

Research Article

Vol. 22, No. 2, May-June, 2026, p. 129-155

Optimization of the Properties of pH-Sensitive Biodegradable Intelligent Films Based on Gelatin/Chitin Nanofibers Containing Malva and Amaranth Extracts

N. Taraghikhah^{1,2*}, A. Ayaseh¹, S. Milani¹, Sh. Vatgar^{3,2}

1- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

2- Azarnan Nazari Co.

(*- Corresponding Author Email: taraghikhaah@gmail.com)

3- Department of Food Science and Technology, Tehran Azad University, Tehran, Iran

Received: 11.10.2025

Revised: 02.02.2026

Accepted: 07.02.2026

Available Online: 09.05.2026

How to cite this article:

Taraghikhah, N., Ayaseh, A., Milani S., & Vatgar, Sh. (2026). Optimization of the properties of pH-sensitive biodegradable intelligent films based on gelatin/chitin nanofibers containing malva and amaranth extracts. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 22(2), 129-155. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2026.95850.1484>

Introduction

Food packaging is one of the essential components of the food supply chain, playing a vital role in maintaining product quality, ensuring safety, and extending the shelf life of perishable commodities. Beyond its traditional role as a passive barrier against physical, chemical, and microbial deterioration, novel packaging is expected to perform active and intelligent functions that can enhance product stability, indicate spoilage, and reduce food waste. In this context, the development of intelligent biodegradable films has received growing attention over the past decade due to their environmental compatibility, sustainability, and ability to provide real-time information on food freshness through measurable color changes triggered by spoilage-related pH variations. Among various natural colorants, anthocyanin-rich plant extracts are considered ideal candidates to be applied as a pH indicator in smart packaging. These compounds exhibit distinct color transitions in response to pH changes while also contributing antioxidant and antimicrobial properties that can further enhance food preservation.

Materials and Methods

In the present study, a pH-sensitive, biodegradable intelligent film was developed using a gelatin-based matrix reinforced with chitin nanofibers (NCh). The film was incorporated with *Malva sylvestris* (malva) and *Amaranthus cruentus* (amaranth) extracts as natural colorimetric indicators and bioactive components. Both extracts are rich sources of anthocyanins and phenolic compounds, which can impart multifunctional properties to the packaging material. The experimental design was optimized using the Response Surface Methodology (RSM) based on a Central Composite Design (CCD) with two independent factors: the concentration of malva extract (0.05–0.35% w/v) and amaranth extract (0.3–0.8% w/v).

The prepared films were evaluated for mechanical characteristics (tensile strength and elongation at break), water vapor permeability (WVP), moisture content, solubility, color attributes, thickness, and optical properties. Antioxidant activity was determined using the DPPH radical scavenging method, while antimicrobial activity of malva extract was tested against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* using the disk diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) assays. Structural and morphological characterizations were carried out using Scanning Electron Microscopy (SEM), Atomic Force Microscopy (AFM), and X-ray Diffraction (XRD), while Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to examine possible molecular interactions between film components. The color response of the films to pH variation was evaluated over a wide range (pH 1–14), and their practical application was assessed by monitoring spoilage in packaged common carp (*Cyprinus carpio*) fillets stored at refrigerator temperature for 72 hours.



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2026.95850.1484>

Results and Discussion

The results indicated that the simultaneous increase in malva and amaranth extract concentrations significantly enhanced the tensile strength of the films from 1.687 to 4.654 MPa, while elongation at break decreased from 24.405% to 15.102%, reflecting increased structural rigidity and reduced flexibility. Water vapor permeability increased from 0.00162 to 0.00418 $\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$, whereas moisture content and solubility decreased from 26.501% to 19.001% and from 23.654% to 17.415%, respectively, suggesting improved hydrophobic interactions within the polymeric network. The film thickness increased from 0.141 to 0.231 mm, total color difference (ΔE) increased from 20.99 to 43.47, and whiteness index (WI) decreased from 82.71 to 51.11, demonstrating that the incorporation of extracts led to more intense coloration. The antioxidant activity, measured as DPPH radical inhibition, increased remarkably from 39.889% to 71.021% ($p < 0.001$), confirming the strong radical scavenging potential of the incorporated extracts. Malva extract showed notable antimicrobial effects, with inhibition zones of 8 mm (MIC = 13.86 ppm) against *S. aureus* and 9 mm (MIC = 24.67 ppm) against *E. coli*, highlighting its effectiveness as a natural antimicrobial agent.

SEM and AFM analyses revealed improved surface uniformity and better compatibility between gelatin and chitin nanofibers in the presence of the extracts, while XRD results indicated that the semi-crystalline nature of the films remained largely unchanged. FTIR spectra confirmed hydrogen bonding interactions between the hydroxyl and amide groups of the extracts and the polymeric matrix, validating molecular-level compatibility. The pH-sensitivity evaluation demonstrated a distinct color shift across the pH range of 1 to 14, from red in strongly acidic conditions to yellow under alkaline environments. This visible and reversible color transition indicated the suitability of the films as pH-sensitive indicator. In practical application tests, the films successfully detected fish spoilage after 72 hours of storage at refrigerator temperature by exhibiting an obvious and easily perceivable color change corresponding to the increase in pH caused by microbial activity.

Conclusion

Overall, the developed gelatin/chitin nanofiber-based films incorporated with *Malva sylvestris* and *Amaranthus cruentus* extracts exhibited desirable physicochemical, mechanical, antioxidant, and antimicrobial properties, along with excellent pH sensitivity. These multifunctional attributes make the films a promising candidate for use as intelligent and active food packaging materials capable of real-time freshness monitoring. Furthermore, the biodegradable nature of the materials provides an environmentally sustainable alternative to conventional synthetic packaging. Future studies are recommended to investigate the color stability, performance, and long-term durability of these films under refrigerated and industrial storage conditions to support their potential commercialization in smart packaging systems.

Keywords: Chitin nanofiber, Natural color indicator, pH-sensitive biofilm, Smart food packaging

مقاله پژوهشی

جلد ۲۲، شماره ۲، خرداد- تیر ۱۴۰۵، ص. ۱۵۵-۱۲۹

بهینه‌سازی خواص فیلم‌های هوشمند ژلاتین/نانوفیبر کیتین حاوی عصاره‌های گیاهی پنیرک و تاج خروس به روش سطح پاسخ

نادیا ترقی خواه^{۱*}، علی ایاسه^۱، صبا میلانی^۱ - شهرک واتگر^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۸

چکیده

بسته‌بندی مواد غذایی یکی از اجزای کلیدی زنجیره تأمین است که در حفظ کیفیت، ایمنی و افزایش ماندگاری محصولات نقش مهمی دارد و با کاهش ضایعات و تسهیل حمل‌ونقل، ارزش اقتصادی بالایی ایجاد می‌کند. در این پژوهش، فیلم هوشمند زیست‌تخریب‌پذیر حساس به pH بر پایه ژلاتین و نانوفیبر کیتین با استفاده از عصاره‌های گیاه پنیرک (*Malva sylvestris*) و تاج‌خروس (*Amaranthus cruentus*) به‌عنوان شاخص‌های رنگی طبیعی و عوامل زیست‌فعال تهیه و بهینه‌سازی شد. طراحی آزمایش‌ها بر اساس روش سطح پاسخ (RSM) و طرح مرکب مرکزی با دو متغیر مستقل شامل غلظت عصاره‌های پنیرک و تاج‌خروس انجام گرفت. نتایج نشان داد با افزایش همزمان غلظت دو عصاره از ۰/۰۵ تا ۰/۳۵ درصد (پنیرک) و از ۰/۳ تا ۰/۸ درصد (تاج‌خروس)، استحکام کششی فیلم‌ها از ۱/۶۸۷ به ۴/۶۵۴ مگاپاسکال افزایش و ازدیاد طول در شکست از ۲۴/۴۰۵ به ۱۵/۱۰۲ درصد کاهش یافت. نفوذپذیری بخار آب از ۰/۰۱۶۲ به ۰/۰۰۴۱۸ گرم بر (متر^۲×ثانیه^{-۱}×پاسکال) افزایش یافت، در حالی که رطوبت و حلالیت به‌ترتیب از ۲۶/۵۰۱ و ۲۳/۶۵۴ به ۱۹/۰۰۱ و ۱۷/۴۱۵ درصد کاهش یافتند. ضخامت فیلم از ۰/۱۴۱ به ۰/۲۳۱ میلی‌متر و اختلاف رنگ (ΔE) از ۲۰/۹۹ به ۴۳/۴۷ افزایش یافت، اما شاخص سفیدی از ۸۲/۷۱ به ۵۱/۱۱ کاهش یافت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار DPPH) از ۳۹/۸۸۹ به ۷۱/۰۲۱ درصد افزایش یافت ($p < 0.001$). عصاره پنیرک بیشترین اثر ضد میکروبی را در برابر *S. aureus* و *E. coli* نشان داد. بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی روشی، میکروسکوپ نیروی اتمی و پراش اشعه ایکس یکنواختی و سازگاری مناسب فازها را تأیید کرد و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری وجود پیوندهای هیدروژنی را نشان داد. فیلم‌ها در گستره pH ۱ تا ۱۴ تغییر رنگی از قرمز تا زرد داشتند و در بسته‌بندی فیله ماهی کپور، پس از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای یخچال فساد نمونه را از طریق تغییر رنگ آشکار شناسایی کردند. این فیلم‌ها با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و حساس به pH می‌توانند به‌عنوان بسته‌بندی هوشمند فعال در ارزیابی تازگی مواد غذایی به کار روند.

واژه‌های کلیدی: بسته‌بندی هوشمند مواد غذایی، شاخص رنگی طبیعی، فیلم زیستی حساس به pH، نانوفیبر کیتین

مقدمه

شده است. سالانه بیش از ۳۸۰ میلیون تُن پلاستیک تولید می‌شود که نزدیک به ۴۰٪ آن‌ها برای بسته‌بندی مواد غذایی به کار می‌رود و سهم قابل توجهی از آلودگی جهانی را تشکیل می‌دهد. از آنجاکه اغلب این پلیمرها غیرقابل تجزیه هستند، جایگزینی آن‌ها با مواد

در دهه‌های اخیر، استفاده گسترده از پلیمرهای سنتزی در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی به دلیل قیمت پایین، وزن سبک و سهولت فرآیندپذیری، به یکی از اصلی‌ترین چالش‌های زیست‌محیطی تبدیل

۱- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- شرکت آذرنان نظری

(*)- نویسنده مسئول: (Email: taraghikhaah@gmail.com)

۳- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد تهران، تهران، ایران

نانوفیبر کیتین و دو عصاره طبیعی با ویژگی‌های مکمل زیستی و رنگی پرداخته‌اند. اغلب تحقیقات پیشین تنها از یک منبع رنگی یا یک افزودنی فعال استفاده کرده‌اند و به بهینه‌سازی کمی خواص فیزیکوشیمیایی و عملکردی فیلم‌ها کمتر توجه شده است (Elhadeh et al., 2024a). از این رو، هنوز نیاز به توسعه فیلم‌هایی وجود دارد که علاوه بر پایداری مکانیکی مناسب، توانایی تشخیص بصری فساد مواد غذایی را نیز دارا باشند.

هدف و نوآوری پژوهش

هدف این پژوهش، توسعه و بهینه‌سازی فیلم هوشمند زیست‌تخریب‌پذیر حساس به pH بر پایه ژلاتین و نانوفیبرهای کیتین حاوی عصاره‌های پنیرک و تاج‌خروس به‌عنوان شاخص‌های رنگی طبیعی و ترکیبات زیست‌فعال است. نوآوری پژوهش حاضر در ترکیب دو عصاره گیاهی با عملکرد رنگی و آنتی‌اکسیدانی مکمل و به‌کارگیری روش طراحی آزمایش سطح پاسخ (RSM) برای بهینه‌سازی هم‌زمان خواص مکانیکی، فیزیکی و عملکردی فیلم‌ها است. این فیلم‌ها علاوه بر ویژگی‌های زیست‌تخریب‌پذیری و سازگاری با محیط‌زیست، قادرند تغییرات pH ناشی از فساد مواد غذایی را از طریق تغییر رنگ قابل رؤیت نشان دهند و در بسته‌بندی محصولات حساس مانند فیله ماهی کاربرد عملی دارند.

مواد و روش‌ها

ژلاتین حیوانی استخراج شده از ماهی در آزمایشگاه فرمولاسیون مرکز تحقیقات کاربردی دارویی تبریز تهیه شد، نانوفیبر کیتین از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان، گیاه تاج‌خروس و پنیرک از بازار محلی تبریز، گلیسرول و پلی‌سوربات ۸۰ از شرکت مرک آلمان، مولر هیتون آگار از شرکت سیگما آلدردیج تهیه گردید. علاوه بر این، اشریشیاکلی (PTCC1163) و استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC1764) از آزمایشگاه مرکزی دانشگاه تبریز تهیه گردید.

نانوفیبرهای کیتین (Chitin nanofibers, CNFs) با درجه خلوص $\leq 99.5\%$ ، غلظت 2% و قطر نانوفیبر $30-50$ نانومتر از شرکت NanoNovin Co. (Tehran, Iran) تأمین گردید. حلال‌ها و مواد شیمیایی شامل اسید استیک (CH_3COOH , $\geq 99.8\%$)، اتانول مطلق $\geq 99.9\%$ و سدیم هیدروکسید (NaOH , $\geq 98\%$) از برند Merck KGaA (Darmstadt, Germany) با گرید تحلیلی استفاده شدند.

برای استخراج رنگدانه‌های طبیعی، گل‌های خشک پنیرک (*Malva sylvestris*) و تاج‌خروس (*Amaranthus cruentus*) از

زیست‌تخریب‌پذیر حاصل از منابع تجدیدپذیر نظیر پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و زیست‌پلیمرهای طبیعی به یکی از رویکردهای نوین در علوم غذایی تبدیل شده است (Ahmed et al., 2018).

یکی از فناوری‌های نوین در این حوزه، بسته‌بندی هوشمند (Smart Packaging) است. بسته‌بندی هوشمند، سامانه‌ای است که وضعیت کیفی و ایمنی مواد غذایی را در طول زمان نگهداری پایش کرده و تغییرات فیزیکی، شیمیایی یا میکروبی را از طریق پاسخ رنگی یا سیگنال‌های قابل تشخیص نشان می‌دهد (Kuswandi, Oktaviana, & Abdullah, 2023). در این میان، فیلم‌های حساس به pH از مهم‌ترین انواع بسته‌بندی‌های هوشمند محسوب می‌شوند، زیرا تغییرات ناشی از فساد مواد غذایی (مانند افزایش آمونیاک و آمین‌های فرار) با تغییر pH همراه است که می‌تواند باعث تغییر رنگ در فیلم‌های دارای شاخص رنگی شود (Tahir, Ahmed, & Mehmood, 2024). اصلی‌ترین ترکیبات رنگی مورد استفاده در این فیلم‌ها، آنتوسیانین‌ها و بتالین‌ها هستند؛ ترکیبات طبیعی محلول در آب که بر اثر تغییر pH، ساختار مولکولی و در نتیجه طیف رنگی آن‌ها از قرمز (در محیط اسیدی) به بنفش، آبی و زرد (در محیط قلیایی) تغییر می‌کند. این ویژگی امکان طراحی بسته‌بندی‌های هشداردهنده فساد را فراهم می‌سازد (Hong, Wang, Liu, & Zhang, 2022).

در میان پلیمرهای زیستی، ژلاتین به‌دلیل خاصیت فیلم‌سازی عالی، شفافیت، زیست‌سازگاری و توانایی ترکیب با افزودنی‌های طبیعی، یکی از پرکاربردترین گزینه‌ها در تهیه فیلم‌های خوراکی است. با این حال، محدودیت‌هایی مانند شکنندگی و حساسیت به رطوبت، استفاده از آن را به تنهایی محدود می‌کند. برای بهبود این خواص، ترکیب ژلاتین با نانوفیبرهای کیتین پیشنهاد شده است. نانوفیبرهای کیتین ساختاری متخلخل، مقاوم و زیست‌سازگار دارند که باعث افزایش استحکام مکانیکی، پایداری حرارتی و کاهش نفوذپذیری به بخار آب می‌شوند (Fernández-Marín, Fernandes, Sanchez, & Labidi, 2022). از سوی دیگر، گیاهان دارویی و خوراکی حاوی ترکیبات زیست‌فعال همچون پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها، گزینه‌ای مؤثر برای افزودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی به فیلم‌های زیستی هستند. عصاره پنیرک (*Malva sylvestris*) به‌دلیل غنای بالا از مالویدین، فلاونول‌ها و اسیدفولیک، اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی قابل توجهی دارد (Batiha et al., 2023). همچنین، عصاره تاج‌خروس (*Amaranthus cruentus*) حاوی بتالین‌ها و پلی‌فنول‌های متنوع است که علاوه بر نقش رنگی طبیعی، توانایی مهار اکسیداسیون و فعالیت ضد میکروبی دارند (Kanatt, 2020).

با وجود پژوهش‌های متعددی در زمینه فیلم‌های هوشمند بر پایه پلیمرهای زیستی، مطالعات اندکی به بررسی ترکیب هم‌زمان ژلاتین،

۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد (Gasparetto, Martins, Hayashi, Otuky, & Pontarolo, 2012).

روش تهیه فیلم

جهت تهیه فیلم‌ها، ابتدا نانوفیبر کیتین در آب مقطر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حل و به مدت ۲۰ دقیقه توسط دستگاه همزنایزر اولتراتوراکس T 50 Digital Ultraturax همگن گردید. سپس ژلاتین در آب مقطر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد حل شده و با همزن مغناطیسی مخلوط شد. محلول نانوفیبر کیتین به محلول ژلاتین اضافه و مجدداً همزده شد تا مخلوط یکنواختی به دست آید. در ادامه، گلیسرول به عنوان پلاستی سایزر و تثبیت ۸۰ به عنوان امولسیفایر به محلول اضافه شد و به طور کامل مخلوط گردید. عصاره پنیرک و عصاره تاج خروس مطابق تیمار بندی‌های انجام شده به محلول پایه اضافه و به مدت کوتاهی همزده شد تا ترکیب یکنواخت حاصل شود. مخلوط نهایی در پلیت‌های پلاستیکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک گردید. فیلم‌ها تا زمان انجام آزمایش‌ها در محیط تاریک نگهداری شدند (Asdaghi & Pirs, 2020).

ارزیابی ضخامت

جهت تعیین ضخامت فیلم‌ها، از یک میکرومتر دیجیتالی (Cotex tools) با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر استفاده گردید. اندازه‌گیری‌ها در ۵ نقطه مختلف فیلم انجام گردید سپس میانگین‌گیری شد (Batiha et al., 2023).

محتوای رطوبتی

جهت اندازه‌گیری محتوای رطوبتی فیلم‌ها، نمونه‌ها در ابعاد ۳×۳ سانتی‌متر مربع آماده شدند. نمونه‌های آماده شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در دسیکاتور به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. پس از گذشت زمان لازم، وزن اولیه نمونه‌های فیلم با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری گردید. سپس نمونه‌ها در آون Behdad (BC OVEN 70) در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و پس از سپری شدن زمان لازم وزن نهایی نمونه‌های فیلم تعیین گردید. مقدار رطوبت نمونه‌های فیلم از رابطه زیر محاسبه گردید (Bilgiç, Söğüt, & Seydim, 2019):

$$MC\% = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad (1)$$

که W_i وزن اولیه نمونه‌های فیلم و W_f وزن نهایی نمونه‌های فیلم می‌باشد.

بازار محلی (تبریز، ایران) تهیه شدند. نمونه‌ها پیش از استخراج به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک و در ظرف دربسته نگهداری شدند.

استخراج ژلاتین

جهت بهبود بازده و کیفیت استخراج ژلاتین، عصاره پوست ماهی تحت فرآیند اولتراسوند با استفاده از پروب انجام شد. پس از پیش‌تراش و شستشوی پوست، نمونه‌ها در آب مقطر قرار گرفتند و با پروب اولتراسوند در فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و شدت ۵۰۰ وات به مدت ۱۵ دقیقه تحت ارتعاش قرار گرفتند. این فرآیند باعث شکست ساختار بافت و آزادسازی سریع‌تر پروتئین‌ها شد. عصاره حاصل پس از فیلتراسیون و تغلیظ، برای تولید پودر ژلاتین از طریق خشک‌کن اسپری (دمای ورودی ۱۷۵ درجه سانتی‌گراد و دمای خروجی ۸۵ درجه سانتی‌گراد) خشک و تا زمان استفاده نگهداری شد (Valcarcel, Hermida-Merino, Piñeiro, Hermida-Merino, & Vázquez, 2021).

تهیه عصاره برگ تاج‌خروس

در ابتدا برگ‌ها جدا، شسته و در آون هوای گرم در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. برگ‌های خشک شده به پودر بسیار ریز آسیاب و با آب مقطر حاوی ۰/۱ مولار اسید سیتریک استخراج گردیدند. نسبت پودر برگ به حلال ۱:۱۰ در نظر گرفته شد و مخلوط به مدت ۱۸ ساعت در شیکر مداری با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در سرعت ۱۲۱۰۰ g $\times$ سانتریفیوژ SIGMA (UNIVERSAL320) شد و سوپرناتان حاصل فیلتر گردید (Hu, Yao, Qin, Yong, & Liu, 2020). عصاره به دست آمده برای تمامی تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج عصاره گیاه پنیرک

جهت استخراج عصاره گلبرگ گیاه پنیرک، مقدار مشخصی از گل خشک شده پنیرک به نسبت ۱:۲۰ (وزنی/وزنی) به اتانول ۲۰ درصد اضافه شد. سپس ۰/۱۵ درصد (وزنی/حجمی) اسید سیتریک به مخلوط اضافه شده و pH محلول با استفاده از اسیدکلریدریک ۶ مولار به ۲/۵ تنظیم گردید. مخلوط به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و در تاریکی بر روی همزن مغناطیسی (Alfa (D-500) قرار گرفت. محلول استخراج شده با کاغذ فیلتر واتمن شماره یک صاف شد. سپس عصاره به دست آمده برای تبخیر حلال الکلی، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه روتاری اواپراتور (Vargha Tajhiz) تغلیظ شد. عصاره حاصل با سانتریفیوژ در سرعت 5500 rpm جهت ته‌نشین شدن ذرات معلق قرار گرفت و سپس مجدداً توسط کاغذ فیلتر واتمن شماره یک فیلتر شد. عصاره نهایی تا زمان استفاده در دمای

شفافیت

برای تعیین شفافیت، فیلم‌ها به صورت نوارهایی به ابعاد $0.4 \times 1/8$ سانتی‌متر بریده شده و داخل سل اسپکتروفتومتر (Pharmacia Ultrospec 2000 (Biotech قرار داده شدند. سل خالی به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. سپس میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و شفافیت فیلم طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Dong et al., 2020):

$$\text{Transparency (\%)} = \frac{T_{600}}{d} \quad (2)$$

که در این رابطه، T_{600} میزان جذب نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر و d ضخامت نمونه‌های فیلم به میلی‌متر است.

نفوذپذیری بخار آب

میزان نفوذپذیری فیلم تولید شده در برابر بخار آب به روش E96 مصوب ASTM اندازه‌گیری شد. از ویال‌های شیشه‌ای برای اندازه‌گیری استفاده گردید و درون آنها آب ریخته شد و سطح ویال‌ها با فیلم پوشانده شد. سپس فیلم توسط گریس به ویال‌ها فیکس شده و درون دسیکاتور حاوی سلیکاژل قرار داده شدند. ویال‌ها به مدت ۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند و به صورت دوره‌ای هر یک ساعت وزن شدند. آب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رطوبت ۱۰۰٪ ایجاد می‌کند. اختلاف رطوبت در دو سمت فیلم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اختلاف فشار بخاری معادل $2/337 \times 10^3$ پاسکال ایجاد می‌کند. تغییرات وزن ویال‌ها در طول زمان با استفاده از ترازوی دیجیتال AND GR-202 اندازه‌گیری شد. سپس با رسم منحنی تغییرات وزن ویال نسبت به زمان، یک نمودار خطی حاصل شد که نرخ انتقال بخار آب معادل با شیب خط حاصله تقسیم بر سطح سلول است. نفوذپذیری نسبت به بخار آب با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Elhadeif et al., 2024a):

$$WVTR = \frac{WVRT \times X}{2/337 \times 10^3} \quad (3)$$

که در آن $WVTR^1$ (g·mm/(m²·day·kPa)) نرخ انتقال بخار آب X ضخامت فیلم بر حسب میلی‌متر می‌باشد.

حالات

جهت تجزیه و تحلیل قابلیت انحلال، فیلم‌های به صورت مربع‌های 2×2 سانتی‌متر مربع بریده شدند و در آن دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. سپس وزن اولیه فیلم‌های خشک ثبت شد. فیلم‌ها در لوله‌های درپوش‌دار پیچی در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر

غوطه‌ور شدند و به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق به آرامی هم‌زده شدند. سپس کل محلول شامل مواد نامحلول و فاز محلول روی کاغذ صافی ریخته شد تا مواد جامد نامحلول از محلول حاصل جدا شدند. در نهایت مواد جامد نامحلول در آن در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک شده و وزن گردیدند (وزن نهایی فیلم). درصد انحلال فیلم در آب از طریق معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad (4)$$

که W_i وزن اولیه فیلم و W_f وزن نهایی فیلم می‌باشد (Freitas et al., 2020).

خواص مکانیکی

نمونه‌های فیلم به مدت ۲۴ ساعت در رطوبت نسبی ۳۰ درصد مشروط شده و سپس خواص مکانیکی آنها اندازه‌گیری شد. ضخامت فیلم‌ها با استفاده از میکرومتر دیجیتالی دستی اندازه‌گیری شد (در ۱۰ نقطه تصادفی فیلم). جهت اندازه‌گیری خواص مکانیکی، نمونه‌ها بر روی دستگاه آزمون کشش Bongshin DBBP-20 (ساخت کشور کره) با فاصله اولیه ۳۰ میلی‌متر بین فک‌ها و سرعت آزمایش ۱۰ میلی‌متر بر دقیقه قرار داده شدند.

آزمون کشش در دمای اتاق انجام گرفت و دستگاه، تغییرات نیرو و طول را به صورت هم‌زمان ثبت نمود تا منحنی تنش-کرنش برای هر نمونه ترسیم شود. استحکام کششی TS^4 به عنوان بیشینه مقدار تنش در لحظه‌ی گسیختگی از رابطه زیر محاسبه شد:

$$TS \text{ (MPa)} = \frac{P}{b \times d} \quad (5)$$

که در آن P بار شکست بر حسب نیوتن، b عرض نمونه بر حسب میلی‌لیتر، d ضخامت نمونه بر حسب میلی‌متر می‌باشد.

همچنین ازدیاد طول در نقطه شکست EAB^5 از نسبت افزایش طول نمونه در لحظه‌ی گسیختگی به طول اولیه، طبق رابطه زیر محاسبه گردید (Gasti et al., 2021):

$$EAB \text{ (\%)} = \frac{L - L_0}{L_0} \quad (6)$$

L_0 و L به ترتیب طول اولیه و بعد از کشش فیلم بر حسب میلی‌متر می‌باشد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها (۵۰ میلی‌گرم) با استفاده از آزمون مهار رادیکال DPPH ارزیابی شد. به طور خلاصه ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول آبی حاوی یک فیلم با ۳/۵ میلی‌لیتر از محلول متانول حاوی

4- Tensile Strength
5- Elongation at Break

1- Water Vapor Transmission Rate
2- Initial weight
3- Final weight

دیسک انتشار^۳

برای ارزیابی اثر ضد میکروبی فیلم‌ها از روش انتشار دیسک روی دو سویه اشیریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. فیلم‌ها با دستگاه پانچ به دیسک‌هایی با قطر ۴ میلی‌متر بریده شدند. یک صفحه مولر هینتون آگار تهیه و سطح آن با باکتری‌های مورد آزمایش در غلظت 10^5-10^6 cfu/ml تلقیح شد. دیسک‌های فیلم روی سطح آگار قرار داده شدند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و ناحیه مهار به‌عنوان هاله شفاف اطراف دیسک‌ها با میکرومتر دیجیتالی اندازه‌گیری شد (Vidal et al., 2021).

میکروسکوپ الکترونی روبشی

جهت بررسی ساختار و ریزساختار سطح و ویژگی‌های مورفولوژی فیلم‌های تهیه شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM- TESCAN MIRA3-FEG) استفاده شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها، تکه‌های کوچکی از قسمت میانی نمونه برش داده و بر روی استند مخصوص قرار گرفتند و تحت خلأ با لایه‌ای از طلا پوشش داده شدند. سپس نمونه‌ها به دستگاه منتقل شده و تصاویر با بزرگ‌نمایی‌های مختلف ثبت شدند (Wu et al., 2020).

طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوری

برای به‌دست آوردن اطلاعات درباره برهمکنش‌های میان اجزا و گروه‌های عاملی مختلف، طیف FTIR فیلم‌ها با استفاده از اسپکترومتر FTIR (FTIR-8400S) در محدوده $4000-400$ cm⁻¹ در دمای اتاق انجام شد و تحت بازتاب کلی تضعیف شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Yi et al., 2023).

پراش پرتو ایکس

جهت تحلیل ساختار کریستالی فیلم‌ها، آزمون پراش پرتو ایکس انجام شد. نمونه‌های فیلم به ابعاد $1/5 \times 1$ سانتی‌متر مربع برش داده شدند و پرتوهای تابشی از نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در محدوده زاویه مشخص ثبت گردید (Confocal Raman Microscope). نمودارهای مربوطه ترسیم شدند و سرعت آنالیز $2^\circ\text{C}/\text{min}$ بود (Sani, Tavassoli, Hamishehkar, & McClements, 2021).

DPPH (۰/۰۰۴٪) ترکیب شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب محلول در ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکترومتر UV-vis Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) ثبت شد. جذب محلول استاندارد بدون تیمار به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Hashim et al., 2022):

$$\text{Quenching (\%)} = \frac{A_{DPPH} - A_{\text{Sample}}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (7)$$

که در این فرمول، A_{DPPH} میزان جذب محلول کنترل و A_{Sample} جذب محلول تیمار شده است.

رنگ‌سنجی

برای تعیین پارامترهای رنگی از روش پردازش تصویر به‌عنوان مثال (روشنایی / روشنی)، a (قرمزی / سبزی) و b (زردی / آبی) نمونه‌های فیلم استفاده شد. این پارامترهای رنگی با استفاده از دستگاه هانترب لب دستی ColorFlex EZ – HunterLab و دوربین دیجیتالی در آزمایشگاه بیوفیزیک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز اندازه‌گیری شدند. کاغذ سفید به‌عنوان مرجع استفاده شد. تفاوت کلی رنگ (ΔE) و شاخص سفیدی (WI)^۱ نیز با استفاده از روابط زیر محاسبه گردیدند (He et al., 2022):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (8)$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L)^2 + a^2 + b^2} \quad (9)$$

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد^۲

حداقل غلظتی از ماده مؤثر که توانایی مهار رشد میکروارگانیسم را دارد، MIC است. از آزمایش سری رقت برای به‌دست آوردن MIC استفاده شد. در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت نوترینت براث در تمامی چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه به غیر از چاهک‌های ستون اول ریخته شد. سپس حجم مورد نظر برای اولین چاهک با توجه به دانسیته عصاره و امولسیون، انتخاب شد و سری رقت از این چاهک‌ها ایجاد شد. بعد از آن ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و در نهایت در یک انکوباتور (Memmert) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و بعد از گذشت زمان لازم نتیجه تست MIC خوانده شد. در واقع MIC معادل غلظت اولین چاهکی است که در آن رشد باکتری به لحاظ چشمی قابل تشخیص نباشد (Vidal, Velásquez, Galotto, & López de Dicastillo, 2021).

میکروسکوپ نیروی اتمی

ویژگی‌های توپوگرافی فیلم‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) PerkinElmer مدل Spectrum Two مورد مطالعه قرار گرفت. تمامی نمونه‌های فیلم به مدت دو روز در دمای اتاق و رطوبت نسبی ۵۵٪ مشروط شدند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Nano surf تحلیل گردید (Sohany, Tawakkal, Ariffin, & Shah, & Yusof, 2021).

واکنش فیلم‌ها به تغییرات pH

برای بررسی تغییرات رنگ فیلم‌ها در پاسخ به تغییرات pH، فیلم‌ها به ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر مربع بریده شدند. سپس در محلول‌های بافر (۱- pH=۱۴) غوطه‌ور شده تا پتانسیل آن‌ها به عنوان شاخص‌های رنگی اندازه‌گیری شود. از فیلم بعد از ۱۰ دقیقه تماس با محلول‌های بافر عکس گرفته شد (Khezerlou, Tavassoli, Alizadeh Sani, & Ehsani, & McClements, 2023).

آزمون بسته‌بندی

برای بررسی تغییر رنگ فیلم‌ها، از آن‌ها برای بسته‌بندی فیلم‌های ماهی استفاده شد تا تأثیر زمان و عوامل مختلف بر رنگ فیلم‌ها ارزیابی شود. فیلم‌های ماهی با وزن تقریبی ۱۵۰ گرم از فروشگاه تهیه شده و درون فیلم‌های بسته‌بندی قرار گرفتند. دو طرف فیلم‌ها به هم چسبانده شد و بسته‌بندی‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای یخچال نگهداری شدند. تغییرات رنگ فیلم‌ها هر ۶ ساعت با استفاده از دوربین دیجیتالی ثبت گردید (Khezerlou et al., 2023).

تحلیل پروفیل اسیدهای چرب با کروماتوگرافی گازی

به منظور ارزیابی اثر استفاده از فیلم‌های بسته‌بندی زیست‌تخریب‌پذیر بر حفظ کیفیت لیپیدی ماهی، پروفیل اسیدهای چرب نمونه‌ها تعیین شد. برای این منظور، نمونه‌های ماهی پس از بسته‌بندی با فیلم‌های تهیه‌شده و نگهداری در شرایط سردخانه‌ای، استخراج لیپید شدند و متیل‌استر اسیدهای چرب تهیه گردید. سپس

ترکیب و نسبت اسیدهای چرب با استفاده از کروماتوگرافی گازی شناسایی و کمی‌سازی شد. هدف از این آزمون بررسی تغییرات احتمالی در پروفیل اسیدهای چرب تحت تأثیر بسته‌بندی و ارزیابی توانایی فیلم‌ها در حفظ کیفیت تغذیه‌ای ماهی طی نگهداری بود (Goluch, Rybarczyk, Polawska, & Haraf, 2023).

آنالیز آماری

طراحی آزمایش‌ها بر اساس روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology, RSM) و با استفاده از طرح مرکب مرکزی (Central Composite Design, CCD) انجام شد. این طرح شامل ۱۵ تیمار آزمایشی تصادفی‌سازی شده (Randomized) بدون بلاک بود و برای برازش داده‌ها از مدل درجه دوم (Quadratic model) استفاده گردید.

دو متغیر مستقل شامل غلظت عصاره پنیرک (*Malva sylvestris*) (A) در بازه ۰/۰۵ تا ۰/۳۵ درصد وزنی/حجمی و غلظت عصاره تاج‌خروس (*Amaranthus cruentus*) (B) در بازه ۰/۳ تا ۰/۸ درصد وزنی/حجمی به عنوان عوامل عددی در نظر گرفته شدند (جدول ۱). سطوح متغیرها به صورت کدگذاری شده (۱-، ۰ و ۱+) تعریف گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Design-Expert نسخه ۱۱ انجام شد. معنی‌داری مدل‌ها و ضرایب رگرسیونی با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و در سطح اطمینان ۹۵٪ ($p > 0.05$) ارزیابی گردید. کفایت مدل‌ها بر اساس ضریب تعیین (R^2)، ضریب تعیین تعدیل شده ($Adj-R^2$)، ضریب پیش‌بینی ($Pred-R^2$)، آزمون عدم برازش (Lack of fit) و مقدار Adequate Precision بررسی شد (جدول ۳). مدل‌هایی که مقدار Adequate Precision آن‌ها بیشتر از ۴ و آزمون عدم برازش آن‌ها غیرمعنی‌دار بود، به عنوان مدل‌های مناسب برای پیش‌بینی پاسخ‌ها انتخاب شدند.

بهینه‌سازی هم‌زمان پاسخ‌ها با استفاده از تابع مطلوبیت (Desirability function) انجام گرفت و ترکیب بهینه متغیرهای مستقل بر اساس بیشینه‌سازی مطلوبیت کلی تعیین شد.

جدول ۱- سطوح کدگذاری شده متغیرهای مستقل در طرح آزمایشی
Table 1- Coded variables of independent variables in the experimental design

متغیرهای مستقل Independent values	متغیرهای آزمایشی و کدگذاری شده Experimental and coded variables		
	-1	0	+1
A	0,05	0,2	0,35
B	0,3	0,55	0,8

A و B به ترتیب غلظت عصاره پنیرک و عصاره تاج خروس

A and B represent the concentrations of malva extract and amaranth extract, respectively.

جدول ۲- تیمار بندی طرح
Table 2- Treatment plan

شاخص	تغییرات	محتوای	نفوذپذیری به	خاصیت آنتی	ازدیاد طول	استحکام کششی	شفافیت	حلالیت	ضخامت	تیمار
سفیدی	رنگ	رطوبت	بخار آب	اکسیدانی	Elongation	Tensile strength	Transpa rency	Solubility	Thickness	Treatment
Whiteness index	Color difference	Moisture content	Water vapor permeability	Antioxidant activity						
64.99	28.29	19.121	0.00165	70.566	22.203	4.654	0.96	17.415	0.231	1
53.09	40.48	24.012	0.00208	54.691	19.252	3.102	1.326	21.805	0.192	2
82.71	21.72	21.564	0.00202	61.366	15.102	3.431	1.968	20.525	0.198	3
70.07	30.61	25.365	0.00362	45.988	20.366	2.145	1.589	23.012	0.154	4
76.01	25.73	26.501	0.00402	40.201	16.414	1.687	2.899	23.654	0.148	5
76.15	24.98	26.256	0.00418	39.889	16.023	1.699	2.705	23.054	0.141	6
77.98	26.81	25.606	0.00303	47.802	24.212	2.789	1.121	22.021	0.176	7
65.01	27.88	19.001	0.00162	71.021	22.805	4.64	0.905	17.415	0.228	8
60.02	34.56	20.231	0.00181	65.424	17.561	4.002	1.132	18.252	0.223	9
82.66	20.99	21.505	0.00211	61.902	15.505	3.403	1.881	20.955	0.193	10
65.12	28.04	22.595	0.00196	58.056	23.125	3.995	1.028	19.556	0.204	11
54.09	41.24	23.989	0.00396	54.061	18.989	3.198	1.302	21.805	0.192	12
58.17	33.93	23.421	0.00311	55.015	19.201	3.005	1.389	21.323	0.196	12
51.11	43.47	24.705	0.00322	51.203	16.456	2.361	2.321	22.989	0.161	14
77.98	26.81	25.606	0.00303	47.222	24.405	2.801	1.129	22.301	0.176	15

جدول ۳- آنالیز واریانس ANOVA جهت بررسی اثر عصاره‌های پنیرک و تاج خروس بر فیلم‌های بسته‌بندی بر پایه ژلاتین و نانوفیبر کیتین
Table 3- ANOVA analysis of variance to investigate the effect of malva and amaranth extracts on gelatin and chitin nanofiber-based packaging films

ضریب تعیین / مقدار دقت تعدیل شده	اهمیت	P مقدار	F مقدار	میانگین مربعات	درجه آزادی	اثر	پاسخ
Notes (R ² / Adeq. Precision)	Significance	p-value	F-value	Mean Square	DF	Effect	Response
R ² =0.9665 / AP=36.2	معنی‌دار Significant	<0.0001	172.68	5.54	1	A	ضخامت Thickness
R ² =0.9665 / AP=36.2	معنی‌دار Significant	<0.0001	172.68	5.54	1	B	ضخامت Thickness
R ² =0.9665 / AP=36.2	معنی‌دار Significant	0.002	78.25	2.50	1	AB	ضخامت Thickness
R ² =0.9665 / AP=36.2	معنی‌دار Significant	0.01	56.40	1.80	1	A ²	ضخامت Thickness
R ² =0.9665 / AP=36.2	معنی‌دار Significant	0.01	53.30	1.70	1	B ²	ضخامت Thickness
R ² =0.9698 / AP=22.71	معنی‌دار Significant	<0.0001	57.73	11.42	1	A	حلالیت Solubility
R ² =0.9698 / AP=22.71	معنی‌دار Significant	<0.0001	57.73	11.42	1	B	حلالیت Solubility
R ² =0.9698 / AP=22.71	معنی‌دار Significant	0.03	15.70	3.10	1	AB	حلالیت Solubility
R ² =0.9698 / AP=22.71	غیرمعنی‌دار NS	0.08	7.60	1.50	1	A ²	حلالیت Solubility
R ² =0.9698 / AP=22.71	غیرمعنی‌دار NS	0.09	7.10	1.40	1	B ²	حلالیت Solubility
R ² =0.9945 / AP=49.47	معنی‌دار Significant	<0.0001	327.83	1.14	1	A	شفافیت Transparency
R ² =0.9945 / AP=49.47	معنی‌دار Significant	<0.0001	316.50	1.10	1	B	شفافیت Transparency
R ² =0.9945 / AP=49.47	معنی‌دار Significant	<0.0001	245.50	0.85	1	AB	شفافیت Transparency
R ² =0.9945 / AP=49.47	معنی‌دار Significant	<0.0001	173.40	0.60	1	A ²	شفافیت Transparency
R ² =0.9945 / AP=49.47	غیرمعنی‌دار NS	0.002	115.60	0.40	1	B ²	شفافیت Transparency

استحکام کششی Tensile strength	A	1	6.04	354.33	<0.0001	معنی دار Significant	R ² =0.9883 / AP=65.27
استحکام کششی Tensile strength	B	1	5.90	345.50	<0.0001	معنی دار Significant	R ² =0.9883 / AP=65.27
استحکام کششی Tensile strength	AB	1	2.50	146.30	0.01	غیرمعنی دار NS	R ² =0.9883 / AP=65.27
استحکام کششی Tensile strength	A ²	1	1.80	105.50	0.02	غیرمعنی دار NS	R ² =0.9883 / AP=65.27
استحکام کششی Tensile strength	B ²	1	1.60	94.00	0.03	غیرمعنی دار NS	R ² =0.9883 / AP=65.27
ازدیاد طول Elongation	A	1	21.78	278.97	<0.0001	معنی دار Significant	R ² =0.9789 / AP=39.83
ازدیاد طول Elongation	B	1	17.50	223.80	0.002	غیرمعنی دار NS	R ² =0.9789 / AP=39.83
ازدیاد طول Elongation	AB	1	10.40	133.20	0.01	غیرمعنی دار NS	R ² =0.9789 / AP=39.83
ازدیاد طول Elongation	A ²	1	8.90	114.00	0.02	غیرمعنی دار NS	R ² =0.9789 / AP=39.83
ازدیاد طول Elongation	B ²	1	7.50	95.60	0.03	غیرمعنی دار NS	R ² =0.9789 / AP=39.83
نفوذپذیری بخار آب Water vapor permeability	A	1	22.16	201.80	<0.0001	معنی دار Significant	R ² =0.7928 / AP=12.82
نفوذپذیری بخار آب Water vapor permeability	B	1	20.25	184.50	<0.0001	معنی دار Significant	R ² =0.7928 / AP=12.82
نفوذپذیری بخار آب Water vapor permeability	AB	1	10.50	95.20	0.01	غیرمعنی دار NS	R ² =0.7928 / AP=12.82
محتوای رطوبت Moisture content	A	1	41.66	241.52	<0.0001	معنی دار Significant	R ² =0.9926 / AP=42.70
محتوای رطوبت Moisture content	B	1	39.41	228.10	<0.0001	معنی دار Significant	R ² =0.9926 / AP=42.70
محتوای رطوبت Moisture content	AB	1	10.25	59.32	0.02	غیرمعنی دار NS	R ² =0.9926 / AP=42.70
فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity	A	1	22.16	201.80	<0.0001	معنی دار Significant	R ² =0.9937 / AP=78.98
فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity	B	1	21.66	196.50	<0.0001	معنی دار Significant	R ² =0.9937 / AP=78.98
فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity	AB	1	15.50	140.20	0.002	معنی دار Significant	R ² =0.9937 / AP=78.98
تغییرات رنگ Color difference	A	1	0.41	1.04	0.32	غیرمعنی دار NS	R ² =0.679 / AP=5.02
تغییرات رنگ Color difference	B	1	0.39	0.95	0.35	غیرمعنی دار NS	R ² =0.679 / AP=5.02
تغییرات رنگ Color difference	AB	1	0.21	0.61	0.45	غیرمعنی دار NS	R ² =0.679 / AP=5.02
تغییرات رنگ Color difference	A ²	1	0.18	0.52	0.48	غیرمعنی دار NS	R ² =0.679 / AP=5.02
تغییرات رنگ Color difference	B ²	1	0.16	0.46	0.50	غیرمعنی دار NS	R ² =0.679 / AP=5.02
شاخص سفیدی Whiteness index	A	1	0.41	1.01	0.33	غیرمعنی دار NS	R ² =0.8409 / AP=7.84
شاخص سفیدی Whiteness index	B	1	0.39	0.95	0.35	غیرمعنی دار NS	R ² =0.8409 / AP=7.84
شاخص سفیدی Whiteness index	AB	1	0.21	0.61	0.45	غیرمعنی دار NS	R ² =0.8409 / AP=7.84

(Desirability) را داراست. شرایط بهینه‌سازی برای هر پاسخ بر اساس اهداف مورد نظر شامل: در محدود (In range)، حداقل (Minimize) و حداکثر (Maximize) تعریف شد. همچنین، با توجه به اهمیت نسبی هر فاکتور، ضرایب اهمیت مناسبی برای پاسخ‌ها اختصاص یافت (جدول ۴). نتایج حاصل از بهینه‌سازی عددی نشان داد که ترکیب مطلوب شامل ۵۵۸/۰ درصد عصاره آنتوسیانینی تاج‌خروس و ۱۶۵/۰ درصد عصاره پنیرک است که بیشترین مطلوبیت کلی را برای ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی فیلم نشان داد.

بهینه‌سازی کلی متغیرها برای فیلم بسته‌بندی هوشمند بر پایه ژلاتین/نانوفیبرکیتین حاوی عصاره آنتوسیانینی تاج‌خروس و عصاره پنیرک

به‌منظور تعیین غلظت‌های بهینه دو متغیر مستقل A و B و پیش‌بینی پاسخ‌های بهینه برای دستیابی به فیلمی با بهترین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، بهینه‌سازی عددی با استفاده از روش سطح پاسخ انجام شد. در این روش، نقطه‌ای تعیین می‌شود که بیشترین مقدار مطلوبیت

جدول ۴- بهینه یابی متغیرها
Table 4- Optimization of variables

تیمار	عصاره پنیرک	عصاره تاج خروس
Treatment	Malva extract (w/v%)	Amaranth extract (w/v%)
1	0.165	0.558
2	0.05	0.3
3	0.35	0.8
4	0.2	0.55

افزودن عصاره‌های غنی از پلی‌ساکارید موجب افزایش ویسکوزیته و در نتیجه افزایش ضخامت فیلم‌های پروتئینی می‌شود.

نتایج و بحث ضخامت

ضخامت یکی از پارامترهای مهم برای ارزیابی خواص مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌ها است و تحت تأثیر ترکیب فیلم، پراکندگی و خواص جریانی قرار دارد. آنالیز واریانس (ANOVA) نشان داد که مدل درجه دوم برای پیش‌بینی ضخامت فیلم‌ها معنی‌دار بود ($p < 0/05$) و آزمون عدم پردازش غیرمعنی‌دار گزارش شد ($p > 0/05$)، که نشان‌دهنده برازش مناسب مدل با داده‌های تجربی است. اثرات خطی غلظت عصاره تاج خروس (A) و عصاره پنیرک (B) بر ضخامت فیلم‌ها معنی‌دار بودند، به‌طوری‌که بیشترین ضخامت (۰/۲۳۱ میلی‌متر) مربوط به فیلم حاوی بالاترین غلظت هردو عصاره و کمترین ضخامت (۰/۱۴۱ میلی‌متر) مربوط به پایین‌ترین میزان عصاره‌ها بود (شکل ۱). این افزایش به حضور ترکیبات فنلی و پلی‌ساکاریدی عصاره‌ها و تقویت برهمکنش‌های شبکه پلیمری فیلم ژلاتینی نسبت داده می‌شود. ضریب تعیین مدل ($R^2 = 0/۹۶۶۵$) و دقت پیش‌بینی مدل برابر با ۳۶/۲ توان پیش‌بینی بالای مدل را تأیید کردند.

نتایج مشابهی توسط دانگ و همکاران (Dong et al., 2020) و الحادف و همکاران (Elhadeef et al., 2024b) گزارش شده است، آنان نیز افزایش ضخامت فیلم‌های زیستی حاوی ترکیبات گیاهی را به حضور ترکیبات پلی‌فنلی و افزایش مقاومت شبکه پلیمری نسبت دادند. همچنین بیلگیک و همکاران (Bilgiç et al., 2019) نشان دادند که

محتوای رطوبتی

تحلیل اثرات اصلی و متقابل نشان داد که هردو عصاره به طور مستقل باعث کاهش محتوای رطوبتی شدند و اثر هم‌زمان آن‌ها بیشترین کاهش رطوبت را ایجاد کرده است. بیشترین کاهش رطوبت مربوط به سطح بالای هردو عصاره و کمترین در سطح پایین بود (شکل ۲). کاهش رطوبت ناشی از افزایش تراکم شبکه پلیمری و کاهش گروه‌های هیدروکسیل آزاد است. مقادیر ضریب تعیین مدل ($R^2 = 0/۹۹۲۶$) و دقت پیش‌بینی مدل برابر با ۴۲/۷۰ دقت پیش‌بینی بالا را نشان داد.

مطالعات موسوی و همکاران (Mousavi, Rezaei, & Hashemi, 2021) و حسینی و همکاران (Hosseini, Gómez-Regenstein, 2020) نیز نشان دادند که افزودن عصاره‌های غنی از پلی‌فنل به فیلم‌های ژلاتینی و کیتوزانی باعث کاهش رطوبت می‌گردد. همچنین، کازون و همکاران (Cazón, Velazquez, Ramirez, & Vázquez, 2018) گزارش کردند که افزایش غلظت ترکیبات گیاهی موجب کاهش تخلخل و افزایش تراکم ساختار می‌گردد.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Thickness (mm)

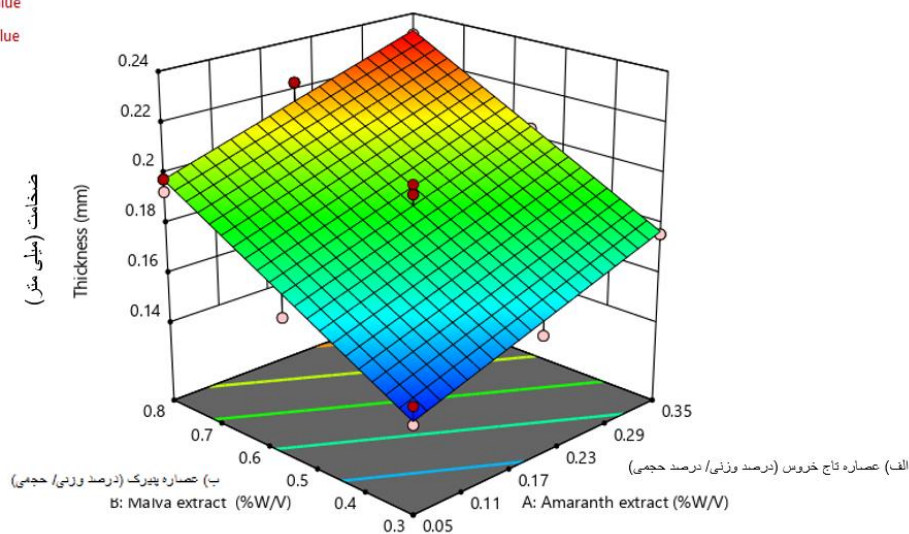
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

0.141 0.231

X1 = A: Amaranth extract

X2 = B: Malva extract



شکل ۱- نمودار سه بعدی ضخامت فیلم‌ها بر اساس دو متغیر

Fig. 1. Three-dimensional plot of film thickness based on two variables

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Moisture (%)

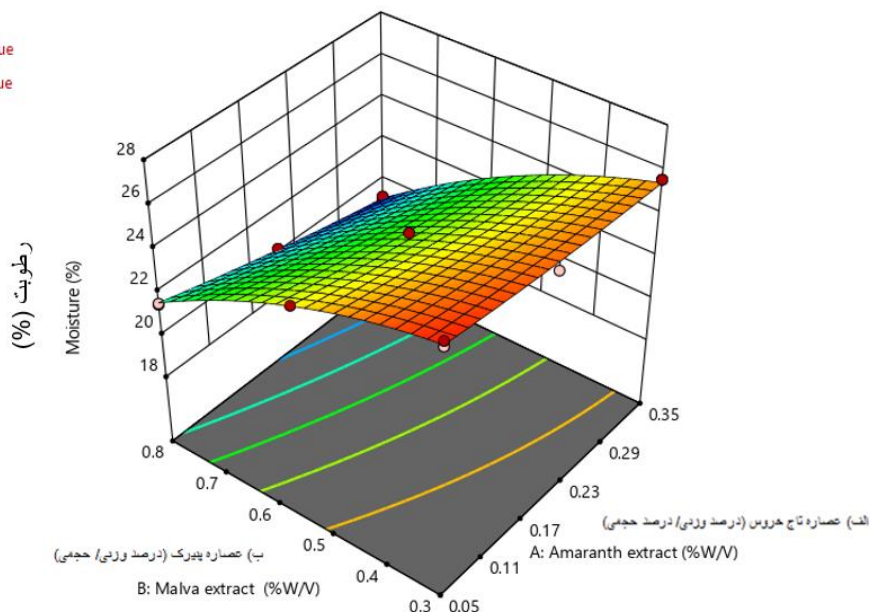
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

19.001 26.501

X1 = A: Amaranth extract

X2 = B: Malva extract



شکل ۲- نمودار سه بعدی رطوبتی محتوای فیلم‌ها بر اساس دو متغیر

Fig. 2. Three-dimensional plot of the moisture content of the films based on two variables

شفافیت

اثرات خطی هر دو عصاره و اثر متقابل آن‌ها بر شفافیت معنی‌دار بود. بیشترین کاهش شفافیت در بالاترین سطح عصاره‌ها و کمترین کاهش در پایین‌ترین سطح مشاهده گردید (شکل ۳). کاهش شفافیت ناشی از پراکندگی نور و تغییر ریزساختار ماتریکس فیلم است. ضریب تعیین مدل ($R^2 = 0.9945$) و قدرت پیش‌بینی مدل برابر با ۴۹/۴۷ گزارش می‌گردد.

مطالعات مشابه توسط موسوی و همکاران (Mousavi *et al.*, 2021)، تانگنان چان و همکاران (Tongnuanchan, Benjakul, & Zhao, Liu, & Chen, 2022) و ژائو و همکاران (Prodpran, 2023) گزارش شده‌اند، که افزودن عصاره‌های گیاهی و رنگدانه‌های طبیعی باعث کاهش شفافیت و افزایش جذب نور می‌شود. حسینی و همکاران (Hosseini *et al.*, 2020). نیز کاهش عبور نور در فیلم‌های ژلاتینی حاوی فنول‌ها را گزارش کردند.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

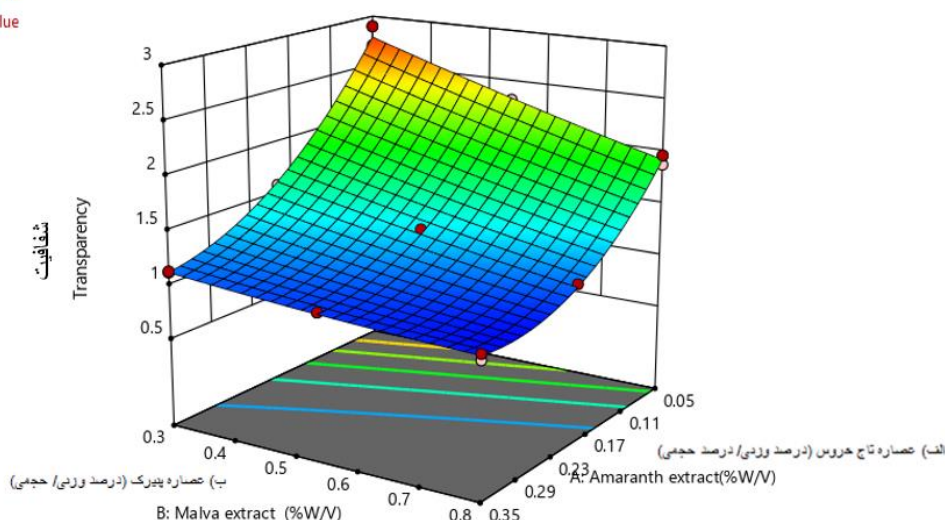
Transparency

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

0.905 2.899

X1 = A: Amaranth extract
X2 = B: Malva extract



شکل ۳- نمودار سه بعدی شفافیت فیلم‌ها بر اساس دو متغیر

Fig. 3. Three-dimensional plot of film transparency based on two variables

ساختار و افزایش ناهنگی سطحی می‌شود. ژائو و همکاران (Zhao *et al.*, 2023) گزارش کردند که حضور رنگدانه‌های آنتوسیانینی با اثرات پلاستیکی و تضعیف برهم‌کنش‌های بین مولکولی باعث افزایش نفوذپذیری بخار آب می‌گردد.

حلالیت

اثرات عصاره‌ها بر کاهش حلالیت معنی‌دار بود و بیشترین کاهش در حضور هم‌زمان عصاره‌ها مشاهده شد (شکل ۵). این اثر به افزایش برهم‌کنش‌های هیدروژنی میان ترکیبات فنلی و گروه‌های قطبی ژلاتین و نانوفیبرهای کیتین نسبت داده می‌شود. $R^2 = 0.9698$ و Adequate precision = ۲۲/۷۱ برازش و توان پیش‌بینی مناسب مدل را تأیید کردند.

نفوذپذیری به بخار آب

مدل درجه دوم برای پیش‌بینی نفوذپذیری بخار آب معنی‌دار بود. هر دو عصاره اثر افزایشی معنی‌داری بر نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌ها داشتند و اثر متقابل آن‌ها نیز قابل توجه بود. بیشترین نفوذپذیری در سطح بالای عصاره‌ها و کمترین در سطح پایین مشاهده شد (شکل ۴). این اثر ناشی از کاهش چگالی شبکه و ایجاد نواحی میکروسکوپی ناهمگن در ماتریکس فیلم است. ضریب تعیین ($R^2 = 0.7928$) با توجه به ماهیت پیچیده انتقال رطوبت قابل قبول است و Adequate precision برابر با ۱۲/۸۲ توان پیش‌بینی مناسب را نشان داد.

مطالعات تانگنان چان و همکاران (Tongnuanchan *et al.*, 2022) نیز گزارش کردند که افزودن عصاره‌های گیاهی یا ترکیبات پلی‌فنلی موجب افزایش نفوذپذیری بخار آب به دلیل کاهش تراکم

۲۰۲۲) نیز کاهش حلالیت فیلم‌های ژلاتینی با افزایش تراکم شبکه پلیمری را گزارش کرده‌اند.

مطالعات نشان داده‌اند که افزودن ترکیبات فنلی و آنتوسیانینی به فیلم‌های پروتئینی موجب کاهش حلالیت و افزایش انسجام ساختار فیلم می‌شود. تانگنان چان و همکاران (Tongnuanchan *et al.*)

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

WVP

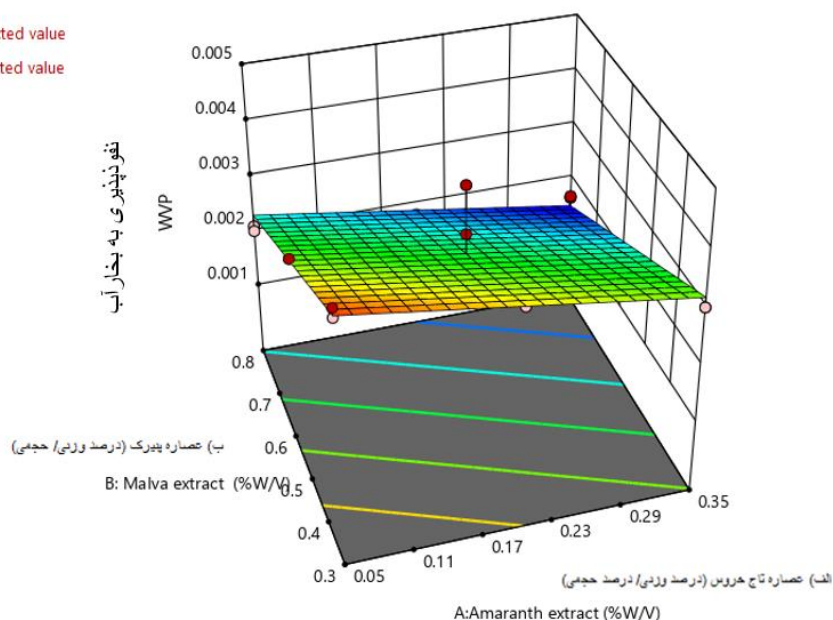
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

0.00162 0.00418

X1 = A: Amaranth extract

X2 = B: Malva extract



شکل ۴- نمودار سه بعدی نفوذپذیری بخار آب فیلم‌ها بر اساس دو متغیر

Fig. 4. Three-dimensional plot of the water vapor permeability of the films based on two variables

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Solubility (%)

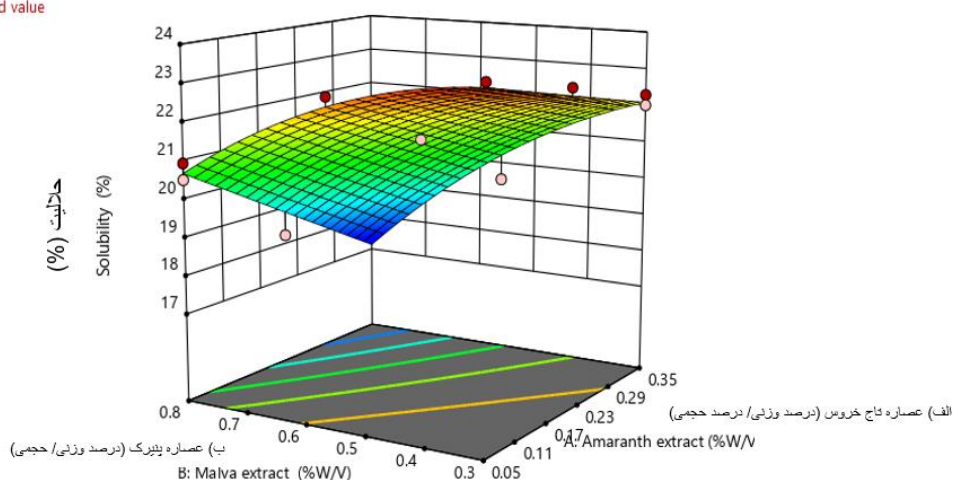
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

17.415 23.654

X1 = A: Amaranth extract

X2 = B: Malva extract



شکل ۵- نمودار سه بعدی حلالیت فیلم‌ها بر اساس دو متغیر

Fig. 5. Three-dimensional plot of the solubility of the films based on two variables

خواص مکانیکی

استحکام کششی فیلم‌ها با افزایش غلظت عصاره‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (بیشترین مقدار: ۴/۶۵۴ مگاپاسکال) و ازدیاد طول در نقطه شکست کاهش یافت (کمترین مقدار: ۱۵/۱۰۲٪) (شکل ۶ و ۷). این تغییرات به برهمکنش میان ترکیبات فنلی و گروه‌ای آمینی/هیدروکسیلی ماتریکس فیلم نسبت داده می‌شود. ضریب تعیین $R^2=0.9883$ و $\text{Adequate precision}=65/27$ قدرت پیش‌بینی بالا را نشان داد.

مطالعات ژائو و همکاران (Zhao et al., 2023) نشان داده است که افزودن عصاره‌های گیاهی موجب تقویت شبکه پلیمری، افزایش استحکام کششی و کاهش ازدیاد طول فیلم‌ها می‌گردد. تانگنان چان و همکاران (Tongnuanchan et al., 2022) نیز گزارش کردند که حضور ترکیبات آنتوسیانینی با ایجاد پیوندهای هیدروژنی بیشتر، انعطاف‌پذیری را کاهش و سختی فیلم را افزایش می‌دهد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها با افزایش غلظت عصاره‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، بیشترین فعالیت (۷۱/۰۲۱٪) مربوط به فیلم با بالاترین غلظت عصاره‌ها و کمترین (۳۹/۸۸۹٪) مربوط به پایین‌ترین میزان عصاره‌ها بود (شکل ۸). این اثر به حضور ترکیبات فنلی و آنتوسیانینی نسبت داده می‌شود که با اهدای هیدروژن و الکترون،

رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کنند. $R^2=0.9937$ و $78/98$ $\text{Adequate precision}$ = نشان‌دهنده قدرت پیش‌بینی بسیار بالا است. مطالعات ژائو و همکاران (Zhao et al., 2023) و الحادف و همکاران (Elhadeb et al., 2024b) گزارش کردند که افزودن عصاره‌های گیاهی غنی از پلی‌فنل‌ها موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها و کاهش اکسیداسیون چربی‌ها در محصولات غذایی می‌شود.

رنگ‌سنجی

شاخص سفیدی (WI) و تغییر رنگ کلی (ΔE) نشان داد که افزایش غلظت عصاره‌ها موجب کاهش شاخص سفیدی و افزایش تغییرات رنگ کلی شد. بیشترین تغییرات رنگ کلی برابر با ۴۳/۴۷ در فیلم با بالاترین غلظت عصاره‌ها مشاهده شد (شکل ۹ و ۱۰). این تغییرات ناشی از حضور رنگدانه‌های طبیعی، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها در عصاره‌ها است. R^2 برای تغییرات رنگ کلی و شاخص سفیدی به‌ترتیب برابر با ۰/۶۷۹ و ۰/۸۴۰۹ و مقادیر $\text{Adequate precision}$ قابل قبول را نشان داد.

مطالعات ژائو و همکاران (Zhao et al., 2023) گزارش کرده که افزودن عصاره‌های غنی از آنتوسیانین باعث کاهش سفیدی، افزایش شدت رنگ و کاهش شفافیت فیلم‌های زیستی می‌گردد.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

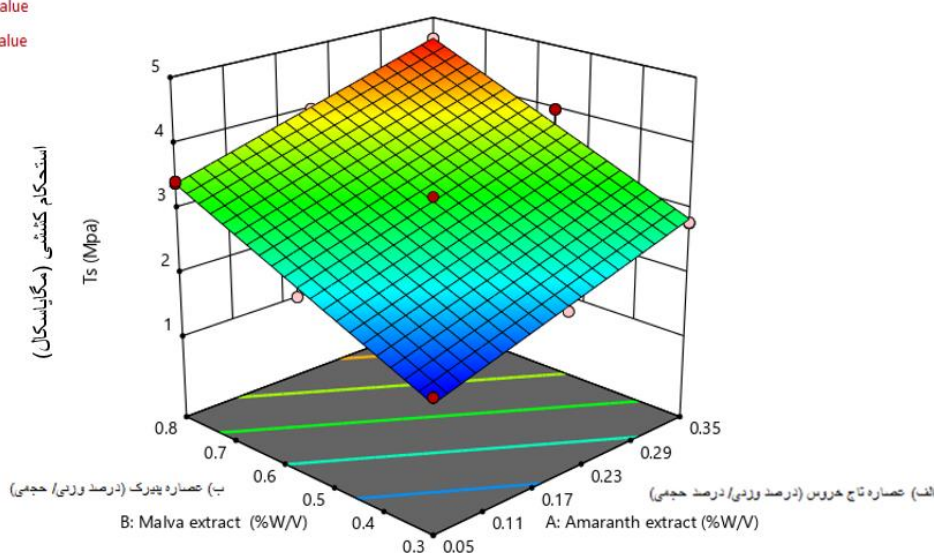
Ts (Mpa)

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

1.687 4.654

X1 = A: Amaranth extract
X2 = B: Malva extract



شکل ۶- نمودار سه بعدی استحکام کششی فیلم‌ها بر اساس دو متغیر

Fig. 6. Three-dimensional plot of the tensile strength of the films based on two variables

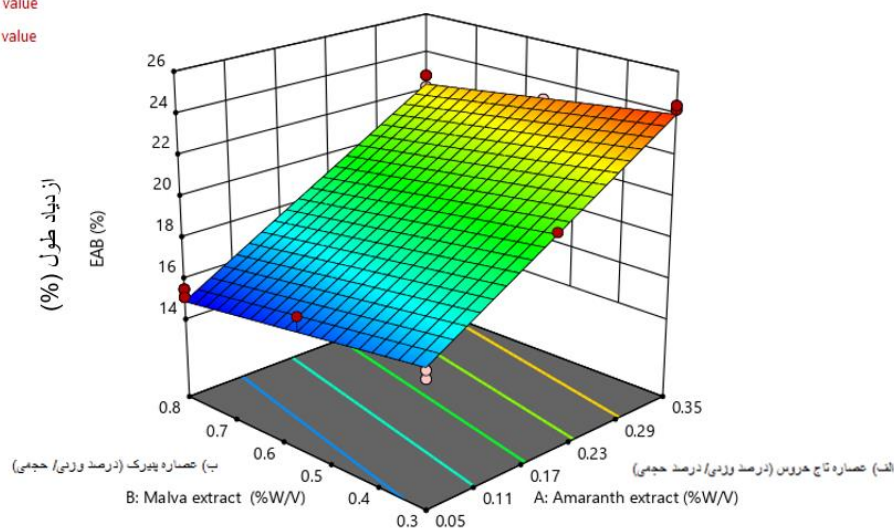
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

EAB (%)

- Design points above predicted value
- Design points below predicted value

15.102 24.405

X1 = A: Amaranth extract
X2 = B: Malva extract



شکل ۷- نمودار سه بعدی ازدیاد طول در شکست بر اساس دو متغیر

Fig. 7. Three-dimensional plot of elongation at break based on two variables

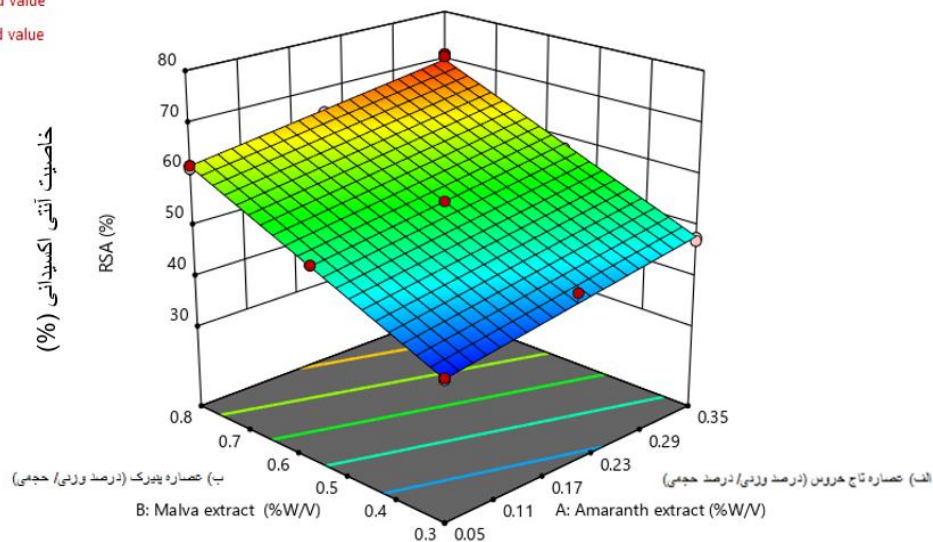
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

RSA (%)

- Design points above predicted value
- Design points below predicted value

39.889 71.021

X1 = A: Amaranth extract
X2 = B: Malva extract



شکل ۸- نمودار سه بعدی خاصیت آنتی اکسیدانی فیلم‌ها بر اساس دو متغیر

Fig. 8. Three-dimensional plot of the antioxidant activity of the films based on two variables

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

E

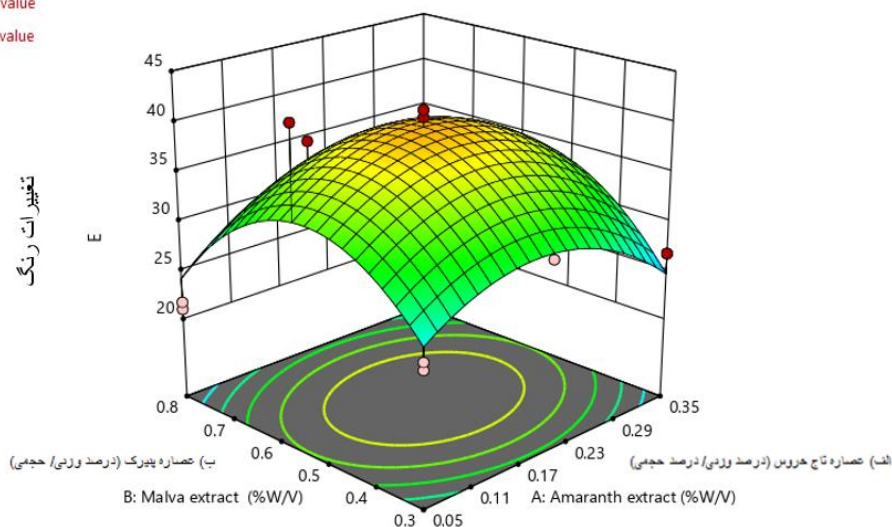
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

20.99 43.47

X1 = A: Amaranth extract

X2 = B: Malva extract



شکل ۹- نمودار سه بعدی اختلاف رنگ فیلم‌ها بر اساس دو متغیر

Fig. 9. Three-dimensional plot of the color difference of the films based on two variables

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

WI

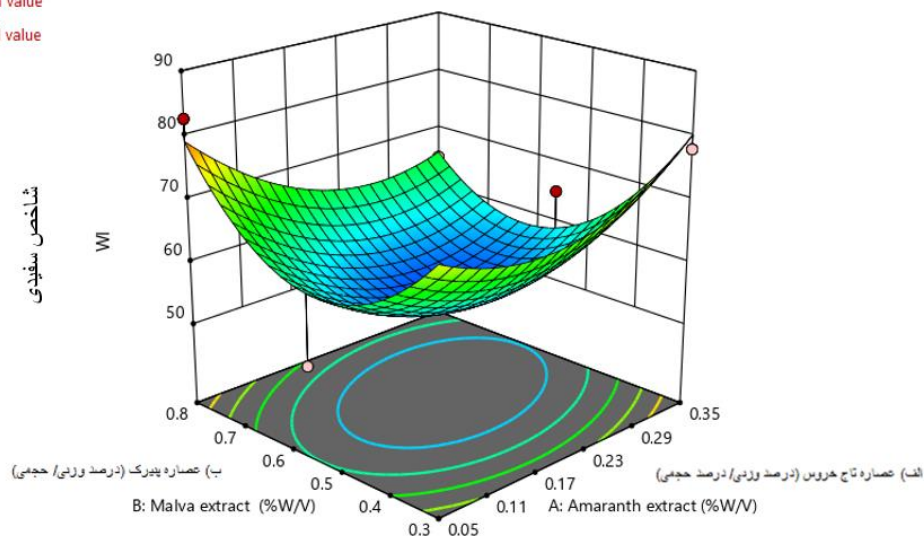
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

51.11 82.71

X1 = A: Amaranth extract

X2 = B: Malva extract



شکل ۱۰- نمودار سه بعدی شاخص سفیدی فیلم‌ها بر اساس دو متغیر

Fig. 10. Three-dimensional plot of the whiteness index of the films based on two variables

نداشت، در حالی‌که فیلم‌های حاوی عصاره‌ها مقادیر MIC متفاوتی نشان دادند. کمترین مقدار MIC مربوط به عصاره پنیرک در برابر استافیلوکوکوس اورئوس (۱۳/۸۶ ppm) و بیشترین مقدار آن در برابر اش‌ریشیاکلی (۲۴/۶۷ ppm) بود. این یافته‌ها بیانگر توان بالقوه ترکیبات زیست‌فعال موجود در پنیرک و تاج‌خروس در مهار رشد باکتری‌های

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد

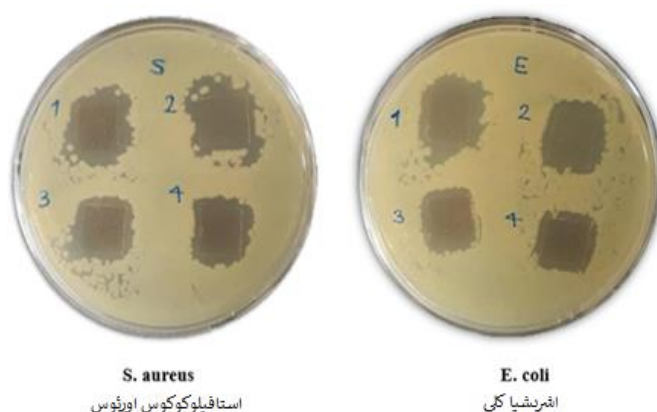
مهار رشد باکتری‌های اش‌ریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس توسط فیلم‌های ژلاتین و نانوفیبر کیتین حاوی عصاره آنتوسیانینی تاج‌خروس و پنیرک با آزمون حداقل غلظت بازدارنده رشد بررسی شد. نتایج نشان داد که فیلم کنترل هیچ‌گونه ممانعتی در برابر رشد باکتری‌ها

بیماری‌زا است. افزایش اثرات ضد میکروبی فیلم‌های غنی‌شده را می‌توان به حضور پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها نسبت داد که از طریق تخریب غشای سیتوپلاسمی، تغییر نفوذپذیری غشاء، مهار آنزیم‌های تنفسی، و اتصال به DNA میکروبی سبب مهار رشد باکتری‌ها می‌شوند. علاوه بر این، ترکیب این عصاره‌ها با ماتریکس ژلاتین و نانوفیبرهای کیتین موجب رهایش تدریجی ترکیبات فعال و حفظ طولانی‌مدت خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها می‌شود (شکل ۱۱).

یافته‌های این پژوهش با گزارش‌های پرانوتو و همکاران (Pranoto, Rakshit, & Salokhe, 2020) و بنبتایب و همکاران (Benbettaieb, Karbowiak, & Debeaufort, 2021) مطابقت دارد. این پژوهشگران نشان دادند که افزودن عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنولی به فیلم‌های پروتئینی و پلی‌ساکاریدی، باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی در برابر گونه‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی می‌شود. در مطالعه‌ی بنبتایب و همکاران (Benbettaieb et al., 2021)، فیلم‌های ژلاتینی حاوی عصاره‌های گیاهی در برابر *S. aureus* فعالیت قوی‌تری نسبت به *E. coli* نشان دادند که مشابه یافته‌های حاضر است.

دیسک انتشار

نتایج نشان داد با افزایش غلظت عصاره پنیرک و عصاره تاج‌خروس در فیلم‌ها، قطر هاله عدم رشد در برابر اشیریشیاکلی و استافیلوکوکوس



شکل ۱۱- خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها بر پایه ژلاتین
Fig. 11. Antimicrobial activity of gelatin-based films

و ویژگی‌های رنگی فیلم‌ها اهمیت دارند. مشاهدات میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که فیلم ژلاتین/نانوفیبر کیتین حاوی غلظت پایین عصاره تاج‌خروس (۳٪ w/v) و عصاره پنیرک (۰/۵٪ w/v) دارای ناهمگنی و رگه‌هایی در سطح بود. با افزایش غلظت عصاره‌ها (۵۵٪ w/v تاج‌خروس و ۲٪ w/v پنیرک) سطح فیلم صاف‌تر

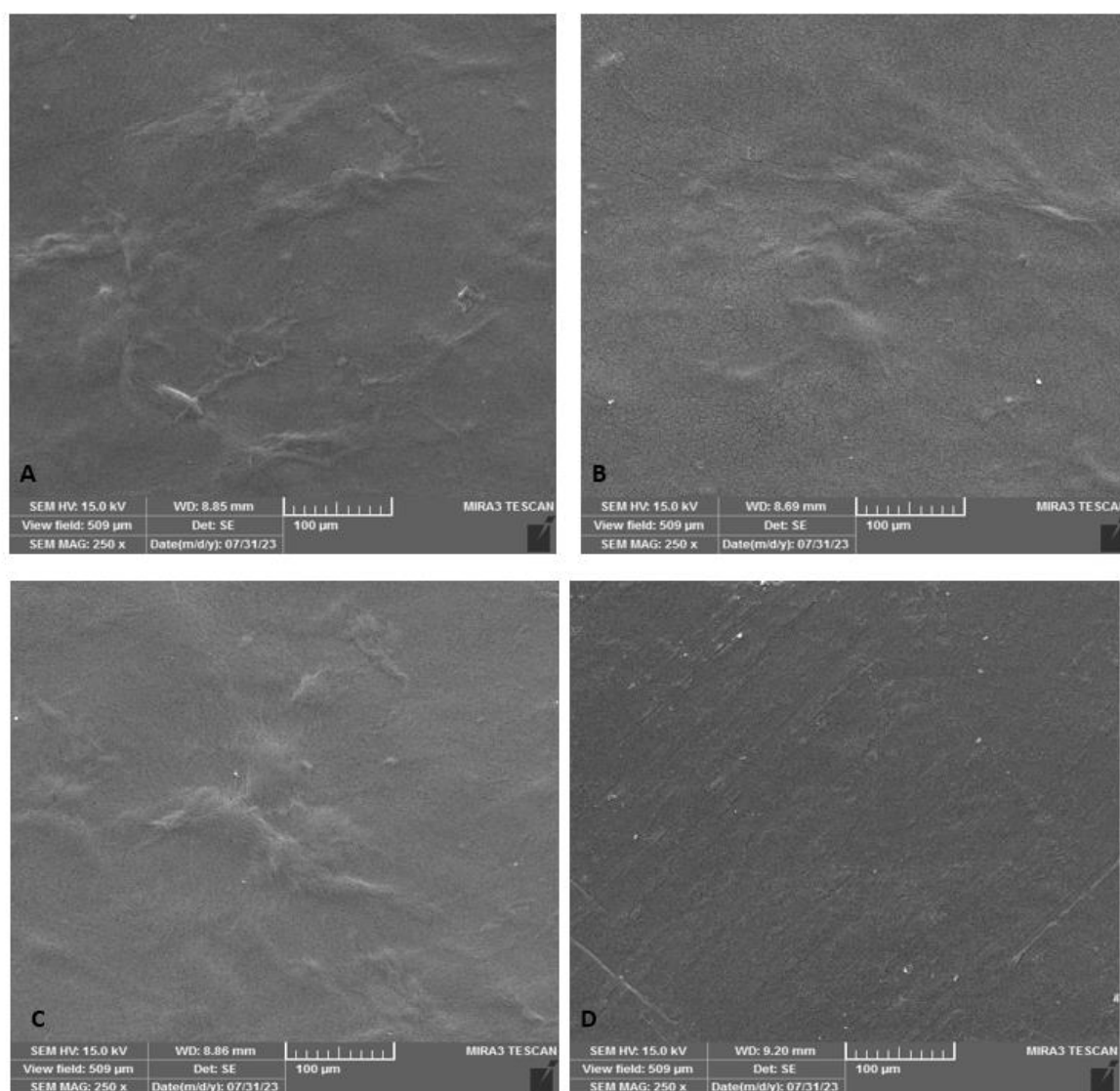
میکروسکوپ الکترونی روبشی

میکروسکوپ الکترونی روبشی به‌منظور بررسی ریزساختار فیلم‌های هوشمند حاوی مقادیر مختلف عصاره آنتوسیانینی تاج‌خروس و عصاره پنیرک و مقایسه آن‌ها با فیلم‌های فاقد عصاره استفاده شد. این بررسی‌ها در تفسیر نتایج آزمون‌های مکانیکی، نفوذپذیری به بخار آب

2024) هم‌خوانی دارد؛ این محققان گزارش کردند که افزودن عصاره‌های گیاهی غنی از آنتوسیانین به فیلم‌های زیستی موجب افزایش یکنواختی سطح، بهبود چسبندگی بین‌فازی و کاهش تخلخل سطحی در تصاویر SEM می‌شود.

گردید و در بالاترین غلظت‌ها (۸٪ w/v) تاج‌خروس و (۳۵٪ w/v) پنیرک) یکنواختی و صافی سطح به‌طور محسوسی افزایش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که آنتوسیانین‌ها موجب بهبود سازگاری بین ژلاتین و نانوفیبر کیتین و ارتقای ریزساختار فیلم‌ها می‌شوند (شکل ۱۲).

نتایج این پژوهش با یافته‌های محققین (Kumar, Prasad, & Yadav, 2021; Liu, Zhao, & Chen, 2022; Zhou et al.,



شکل ۱۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی رویشی فیلم‌ها

Fig. 12. Scanning electron microscope (SEM) images of the films

رفت (شکل ۱۳). نوار گسترده در 3422 cm^{-1} به ارتعاشات کششی O-H و تشکیل پیوندهای هیدروژنی نسبت داده شد. باندهای مشاهده‌شده در محدوده $2840\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی C-H در زنجیره پلیمری نانوفیبر کیتین بود. پیک‌های $2120\text{--}2160\text{ cm}^{-1}$ به

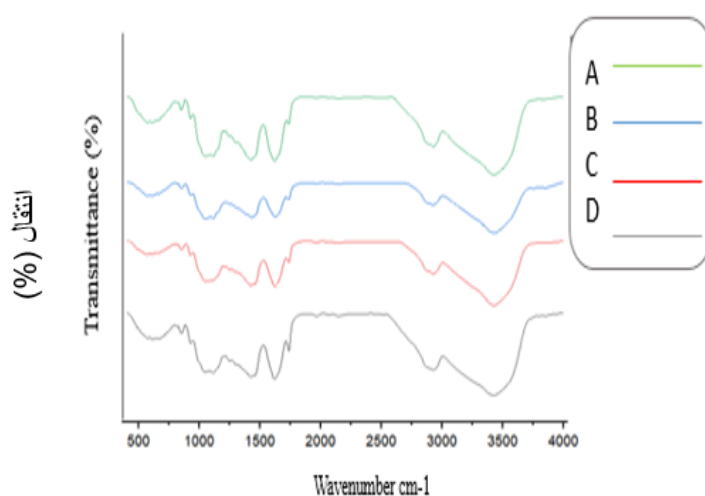
طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه برای بررسی برهم‌کنش‌های مولکولی و گروه‌های عاملی در فیلم‌های ژلاتین/نانوفیبر کیتین حاوی درصد‌های مختلف عصاره آنتوسیانینی تاج‌خروس و عصاره پنیرک به‌کار

چسبندگی بین مولکولی و بهبود خواص مکانیکی و ممانعتی فیلم‌ها منجر شده‌اند (شکل ۱۳).

نتایج این تحلیل با یافته‌های محققین، (Liu et al., 2022; Salgado, Ortiz, & Mauri, 2022; Yin et al., 2023; Zhou et al., 2024) مطابقت دارد، که همگی گزارش کردند افزودن عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنولی باعث جابه‌جایی باندهای آمید و O-H در طیف FTIR فیلم‌های زیستی شده و نشان‌دهنده‌ی برهم‌کنش‌های هیدروژنی و الکترواستاتیکی بین ترکیبات گیاهی و ماتریکس پلیمری است.

ارتعاشات گروه‌های N=N=N (آزید) و پیک 1963 cm^{-1} به ارتعاشات C-H در حلقه‌های آروماتیک اختصاص یافت. همچنین جذب قوی در محدوده 1600–1700 cm^{-1} به ارتعاشات خمشی گروه‌های معطر C=H و پیک‌های 1633–1647 cm^{-1} به ارتعاشات C=C در حلقه‌های آروماتیک مربوط بود که نشان‌دهنده حضور ترکیبات فنولی و معطر در عصاره‌های تاج‌خروس و پنیرک است. تغییرات مشاهده‌شده در موقعیت و شدت پیک‌ها بیانگر آن است که افزودن عصاره‌های تاج‌خروس و پنیرک موجب ایجاد برهم‌کنش‌های فیزیکی و شیمیایی بین ترکیبات زیست‌فعال و ماتریکس ژلاتین/نانوفیبر کیتین شده است. این برهم‌کنش‌ها احتمالاً به تشکیل شبکه‌های پایدارتر، افزایش



طول موج (سانتی متر^{-۱})

شکل ۱۳- الگوهای طیف سنجی مادون قرمز؛ فیلم حاوی ۰/۰۵ درصد وزنی حجمی عصاره پنیرک و ۰/۳ درصد وزنی حجمی عصاره تاج خروس (A)، فیلم حاوی ۰/۱۶۵۸ درصد وزنی حجمی عصاره پنیرک و ۰/۵۵۸ درصد وزنی حجمی عصاره تاج خروس (B)، فیلم حاوی ۰/۲ درصد وزنی حجمی عصاره پنیرک و ۰/۵۵ درصد وزنی حجمی عصاره تاج خروس (C)، فیلم حاوی ۰/۳۵ درصد وزنی حجمی عصاره پنیرک و ۰/۸ درصد وزنی حجمی عصاره تاج خروس (D)

Fig. 13. Fourier-transform infrared (FTIR) spectra patterns: (A) film containing 0.05% v/v malva extract and 0.3% w/v amaranth extract; (B) film containing 0.1658% w/v malva extract and 0.558% w/v amaranth extract; (C) film containing 0.2% w/v malva extract and 0.55% w/v amaranth extract; (D) film containing 0.35% w/v malva extract and 0.8% w/v amaranth extract

بود. مقایسه منحنی‌های پراش بین فیلم کنترل و فیلم‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره آنتوسیانینی تاج‌خروس (۰/۳، ۰/۵۵ و ۰/۸) و عصاره پنیرک (۰/۰۵، ۰/۲ و ۰/۳۵) نشان داد که افزودن عصاره‌ها تغییر قابل توجهی در موقعیت پیک‌ها ایجاد نکرد. این موضوع حاکی از آن است که ترکیبات آنتوسیانینی تاج‌خروس و پنیرک بر ماهیت کریستالی ماتریکس ژلاتین/نانوفیبر کیتین اثر بارزی نداشته و بیشتر بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی سطحی مؤثر بوده‌اند. کاهش جزئی شدت پیک‌ها و پهن‌تر شدن آن‌ها می‌تواند ناشی از برهم‌کنش‌های

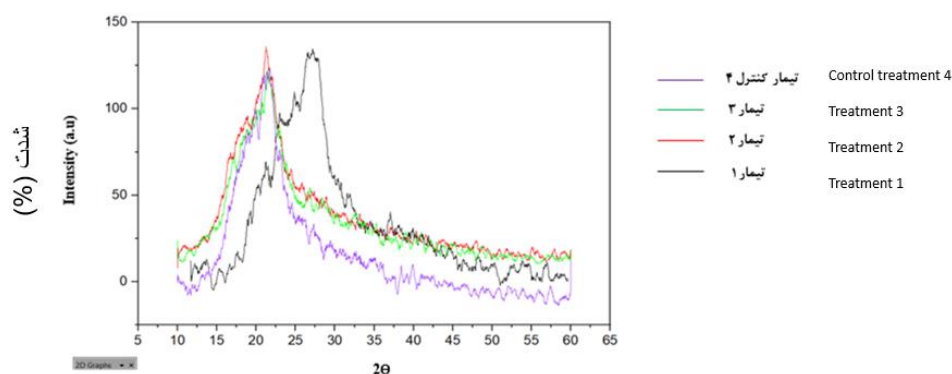
پراش اشعه ایکس

خصوصیات کریستالی مواد بسته‌بندی نقش مهمی در خواص مکانیکی فیلم‌ها دارند. به همین منظور، ساختار فیلم ژلاتین/نانوفیبر کیتین بدون عصاره و فیلم‌های حاوی عصاره آنتوسیانینی تاج‌خروس و پنیرک با استفاده از پراش پرتو ایکس مورد بررسی قرار گرفت.

فیلم‌های کنترل (فاقد عصاره) پیک پراش مشخصی در محدوده $\Theta = 18-28$ نشان دادند که بیانگر ساختار نیمه‌کریستالی بیوپلیمر

سطحی نقش دارند تا در بازآرایی ساختار کریستالی شبکه‌ی پلیمری (شکل ۱۴).

نتایج حاصل با یافته‌های محققین (Fang, Zhao, & Xu, 2019; Kumar, Prasad, & Yadav, 2022; Zhou et al., 2024) مطابقت دارد؛ این پژوهشگران نیز گزارش کردند که افزودن عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی به فیلم‌های بر پایه‌ی ژلاتین یا کیتوزان تغییر محسوسی در موقعیت پیک‌های XRD ایجاد نمی‌کند، اما موجب کاهش نسبی شدت آن‌ها و افزایش نواحی آمورف می‌شود.



شکل ۱۴- الگوهای پراش پرتو ایکس نمونه‌های کنترل و تیمار بندی شده؛ فیلم کنترل (تیمار ۴)، فیلم حاوی ۰/۰۵ درصد وزنی حجمی عصاره پنیرک و ۰/۳ درصد وزنی حجمی عصاره تاج خروس (تیمار ۳)، فیلم حاوی ۰/۱۶۵۸ درصد وزنی حجمی عصاره پنیرک و ۰/۵۵۸ درصد وزنی حجمی عصاره تاج خروس (تیمار ۲)، فیلم حاوی ۰/۳۵ درصد وزنی حجمی عصاره پنیرک و ۰/۸ درصد وزنی حجمی عصاره تاج خروس (تیمار ۱)
Fig. 14. X-ray diffraction (XRD) patterns of control and treated samples: control film (Treatment 4); film containing 0.05% w/v malva extract and 0.3% w/v amaranth extract (Treatment 3); film containing 0.1658% w/v malva extract and 0.558% w/v amaranth extract (Treatment 2); film containing 0.35% w/v malva extract and 0.8% w/v amaranth extract (Treatment 1)

($Sa=58/65$ و $Sq=60/43$ نانومتر). نهایتاً در بالاترین غلظت‌ها (۰/۳۵ درصد پنیرک و ۰/۸ درصد تاج‌خروس)، بیشترین میزان ناصافی سطح ثبت شد ($Sa=62/56$ و $Sq=64/33$). به‌طور کلی، افزایش غلظت عصاره‌های آنتوسیانینی تاج‌خروس و پنیرک موجب افزایش زبری و ناصافی سطح فیلم‌ها شد که می‌تواند بر ویژگی‌های عملکردی آن‌ها تأثیرگذار باشد (شکل ۱۵).

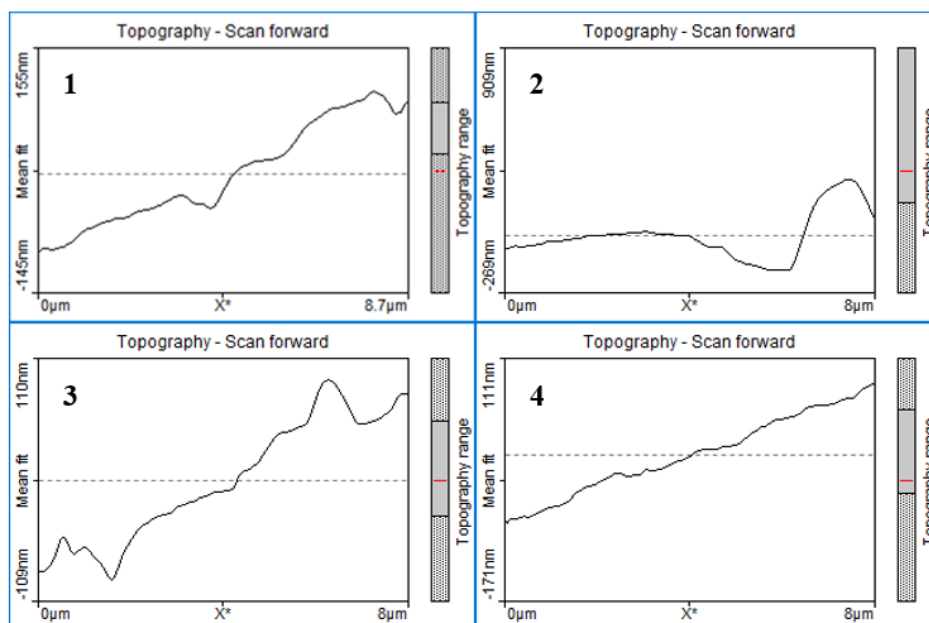
الگوهای به‌دست‌آمده با یافته‌های محققین (Benbettaieb et al., 2021; Zhou et al., 2024; Yin et al., 2023) مطابقت دارد؛ این پژوهشگران نیز گزارش کردند که افزودن عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنولی و آنتوسیانینی باعث افزایش زبری سطحی فیلم‌های بر پایه‌ی ژلاتین و کیتین شده و به‌واسطه‌ی تعاملات بین‌مولکولی جدید، توپوگرافی ناهمگن‌تری ایجاد می‌کند.

هیدروژنی بین گروه‌های فنولی عصاره‌ها و گروه‌های آمینی یا هیدروکسیلی موجود در ماتریکس ژلاتین/نانوفیبر کیتین باشد، که موجب محدود شدن بازآرایی منظم زنجیره‌ها در نواحی کریستالی می‌گردد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که افزودن عصاره‌های گیاهی عمدتاً باعث افزایش نواحی آمورف و بهبود انعطاف‌پذیری فیلم‌ها می‌شود، بدون اینکه ساختار پایه‌ی کریستالی دچار تخریب گردد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات آنتوسیانینی تاج‌خروس و پنیرک بر ماهیت کریستالی ماتریکس ژلاتین/نانوفیبر کیتین تأثیر قابل توجهی ندارند و بیشتر در بهبود ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی و

میکروسکوپ نیروی اتمی

توپوگرافی و زبری سطح فیلم‌های ژلاتین/نانوفیبر کیتین حاوی عصاره آنتوسیانینی تاج‌خروس و عصاره پنیرک با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی مورد بررسی قرار گرفت. زبری سطح یکی از عوامل مؤثر بر نفوذپذیری و مهاجرت ترکیبات در فیلم‌ها به‌شمار می‌رود.

نتایج نشان داد که فیلم کنترل (ژلاتین/نانوفیبر کیتین بدون عصاره) کمترین میزان زبری سطح را داشت ($Sa=23/04$ نانومتر و $Sq=24/89$ نانومتر). با افزودن ۰/۰۵ درصد عصاره پنیرک و ۰/۳ درصد عصاره تاج‌خروس، میزان زبری افزایش یافت ($Sa=26/07$ و $Sq=28/91$ نانومتر). در غلظت‌های بالاتر (۰/۱۶۵۸ درصد پنیرک و ۰/۵۵۸ درصد تاج‌خروس)، زبری سطح به‌طور محسوسی افزایش پیدا کرد



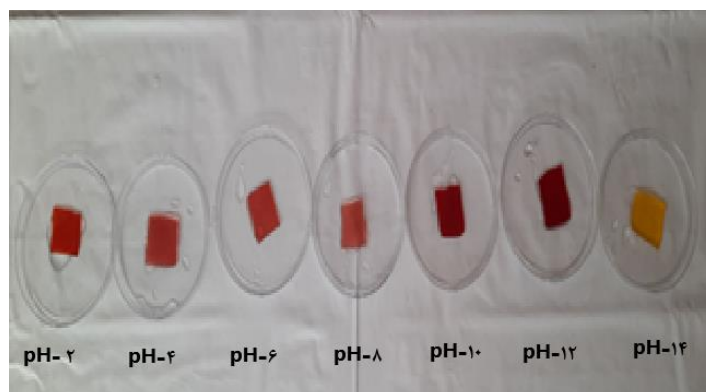
شکل ۱۵- تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی فیلم‌های کنترل و تیمار بندی شده
Fig. 15. Atomic force microscopy (AFM) images of control and treated films

عصاره آنتوسیانینی تاج خروس نسبت به پنیرک، واکنش رنگی فیلم‌ها عمده‌تاً تحت‌تأثیر این عصاره قرار داشت. این نتایج نشان می‌دهد فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی عصاره آنتوسیانینی تاج خروس و پنیرک قابلیت تغییر رنگ در گستره وسیعی از pH را دارند و می‌توانند به‌عنوان بسته‌بندی هوشمند مورد استفاده قرار گیرند (شکل ۱۶).

این یافته‌ها با نتایج محققین (Kumar et al., Lu et al., 2019; Zhou et al., 2024; 2021) هم‌خوانی دارد؛ این پژوهشگران نیز گزارش کردند که فیلم‌های زیستی حاوی رنگدانه‌های آنتوسیانینی از عصاره‌های گیاهی، در گستره‌ی وسیعی از pH تغییر رنگ قابل توجهی نشان می‌دهند و قابلیت کاربرد در بسته‌بندی‌های هوشمند برای پایش تازگی مواد غذایی را دارند.

واکنش فیلم‌ها به تغییرات pH

پاسخ رنگ به‌عنوان شاخصی مهم برای تعیین تغییرات در فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر به‌ویژه زمانی که با عصاره‌های طبیعی غنی از آنتوسیانین ترکیب شوند، مطرح است. نتایج نشان داد فیلم‌های مبتنی بر ژلاتین/نانوفیبرکیتین حاوی عصاره آنتوسیانینی تاج خروس و پنیرک نسبت به تغییرات pH حساسیت بالایی داشته و در مدت کوتاهی تغییر رنگ قابل مشاهده‌ای ایجاد می‌کنند. بررسی طیف رنگی در محلول‌های بافری مختلف نشان داد که این فیلم‌ها در pH اسیدی (۱-۶) قرمز، در pH خنثی قرمز متمایل به صورتی، در pH ۱۰-۱۲ ارغوانی و در محیط‌های قلیایی قوی (۱۳-۱۴) زرد بودند. به‌دلیل غلظت بالاتر



شکل ۱۶- واکنش فیلم‌ها به تغییرات pH
Fig. 16. Response of the films to pH changes

تعیین پروفیل اسیدهای چرب ماهی کپور با

گازکروماتوگرافی

نتایج نشان می‌دهد که ماهی کپور حاوی مقادیر قابل توجهی از اسیدهای چرب غیراشباع، به‌ویژه $^{1}MUFA$ (اولئیک اسید) و $^{2}PUFA$ (لینولئیک اسید)، ^{3}EPA و ^{4}DHA است که برای سلامت قلب و عروق و عملکرد سیستم ایمنی اهمیت دارند. با این حال، میزان EPA و DHA در کپور نسبت به گونه‌های چرب‌تر مانند سالمون کمتر است. بنابراین، حفظ پایداری این ترکیبات طی فرآیند نگهداری و بسته‌بندی اهمیت ویژه‌ای دارد. استفاده از فیلم‌های بسته‌بندی زیست‌تخریب‌پذیر می‌تواند با کاهش اکسیداسیون چربی‌ها به حفظ کیفیت تغذیه‌ای ماهی کمک کند.

نتایج با یافته‌های پژوهش‌های پیشین هم‌راستا بود؛ به‌طوری‌که علی و همکاران (*Ali, Rauf, & Ahmad, 2023*) نیز گزارش کردند که اولئیک و لینولئیک اسیدها از اجزای اصلی چربی ماهی کپور معمولی هستند و نسبت $PUFA/MUFA$ به‌طور مستقیم بر کیفیت تغذیه‌ای و ارزش سلامتی گوشت ماهی اثر دارد. همچنین ونگ و همکاران (*Wang et al., 2024*) بیان کردند که گونه‌های چرب‌تر مانند سالمون، مقادیر بالاتری از EPA و DHA نسبت به ماهی‌های آب شیرین مانند کپور دارند که این اختلاف به رژیم غذایی و شرایط محیطی ماهیان نسبت داده می‌شود. در همین راستا، الحادف و همکاران (*Elhadeif, Remédio, & Kanatt, 2024*) نیز گزارش کردند که استفاده از پوشش‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند سرعت اکسیداسیون $PUFA$ را کاهش داده و پایداری چربی‌ها را طی نگهداری افزایش دهد.

از آنجا که $PUFA$ ها به‌ویژه EPA و DHA نسبت به اکسیداسیون بسیار حساس هستند، حفظ پایداری این ترکیبات در طول فرآیند نگهداری و بسته‌بندی اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش، استفاده از فیلم‌های ژلاتین/نانوفیبرکیتین حاوی عصاره‌های گیاهی پنیرک و تاج‌خروس به‌دلیل دارا بودن ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی، موجب کاهش اکسیداسیون چربی‌ها و حفظ ترکیب اسیدهای چرب مفید در نمونه‌های بسته‌بندی شده گردید. این یافته‌ها با نتایج تاپیچای و همکاران (*Tanpichai, Pumpuang, Srimarut, & Woraprayote, 2023*) نیز هم‌خوانی دارد که گزارش کردند نانوفیبرهای کیتین به‌عنوان عامل تقویت‌کننده و پایدارکننده چربی‌ها، نقش مؤثری در جلوگیری از تجزیه لیپیدها و بهبود عمر ماندگاری محصولات غذایی ایفا می‌کنند.

آزمون بسته‌بندی

یکی از کاربردهای اصلی فیلم‌های حساس به pH، بررسی تغییرات طراوت محصولات دریایی در طول نگهداری است. فساد ماهی عمدتاً به‌دلیل فعالیت آنزیمی و میکروبی رخ می‌دهد که منجر به تشکیل ترکیبات نیتروژنی فرار و افزایش pH می‌شود. در این پژوهش، از فیلم بهینه ژلاتین/نانوفیبرکیتین حاوی عصاره آنتوسیانینی گل تاج‌خروس و عصاره پنیرک برای بسته‌بندی فیله ماهی کپور استفاده شد. نتایج نشان داد پس از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای یخچال (۷ درجه سانتی‌گراد)، فیلم‌های حاوی عصاره تغییر رنگ محسوسی از قرمز به زرد در pH بالا نشان دادند که بیانگر فساد نمونه‌های ماهی بود. این تغییر به تشکیل ترکیبات قلیایی فرار ناشی از تجزیه پروتئین‌ها و چربی‌ها نسبت داده شد. بنابراین، فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی عصاره آنتوسیانینی گل تاج‌خروس و پنیرک می‌توانند به‌عنوان شاخص بصری کارآمدی برای تشخیص تازگی ماهی عمل کنند (شکل ۱۷).

نتایج به‌دست‌آمده با یافته‌های پژوهش‌های پیشین هم‌خوانی دارد. برای مثال، طاهیر و همکاران (*Tahir et al., 2024*) گزارش کردند فیلم ژلاتین حاوی عصاره آنتوسیانینی پوست انگور در بسته‌بندی فیله ماهی آزاد، طی نگهداری در دمای $25^{\circ}C$ تغییر رنگ قابل مشاهده‌ای متناسب با افزایش pH و تولید آمین‌های فرار نشان داد. همچنین هونگ و همکاران (*Hong et al., 2022*) بیان کردند فیلم‌های مبتنی بر آنتوسیانین توت‌سیاه قادرند فساد میکروبی محصولات دریایی را از طریق تغییر رنگ از قرمز به سبز در بازه‌ی ۲۴ تا ۳۶ ساعت آشکار کنند. در مطالعه‌ای دیگر، ژانگ و همکاران (*Zhang et al., 2024*) فیلم‌های پکتین حاوی رنگدانه طبیعی را به‌عنوان شاخص مؤثر برای تشخیص تازگی گوشت و ماهی معرفی کردند که در محدوده‌ی pH ۶ تا ۸ پاسخ رنگی خطی نشان دادند.

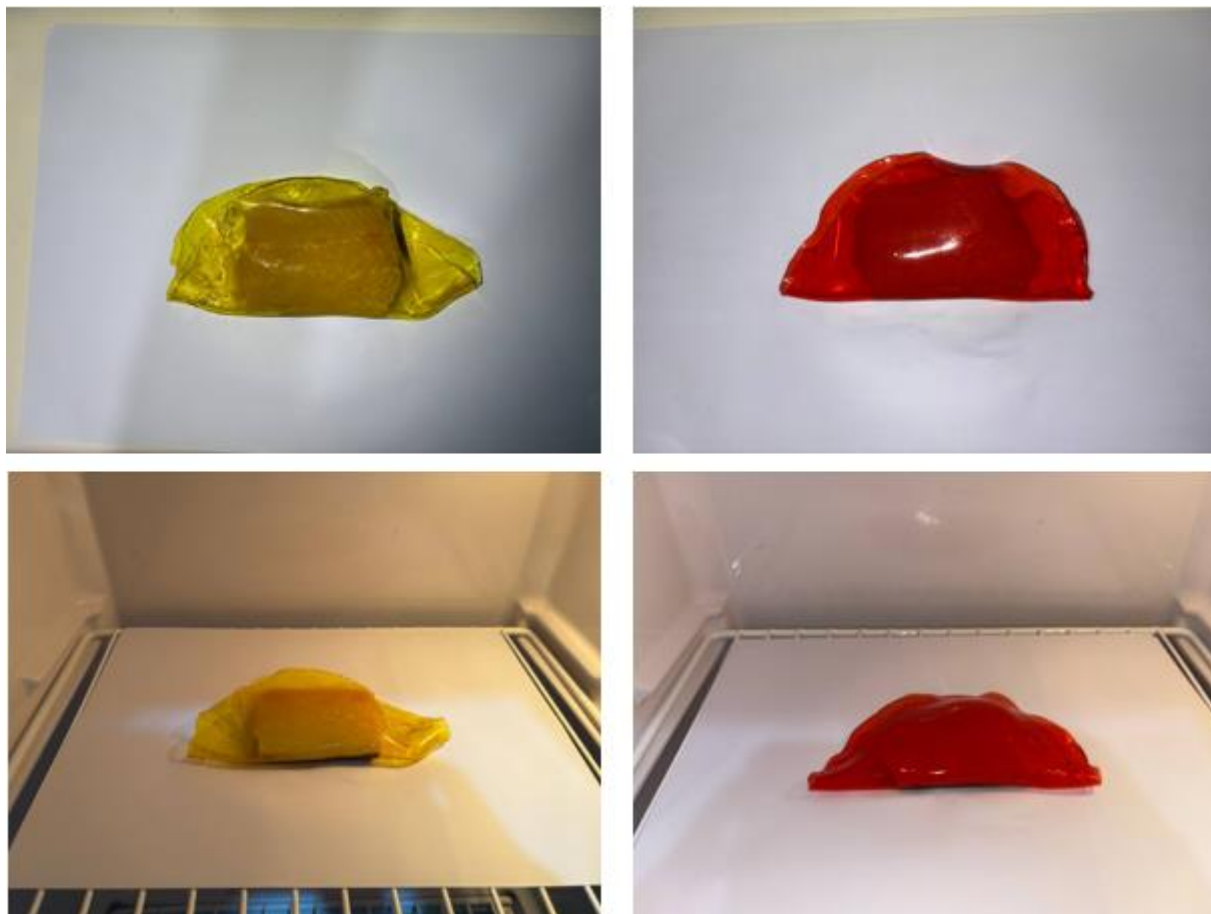
در پژوهش حاضر نیز همانند مطالعات فوق، رنگ قرمز اولیه فیلم‌های آنتوسیانینی در شرایط اسیدی حفظ شد و با افزایش pH ناشی از فساد، به رنگ‌های زرد و نارنجی تغییر یافت. این رفتار رنگی ناشی از تغییر ساختار شیمیایی آنتوسیانین‌ها از فرم فلاوینیوم (در محیط اسیدی) به فرم کوئینوید باز (در محیط قلیایی) است. چنین پاسخ رنگی سریع و برگشت‌ناپذیر در حضور ترکیبات قلیایی، نشان‌دهنده‌ی حساسیت بالای فیلم‌های تهیه‌شده برای تشخیص بصری فساد محصولات دریایی است.

3- Eicosapentaenoic acid

4- Docosahexaenoic acid

1- Monounsaturated fatty acid

2- Polyunsaturated fatty acid



شکل ۱۷- تست بسته‌بندی فیلم بهینه

تیمار بهینه حاوی ۰/۵۵۸٪ عصاره تاج خروس و ۰/۱۶۵٪ عصاره پنیرک می باشد.

Fig. 17. Packaging test of the optimized film

The optimal treatment containing 0.558% amaranth extract and 0.165% malva extract.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش فیلم‌های بسته‌بندی هوشمند زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه ژلاتین و نانوفیبرکیتین با استفاده از عصاره آنتوسیانینی تاج‌خروس و عصاره پنیرک تولید و ارزیابی شدند. بهینه‌سازی فرمولاسیون نشان داد که ترکیب این عصاره‌ها موجب بهبود خواص مکانیکی، رنگی و عملکردی فیلم‌ها گردید. بررسی‌های میکروسکوپی بیانگر تغییرات ساختار سطحی و یکنواختی بیشتر فیلم‌ها در حضور عصاره‌های طبیعی بود و طیف‌سنجی مادون قرمز نیز برهم‌کنش میان اجزای تشکیل‌دهنده را تأیید کرد. آزمون‌های عملکردی نشان دادند که این فیلم‌ها نسبت به تغییرات pH حساس بوده و توانایی تغییر رنگ در شرایط مختلف را دارند، به‌گونه‌ای که می‌توانند به‌عنوان شاخص بصری برای تعیین تازگی مواد غذایی به‌کار روند. علاوه بر این، فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها علیه باکتری‌های شاخص غذایی ثابت کرد که این نوع بسته‌بندی می‌تواند علاوه بر نظارت بر کیفیت، به افزایش ایمنی و ماندگاری مواد غذایی کمک کند. به‌طور کلی، فیلم‌های تولیدشده قابلیت جایگزینی

مناسبی برای بسته‌بندی‌های متداول دارند و می‌توانند در راستای توسعه بسته‌بندی‌های پایدار و هوشمند در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

میزان مشارکت نویسندگان

نادیا ترقی خواه: پیش‌نویس اصلی، تحقیق و بررسی، مدیریت پروژه. **علی ایاسه:** بررسی و ویرایش مقاله، اعتبارسنجی. **صبا میلانی:** بررسی و ویرایش مقاله، نرم‌افزار، اعتبارسنجی. **شهرک واتگر:** بررسی و ویرایش، نظارت.

منابع تأمین مالی

این تحقیق هیچ کمک مالی خاصی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

References

1. Ahmed, I., Lin, H., Zou, L., Li, Z., Brody, A.L., Qazi, I.M., Lv, L., Pavase, T.R., Khan, M.U., Khan, S., & Sun, L. (2018). An overview of smart packaging technologies for monitoring safety and quality of meat and meat products. *Packaging Technology and Science*, 31(7), 449–471. <https://doi.org/10.1002/pts.2380>
2. Ali, M., Rauf, A., & Ahmad, N. (2023). Fatty acid composition and nutritional quality of common carp (*Cyprinus carpio*) from different habitats. *Aquaculture Reports*, 32, 101637. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101637>
3. Asdaghi, A., & Pirsai, S. (2020). Bacterial and oxidative control of local butter with smart/active film based on pectin/nanoclay/*Carum copticum* essential oils/ β -carotene. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.192>
4. Batiha, G.E.-S., Tene, S.T., Teibo, J.O., Shaheen, H.M., Oluwatoba, O.S., Teibo, T.K.A., Al-kuraishy, H.M., Al-Garbee, A.I., Alexiou, A., & Papadakis, M. (2023). The phytochemical profiling, pharmacological activities, and safety of *Malva sylvestris*: a review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396(3), 421–440. <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02329-w>
5. Benbettaieb, N., Karbowiak, T., & Debeaufort, F. (2021). Surface characterization of gelatin-based biofilms incorporated with natural antioxidants using AFM and SEM. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 152–167.
6. Bilgiç, S., Söğüt, E., & Seydim, A.C. (2019). Chitosan and starch based intelligent films with anthocyanins from eggplant to monitor pH variations. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7, 61–66. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7isp1.61-66.2705>
7. Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J.A., & Vázquez, M. (2018). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>
8. Dong, H., Ling, Z., Zhang, X., Zhang, X., Ramaswamy, S., & Xu, F. (2020). Smart colorimetric sensing films with high mechanical strength and hydrophobic properties for visual monitoring of shrimp and pork freshness. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 309, 127752. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127752>
9. Elhadeif, K., Chaari, M., Akermi, S., Ben Hlima, H., Ennouri, M., Abdelkafi, S., Agriopoulou, S., Ali, D.S., Boulekbache-Makhlouf, L., Mellouli, L., & Smaoui, S. a(2024). pH-sensitive films based on carboxymethyl cellulose/date pits anthocyanins: A convenient colorimetric indicator for beef meat freshness tracking. *Food Bioscience*, 57, 103508. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103508>
10. Elhadeif, K., Chaari, M., Akermi, S., Ennouri, K., Ben Hlima, H., Fourati, M., Mtibaa, A., Ennouri, M., Sarkar, T., Shariati, M., Gökşen, G., Mirian, P., Mellouli, L., Lorenzo, J., Smaoui, S. b(2024). Development of bioactive gelatin-based films containing plant phenolic extracts. *Food Packaging and Shelf Life*, 33, 101089.
11. Elhadeif, R., Remédio, L.N., & Kanatt, S. (2024). Active biopolymer films incorporated with plant extracts to retard lipid oxidation in fish fillets. *LWT- Food Science and Technology*, 185, 115002. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115002>
12. Fernández-Marín, R., Fernandes, S.C.M., Sánchez, M.Á.A., & Labidi, J. (2022). Halochromic and antioxidant capacity of smart films of chitosan/chitin nanocrystals with curcuma oil and anthocyanins. *Food Hydrocolloids*, 123, 107119. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107119>
13. Fang, Z., Zhao, Y., & Xu, Z. (2019). Crystallinity and structural modification of gelatin-based films incorporated with natural extracts studied by XRD. *Food Hydrocolloids*, 89, 343–351.
14. Freitas, P. A., de Oliveira, T. V., Silva, R. R., e Moraes, A. R. F., Pires, A. C. D. S., Soares, R. R., ... & Soares, N. F. (2020). Effect of pH on the intelligent film-forming solutions produced with red cabbage extract and hydroxypropylmethylcellulose. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100604.
15. Gasparetto, J.C., Martins, C.A.F., Hayashi, S.S., Otuky, M.F., & Pontarolo, R. (2012). Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(2), 172–189. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01383.x>
16. Gasti, T., Dixit, S., D'souza, O.J., Hiremani, V.D., Vootla, S.K., Masti, S.P., Chougale, R.B., & Malabadi, R.B. (2021). Smart biodegradable films based on chitosan/methylcellulose containing *Phyllanthus reticulatus* anthocyanin for monitoring the freshness of fish fillet. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.128>
17. Goluch, Z., Rybarczyk, A., Poławska, E., & Haraf, G. (2023). Fatty acid profile and lipid quality indexes of the meat and backfat from porkers supplemented with EM Bokashi probiotic. *Animals*, 13(20), 3298. <https://doi.org/10.3390/ani13203298>
18. Hashim, S.B.H., Tahir, H.E., Mahdi, A.A., Liu, L., Zhang, J., Zhai, X., Ibrahim, N.A., Mahunu, G.K., Awad, F.N., Hassan, M.M., Xiaobo, Z., & Jiyong, S. (2022). Development of smart colorimetric sensing films carbohydrate-based with soybean wax and purple cauliflower anthocyanins for visual monitoring of shrimp freshness. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(10), 4362–4376. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02483-5>
19. He, Y., Lu, L., Lin, Y., Li, R., Yuan, Y., Lu, X., Zou, Y., Zhou, W., Wang, Z., & Li, J. (2022). Intelligent pH-sensing film based on polyvinyl alcohol/cellulose nanocrystal with purple cabbage anthocyanins for visually

- monitoring shrimp freshness. *International Journal of Biological Macromolecules*, 218, 900–908. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.194>
20. Hosseini, S.F., Gómez-Guillén, M.C., & Regenstein, J.M. (2020). Effect of plant polyphenols on fish gelatin films: Physical and structural properties. *Food Hydrocolloids*, 98, 105292.
21. Hong, Y., Wang, Y., Liu, X., & Zhang, L. (2022). Colorimetric pH indicator films based on natural anthocyanins for intelligent monitoring of seafood spoilage. *Food Hydrocolloids*, 128, 107556. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107556>
22. Hu, H., Yao, X., Qin, Y., Yong, H., & Liu, J. (2020). Development of multifunctional food packaging by incorporating betalains from vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) into quaternary ammonium chitosan/fish gelatin blend films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 675–684. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.103>
23. Kanatt, S.R. (2020). Development of active/intelligent food packaging film containing Amaranthus leaf extract for shelf life extension of chicken/fish during chilled storage. *Food Packaging and Shelf Life*, 24(February 2019), 100506. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100506>
24. Khezerlou, A., Tavassoli, M., Alizadeh Sani, M., Ehsani, A., & McClements, D.J. (2023). Smart packaging for food spoilage assessment based on *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanin-loaded chitosan films. *Journal of Composites Science*, 7(10), 404. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3080770/v1>
25. Kumar, N., Prasad, P., & Yadav, S. (2021). Morphological and functional characterization of gelatin composite films containing plant polyphenols. *Carbohydrate Polymers*, 255, 117366.
26. Kumar, N., Prasad, P., & Yadav, S. (2022). Effect of plant polyphenols on structural and crystalline characteristics of gelatin/chitosan biocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 210, 1024–1035.
27. Kuswandi, B., Oktaviana, D., & Abdullah, A. (2023). Progress in intelligent packaging systems for food freshness monitoring: Mechanisms, materials, and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 137, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.03.005>
28. Liu, X., Zhao, Y., & Chen, L. (2022). Structural and morphological properties of gelatin–chitosan films enriched with natural anthocyanin extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 210, 103–112.
29. Lu, Y., Weng, L., & Zhang, L. (2019). Colorimetric response of anthocyanin-based biopolymer films as pH indicators. *Food Hydrocolloids*, 90, 114–123.
30. Mousavi, M., Rezaei, M., & Hashemi, M. (2021). The effect of herbal extracts on the physicochemical and barrier properties of gelatin–chitosan composite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 180, 707–716.
31. Pranoto, Y., Rakshit, S.K., & Salokhe, V.M. (2020). Antimicrobial activity of edible films incorporated with natural plant extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 132, 109906. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.09.014>
32. Sani, M.A., Tavassoli, M., Hamishehkar, H., & McClements, D.J. (2021). Carbohydrate-based films containing pH-sensitive red barberry anthocyanins: Application as biodegradable smart food packaging materials. *Carbohydrate Polymers*, 255, 117488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117488>
33. Salgado, P.R., Ortiz, C.M., & Mauri, A.N. (2022). Interactions between protein-based biopolymer films and natural extracts analyzed by FTIR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 129, 107691.
34. Sohany, M., Tawakkal, I.S.M.A., Ariffin, S.H., Shah, N.N.A.K., & Yusof, Y.A. (2021). Characterization of anthocyanin associated purple sweet potato starch and peel-based pH indicator films. *Foods*, 10(9), 2005. <https://doi.org/10.3390/foods10092005>
35. Tahir, H., Ahmad, T., & Mehmood, S. (2024). Development of gelatin-based intelligent films incorporating grape skin anthocyanins for monitoring fish freshness. *Food Packaging and Shelf Life*, 42, 103235. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2024.103235>
36. Tanpichai, S., Pumpuang, L., Srimarut, Y., & Woraprayote, W. (2023). Development of chitin nanofiber coatings for prolonging shelf life and inhibiting lipid oxidation in fresh fish. *Scientific Reports*, 13, 13195. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39739-6>
37. Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2022). Influence of natural extracts on moisture content and mechanical properties of gelatin-based films. *Food Packaging and Shelf Life*, 33, 101143
38. Valcarcel, J., Hermida-Merino, C., Piñeiro, M.M., Hermida-Merino, D., & Vázquez, J.A. (2021). Extraction and characterization of gelatin from skin by-products of Seabream, Seabass and Rainbow Trout reared in aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12104. <https://doi.org/10.3390/ijms222212104>
39. Vidal, C.P., Velásquez, E., Galotto, M.J., & López de Dicastillo, C. (2021). Antimicrobial food packaging system based on ethyl lauroyl arginate-loaded core/shell electrospun structures by using hydrophilic and hydrophobic polymers. *Polymer Testing*, 93, 106937. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106937>
40. Wang, Y., Zhang, H., & Li, J. (2024). Comparative analysis of lipid profiles and omega-3 fatty acids in freshwater and marine fish species. *Food Chemistry*, 431, 137012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.137012>

41. Wu, C., Li, Y., Sun, J., Lu, Y., Tong, C., Wang, L., Yan, Z., & Pang, J. (2020). Novel konjac glucomannan films with oxidized chitin nanocrystals immobilized red cabbage anthocyanins for intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids*, 98, 105245. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105245>
42. Yi, F., Hou, F., Zhan, S., Song, L., Zhang, R., Han, X., Sun, X., & Liu, Z. (2023). Preparation, characterization and application of pH-responsive smart film based on chitosan/zein and red radish anthocyanin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127037. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127037>
43. Yin, X., Zhao, Y., & Qian, Y. (2023). AFM and morphological analysis of bioactive films enriched with anthocyanin-rich plant extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 223, 124–136.
44. Zhang, J., Chen, X., Li, P., & Zhao, H. (2024). Recent advances in pH-sensitive indicator films based on natural pigments: A review. *Food Chemistry*, 436, 137247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.137247>
45. Zhao, R., Liu, Y., & Chen, Y. (2023). Incorporation of anthocyanin-rich plant extracts into biopolymer films: Effects on optical and antioxidant properties. *Carbohydrate Polymers*, 310, 120657.
46. Zhou, L., Zhang, R., & Han, X. (2024). XRD and morphological characterization of anthocyanin-loaded biopolymer films for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 36, 101288. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2024.101351>