

Research Article

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 ¹, Mohammad Alizadeh ², Hamed Hassanzadeh ^{3*}

1. MSc, Department of Food Industry Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2. Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3. Assistant Professor, Department of Health and Food Industry, Faculty of Paraveterinary Medicine, Ilam University, Ilam, Iran

(Received 11 July 2023, Received in revised form 6 August 2023, Accepted 12 August 2023)

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 they are used in appropriate concentrations.

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

How to cite this article:

Taghizadeh, E., Alizadeh, M., & Hassanzadeh, H., (2023). Investigation of Antimicrobial, Antioxidant and Physicochemical Properties of Active Film Based on Whey Protein Containing Pomegranate and Red Grape Anthocyanins and Zinc Oxide Nanoparticles . *Innov. Food Technol.*, 10(4), 397-410.
DOI: <http://dx.doi.org/10.22104/IFT.2023.6374.2145>

* Corresponding author: h.hassanzadeh@ilam.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی خصوصیات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و فیزیکوشیمیایی فیلم فعال بر پایه پروتئین آب پنیر حاوی آنتوسیانین انار و انگور قرمز و نانو ذرات اکسید روی

ابراهیم تقی زاده^۱، محمد علیزاده^۲، حامد حسن زاده^{۳*}

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

(تاریخ ارسال: ۱۴۰۲/۰۴/۲۰، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۴۰۲/۰۵/۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۱)

چکیده

بسته‌های فعال ضد میکروب نانو کامپوزیت‌های فلزی نسل جدیدی از بسته‌ها با ساختار نانو هستند که از ترکیب مستقیم نانو ذرات فلزی با بسیار زمینه‌ای تولید می‌شوند. این تحقیق با هدف بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی فیلم هوشمند کنسانتره پروتئین آب پنیر حاوی آنتوسیانین انار و انگور قرمز و نانو ذرات اکسید روی انجام شده است. نفوذپذیری نسبت به بخار آب، خواص آنتی‌اکسیدانی، خواص ضد میکروبی به روش انتشار دیسک و آزمون گرماسنج روبش افتراقی بر روی فیلم‌های تهیه‌شده انجام شده است. برای تعیین اثرات ضد میکروبی فیلم از روش انتشار آگار استفاده شد. با افزایش درصد نانو ذرات اکسید روی و آنتوسیانین به فیلم بر درصد مواد جامد فیلم افزوده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های فعال به‌طور قابل توجهی با افزایش محتوای آنتوسیانین فیلم‌ها افزایش یافت. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) به نمونه فیلم با عصاره ۲/۶ cc نسبت داده شد. با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده از آزمون DSC، با افزودن آنتوسیانین‌ها، دمای ۲۹۰ و انتقال شیشه‌ای تا حدودی کاهش داده است. به‌طور کلی، این مطالعه نشان داد که آنتوسیانین‌ها و نانو ذرات اکسید روی پتانسیل استفاده برای تهیه فیلم‌های بر پایه کنسانتره آب پنیر فعال زیستی با خواص فیزیکوشیمیایی بهبود و خواص بیولوژیکی مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در صورت استفاده در غلظت‌های مناسب دارند.

واژه‌های کلیدی: فیلم خوراکی، پروتئین آب پنیر، آنتوسیانین، نانو ذرات، خاصیت آنتی‌اکسیدانی

* نویسنده مسئول: h.hassanzadeh@ilam.ac.ir

۱. مقدمه

ترتیب کیفیت، عمر نگهداری و یکپارچگی ماده غذایی را بهبود بخشد [۶].

استفاده از پلی پپتیدها به‌عنوان عوامل سازنده فیلم خوراکی شامل کلاژن، ژلاتین، فیرینوژن، گلوتن گندم، پروتئین سویا، زئین ذرت، آلبومین تخم‌مرغ، کازئین و پروتئین آب پنیر بوده است. آن‌ها ماکرو ملکول‌هایی با ساختارهای ملکولی و زنجیرهای آمینو اسید ویژه هستند. ساختارهای دوم، سوم و چهارم پروتئین‌ها می‌توانند به‌آسانی توسط واسرشتی حرارتی، فشار، تابش، تیمار مکانیکی، اسیدهای قلیاها، یون‌های فلزی، نمک‌ها، آبکافت شیمیایی، تیمار آزیمی و اتصالات عرضی شیمیایی اصلاح گردند. مشخص‌ترین خصوصیت پروتئین‌ها در مقایسه با دیگر مواد تشکیل‌دهنده فیلم، واسرشتی آرایش فضایی بارهای الکترواستاتیک و ماهیت دوگانه دوست آنها می‌باشد. عوامل زیادی بر آرایش فضایی پروتئین‌ها تأثیرگذار هستند که شامل چگالی بار و تعادل آب دوست - آب گریز است و با کنترل این عوامل می‌توان خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های تهیه شده را تعیین کرد. فیلم‌های بر پایه پروتئین به‌خوبی به سطوح آب دوست می‌چسبند و سدی در برابر اکسیژن و دی‌اکسید کربن پدید می‌آورند هر چند به انتشار آب مقاوم نیستند [۵]. بسته‌های فعال ضد میکروب نانو کامپوزیت‌های فلزی نسل جدیدی از بسته‌ها با ساختار نانو هستند که از ترکیب مستقیم نانوذرات فلزی با بسپار زمینه‌ای تولید می‌شوند [۷]. میکرو و نانو ذرات فلزی به‌منظور بهبود خصوصیات مکانیکی و ممانعتی و جلوگیری از تخریب نوری پلاستیک‌ها، به داخل بسپارهای در تماس با فرآورده‌های غذایی وارد می‌شوند. عناصر فلزی سنگین به شکل نمک، اکسید، کلوئید و ترکیباتی مانند زئولیت نقره با نانو ذرات خواص ضد میکروبی فعالی دارند. آنها با هدف نگهداری مواد غذایی و به‌منظور ضدعفونی کردن سطوح در محیط‌های صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند و فلزات قابل استفاده در تولید نانو کامپوزیت‌هایی بر پایه مواد فلزی با بسپارهای آلی یا غیر آلی عبارتند از: نقره، مس، اکسید مس، اکسید تیتانیوم، اکسید روی، پالادیوم، آهن [۸].

فلانوییدها دسته مهمی از محصولات طبیعی هستند که اهمیت آنها در گیاهان غیرقابل چشم‌پوشی می‌باشد. این مواد

فیلم‌های خوراکی ساختارهایی هستند که به‌طور مستقل از قبل ساخته‌شده و سپس روی سطح غذا، بین اجزای غذا قرار می‌گیرند [۱]. پوشش‌های خوراکی، به‌نوبه خود، مستقیماً روی سطح غذا با غوطه‌ور 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 می‌آید [۲]. اگرچه انتظار نمی‌رود که فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به‌طور کامل جایگزین مواد بسته‌بندی معمولی شوند، اما می‌توان از آنها در کاهش تبادل رطوبت، گازها، لیپیدها و مواد فرار بین غذا و محیط اطراف که به ثبات غذا کمک می‌کند همچنین با جلوگیری از آلودگی سطحی، کمک به بهبود کارایی بسته‌بندی مواد غذایی و در نتیجه کاهش نیاز به پلیمرهای مشتق شده از نفت استفاده کرد [۴،۳].

فیلم‌ها پوشش‌های خوراکی باید از ویژگی‌های لازم برای بسته‌بندی ماده غذایی شامل اثر ممانعت‌کنندگی 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 شکل‌گیری و موارد کاربرد آنها بستگی دارد [۵]. در هر پوشش بسته‌بندی دو نوع نیرو وجود دارد. اولی نیروهای بین ملکولی پلیمرهای تشکیل‌دهنده فیلم (پیوستگی و نیروهای بین فیلم و محصول مورد نظر برای چسبندگی مواد پوشش‌دهنده) هستند. نوع دوم، میزان پیوستگی روی خصوصیات فیلم مثل مقاومت، انعطاف‌پذیری و نفوذپذیری تأثیر می‌گذارد. نیروی پیوستگی قوی انعطاف‌پذیری را کاهش می‌دهد میزان پیوستگی به ساختار و خصوصیات پلیمر سازنده و روش ساخت مانند درجه حرارت، فشار نوع حلال رقیق‌کننده چگونگی تبخیر حلال و افزودنی‌ها بستگی دارد. عواملی که حرکت جزئی زنجیره‌های پلیمری را تحت تأثیر قرار می‌دهند شامل نیروهای درون زنجیره‌ای مثل پیوند هیدروژنی، نیروهای واندروالسی و پیوند عرضی هستند لذا فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی می‌توانند به‌عنوان سدی در مقابل نفوذ رطوبت و اکسیژن به کار روند و همچنین برخی خصوصیات مکانیکی را تقویت نموده و به این



۱.۲. مواد

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

۲.۲. روش تهیه فیلم‌ها

جهت تهیه فیلم نانو کامپوزیت، ۱۰ گرم پودر کنسانتره پروتئین آب پنیر به ۹۰ ml آب مقطر اضافه شد. در آغاز تولید فیلم قبل از بالا رفتن دمای محلول تولیدی pH را به کمک سود ۱/۰ نرمال روی ۸ = pH تنظیم کرده و جهت حل شدن بهتر ایزوله، این مخلوط به مدت ۳۰ min و با دمای ۸۰°C 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 (I9D1۲ شرکت هایدولف، آلمان) محلول به مدت ۱۰ min با دور ۱۳۰۰۰ rpm هموزن گردید. سپس نانو ذره اکسید روی طبق طرح آماری را به محلول اضافه شده و به مدت ۱۰ min روی همزن مغناطیسی همگن شده و بعد در حمام اولتراسوند جهت پخش‌شدگی به مدت ۱۰ min قرار گرفت. در مرحله بعد افزودن گلیسرول به میزان ۴۰ % وزن ماده خشک و به مدت ۱۵ min روی همزن مغناطیسی دارای چرخش و بدون حرارت دهی قرار گرفت. محلول شکل گرفته به مدت ۱۰ min هواگیری و ۲۵ ml از آن در مرکز پلیت (۸ cm) 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^۱ (WVP)

برای این کار از ویال های مخصوصی با قطر ۲ cm و ارتفاع ۴/۵ cm استفاده شد. منفذی به قطر ۵ mm قرار در درپوش این ویال‌ها داشت که قطعه‌ای از فیلم مورد آزمون در این

دارای ساختار پلی- فتولیک می‌باشند که به‌طور گسترده در میوه‌ها و سبزیجات بافت می‌شوند. این ترکیبات دارای اثرات بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی مفید در رابطه با بیماری‌هایی مانند آلزایمر و آترواسکلروزیس می‌باشند [۹] زیرا علاوه بر داشتن رنگ زیبا و درخشان، شواهد نشان می‌دهد که فلاوونوئیدها نقش کلیدی در کاهش خطر ابتلا به بیماری دارند [۱۰]. نتایج اخیر نشان می‌دهد مصرف ترکیبات حاوی آنتوسیانین در سلامتی مصرف‌کننده مؤثر است [۱۱].

Schmidt و همکاران (۲۰۱۳) از نانوفیبر سلولز باکتریایی در ساختار فیلم استات نشاسته استفاده کردند و ویژگی‌های مکانیکی و مانع‌تی نانو کامپوزیت‌ها مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج خواص مکانیکی نشان داد که فیلم‌های تقویت‌شده با نانوفیبر سلولز در غلظت‌های (w/w) % ۰/۰۲۵، ۰/۰۷۵ و ۰/۱۲۵ 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 به‌طور قابل توجهی کاهش نشان داد. همچنین خاصیت جذب رطوبت نانو کامپوزیت‌ها کمتر از نمونه شاهد بود [۱۲]. Chen و همکاران (۲۰۲۰)، فیلم‌های حساس به pH بصری پوشیده شده با کورکومین و آنتوسیانین به‌عنوان برجسب‌های نشانگر روی بسته ماهی برای تشخیص تازگی آن فراهم کردند. نتایج آزمون پایداری رنگ نشان داد که فیلم‌های کامپوزیت ترکیب‌شده با کورکومین بیشترین پایداری و فیلم‌های کامپوزیت ترکیب‌شده 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 (v/v) ۸:۲ می‌تواند سه رنگ مختلف را ارائه دهد که نشانه‌های تازه، قابل مصرف و غیر قابل مصرف برای بسته‌بندی ماهی اختصاص داده شده است [۱۳]. هدف این تحقیق بررسی ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی فیلم هوشمند کنسانتره پروتئین آب پنیر حاوی آنتوسیانین انار و انگور قرمز و نانو ذرات اکسید روی می‌باشد تا بتوان از فیلم تهیه شده در تخمین ماندگاری مواد غذایی استفاده کرد.

۲. مواد و روش‌ها

1. Water vapor permeability

از محلول آب و متانول (۳ cc آب مقطر به علاوه ۳ cc (متانول با ۴ cc محلول ۰/۱ mM DPPH به مدت ۳۰ min در تاریکی انکوبه شده و جذب آن در طول موج ۵۱۷ nm اندازه‌گیری شد (معادله ۳) [۱۵].

$$I(\%) = \frac{A_{Control} - A_{Sample}}{A_{Control}} \times 100 \quad (3)$$

در این رابطه $Ab_{S_{control}}$ میزان جذب محلول متانولی DPPH در طول موج ۵۱۷ nm و $Ab_{S_{sample}}$ میزان جذب عصاره نمونه‌های فیلم می‌باشد. 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 دیسک‌های ۱۵ بریده شده و سپس بر روی پلیت‌های مولر هینتون آگار حاوی باکتری اش‌ریشیاکلی H7:0157 و باسیلوس سرئوس قرار گرفت. باکتری را قبل از استفاده به‌طور متوالی دو بار در محیط مولر هینتون براث تجدید کشت نموده و سپس پلیت‌ها با ۱/۰ ml از محیط کشت براث (۱۰۶ - ۱۰۵ CFU / mL) حاوی باکتری که شب قبل آماده شده بود، تلقیح شدند و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴h انکوبه شد. در هر پلیت نیز نمونه‌های کنترل حاوی کاغذ واتمن آغشته به آب مقطر استریل قرار داده شد. بعد از این مدت هاله ممانعت از رشد توسط یک کولیس اندازه‌گیری و مساحت آن برحسب میلی‌متر مربع بعد از کسر از مساحت خود فیلم گزارش شد [۱۶].

۶.۲. اندازه‌گیری خواص حرارتی

برای بررسی خواص حرارتی، از گرماسنج روبشی افتراقی (DSC^۱) استفاده شد. برای این منظور نمونه‌هایی از فیلم با وزن تقریبی ۵ mg با سرعت ۱۰ °C/min در گستره دمایی صفر تا ۳۰۰ °C حرارت داده شد و مجدداً با همان سرعت تا صفر درجه سانتی‌گراد سرد شد. از روی الگوی گرمایی به‌دست‌آمده دمای انتقال شیشه‌ای (Tg) و دمای ذوب، تعیین گردید.

قسمت قرار گرفت. برای این منظور ابتدا ۳ g سولفات کلسیم (رطوبت برابر صفر) در داخل ویال‌ها قرار داده شد، سپس قطعه‌ای از فیلم بریده شده و در درپوش ویال قرار گرفت. ویال‌ها با تمام محتویاتش توزین شده و درون دسیکاتور حاوی محلول اشباع سولفات پتاسیم قرار داده شد. دسیکاتور در دمای ۲۵ °C قرار داده شد سپس به مدت ۳ روز وزن ویال‌ها اندازه‌گیری گردید. مقدار بخار آب انتقال یافته از فیلم‌ها از روی افزایش وزن ویال‌ها تعیین شد [۱۴]. منحنی افزایش وزن ویال‌ها 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^۱ (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)، Δw : میزان بخار آب عبور کرده از فیلم، t: مدت زمان انتقال بخار آب و A: مساحت سطح فیلم می‌باشند.

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

X: ضخامت فیلم (m)، P: فشار بخار آب خالص در ۲۵°C (۳۱۶۹Pa)، R_۱: رطوبت نسبی در دسیکاتور (۰/۹۷)، R_۲: رطوبت نسبی در داخل ویال (۰/۰) می‌باشند.

۴.۲. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم

جهت اندازه‌گیری میزان آنتی‌اکسیدان فیلم، مقدار ۳۰ mg از فیلم در آب مقطر و متانول به نسبت ۳:۳ حل شد. پس از حل شدن همه فیلم محلول به‌دست‌آمده به مدت ۱۵ min با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس ۱ cc از قسمت رویی محلول سانتریفیوژ شده هر فیلم با ۴ cc محلول ۰/۱ mM DPPH مخلوط شد و به مدت ۳۰ min در تاریکی نگه داشته شد. سپس جذب آن در ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. به‌عنوان شاهد ۱ cc

2. Differential Scanning Calorimetry

1. Water vapor transmission rate

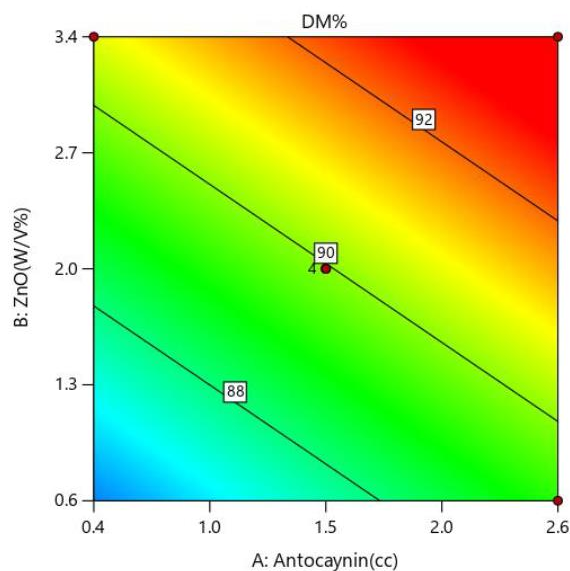
۷.۲. طرح آماری

۳. نتایج و بحث

۳.۱. درصد مواد جامد فیلم‌های تولیدشده

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 نانو ذرات 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 زالزالک چینی (Crataegus pinnatifida) برای توسعه بسته‌های فعال جدید بر اساس هیدروژل‌های آلژینات کلسیم و فیلم‌های کیتوزان-ژلاتین استفاده کردند [۱۷].

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 داده‌ها فیلم‌های بهینه بر اساس بهینه‌سازی و تابع مطلوبیت توسط نرم‌افزار آماری ۱۱ Design expert بررسی شد.



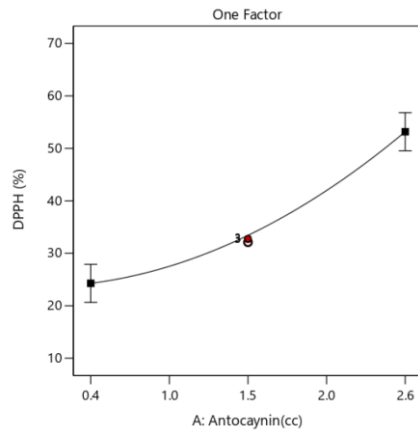
شکل (۱) کانتورپلات اثر عوامل آنتوسیانین (انگور و انار) و نانوذرات اکسید روی بر درصد مواد جامد در فیلم

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

همچنین تبدیل الکترون آزاد هستند که آنها را برای تقویت و بهبود توانایی آنتی‌اکسیدانی تقویت می‌کند [۱۸]. آنتوسیانین‌ها که فعالیت مهار رادیکال را افزایش می‌دهند آنتوسیانین‌های موجود و مؤثر در انار می‌توان به، سیانیدین دلفینیدین و پلارگونیدین اشاره کرد [۱۹].

۲.۳. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های تولیدشده

طبق شکل (۲)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های فعال به‌طور قابل توجهی با افزایش محتوای آنتوسیانین فیلم‌ها افزایش یافت. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) به نمونه فیلم با عصاره ۲/۶ cc نسبت داده شد. آنتوسیانین‌ها ترکیبات فنلی با توانایی اهدای یون H^+ و



شکل (۲) تاثیر فاکتور آنتوسیانین انگور و انار بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم

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

ویژگی از فیلم ندارند ($p > 0.05$). در تحقیق Zheng و همکاران (۲۰۲۲) نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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^۱ و FRAP^۲ در فیلم‌ها قبل و بعد از ترکیب ZnO به طرز چشمگیری تغییر کرد که نشان می‌دهد نانو ZnO هیچ‌گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارائه نکرده است [۲۲]. Roy و همکاران (۲۰۲۱) دریافتند که وقتی نانو ذرات اکسید روی به فیلم‌های مبتنی بر نانو الیاف 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 آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های بیولوژیکی را تا حدی افزایش دهد اما به دلیل پراکندگی خوب ZnO در بستر پلیمری و کاهش

Negro و همکاران (۲۰۰۳) در تحقیقی گزارش کردند که مقدار کل مواد فنلی و کل فلاونوئیدهای موجود در عصاره هسته انگور بیشتر از مقدار به‌دست‌آمده از پوست و مارک آن بود. در واقع، غلظت کل فنل در عصاره هسته انگور برابر با ۲،۸۶ g/L و مقدار آنها در ۱۰۰ g وزن خشک بود. در حالی که مقدار فنل موجود در عصاره‌های مربوطه به‌دست‌آمده از پوست و مارک به ترتیب ۱۱/۱ و ۴۰/۱ g/L بود که به ترتیب معادل ۳۳/۳ و ۱۹/۴ g/100g 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 آنتی‌اکسیدانی عالی است [۲۲]. از طرفی همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود نانو ذرات اکسید روی تأثیر معناداری بر روی این

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

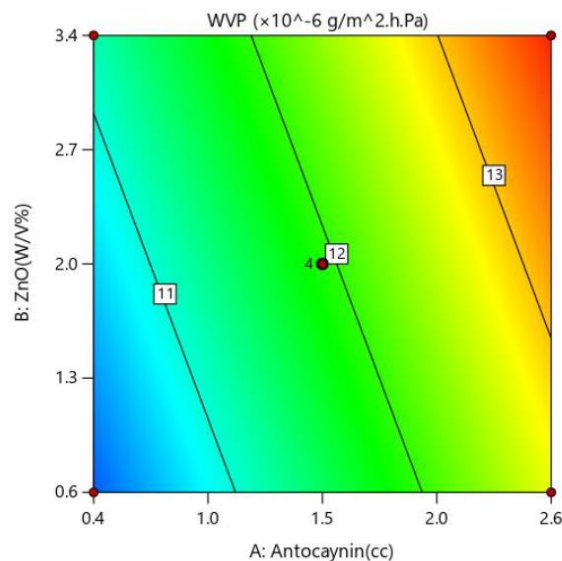
2. Fluorescence Recovery After Photobleaching

کردن انتقال رطوبت بین دو طرف داخلی و خارجی فیلم‌ها نشان می‌دهد [۲۵]. نتایج تجزیه واریانس اثر آنتوسیانین و اکسید روی اضافه شده به فیلم‌ها بر روی میزان نفوذپذیری 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 می‌باشد.

انتقال اکسیژن و آب و کاهش غیرمستقیم سرعت اکسیداسیون مواد غذایی بود [۲۴].

۳.۳. نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های تولیدشده

نفوذپذیری به بخار آب یک عامل مهم برای سیستم‌های بسته‌بندی مواد غذایی است که توانایی فیلم‌ها را در محدود



شکل (۳) کانتورپلات اثر عوامل آنتوسیانین (انگور و انار) و نانوذرات اکسید روی بر نفوذپذیری بخار فیلم

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

که با افزایش ضخامت نفوذناپذیری فیلم به بخار آب افزایش می‌یابد [۲۷]. مطالعات قبلی همچنین نتایج مشابهی را برای نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های کیتوزان گزارش کردند که تحت تأثیر غنی‌سازی با عصاره سیب‌زمینی شیرین [۲۸] و عصاره پوست آلو سیاه [۲۹] قرار گرفت آن‌ها گزارش کردند که افزایش نفوذپذیری به بخار آب ممکن است به دلیل گروه‌های آلدوست بیشتری باشد که در عصاره‌ها وجود دارد که بر ویژگی‌های مانع آب فیلم‌ها تأثیر می‌گذارد. از فاکتورهای مؤثر دیگر میزان رطوبت نسبی محیط است. از آنجائی که پروتئین‌ها خاصیت آلدوستی دارند، هرچه رطوبت نسبی محیط بالاتر باشد، میزان تراوایی نسبت به بخار آب افزایش خواهد یافت. در رطوبت‌های نسبی بسیار بالا بیش

شکل (۳) نشانگر این است که در غلظت‌های بیشتر آنتوسیانین و درصدهای بالای اکسید روی بر میزان نفوذپذیری افزوده شده است. بازه به‌دست‌آمده در محدوده $9/89 - 13/74 \times 10^{-6} \text{ g/m}^2.\text{h.Pa}$ می‌باشد. میزان نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های تولیدشده با یا بدون افزودن آنتوسیانین مشخص شد. به‌طور کلی این خاصیت فیلم‌ها با غنی‌سازی با عصاره آنتوسیانین افزایش یافت. افزایش کلی آن با افزودن عصاره در نمونه‌های فیلم بیشتر شده که دلیل آن را می‌توان به خاصیت آب دوستی آنتوسیانین‌ها که باعث نفوذ بیشتر بخار آب در سراسر ماتریس فیلم شود [۲۶].

بر اساس مطالعات Bravin و همکاران (۲۰۰۶) ضخامت نیز در میزان نفوذپذیری به بخار آب تأثیرگذار است بدین ترتیب

کامپوزیتی تهیه‌شده 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 فیلم‌ها را تا حدودی افزایش دهند و این موضوع به‌عنوان یک امتیاز منفی برای این فیلم‌ها محسوب می‌شود. اثر بهبود خواص ممانعتی نانو ذرات با افزایش درصد نانو ذرات مورد استفاده در فیلم‌ها کاهش یافت که علت آن احتمالاً افزایش تجمع نانو ذرات در قسمت‌هایی از فیلم و تخریب شبکه پروتئینی در آن نواحی می‌باشد. در تحقیقات اثر نانو ذرات نقره در بهبود خواص ممانعتی فیلم‌ها بیشتر از نانو ذرات اکسید روی است که این موضوع می‌تواند 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 ۱٪ به فیلم‌های تهیه‌شده از پروتئین آب پنیر برخی خصوصیات کمی بهبود می‌یابد اما مقادیر بالای این نانو ذره در حدود ۲٪ نیز سبب نزدیک شدن خصوصیات فیلم‌ها به فیلم شاهد شده بود؛ بنابراین غلظت ۱٪ از نانو ذرات اکسید تیتانیوم را پیشنهاد کردند. خصوصیات فیلم‌ها 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 بخش‌هایی 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 فیلم‌ها نسبت به رطوبت برای فیلم حاوی نانو ذرات در مقایسه با فیلم شاهد دست یافتند [۳۶].

۴.۳. خاصیت ضد میکروبی

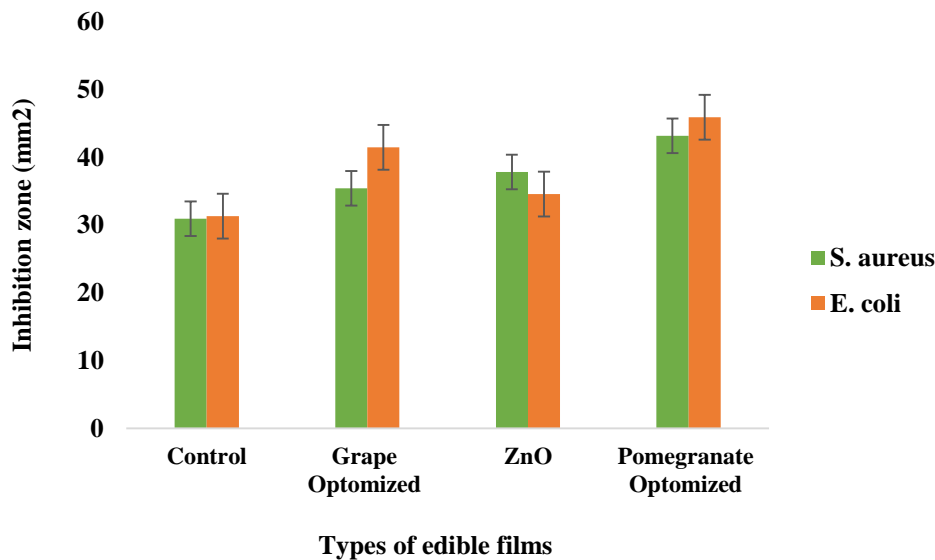
فیلم کنسانتر آب پنیر خالص (الف)، فیلم کنسانتره آب پنیر حاوی نانو ذرات (ب)، فیلم کنسانتر آب پنیر حاوی بهینه آنتوسیانین انار (ج) و فیلم کنسانتره آب پنیر حاوی بهینه

از ۸۰٪، به علت جذب آب پروتئین‌ها شبکه پروتئینی به شکل گسترده‌ای متورم شده و بنابراین فضای کافی برای عبور مولکول‌های آب وجود نخواهد داشت و تراوایی فیلم‌ها کاهش می‌یابد [۳۰]. نفوذپذیری فیلم‌های خوراکی مربوط به مسیره‌های ریز موجود در شبکه میکرو ساختاری پروتئین فیلم مانند کنسانتره آب پنیر است [۳۱]؛ بنابراین یک راه دیگر برای کاهش تراوایی فیلم‌های پروتئینی پر کردن منافذ موجود در شبکه پروتئینی فیلم است نانو ذرات فضاهای خالی بین مولکولی را پر و سبب کاهش نفوذپذیری نسبت به بخار آب فیلم‌ها می‌شوند. De Moura و همکاران (۲۰۱۲) کاهش نفوذپذیری برای نانو ذرات با اندازه کوچک‌تر را در رابطه با افزودن نانو ذرات نقره به ماتریس سلولزی گزارش کردند؛ در حالی که نانو ذرات بزرگ اثر چندانی نداشتند. بعلاوه هر چه مقدار نانو ذرات مورد استفاده کمتر، باشد اثر ممانعتی افزایش می‌یابد. نانو ذرات رس به علت ساختار ورقه‌ای که دارند سبب بهبود بیشتر خصوصیات مکانیکی و ممانعتی بسپارها در مقایسه با نانو ذرات کروی شکل فلزی خواهند شد [۳۲]. Zheng و همکاران (۲۰۰۲) بهبود خصوصیات فیزیکی نانو کامپوزیت تهیه‌شده 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 بسته‌های کامپوزیتی را از زمان تولید تا مصرف تصدیق می‌کنند [۳۴].

تمام این نتایج زمانی به دست می‌آید که نانو ذرات افزوده‌شده به بسپار از توزیع یکنواختی برخوردار باشند. Pantani و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند نفوذپذیری فیلم‌های 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 می‌باشد. یکی دیگر از فاکتورهای تأثیرگذار بر میزان تراوایی فیلم‌های بیونانو کامپوزیتی نسبت به بخار آب، دماست؛ هر چه دمای محیط بالاتر باشد میزان تراوایی افزایش می‌یابد. در تحقیق ایشان میزان تراوایی فیلم‌ها در دمای 30°C ۵/۱ برابر و در دمای 45°C ۲ برابر تراوایی در دمای 15°C است و میزان تراوایی نسبت به رطوبت فیلم‌های بیونانو

برابر این دو باکتری بیماری‌زا داشت، در حالی که فیلم‌های حاوی آنتوسیانین و نانو ذرات اکسید روی دارای خواص ضد میکروبی بود به طوری که قطر ناحیه بازدارنده رشد به طور قابل توجهی (۲۴-۲۰cc) افزایش یافت.

آنتوسیانین انگور (د) برای مطالعه فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها استفاده شده و فعالیت ضد میکروبی این چهار فیلم در برابر باکتری *S. aureus* و *E. coli* مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). نتایج نشان داد که نمونه شاهد مقاومت کمی در



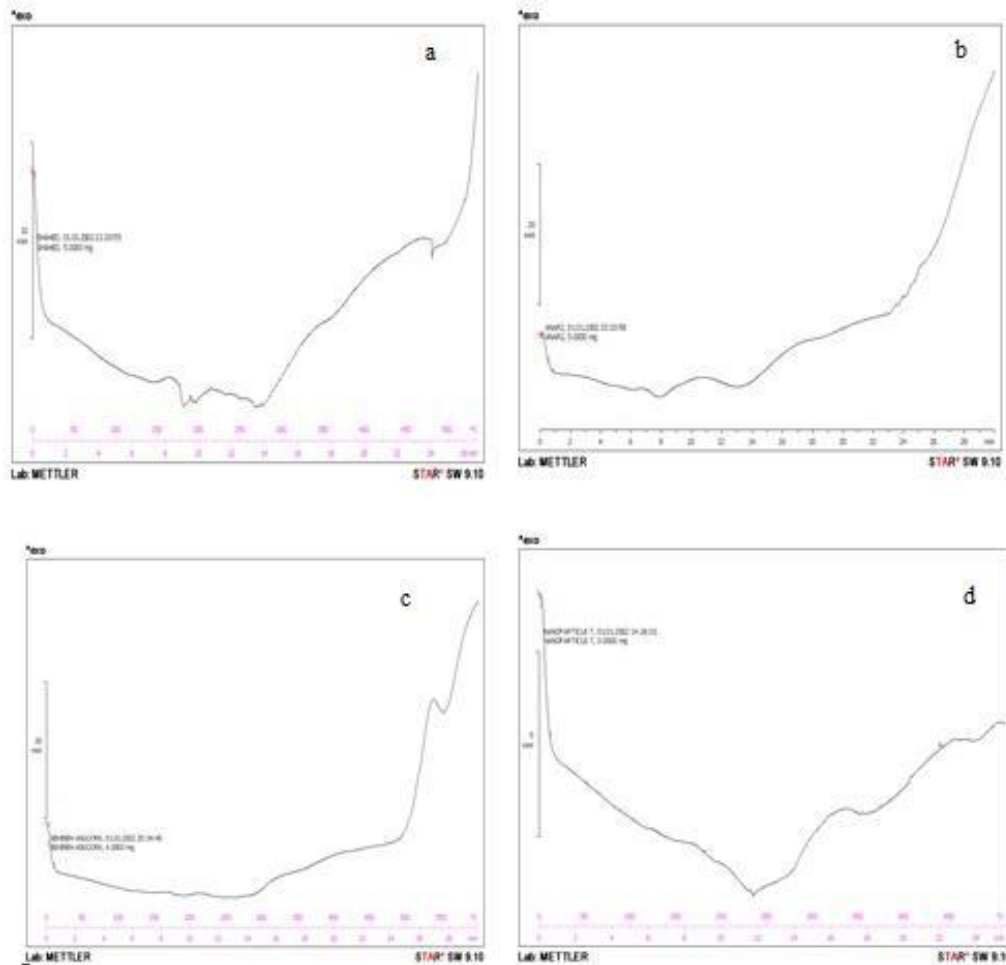
شکل (۴) نمودار فعالیت میکروبی نانوذرات آنتوسیانین و اکسید روی در فیلم بر پایه کنسانتره آب پنبیر
Fig 4. Diagram of microbial activity of anthocyanin and zinc oxide nanoparticles in the film based on whey concentrate

کشتن باکتری‌های گرم مثبت مؤثرتر از باکتری‌های گرم منفی است [۳۷].

۵.۳. نتایج DSC

شکل ۵ منحنی‌های DSC نمونه‌های فیلم را نشان می‌دهد مطابق با منحنی‌های DSC مذکور، پیک گرماگیر فیلم کنسانتره خالص در دمای $180/1^{\circ}\text{C}$ مشاهده شد (شکل ۵a). دومین و سومین پیک گرماگیر در نمونه شاهد به ترتیب در دمای 270°C و 470°C در توان 10 mW به دست 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 می‌باشد. زمانی که یک واکنش گرماده وجود داشته باشد روندی عکس روند بالا را دیده می‌شود چون در این خصوص، به توان کمتری از المنت برای تثبیت دما نیاز می‌باشد.

نتایج همچنین نشان داد که حاوی نانو ذرات اکسید روی بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیماری‌زا مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از گرم منفی‌هایی مثل *اشرشیا کلی* می‌باشد. در خصوص خاصیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی در فیلم‌های خوراکی که در سراسر ماتریس فیلم توزیع می‌شود، کارهای مختلفی انجام شده است. فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی و مکانیسم اثر مهارکنندگی آن در برابر میکروارگانیسم‌ها می‌تواند بدین صورت باشد که یون‌های آن از دیواره سلولی میکروارگانیسم نفوذ کرده و با اجزای داخلی واکنش داده که در نهایت بر روی زنده مانی سلول‌ها تأثیر می‌گذارد. در واقع به‌عنوان واسطه تولید پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، یک عامل اکسیدکننده قوی که باعث آسیب به غشای سلولی باکتری می‌شود، شناخته شده است. Tayel و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که نانو ذرات اکسید روی برای



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

در نمونه فیلم با بیشترین مقدار انار استفاده شده در آن (شکل ۵) پیک گرماگیر در دمای 160°C دیده می‌شود و نسبت به نمونه کنترل نزدیک و کمی کمتر است. در نمونه بهینه انار (شکل ۵) با داشتن توان بالا 20 میلی‌ولت، پیک گرماگیر مشاهده نمی‌شود و پیک گرمای آن در دمای 520°C به دست آمده است. در نهایت نمونه حاوی نانو ذرات (شکل ۵) با داشتن مقاومت پایین (5mV) دارای پیک گرماگیر در دمای 235°C و پیک گرماگیر 440°C می‌باشد. پیک گرماگیر و گرمای بحث شده در این قسمت به ترتیب مربوط به دمای ذوب و دمای انتقال شیشه‌ای بود از طرفی دمای تخریب حرارتی فیلم نیز در نمودار مشخص است به طوری که دمای تخریب حرارتی برای فیلم‌های شاهد، بیشترین مقدار انار، بهینه انار و بهینه انگور به ترتیب 280°C

در نمونه فیلم با بیشترین مقدار انار استفاده شده در آن (شکل ۵) پیک گرماگیر در دمای 160°C دیده می‌شود و نسبت به نمونه کنترل نزدیک و کمی کمتر است. در نمونه بهینه انار (شکل ۵) با داشتن توان بالا 20 میلی‌ولت، پیک گرماگیر مشاهده نمی‌شود و پیک گرمای آن در دمای 520°C به دست آمده است. در نهایت نمونه حاوی نانو ذرات (شکل ۵) با داشتن مقاومت پایین (5mV) دارای پیک گرماگیر در دمای 235°C و پیک گرماگیر 440°C می‌باشد. پیک گرماگیر و گرمای بحث شده در این قسمت به ترتیب مربوط به دمای ذوب و دمای انتقال شیشه‌ای بود از طرفی دمای تخریب حرارتی فیلم نیز در نمودار مشخص است به طوری که دمای تخریب حرارتی برای فیلم‌های شاهد، بیشترین مقدار انار، بهینه انار و بهینه انگور به ترتیب 280°C

نشان می‌دهد. به‌طور کلی این مطالعه نشان داد که آنتوسیانین‌ها و نانو ذرات کسید روی پتانسیل استفاده برای تهیه فیلم‌های بر پایه کنسانتره آب پنیر فعال زیستی با خواص فیزیکی‌شیمیایی بهبود و خواص بیولوژیکی مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در صورت استفاده در غلظت‌های مناسب دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی برای این مقاله وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله تشکر و قدردانی خود را از همکاری آزمایشگاه‌های مرکزی و همچنین حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه اعلام می‌دارد.

بر پکتین ندارد [۳۸]. Shabahang و همکاران (۲۰۲۲) طی بررسی خواص فیزیکی‌شیمیایی فیلم کامپوزیت بر اساس پروتئین آب پنیر ایزوله / پکتین / نانو ذرات CuO / رنگدانه بتانین به نتایج مشابهی دست یافتند [۳۹].

۴. نتیجه‌گیری

نتیجه آزمایش‌های انجام‌شده بر روی فیلم تولیدی نشان می‌دهد که افزایش غلظت آنتوسیانین و نانو ذرات اکسید روی باعث افزایش معنادار ضخامت، درصد مواد جامد، میزان نفوذپذیری به بخار آب، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش معنادار در میزان حلالیت فیلم‌های تولیدی گردید. افزودن نانو ذرات دمای ذوب و تخریب حرارتی نمونه‌های فیلم را اندکی کاهش داد که نشان می‌دهد افزودن نانو ذرات به ساختار، فیلم پایداری حرارتی فیلم‌ها را کاهش می‌دهد. افزایش پایداری حرارتی نمونه‌های فیلم نیز برهمکنش کافی بین کنسانتره آب پنیر یا پروتئین، نانو ذرات و آنتوسیانین‌ها را

منابع

- [1] Umaraw, P., & Verma, A. K. (2017). Comprehensive review on application of edible film on meat and meat products: An eco-friendly approach. *Crit Rev in Food Sci and Nutr*, 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. *Nutr and Food Sci*, 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 Biotech*, 12, 187-216.
- [5] Kumari, N., Bangar, S. P., Petrú, 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 App Material & Interf*, 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 Func. 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. *J. Nutri Sci*, 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. *J. Agri and Food Chem*, 66(27), 7076-7086. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01273>
- [11] Diaz-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. *J.*

- Sci of Food and Agri*, 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 Eng Transa*, 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*). *Intern J. Biol Macrom*, 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. *App Surface Sci*, 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. *Intern J. Biol Macrom*, 140, 384-392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.155>
- [18] Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., Show, P. L., & Cocolletzi, H. H. (2019). Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. *Intern J. Biol Macrom*, 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. *Fronti in Plant Sci*, 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. *Biores Technol*, 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. *Intern J. Biol Macrom*, 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. *Intern J. Biol Macrom*, 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. *J. Agric and Food Chem*, 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. *J. Food Eng*, 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 Chem*, 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, TiO₂ 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 TiO₂/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. *J. Food Eng*, 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. *J. Appl Polym Sci*, 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. *J. Food Measur and Charact*, 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 Chem*, 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. *J. 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 Addit & Conta: 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/betanin pigments; investigation of physicochemical properties. *J. Polym and the Environ*, 30(9), 3985-3998. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02481-7>