مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال شانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، صفحات ۱۳۰-۱۲۱

حفظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش بار میکروبی آریل انار رقم ملس ساوه با استفاده از فیلم حاوی کیتوزان و کارواکرول

حسین عراقی[۱]، سمیه رستگار[۲]، بهجت تاج‌الدین[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 غذیی 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 گیاه‌پزشکی، 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 آنتی‌اکسیدانی می‌تواند منجر به ارتقا سطح سلامت و افزایش قدرت ایمنی بدن شود. از این رو هدف از این پژوهش، تأثیر فیلم پلی‌اتیلنی حاوی کیتوزان و کارواکرول بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بار میکروبی آریل انار نگهداری شده در دمای ۷± ۱ درجه سلسیوس است.

مواد و روش‌ها: محتوای آنتوسیانین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعداد پرگنه‌های قارچ و باکتری آریل میوه انار بسته‌بندی شده با فیلم پلی‌اتیلنی حاوی سه غلظت کارواکرول (۰، ۱ و ۲ درصد) و سه غلظت کیتوزان (۰، ۱ و ۲ درصد) طی ۱۶ روز انبارداری در دمای ۱± ۷ درجه سلسیوس و به فاصله هر ۴ روز اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف کیتوزان و کارواکرول تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بار میکروبی آریل‌های انار داشتند. فیلم های حاوی کیتوزان سبب حفظ معنی‌دار محتوی آنتوسیانین در مقابل کنترل شد. بعد از ۱۶ روز انبارداری فیلم‌های حاوی ۱ درصد کارواکرول و ۲ درصد کیتوزان تأثیر معنی‌دار در سطح ۱ درصد بر پرگنه‌های قارچ و آلودگی باکتریایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشتند.

نتیجه‌گیری: استفاده از فیلم های حاوی کارواکرول و کیتوزان بدلیل کاهش بار میکروبی می‌تواند در صنعت بسته‌بندی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: کارواکرول، فیلم پلی‌اتیلنی، آریل انار، پرگنه‌های قارچ و باکتری

• مقدمه

انار *(Punica granatum L.)* درختچه‌ای متعلق به خانواده پونیکاسه است که به طور وسیع در بسیاری از کشورهای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری کشت می‌شود (1). در سال‌های اخیر، استفاده از مواد غذایی غنی از مواد آنتی‌اکسیدان مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. آریل انار قسمت خوراکی میوه انار است که حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد وزن آن را تشکیل می‌دهد. که به نوبه خود از ۱۰ درصد قند (عمدتاً فروکتوز و گلوکز)، ۱۵ درصد اسیدآلی (اسیدآسکوربیک، اسیدسیتریک و اسیدمالیک) و ترکیبات فعال همچون آنتوسیانین و دیگر ترکیبات فنولی تشکیل شده است (2). فعالیت آنتی‌اکسیدانی انار به حضور ترکیبات فنلی متعدد ازجمله ایزومرهای پونیکالاژین، مشتقات آلاژیک اسید، آنتوسیانین‌های مختلف و فلاونوئیدها (کوئرسیتین و کامپفرول) مرتبط است. این ترکیبات دارای ویژگی جذب رادیکال‌های آزاد بوده و از اکسیدشدن لیپیدها ممانعت می‌کنند (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 نقص‌های خارجی مانع بازارپسندی این میوه شده است، امروزه عرضه میوه انار به صورت آریل و آماده مصرف، راهکاری

مناسب برای دستیابی به بهره‌وری اقتصادی و سود تجاری از میوه انار به ویژه انواعی که ظاهر آنها دچار صدمه شده است می‌باشد (4). یکی از مشکلات عمده پس از برداشت آریل‌های انار از دست دادن رنگ و آلودگی میکروبی می‌باشد (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 مهم‌ترین آنها می‌توان به *آسپرژیلوس، آلترناریا، پنی‌سیلیوم و بوتریتیس سینرا* اشاره کرد (6). با توجه به محدودیت استفاده از قارچ‌کش‌ها در محصولات غذایی، تکنیک‌های جایگزین که هیچ ماده شیمیایی در آنها استفاده نمی‌شود، سودمند شناخته شده است (7).

فناوری نانو در صنعت بسته‌بندی به عنوان پتانسیلی برای ایجاد انقلابی بزرگ در زمینه بسته‌بندی مواد غذایی نام برده می‌شود. امروزه استفاده از این فناوری در بسته‌بندی غذا واقعیتی است که به مرحله‌ی تجاری رسیده است. ترکیب کردن نانو مواد در پلیمرهای پلاستیکی منجر به توسعه ایجاد بسته بندی جدیدی شده است (8). فیلم‌های فعال نانوپلیمری باعث مهاجرت پیوسته ترکیبات ضدمیکروبی به سطح ماده غذایی، کنترل رشد میکروارگانیسم‌های مولد فساد موادغذایی و در نتیجه سبب بهبود امنیت غذایی و افزایش طول دوره نگهداری محصولات غذایی می‌گردد. نانوذرات در نانوکامپوزیتهای پلیمری سطح ویژه بالایی نسبت به ذرات در اندازه میکرو دارند. همین سطح ویژه بالا موجب بهبود برهمکنش بین پلیمر و نانو ذرات می‌شود و خصوصیاتی بروز می‌کند که از همان ذرات در مقیاس میکرو قابل دریافت نیست، بنابراین دستیابی به ویژگیهای خاص و مناسب این ذرات را ممکن می‌سازد. از جمله نانوذرات مورد استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی می‌توان به نانورس، نانونقره، نانوذرات دی اکسید تیتانیم 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 می‌گیرند و در نتیجه انتشار آنها کنترل شده و در برابر تخریب و تجزیه محافظت می‌شوند (۱۰) هالوسیت‌ها یک نانو رس لوله‌ای، قطر خارجی این۳۰-۱۹۰ نانومتر و قطر داخلی ۱۰-۱۰۰ نانومتر (۱۱) با خاصیت بالقوه بسیار زیادی در صنعت، سمیت کم، سازگاری زیستی می‌باشد (۱۲)که از آنها می‌توان برای محافظت و انتشار کنترل شده اجزای فعال استفاده کرد (۱۳).

استفاده از نانو ذراتی همچون نانوهالوسیت‌رس در تولید پلیمرهای فعال بسته‌بندی باعث رهایش کنترل‌شده ماده فعال و محافظت از ماده فعال در طول انبارداری و تأثیرگذاری بهتر آن می‌شود (۱۴) و می‌توان از آن برای محصور کردن کارواکرول و هر ماده فعال دیگر استفاده کرد (۱۵). امروزه گرایش به کاهش استفاده از افزودنی‌های سنتزی در فیلم‌های بسته‌بندی توجه به استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها و ضدمیکروبی طبیعی مانند اسانس، عصاره‌های گیاهی و کیتوزان را افزایش داده است (۱۶). در پژوهش‌های انجام شده از کارواکرول به عنوان عامل ضدباکتریایی (۱۷) و جلوگیری از اکسیداسیون در فیلم‌های بسته‌بندی مواد غذایی (۱۸) بهره گرفته شده است. از طرفی کیتوزان به عنوان یک بیوپلیمر غیرسمی می‌تواند در بستر فیلم‌های فعال بسته‌بندی به همراه اسانس گیاهی مورد استفاده قرار گیرد (۲۰، ۱۹). از ویژگی‌های کیتوزان در فیلم‌های فعال خوراکی میتوان به کنترل انتقال رطوبت، فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانتی، کنترل سرعت تنفس، تغییر اتمسفر بسته و کنترل کننده فعالیت آنزیم‌های قهوه ای‌شدن اشاره کرد (۲۱). استفاده از فیلم‌های پلی‌اتیلنی پوشش‌دار شده با عامل آنتی‌میکروبی مانند اسانس دارچین تأثیر معنی‌داری بر کاهش آلودگی‌های هلو طی ۱۲ روز نگهداری در دمای اتاق گذاشت (۲۲).

باتوجه به مصرف روزافزون آریل میوه‌ی 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 بیماری‌های قارچی و افزایش عمر انباری آن ضروری بنظر می‌رسد. استفاده از دانه‌های تازه و آماده برای خوردن همچنین کسب سود اقتصادی از میوه‌های دارای آسیب ظاهری، گزینه‌ای مناسب برای جلب توجه مصرف کننده‌های میوه انار می‌باشد(۴). از طرف دیگر امروزه مصرف کنندگان نگرانی‌های خاصی نسبت به استفاده از نگهدارنده‌ها در مواد غذائی دارند. نتایج نشان داده است که بسته‌بندی آریل انار یک اقدام بزرگ در جهت افزایش عمر انبارداری همراه با حفظ کیفیت آن می‌باشد (۲۳). از این جهت هدف از این پژوهش حفظ کیفیت و کاهش آلودگی‌های میکروبی آریل‌های انار رقم ملس ساوه با استفاده از بسته‌بندی فعال بدون استفاده از هیچ ماده نگهدارنده در مدت نگهداری می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

مواد اولیه: میوه‌های 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

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 ۰/۹۲g/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 کاروکرول محصول شرکت Natural nano آمریکا برای تهیه فیلم خریداری شد. کیتوزان با وزن ملکولی متوسط ساخت شرکت سیگما آلدریچ مورد استفاده قرار گرفت.

تولید فیلم فعال

تهیه هیبرید نانوهالوسیت رس/کارواکرول: برای تولید هیبرید نانوهالوسیت رس/کارواکرول (Halloysite Nanotubes /carvacrol hybrids) (HNTs)، نانوهالوسیت‌رس 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 کپسوله‌کردن کارواکرول توسط نانوهالوسیت 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 نانوهالوسیت‌رس، نانوهالوسیت‌ها 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 نانوهالوسیت/کارواکرول و کیتوزان: برای تهیه فیلم مذکور کیتوزان در سه غلظت شامل ۰، ۱، ۲ درصد و هیبرید نانوهالوسیت‌رس/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 اکسترود 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 اکسترود تک پیچه (مدل D-47055) ساخت کشور آلمان مجهز به سیستم فیلم دمشی تولید شد (۱۴).

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 ۱± ۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۰/۵± ۹۵ 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 نمونه ها در طول موج های ۵۱۰ و ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتریک (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.

آنتوسیانین کل = [(A×MW×DF×1000)/MA]

A= (A510 – A700) pH1.0 - (A510 – A700) pH4.5

که در آن MW: وزن مولکولی آنتوسیانین غالب (۴۴۹/۲)، df: فاکتور رقت (۱۰)، MA : ضریب جذب مولی سیانیدین 3-گلوکوزاید (۲۶۹۰۰) است.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد ۲ و ۲ دی‌فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) اندازه‌گیری شد. بدین صورت که از عصاره متانولی تهیه شده (۰/۵ گرم آب میوه با ۳ میلی‌لیتر متانول ۸۵٪)، ۵۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به همراه ۵۰۰ میکرو-لیتر آب مقطر به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد و سپس ۷۵ میکرولیتر از فاز رویی به همراه ۲۹۲۵ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۰۰۲۴ گرم DPPH با متانول ۸۵ درصد به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد) ورتکس شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتریک (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).

[(At0 –At30)/ At0]×100 = فعالیت آنتی اکسیدانی (در صد)
At0: جذب نمونه‌ها در زمان صفر، At30: جذب نمونه‌ها پس از 30دقیقه

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 محیط های 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 ۱۰ ($10 \log cfu.ml^{-1}$) 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 میلی‌لیتر آب میوه به ۹ میلی‌لیتر محلول سرم آماده شده اضافه گردید تا رقت 10^{-1} حاصل شود. سپس از آنها برای تهیه رقت های، 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 میلی‌لیتر با میکرپیپت 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 کلونی-های هر پلیت شمارش و نتایج بر اساس تعداد کلونی تشکیل شده بر حسب $\log_{10}$ cfu/ml گزارش گردید (۲۷).

x =۱۰×عکس رقت×تعداد کلونی
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 میلی‌لیتر با میکرپیپت 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 سلسیوس منتقل شد. تعداد کلونی‌ها هر پلیت شمارش و نتایج بر حسب $\log_{10}$ cfu/ml گزارش گردید (۲۷).

x =۱×عکس رقت×تعداد کلونی
CFU= log x

در این معادله x میانگین کلونی‌های مشاهده شده می‌باشد.

تجزیه آماری: به منظور بررسی تأثیر کارواکرول و کیتوزان در بدنه فیلم پلی‌اتیلنی بر فعالیت آنتی اکسیدانی و کاهش بار میکروبی آریل انار رقم ملس ساوه آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل درصدهای مختلف کیتوزان (۰،۱،۲درصد)، 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 SAS (System Institute Inc., Statistical Analysis ;Version 9.4 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 پلی‌اتیلنی 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 (جدول۱). ولی اثرات متقابل کارواکرول با کیتوزان بر محتوی آنتوسیانین معنی‌دار نشد (جدول۱). 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 (جدول۲).

براساس نتایج تجزیه واریانس، فاکتورهای زمان، کارواکرول، کیتوزان و اثرات متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنتی اکسیدانی آریل انار نشان دادند (جدول۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها حاکی از آن بود که بعد از ۱۶ روز انبارمانی، بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی 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 (جدول۳).

نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده تأثیر معنی‌دار زمان و اثر متقابل آن با کیتوزان و کارواکرول و همچنین کارواکرول موجود در فیلم‌های پلی‌اتیلنی 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 (جدول۱).

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

منبع تغییر S.V	درجه آزادی D.F	میانگین مربعات (M.S)			
		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}
اثرمتقابل AB	۸	۷۵/۲**	۴۷/۳**	۱/۰۸۸**	۲/۹۱۲**
اثرمتقابل AC	۸	۵/۴^{ns}	۲/۶**	۰/۰۴۶**	۰/۱۸۱**
اثرمتقابل BC	۴	۲/۱ ^{ns}	۳/۹**	۰/۰۰۷ ^{ns}	۰/۰۹۳**
اثرمتقابل 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 غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

جدول ۲. مقایسه اثرمتقابل زمان و کارواکرول بر محتوی آنتوسیانین و تعداد پرگنه‌های قارچ آب آریل انارکشت شده به مدت۷۲ ساعت در محیط کشت PDA طی مدت نگهداری

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

براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها با گذشت زمان محتوی کل قارچ و مخمر افزایش یافت. در پایان آزمایش کمترین تعداد پرگنه‌ها 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 آلودگی‌های قارچی کل آب آریل انار شد (جدول۲).

نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده تأثیر معنی‌داری همه فاکتورها و اثر متقابل آنها بجز کیتوزان، بر محتوی کل باکتری مزوفیل هوازی می‌باشد (جدول۱). استفاده از فیلم فعال حاوی (کارواکرول و کیتوزان) بصورت همزمان باعث کاهش معنی‌دار آلودگی‌های باکتریائی کل آب آریل انار در طول مدت نگهداری شد (جدول۱). براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها به تدریج با گذشت زمان تعداد باکتری آب آریل انار افزایش یافت. در پایان آزمایش استفاده از فیلم‌های حاوی ۱ درصد کارواکرول به تنهایی و در ترکیب با کیتوزان ۱و ۲ درصد بطور معنی‌داری آلودگی را نسبت به شاهد کاهش داد. در حالی که غلظت ۲ درصد کارواکرول و همچنین کیتوزان ۱و۲ درصد به تنهایی تأثیر معنی‌داری بر آلودگی باکتریی نشان ندادند.

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

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

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 اثرمتقابل زمان، کارواکرول و کیتوزان بر تعداد پرگنه های باکتری آب آریل انار کشت شده به مدت۷۲ ساعت در محیط کشت NA طی مدت انبارداری

کارواکرول(٪)	کیتوزان (٪)	زمان (روز) صفر	۴	۸	۱۲	۱۶
۰	۰	۰/۹۶^{jk}	۱/۳۰^{i}	۱/۷۳^{gh}	۳/۰۴^{de}	۴/۷۴^{a}
	۱	۱/۰۴^{ijk}	۱/۲۰^{ijk}	۲/۱۱^{f}	۲/۸۵^{e}	۴/۴۳^{ab}
	۲	۱/۰۴^{ijk}	۱/۱۴^{ijk}	۲/۱۰^{f}	۳/۲۳^{cd}	۴/۶۵^{a}
۱	۰	۱/۱۱^{ijk}	۱/۱۱^{ijk}	۱/۶۸^{h}	۲/۱۴^{f}	۲/۸۵^{e}
	۱	۰/۹۹^{ijk}	۱/۲۶^{ij}	۱/۷۳^{gh}	۲/۰۶^{fg}	۲/۱۴^{f}
	۲	۱/۱۱^{ijk}	۱/۱۴^{ijk}	۱/۷۳^{gh}	۱/۹۹^{fgh}	۲/۰۶^{fg}
۲	۰	۰/۹۹^{ijk}	۱/۲۶^{ij}	۱/۶۸^{h}	۳/۴۱^{c}	۴/۶۹^{a}
	۱	۱/۰۴^{ijk}	۱/۰۸^{ijk}	۲/۰۲^{fg}	۳/۴۱^{c}	۴/۷۴^{a}
	۲	۰/۹۲^{k}	۱/۲۲^{ijk}	۲/۰۰^{fgh}	۳/۴۱^{c}	۴/۱۶^{b}

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

• بحث

پـژوهش حاضـر نشـان داد کـه بعـد از ۱۶ روز نگهـداری بیشترین محتوی آنتوسیانین‌ها مربوط به نمونه‌های بسته‌بندی شده با فیلم حاوی ۱ درصد کارواکرول بـود و کمتـرین مقـدار آنتوسیانین در نمونه‌های حاوی ۲ درصـد کـارواکرول مشـاهده شد. کاهش ترکیبات فنولی ممکن است بدلیل تجزیه سـاختار سلولی در فرایند پیری در طول مـدت انبـاری و اکسیداسـیون آنها توسط آنزیم‌های پلـی‌فنـول اکسـیداز و پراکسـیداز باشـد (۲۸). مقـادیر پـایین ترکیبـات فنـولی در نمونـه‌هـای شـاهد می‌تواند بدلیل مشارکت پلی‌فنول‌ها در فرآینـد قهـوه‌ای شـدن طول مدت انبارداری باشد. احتمالا بخار اسانس‌های گیـاهی از جملـه کـارواکرول از طریـق پخـش‌شـدن در محـیط بسـته و بـرهمکنش بـا سـطح مـاده غـذایی (۲۹)، مـانع تجزیـه آنتوسیانین‌ها از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های مسئول تجزیه ترکیبات فنولی مانند پلی‌فنول اکسیداز و در نتیجـه تـاخیر در اکسیداسیون آنها (۳۰) می‌شود. از طرف دیگر بدلیل حساسیت بافت آریل انار، غلظت بالای اسانس می‌تواند باعث تغییر شـکل بافـت، افـزایش سـرعت فعالیـت‌هـای متـابولیکی (۳۱) و اکسیداسیون ترکیبات فنولی و در نتیجه کاهش آنتوسیانین‌هـا شود (۱۴). گزارش شده است فیلم حاوی کیتوزان باعث تاخیر در سرعت تغییر محتـوی آنتوسـیانین، فلانوئیـد و فنولیـک از طریق کاهش فعالیت پراکسیداز کل میوه لیچـی گردیـد (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) گـزارش شـده است.

در پایان مدت انباری استفاده از فیلم حاوی (۱درصد کارواکرول و ۲ درصد کیتوزان) باعث حفظ خواص آنتی‌اکسیدانی آب آریل انار شد. به نظر می‌رسد سنتز آنتوسیانین طی انبارداری می‌تواند دلیلی بر بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تجزیه آن گویای پایین بودن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آب میوه انار است (۳۵). تفسیر نتایج بیانگر محتوی آنتوسیانین بالا در نمونه‌های بسته‌بندی با فیلم حاوی ۱ درصد کارواکرول است. این چنین می‌توان گفت که کارواکرول سبب حفظ قدرت آنتی‌اکسیدانی از طریق تاخیر در تجزیه آنتوسیانین‌ها شده است. این احتمال وجود دارد که اسانس‌های گیاهی نقش مثبتی در تولید متابولیت‌های ثانویه و بیوسنتز ترکیبات فنولی و آنتوسیانین‌ها از طریق افزایش فعالیت آنزیم PAL شوند (۳۵).

گزارش شده است که رابطه مثبتی بین محتوی آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در آریل‌های انار تحت تیمار کیتوزان وجود دارد. احتمالا کیتوزان از طریق تاخیر در اکسیداسیون آنتوسیانین‌ها باعث حفظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده است (۳۳).

بکارگیری اسانس‌ها برای کاهش بار میکروبی محصولات تازه توسط محققان مختلفی گزارش شده است (۲۰، ۱۵، ۱۴). یکی از معایب اصلی استفاده از اسانس‌ها تأثیر آنها بر روی عطر و طعم محصولات می‌باشد. از این جهت استفاده از مواد ثانویه مانند نانو رس و کیتوزان می‌تواند علاوه بر حفظ خاصیت اسانس‌ها بر روی آلودگی‌ها باعث کاهش اثرات مخرب آنها بر عطر و طعم محصولات شود. نانو هالوسیت‌رس بعنوان یک عامل نگهدارنده ترکیبات فعال مانند اسانس‌ها (۳۵) می‌تواند برای محافظت و انتشار کنترل شده آنها مورد استفاده قرار گیرد (۱۳). در طی آزمایشات قبلی مشخص شده است که نانوهالوسیت‌رس هیچ تأثیری بر خواص ضد قارچی اسانس‌ها نظیر کارواکرول ندارد (۳۶). از طرفی کیتوزان به عنوان یک بیوپلیمر غیر سمی می‌تواند در بدنه فیلم‌های فعال بسته‌بندی 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 غیرسمی بودن، به عنوان ماده نگهدارنده اهمیت زیادی پیدا کرده است (۳۹، ۳۸).

استفاده همزمان از کیتوزان و کارواکرول در فیلم‌های پلی‌اتیلنی باعث کاهش بار میکروبی اعم از قارچ‌ها و باکتری‌ها در نمونه آریل‌های انار شد. بیشترین خاصیت بازدارندگی مربوط به فیلم حاوی (۱ درصد کارواکرول و ۲ درصد کیتوزان) و کمترین میزان تأثیر بر آلودگی میکروبی مربوط به نمونه‌های بسته‌بندی با فیلم حاوی ۲ درصد کارواکرول بود. Ramos و همکاران اثر تیمول و کارواکرول را در بدنه فیلم های پلی پرو پیلن (PP) روی باکتری‌های رشته ای مورد بررسی قرار دادند و پی بردند که اثرات متقابل تیمول و کارواکرول بطور معنی-داری از گسترش باکتری‌های رشته ای در محیط کشت درون شیشه‌ای (in vitro) جلوگیری به عمل آورد (۲۹). در آزمایشی اثر کارواکرول در بدنه فیلم های پلی اتیلنی با چگالی کم (LDPE) روی عوامل میکروبی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که ملکول‌های کارواکرول با آزاد شدن در محیط بسته و تأثیر بر رشد عوامل بیماری‌زا به طور معنی‌داری از گسترش قارچ های اشرشیا کولا، لیستریا آنولا و آلترناترا آلترناترا جلوگیری می‌کند (۴۰). Shemesh و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثر بازدارندگی معنی‌دار هیبرید کارواکرول 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 کارواکرول 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 می‌کند (۲۹). به نظر می‌رسد که کارواکرول از طریق انتشار در محیط بسته مانع جوانه‌زنی و رشد قارچ‌ها می‌شود (۴۲). اعتقاد بر این است که کارواکرول 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 چربی‌دوستی کارواکرول این امکان را فراهم می‌کند که توسط میسیلیوم قارچ جذب و از این طریق بر رشد قارچ تأثیر منفی بگذارد (۴۴). افزایش انشعابات میسلیومی، چروکیدگی و مجعد شدن میسلیوم‌ها و کاهش تولید اسپورها توسط برخی پژوهشگران هنگام استفاده از اسانسهای حاوی کارواکرول بصورت تدخینی گزارش شده است (۴۵). نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (۴۰، ۲۹، ۱۴). در مقابل استفاده از غلظت‌های 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 غلظت‌های 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

کارواکرول باعث جذب بهتر رطوبت محیط بسته‌بندی و در نتیجه کنترل بهتر آلودگی قارچی شده است (۴۴). گزارش شده است که فیلم تولیدی حاصل ترکیب نانو ذرات کیتوزان و اسانس‌های گیاهی باعث کاهش معنی‌دار پوسیدگی قهوه ای هلو گردید (۴۶). جذب رطوبت داخل بسته توسط کیتوزان می‌تواند دلیلی بر کاهش آلودگی قارچی آریل‌های انار باشد. گزارشات مشابهی توسط ازمیر و کوگمن (۴۷) ارائه شده است.

از نتایج بدست آمده این طور استنباط می‌شود که کارواکرول (در غلظت مناسب) موجود در فیلم پلی‌اتیلنی به تنهایی با پخش شدن درون بسته قادر به کاهش آلودگی‌های میکروبی و حفظ فعالیت انتی‌اکسیدانی می‌باشد. استفاده از کیتوزان در فیلم می‌تواند باعث بهبود اثرات کارواکرول و تأثیر گذاری بهتر آن شده در نهایت باعث افزایش عمر انباری آریل‌های انار وکاهش آلودگی میکروبی گردد.

سپاس‌گزاری: نویسندگان این پژوهش از ارگان‌های 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.

• References

1. Mirjalili A. pomegranate identification. Publication of agricultural education. press; 2002. p. 10-15 [in Persian].
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Gil MI, Martí JA, Artés F. Minimally processed pomegranate seeds. LWT-Food Science and Technology, 1996; 29: 708-713.
6. Shakeri M, Mirhosseini SMR, Dehghani F. Assessment several fungicides to control pomegranate fruit rots.Iranian Pajouhesh & Sazandgi 2007; 74:165-171[in Persian].
7. Stensvand A. Evaluation of new fungicides and a biocontrol agent against grey mould in strawberry. Annals Applied Biology, 1998; 19: 70-71.
8. Chau CF, Wu SH, Yen GC. The development of regulations for food nanotechnology. Trends in Food Science & Technology, 2007; 18(5): 269-280.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Lvov, YM., Shchukin, DG., Mohwald, H, Price, RR. Halloysite clay nanotubes for controlled release of protective agents. ACS Nano, 2008; 2: 814–820.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Tunç S, Duman O. Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/ carvacrol/ montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. LWT - Food Science and Technology, 2011; 44: 465-472.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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 activityof pomegranate (Punica granatum L. cv. Tarom) at cold storage temperature. J.Sci. Food Agric, 2013; 93: 368–374.

29. Perettoa G, Dub W, Avena-Bustillosb J, Sarreal S.B, HuabS S, Samboa P, McHugh T. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamateantimicrobial 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. Carbohyd.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 H[1], Rastegar S[1], Tajeddin B[1], Askari Sarcheshmeh M.A[2], Javan-nikkhah M[2]*

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 deceases 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 aryl, Fungal and bacterial colonies