

حفظ فعالیت آنتی اکسیدانی و کاهش بار میکروبی آریل انار رقم مجلس ساوه با استفاده از فیلم حاوی کیتوزان و کارواکرول

حسین عراقی^۱، سمیه رستگار^۲، بهجت تاج الدین^۳، محمد جوان نیکخواه^۴، محمدعلی عسکری سرچشمه^۵

- ۱- دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران. پست الکترونیکی: rastegarhort@gmail.com
۳- دانشیار گروه مهندسی صنایع غذایی و مسائل پس از برداشت، موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۴- دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۵- استاد گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۷/۱

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۵

چکیده

سابقه و هدف: کاهش بار میکروبی آریل انار و حفظ قدرت آنتی اکسیدانی می تواند منجر به ارتقا سطح سلامت و افزایش قدرت ایمنی بدن شود. از این رو هدف از این پژوهش، تأثیر فیلم پلی اتیلنی حاوی کیتوزان و کارواکرول بر فعالیت آنتی اکسیدانی و بار میکروبی آریل انار نگهداری شده در دمای 7 ± 1 درجه سلسیوس است.

مواد و روش ها: محتوای آنتوسیانین، فعالیت آنتی اکسیدانی و تعداد پرگنه های قارچ و باکتری آریل میوه انار بسته بندی شده با فیلم پلی اتیلنی حاوی سه غلظت کارواکرول (1 و 2 درصد) و سه غلظت کیتوزان (1 و 2 درصد) طی 16 روز انبارداری در دمای 1 ± 7 درجه سلسیوس و به فاصله هر 4 روز اندازه گیری شدند.

یافته ها: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت های مختلف کیتوزان و کارواکرول تأثیر معنی داری بر فعالیت آنتی اکسیدانی و بار میکروبی آریل های انار داشتند. فیلم های حاوی کیتوزان سبب حفظ معنی دار محتوی آنتوسیانین در مقابل کنترل شد. بعد از 16 روز انبارداری فیلم های حاوی 1 درصد کارواکرول و 2 درصد کیتوزان تأثیر معنی دار در سطح 1 درصد بر پرگنه های قارچ و آلودگی باکتریایی و فعالیت آنتی اکسیدانی داشتند.

نتیجه گیری: استفاده از فیلم های حاوی کارواکرول و کیتوزان بدلیل کاهش بار میکروبی می تواند در صنعت بسته بندی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: کارواکرول، فیلم پلی اتیلنی، آریل انار، پرگنه های قارچ و باکتری

● مقدمه

انار به حضور ترکیبات فنلی متعدد ازجمله ایزومرهای پونیکالائین، مشتقات آلاژیک اسید، آنتوسیانین های مختلف و فلاونوئیدها (کوئرستین و کامپفرول) مرتبط است. این ترکیبات دارای ویژگی جذب رادیکال های آزاد بوده و از اکسیدشدن لیپیدها ممانعت می کنند (3).

مصرف انار به علت دارا بودن پوسته سخت آن برای رسیدن به دانه، محدود است. از سوی دیگر، پوست آن بسیار حساس به آفتاب سوختگی، ترک خوردگی و سرما است. این نقص های خارجی مانع بازاری پسندی این میوه شده است، امروزه عرضه میوه انار به صورت آریل و آماده مصرف، راهکاری

انار (*Punica granatum L.*) درختچه ای متعلق به خانواده پونیکاسه است که به طور وسیع در بسیاری از کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت می شود (1). در سال های اخیر، استفاده از مواد غذایی غنی از مواد آنتی اکسیدان مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. آریل انار قسمت خوراکی میوه انار است که حدود 50 تا 70 درصد وزن آن را تشکیل می دهد. که به نوبه خود از 10 درصد قند (عمدتاً فروکتوز و گلوکز)، 15 درصد اسیدآلی (اسیدآسکوربیک، اسیدسیتریک و اسیدمالیک) و ترکیبات فعال همچون آنتوسیانین و دیگر ترکیبات فنولی تشکیل شده است (2). فعالیت آنتی اکسیدانی

و محافظت از ماده فعال در طول انبارداری و تأثیرگذاری بهتر آن می شود (۱۴) و می توان از آن برای محصور کردن کارواکرول و هر ماده فعال دیگر استفاده کرد (۱۵). امروزه گرایش به کاهش استفاده از افزودنی های سنتزی در فیلم های بسته بندی توجه به استفاده از آنتی اکسیدانت ها و ضد میکروبی طبیعی مانند اسانس، عصاره های گیاهی و کیتوزان را افزایش داده است (۱۶). در پژوهش های انجام شده از کارواکرول به عنوان عامل ضد باکتریایی (۱۷) و جلوگیری از اکسیداسیون در فیلم های بسته بندی مواد غذایی (۱۸) بهره گرفته شده است. از طرفی کیتوزان به عنوان یک بیوپلیمر غیرسمی می تواند در بستر فیلم های فعال بسته بندی به همراه اسانس گیاهی مورد استفاده قرار گیرد (۲۰، ۱۹). از ویژگی های کیتوزان در فیلم های فعال خوراکی میتوان به کنترل انتقال رطوبت، فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانتی، کنترل سرعت تنفس، تغییر اتمسفر بسته و کنترل کننده فعالیت آنزیم های قهوه ای شدن اشاره کرد (۲۱). استفاده از فیلم های پلی اتیلنی پوشش دار شده با عامل آنتی میکروبی مانند اسانس دارچین تأثیر معنی داری بر کاهش آلودگی های هلو طی ۱۲ روز نگهداری در دمای اتاق گذاشت (۲۲).

باتوجه به مصرف روزافزون آریل میوه ای انار به دلیل داشتن ترکیبات مفید برای سلامتی بشر، سهولت مصرف، ایجاد شرایط مناسب جهت نگهداری آریل میوه انار و دستیابی به یک روش مطمئن و کاربردی برای کاهش بیماری های قارچی و افزایش عمر انباری آن ضروری بنظر می رسد. استفاده از دانه های تازه و آماده برای خوردن همچنین کسب سود اقتصادی از میوه های دارای آسیب ظاهری، گزینه ای مناسب برای جلب توجه مصرف کنندگان میوه انار می باشد (۴). از طرف دیگر امروزه مصرف کنندگان نگرانی های خاصی نسبت به استفاده از نگهدارنده ها در مواد غذایی دارند. نتایج نشان داده است که بسته بندی آریل انار یک اقدام بزرگ در جهت افزایش عمر انبارداری همراه با حفظ کیفیت آن می باشد (۲۳). از این جهت هدف از این پژوهش حفظ کیفیت و کاهش آلودگی های میکروبی آریل های انار رقم ملس ساوه با استفاده از بسته بندی فعال بدون استفاده از هیچ ماده نگهدارنده در مدت نگهداری می باشد.

• مواد و روش ها

مواد اولیه: میوه های انار رقم ملس ساوه در مرحله رسیدگی کامل فیزیولوژیکی بطور تصادفی از درختان ۱۵ ساله تغذیه شده با کود دامی فراوری شده واقع در ضلع غربی آبریز سد ساوه (36°54'26.6"N-50°09'16.4"E) از یک باغ تجاری

مناسب برای دستیابی به بهره وری اقتصادی و سود تجاری از میوه انار به ویژه انواعی که ظاهر آنها دچار صدمه شده است می باشد (4). یکی از مشکلات عمده پس از برداشت آریل های انار از دست دادن رنگ و آلودگی میکروبی می باشد (5). تاکنون بیش از ۲۹ گونه و جنس قارچ یا باکتری به عنوان عوامل پوسیدگی و ترشیدگی میوه انار در سراسر جهان گزارش شده است که از جمله مهم ترین آنها می توان به *آسپرژیلوس*، *آلترناریا*، *پنی سیلیوم* و *بوتریتیس سینرا* اشاره کرد (6). با توجه به محدودیت استفاده از قارچ کش ها در محصولات غذایی، تکنیک های جایگزین که هیچ ماده شیمیایی در آنها استفاده نمی شود، سودمند شناخته شده است (7).

فناوری نانو در صنعت بسته بندی به عنوان پتانسیلی برای ایجاد انقلابی بزرگ در زمینه بسته بندی مواد غذایی نام برده می شود. امروزه استفاده از این فناوری در بسته بندی غذا واقعیتی است که به مرحله ی تجاری رسیده است. ترکیب کردن نانو مواد در پلیمرهای پلاستیکی منجر به توسعه ایجاد بسته بندی جدیدی شده است (8). فیلم های فعال نانوپلیمری باعث مهاجرت پیوسته ترکیبات ضد میکروبی به سطح ماده غذایی، کنترل رشد میکروارگانیسم های مولد فساد مواد غذایی و در نتیجه سبب بهبود امنیت غذایی و افزایش طول دوره نگهداری محصولات غذایی می گردد. نانوذرات در نانوکامپوزیت های پلیمری سطح ویژه بالایی نسبت به ذرات در اندازه میکرو دارند. همین سطح ویژه بالا موجب بهبود برهمکنش بین پلیمر و نانو ذرات می شود و خصوصیتی بروز می کند که از همان ذرات در مقیاس میکرو قابل دریافت نیست، بنابراین دستیابی به ویژگی های خاص و مناسب این ذرات را ممکن می سازد. از جمله نانوذرات مورد استفاده در بسته بندی مواد غذایی می توان به نانورس، نانونقره، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و اکسید روی اشاره کرد (۹). درون پوشانی (انکپسولاسیون) تکنیکی است که طی آن، ذرات کوچک جامد و قطرات مایع، درون یک پوشش نازک قرار می گیرند و در نتیجه انتشار آنها کنترل شده و در برابر تخریب و تجزیه محافظت می شوند (۱۰) هالوسیت ها یک نانو رس لوله ای، قطر خارجی این ۳۰-۱۹۰ نانومتر و قطر داخلی ۱۰-۱۰۰ نانومتر (۱۱) با خاصیت بالقوه بسیار زیادی در صنعت، سمیت کم، سازگاری زیستی می باشد (۱۲) که از آنها می توان برای محافظت و انتشار کنترل شده اجزای فعال استفاده کرد (۱۳). استفاده از نانو ذراتی همچون نانوهالوسیت رس در تولید پلیمرهای فعال بسته بندی باعث رهایش کنترل شده ماده فعال

آماده سازی نمونه‌ها: ریل میوه انار رقم ملس ساوه پس از جداسازی از پوست در شرایط استریل درون بسته‌های پلی‌اتیلنی با ابعاد (۱۵×۱۵×۱۰) قرار داده شد فیلم‌های تولیدی توسط چسب دوطرفه به سطح داخلی درب بسته‌ها ثابت شدند، سپس نمونه‌ها به سردخانه با دمای 7 ± 1 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 95 ± 5 درصد به مدت ۱۶ روز منتقل و با فاصله زمانی هر ۴ روز یک مرتبه از محیط خارج و برای ارزیابی صفات به آزمایشگاه منتقل شدند.

اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین کل: آنتوسیانین کل با استفاده از روش اختلاف pH بین دو سیستم بافری اندازه‌گیری شد (۲۴). در این روش پس از آماده سازی عصاره آب میوه در دو بافر با اسیدیته ۱ و ۵/۴ جذب نمونه‌ها در طول موج های ۵۱۰ و ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتریک (PHARMACIA BIOTECH Novaspec II, USA) اندازه‌گیری شده و آنتوسیانین کل براساس سیانیدین ۳- گلوکوزاید به عنوان آنتوسیانین غالب انار با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$A = \frac{(A_{510} - A_{700}) \text{ pH} 1.0 - (A_{510} - A_{700}) \text{ pH} 4.5}{(A_{510} - A_{700}) \text{ pH} 1.0 - (A_{510} - A_{700}) \text{ pH} 4.5} \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000 / \text{MA}$$

که در آن MW: وزن مولکولی آنتوسیانین غالب (۴۴۹/۲)، df: فاکتور رقت (۱۰)، MA: ضریب جذب مولی سیانیدین ۳- گلوکوزاید (۲۶۹۰۰) است.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد ۲ و ۲ دی‌فنیل ۱- (2,2-diphenyl-1-) DPPH (picrylhydrazyl) اندازه‌گیری شد. بدین صورت که از عصاره متانولی تهیه شده (۵/۰ گرم آب میوه با ۳ میلی‌لیتر متانول ۸۵/۰)، ۵۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به همراه ۵۰۰ میکرو-لیتر آب مقطر به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتیفریوژ شد و سپس ۷۵ میکرولیتر از فاز روئی به همراه ۲۹۲۵ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۰۰۲۴) گرم به همراه DPPH با متانول ۸۵ درصد به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد) ورتکس شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتریک (PHARMACIA BIOTECH Novaspec II, USA) خوانده شد و پس از گذشتن ۳۰ دقیقه نگهداری نمونه‌ها در تاریکی، مجدداً جذب نمونه‌ها اندازه‌گیری شده و با استفاده از رابطه زیر درصد بازدارندگی آب میوه محاسبه گردید و نتایج بر حسب درصد بیان شد (۲۵).

برداشت و در شرایط خنک به آزمایشگاه موسسه فنی و مهندسی کشاورزی کرج منتقل و تا شروع آزمایش در دمای ۵ درجه نگهداری شدند. پلی اتیلن سبک با وزن مخصوص 0.92 g/cm^3 و شاخص جریان ذوب ۲ گرم در ۱۰ دقیقه بصورت گرانول به عنوان فاز اصلی پلیمری از شرکت ملی صنایع پتروشیمی خریداری گردید. کارواکرول با خلوص ۹۸ درصد به عنوان ماده فعال از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. نانو ذرات هالوسیت رس با خلوص ۹۰ درصد و با قطر خارجی کمتر از ۱۰۰ nm به عنوان محافظ و کپسوله کننده کارواکرول محصول شرکت Natural nano آمریکا برای تهیه فیلم خریداری شد. کیتوزان با وزن ملکولی متوسط ساخت شرکت سیگما آلدریج مورد استفاده قرار گرفت.

تولید فیلم فعال

تهیه هیبرید نانو هالوسیت رس/کارواکرول: برای تولید هیبرید نانو هالوسیت رس/کارواکرول (Haloysite Nanotubes /carvacrol hybrids)، نانو هالوسیت رس و کارواکرول به ترتیب با نسبت ۱ به ۲ توسط دستگاه همزن برشی، شرکت توسعه فناوری مافوق صوت (مدل WTW-DISPER D-8) ساخت ایران (واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس) مخلوط شده و در نهایت کپسوله کردن کارواکرول توسط نانو هالوسیت رس در دمای اتاق با دامنه پیوسته ۷۰٪ توسط دستگاه آلتراسونیک پروب شرکت توسعه فناوری مافوق صوت (مدل UHP-400) ساخت ایران (واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس) صورت پذیرفت، برای جلوگیری از تجمع نانو هالوسیت رس، نانو هالوسیت‌ها در دو مرحله به کارواکرول اضافه و توسط همزن برشی مخلوط شدند. سپس به فاصله هر دو دقیقه عملیات مخلوط کردن و کپسول کردن به مدت نهایی ۲۰ دقیقه انجام پذیرفت (۱۴).

تهیه فیلم فعال حاوی هیبرید نانو هالوسیت/کارواکرول و کیتوزان: برای تهیه فیلم مذکور کیتوزان در سه غلظت شامل ۰، ۱، ۲ درصد و هیبرید نانو هالوسیت رس/کارواکرول در سه غلظت حاوی ۰، ۱، ۲ درصد کارواکرول به مواد پلی‌اتیلنی اضافه گشت و بعد از مخلوط کردن مکانیکی، مخلوط حاصله توسط دستگاه اکستروژ دو پیچه ناهمسو Brabender (مدل ZSK-25) ساخت کشور آلمان با قطر خارجی ۲۵ میلیمتر واقع در کارگاه پلاستیک پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس ذوب و فیلم نهایی با ضخامت ۵۰ میکرون توسط دستگاه اکستروژ تک پیچه (مدل D-47055) ساخت کشور آلمان مجهز به سیستم فیلم دمشی تولید شد (۱۴).

$$[(At0 - At30) / At0] \times 100 = \text{فعالیت آنتی اکسیدانی (در صد)}$$

At0: جذب نمونه‌ها در زمان صفر، At30: جذب نمونه‌ها پس از 30 دقیقه

سلسیوس منتقل شد. تعداد کلونی‌ها هر پلیت شمارش و نتایج بر حسب $\log_{10} \text{cfu/ml}$ گزارش گردید (۲۷).

$$x = 10^{\text{عکس رقت} \times \text{تعداد کلونی}}$$

$$\text{CFU} = \log x$$

در این معادله x میانگین کلونی‌های مشاهده شده می‌باشد.

تجزیه آماری: به منظور بررسی تأثیر کارواکرول و کیتوزان در بدنه فیلم پلی اتیلنی بر فعالیت آنتی اکسیدانی و کاهش بار میکروبی آریل انار رقم ملس ساوه آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل درصدهای مختلف کیتوزان (۰، ۱، ۲ درصد)، فاکتور دوم شامل درصدهای مختلف کارواکرول (۰، ۱، ۲ درصد)، فاکتور سوم زمان (۰، ۴، ۸، ۱۶ روز) اندازه‌گیری بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار Version 9.4; SAS (System Institute Inc., Statistical Analysis) انجام گردید. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح اطمینان ۹۹ درصد انجام گرفت.

• یافته‌ها

براساس نتایج تجزیه واریانس، اضافه کردن کارواکرول به فیلم پلی اتیلنی حاوی کیتوزان تأثیر معنی‌دار بر محتوی آنتوسیانین داشتند. همچنین داده‌های حاصل از تجزیه واریانس نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار کیتوزان بر محتوی آنتوسیانین کل آب آریل‌ها است (جدول ۱). ولی اثرات متقابل کارواکرول با کیتوزان بر محتوی آنتوسیانین معنی‌دار نشد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که طی ۱۶ روز انبارداری بیشترین میزان آنتوسیانین کل آب آریل‌ها متعلق به استفاده از فیلم فعال حاوی ۱ درصد کارواکرول بود (جدول ۲). براساس نتایج تجزیه واریانس، فاکتورهای زمان، کارواکرول، کیتوزان و اثرات متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنتی اکسیدانی آریل انار نشان دادند (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها حاکی از آن بود که بعد از ۱۶ روز انبارمانی، بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی مربوط به استفاده از فیلم فعال حاوی (۱ درصد کارواکرول و ۲ درصد کیتوزان) و کمترین میزان مربوط به استفاده از فیلم فعال حاوی (۲ درصد کارواکرول) فاقد کیتوزان بود (جدول ۳).

نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده تأثیر معنی‌دار زمان و اثر متقابل آن با کیتوزان و کارواکرول و همچنین کارواکرول موجود در فیلم‌های پلی اتیلنی بر تعداد پرگنه‌های کپک و مخمر کل آب آریل انار است. کیتوزان و اثر متقابل آن با کارواکرول و اثر سه‌گانه با زمان تأثیر معنی‌داری بر محتوی کل قارچ و مخمر نداشت (جدول ۱).

بررسی آلودگی میکروبی: بررسی‌های میکروبی با تهیه عصاره رقیق شده آب انار در غلظت‌های مختلف (10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4}) و کشت آن روی محیط‌های ویژه کشت باکتری: NA (نوترینت آگار) و قارچ: PDA (پوتیتو- دکستروز- آگار) صورت گرفت. شمارش پرگنه‌ها ۲ الی ۳ روز پس از کشت انجام شد با مقایسه تعداد پرگنه‌ها در شاهد و نمونه‌های تحت تیمار، جمعیت میکروبی آب آریل میوه انار تعیین و بر اساس لگاریتم بر مبنای $10 \log \text{cfu.ml}^{-1}$ بصورتی که در ذیل مشخص است، بیان شد (۲۶).

آماده‌سازی سرم فیزیولوژی: ۳۰ گرم نمونه آریل انار از تیمارها و شاهد برداشته شد و در شرایط استریل هموژن و آب آنها برای تهیه رقت‌های مختلف سرم فیزیولوژی (۹ گرم سدیم کلرید به ۱ لیتر آب مقطر اضافه می‌شود، نمونه سرم با پنبه و فویل آلومینیومی می‌بندیم و داخل اتوکلاو برای استریل قرار می‌دهیم) مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه سرم مورد نظر ابتدا ۱ میلی لیتر آب میوه به ۹ میلی لیتر محلول سرم آماده شده اضافه گردید تا رقت 10^{-1} حاصل شود. سپس از آنها برای تهیه رقت‌های 10^{-2} ، 10^{-3} و 10^{-4} استفاده شد.

شمارش کپک و مخمر: از هر یک از رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} و 10^{-4} از قبل ساخته شده به میزان ۰/۱ میلی لیتر با میکروپیت استریل بروی محیط کشت PDA منتقل و در سه تکرار بصورت سطحی کشت داده شد. نمونه‌ها به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل شد. در نهایت تعداد کلونی‌های هر پلیت شمارش و نتایج بر اساس تعداد کلونی تشکیل شده بر حسب $\log_{10} \text{cfu/ml}$ گزارش گردید (۲۷).

$$x = 10^{\text{عکس رقت} \times \text{تعداد کلونی}}$$

$$\text{CFU} = \log x$$

در این معادله x میانگین کلونی‌های مشاهده شده می‌باشد.

شمارش باکتری مزوفیل هوازی: از هر یک از رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} و 10^{-4} از قبل ساخته شده به میزان ۱ میلی لیتر با میکروپیت استریل داخل پلیت ریخته و کشت مخلوط بصورت علامت بینهایت با استفاده از محیط کشت نوترینت آگار مذاب سرد شده در ۳ تکرار انجام شد (ابتدا سرم ریخته شد بعد محیط کشت و مخلوط گردید). پلیت‌ها پس از منعقد شدن بصورت وارونه به انکوباتور با دمای ۳۰ درجه

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر کیتوزان، کارواکرول و زمان بر محتوی آنتوسیانین، فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان آلودگی میکروبی آب آریل انار طی مدت نگهداری

منبع تغییر S.V	درجه آزادی D.F	آنتوسیانین	فعالیت آنتی اکسیدانی	محتوی کل قارچ و مخمر	محتوی کل باکتری مزوفیل هوازی
زمان (A)	۴	۱۲۴۴/۷**	۴۸۳/۷**	۳۷/۹۸۳**	۳۷/۵۵۸**
کارواکرول (B)	۲	۳۰۸/۶**	۵۸۱/۹**	۱/۸۷۸**	۷/۶۳۹**
کیتوزان (C)	۲	۷۱/۴*	۲۱/۶**	۰/۰۲۵ ^{ns}	۰/۰۳۶ ^{ns}
اثر متقابل AB	۸	۷۵/۲**	۴۷/۳**	۱/۰۸۸**	۲/۹۱۲**
اثر متقابل AC	۸	۵/۴ ^{ns}	۲/۶**	۰/۰۴۶**	۰/۱۸۱**
اثر متقابل BC	۴	۲/۱ ^{ns}	۳/۹**	۰/۰۰۷ ^{ns}	۰/۰۹۳**
اثر متقابل ABC	۱۶	۲/۶ ^{ns}	۱/۷**	۰/۰۱۳ ^{ns}	۰/۰۶۲**
خطا	۹۰	۲۰/۷	۰/۵	۰/۰۲۱	۰/۰۲۴
ضریب تغییرات C.V%		۳/۴	۰/۹	۶/۰	۷/۲

^{ns}، * و ** به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

جدول ۲. مقایسه اثر متقابل زمان و کارواکرول بر محتوی آنتوسیانین و تعداد پرگنه های قارچ آب آریل انار کشت شده به مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت PDA طی مدت نگهداری

زمان (روز)	کارواکرول (%)	آنتوسیانین (mg per 100mL)	محتوی کل قارچ و مخمر (cfu/ml)
	۰	۱۳۳/۴ ^{cd}	۱/۲۱ ^h
	۱	۱۳۶/۴ ^{bc}	۱/۲۰ ^h
	۲	۱۳۷/۱ ^{abc}	۱/۱۶ ^h
	۰	۱۴۱/۹ ^a	۱/۶۶ ^g
۴	۱	۱۴۱/۳ ^{ab}	۱/۶۸ ^g
	۲	۱۴۱/۲ ^{ab}	۱/۶۹ ^g
	۰	۱۳۲/۴ ^{cd}	۲/۱۲ ^f
	۱	۱۳۵/۳ ^c	۲/۰۵ ^f
۸	۲	۱۲۹/۹ ^{de}	۲/۰۰ ^f
	۰	۱۲۷/۸ ^{ef}	۳/۱۷ ^d
	۱	۱۳۲/۸ ^{cde}	۲/۸۸ ^e
۱۲	۲	۱۲۲/۳ ^g	۳/۴۱ ^c
	۰	۱۲۳/۵ ^{fg}	۴/۴۱ ^b
	۱	۱۲۹/۷ ^{de}	۳/۲۳ ^{cd}
۱۶	۲	۱۱۹/۰ ^g	۴/۷۲ ^a

میانگین های موجود در هر ستون که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح ۱٪ آزمون PLSD اختلاف معنی داری با هم ندارند.

آلودگی های باکتریایی کل آب آریل انار در طول مدت نگهداری شد (جدول ۱). براساس نتایج مقایسه میانگین ها به تدریج با گذشت زمان تعداد باکتری آب آریل انار افزایش یافت. در پایان آزمایش استفاده از فیلم های حاوی ۱ درصد کارواکرول به تنهایی و در ترکیب با کیتوزان ۱ و ۲ درصد بطور معنی داری آلودگی را نسبت به شاهد کاهش داد. در حالی که غلظت ۲ درصد کارواکرول و همچنین کیتوزان ۱ و ۲ درصد به تنهایی تأثیر معنی داری بر آلودگی باکتری نشان ندادند.

براساس نتایج مقایسه میانگین ها با گذشت زمان محتوی کل قارچ و مخمر افزایش یافت. در پایان آزمایش کمترین تعداد پرگنه ها کپک و مخمر در نتیجه استفاده از فیلم فعال حاوی ۱ درصد کارواکرول بدست آمد. درحالی که استفاده از غلظت ۲ درصد کارواکرول باعث افزایش میزان آلودگی های قارچی کل آب آریل انار شد (جدول ۲).

نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده تأثیر معنی داری همه فاکتورها و اثر متقابل آنها بجز کیتوزان، بر محتوی کل باکتری مزوفیل هوازی می باشد (جدول ۱). استفاده از فیلم فعال حاوی (کارواکرول و کیتوزان) بصورت همزمان باعث کاهش معنی دار

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل زمان، کارواکرول و کیتوزان بر فعالیت آنتی اکسیدانی آب آریل انار طی مدت انبارداری

زمان (روز)					کیتوزان (%)	کارواکرول (%)
۱۶	۱۲	۸	۴	۰		
۷۰/۱۳ ^m	۷۵/۰۷ ^{jk}	۷۶/۷۷ ^{ghi}	۸۲/۷۷ ^{abcd}	۷۶/۴۳ ^{ghij}	۰	
۷۲/۳۰ ^l	۷۴/۲۳ ^k	۷۷/۱۳ ^{gh}	۸۲/۰۰ ^{bcde}	۷۷/۳۰ ^g	۱	
۷۱/۹۳ ^l	۷۵/۱۰ ^{jk}	۷۷/۸۳ ^g	۸۱/۹۰ ^{bcde}	۷۷/۸۳ ^g	۲	
۷۵/۲۷ ^{ijk}	۷۷/۲۷ ^g	۸۱/۱۷ ^{ef}	۸۴/۰۰ ^a	۸۰/۰۰ ^f	۰	
۷۷/۸۳ ^g	۸۰/۱۰ ^f	۸۱/۳۳ ^{cdef}	۸۲/۸۳ ^{abc}	۸۱/۰۰ ^{ef}	۱	
۷۹/۹۷ ^f	۸۱/۲۷ ^{def}	۸۳/۰۳ ^{ab}	۸۳/۱۷ ^{ab}	۸۲/۷۰ ^{abcd}	۲	۱
۶۴/۹۳ ⁿ	۶۹/۰۷ ^m	۷۴/۱۷ ^k	۸۲/۱۰ ^{bcde}	۷۴/۵۰ ^k	۰	
۶۴/۹۳ ⁿ	۶۹/۷۷ ^m	۷۵/۰۷ ^{jk}	۸۳/۹۰ ^a	۷۵/۴۰ ^{ijk}	۱	۲
۶۶/۰۰ ⁿ	۷۰/۱۷ ^m	۷۴/۹۷ ^{jk}	۸۲/۹۰ ^{ab}	۷۵/۶۳ ^{hijk}	۲	

میانگین‌های موجود در هر ستون که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح ۱٪ آزمون PLSD اختلاف معنی داری با هم ندارند.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل زمان، کارواکرول و کیتوزان بر تعداد پرگنه های باکتری آب آریل انار کشت شده به مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت NA طی مدت انبارداری

زمان (روز)					کیتوزان (%)	کارواکرول (%)
۱۶	۱۲	۸	۴	صفر		
۴/۷۴ ^a	۳/۰۴ ^{de}	۱/۷۳ ^{gh}	۱/۳۰ ⁱ	۰/۹۶ ^{jk}	۰	
۴/۴۳ ^{ab}	۲/۸۵ ^e	۲/۱۱ ^f	۱/۲۰ ^{ijk}	۱/۰۴ ^{ijk}	۱	
۴/۶۵ ^a	۳/۲۳ ^{cd}	۲/۱۰ ^f	۱/۱۴ ^{ijk}	۱/۰۴ ^{ijk}	۲	
۲/۸۵ ^e	۲/۱۴ ^f	۱/۶۸ ^h	۱/۱۱ ^{ijk}	۱/۱۱ ^{ijk}	۰	
۲/۱۴ ^f	۲/۰۶ ^{fg}	۱/۷۳ ^{gh}	۱/۲۶ ^{ij}	۰/۹۹ ^{ijk}	۱	۱
۲/۰۶ ^{fg}	۱/۹۹ ^{fgh}	۱/۷۳ ^{gh}	۱/۱۴ ^{ijk}	۱/۱۱ ^{ijk}	۲	
۴/۶۹ ^a	۳/۴۱ ^c	۱/۶۸ ^h	۱/۲۶ ^{ij}	۰/۹۹ ^{ijk}	۰	
۴/۷۴ ^a	۳/۴۱ ^c	۲/۰۲ ^{fg}	۱/۰۸ ^{ijk}	۱/۰۴ ^{ijk}	۱	۲
۴/۱۶ ^b	۳/۴۱ ^c	۲/۰۰ ^{fgh}	۱/۲۳ ^{ijk}	۰/۹۲ ^k	۲	

میانگین‌های موجود در هر ستون که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح ۱٪ آزمون PLSD اختلاف معنی داری با هم ندارند.

• بحث

پژوهش حاضر نشان داد که بعد از ۱۶ روز نگهداری بیشترین محتوی آنتوسیانین‌ها مربوط به نمونه‌های بسته‌بندی شده با فیلم حاوی ۱ درصد کارواکرول بود و کمترین مقدار آنتوسیانین در نمونه‌های حاوی ۲ درصد کارواکرول مشاهده شد. کاهش ترکیبات فنولی ممکن است بدلیل تجزیه ساختار سلولی در فرایند پیری در طول مدت انباری و اکسیداسیون آنها توسط آنزیم‌های پلی فنول اکسیداز و پراکسیداز باشد (۲۸). مقادیر پایین ترکیبات فنولی در نمونه‌های شاهد می‌تواند بدلیل مشارکت پلی فنول‌ها در فرآیند قهوه‌ای شدن طول مدت انبارداری باشد. احتمالاً بخار اسانس‌های گیاهی از جمله کارواکرول از طریق پخش شدن در محیط بسته و برهمکنش با سطح ماده غذایی (۲۹)، مانع تجزیه

آنتوسیانین‌ها از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های مسئول تجزیه ترکیبات فنولی مانند پلی فنول اکسیداز و در نتیجه تاخیر در اکسیداسیون آنها (۳۰) می‌شود. از طرف دیگر بدلیل حساسیت بافت آریل انار، غلظت بالای اسانس می‌تواند باعث تغییر شکل بافت، افزایش سرعت فعالیت‌های متابولیکی (۳۱) و اکسیداسیون ترکیبات فنولی و در نتیجه کاهش آنتوسیانین‌ها شود (۱۴). گزارش شده است فیلم حاوی کیتوزان باعث تاخیر در سرعت تغییر محتوی آنتوسیانین، فلانویید و فنولیک از طریق کاهش فعالیت پراکسیداز کل میوه لیچی گردید (۳۲). گزارش شده است که کیتوزان می‌تواند با تغییر اتمسفر داخلی بسته مانع اکسیداسیون آنزیمی آنتوسیانین‌ها شود (۳۳). نتایج مشابهی روی آریل انار (۳۴) و توت‌فرنگی (۳۱) گزارش شده است.

در پایان مدت انباری استفاده از فیلم حاوی (۱ درصد کارواکرویل و ۲ درصد کیتوزان) باعث حفظ خواص آنتی اکسیدانی آب آریل انار شد. به نظر می رسد سنتز آنتوسیانین طی انبارداری می تواند دلیلی بر بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی و تجزیه آن گویای پایین بودن ظرفیت آنتی اکسیدانی آب میوه انار است (۳۵). تفسیر نتایج بیانگر محتوی آنتوسیانین بالا در نمونه های بسته بندی با فیلم حاوی ۱ درصد کارواکرویل است. این چنین می توان گفت که کارواکرویل سبب حفظ قدرت آنتی اکسیدانی از طریق تاخیر در تجزیه آنتوسیانین ها شده است. این احتمال وجود دارد که اسانس های گیاهی نقش مثبتی در تولید متابولیت های ثانویه و بیوسنتز ترکیبات فنولی و آنتوسیانین ها از طریق افزایش فعالیت آنزیم PAL شوند (۳۵).

گزارش شده است که رابطه مثبتی بین محتوی آنتوسیانین ها و فعالیت آنتی اکسیدانی در آریل های انار تحت تیمار کیتوزان وجود دارد. احتمالاً کیتوزان از طریق تاخیر در اکسیداسیون آنتوسیانین ها باعث حفظ فعالیت آنتی اکسیدانی شده است (۳۳).

بکارگیری اسانس ها برای کاهش بار میکروبی محصولات تازه توسط محققان مختلفی گزارش شده است (۲۰، ۱۵، ۱۴). یکی از معایب اصلی استفاده از اسانس ها تأثیر آنها بر روی عطر و طعم محصولات می باشد. از این جهت استفاده از مواد ثانویه مانند نانو رس و کیتوزان می تواند علاوه بر حفظ خاصیت اسانس ها بر روی آلودگی ها باعث کاهش اثرات مخرب آنها بر عطر و طعم محصولات شود. نانو هالوسیت رس بعنوان یک عامل نگهدارنده ترکیبات فعال مانند اسانس ها (۳۵) می تواند برای محافظت و انتشار کنترل شده آنها مورد استفاده قرار گیرد (۱۳). در طی آزمایشات قبلی مشخص شده است که نانو هالوسیت رس هیچ تأثیری بر خواص ضد قارچی اسانس ها نظیر کارواکرویل ندارد (۳۶). از طرفی کیتوزان به عنوان یک بیوپلیمر غیر سمی می تواند در بدنه فیلم های فعال بسته بندی به همراه اسانس گیاهی قرار گیرد (۳۷). امروزه استفاده از کیتوزان در صنایع پزشکی و دارویی به دلیل سازگاری زیستی بالا، زیست تخریب پذیری و غیر سمی بودن، به عنوان ماده نگهدارنده اهمیت زیادی پیدا کرده است (۳۸، ۳۹).

استفاده همزمان از کیتوزان و کارواکرویل در فیلم های پلی اتیلنی باعث کاهش بار میکروبی اعم از قارچ ها و باکتری ها در نمونه آریل های انار شد. بیشترین خاصیت بازدارندگی مربوط به فیلم حاوی (۱ درصد کارواکرویل و ۲ درصد کیتوزان) و کمترین میزان تأثیر بر آلودگی میکروبی مربوط به نمونه های

بسته بندی با فیلم حاوی ۲ درصد کارواکرویل بود. Ramos و همکاران اثر تیمول و کارواکرویل را در بدنه فیلم های پلی پرو پیلن (PP) روی باکتری های رشته ای مورد بررسی قرار دادند و پی بردند که اثرات متقابل تیمول و کارواکرویل بطور معنی داری از گسترش باکتری های رشته ای در محیط کشت درون شیشه ای (in vitro) جلوگیری به عمل آورد (۲۹). در آزمایشی اثر کارواکرویل در بدنه فیلم های پلی اتیلنی با چگالی کم (LDPE) روی عوامل میکروبی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که ملکول های کارواکرویل با آزاد شدن در محیط بسته و تأثیر بر رشد عوامل بیماری زا به طور معنی داری از گسترش قارچ های اشرفیا کولا، لیستریا آنولا و آلترناترا آلترناترا جلوگیری می کند (۴۰). Shemesh و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثر بازدارندگی معنی دار هیبرید کارواکرویل و رس را در کنترل آلودگی قارچی آلترناترا آلترناترا و بوتریتیس سینرا گزارش کردند (۴۰). نتایج مشابهی توسط Guarda و همکاران (۴۱) گزارش شده است.

گزارش شده است که کارواکرویل به صورت کمپلکس در بدنه فیلم های پلی اتیلنی با دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی رنج وسیعی از غذا ها در برابر عوامل میکروبی و اکسیداسیون محافظت می کند (۲۹). به نظر می رسد که کارواکرویل از طریق انتشار در محیط بسته مانع جوانه زنی و رشد قارچ ها می شود (۴۲). اعتقاد بر این است که کارواکرویل قادر است در اعمال حیاتی دیواره سلولی قارچ ها اختلال ایجاد کرده و باعث از بین رفتن دیواره سلولی آنها شوند (۴۳). این احتمال وجود دارد ماهیت چربی دوستی کارواکرویل این امکان را فراهم می کند که توسط میسیلیوم قارچ جذب و از این طریق بر رشد قارچ تأثیر منفی بگذارد (۴۴). افزایش انشعابات میسیلیومی، چروکیدگی و مجعد شدن میسیلیوم ها و کاهش تولید اسپورها توسط برخی پژوهشگران هنگام استفاده از اسانس های حاوی کارواکرویل بصورت تدخینی گزارش شده است (۴۵). نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (۴۰، ۲۹، ۱۴). در مقابل استفاده از غلظت های بالای اسانس باعث تغییر تخریب بافت، تنش اکسیداسیونی و در نتیجه افزایش آلودگی خواهد شد (۳۶).

ترکیب نانو ذرات نقره و نانو ذرات روی با کیتوزان باعث بهبود خاصیت ضد میکروبی فیلم فعال حاصله به روش کاستینگ گردید (۴۶). استفاده از پوشش کیتوزان با غلظت های ۰/۵ و ۱ درصد طی ۱۲ روز انبارداری در دمای ۴ درجه منجر به کاهش میزان رشد کپک ها و باکتری روی سطح آریل انار در آنالیز میکروبی گردیدند (۳۳). استفاده همزمان از کیتوزان و

میکروبی و حفظ فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد. استفاده از کیتوزان در فیلم می تواند باعث بهبود اثرات کارواکرول و تأثیر گذاری بهتر آن شده در نهایت باعث افزایش عمر انباری آریل های انار و کاهش آلودگی میکروبی گردد.

سپاس گذاری: نویسندگان این پژوهش از ارگان های موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی کرج، دانشگاه تربیت مدرس، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران که صمیمانه ما را در انجام این پژوهش کمک کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

کارواکرول باعث جذب بهتر رطوبت محیط بسته بندی و در نتیجه کنترل بهتر آلودگی قارچی شده است (۴۴). گزارش شده است که فیلم تولیدی حاصل ترکیب نانو ذرات کیتوزان و اسانس های گیاهی باعث کاهش معنی دار پوسیدگی قهوه ای هلو گردید (۴۶). جذب رطوبت داخل بسته توسط کیتوزان می تواند دلیلی بر کاهش آلودگی قارچی آریل های انار باشد. گزارشات مشابهی توسط ازمیر و کوگمن (۴۷) ارائه شده است.

از نتایج بدست آمده این طور استنباط می شود که کارواکرول (در غلظت مناسب) موجود در فیلم پلی اتیلنی به تنهایی با پخش شدن درون بسته قادر به کاهش آلودگی های

• References

- Mirjalili A. pomegranate identification. Publication of agricultural education. press; 2002. p. 10-15 [in Persian].
- Safa M, Khazaei J. Determining and modeling some physical properties of pomegranate fruits of Saveh area, Iran, related to peeling and packaging. In: International Congress on Information Technology in Agriculture, Food and Environment, Izmir, Turkey, 2003; 331-337.
- Anand P, Kulkarni A, Somaradhya M, Soundar D. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant punicalagin from pith and capillary membrane of pomegranate fruit. Food Chemistry, 2004; 214: 56-67.
- Lopez-Rubira V, Conesa A, Allende A, Artes A. Shelf life and overall quality of minimally processed pomegranate arils modified atmosphere packaged and treated with UV-C. Postharvest Biology and Technology, 2005; 37 : 174-185.
- Gil MI, Martí JA, Artés F. Minimally processed pomegranate seeds. LWT-Food Science and Technology, 1996; 29: 708-713.
- Shakeri M, Mirhosseini SMR, Dehghani F. Assessment several fungicides to control pomegranate fruit rots. Iranian Pajouhesh & Sazandgi 2007; 74:165-171[in Persian].
- Stensvand A. Evaluation of new fungicides and a biocontrol agent against grey mould in strawberry. Annals Applied Biology, 1998; 19: 70-71.
- Chau CF, Wu SH, Yen GC. The development of regulations for food nanotechnology. Trends in Food Science & Technology, 2007; 18(5): 269-280.
- Mohammed, F.A., Balaji, K., Girilal, M., Kalaichelvan, P.T., and Venkatesan, R. "Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation, " Journal Agriculture Food Chemistry, 2009; 57: 6246-6252.
- Amini F, Moshtaghi H, and Abasvali M. Antibacterial effect of methanolic extract of clover (*Eryngium caeruleum*) on *E. coli* and *Staphylococcus aureus* in a food model at 4°C. 3rd International Conference on Science and Engineering, Istanbul – Turkey, 2016.
- Yuan, P, Tan, D, Annabi-Bergaya, F, Yan W, Liu D, Liu, Z. From platy kaolinite to aluminosilicate nanoroll via one-step delamination of kaolinite: effect of the temperature of intercalation. Appl. Clay Sci, 2013; 68-76.
- Yah, WO, Xu H, Soejima H. Ma W, Lvov Y, Takahara, A. 2012. Biomimetic dopamine derivative for selective polymer modification of halloysite nanotube lumen. J. Am. Chem. Soc, 2012; 134: 12134-12137.
- Lvov, YM., Shchukin, DG., Mohwald, H, Price, RR. Halloysite clay nanotubes for controlled release of protective agents. ACS Nano, 2008; 2: 814-820.
- Shemesh R, Krepkera M, Nitzanc N, Vaxmanb A, Segala E. Active packaging containing encapsulated carvacrol for control of postharvest decay. Postharvest Biology and Technology, 2016; 118: 175-182.
- Cacciatorea FA, Dalmása M, Madersa C, Isaíab H.A, Brandellib A, Malheirosa P.S. Carvacrol encapsulation into nanostructures: Characterization and antimicrobial activity against foodborne pathogens adhered to stainless steel. Food Research International, 2020; 109: 133-143.
- López-de-Dicastillo C, Gómez-Estaca J, Catalá R, Gavara R, Hernández-Muñoz P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. Food Chemistry, 2012; 131: 1376-1384.
- Tunç S, Duman O. Preparation of active antimicrobial methanol cellulose/ carvacrol/ montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. LWT - Food Science and Technology, 2011; 44: 465-472.
- Park HY, Kimk SJ, Kim KM, You YS, Han, j. Development of antioxidant packaging material by applying corn-zein to LDPE film in combination with phenolic compounds. J. Food Sci, 2012; 77(10): 273-279.
- Bonilla J, Atares L, Vargas M, Chiralt A. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. Journal of Food Engineering, 2012; 110: 208-213.
- Hasheminejad N, Khodaiyan F. The effect of clove essential oil loaded chitosan nanoparticles on the shelf life and quality of pomegranate arils. Food Chemistry, 2019; 1-33.
- Shahidi F, Arachchi J, Jeon YJ. Food applications of chitin and chitosans. Trends in Food Science & Technology, 1999; 10: 37-51.

22. Montero-Prado P, Rodriguez-Lafuente A, Nerin C. Active label-based packaging to extend the shelf-life of "Calanda" peach fruit: Changes in fruit quality and enzymatic activity. *Postharvest Biology and Technology*, 2011; 60: 211-219.
23. Kahramanoglu I, Usanmaz S, Aril production. In: Kahramanoglu, I., Usanmaz, S. (Eds.), *Pomegranate Production and Marketing*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Broken Sound Parkway NW, 2018; 87-89.
24. Muand F.N, Souliman R, Diop B, Dicko A. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stev reia baudiana* Bertoni leaves. *LWT - Food Science and Technology*. 2011; 44: 1865-1872.
25. D' Angelo S, Amelia C, Raimo M, Salvatore A, Zappia V, Galletti P. Effect of Reddening-Ripening on the Antioxidant Activity of Polyphenol Extracts from Cv. 'Annurca' Apple Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017; 55(24): 9977-9985.
26. Esna-Ashari M, Fath L, Ershadi A, Zafari D. The effect of UV irradiation and packaging type on anthocyanin content, antioxidant activity and microbial population in pomegranate fruit (cv. Malas Saveh) during cold storage. *Iranian Plant production tech* 2019; 91(9):143-195[in Persian].
27. O,grady L, Sigge GO, Caleb OJ, Opara UL. Effects of water dipping of whole fruit on the microbial quality of minimally processed pomegranate (*Punica granatum* L.) arils during cold storage. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation*, 2015; 5(1): 1-7.
28. Ghasemnezhad M, Zareh S, Rassa M, Sajedi R.H. Effect of chitosan coating on maintenance of aril quality: microbial population and PPO activity of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Tarom) at cold storage temperature. *J.Sci. Food Agric*, 2013; 93: 368-374.
29. Peretto G, Dub W, Avena-Bustillos J, Sarreal S.B, HuabS S, Samboa P, McHugh T. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. *Postharvest Biology and Technology*, 2014; 89: 11-18.
30. Gao M, Feng L, Jiang T. Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment. *Food Chemistry*, 2014; (149): 107-113.
31. Asghari-marjanlo A, Mostofi Y, Shoeiby Sh, Maghomy M. The effect of basil essential oil on control of gray rot and post-harvest strawberry (cv. Selva). 2008; 8(1):28 [in Persian].
32. Zha D, Quantick C. Effect of Chitosan Coating on Enzymatic Browning and Decay During Post-Harvest Storage of Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) Fruit' in *Postharvest Biol.Technol*, 1997; 12: 195-202.
33. Zhang D, Quantick P.C, Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. *J Hort Sci Biotechnol*, 1999; 73: 763-767.
34. Varasteh F, Arzani K, Barzegar M, Zamani Z. Changes in anthocyanins in arils of chitosan-coated pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Rabbab-e- Neyriz) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 2012; 130(2): 267-272.
35. Lvov, Y., Wang, W., Zhang, L., and Fakhrullin, R. 2015. Halloysite clay nanotubes for loading and sustained release of functional compounds. *Adv. Mater.* n/a-n/a.
36. Ramos M., Jimenez A., Peltzer M. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *J. Food Eng*, 2012;109-513.
37. Bonilla, J, Atares, L., Vargas, M, Chiralt, A. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering*, 2012; 110: 208-213.
38. Weiss, J, Takhistov, P, McClement, J. Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 2006; 71: 107-116.
39. Rinaudo, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 2008; 57(3):397-430.
40. Shemesh R, Krepker M, Natan M, Danin-Poleg Y, Banin E, Kashi Y, et all. Novel LDPE/halloysite nanotube films with sustained carvacrol release for broad-spectrum antimicrobial activity. *RSC Adv*, 2015; 5: 87108-87117.
41. Guarda A, Rubilar JF, Miltz J, Galotto M.J, The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 2011; 146 (2): 144-150.
42. Marina Ramos M, Ana Beltran A, Arancha Valdes A, Mercedes Peltzer A, Alfonso Jimenez A,
43. Isman M B, Machial, CM. Pesticides based on plant essential oils: From traditional practice to commercialization, 2006; 29-44.
44. Soylu EM., Soylu S, Kurt S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 2006; 161: 119-128.
45. Vesaltalab Z, Gholami, M. The Effect of Clove Buds and Rosemary Extracts and Essences on Control of *Botrytis cinerea* Growth. . *Iranian Plant production tech*, 2011; (11)2: 1-11.
46. Pinto R, Fernandes SCM, Freirea CSR, Sadocco P, Causio J, Pascoal Neto C, et all. Antibacterial activity of optically transparent nanocomposite films based on chitosan or its derivatives and silver nanoparticles. *Carbohydr.Res*, 2012; 348: 77-83.
47. Quesada J, Sendra E, Navarro C, Sayas-Barberá E. Antimicrobial active packaging including chitosan films with thymus vulgaris l. Essential oil for ready-to-eat meat. *Foods*, 2016; 57: 1-13.

Preserving Antioxidant Activity and Microbial Contamination of Pomegranate Aril (cv. Malas Saveh) Using Films Containing Chitosan and Carvacrol

Araghi H¹, Rastegar S^{*1}, Tajeddin B¹, Askari Sarcheshmeh M.A², Javan-nikkhah M²

1- Ph.D. Student, Department of Horticultural Science, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

2-*Corresponding author: Associated Prof, Department of Horticultural Science, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
Email: srastegar2008@gmail.com

3- Associated Prof, Department of Food Science and Technology, Agricultural Engineering and Research Institute, Karaj, Iran

4- Prof, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

5- Associated Prof, Department of Horticultural Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received 22 Sept, 2020

Accepted 25 Des, 2020

Background and Objectives: Decreases in microbial loads of pomegranate arils and their antioxidant activity can lead to cardiovascular diseases as well as increases in the body immune system. Therefore, the objective of this study was to investigate effects of films containing chitosan and carvacrol on antioxidant activity and microbial load of pomegranate arils stored at 7 °C ±1.

Materials & Methods: Anthocyanin content, antioxidant activity, microbial load and fungal colonies of the pomegranate aril packaging using films of carvacrol (0, 1 and 2%) and chitosan (0, 1 and 2%) were investigated every four days through 16 days of cold storage at 7 °C ±1.

Results: The ANOVA results showed that various concentrations of carvacrol and chitosan caused significant differences in antioxidant activity and microbial load of pomegranate arils. Films containing chitosan significantly preserved the anthocyanin content, compared to the control. Film containing chitosan (2%) and carvacrol (1%) included significant effects on antioxidant activity and fungal colonies after 16 days of storage at 7 °C ±1.

Conclusion: Films containing carvacrol and chitosan can be used in packaging industries due to the decreases in microbial loads.

Keywords: Carvacrol, Polyethylene film, Pomegranate aril, Fungal and bacterial colonies