

### Journal Pre-proofs

Investigation of antimicrobial, antioxidant and physicochemical properties of active film based on whey protein containing pomegranate and red grape anthocyanins and zinc oxide nanoparticles

Ebrahim Taghizadeh <sup>1</sup>, Mohammad Alizadeh <sup>2</sup>, Hamed Hassanzadeh <sup>3\*</sup>

DOI: <https://doi.org/10.22104/IFT.2023.6374.2145>

To appear in: Innovative Food Technologies (IFT)

Received Date: 11 July 2023

Revised Date: 6 August 2023

Accepted Date: 12 August 2023

Please cite this article as: Ebrahim Taghizadeh<sup>1</sup>, Mohammad Alizadeh<sup>2</sup>, Hamed Hassanzadeh<sup>3</sup>, Investigation of antimicrobial, antioxidant and physicochemical properties of active film based on whey protein containing pomegranate and red grape anthocyanins and zinc oxide nanoparticles, *Innovative Food Technologies* (2023), doi: <https://doi.org/10.22104/IFT.2023.6374.2145>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2023 The Author(s). Published by irost.org.



### Investigation of antimicrobial, antioxidant and physicochemical properties of active film based on whey protein containing pomegranate and red grape anthocyanins and zinc oxide nanoparticles

Ebrahim Taghizadeh <sup>1</sup>, Mohammad Alizadeh <sup>2</sup>, Hamed Hassanzadeh <sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Master's degree, Department of Food Industry Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup>Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Health and Food Industry, Faculty of Paraveterinary Medicine, Ilam University, Ilam, Iran

Corresponding authors: [h.hassanzadeh@ilam.ac.ir](mailto:h.hassanzadeh@ilam.ac.ir)

**Introduction:** Active anti-microbial packages, metal nanocomposites are a new generation of packages with nano structure, which are produced by direct combination of metal nanoparticles with base resin. This research was conducted with the aim of investigating the physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of whey protein concentrate smart film containing pomegranate and red grape anthocyanins and zinc oxide nanoparticles.

**Materials and methods:** permeability to water vapor, antioxidant properties, antimicrobial properties by disk diffusion method and differential scanning calorimeter test were performed on the prepared films. Agar diffusion method was used to determine the antimicrobial effects of the film.

**Results and Discussion:** By increasing the percentage of zinc oxide nanoparticles and anthocyanin in the film, the percentage of solids in the film increased. The antioxidant activity of active films increased significantly with the increase of anthocyanin content of the films. The highest antioxidant activity with a significant difference ( $p < 0.05$ ) was attributed to the film sample with 2.6 cc extract. According to the data obtained from the DSC test, with the addition of anthocyanins, the temperature of 290 and the glass transition have changed to some extent, and on the other hand, it can be concluded that the addition of nanoparticles to the film can reduce the glass transition temperature.

**Conclusion:** In general, this study showed that anthocyanins and zinc oxide nanoparticles have the potential to be used to prepare films based on bioactive whey concentrate with improved physicochemical properties and biological properties such as antioxidant properties when used in appropriate concentrations.

**Keywords:** Edible film, Whey protein, Anthocyanin, Nanoparticles, Antioxidant property

بررسی خصوصیات ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و فیزیکوشیمیایی فیلم فعال بر پایه پروتئین آب پنیر حاوی

آنتوسیانین انار و انگور قرمز و نانو ذرات اکسید روی

ابراهیم تقی زاده<sup>1</sup>، محمد علیزاده<sup>2</sup>، حامد حسن زاده<sup>3\*</sup>

۱- کارشناس ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استادیار گروه بهداشت و صنایع غذایی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

\*مسئول مکاتبات: [h.hassanzadeh@ilam.ac.ir](mailto:h.hassanzadeh@ilam.ac.ir)

## چکیده

بسته های فعال ضد میکروب نانو کامپوزیت های فلزی نسل جدیدی از بسته ها با ساختار نانو هستند که از ترکیب مستقیم نانوذرات فلزی با بسپار زمینه ای تولید می شوند. این تحقیق با هدف بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی، آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی فیلم هوشمند کنسانتره پروتئین آب پنیر حاوی آنتوسیانین انار و انگور قرمز نانو ذرات اکسید روی انجام شده است. نفوذپذیری نسبت به بخار آب، خواص آنتی اکسیدانی، خواص ضد میکروبی به روش انتشار دیسک و آزمون گرماسنج روبش افتراقی بر روی فیلم های تهیه شده انجام شده است. برای تعیین اثرات ضد میکروبی فیلم از روش انتشار آگار استفاده شد. با افزایش درصد نانوذرات اکسید روی و آنتوسیانین به فیلم بر درصد مواد جامد فیلم افزوده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم های فعال به طور قابل توجهی با افزایش محتوای آنتوسیانین فیلم ها افزایش یافت. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی با اختلاف معنی داری ( $p < 0.05$ ) به نمونه فیلم با عصاره ۲/۶ میلی لیتر نسبت داده شد. با توجه به داده های بدست آمده از آزمون DSC، با افزودن آنتوسیانین ها، دمای ۲۹۰ و انتقال شیشه ای تا حدودی کاهش داده است. به طور کلی، این مطالعه نشان داد که آنتوسیانین ها و نانوذرات کسید روی پتانسیل استفاده برای تهیه فیلم های بر پایه کنسانتره آب پنیر فعال زیستی با خواص فیزیکوشیمیایی بهبود و خواص بیولوژیکی مانند خاصیت آنتی اکسیدانی را در صورت استفاده در غلظت های مناسب دارند.

**واژه های کلیدی:** فیلم خوراکی، پروتئین آب پنیر، آنتوسیانین، نانوذرات، خاصیت آنتی اکسیدانی

## ۱. مقدمه

فیلم های خوراکی ساختارهایی هستند که به طور مستقل از قبل ساخته شده و سپس روی سطح غذا، بین اجزای غذا قرار می گیرند [۱]. پوششهای خوراکی، به نوبه خود، مستقیماً روی سطح غذا با غوطه ور کردن، اسپری کردن یا پانینگ تشکیل میشوند که دومی با مخلوط کردن مواد غذایی و محلول پوشش در یک کاسه چرخان و خشک کردن به دست می آید [۲].

اگرچه انتظار نمی رود که فیلم ها و پوشش های خوراکی به طور کامل جایگزین مواد بسته بندی معمولی شوند، اما می توان از آنها در کاهش تبادل رطوبت، گازها، لیپیدها و مواد فرار بین غذا و محیط اطراف که به ثبات غذا کمک می کند همچنین جلوگیری از آلودگی سطحی، کمک به بهبود کارایی بسته بندی مواد غذایی و در نتیجه کاهش نیاز به پلیمرهای مشتق شده از نفت استفاده کرد [۳ و ۴].

فیلم ها پوششهای خوراکی باید از ویژگیهای لازم برای بسته بندی ماده غذایی شامل اثر ممانعت کنندگی در برابر نفوذ رطوبت بهبود رنگ، ظاهر خصوصیات مکانیکی مطلوب و غیر سمی بودن برخوردار باشند. این خصوصیات به نوع ماده غذایی مورد استفاده نحوه شکل گیری و موارد کاربرد آنها بستگی دارد [۵]. در هر پوشش بسته بندی دو نوع نیرو وجود دارد. اولی نیروهای بین ملکولی پلیمرهای تشکیل دهنده فیلم (پیوستگی و نیروهای بین فیلم و محصول مورد نظر برای چسبندگی مواد پوشش دهنده) هستند. نوع دوم، میزان پیوستگی روی خصوصیات فیلم مثل مقاومت، انعطاف پذیری و نفوذ پذیری تأثیر می گذارد. نیروی پیوستگی قوی انعطاف پذیری را کاهش می دهد میزان پیوستگی به ساختار و خصوصیات پلیمر سازنده و روش ساخت مانند درجه حرارت، فشار نوع حلال رقیق کننده چگونگی تبخیر حلال و افزودنی ها بستگی دارد. عواملی که حرکت جزئی زنجیره های پلیمری را تحت تأثیر قرار می دهند شامل نیروهای درون زنجیره ای مثل پیوند هیدروژنی، نیروهای واندروالسی و پیوند عرضی هستند لذا فیلم ها و پوشش های خوراکی می توانند به عنوان سدی در مقابل نفوذ رطوبت و اکسیژن به کار روند و همچنین برخی خصوصیات مکانیکی را تقویت نموده و به این ترتیب کیفیت، عمر نگهداری و یکپارچگی ماده غذایی را بهبود بخشد [۶].

استفاده از پلی پیتیدها به عنوان عوامل سازنده فیلم خوراکی شامل کلاژن، ژلاتین، فیرینوزن، گلوتن گندم، پروتئین سویا، زئین ذرت، آلومین تخم مرغ، کازئین و پروتئین آب پنیر بوده است. آن ها ماکرو ملکول هایی با ساختارهای ملکولی و زنجیره های آمینو اسید ویژه هستند. ساختارهای دوم، سوم و چهارم پروتئین ها میتوانند به آسانی توسط واسرشتی حرارتی، فشار، تابش، تیمار مکانیکی، اسیدهای قلیاها، یون های فلزی، نمک ها، آبکافت شیمیایی، تیمار آنزیمی و اتصالات عرضی شیمیایی اصلاح گردند. مشخص ترین خصوصیت پروتئین ها در مقایسه با دیگر مواد تشکیل دهنده فیلم، واسرشتی آرایش فضایی بارهای الکترواستاتیک و ماهیت دوگانه دوست آنها می باشد. عوامل زیادی بر آرایش فضایی پروتئین ها تأثیرگذار هستند که شامل چگالی بار و تعادل آب دوست - آب گریز است و با کنترل این عوامل می توان خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم های تهیه شده را تعیین کرد. فیلم های بر پایه پروتئین به خوبی به سطوح آب دوست می چسبند و سدی در برابر اکسیژن و دی اکسید کربن پدید می آورند هر چند به انتشار آب مقاوم نیستند [۵].

بسته های فعال ضد میکروب نانو کامپوزیتهای فلزی نسل جدیدی از بسته ها با ساختار نانو هستند که از ترکیب مستقیم نانوذرات فلزی با بسپار زمینه ای تولید می شوند [۷]. میکرو و نانو ذرات فلزی به منظور بهبود خصوصیات مکانیکی و ممانعتی و جلوگیری از تخریب نوری پلاستیک ها، به داخل بسپارهای در تماس با فرآورده های غذایی وارد می شوند. عناصر فلزی سنگین به شکل نمک، اکسید، کلئید و ترکیباتی مانند زئولیت نقره با نانو ذرات خواص ضد میکروبی فعالی دارند. آنها با هدف نگهداری مواد غذایی و به منظور ضد عفونی کردن سطوح در محیط های صنعتی مورد استفاده قرار می گیرند و فلزات قابل استفاده در تولید نانو کامپوزیت هایی بر پایه مواد فلزی با بسپارهای آلی یا غیر آلی عبارتند از: نقره، مس، اکسید مس، اکسید تیتانیوم، اکسید روی، پالادیوم، آهن [۸].

فلانوئیدها دسته مهمی از محصولات طبیعی هستند که اهمیت آنها در گیاهان غیر قابل چشم پوشی می باشد. این مواد دارای ساختار پلی- فتولیک میباشند که به طور گسترده در میوه ها و سبزیجات یافت می شوند. این ترکیبات دارای اثرات بیوشیمیایی و

آنتی اکسیدانی مفید در رابطه با بیماریهایی مانند آلزایمر و آترواسکلروزیس می باشند [۹] زیرا علاوه بر داشتن رنگ زیبا و درخشان، شواهد نشان می دهد که فلاوونوئیدها نقش کلیدی در کاهش خطر ابتلا به بیماری دارند [۱۰]. نتایج اخیر نشان می دهد مصرف ترکیبات حاوی آنتوسیانین در سلامتی مصرف کننده مؤثر است [۱۱].

Schmidt و همکاران (۲۰۱۳) از نانوفیبر سلولز باکترایی در ساختار فیلم استات نشاسته استفاده کردند و ویژگی‌های مکانیکی و ممانعتی نانوکامپوزیت ها مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج خواص مکانیکی نشان داد که فیلم های تقویت شده با نانوفیبر سلولز در غلظت های ۰/۰۲۵، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۲۵ گرم بر گرم استات نشاسته، مقاومت کششی ۲، ۳ و ۷ برابر و مدول یانگ ۲، ۳ و ۱۱ برابر بیشتر از نمونه شاهد بود و درصد کشش بطور قابل توجهی کاهش نشان داد. همچنین خاصیت جذب رطوبت نانوکامپوزیت ها کمتر از نمونه شاهد بود [۱۲]. Chen و همکاران (۲۰۲۰)، فیلم های حساس به pH بصری پوشیده شده با کورکومین و آنتوسیانین به عنوان برچسب های نشانگر روی بسته ماهی برای تشخیص تازگی آن فراهم کردند. نتایج آزمون پایداری رنگ نشان داد که فیلم های کامپوزیت ترکیب شده با کورکومین بیشترین پایداری و فیلم های کامپوزیت ترکیب شده با آنتوسیانین کمترین پایداری را در دمای اتاق برای ۱۸۰ روز را داشتند. نتایج نشان داد که فیلم SPVA/glycerol همراه با کورکومین و آنتوسیانین با نسبت ۸:۲ حجمی-حجمی) می تواند سه رنگ مختلف را ارائه دهد که نشانه های تازه، قابل مصرف و غیر قابل مصرف برای بسته بندی ماهی اختصاص داده شده است [۱۳]. هدف این تحقیق بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی، آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی فیلم هوشمند کنسانتره پروتئین آب پنیر حاوی آنتوسیانین انار و انگور قرمز نانو ذرات اکسید روی می باشد تا بتوان از فیلم تهیه شده در تخمین ماندگاری مواد غذایی استفاده کرد.

## ۲. مواد و روش ها

### ۲.۱. مواد

پتاسیم برمید خشک، کلسیم نیترات، متانول، کلسیم سولفات، پتاسیم سولفات، تری کلرواستیک اسید، آمونیوم تیوسینات از شرکت مرک (آلمان) و فنل فتالین از شرکت بایوکم (فرانسه) تهیه شدند.

### ۲.۲. روش تهیه فیلم ها

جهت تهیه فیلم نانو کامپوزیت، ۱۰ گرم پودر کنسانتره پروتئین آب پنیر به ۹۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. در آغاز تولید فیلم قبل از بالا رفتن دمای محلول تولیدی pH را به کمک سود ۱/۰ نرمال روی pH=۸ تنظیم کرده و جهت حل شدن بهتر ایزوله، این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه و با دمای ۸۰ درجه سانتیگراد جهت اطمینان از واسرشتی بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. بعد سرد شدن محلول مرحله بعدی افزودن آنتوسیانین انار و انگور قرمز به صورت جداگانه مطابق طرح آماری به محلول اضافه شد. سپس با استفاده از دستگاه هموژنایزر (۱۲ I9D شرکت هایدولف، آلمان) محلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ هموزن گردید. سپس نانو ذره اکسید روی طبق طرح آماری را به محلول اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی همگن شده و بعد در حمام اولتراسوند جهت پخش شدگی به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. در مرحله بعد افزودن گلیسرول به میزان ۴۰ درصد وزن ماده خشک و به مدت ۱۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی دارای چرخش و بدون حرارت دهی قرار گرفت. محلول شکل گرفته به مدت ۱۰ دقیقه هواگیری و ۲۵ میلی لیتر از آن در مرکز پلیت (۸ سانتیمتر) ریخته شد. سپس فیلم در داخل آون در دمای ۳۸ درجه سلسیوس خشک و فیلم شاهد تولید شد. پس از خشک شدن، فیلم از سطح پلیت جدا و مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳.۲. نفوذپذیری نسبت به بخار آب<sup>۱</sup> (WVP)

برای این کار از ویال های مخصوصی با قطر ۲cm و ارتفاع ۴/۵cm استفاده شد. منفذی به قطر ۵mm قرار در درپوش این ویال ها داشت که قطعه ای از فیلم مورد آزمون در این قسمت قرار گرفت. برای این منظور ابتدا ۳ گرم سولفات کلسیم (رطوبت برابر صفر) در داخل ویال ها قرار داده شد، سپس قطعه ای از فیلم بریده شده و در درپوش ویال قرار گرفت. ویال ها با تمام محتویاتش توزین شده و درون دسیکاتور حاوی محلول اشباع سولفات پتاسیم قرار داده شد. دسیکاتور در دمای ۲۵ درجه قرار داده شد سپس به مدت ۳ روز وزن ویال ها اندازه گیری گردید. مقدار بخار آب انتقال یافته از فیلم ها از روی افزایش وزن ویال ها تعیین شد [۱۴]. منحنی افزایش وزن ویال ها با گذشت زمان رسم شد و پس از محاسبه رگرسیون خطی، شیب خط حاصل محاسبه گردید. از تقسیم کردن شیب خط مربوط به هر ویال به کل سطح فیلم که در معرض انتقال بخار آب قرار داشت، آهنگ انتقال بخار آب<sup>۲</sup> (WVTR) به دست آمد.

$$J = WVTR = \frac{\Delta w}{tA} \quad (1)$$

J: شار بخار آب در عرض فیلم است و آهنگ انتقال بخار آب (WVTR)،  $\Delta w$ : میزان بخار آب عبور کرده از فیلم، t: مدت زمان انتقال بخار آب و A: مساحت سطح فیلم می باشند

$$WVP = \frac{WVTR}{P(R_1 - R_2)} \times X \quad (2)$$

X: ضخامت فیلم (m)، P: فشار بخار آب خالص در ۲۵°C (۳۱۶۹ Pa)،  $R_1$ : رطوبت نسبی در دسیکاتور (۰.۹۷) و

$R_2$ : رطوبت نسبی در داخل ویال (۰) می باشند.

## ۴.۲. فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم

جهت اندازه گیری میزان آنتی اکسیدان فیلم، مقدار ۳۰ میلی گرم از فیلم در آب مقطر و متانول به نسبت ۳:۳ حل شد. پس از حل شدن همه فیلم محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس ۱ میلی لیتر از قسمت رویی محلول سانتریفیوژ شده هر فیلم با ۴ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی لیتر مولار DPPH مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگه داشته شد. جذب آن در ۵۱۷ سپس نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. (Abs) به عنوان شاهد ۱ میلی لیتر از محلول آب

<sup>1</sup> Water vapor permeability

1. Water vapor transmission rate

و متانول (۳ میلی لیتر آب مقطر به علاوه ۳ میلی لیتر (متانول با ۴ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار متانولی DPPH به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد (معادله ۳) [۱۵].

$$I(\%) = \frac{A_{Control} - A_{Sample}}{A_{Control}} \times 100 \quad (۳)$$

در این رابطه  $Ab_{S_{control}}$  میزان جذب محلول متانولی DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر و  $Ab_{S_{sample}}$  میزان جذب عصاره نمونه‌های فیلم می باشد. هر نمونه در سه تکرار انجام شد.

## ۵.۲. خاصیت ضد میکروبی

برای تعیین اثرات ضد میکروبی فیلم از روش انتشار آگار استفاده شد. بدین ترتیب که فیلمها به اندازه دیسک های ۱۵ میلیمتری بریده شده و سپس بر روی پلیت های مولر هینتون آگار حاوی باکتری اشریشیا کلی H7:0157 و باسیلوس سرئوس قرار گرفت. باکتری را قبل از استفاده به طور متوالی دو بار در محیط مولر هینتون براث تجدید کشت نموده و سپس پلیتها با ۱/۰ میلی لیتر از محیط کشت براث (۱۰۵ - ۱۰۶ CFU / mL) حاوی باکتری که شب قبل آماده شده بود، تلقیح شدند و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در هر پلیت نیز نمونه های کنترل حاوی کاغذ واتمن آغشته به آب مقطر استریل قرار داده شد. بعد از این مدت هاله ممانعت از رشد توسط یک کولیس اندازه گیری و مساحت آن بر حسب میلی متر مربع بعد از کسر از مساحت خود فیلم گزارش شد [۱۶].

## ۶.۲. اندازه گیری خواص حرارتی

برای بررسی خواص حرارتی، از گرماسنج روبشی افتراقی (DSC<sup>1</sup>) استفاده شد. برای این منظور نمونه‌هایی از فیلم با وزن تقریبی ۵ میلی گرم با سرعت ۱۰ C/min در گستره دمایی صفر تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد و مجدداً با همان سرعت تا صفر درجه سانتیگراد سرد شد. از روی الگوی گرمایی بدست آمده دمای انتقال شیشه‌ای (Tg) و دمای ذوب، تعیین گردید.

## ۷.۲. طرح آماری

تهیه فیلم مرکب هوشمند کنسانتره پروتئین آب پنیر حاوی آنتوسیانین انار و انگور قرمز و نانو ذرات اکسید روی جهت تشخیص دوره رسیدگی پنیر کوبه که در این بخش دو متغیر درصد آنتوسیانین قرمز و درصد آنتوسیانین انار و درصد نانو ذره اکسید مس مورد بررسی قرار گرفت. که هر کدام در پنج سطح مورد بررسی قرار گرفت و از روش سطح پاسخ (RSM) طرح مرکب مرکزی (از دو طرح مرکب مرکزی درصد آنتوسانتین انگور قرمز و درصد نانو ذرات اکسید روی و طرح مرکب مرکزی درصد آنتوسانتین انار و درصد نانو ذرات اکسید روی) استفاده شد که مجموعاً ۲۴ فیلم مرکب تهیه شده و مورد بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی قرار گرفتند. همچنین بعد از آنالیز داده ها فیلم های بهینه بر اساس بهینه سازی و تابع مطلوبیت توسط نرم افزار آماری ۱۱ Design expert بررسی شد.

## ۳. نتایج و بحث

### ۱.۳. درصد مواد جامد فیلم های تولید شده

<sup>1</sup> - Differential Scanning Calorimetry

پس از آنکه فیلم‌ها در دیسکاتوری حاوی نیتريت کلسیم اشباع رطوبت نسبی ۵۵٪ به تعادل رطوبتی رسیدند، میزان رطوبت آن‌ها تعیین شد که نتایج تجزیه واریانس اثر معنادار فاکتورهای مورد مطالعه (اکسید روی و آنتوسیانین) بر روی رطوبت را نشان دادند ( $P < 0.05$ ). به طوری که با افزایش درصد نانوذرات اکسید روی و آنتوسیانین به فیلم بر درصد مواد جامد فیلم افزوده شده که نتیجه برهمکنش این دو فاکتور در شکل ۱ آورده شده است. دلیل آن را می‌توان به دلیل افزایش ماده جامد در اثر افزایش غلظت آنتوسیانین و درصد اکسید روی در می‌ماتریس فیلم دانست که منجر به تمایل کمتر به انقباض در طول فرآیند خشک کردن فیلم شود. که با نتایج کان و همکاران (۲۰۱۹)، که از عصاره پلی فنول چای و عصاره میوه زالک چینی (*Crataegus pinnatifida*) برای توسعه بسته های فعال جدید بر اساس هیدروژل های آلژینات کلسیم و فیلمهای کیتوزان-ژلاتین استفاده کردند [۱۷].

محل شکل ۱

### ۲.۳. فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم های تولید شده

طبق شکل ۲، فعالیت آنتی اکسیدانی فیلمهای فعال به طور قابل توجهی با افزایش محتوای آنتوسیانین فیلم‌ها افزایش یافت. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی با اختلاف معنی داری ( $p < 0.05$ ) به نمونه فیلم با عصاره ۲/۶ میلی لیتر نسبت داده شد. آنتوسیانین‌ها ترکیبات فنلی با توانایی اهدای یون  $H^+$  و همچنین تبدیل الکترون آزاد هستند که آنها را برای تقویت و بهبود توانایی آنتی اکسیدانی تقویت می‌کند [۱۸]. آنتوسیانین‌ها که فعالیت مهار رادیکال را افزایش میدهند آنتوسیانین‌های موجود و موثر در انار می‌توان به سیانیدین دلفینیدین و پلارگونیدین اشاره کرد [۱۹].

محل شکل ۲

Negro و همکاران (۲۰۰۳) در تحقیقی گزارش کردند که مقدار کل مواد فنلی و کل فلاونوئیدهای موجود در عصاره هسته انگور بیشتر از مقدار به دست آمده از پوست و مارک آن بود. در واقع، غلظت کل فنل در عصاره هسته انگور برابر با ۲,۸۶ گرم در لیتر و مقدار آنها در ۱۰۰ گرم وزن خشک بود. در حالی که مقدار فنل موجود در عصاره های مربوطه به دست آمده از پوست و مارک به ترتیب ۱۱/۱ و ۴۰/۱ گرم در لیتر بود که به ترتیب معادل ۳۳/۳ و ۱۹/۴ گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک بود [۲۰]. علاوه بر این Musso و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که استفاده از عصاره کلم قرمز در محلول تشکیل فیلم برای تهیه فیلم‌های هوشمند مبتنی بر ژلاتین به دلیل آنتوسیانین‌های مختلفی که در عصاره کلم قرمز وجود دارد فعالیت رادیکال ABTS را بهبود می‌بخشد [۲۱]. تحقیقات Zheng و همکاران (۲۰۲۲) نشان داد که اسانس آنوا درمنه حاوی ترکیبات فنلی غنی و مونوترپنوئیدها است و دارای فعالیت آنتی اکسیدانی عالی است [۲۲]. از طرفی همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود نانوذرات اکسید روی تاثیر معناداری بر روی این ویژگی از فیلم ندارند ( $p > 0.05$ ). در تحقیق Zheng و همکاران (۲۰۲۲) نیز فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم خوراکی در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش مهار DPPH و روش کلات کردن FRAP بررسی شده است که نتایج آنان نشان داد توانایی مهار رادیکال به دو روش DPPH<sup>۱</sup> و FRAP<sup>۲</sup> در فیلم‌ها قبل و بعد از ترکیب ZnO به طرز چشمگیری تغییر کرد، که نشان میدهد نانو ZnO هیچ گونه فعالیت آنتی اکسیدانی ارائه نکرده است [۲۲]. Roy و همکاران (۲۰۲۱) دریافته‌اند که وقتی نانوذرات اکسید روی به فیلمهای مبتنی بر نانوالیاف سلولزی اضافه میشود توانایی مهار DPPH فیلم افزایش نمی‌یابد [۲۳]. نتیجه مشابه دیگری نیز توسط Roy و Rhim (۲۰۲۰) به دست آمد آنان گزارش کردند که اگرچه ZnO میتواند فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم‌های بیولوژیکی را تا حدی افزایش

<sup>3</sup> 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

<sup>4</sup> Fluorescence Recovery After Photobleaching



دهد اما به دلیل پراکندگی خوب ZnO در بستر پلیمری و کاهش انتقال اکسیژن و آب و کاهش غیر مستقیم سرعت اکسیداسیون مواد غذایی بود [۲۴].

### ۳.۳. نفوذ پذیری به بخار آب فیلم های تولید شده

نفوذ پذیری به بخار آب یک عامل مهم برای سیستم های بسته بندی مواد غذایی است که توانایی فیلم ها را در محدود کردن انتقال رطوبت بین دو طرف داخلی و خارجی فیلم ها نشان می دهد [۲۵]. نتایج تجزیه واریانس اثر آنتوسیانین و اکسید روی اضافه شده به فیلم ها بر روی میزان نفوذ پذیری به بخار آب نشان داد که اثر عوامل مورد مطالعه در مدل معنادار بوده و میزان و نحوه اثر یا برهمکنش عوامل فوق در شکل ۳ قابل مشاهده می باشد.

محل شکل ۳

شکل ۳ نشانگر این است که در غلظتهای بیشتر آنتوسیانین و درصدهای بالای اکسید روی بر میزان نفوذ پذیری افزوده شده است. بازه بدست آمده در محدوده  $10^{-6} \times 13/74 - 9/89$  گرم بر متر مربع در ساعت در پاسکال می باشد. میزان نفوذ پذیری به بخار آب فیلم های تولید شده با یا بدون افزودن آنتوسیانین مشخص شد. به طور کلی این خاصیت فیلمها با غنی سازی با عصاره آنتوسیانین افزایش یافت. افزایش کلی آن با افزودن عصاره در نمونه های فیلم بیشتر شده که دلیل آن را میتوان به خاصیت آب دوستی آنتوسیانین ها که باعث نفوذ بیشتر بخار آب در سراسر ماتریس فیلم شود [۲۶].

بر اساس مطالعات Bravin و همکاران (۲۰۰۶) ضخامت نیز در میزان نفوذ پذیری به بخار آب تأثیر گذار است بدین ترتیب که با افزایش ضخامت نفوذ ناپذیری فیلم به بخار آب افزایش می یابد [۲۷]. مطالعات قبلی همچنین نتایج مشابهی را برای نفوذپذیری به بخار آب فیلمهای کیتوزان گزارش کردند که تحت تأثیر غنی سازی با عصاره سیب زمینی شیرین [۲۸] و عصاره پوست آلو سیاه [۲۹] قرار گرفت آنها گزارش کردند که افزایش نفوذپذیری به بخار آب ممکن است به دلیل گروه های آبدوست بیشتری باشد که در عصاره ها وجود دارد که بر ویژگی های مانع آب فیلم ها تأثیر می گذارد. از فاکتورهای موثر دیگر میزان رطوبت نسبی محیط است. از آنجائیکه پروتئین ها خاصیت آبدوستی دارند، هرچه رطوبت نسبی محیط بالاتر باشد، میزان تراوایی نسبت به بخار آب افزایش خواهد یافت. در رطوبت های نسبی بسیار بالا بیش از ۸۰ درصد، به علت جذب آب پروتئین ها، شبکه پروتئینی به شکل گسترده ای متورم شده و بنابراین فضای کافی برای عبور مولکول های آب وجود نخواهد داشت و تراوایی فیلم ها کاهش می یابد [۳۰]. نفوذ پذیری فیلمهای خوراکی مربوط به مسیرهای ریز موجود در شبکه میکروساختاری پروتئین فیلم مانند کنسانتره آب پنیر است [۳۱]. بنابراین یک راه دیگر برای کاهش تراوایی فیلم های پروتئینی پر کردن منافذ موجود در شبکه پروتئینی فیلم است نانو ذرات فضاهای خالی بین مولکولی را پر و سبب کاهش نفوذ پذیری نسبت به بخار آب فیلم ها می شوند. De Moura و همکاران (۲۰۱۲) کاهش نفوذ پذیری برای نانو ذرات با اندازه کوچکتر را در رابطه با افزودن نانو ذرات نقره به ماتریس سلولزی گزارش کردند؛ در حالیکه نانو ذرات بزرگ اثر چندانی نداشتند. بعلاوه هر چه مقدار نانو ذرات مورد استفاده کمتر باشد اثر ممانعتی افزایش می یابد. نانو ذرات رس به علت ساختار ورقه ای که دارند سبب بهبود بیشتر خصوصیات مکانیکی و ممانعتی بسپارها در مقایسه با نانوذرات کروی شکل فلزی خواهند شد [۳۲]. Zheng و همکاران (۲۰۰۲) بهبود خصوصیات فیزیکی نانو کامپوزیت تهیه شده از ژلاتین و نانو رس را گزارش کردند [۳۳]. مطالعات دیگر تأثیر مستقیم نانو ذرات غیر آلی بر حفظ خصوصیات کیفی محصول از جمله خواص ظاهری مانند رنگ، بافت، عطر و طعم در بسته های کامپوزیتی را از زمان تولید تا مصرف تصدیق می کنند [۳۴].

تمام این نتایج زمانی بدست می آید که نانو ذرات افزوده شده به بسپار از توزیع یکنواختی برخوردار باشند. Pantani و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند نفوذ پذیری فیلم های پلی لاکتیک اسید حاوی ۱٪ نانو ذرات اکسید روی نسبت به فیلم بدون نانو ذره کاهش یافت این اثر برای فیلم حاوی ۳ نانو ذره چشمگیرتر بود که دلیل آن نفوذ تعداد بیشتری از نانو ذرات به درون فضاهای خالی ماتریس بسپار می باشد. یکی دیگر از فاکتورهای تاثیر گذار بر میزان تراوایی فیلم های بیونانو کامپوزیتی نسبت به بخار آب، دماست؛ هر چه دمای محیط بالاتر باشد میزان تراوایی افزایش می یابد. در تحقیق ایشان میزان تراوایی فیلم ها در دمای ۳۰ درجه ۵/۱ برابر و در دمای ۴۵ درجه ۲ برابر تراوایی در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد است و میزان تراوایی نسبت به رطوبت فیلم های بیونانو کامپوزیتی تهیه شده از ایزوله پروتئینی گاودانه حاوی نانو ذرات نقره و اکسید روی، نسبت به فیلم شاهد کاهش یافت [۳۵].

همانطور که در شکل ۳ مشاهده شد افزودن نانو ذرات اکسید روی توانست میزان تراوایی فیلم ها را تا حدودی افزایش دهند و این موضوع به عنوان یک امتیاز منفی برای این فیلم ها محسوب می شود. اثر بهبود خواص ممانعتی نانو ذرات با افزایش درصد نانو ذرات مورد استفاده در فیلم ها کاهش یافت که علت آن احتمالاً افزایش تجمع نانو ذرات در قسمت هایی از فیلم و تخریب شبکه پروتئینی در آن نواحی می باشد. در تحقیقات اثر نانو ذرات نقره در بهبود خواص ممانعتی فیلمها بیشتر از نانو ذرات اکسید روی است که این موضوع می تواند به دلیل کوچکتر بودن اندازه نانو ذرات نقره مصرفی نسبت به اکسید روی و تمایل کمتر آنها برای چسبیدن به یکدیگر باشد. Li و همکاران (۲۰۱۱) به نتایجی مشابه دست یافتند و گزارش کردند در اثر افزودن مقادیر کمی از نانو ذرات اکسید تیتانیوم در حدود ۱۰٪ به فیلم های تهیه شده از پروتئین آب پنیر برخی خصوصیات کمی بهبود می یابد اما مقادیر بالای این نانو ذره در حدود ۲٪ نیز سبب نزدیک شدن خصوصیات فیلم ها به فیلم شاهد شده بود. بنابراین غلظت ۱٪ از نانو ذرات اکسید تیتانیوم را پیشنهاد کردند. خصوصیات فیلم ها به فیلم شاهد شده بود. بنابراین غلظت ۱٪ از نانو ذرات اکسید تیتانیوم را پیشنهاد کردند که بهترین خصوصیات از جمله بالاترین میزان ممانعت در برابر بخار آب را نشان داده بود [۳۱]. دلیل این موضوع آگلومره شدن و تجمع نانو ذرات اکسید تیتانیوم در غلظتهای بالاتر از ۱٪ در بخش هایی خاص از شبکه پروتئینی و تخریب این شبکه است. Kanmani و همکاران (۲۰۱۴) از افزودن نانو ذرات نقره به فیلم پروتئینی ژلاتین به نتایج مشابهی در خصوص کاهش تراوایی فیلم ها نسبت به رطوبت برای فیلم حاوی نانو ذرات در مقایسه با فیلم شاهد دست یافتند [۳۶].

#### ۴.۳. خاصیت ضد میکروبی

فیلم کنسانتر آب پنیر خالص (الف)، فیلم کنسانتره آب پنیر حاوی نانو ذرات (ب)، فیلم کنسانتر آب پنیر حاوی بهینه آنتوسیانین انار (ج) و فیلم کنسانتره آب پنیر حاوی بهینه آنتوسیانین انگور (د) برای مطالعه فعالیت ضد میکروبی فیلم ها استفاده شده و فعالیت ضد میکروبی این چهار فیلم در برابر باکتری *E. coli* و *S. aureus* مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). نتایج نشان داد که نمونه شاهد مقاومت کمی در برابر این دو باکتری بیماری زا داشت، در حالی که فیلم های حاوی آنتوسیانین و نانوذرات اکسید روی دارای خواص ضد میکروبی بود به طوری که قطر ناحیه بازدارنده رشد به طور قابل توجهی (۲۰-۲۴) میلی متر افزایش یافت.

#### محل شکل ۴

نتایج همچنین نشان داد که حاوی نانوذرات اکسید روی بر روی باکتری های گرم مثبت بیماریزا مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از گرم منفی هایی مثل *اشرشیا کلی* می باشد. در خصوص خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی در فیلم های خوراکی که در سراسر ماتریس فیلم توزیع می شود، کارهای مختلفی انجام شده است. فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی و مکانیسم اثر مهار کنندگی آن در برابر میکروارگانیسم ها می تواند بدین صورت باشد که یون های آن از دیواره سلولی میکروارگانیسم نفوذ

کرده و با اجزای داخلی واکنش داده که در نهایت بر روی زنده مانی سلول ها تأثیر می گذارد. در واقع به عنوان واسطه تولید پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، یک عامل اکسید کننده قوی که باعث آسیب به غشای سلولی باکتری می شود، شناخته شده است. Tayel و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که نانوذرات اکسید روی برای کشتن باکتری های گرم مثبت موثرتر از باکتری های گرم منفی است [۳۷].

### ۳.۵. نتایج DSC

شکل ۵ منحنی های DSC نمونه های فیلم را نشان میدهد مطابق با منحنی های DSC مذکور، پیک گرماگیر فیلم کنسانتره خالص در دمای ۱۸۰/۱ درجه سانتی گراد مشاهده شد (شکل ۵a). دومین و سومین پیک گرماگیر در نمونه شاهد به ترتیب در دمای ۲۷۰ و ۴۷۰ درجه در توان ۱۰ میلی وات بدست آمده است. وجود یک واکنش گرماگیر سبب افزایش توان در المنت حرارتی خواهد شد چراکه به گرمای بیشتری برای پیشبرد واکنش و حفظ دما نیاز می باشد. زمانی که یک واکنش گرماده وجود داشته باشد روندی عکس روند بالا را دیده می شود چون در این خصوص، به توان کمتری از المنت برای تثبیت دما نیاز می باشد.

#### محل شکل ۵

در نمونه فیلم با بیشترین مقدار انار استفاده شده در آن (شکل ۵) پیک گرماگیر در دمای ۱۶۰ درجه دیده می شود و نسبت به نمونه کنترل نزدیک و کمی کمتر است. در نمونه بهینه انار (شکل ۵) با داشتن توان بالا ۲۰ میلی ولت، پیک گرماگیر مشاهده نمی شود و پیک گرمای آن در دمای ۵۲۰ درجه سانتی گراد بدست آمده است. در نهایت نمونه حاوی نانوذرات (شکل ۵) با داشتن مقاومت پایین (۵ میلی ولت) دارای پیک گرماگیر در دمای ۲۳۵ درجه سانتی گراد و پیک گرماگیر ۴۴۰ درجه سانتی گراد میباشد پیک گرماگیر و گرمای بحث شده در این قسمت به ترتیب مربوط به دمای ذوب و دمای انتقال شیشه ای بود از طرفی دمای تخریب حرارتی فیلم نیز در نمودار مشخص است به طوری که دمای تخریب حرارتی برای فیلم های شاهد، بیشترین مقدار انار، بهینه انار و بهینه انگور به ترتیب ۲۸۰، ۲۸۰، ۲۸۰ درجه سانتیگراد بدست آمد. با توجه به دادهای بدست آمده با افزودن آنتوسیانین ها، دمای ۲۹۰ و انتقال شیشه ای تا حدودی تغییر پیدا کرد از طرفی میتوان استنباط کرد که افزودن نانوذرات به فیلم می تواند دمای انتقال شیشه ای را کاهش دهد این افزودن همچنین دمای ذوب و تخریب حرارتی نمونه های فیلم را اندکی کاهش داد که نشان می دهد افزودن نانوذرات به ساختار، فیلم پایداری حرارتی فیلم ها را کاهش می دهد. افزایش پایداری حرارتی نمونه های فیلم نیز برهمکنش کافی بین کنسانتره آب پنیر یا پروتئین، نانوذرات و آنتوسیانین ها را نشان میدهد نتیجه مشابهی توسط Pirsā و همکاران (۲۰۲۰) گزارش شد که در آن پیشنهاد کردند که افزودن متیلن بلو هیچ تأثیری بر دمای انتقال شیشه، ذوب و تخریب حرارتی در فیلم مبتنی بر پکتین ندارد [۳۸]. Shabahang و همکاران (۲۰۲۲) طی بررسی خواص فیزیکیوشیمیایی فیلم کامپوزیت بر اساس پروتئین آب پنیر ایزوله / پکتین / نانوذرات / CuO / رنگدانه بتانین به نتایج مشابهی دست یافتند [۳۹].

### ۴. نتیجه گیری

نتیجه آزمایش های انجام شده بر روی فیلم تولیدی نشان می دهد که افزایش غلظت آنتوسیانین و نانو ذرات اکسید روی باعث افزایش معنادار ضخامت، درصد مواد جامد، میزان نفوذ پذیری به بخار آب، خاصیت آنتی اکسیدانی و کاهش معنادار در میزان حلالیت فیلم های تولیدی گردید. افزودن نانوذرات دمای ذوب و تخریب حرارتی نمونه های فیلم را اندکی کاهش داد که نشان می دهد افزودن نانوذرات به ساختار، فیلم پایداری حرارتی فیلم ها را کاهش می دهد. افزایش پایداری حرارتی نمونه های فیلم نیز برهمکنش

کافی بین کنسانتر آب پنیر یا پروتئین، نانوذرات و آنتوسیانین ها را نشان می دهد. به طور کلی این مطالعه نشان داد که آنتوسیانین ها و نانوذرات کسید روی پتانسیل استفاده برای تهیه فیلم های بر پایه کنسانتره آب پنیر فعال زیستی با خواص فیزیکوشیمیایی بهبود و خواص بیولوژیکی مانند خاصیت آنتی اکسیدانی را در صورت استفاده در غلظت های مناسب دارند.

### تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تعارض منافی برای این مقاله وجود ندارد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله تشکر و قدردانی خود را از همکاری آزمایشگاه های مرکزی و همچنین حمایت معاونت ژوهشی دانشگاه ارومیه اعلام می دارد.

- [1] Umaraw, P., & Verma, A. K. (2017). Comprehensive review on application of edible film on meat and meat products: An eco-friendly approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1270-1279. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.986563>
- [2] Kumar, N. (2019). Polysaccharide-based component and their relevance in edible film/coating: A review. *Nutrition and Food Science*, 49(5), 793-823. <https://doi.org/10.1108/NFS-10-2018-0294>
- [3] Erkan, N., Doğruyol, H., Günlü, A., & Genç, İ. Y. (2015). Use of natural preservatives in seafood: Plant extracts, edible film and coating. *Food and Health*, 1(1), 33-49. <https://doi.org/10.3153/JFHS15004>
- [4] Singh, R. S., & Kaur, N. (2015). Microbial biopolymers for edible film and coating applications. *Advances in Biotechnology*, 12, 187-216.
- [5] Kumari, N., Bangar, S. P., Petru, M., Ilyas, R. A., Singh, A., & Kumar, P. (2021). Development and characterization of fenugreek protein-based edible film. *Foods*, 10(9), 1976. <https://doi.org/10.3390/foods10091976>
- [6] Zhang, P., Zhao, Y., & Shi, Q. (2016). Characterization of a novel edible film based on gum ghatti: Effect of plasticizer type and concentration. *Carbohydrate Polymers*, 153, 345-355. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.082>
- [7] Zare, E. N., Jamaledin, R., Naserzadeh, P., Afjeh-Dana, E., Ashtari, B., Hosseinzadeh, M., ... & Makvandi, P. (2019). Metal-based nanostructures/PLGA nanocomposites: antimicrobial activity, cytotoxicity, and their biomedical applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(3), 3279-3300. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b19435>
- [8] Makvandi, P., Wang, C. Y., Zare, E. N., Borzacchiello, A., Niu, L. N., & Tay, F. R. (2020). Metal-based nanomaterials in biomedical applications: antimicrobial activity and cytotoxicity aspects. *Advanced Functional Materials*, 30(22), 1910021. <https://doi.org/10.1002/adfm.201910021>
- [9] Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- [10] Wang, N., Liu, W., Zhang, T., Jiang, S., Xu, H., Wang, Y., ... & Chen, X. (2018). Transcriptomic analysis of red-fleshed apples reveals the novel role of MdWRKY11 in flavonoid and anthocyanin biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(27), 7076-7086. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01273>
- [11] Díaz-García, M. C., Castellar, M. R., Obón, J. M., Obón, C., Alcaraz, F., & Rivera, D. (2015). Production of an anthocyanin-rich food colourant from *Thymus moroderi* and its application in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(6), 1283-1293. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6821>
- [12] Schmidt, V. C. R., Berti, F., Porto, L. M., & Laurindo, J. B. (2013). Production of starch acetate films with addition of bacterial cellulose nanofibers. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 2251-2256. <https://doi.org/10.3303/CET1332376>
- [13] Chen, H. Z., Zhang, M., Bhandari, B., & Yang, C. H. (2020). Novel pH-sensitive films containing curcumin and anthocyanins to monitor fish freshness. *Food Hydrocolloids*, 100, 105438. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105438>
- [14] Casariego, A. B. W. S., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Díaz, R., & Vicente, A. A. (2009). Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1895-1902. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.007>
- [15] Ekrami, M., Emam-Djomeh, Z., Ghoreishy, S. A., Najari, Z., & Shakoury, N. (2019). Characterization of a high-performance edible film based on Salep mucilage functionalized with pennyroyal (*Mentha*

pulegium). *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 529-537.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.136>

[16] Ramesh, S., & Radhakrishnan, P. (2019). Cellulose nanoparticles from agro-industrial waste for the development of active packaging. *Applied Surface Science*, 484, 1274-1281.

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.04.003>

[17] Kan, J., Liu, J., Yong, H., Liu, Y., Qin, Y., & Liu, J. (2019). Development of active packaging based on chitosan-gelatin blend films functionalized with Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) fruit extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 384-392.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.155>

[18] Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., Show, P. L., & Coioletzi, H. H. (2019). Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 1234-1243. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.196>

[19] Bar-Ya'akov, I., Tian, L., Amir, R., & Holland, D. (2019). Primary metabolites, anthocyanins, and hydrolyzable tannins in the pomegranate fruit. *Frontiers in Plant Science*, 10, 620.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00620>

[20] Negro, C., Tommasi, L., & Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87(1), 41-44. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00202-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00202-X)

[21] Musso, Y. S., Salgado, P. R., & Mauri, A. N. (2019). Smart gelatin films prepared using red cabbage (*Brassica oleracea* L.) extracts as solvent. *Food Hydrocolloids*, 89, 674-681.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.036>

[22] Zheng, K., Zhang, J., Yang, F., Wang, W., Li, W., & Qin, C. (2022). Properties and biological activity of chitosan-coix seed starch films incorporated with nano zinc oxide and *Artemisia annua* essential oil for pork preservation. *LWT*, 164, 113665. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113665>

[23] Roy, S., Kim, H. C., Panicker, P. S., Rhim, J. W., & Kim, J. (2021). Cellulose nanofiber-based nanocomposite films reinforced with zinc oxide nanorods and grapefruit seed extract. *Nanomaterials*, 11(4), 877. <https://doi.org/10.3390/nano11040877>

[24] Roy, S., & Rhim, J. W. (2020). Carboxymethyl cellulose-based antioxidant and antimicrobial active packaging film incorporated with curcumin and zinc oxide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 666-676. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.204>

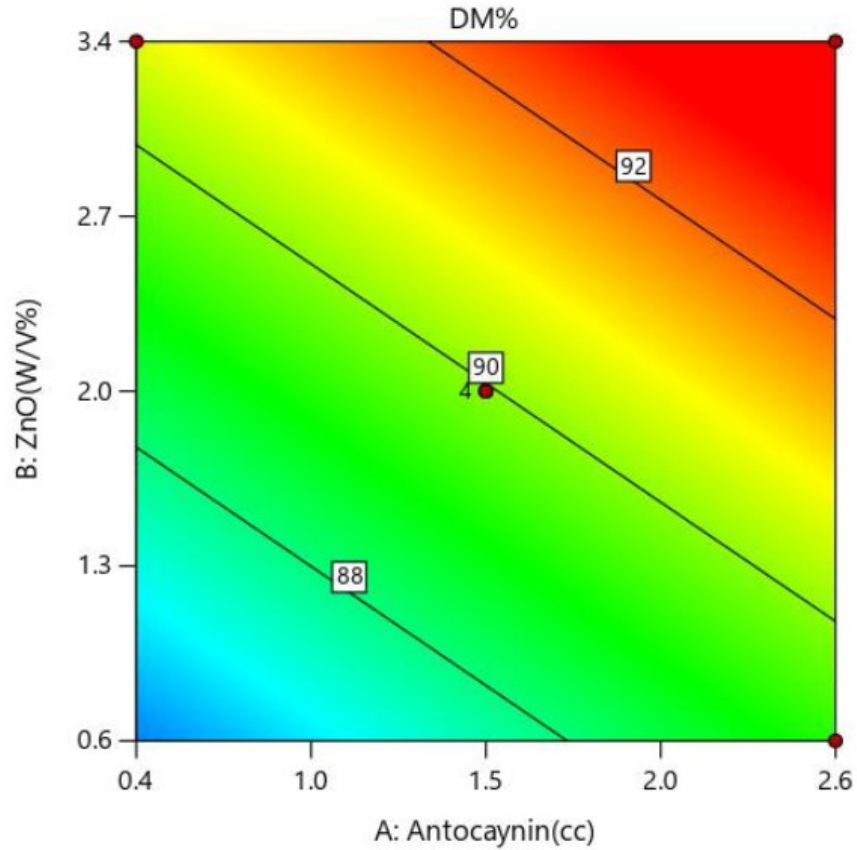
[25] Jancikova, S., Jamróz, E., Kulawik, P., Tkaczewska, J., & Dordevic, D. (2019). Furcellaran/gelatin hydrolysate/rosemary extract composite films as active and intelligent packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.050>

[26] Wang, N., Liu, W., Zhang, T., Jiang, S., Xu, H., Wang, Y., ... & Chen, X. (2018). Transcriptomic analysis of red-fleshed apples reveals the novel role of MdWRKY11 in flavonoid and anthocyanin biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(27), 7076-7086. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01273>

[27] Bravin, B., Peressini, D., & Sensidoni, A. (2006). Development and application of polysaccharide-lipid edible coating to extend shelf-life of dry bakery products. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 280-290. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.021>

[28] Jiang, T., Mao, Y., Sui, L., Yang, N., Li, S., Zhu, Z., ... & He, Y. (2019). Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. *Food Chemistry*, 274, 460-470. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.141>

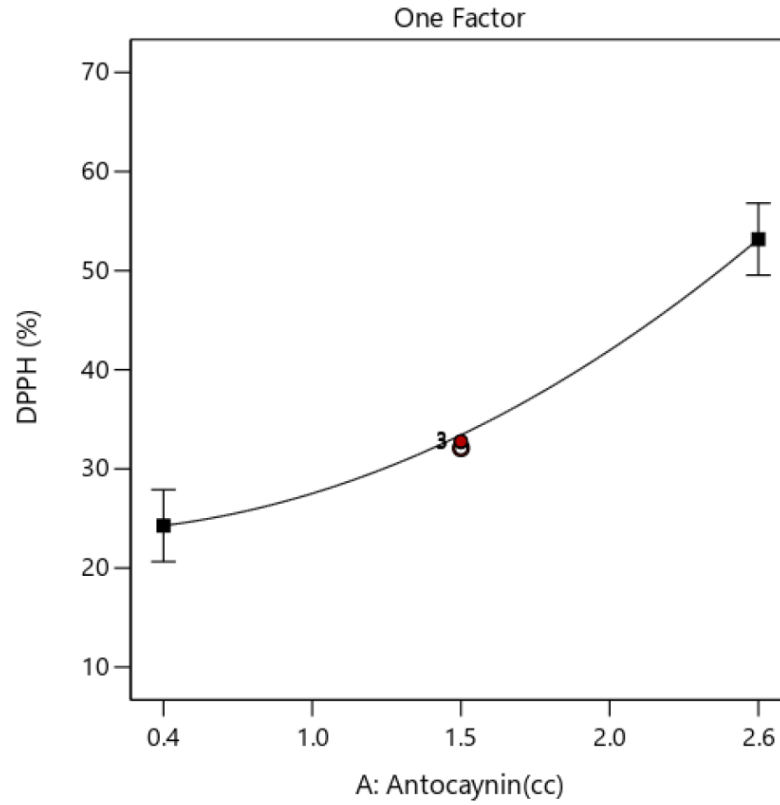
- [29] Zhang, X., Liu, Y., Yong, H., Qin, Y., Liu, J., & Liu, J. (2019). Development of multifunctional food packaging films based on chitosan, TiO<sub>2</sub> nanoparticles and anthocyanin-rich black plum peel extract. *Food Hydrocolloids*, 94, 80-92. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.009>
- [30] Jin, M. (2012). Plant protein-based nanocomposite materials: modification of layered nanoclay by surface coating and enhanced interactions by enzymatic and chemical cross-linking.
- [31] Li, Y., Jiang, Y., Liu, F., Ren, F., Zhao, G., & Leng, X. (2011). Fabrication and characterization of TiO<sub>2</sub>/whey protein isolate nanocomposite film. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1098-1104. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.10.006>
- [32] De Moura, M. R., Mattoso, L. H., & Zucolotto, V. (2012). Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 520-524. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.030>
- [33] Zheng, J. P., Li, P., Ma, Y. L., & Yao, K. D. (2002). Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. I. Preparation and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 86(5), 1189-1194. <https://doi.org/10.1002/app.11062>
- [34] Moghadam, M., Salami, M., Mohammadian, M., & Emam-Djomeh, Z. (2021). Development and characterization of pH-sensitive and antioxidant edible films based on mung bean protein enriched with Echinium amoenum anthocyanins. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 2984-2994. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00872-3>
- [35] Pantani, R., Gorrasi, G., Vigliotta, G., Murariu, M., & Dubois, P. (2013). PLA-ZnO nanocomposite films: Water vapor barrier properties and specific end-use characteristics. *European Polymer Journal*, 49(11), 3471-3482. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.08.005>
- [36] Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014). Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. *Food Chemistry*, 148, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.047>
- [37] Tayel, A. A., EL-TRAS, W. F., Moussa, S., EL-BAZ, A. F., Mahrous, H., Salem, M. F., & Brimer, L. (2011). Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*, 31(2), 211-218. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2010.00287.x>
- [38] Pirsá, S., Karimi Sani, I., Pirouzifard, M. K., & Erfani, A. (2020). Smart film based on chitosan/Melissa officinalis essences/pomegranate peel extract to detect cream cheeses spoilage. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(4), 634-648. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1716079>
- [39] Shabahang, Z., Nouri, L., & Nafchi, A. M. (2022). Composite film based on whey protein isolate/pectin/CuO nanoparticles/betain pigments; investigation of physicochemical properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(9), 3985-3998. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02481-7>



شکل ۱. کانتورپلات اثر عوامل آنتوسیانین (انگور و انار) و نانوذرات اکسید روی بر درصد مواد جامد در فیلم

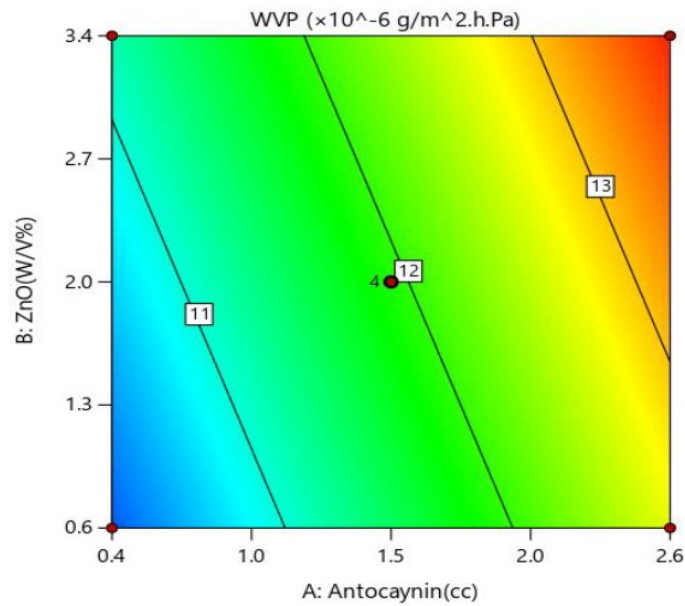
**Fig 1.** Contour plot of the effect of anthocyanin factors (grape and pomegranate) and zinc oxide nanoparticles on the percentage of solids in the film





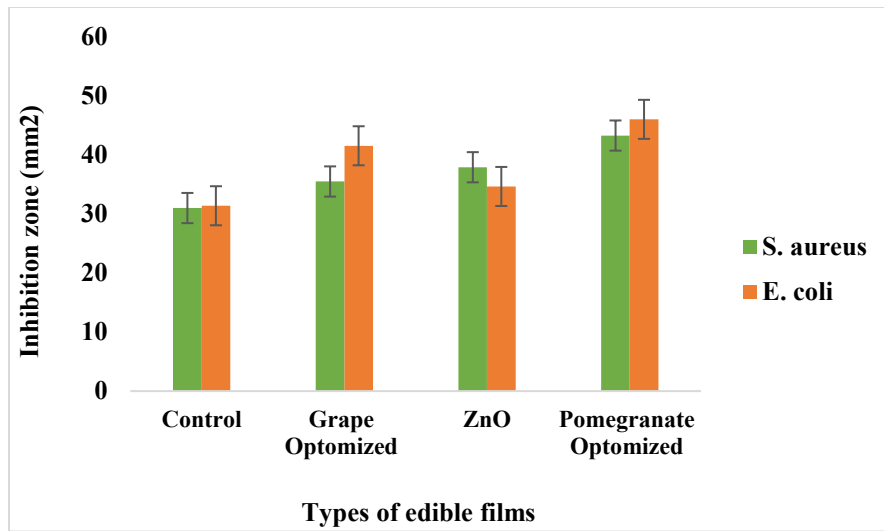
شکل ۲. تاثیر فاکتور آنتوسیانین انگور و انار بر فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم

**Fig 2.** The effect of grape and pomegranate anthocyanin factor on the antioxidant activity of the film



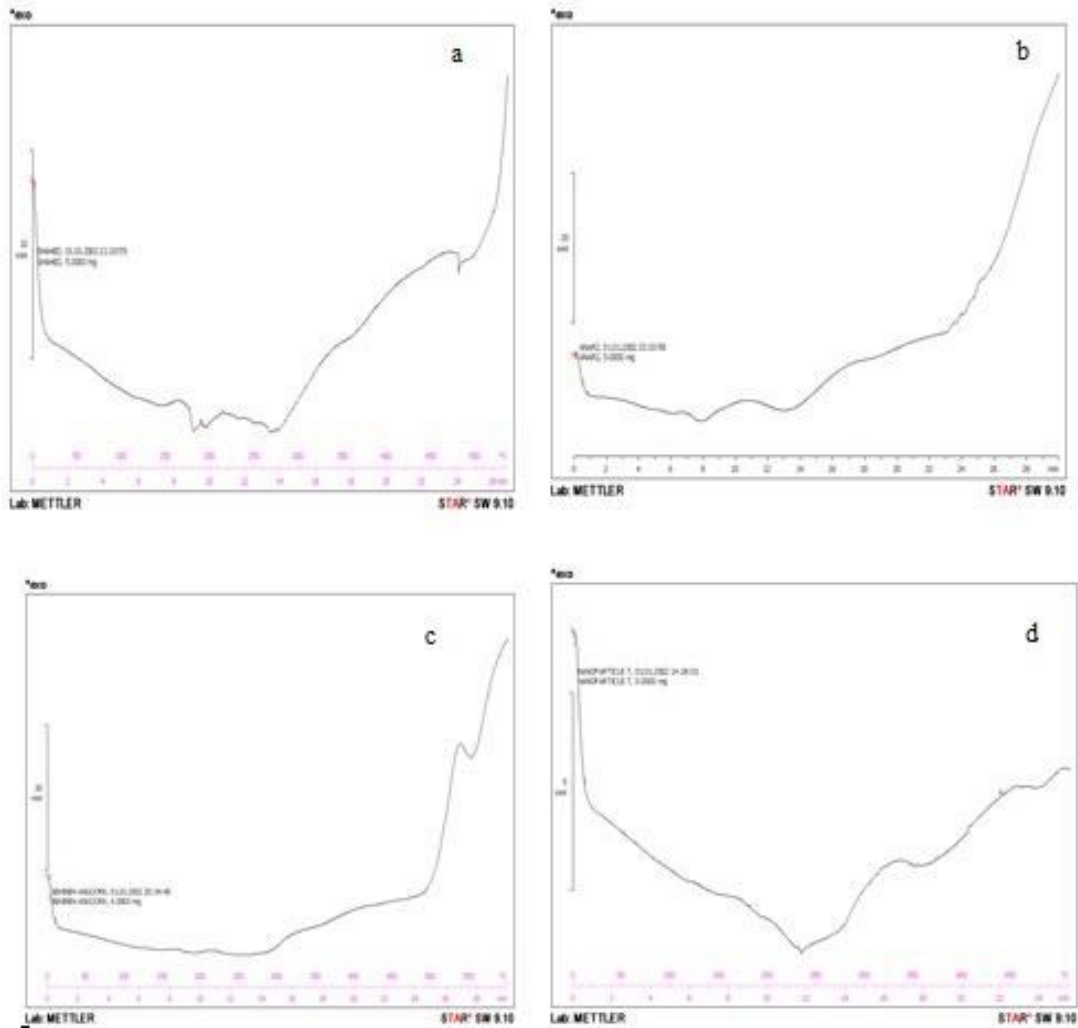
شکل ۳. کانتور پلات اثر عوامل آنتوسیانین (انگور و انار) و نانوذرات اکسید روی بر نفوذ پذیری بخار فیلم

**Fig 3.** Contour plot of the effect of anthocyanin factors (grape and pomegranate) and zinc oxide nanoparticles on film vapor permeability



شکل ۴. نمودار فعالیت میکروبی نانوذرات آنتوسیانین و اکسید روی در فیلم بر پایه کنسانتره آب پنیر

**Fig 4.** Diagram of microbial activity of anthocyanin and zinc oxide nanoparticles in the film based on whey concentrate



شکل ۵. منحنی نتایج آزمایش DSC: الف: کنترل ب: حداکثر نمونه انار، ج: نمونه انار بهینه و د: نمونه انگور بهینه  
**Fig 5.** DSC test results curve: a: control b: maximum pomegranate sample, c: optimal pomegranate sample and d: optimal grape sample