A., & Martin-Belloso, O. (2007). Alginate and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *J Food Sci.*, *72*, 190–196.
[67] Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H. H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocoll.*, *39*, 231-242.
[68] 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*. *J Funct Foods.*, *16*, 164-173.
[69] Shahrampour, D., Khomeiri, M., Kashiri, M., & Razavi, S. M. A. (2020). Evaluation of probiotic bioactive edible coating application on qualitative properties of fresh strawberry. *JIFT.*, In Press. [In Persian]
[70] 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 Sci Technol.*, *87*, 54-60.
[71] Altamirano-Fortoul, R., Moreno-Terrazas, R., Quezada-Gallo, A., & Rosell, C. M. (2012). Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocoll.*, *29(1)*, 166-174.
[72] De Lacey, A. L., López-Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2012). Functionality of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum incorporated to edible coatings and films. *Innov Food Sci Emerg Technol.*, *16*, 277-282.

Review Article

Films and coatings containing probiotic microorganisms: A new approach for production of probiotic products

Dina Shahrampour[1*], Morteza Khomeiri[2]

1. Ph.D graduate of Food Microbiology, Dept of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan
2. Proffessor, Dept of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan

Abstract

Probiotics are live microorganisms that adequate consumption of them leads to health effects in the host. Due to the increase in people's awareness and change in their lifestyle in recent years, the tendency to consume probiotic products has increased around the world. Production of probiotic food products have challenge because of inactivation of significant number of probiotic microorganisms during various food processes, storage or interaction with food ingredients. In addition, the digestion and passage of food through the gastrointestinal tract can affect the survival of probiotics. Therefore, maintaining the live population of probiotic microorganisms sufficiently($>10^6$ CFU /ml or g) until consumption of product should be considered by manufacturers. Incorporation of probiotic microorganisms in the different films and coatings are a new approach that has been proposed in the last decade to develop bioactive films with antimicrobial and health-promoting properties in order to provide new non-dairy probiotic products. The aim of this review study was evaluation of studies of probiotic films and coatings until now to conduct further research based on the available results in future.

Keywords: Probiotic microorganism, Film and Coating, Survival, Food

* Corresponding Author: shahrampour@gau.ac.ir