

Study of antimicrobial properties of polyvinyl alcohol/chitosan nanocomposite films containing original & color removal pomegranate peel extract and zinc oxide nanoparticles

Mahboubeh Mohseni¹, Abolfazl Mirzapoor armaki^{2*}, Sara Daneshjoo²

¹ M.Sc graduate, Nano biotechnology department, Faculty of Biological sciences, Tarbiat modares university, Tehran, Iran.

² Assistant Professor, Nano biotechnology department, Faculty of Biological sciences, Tarbiat modares university, Tehran, Iran, Email: a.mirzapour@modares.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:

Received: 2025-03-10
Revised: 2025-08-32
Accepted: 2025-09-15

Keywords:

Nanocomposite film
polyvinyl alcohol
chitosan
pomegranate peel extract
zinc oxide nanoparticles
food packaging

ABSTRACT

Background and Objectives: The consumption of healthy and safe food with minimal use of industrial polymers is rapidly increasing. Food safety against internal and external spoilage agents is an effective strategy for preserving food resources. For this reason, global efforts have been focused on developing safe and efficient packaging. In this regard, extensive research has been conducted to evaluate biopolymers as suitable alternatives to plastic packaging. Biodegradable polymers have limitations in terms of mechanical, physical, and functional properties. Despite solving the environmental problem caused by plastics, films have mechanical, physical, and functional disadvantages properties. Combination of two or more polymers, using plant extracts and using nanoparticles are effective problem solving routs. The object of this research is to prepare nanocomposite films based on polyvinyl alcohol/chitosan /pomegranate peel extract/zinc oxide nanoparticles to increase the shelf life and maintain the quality of food products. The presence of hydroxyl groups on the carbon atoms of polyvinyl alcohol makes it hydrophilic and causes its decomposition through hydrolysis. In order to reduce the hydrophilic properties and improve the physical properties, a hybrid polymer was used. Chitosan is a biocompatible and biodegradable polymer that has film-forming capacity and ability to absorb oxygen and moisture. However, its antioxidant and antibacterial properties is low and can be improved with pomegranate peel plant extract. Use of zinc oxide nanoparticles has positive effects on antibacterial properties as well as the antioxidant properties of nanocomposite films due to their photocatalytic properties.

Materials & Methods: To overcome these challenges, solutions such as polymer blending, use of plant extracts, and application of nanoparticles have been proposed. In this study, a biodegradable nanocomposite film was fabricated by combining polyvinyl alcohol, chitosan, zinc oxide (ZnO) nanoparticles, and pomegranate peel extract (PPE). Based on various experiments, 5 films were synthesized through trial and error to achieve maximum antibacterial properties, and 8 samples were designed based on the

proposed model.

Results: Studies showed that sample number 4 had the largest diameter of the growth inhibition zone, and accordingly, optimal concentrations were selected for the final film. The results showed that the optimized nanocomposite film made with a combination of polyvinyl alcohol, chitosan, zinc oxide nanoparticles, and pomegranate peel extract has better desirable antibacterial and antifungal properties than the reference films. Conclusion: This film can be a suitable option for biodegradable food packaging, helping to increase the shelf life and maintain the quality of products.

Cite this article: Alimohammadifard, E., Imamjoma, Z., Ekrami, M. 2025. Study of antimicrobial properties of polyvinyl alcohol/chitosan nanocomposite films containing original & color removal pomegranate peel extract and zinc oxide nanoparticles. *Food Processing and Preservation Journal*, 17(3), 1-22.



© The Author(s)



[10.22069/fppj.2025.23423.1871](https://doi.org/10.22069/fppj.2025.23423.1871)

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بررسی خواص ضد باکتریایی نانو فیلم‌های کامپوزیتی پلی وینیل الکل/کیتوزان حاوی عصاره پوست انار معمولی و رنگبری شده و نانوذره اکسید روی

محبوبه محسنی^۱، ابوالفضل میرزاپور ارملی^{۲*}، سارا دانشجو^۳

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

^۲ استادیار، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

^۳ دانشیار، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، رایانامه: a.mirzapour@modares.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی	سابقه و هدف: تقاضا برای مواد غذایی سالم و ایمن با حداقل استفاده از پلیمرهای صنعتی به سرعت در حال افزایش است. ایمنی مواد غذایی در برابر عوامل فاسدکننده داخلی و خارجی، راهکاری مؤثر برای حفظ منابع غذایی به شمار می‌آید. در همین راستا، تلاش‌های جهانی در جهت توسعه بسته‌بندی‌های ایمن و کارآمد، به‌ویژه با استفاده از پلیمرهای زیستی به‌عنوان جایگزین‌های بسته‌بندی پلاستیکی، افزایش یافته است. با این حال، پلیمرهای زیست تخریب پذیر با محدودیت‌هایی مواجه‌اند که نیازمند بهبود و اصلاح هستند. فیلم‌ها علیرغم حل مشکل زیست محیطی ناشی از پلاستیک‌ها، از نظر خواص مکانیکی، فیزیکی، عملکردی دارای معایبی هستند. راهکارهایی از جمله ترکیب دو یا چند پلیمر، به‌کاربردن عصاره گیاهی و استفاده از نانوذرات برای حل مشکلات، تاکنون به کاررفته است. هدف این پژوهش، تهیه فیلم‌های نانوکامپوزیت بر پایه پلی وینیل الکل/کیتوزان/عصاره پوست انار/نانوذره اکسیدروی برای افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت محصولات غذایی می باشد. حضور گروه‌های هیدروکسیل بر روی اتم‌های کربن پلی وینیل الکل، آن را آبدوست کرده و موجب تجزیه آن از طریق هیدرولیز می شود. به منظور کاهش خواص آبدوستی و بهبود ویژگی فیزیکی، از پلیمر ترکیبی استفاده شد. کیتوزان پلیمری زیست سازگار و زیست تخریب پذیر است که دارای ظرفیت فیلم سازی و توانایی جذب اکسیژن و رطوبت می باشد. اما خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی باکتریال آن کم است و با و عصاره گیاهی پوست انار تقویت شود. استفاده از نانوذرات اکسیدهای فلزی اکسیدروی به دلیل ویژگی‌های فتوکاتالیستی تأثیرات مثبت بر خواص ضد باکتریایی و همچنین خواص آنتی اکسیدانی فیلم‌های نانوکامپوزیت دارد.
واژه‌های کلیدی: فیلم نانوکامپوزیت پلی وینیل الکل کیتوزان، عصاره پوست انار نانوذرات اکسید روی.	مواد و روش‌ها: برای رفع چالش‌های موجود، در این پژوهش فیلم نانوکامپوزیت زیست تخریب پذیری با ترکیب پلی وینیل الکل، کیتوزان، نانوذرات اکسید روی (ZnO) و عصاره پوست انار (PPE) ساخته شد. ابتدا ۵ نمونه فیلم به‌صورت آزمون و خطا برای شناسایی شرایط بهینه سنتز شدند و سپس ۸ نمونه دیگر بر اساس طراحی آزمایش تهیه گردید. یافته‌ها: بررسی‌ها نشان داد که نمونه شماره ۴ (کیتوزان و پلی وینیل الکل (۲۵۰ میلی گرم /

میلی لیتر)، اکسید روی (۲۰۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره پوست انار (۰,۴ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۵۰ میلی لیتر) بیشترین قطره‌اله عدم رشد باکتری را دارا بود. بر این اساس، غلظت‌های بهینه ترکیبات تعیین و فیلم نهایی سنتز شد. نتایج آزمایش‌ها حاکی از آن بود که فیلم نهایی خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی برتری نسبت به نمونه مرجع (پلی وینیل الکل/کیتوزان) ارائه می‌دهد.

نتیجه‌گیری: فیلم نانوکامپوزیت بهینه‌شده می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای مناسب در بسته‌بندی زیست‌تخریب‌پذیر مواد غذایی مطرح شود و با افزایش ماندگاری، به حفظ کیفیت محصولات غذایی کمک کند.

استناد: علی محمدی فرد، اسماعیل؛ امام جمعه، زهرا؛ اکرامی، محمد. (۱۴۰۴). بررسی خواص ضد باکتریایی نانو فیلم‌های کامپوزیتی پلی وینیل الکل/کیتوزان حاوی عصاره پوست انار معمولی و رنگبری شده و نانوذره اکسید روی. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۷(۳)، ۱-۲۲.



[10.22069/fppj.2025.23423.1871](https://doi.org/10.22069/fppj.2025.23423.1871)

© نویسندگان



ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

با توجه به پیشرفت‌های سریع فناوری و توسعه صنعتی، روش‌های نوین متعددی برای ارتقای ایمنی و پایداری در صنایع کشاورزی و غذایی ارائه شده‌است. در این میان، بسته‌بندی مواد غذایی به‌عنوان عنصر اساسی در حفظ کیفیت، افزایش ماندگاری و تضمین ایمنی محصولات، نقش کلیدی ایفا می‌کند. به واسطه‌ی این مزایا، بسته‌بندی قادر است از فساد ناشی از عوامل محیطی مانند حشرات، نور، حرارت، اکسیژن، بخار آب و سایر آلاینده‌ها جلوگیری کرده و از رشد میکروارگانیسم‌های مضر که می‌توانند ارزش تغذیه‌ای، بهداشت و ایمنی مواد غذایی را کاهش دهند، مصون نگه دارد. در نتیجه، فساد ناشی از عوامل محیطی مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها به‌عنوان یکی از چالش‌های اصلی بسته‌بندی مناسب مواد غذایی در نظر گرفته می‌شود. با توجه به نیاز به بهبود عملکرد بسته‌بندی‌ها، استفاده از فناوری‌های نوآورانه‌ای مانند نانوبیوتکنولوژی و نانوسنسورها برای کاهش ضایعات، افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت محصولات، رو به افزایش است (۱-۳). از سوی دیگر، مشکلات زیست‌محیطی ناشی از استفاده از پلیمرهای سنتزی مبتنی بر سوخت‌های فسیلی در صنعت بسته‌بندی محصولات غذایی، به دلیل عدم تجزیه‌پذیری آن‌ها، زمینه تحقیقات گسترده در توسعه زیست‌پلیمرهای خوراکی و زیست‌تخریب‌پذیر^۱ را فراهم آورده است. در سال‌های اخیر، به دلیل سمیت پایین و قابلیت تجزیه‌پذیری، توسعه و استفاده از پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر از منابع تجدیدپذیر به‌عنوان جایگزینی پایدار مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. ترکیب این پلیمرها با پلیمرهایی ضد میکروبی مانند آلژینات و کیتوزان^۲، کارایی بسته‌بندی‌های نوین را در حفظ کیفیت مواد

غذایی بهبود می‌بخشد؛ به‌گونه‌ای که محصولات نهایی تخریب زیستی آن‌ها، همچون زیست‌توده، CO₂، آب و CH₄، می‌باشد که می‌توانند بر تعادل گازهای گلخانه‌ای و سایر اثرات زیست‌محیطی تأثیر مثبتی داشته باشند (۴-۶). در نتیجه، با توجه به نگرانی‌های زیست‌محیطی ناشی از استفاده از پلیمرهای سنتزی مبتنی بر سوخت‌های فسیلی، استفاده از مواد زیست‌تخریب‌پذیر در بسته‌بندی به‌منظور حفظ اکوسیستم و کاهش اثرات منفی زیست‌محیطی امری ضروری به شمار می‌آید. هرچند پلیمرهای زیست‌پایه در مقایسه با مواد متداول، اغلب ویژگی‌های مکانیکی ضعیف‌تری دارند که می‌تواند منجر به کاهش عمر مفید محصولات بسته‌بندی‌شده شود، پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که استفاده همزمان پلیمرهای طبیعی مانند کیتوزان و پلیمرهای سنتزی مانند پلی وینیل الکل (PVA)^۳ به دلیل خواص مکانیکی مناسب، فراوری آسان و هزینه نسبتاً پایین، گزینه‌های امیدوارکننده‌ای برای جایگزینی پلاستیک‌های سنتزی محسوب می‌شوند (۵ و ۷ و ۸). با این وجود، استفاده از پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر زیست‌پایه همچنان با چالش‌هایی نظیر استحکام کششی پایین و جذب آب بالا مواجه هستند؛ مشکلاتی که می‌توان با به‌کارگیری نانوذرات^۴ و بهبود ویژگی‌های عملکردی آن‌ها تا حد قابل توجهی برطرف نمود. لازم به ذکر است که روش‌های سنتز نانوذرات متداول مانند کاهش شیمیایی، میکرومولسیون و تجزیه حرارتی به دلیل استفاده از شرایط سخت، مواد شیمیایی سمی و هزینه‌های تولید بالا، از نظر زیست‌محیطی نیز دارای مشکلاتی هستند. در این میان، سنتز سبز^۵ به‌عنوان رویکردی پایدار و سازگار با محیط‌زیست مطرح شده و با به حداقل

³ Polyvinyl alcohol

⁴ Biobased polymers

⁵ Nanoparticles

⁶ Green synthesis

¹ Biodegradable

² Chitosan

و سد اکسیژنی عالی می‌گردد. در نتیجه، ترکیب آن با کیتوزان نیز موجب بهبود خواص مکانیکی این ماده می‌شود. مطالعات متعددی به بررسی فیلم‌های ترکیبی کیتوزان/PVA در بسته‌بندی مواد غذایی پرداخته‌اند که این ترکیب را به‌عنوان گزینه‌ای امیدوارکننده برای تولید فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر معرفی می‌کند. اگرچه فیلم‌های پلیمری زیست‌پایه به دلیل در دسترس بودن، هزینه کمتر و قابلیت تجزیه‌پذیری زیستی جایگزین‌های امیدوارکننده‌ای محسوب می‌شوند اما همچنان با چالش‌هایی نظیر استحکام کششی پایین و جذب آب بالا مواجه‌اند (۳ و ۷ و ۱۳) این معایب می‌تواند با استفاده از نانوذرات که ویژگی‌های عملکردی فیلم‌ها را بهبود می‌بخشند، رفع شود. شایان‌ذکر است که روش‌های سنتز متداول نانو ذرات مانند کاهش شیمیایی، میکرومولسیون و تجزیه حرارتی به دلیل شرایط سخت، استفاده از مواد سمی و هزینه‌های بالای تولید، مشکلات زیست‌محیطی به همراه دارند. در مقابل، سنتز سبز به‌عنوان رویکردی پایدار و سازگار با محیط‌زیست، با به حداقل رساندن استفاده از مواد مضر و پسماندهای زیان‌آور، جایگزینی مطلوب در تولید نانوذرات ارائه می‌دهد (۷ و ۸ و ۱۴). در میان نانوذرات مورد بررسی، نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد و کاربردهای بالقوه، به‌عنوان یکی از افزودنی‌های کلیدی در توسعه بسته‌بندی‌های مبتنی بر زیست‌پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. این نانوذرات به دلیل ویژگی‌های چندمنظوره از جمله به زیست‌سازگاری و غیرسمی بودن، نیمه‌رسانایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی، با ایجاد سد UV و تقویت ساختار کامپوزیت، نه تنها فعالیت ضدباکتریایی ماتریس‌های بسته‌بندی را افزایش داده بلکه به بهبود عمر ماندگاری مواد غذایی نیز کمک می‌کنند [۳ و ۱۵]. افزودن نانو ذرات ZnO به

رساندن استفاده از مواد سمی و تولید پسماندهای مضر، راه‌حلی مطلوب در جهت تولید نانومواد ارائه می‌دهد (۷ و ۹). کیتوزان، به‌عنوان دومین پلی‌ساکارید کاتیونی فراوان در طبیعت (پس از سلولز)، یک پلی‌ساکارید خطی متشکل از واحدهای N-استیل-D-گلوکوزامین و D-گلوکوزامین است که از طریق د استیلاسیون کیتین موجود در پوسته سخت‌پوستان نظیر خرچنگ و میگو استخراج می‌شود. این ماده به دلیل خواص ضد میکروبی، ضد قارچی، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، غیرسمی بودن و هزینه پایین، به‌عنوان گزینه‌ای ایده‌آل برای تولید فیلم‌های خوراکی و استفاده در صنعت بسته‌بندی غذایی مطرح شده است؛ اما باید توجه داشت که کیتوزان خالص تنها در شرایط اسیدی محلول بوده، از ویژگی‌های مکانیکی ضعیفی برخوردار است و در pH بالاتر از ۶/۵ فعالیت ضدباکتریایی خود را از دست می‌دهد (۳ و ۱۰ و ۱۱). به همین جهت، ترکیب کیتوزان با پلیمرهای دیگر مانند PVA، ژلاتین و پلی‌لاکتیک اسید (PLA) به‌عنوان یکی از راهکارهای مؤثر برای بهبود خواص مکانیکی و عملکردی آن مورد توجه قرار گرفته است. از این‌رو، در مطالعات گسترده‌ای ترکیب کیتوزان با PVA پیشنهاد شده است چراکه ماهیت کاتیونی کیتوزان امکان ایجاد پیوندهای هیدروژنی گروه آمینی آن با گروه‌های هیدروکسیل PVA را فراهم می‌آورد. PVA، پلیمر سنتزی محلول در آب حاصل از هیدرولیز پلی‌وینیل استات، به دلیل ویژگی‌هایی نظیر زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، غیرسمی بودن، بی‌بو بودن، شفافیت و مقاومت شیمیایی بالا در محیط‌های اسیدی و قلیایی، به‌عنوان ماده‌ای مناسب برای بسته‌بندی مواد غذایی شناخته می‌شود (۳ و ۱۰ و ۱۱). علاوه بر این، تعاملات بین مولکولی مطلوب، قابلیت امتزاج‌پذیری بالای PVA منجر به تشکیل فیلم‌های با استحکام بالا

بروز اثرات ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد دیابتی می‌شود. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که PPP نسبت به سایر بخش‌های گیاه، فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری از خود نشان می‌دهد و به عنوان ضایعات غذایی، منبع پایداری برای استخراج ترکیبات مؤثر محسوب می‌شود [۱۷-۱۹]. بنابراین به کارگیری PPP در ماتریس‌های زیست پلیمری می‌تواند پایداری اکسیداتیو را افزایش داده، ماندگاری محصولات را بهبود بخشد و ارزش تغذیه‌ای آن‌ها را ارتقا دهد. با وجود مطالعات پیشین که پتانسیل استفاده از ترکیب‌های کیتوزان-PVA و کیتوزان-نانوذرات ZnO را در بسته‌بندی نشان داده‌اند (۱ و ۳) و همچنین پژوهش‌هایی که از فیلم‌های مشابه این پژوهش به منظور بسته‌بندی مواد غذایی استفاده کرده‌اند (۳ و ۷) (۱۷-۲۰) تاکنون مطالعه‌ای جامع در خصوص ترکیب عصاره PPE با مخلوط پلیمری کیتوزان/PVA/ZnO به منظور ارزیابی پتانسیل ضد میکروبی و ضد قارچی در کاربرد بسته‌بندی مواد غذایی انجام نشده است. بنابراین هدف از این پژوهش، تولید فیلم‌های نانوکامپوزیتی زیست تخریب پذیر بر پایه کیتوزان با افزودن PVA، عصاره PPE در غلظت‌های مختلف و سطوح متفاوت نانوذرات ZnO به منظور ارزیابی خواص ضد میکروبی و ضد قارچی می‌باشد. این فیلم‌های نانوکامپوزیتی با بهره‌گیری از تکنیک‌های طیف سنجی، حرارتی و مکانیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت، عملکرد بهینه فیلم منتخب در برابر آلودگی‌های ناشی از استافیلوکوکوس/اورئوس و/شرشیا کلی آزمایش شد تا امکان استفاده بالقوه آن به عنوان بسته‌بندی ضد میکروبی مواد غذایی تعیین گردد.

مواد و روش‌ها

روش تهیه عصاره پوست انار: عصاره گیری پوست انار با روش استخراج الکلی صورت گرفت. برای

ترکیب با کیتوزان، خواص مکانیکی و عملکردی فیلم را تغییر داده است؛ این تغییرات شامل انتقال خواص از حالت شکننده به انعطاف پذیر، کاهش استحکام کششی و مدول ینگ همراه با افزایش ازدیاد طول در نقطه شکست و بهبود ویژگی‌های سدکنندگی مانند کاهش نفوذپذیری بخار آب و اکسیژن می‌باشد. لازم به ذکر است که مکانیسم ضد باکتریایی ZnO به گونه‌ای است که بلافاصله پس از تماس با باکتری‌ها، از طریق تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) موجب بی‌ثباتی ژنومی، آسیب به پروتئین‌های غشایی و تخریب غشای سلولی می‌شود؛ در مقابل، تمامی این عوامل نیز می‌توانند مقاومت پاتوژن‌های ناشی از غذا را نسبت به عوامل ضد باکتریایی مرسوم آغاز کرده یا تشدید کنند (۳ و ۱۵). با این حال، با ساخت ترکیبات حاوی نانوذرات ZnO خاص که خاصیت آنتی اکسیدانی دارند، می‌توان اثرات منفی ناشی از تولید بیش از حد ROS را کاهش داد. علاوه بر موارد مذکور، روش‌های سنتز سبز با استفاده از عصاره‌های طبیعی و ضایعات زیست توده نیز در سال‌های اخیر به عنوان رویکردهایی پایدار و سازگار با محیط زیست، توجه گسترده‌ای را به خود جلب کرده‌اند. استفاده از منابع طبیعی و گونه‌های گیاهی متنوع، امکان سنتز نانوذرات با ویژگی‌های مطلوب را فراهم نموده است. به عنوان نمونه، اخیراً نانوذرات ZnO با بهره‌گیری از عصاره‌های گیاهی با موفقیت سنتز شده‌اند (۳ و ۱۵ و ۱۶). در میان عصاره‌های گیاهی دارای خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی، عصاره پوست انار (PPP) به دلیل ویژگی‌های برجسته خود جایگاه ویژه‌ای یافته و به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است. انار (با نام علمی *Punica granatum*)، میوه‌ای بومی ایران با کاربرد فراوان در طب سنتی، حاوی ترکیبات زیست فعالی نظیر فلاونوئیدها و تانن‌هاست که موجب

عصاره گیری از پوست انار، ابتدا انار شسته و پوست آن جدا شده و سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک و آسیاب گردید تا به صورت پودر درآید. سپس ۰/۲ گرم از پودر پوست انار با ۱۰ میلی لیتر متانول مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴۵ درجه سانتی گراد در حمام التراسونیک (مدل ULTRA 2020 ساخت شرکت James انگلستان) قرار گرفت. مخلوط به دست آمده در دمای ۵ درجه سانتی گراد و با دور ۸۶۵۴ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (سیگما، ساخت آلمان) شد. در نهایت، مخلوط رویی با کاغذ واتمن شماره ۱۱ صاف شده و در آون خلأ در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد خشک گردید (۲۰).

روش رنگبری عصاره پوست انار: به منظور رنگبری عصاره انار از کربن فعال استفاده شد و پس از ۵ ساعت انکوباسیون کربن فعال با عصاره انار طی دو مرحله عصاره ها در سه حلال مختلف (متانول و استون به نسبت برابر، متانول دو برابر استون و استون دو برابر متانول) رنگبری شد.

ساخت فیلم نانوکامپوزیت مبتنی بر پلی وینیل الکل / کیتوزان / اکسید روی / عصاره پوست انار: نانوکامپوزیتی ساخته شده شامل عصاره PPE با مخلوط پلیمری کیتوزان / PVA / ZnO است. در این مطالعه کیتوزان به عنوان ماده اصلی فیلم نانوکامپوزیت انتخاب شد، اما به دلیل خواص مکانیکی و فیزیکی ضعیف با PVA ترکیب گردید و برای بهبود خواص فیلم، از اسید سیتریک و گلیسرول استفاده شد. برای سنتز این فیلم، ابتدا ۴/۵ گرم کیتوزان به ۳۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد و ۳۳/۶ گرم اسیدسیتریک به آن افزوده گردید و به مدت یک ساعت هم خورد تا کاملاً در آب حل شود و محلول شفاف زرد رنگ به دست آید. در این مرحله دما ۹۵ درجه سانتی گراد و سرعت همزن (همزن مغناطیسی دیجیتال شرکت

خرداد تجهیز) ۵۰۰ دور بر دقیقه تنظیم شد. در مرحله بعد، ۲/۵ گرم پلی وینیل الکل به ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه هم خورد تا در آب حل شود. سپس ۲/۵ گرم اکسید روی در ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه توزیع شد و به محلول پلی وینیل الکل اضافه و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و سرعت ۶۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱ ساعت مخلوط شد. سپس ۱۵ گرم عصاره پوست انار و ۰/۸ میلی لیتر گلیسرول برای افزایش انعطاف پذیری فیلم اضافه گردید و به مدت یک ساعت مخلوط شد. پس از قالب گیری، فیلم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و تحت شرایط خلأ با استفاده از دستگاه آون خلأ (ساخت کمپانی جیوتک کره) خشک شد. به دلیل ضخامت زیاد و رنگ تیره، از کربن فعال (۳۰ گرم کربن فعال به آن افزوده شد و فرآیند رنگبری به مدت ۲ ساعت ادامه یافت نمونه های رنگبری شده S۱، S۲، S۳ به منظور بررسی و مقایسه خواص ضدباکتریایی آنها تهیه شدند) برای رنگبری عصاره استفاده شد. اثر سه حلال مختلف (آب، الکل و استون) در رنگبری و حفظ خواص ضدباکتریایی عصاره مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه نمونه S۱ با استون، ۶ گرم عصاره در ۳۰۰ میلی لیتر استون حل و ۳۰ گرم کربن فعال افزوده شد. این محلول به مدت ۲ ساعت همگن و سپس از کاغذ صافی عبور داده شد. نمونه S۲ با متانول و نمونه S۳ با آب دیونیزه تهیه شد. محصول نهایی نمونه S۲ روشن تر از سایر نمونه ها بود. (لازم به تاکید است که فرآیند رنگبری قبل از اضافه کردن عصاره ها به فیلم انجام شده است). بر اساس الگوی زیر، نمونه های مختلفی سنتز شدند:

- نمونه ۱: کیتوزان و پلی وینیل الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)،

استافیلوکوکوس/اورئوس (ATCC ۶۵۳۸) استفاده شد.

باکتری‌ها در محیط کشت LURIA BERTANI(LB)

و آگار رشد داده شدند. برای تهیه استوک، ۰٫۱۸ گرم نرمال سالین ۰٫۹٪ با ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط و اتوکلاو شد. سپس سوسپانسیون نیم مک فارلند به فالكون‌های استریل تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت گردید. پس از سانتریفیوژ، سوسپانسیون‌ها با گلیسرول مخلوط و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. در ادامه به منظور بررسی میزان فعالیت ضدباکتریایی عصاره پوست انار، از سه روش استاندارد، روش دیسک دیفیوژن^۱، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)^۲ و روش چاهک‌گذاری^۳ استاندارد استفاده شد (۱۹ و ۱۸).

روش دیسک دیفیوژن: در روش دیسک دیفیوژن پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار با باکتری‌های /شریشیا کلی و /استافیلوکوکوس/اورئوس، با کدورت استاندارد معادل نیم مک فارلند به روش کشت چمنی تلقیح شدند. پس از تلقیح پلیت‌ها با هر یک از باکتری‌ها، دیسک‌های کاغذی آغشته به عصاره پوست انار با غلظت‌های مختلف بر روی سطح نوترینت آگار قرار گرفتند و به مدت ۲۴ ساعت در دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان این مدت، هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد (۲۰).

ارزیابی اثرات ضدباکتریایی: برای ارزیابی اثرات ضدباکتریایی عصاره پوست انار، سریال رقت‌هایی با غلظت‌های ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ گرم/میلی‌لیتر تهیه گردید و دیسک‌های انتشار آغشته به این غلظت‌ها بر روی سطح محیط کشت قرار داده شدند. به منظور کنترل مثبت آزمایش، دیسک‌های

عصاره پوست انار (۰/۱ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۲۰۰ میلی‌لیتر)

- نمونه ۲: کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۱۰۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۲ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۱۵۰ میلی لیتر)
- نمونه ۳: کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۱۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۳ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۱۰۰ میلی لیتر)
- نمونه ۴: کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۲۰۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۴ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۵۰ میلی لیتر)
- نمونه ۵: کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۵ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۱۰۰)
- نمونه ۶ (مرجع): کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)
- نمونه ۷: کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۱ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۱۰۰)
- نمونه ۸: کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۵ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۲۰۰ میلی لیتر)

هر یک از ۸ نمونه فوق به کمک سمپلر در میکروتیوب‌های مخصوص انتقال داده شدند و برای آزمون‌های ضدباکتریایی و ضدقارچی آماده شدند (۲۰ و ۲۱).

کشت و نگهداری باکتری و قارچ: برای بررسی اثر ضدقارچی و ضدباکتریایی، از قارچ‌های مخمری و باکتری‌های /شریشیا کلی (ATCC ۲۵۹۲۲) و

¹ Disc diffusion

² Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

³ Well Diffusion Method

آنتی‌بیوگرام حاوی جنتامایسین^۱ و آمپی‌سیلین^۲ نیز بر روی محیط کشت قرار گرفتند. سپس پلیت‌ها مجدداً در انکوباتور با دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. روز بعد، پلیت‌ها از نظر خاصیت ضدباکتریایی (قطره‌اله عدم رشد) مورد بررسی قرار گرفتند. این روش مشابه روش دیسک دیفیوژن است، با این تفاوت که در این روش سوراخ‌هایی به قطر ۶ تا ۸ میلی‌متر بر روی سطح نوترینت آگار ایجاد می‌شود. حجم مشخصی از عصاره پوست انار با غلظت‌های معین به درون این چاهک‌ها تزریق شد. پس از گرمخانه گذاری پلیت در شرایط استاندارد با گذشت ۲۴ ساعت، هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها به منظور بررسی میزان اثر ضدباکتریایی عصاره پوست انار بر روی رشد هر دو سویه از باکتری بررسی شد (۲۰).

آزمون ضدقارچی بر روی فیلم به روش MIC: به دلیل عملکرد برتر نمونه‌های ۴ و ۸ در آزمون‌های ضدباکتریایی، این دو نمونه برای آزمون ضدقارچی روی سه گونه مخمری شامل استاندارد (۱۱-۷۰)، کاندیدا (۱-۵-ب) و کاندیدا (ش-۳) مورد بررسی قرار گرفتند. بنابراین ابتدا محیط کشت با حل کردن ۱۰،۴۳ گرم RPMI و ۳۴،۵۳ گرم MOPS در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه و pH آن به ۷ تنظیم شد. سپس حجم نهایی محلول به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسید. در ادامه سوسپانسیون مخمری با تهیه محیط کشت سابرو دکستروز آگار شامل ۴۰ گرم دکستروز، ۱۰ گرم پپتون و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر تولید شد. مقداری از این محیط با سوآپ استریل به لوله آزمایش حاوی ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه و برای تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلند، OD در طول موج ۵۳۰ نانومتر بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ تنظیم

شد. سپس نمونه‌های فیلم شماره ۴ و ۸ به نسبت ۵ به ۱ با آب مقطر استریل رقیق شدند. تمامی این مراحل در زیر هود و نزدیک به شعله انجام گردید. در مرحله بعدی سوسپانسیون مخمری با آب مقطر به نسبت ۱۰ به ۱ رقیق و به نسبت ۱ به ۱۰۰ با محیط کشت سلولی ترکیب شد. در این مرحله، ۹۹۰۰ میکرولیتر RPMI و ۱۰۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری در یک لوله آزمایش ترکیب شدند. در نهایت، آزمایش در یک پلیت ۹۶ خانه ای صورت گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر از بیوفیلم نمونه‌های ۴ و ۸ به خانه اول ردیف اول و خانه اول ردیف دوم ریخته شد. با استفاده از سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر از RPMI به خانه‌های دوم تا دوازدهم افزوده و محتویات خانه اول به خانه دوم منتقل شدند. این روند تا خانه یازدهم ادامه یافت و در این مرحله محتویات دور ریخته شد، به طوری که خانه‌های یازدهم و دوازدهم به عنوان کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شدند. سپس سوسپانسیون قارچی از خانه دوازدهم به خانه‌های دیگر اضافه شد، به جز خانه شماره یازدهم و این فرآیند برای هرگونه مخمر سه بار تکرار گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند و روز بعد نتایج به صورت چشمی خوانش و ثبت شدند (۲۱).

نتایج

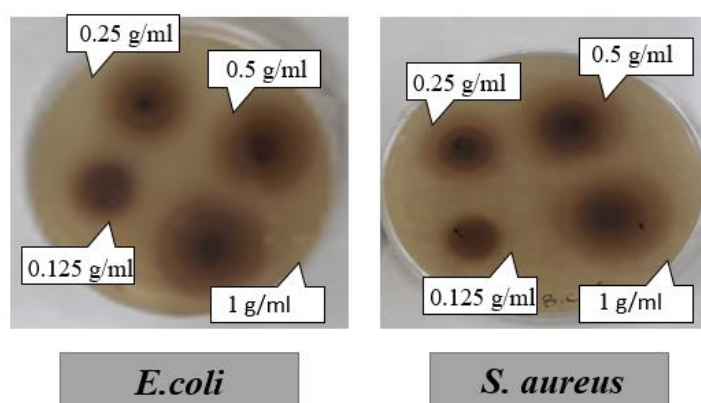
نتایج آزمون ضدباکتریایی عصاره پوست انار به روش چاهک گذاری: نتایج آزمون ضدباکتریایی عصاره پوست انار با استفاده از روش چاهک گذاری نشان داد که اثر ضدباکتریایی آن با افزایش غلظت عصاره به طور معناداری تقویت می‌شود. در مطالعات پیشینی انجام شده توسط برگوس و همکاران (۱۸) نیز وجود خواص ضد باکتری عصاره پوست انار تأیید شد. این ویژگی به دلیل اثر ترکیبات پلی فنولی در عصاره و تخریب غشاء باکتری در اثر واکنش با این ترکیبات بوده است.

^۱ Gentamicin

^۲ Ampicillin

یافته‌ها نشان دادند که عصاره پوست انار در غلظت‌های بالا دارای فعالیت ضدباکتریایی موثرتری است و اثر آن بر *اشرشیا کلی* بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* به نظر می‌رسد. این نتایج پتانسیل بالای عصاره پوست انار را به عنوان یک ماده ضدباکتریایی طبیعی برای استفاده در صنعت بسته بندی مواد غذایی، به ویژه در پیشگیری از آلودگی‌های باکتریایی، تأکید می‌کند (شکل و جدول ۱).

بررسی‌ها نشان داد که غلظت‌های بالاتر عصاره (از ۰/۱۲۵ تا ۱ گرم در میلی‌لیتر) منجر به افزایش تدریجی قطر هاله‌های عدم رشد و به تبع آن، تقویت خاصیت مهار بر رشد باکتری‌ها می‌شود. همچنین مقایسه تأثیر عصاره بر دو باکتری *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* حاکی از اثر قوی تر عصاره بر *اشرشیا کلی* است که ممکن است به ویژگی‌های ساختاری متفاوت دیواره سلولی این دو باکتری مرتبط باشد. در نهایت،



شکل ۱- قطر هاله عدم رشد

Figure 1- Diameter of the growth inhibition zone

جدول ۱- نتیجه خاصیت ضدباکتریایی سریال رقت عصاره پوست انار بر حسب گرم / میلی‌لیتر

Table 1- Result of serial dilution antibacterial properties of pomegranate peel extract in gram/ML			
1.25	0.25	0.5	1
غلظت عصاره پوست انار Pomegranate peel extract concentration			
باکتری اشرشیا کلی <i>Escherichia coli</i> bacteria			
*	**	***	****
باکتری استافیلوکوکوس اورئوس <i>Staphylococcus aureus</i> bacteria			
*	*	**	***

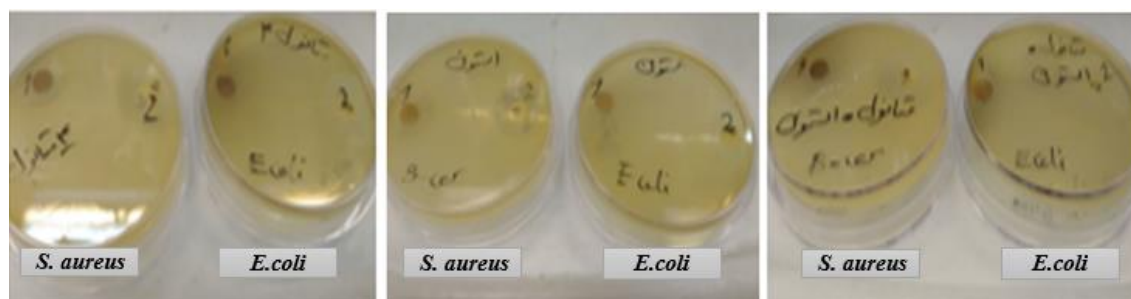
فعالیت ضدباکتریایی ضعیف (*) / فعالیت ضدباکتریایی متوسط (**) / فعالیت ضدباکتریایی بالا (***)

Weak antibacterial activity (*) / Moderate antibacterial activity (**) / High antibacterial activity

خاصیت ضدباکتریایی از خود نشان داده و هیچ یک از نمونه‌ها تأثیری بر *استافیلوکوکوس اورئوس* نداشتند. جدول ۳ نتایج تکرار آزمون ضدباکتریایی نمونه S1 در غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. خاصیت ضدباکتریایی این نمونه فقط علیه *اشرشیا کلی* مشاهده شد و قدرت آن بسته به غلظت تغییر کرد. به ویژه،

بررسی خاصیت عصاره‌های رنگ‌بری شده: در این بخش، خاصیت ضدباکتریایی سه نمونه رنگ‌بری شده (S1، 2S و S3) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به صورت کیفی و کمی ثبت شد (شکل ۲ و جدول ۲). نتایج اولیه نشان داد که تنها نمونه S1 در برابر باکتری *اشرشیا کلی*

غلظت ۰/۲۵ گرم در میلی لیتر به عنوان حداقل غلظت مؤثر، عملکرد مشابه آنتی بیوگرام جنتامایسین را نشان داد. باین حال، مشخص شد که فرآیند رنگبری به طور کامل انجام نشده است. بنابراین برای بهینه سازی این خاصیت، استفاده از حلال های قوی تر و نسبت های متفاوت مورد بررسی قرار گرفت (۲۰ و ۲۲).



(ج) (الف)

(ب) (الف)

(الف) (الف)

شکل ۲- ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی عصاره پوست انار رنگبری شده با حلال های مختلف (آب- استون- متانول) (الف) متانول و استون به نسبت برابر. (ب) نسبت دو برابری استون به متانول. (ج) نسبت دو برابری متانول به استون. در هر سه نمونه میزان آب ثابت است و غلظت عصاره رنگبری شده ۰/۲۵ گرم/میلی لیتر.

Figure 2. Evaluation of antibacterial properties of bleached pomegranate peel extract with different solvents (water-acetone-methanol) (a) Methanol equal to acetone. (b) Double ratio of acetone to methanol. (c) Double ratio of methanol to acetone. In all three samples, the amount of water is constant and the concentration of bleached extract is 0.25 g/ml.

جدول ۲- نتایج هاله عدم رشد عصاره های رنگبری شده با حلال های مختلف در غلظت ۰/۲۵ گرم/میلی لیتر

Table 2. Results of the growth inhibition zone of bleached extracts with different solvents at a concentration of 0.25 g/ml

استافیلوکوکوس ارئوس Staphylococcus aureus	اشرشیا کلی Escherichia coli	نوع باکتری Type of bacteria	عصاره های رنگبری شده bleached pomegranate peel extract
—	✓		S1
—	—		S2
—	—		S3

فعالیت ضدباکتریایی مشاهده شد (✓) / فعالیت ضدباکتریایی مشاهده نشد (-)

Antibacterial activities observed (✓) / Antibacterial activities not observed (-)

جدول ۳- آزمون فعالیت ضدباکتریایی نمونه S1 در غلظت های مختلف

Table 3. Antibacterial activity test of sample S1 at different concentrations

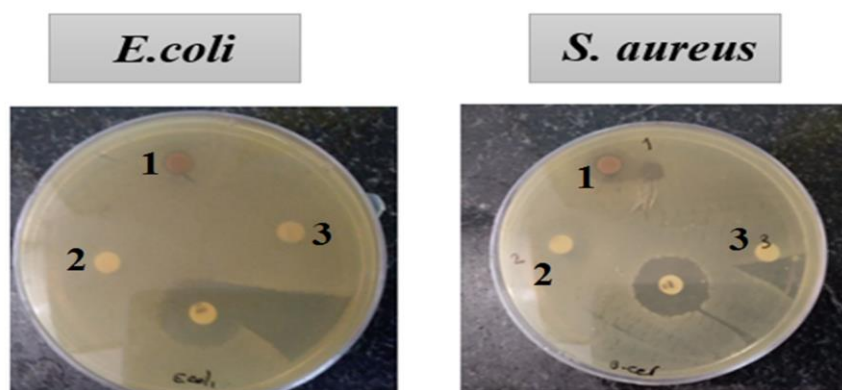
غلظت S1 S1 concentration	۱ (گرم/ میلی لیتر) g/ml	۰/۵ (گرم/ میلی لیتر) g/ml	۰/۲۵ (گرم/ میلی لیتر) g/ml	۰/۱۲۵ (گرم/ میلی لیتر) g/ml
اشرشیا کلی Escherichia coli	***	**	*	—

فعالیت ضدباکتریایی ضعیف (*) / فعالیت ضدباکتریایی متوسط (**) / فعالیت ضدباکتریایی بالا (***) / فعالیت ضدباکتریایی مشاهده نشد

Weak antibacterial activity (*) / Moderate antibacterial activity (**) / High antibacterial activity (***) / No antibacterial activity observed (-)

شرشیا کلی نداشته و تنها نمونه شماره ۳ (کیتوزان و پلی وینیل الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۱۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره رنگبری شده پوست انار (۰,۳ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۱۰۰ میلی لیتر)) خاصیت ضدباکتریایی بسیار ضعیفی در برابر /ستافیلوکوکوس/ اورئوس از خود نشان داد. نکته قابل توجه این است که با حذف کامل رنگ، خاصیت ضدباکتریایی به تدریج کاهش یافت، که نشان دهنده تأثیر منفی فرآیند رنگبری بر فعالیت زیستی عصاره است. به همین دلیل، ادامه استفاده از عصاره پوست انار رنگبری شده برای ساخت فیلم متوقف شد. این داده‌ها نشان می‌دهند که هرچند ترکیب متانول و استون در حذف رنگ مؤثر بود، اما منجر به کاهش یا حذف ترکیبات فعال زیستی مسئول خاصیت ضدباکتریایی گردید.

بررسی خاصیت ضدباکتریایی فیلم ساخته شده با عصاره رنگبری شده: از میان سه حالت مختلف حلال (نسبت برابر متانول و استن، نسبت دو برابری متانول به استن و نسبت دو برابری استون به متانول) نسبت برابر متانول و استون با توجه به نتایج، بهترین حلال برای بهینه‌سازی فرآیند حذف رنگ و حفظ خصوصیات ضدباکتریایی فیلم نهایی تعیین شد. یافته‌ها نشان داد که یک غلظت مشخص از عصاره در ترکیب متانول و استون با نسبت مساوی به همراه یک واحد آب دیونیزه، بهترین کارایی را در حذف رنگ نشان می‌دهد. از عصاره‌های رنگبری شده به روش منتخب برای ساخت فیلم نانوکامپوزیتی استفاده شد. نتایج آزمایش کیفی (شکل ۳ و جدول ۴) حاکی از این است که هیچ‌یک از نمونه‌های ساخته شده با عصاره رنگبری شده خاصیت ضدباکتریایی علیه



شکل ۳- نتایج آزمون ضدباکتریایی فیلم‌های سنتز شده با عصاره رنگبری شده. نمونه شماره ۱ (کیتوزان و پلی وینیل الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۱۰۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره رنگبری شده پوست انار (۰/۱ گرم / میلی لیتر))، نمونه شماره ۲ (کیتوزان و پلی وینیل الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۱۰۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره رنگبری شده پوست انار (۰/۲ گرم / میلی لیتر))، نمونه شماره ۳ (کیتوزان و پلی وینیل الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۱۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره رنگبری شده پوست انار (۰,۳ گرم / میلی لیتر))

Figure 3. Results of antibacterial test of synthesized films with bleached extract. Sample No. 1 (chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (100 mg/ml), bleached pomegranate peel extract (0.1 g/ml)), Sample No. 2 (chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (100 mg/ml), bleached pomegranate peel extract (0.2 g/ml)), Sample No. 3 (chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (150 mg/ml), bleached pomegranate peel extract (0.3 g/ml))

جدول ۴- نتایج به دست آمده آزمون ضدباکتریایی در نسبت‌های برابر متانول و استون

Table 4. Results of antibacterial test in equal proportions of methanol and acetone

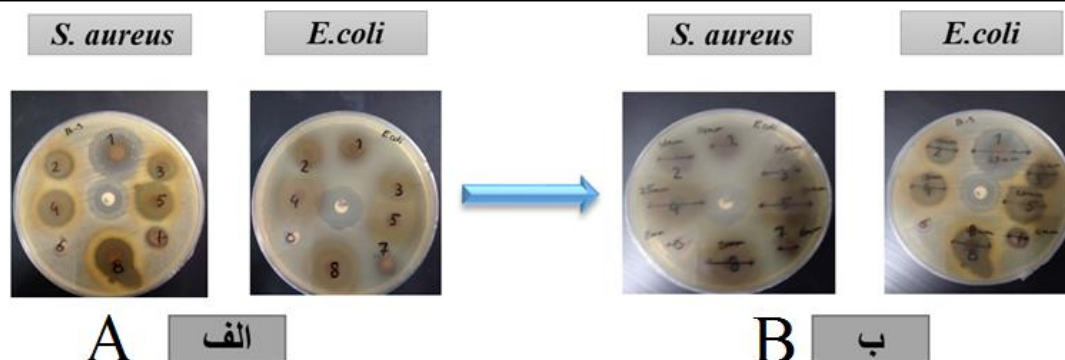
نمونه شماره ۳	نمونه شماره ۲	نمونه شماره ۱	شماره نمونه
(کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۱۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره رنگیری شده پوست انار (۰.۳ گرم / میلی لیتر))	(کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۱۰۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره رنگیری شده پوست انار (۰.۲ گرم / میلی لیتر))	(کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۱۰۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره رنگیری شده پوست انار (۰.۱ گرم / میلی لیتر))	Sample number
Sample No. 3 Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (150 mg/ml), bleached pomegranate peel extract (0.3 g/ml)	Sample No. 2 Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (100 mg/ml), bleached pomegranate peel extract (0.2 g/ml)	Sample No. 1 Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (100 mg/ml), bleached pomegranate peel extract (0.1 g/ml)	نوع باکتری Type of bacteria
—	—	—	اشریشیا کلی Escherichia coli
*	—	—	استافیلوکوکوس اورئوس Staphylococcus aureus

فعالیت ضدباکتریایی ضعیف (*) / فعالیت ضدباکتریایی مشاهده نشد

(-) Weak antibacterial activity (*) / No antibacterial activity observed(-)

مورد / استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت)، نمونه شماره ۱ با قطر هاله ۲۹ میلی متر بیشترین تأثیر را داشت، درحالی‌که نمونه شماره ۴ (کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۲۰۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره پوست انار (۰.۴ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۵۰ میلی لیتر) نیز با قطر هاله ۱۸ میلی متر فعالیت قابل توجهی داشت. انتخاب نمونه شماره ۴ به دلیل خاصیت ضدباکتریایی قابل توجه و ترکیب بهینه مواد انجام شد که نشان‌دهنده اهمیت نوع و میزان مواد اولیه در کارایی ضدباکتریایی فیلم‌ها است (شکل ۴ و جدول ۵).

بررسی خاصیت ضدباکتریایی نمونه‌های حاوی عصاره انار معمولی: در آزمایش‌های ضدباکتریایی بر روی ۸ نمونه فیلم، نمونه شماره ۴ (کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۲۰۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره پوست انار (۰.۴ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۵۰ میلی لیتر) که شامل کیتوزان، پلی‌وینیل‌الکل، اکسید روی و عصاره پوست انار (۰.۴ گرم / میلی لیتر) بود، بهترین عملکرد را از خود نشان داد. این نمونه در آزمایش با باکتری اشریشیا کلی (گرم منفی) با قطر هاله عدم رشد ۲۵ میلی متر، بالاترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت. در



شکل ۴- بررسی خاصیت ضدباکتریایی ۸ فیلم ساخته شده. الف) مشاهده کیفی نمونه‌ها/ ب) اندازه‌گیری با کولیس. نمونه ۱ (کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۱ گرم / میلی‌لیتر)، آب دیونیزه (۲۰۰ میلی‌لیتر))، نمونه ۲ (کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۱۰۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۲ گرم / میلی‌لیتر)، آب دیونیزه (۱۵۰ میلی‌لیتر))، نمونه ۳ (کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۱۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۳ گرم / میلی‌لیتر)، آب دیونیزه (۱۰۰ میلی‌لیتر))، نمونه ۴ (کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۲۰۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۴ گرم / میلی‌لیتر)، آب دیونیزه (۵۰ میلی‌لیتر))، نمونه ۵ (کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۵ گرم / میلی‌لیتر)، آب دیونیزه (۱۰۰ میلی‌لیتر))، نمونه ۶ (کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۱ گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، آب دیونیزه (۱۰۰ میلی‌لیتر))، نمونه ۷ (کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۱ گرم / میلی‌لیتر)، آب دیونیزه (۱۰۰ میلی‌لیتر))، نمونه ۸ (کیتوزان و پلی‌وینیل‌الکل (۲۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، اکسید روی (۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۵ گرم / میلی‌لیتر)، آب دیونیزه (۲۰۰ میلی‌لیتر))

Figure 4. Investigation of the antibacterial properties of 8 manufactured films. A) Qualitative observation of samples/B) Measurement with calipers. Sample 1 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (50 mg/ml), pomegranate peel extract (0.1 g/ml), deionized water (200 ml)), Sample 2 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (100 mg/ml), pomegranate peel extract (0.2 g/ml), deionized water (150 ml)), Sample 3 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (150 mg/ml), pomegranate peel extract (0.3 g/ml), deionized water (100 ml)), Sample 4 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (200 mg/ml), pomegranate peel extract (0.4 g / ml), deionized water (50 ml)), Sample 5 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg / ml), zinc oxide (250 mg / ml), pomegranate peel extract (0.5 g / ml), deionized water (100)), Sample 6 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg / ml), Sample 7 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg / ml), zinc oxide (250 mg / ml), pomegranate peel extract (0.1 g / ml), deionized water (100)), Sample 8 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg / ml), zinc oxide (50 mg / ml), pomegranate peel extract (0.5 g / ml), deionized water (200 ml))

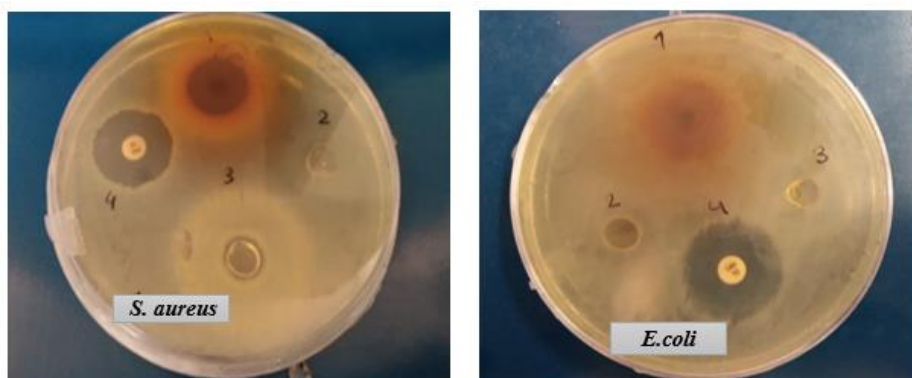
جدول ۵- نتایج به دست آمده از اندازه گیری قطر هاله عدم رشد به وسیله کولیس (بر حسب میلی متر)

Table 5 -Results of measuring diameter of the growth inhibition zone using a caliper (millimeters)

شماره نمونه Sample number	نمونه ۱۸ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۵۰)	نمونه ۱۷ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۲۵۰)	نمونه ۱۵ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۱۵۰)	نمونه ۱۴ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۲۰۰)	نمونه ۱۳ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۱۰۰)	نمونه ۱۲ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۱۰۰)	نمونه ۱۱ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۵۰)	نمونه ۱۰ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۵۰)	نمونه ۹ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۵۰)	نمونه ۸ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۵۰)	نمونه ۷ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۲۵۰)	نمونه ۶ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۲۵۰)	نمونه ۵ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۲۵۰)	نمونه ۴ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۲۵۰)	نمونه ۳ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۱۵۰)	نمونه ۲ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۱۰۰)	نمونه ۱ (کتیزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰) / میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی ۵۰)	نوع باکتری Bacteria typ
۲۰	Sample 8 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (50 mg/ml), pomegranate peel extract (0.5 g/ml), deionized water (200 ml))	Sample 7 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (250 mg/ml), pomegranate peel extract (0.1 g/ml), deionized water (100))	Sample 6 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml))	Sample 5 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (250 mg/ml), pomegranate peel extract (0.5 g/ml), deionized water (100))	Sample 4 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (200 mg/ml), pomegranate peel extract (0.4 g/ml), deionized water (50 ml))	Sample 3 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (150 mg/ml), pomegranate peel extract (0.3 g/ml), deionized water (100 ml))	Sample 2 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (100 mg/ml), pomegranate peel extract (0.2 g/ml), deionized water (150 ml))	Sample 1 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (50 mg/ml), pomegranate peel extract (0.1 g/ml), deionized water (200 ml))	۱۴	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۵	۷	۷	۱۴	Escherichia coli
۱۸		۷	۸	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	Staphylococcus aureus

استافیلوکوکوس آرتوس تأثیری نشان دهد. همچنین، فیلم رنگبری شده (نمونه شماره ۳) عملکرد متوسطی در برابر استافیلوکوکوس آرتوس داشت، اما در برابر / شرشیا کلی تأثیر قابل توجهی نداشت. این نتایج تأکید می‌کند که فرمولاسیون نهایی (نمونه شماره ۱) با ترکیب بهینه کیتوزان، پلی وینیل الکل، اکسید روی و عصاره پوست انار، بهترین عملکرد ضد میکروبی را ارائه می‌دهد و می‌تواند به عنوان گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای ضد میکروبی مورد استفاده قرار گیرد. به طور کلی، الگوستز نمونه شماره ۴ مبنای مناسبی برای تولید فیلم نهایی با خواص ضد میکروبی برتر است که در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مؤثر است.

بررسی عملکرد ضد میکروبی فیلم نهایی انتخاب شده: بر اساس نتایج آزمون‌های ضد باکتریایی و ضد قارچی، نمونه شماره ۴ به عنوان پایه‌ای مناسب برای سنتز فیلم نهایی انتخاب شد. فیلم‌های نهایی با ترکیبات بهینه شده تولید و آزمون ضد باکتریایی روی آن‌ها انجام شد. نتایج (شکل ۵ و جدول ۶) نشان داد که فیلم نهایی (نمونه شماره ۱) عملکرد قابل توجهی در مهار رشد میکروارگانیسم‌های / شرشیا کلی و / استافیلوکوکوس آرتوس داشت. در این نمونه، قطره‌ها عدم رشد در برابر / استافیلوکوکوس آرتوس بالاترین مقدار را داشت که مؤید اثربخشی بالا در مهار این باکتری است. در مقابل، فیلم مرجع (نمونه شماره ۲) تأثیر محدودی بر / شرشیا کلی داشت و نتوانست بر



شکل ۵- بررسی فعالیت ضد باکتریایی فیلم نهایی، مرجع، رنگبری شده. فیلم شماره ۱ (کیتوزان و پلی وینیل الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۲۰۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۴ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۵۰ میلی لیتر)، فیلم شماره ۲ (کیتوزان و پلی وینیل الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، فیلم شماره ۳ (کیتوزان و پلی وینیل الکل (۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۱۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره رنگبری پوست انار (۰/۳ گرم / میلی لیتر))

Figure 5. Evaluation of the antibacterial activities of the final, reference, bleached film. Film No. 1 (chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (200 mg/ml), pomegranate peel extract (0.4 g/ml), deionized water (50 ml)), Film No. 2 (chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml)), Film No. 3 (chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (150 mg/ml), bleached pomegranate peel extract (0.3 g/ml))

جدول ۶- نتایج آزمون ضدباکتریایی فیلم (نهایی، مرجع، رنگبری شده) براساس قطر هاله عدم رشد.

Table 6. Results of antibacterial test of film (final, reference, bleached) based on diameter of non-growth zone

شماره نمونه	فیلم شماره ۱	فیلم شماره ۲	فیلم شماره ۳
Sample number	(کیتوزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰)	(کیتوزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰)	(کیتوزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰)
	میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی (۲۰۰)	میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی (۲۵۰)	میلی گرم / میلی لیتر، اکسید روی (۱۵۰)
	میلی گرم / میلی لیتر، عصاره پوست انار (۰/۴ گرم / میلی لیتر، آب دیونیزه ۵۰)	میلی گرم / میلی لیتر، عصاره پوست انار (۰/۳ گرم / میلی لیتر)	میلی گرم / میلی لیتر، عصاره پوست انار (۰/۳ گرم / میلی لیتر)
نوع باکتری	Film No. 1 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (200 mg/ml), pomegranate peel extract (0.4 g/ml), deionized water (50 ml))	Film No. 2 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml))	Film No. 3 (Chitosan and polyvinyl alcohol (250 mg/ml), zinc oxide (150 mg/ml), pomegranate peel bleaching extract (0.3 g/ml))
Bacteria type			
	اشرشیاکلی	*	-
Escherichia coli	**		
استافیلوکوکوس اورئوس	***	-	*
Staphylococcus aureus			

نمونه شماره ۸ توانست در برابر گونه های استاندارد (۷۰-۱۱) و کاندیدا (۵-۱-ب) به طور کامل رشد قارچ را کنترل کند. نمونه شماره ۴ نیز عملکرد مشابهی داشت و رشد قارچ را به خصوص در برابر گونه های استاندارد به طور موثری مهار کرد. به طور کلی، با توجه به نتایج آزمون های ضد میکروبی و ضد قارچی، نمونه شماره ۴ به عنوان گزینه نهایی مناسب برای سنتز فیلم نهایی به دلیل عملکرد برتر در مهار هم زمان رشد باکتری ها و قارچ ها انتخاب شد.

آزمون ضد قارچی نمونه ها شماره ۴ و ۸ برای انتخاب بهترین نمونه: نتایج آزمون های ضد میکروبی اولیه نشان داد که نمونه های شماره ۴ و ۸ به دلیل عملکرد برتر در مهار رشد باکتری ها برای بررسی های تکمیلی ضد قارچی انتخاب شدند. آزمایش های ضد قارچی بر روی این دو نمونه انجام شد تا کارایی آن ها در برابر سه نوع مخمری ارزیابی شود. نتایج (شکل ۶ و جدول ۷) نشان داد که هر دو نمونه اثرات قابل توجهی در مهار رشد قارچ ها دارند. به ویژه،



شکل ۶- تست MIC برای نمونه های شماره ۴ و ۸ در پلیت ۹۶ خانه بر روی سه نوع قارچ مخمری

Figure 6. MIC test for samples number 4 and 8 in a 96-well plate on three types of yeast fungi

جدول ۷- نتایج خوانش پلیت ۹۶ خانه

Table 7. 96-well plate reading results

شماره نمونه Sample number	میکروارگانیزم Micr organism	۵-۱-ب (کاندیدا) 5-1-B (Candida)	۱۱-۷۰ (استاندارد) 11-70 (Standard)	ش-۳ (کاندیدا) Sh-3 (Candida)
نمونه شماره ۸ (B1)				
(کیتوزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۵ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۲۰۰ میلی لیتر))				
عدم رشد در تمام خانه‌ها				
Lack of growth in all houses				
عدم رشد در تمام خانه‌ها				
Lack of growth in all houses				
عدم رشد در ۶ خانه اول				
Lack of growth in the first 6 houses				
نمونه شماره ۴ (B2)				
(کیتوزان و پلی وینیل الکل ۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر)، اکسید روی (۲۰۰ میلی گرم / میلی لیتر)، عصاره پوست انار (۰/۴ گرم / میلی لیتر)، آب دیونیزه (۵۰ میلی لیتر))				
عدم رشد در ۹ خانه اول				
Lack of growth in the first 9 houses				
عدم رشد در تمام خانه‌ها				
Lack of growth in all houses				
عدم رشد در ۶ خانه اول				
Lack of growth in the first 6 houses				

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه فیلم نانو کامپوزیت زیست تخریب پذیر بر پایه کیتوزان و پلی وینیل الکل با روش ریخته گری و بررسی نتایج نشان دهنده بهبود خواص فیزیکی، مکانیکی و ضدباکتریایی فیلم‌های کامپوزیت کیتوزان نسبت به فیلم کیتوزان خالص است که می تواند به افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت مواد غذایی کمک کند. در این مطالعه از دو نوع عصاره برای ایجاد خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی در فیلم استفاده شد. تحقیقات پیشین در خصوص استفاده از عصاره پوست انار به منظور ایجاد خواص ضد میکروبی در فیلم‌های کامپوزیتی میزان ۵ میلی گرم بر میلی لیتر تا ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره پوست انار را مورد بررسی قرار داده‌اند. بر نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از غلظت‌های پایین تر عصاره در کنار استفاده از نانوذرات آنتی باکتریال مانند نانوذرات اکسید روی می‌تواند خواص ضد باکتری آن را به صورت هم افزا افزایش دهد. عصاره پوست انار به دست آمده با استفاده از کربن

فعال رنگبری شد اما خود عصاره رنگبری شده و فیلم ساخته شده با آن اثر ضد باکتریایی از خود نشان نداد. برای افزایش خاصیت ضدباکتریایی فیلم نانو کامپوزیت، نانوذرات اکسید روی و عصاره پوست انار مورد استفاده قرار گرفتند. هر یک از این مواد به تنهایی خاصیت ضدباکتریایی داشته و ترکیب آن‌ها در فیلم نهایی باعث تقویت این خواص شد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت عصاره پوست انار همراه با نانوذرات اکسید روی به بهبود سنتز فیلم نانو کامپوزیت کمک کرده است. همچنین فیلم نانو کامپوزیت سنتز شده خاصیت ضدباکتریایی بهینه ای داشته که می تواند به حفظ کیفیت مواد غذایی کمک کند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که انتخاب صحیح مواد اولیه و افزودنی ها تأثیر زیادی در بهبود عملکرد فیلم‌های زیست تخریب پذیر برای بسته بندی مواد غذایی دارد. علاوه بر این، انجام آزمایش‌های بیشتر برای ارزیابی عملکرد ضد باکتریایی فیلم‌ها با استفاده از نانو اکسید روی و عصاره پوست انار پیشنهاد می شود. همچنین تحقیق بر روی پایداری

حرارتی و نوری فیلم‌ها در شرایط واقعی نگهداری مواد غذایی نیز به منظور افزایش کارایی آن‌ها اهمیت دارد. در نهایت، مقایسه عملکرد این فیلم‌ها با فیلم‌های بسته‌بندی تجاری می‌تواند اطلاعات مفیدی برای کاربردهای صنعتی ارائه دهد. این پیشنهادها می‌توانند به بهینه‌سازی عملکرد و کارایی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر کمک کنند.

References

- Hassoun, A et al. (2023). Food processing 4.0: Current and future developments spurred by the fourth industrial revolution. *Food Control*. 145, 109507
- Teshome, E., et al.(2022). Potentials of natural preservatives to enhance food safety and shelf life: A review. *The Scientific World Journal*, 23, 9901018.
- Sultan, M., A. Youssef, and R.A. Baseer. (2024). Fabrication of multifunctional ZnO@ tannic acid nanoparticles embedded in chitosan and polyvinyl alcohol blend packaging film. *Scientific Reports*. 14(1), 18533.
- Zhong, Y., et al.(2020). Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*. 3(1), 27-35.
- Nguyen, Q.L., et al.(2023). Synthesis of Biodegradable and Antimicrobial Nanocomposite Films Reinforced for Coffee and Agri-Food Product Preservation. *ACS omega*. 8(45), 42177-42185.
- Pinaeva, L.G. and A.S.(2024). Noskov, Biodegradable biopolymers: Real impact to environment pollution. *Science of The Total Environment*. 15(947), 174445.
- Mirres, A.C.d.M., et al.(2024). Nanocomposite Films of Babassu Coconut Mesocarp and Green ZnO Nanoparticles for Application in Antimicrobial Food Packaging. *Foods*. 13(12), 1895.
- El-Sayed, S.M. and A.M. Youssef.(2023). Eco-friendly biodegradable nanocomposite materials and their recent use in food packaging applications: a review. *Sustainable Food Technology*. 1(2), 215-227.
- Cheng, J., et al.(2024). Applications of biodegradable materials in food packaging: A review. *Alexandria Engineering Journal*. 91, 70-83.
- Momtaz, F., et al.(2024). Enhanced antibacterial properties of polyvinyl alcohol/starch/chitosan films with NiO–CuO nanoparticles for food packaging. *Scientific Reports*. 14(1), 7356.
- Bhullar, S.K., et al.(2015). Antibacterial activity of combination of synthetic and biopolymer non-woven structures. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 12(4), 289-294.
- Halima, N.B., Poly (vinyl alcohol).(2016). review of its promising applications and insights into biodegradation. *RSC advances*. 6(46), 39823-39832.
- Liu, B., J. Zhang, and H. Guo.(2022). Research progress of polyvinyl alcohol water-resistant film materials. *Membranes*. 12(3), 347.
- Ncube, L.K., et al.(2020). Environmental impact of food packaging materials: A review of contemporary development from conventional plastics to polylactic acid based materials. *Materials*. 13(21), 4994.
- Sirelkhatim, A., et al.(2015) Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-micro letters*. 7, 219-242.
- Mendes, C.R., et al.(2022). Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. *Scientific reports*. 12(1), 2658.
- Viuda-Martos, M., J. Fernández-López, and J. Pérez-Álvarez.(2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 9(6), 635-654.
- Rosas-Burgos, E.C., et al.(2017). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97(3), 802-810.

19. Gallas, J.A., et al.(2023). Characterization, antimicrobial activity, and antioxidant efficacy of a pomegranate peel solution against persistent root canal pathogens. *Cureus*. 15(8),
20. Kumar, N., et al.(2021). Chitosan edible films enhanced with pomegranate peel extract: Study on physical, biological, thermal, and barrier properties. *Materials*. 14(12), 3305.
21. Hamed, M. and Hussein, N.M. (2020). Antibacterial and antifungal activity with minimum inhibitory concentration (MIC) production from *Pocillopora verrucosa* collected from Al-Hamraween, Red Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*. 24(7), 219-231.
22. Dai, L., et al.(2020). Development of pomegranate peel extract and nano ZnO co-reinforced polylactic acid film for active food packaging. *Membranes*. 12(11), 1108.

