

# تعیین اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره انگور ریزپوشانی شده در نانوذرات کیتوزان - تری پلی فسفات بر روی افزایش دوره نگهداری سوریمی کیلکا در یخچال

سپیده سلیمانفلاح<sup>a</sup>، ژاله خوشخو<sup>b\*</sup>، سید ابراهیم حسینی<sup>c</sup>، محمد حسین عزیزی<sup>d</sup>

<sup>a</sup> دانش آموخته دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>b</sup> دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>c</sup> استاد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>d</sup> استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۴/۱۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۲/۲۳

DOI: 10.30495/jftn.2023.73183.11252

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1402.20.4.4.8>

## چکیده

**مقدمه:** در این پژوهش تاثیر عصاره آبی دانه انگور ریزپوشانی شده در نانوذرات کیتوزان (به نسبت ۰/۵ به ۱) به روش ژلاسیون یونی بر روی ماندگاری سوریمی تهیه شده از ماهی کیلکا مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** عصاره انگور به روش آبی استخراج و مقدار فنول کل بوسیله روش فولین سیکالتو و اسیدهای فنولیک عصاره با استفاده از دستگاه HPLC شناسایی شد. خصوصیات فیزیکی نانوذرات شامل اندازه ذرات، پتانسیل زتا و ضریب بس پاشیدگی با زتا سایزر و کارایی ریزپوشانی با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر و ظرفیت بارگذاری نانوذرات با استفاده از HPLC تعیین گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آزاد و نانوذرات کیتوزان با / بدون عصاره ( با آزمون DPPH) تعیین شد. پس از تهیه سوریمی از ماهی کیلکا، تیمارهای مختلف شامل سوریمی (شاهد)، سوریمی حاوی عصاره آزاد، سوریمی حاوی نانوذرات کیتوزان و سوریمی حاوی نانوذرات کیتوزان به همراه عصاره آماده گردید. شمارش کلی با کتری‌های سرمادوست، میانه دوست، سودوموناس، کپک و مخمر و بازدارندگی رشد (MIC, MBC, IZ) باکتری‌های منتخب گرم مثبت و گرم منفی و کپک و مخمر منتخب در تیمارهای مختلف در روزهای آزمایش (۰، ۱، ۳، ۶ و ۹) در دمای یخچال مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** داده‌ها نشانگر این بودند که نانوذرات تولیدی در وضعیت مطلوبی قرار دارند (اندازه ذرات، پتانسیل زتا و PDI به ترتیب: ۱۷۷/۵ نانومتر، ۳۲/۹۵ + میلی ولت و ۰/۳۸۵ و کارایی ریز پوشانی و بارگذاری نانوذرات به ترتیب: ۴۸/۹۵ و ۶/۱۹ درصد مشخص گردید. میزان محتوای فنولی عصاره ۱۸ ± ۲۸۹۶ میلی گرم بر گرم می‌باشد و عصاره در حالت بارگذاری شده، درصد فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری را از خود نشان می‌دهد. (۴۲/۱ درصد) همچنین بازدارندگی رشد در میکروارگانسیم‌های (گرم مثبت و گرم منفی) افزایش می‌یابد و مقادیر کلی باکتری‌های سرمادوست (CFU/g) ۰/۲۹ ± ۶/۳۵، باکتری‌های میانه دوست (CFU/g) ۰/۲۷ ± ۶/۱۸، سودوموناس (CFU/g) ۰/۱۴ ± ۵/۴۱ و کپک و مخمر (CFU/g) ۰/۲۶ ± ۲/۴۵ در آخرین روز آزمایش، کاهش معنی‌داری را در روند افزایشی میکروارگانسیم‌ها نشان می‌دهد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج بدست آمده، استفاده از نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره در سوریمی ماهی کیلکا، موجب به تاخیر انداختن فساد میکروبی و افزایش مقاومت محصول در برابر رادیکال‌های آزاد شده و نتیجتاً باعث افزایش ماندگاری محصول در طی دوره نگهداری در یخچال می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** سوریمی کیلکا، عصاره دانه انگور، فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد میکروبی، نانوذرات کیتوزان

تعیین اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره انگور ریزپوشانی شده در نانوذرات کیتوزان - تری پلی فسفات

## مقدمه

عصاره انگور یکی از ترکیبات غنی از پلی فنلهایی مانند: کاتچین، اپی کاتچین، گالیک اسید و پروآنتی سیانیدین، ترکیبات دی مری، تری مری و تترا مری می باشد که عنوان عوامل ضد ویروسی و ضد سرطان شناخته می شود. عصاره هسته انگور باعث مهار رشد سلول های سرطانی کولون می شود. در تهیه عصاره آبی انگور، از آب بعنوان حلال استفاده می گردد. معیارهای انتخاب حلال: قیمت، راحتی در استفاده، کنترل موثرتر فرآیند، ایمنی و حفظ محیط زیست می باشد. عصاره گیری برای استفاده در ساختار نانو باید بر پایه دو اصل صورت پذیرد: الف) افزایش حلالیت عصاره ب) افزایش پایداری عصاره (Gibis et al., 2013) کیتوزان یک ترکیب بیوپلیمری کاتیونیک طبیعی (کربوهیدراتی) است که پس از سلولوز دومین بیوپلیمر طبیعی در جهان می باشد و از واحدهای N-acetyl-D-glucosamine و D-glucosamine تشکیل شده است که بوسیله اتصالات  $\beta$ -1,4-glycosidic با یکدیگر در ارتباط هستند. کیتوزان یک پلی ساکارید خطی می باشد که از تبادل یونی و اصلاح کیتین ایجاد می شود و در صنایع دارویی و کشاورزی کاربرد بسیار دارد (Abdolahi-Chelehbari et al., 2022). از مکانیسم های عملکرد کیتوزان می توان به (۱) ایجاد کمپلکس با فلزات (۲) توانایی ورود به نوک تاز سلول و ایجاد تداخل در سنتز پروتئین ها توسط mRNA و ایجاد محدودیت در فعالیت آنزیم ها (۳) تغییر در ساختار و نفوذپذیری غشا سلولی و تاثیر بر روی شارژ (منفی) سطحی سلول، که نتیجتاً تاثیر بر روی باکتری های گرم منفی بیش از باکتری های گرم مثبت است (Abdeltwab et al., 2019; Hu & Ganzle., 2019). عوامل مختلفی بر میزان خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان اثر دارند از جمله این عوامل می توان به: سایز نانوذرات، گونه باکتریایی، مرحله رشد، غلظت، pH، پتانسیل زتا، وزن مولکولی و درجه استیلاسیون اشاره کرد. (Chandrasekaran et al., 2020)

ضد اکساینده به ترکیباتی اطلاق می شود که در مقادیر بسیار ناچیز باعث کاهش سرعت یا به تاخیر انداختن واکنش های اکسایشی مواد مستعد به اکسایش می شوند. (Amorati et al., 2013) در حال حاضر، مصرف

کنندگان و صنایع توجه زیادی به ضد اکساینده های طبیعی با منشاء گیاهی معطوف کرده اند که به دلیل اثرات سرطانی ضد اکساینده های سنتزی از قبیل بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) و بوتیل ۲- هیدروکسی آنیزول (BHA) استفاده از آنها با محدودیت زیادی مواجه شده است و فرض بر این است که ضد اکساینده های با منشاء گیاهی اثرات مفیدی بر سلامت مصرف کنندگان، کیفیت مواد غذایی و حتی محیط زیست دارند. (Parakash et al., 2017)

نانوتکنولوژی نقش بسیار مهمی را در توسعه مطالعات ضد میکروبی در سطح اتمی داشته است. (Chandrasekaran et al., 2020) نانوذرات قابل تجزیه در واقع ذرات جامد کلوئیدی ریزی هستند که اندازه آنها بین ۱۰۰-۱۰ نانومتر می باشد که می تواند سطح بسیار بالایی را ایجاد نمایند، که این سطح بالا می تواند ویژگی های فیزیکی و شیمیایی بسیار منحصر بفردی را در انواع کاربردهای آنها در فرآیندهای مواد غذایی ایجاد نماید. (Ahmed et al., 2020) از میان انواع تکنیک های ریزپوشانی، روش ژلاسیون یونی، ارتباط الکترواستاتیک بین بار مثبت کیتوزان و بار منفی تری پلی فسفات (TPP) را ایجاد می نماید. با تغییر نسبت کیتوزان و به TPP، سایز و سطح نانوذرات کیتوزان اصلاح می شود. در این روش هیچ واکنش شیمیایی رخ نمی دهد که باعث ایجاد مواد سمی شود. (Rasaei et al., 2016)

ماهی کیلکا از جمله گونه های با ارزش دریای خزر هستند که به دلیل وجود ارزش غذایی بالا به ویژه اسیدهای چرب غیر اشباع امگا-۳ حائز اهمیت هستند. مطالعات نشان می دهند که بیشترین میزان مصرف این ماهیان برای تولید آرد ماهی بوده و سهم مصرف انسانی آنها پایین است. بنابراین می توان با اتخاذ راه کارهای مختلفی مانند: تهیه کنسرو، ماریناد، انواع محصولات خمیری و ... زمینه استفاده از این ماهیان را افزایش داده است. بین گونه های این خانواده کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris*) بیشترین درصد صید را در دریای خزر به خود اختصاص داده است و می تواند به عنوان یک گزینه مطلوب برای تولید محصولاتی مانند سوریمی مطرح باشد. (Zamani, 2019; Isamaleli et al., 2020)

آشکارسازی در طول موج ۲۵۴ نانومتر قرائت و به صورت میکرومول در گرم وزن تر بیان شد (Vekiari *et al.*, 2007; Koponen *et al.*, 2008).

#### – ارزیابی محتوای فنلی کل

میزان کل ترکیبات فنلی با روش فولین سیکالتو اندازه گیری شد. پس از آماده سازی نمونه عصاره، جذب آنها با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت و جهت رسم منحنی از استاندارد اسید گالیک استفاده شد. محلول پایه ای گالیک اسید آماده و غلظت‌های مختلف ۱۰ تا ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه و منحنی استاندارد بر مبنای جذب در برابر غلظت اسید رسم گردید. میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره بر حسب اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد. آزمایش‌ها در سه تکرار و میانگین آنها گزارش گردید (Roostae *et al.*, 2017; Zarei *et al.*, 2015).

#### – هیبه نانوذرات کیتوزان (همراه و فاقد عصاره)

پودر کیتوزان در ۱٪ اسید استیک حل و در حمام فراصوت ۶۰ دقیقه قرار گرفته و محلول کیتوزان ۲٪ بدست آمد. TPP، با استفاده از همزن مغناطیسی و در دمای محیط، در آب دیونیزه مخلوط تا غلظت ۲٪ محلول TPP حاصل شد. ۴ میلی لیتر از محلول TPP به ۱۰۰ میلی لیتر از محلول کیتوزان اضافه و بوسیله همزن مغناطیسی با سرعت ۷۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه، جهت یکنواخت شدن محلول، همزده می‌شود. روش تولید نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره همانند تولید نانوذرات کیتوزان می‌باشد عصاره پس از حل شدن در آب دیونیزه با غلظت حجمی / حجمی ۰/۷۵ به محلول نانوذرات کیتوزان افزوده شد و پس از هم زدن، کیتوزان به عصاره با نسبت ۱ به ۰/۵ بدست آمد. غلظت نهایی کیتوزان ۲ میلی گرم در میلی لیتر و غلظت نهایی TPP ۰/۷ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید. (Zarei *et al.*, 2015; Ghaderi *et al.*, 2016; Dube *et al.*, 2010; Haider *et al.*, 2017)

#### – اندازه‌گیری اندازه ذرات، پتانسیل زتا و ضریب

##### بس پاشیدگی نانوذرات کیتوزان

۱ میلی لیتر از محلول نانوذرات کیتوزان (با / فاقد عصاره)،

سوریمی شامل پروتئین‌های میوفیبریلی است که پس از شستشو و استخوان گیری و ترکیب با مواد محافظ سرما، به شکل خمیری در می‌آید و می‌توان برای مدت زمان کوتاهی آن را در یخچال نگهداری کرد که در این شرایط استفاده از انواع نگهدارنده‌ها در افزایش ماندگاری آن ضروری است. (Jeyakumari *et al.*, 2016)

پژوهش حاضر با هدف، تعیین اثرات ضد میکروبی و ضد اکسایشی نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره دانه کامل انگور در سوریمی کیلکا در طی دوره نگهداری در یخچال، انجام پذیرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### – تهیه عصاره آبی انگور

دانه‌های انگور (انگور قرمز وارپته قلات استان فارس) در  $45-50^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه در آون خشک و سپس آسیاب شدند و از الک مش ۳۵ میکرون عبور داده شده و به نسبت ۱ به ۸ با آب دیونیزه مخلوط و درون دستگاه حمام اولتراسونیک و در  $55^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه در معرض طول موج ثابت ۳۵ کیلو هرتز قرار گرفتند. عصاره استخراج شده از کاغذ صافی واتمن شماره پنج، جهت جداسازی ناخالصی‌ها عبور داده شده و پس از تغلیظ و خشک کردن به صورت پودر در آمده و در ظرف دربسته، به دور از نور و رطوبت، جهت انجام آزمایش‌ها نگهداری شد. (Rajaei *et al.*, 2010)

##### – استخراج و تعیین اسیدهای فنولیک در عصاره

۰/۵ گرم از عصاره با آب دیونیزه مخلوط و اتیل استات به آن افزوده شده و از صافی میکرومتر عبور داده شد. جداسازی در ستون Hypersil ODS به ابعاد  $4/6 \times 250$  میلی متر با قطر ذرات ۵ میکرون و در دمای محیط انجام گرفت. کروماتوگرافی با استفاده از پمپ HPLC مجهز شده با آشکار ساز UV-V و در ۲۵۴ نانومتر قرائت شد. فاز متحرک شامل پتاسیم دی هیدروژن فسفات و استونیتریل به نسبت حجمی (۸/۰: ۲۰) با سرعت جریان یک میلی لیتر در دقیقه بود. استاندارد اسیدهای فنولیک مورد استفاده قرار گرفت و محلول پایه استاندارد اسیدهای فنولی مختلف در غلظت ۱ تا ۴۰۰ میلی گرم در لیتر در اتانول خالص تهیه شد. اسیدهای فنولی در طول موج ۱۹۰ تا ۴۰۰ نانومتر با

تعیین اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره انگور ریزپوشانی شده در نانوذرات کیتوزان - تری پلی فسفات

به مدت ۳۰ ثانیه در حمام فراصوت قرار گرفت تا هر گونه ذرات به هم چسبیده حذف گردد. جهت اندازه گیری اندازه ذرات، شاخص بس پاشیدگی و پتانسیل زتا، از دستگاه زتا سایزر مالورن ZS مجهز به لیزر He-Ne در طول موج ۶۳۳ نانومتر، توان ۴۰ میلی وات و زاویه پراکنش ثابت ۹۰ استفاده شد و آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت. (Ghaderi, Ghahfarokhi *et al.*, 2016; Farokhzadeh *et al.*, 2020)

### ارزیابی کارایی ریزپوشانی و ظرفیت بارگذاری نانو ذرات حاوی عصاره

سوپانسیون نانو ذرات با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ °C، را به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان جذب اسانس ریزپوشانی نشده در محدوده ۲۵۰-۴۰۰ نانومتر به وسیله طیف نورسنج ماورا بنفش - مرئی قرائت و منحنی استاندارد عصاره در اتانول در طول موج ۲۷۴ نانومتر تهیه و تعیین میزان عصاره آزاد با استفاده از معادله منحنی استاندارد ( $y = 0.0067 \times 0.0145$ ,  $R^2 = 0.999$ ) صورت پذیرفت. در نهایت میزان کارایی ریزپوشانی عصاره با استفاده از رابطه ۱ تعیین گردید:

رابطه ۱:

(%) کارایی ریزپوشانی = میزان کل عصاره انکپسوله شده / میزان کل عصاره اولیه  $\times 100$

جهت تعیین ظرفیت بارگذاری نانوذرات همانند روش کارائی ریز پوشانی نمونه‌ها آماده‌سازی شده و غلظت عصاره در بخش شناور بوسیله HPLC تعیین شد. میزان جذب در طول موج ۲۷۵ نانو متر قرائت و منحنی استاندارد رسم گردید. درصد عصاره بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان توسط فرمول شماره ۲ بدست آمد:

رابطه ۲

(%) ظرفیت بارگذاری = میزان کل عصاره انکپسوله شده / وزن نمونه  $\times 100$

(Tang *et al.*, 2013) (Dube *et al.*, 2010);

### ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

جهت آزمون DPPH، نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره با اتانول ۹۹٪، برای به دست آوردن غلظت نهایی ۰/۱-۱

میلی گرم بر میلی لیتر، با عصاره انگور مخلوط شده و نمونه ۴ ساعت در ۲۰۰ دور بر دقیقه جهت جداسازی عصاره از نانوذرات کیتوزان، توسط شیکر تکان داده شد. محلول با غلظت مشابه (۰/۱-۱) میلی گرم در میلی لیتر در اتانول ساخته شد (نمونه تهی) سپس به ۰/۳ میلی لیتر از عصاره (به صورت آزاد و انکپسوله) و نانو ذرات کیتوزان در اتانول ۲/۷، میلی لیتر محلول اتانولی ( $6 \times 10^{-5}$  mol / L) DPPH (اضافه گردید. پس از شیک شدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری و میزان جذب در ۵۱۷ نانومتر در برابر نمونه تهی با استفاده از دستگاه یو وی اسپکتروفوتومتر قرائت و هر مرحله با سه تکرار انجام پذیرفت. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول ۳ محاسبه می‌شود:

رابطه ۳

درصد مهار رادیکال‌های آزاد) = جذب نمونه تهی - جذب نمونه حاوی عصاره / جذب نمونه تهی  $\times 100$

(Ghaderi Ghahfarokhi *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2013).

### تهیه سوریمی

ماهی کیلکای معمولی (*Cultrientris*) دریای خزر، که جز صید روزانه بندر انزلی می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفت. انتخاب نمونه‌ها به صورت تصادفی (طول و وزن بین ۱۰-۷ سانتی‌متر) بود. نمونه‌ها پس از شستشو با آب تمیز، بلافاصله در جعبه یونولیت همراه با یخ به نسبت ۳ به ۱ از یخ و ماهی، به آزمایشگاه منتقل گردید. جهت تهیه سوریمی گوشت از استخوان جدا شده و توسط چرخ گوشت به صورت یکنواخت در آمده و با آب در حدود ۵ °C به نسبت ۳:۱، گوشت به آب، شستشو داده شده (سه مرحله) و ترکیب حاصله به مدت ۳ دقیقه به آرامی در آب ۱ ± ۴ °C هم زده می‌شود سپس توسط نایلون مشبک فیلتر می‌شود. خمیر حاصله، پس از پرس شدن و آبگیری، تبدیل به سوریمی می‌گردد. (Jeyakumari *et a l.*, 2016; Farokhzadeh *et al.*, 2020)

### آزمون‌های میکروبی

به منظور آماده سازی نمونه‌ها جهت کشت، ۲۵ گرم از نمونه سوریمی با ۲۲۵ میلی لیتر پپتون واتر استریل ۱٪ به

باکتری‌های گرم مثبت منتخب شامل:

*Listeria monocytogenes* (ATCC: 19119/PTCC: 1303)

*Staphylococcus aureus* (ATCC: 9144/PTCC: 1113)

*Bacillus cereus* (ATCC: 11778/PTCC: 1015)

کپک منتخب:

*Aspergillus niger* (ATCC: 1004/PTCC: 5154)

مخمر منتخب:

*Candida albicans* (ATCC: 10231/PTCC: 5027)

### – تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره آزاد

پس از فعال سازی باکتری‌ها توسط روش (Ghaderi) MIC و MBC عصاره آزاد از روش رقت سازی در چاهک استفاده گردید. رقت‌های مختلف عصاره در ۲۰۰۰-۱۰۰ (میلی گرم در میلی لیتر) آب مقطر تهیه و در ۱۹۸ میکرولیتر از محیط کشت BHI تلقیح شده و با سوبه‌های مورد نظر در دو سطح تلقیح ( $10^3$ - $10^6$  CFU/ml)، به چاهک‌ها انتقال یافت. در نهایت ۲ میکرولیتر از عصاره، به چاهک‌ها افزوده شد تا غلظت نهایی عصاره در چاهک‌ها به ۲۰۰۰-۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر برسد. چاهک‌های حاوی BHI و سوبه‌های مختلف جهت کنترل رشد در نظر گرفته شد و چاهک‌های حاوی BHI به تنهایی جهت کنترل سترون بودن محیط مد نظر قرار گرفت. پلیت‌ها در دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری و پس از این مدت نخستین چاهک فاقد کدورت به عنوان MIC در نظر گرفته شد. ۵ میکرو لیتر از چاهک‌های فاقد رشد به پلیت‌های BHI منتقل و در دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند و رشد سوبه‌های میکروبی بر روی محیط کشت جامد بررسی و حداقل غلظتی که در آن هیچ گونه رشدی مشاهده نشد، به عنوان MBC عنوان گردید. (Silva et al., 2020; Rasaei et al., 2016)

### – تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره ریز پوشانی شده

جهت تعیین فعالیت ضد میکروبی نانوذرات کیتوزان (با

خوبی مخلوط و در کیسه همزن استوماکر به مدت ۶۰ ثانیه به منظور همگن سازی قرار داده شد. رقت سازی به نسبت ۱:۱۰ انجام پذیرفت و جهت کشت هر سری از باکتری‌ها، در روزهای آزمایش، ۱ سی سی از آن به پلیت‌های کشت انتقال داده شده و پس از گرمخانه گذاری، تعداد کلونی‌ها شمارش شدند هر کشت با سه تکرار انجام و بر حسب لگاریتم CFU بر گرم نمونه گزارش گردید.

جهت شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل و سایکروفیل از محیط کشت پلیت کانت آگار (PCA) استفاده گردید و پس از کشت سطحی، جهت شمارش باکتری‌های مزوفیل، پلیت‌ها در  $37$ - $35^\circ\text{C}$  به مدت ۳۶ ساعت و جهت شمارش باکتری‌های سایکروفیل، پلیت‌ها در دمای  $7$ - $4^\circ\text{C}$  به مدت ۷ روز، گرمخانه گذاری شدند (Lambrianini et al., 2019, Hassanzade et al., 2018). جهت شمارش کلی باکتری‌های گروه سودوموناس از محیط کشت ستریمید آگار (CA) استفاده گردید و پلیت‌ها در دمای  $25^\circ\text{C}$  به مدت ۲ روز، گرمخانه گذاری شدند. (Maghami et al., 2019) جهت شمارش کلی مخمرها از محیط کشت انتخابی رز بنگال کلرامفنیکل آگار (RBCA) استفاده گردید که پس از کشت سطحی در دمای  $25^\circ\text{C}$  به مدت ۳-۵ روز گرمخانه گذاری شدند.

جهت شمارش کپک‌ها از روش کشت سطحی روی محیط کشت یست اکستراکت گلوکوز کرامفنیکل (YGC) استفاده گردید. ۰/۱ میلی لیتر روی سطح محیط کشت ریخته شده و با میله ی L شکل سترون کاملاً در سطح پلیت پخش شد. پلیت‌ها در دمای  $25^\circ\text{C}$  به مدت ۵ روز گرمخانه‌گذاری شدند. (Ghaderi Ghahfarokhi et al., 2016)

### – تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

گروه‌های باکتریایی بیماریزا مورد نظر از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه گردید. باکتری‌های منتخب گرم منفی شامل:

*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC: 27853/PTCC: 1430)

*Salmonella typhimurium* (ATCC: 14028/PTCC: 1709)

*Escherichia coli* (ATCC: 13706/PTCC: 1769)

تعیین اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره انگور ریزپوشانی شده در نانوذرات کیتوزان - تری پلی فسفات

## یافته‌ها

– **تعیین ترکیبات عصاره با استفاده از HPLC**  
با استفاده از دستگاه HPLC مقادیر غلظت اسیدهای فنلی موجود در عصاره انگور بر اساس میکروگرم بر گرم عصاره در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ - مقدار اسیدهای فنولیک در عصاره انگور  
Table 1- Concentration of phenolic acids in grape extract

Phenolic acid	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )
Gallic acid	10.329
Rotin	9.775
Resveratrol	5.645
Quercetin	15.309
Ellagic acid	43.608
Cafeic acid	9.989

## – تعیین محتوای فنلی

محتوای فنلی عصاره انگور در غلظت عصاره به کیتوزان ۰/۵ به ۱ به ترتیب:  $1/8 \pm 28/96$  میلی‌گرم بر گرم تعیین گردید.

## – ویژگی‌های فیزیکی نانوذرات

توزیع پروفایل حجمی اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان و نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره به ترتیب در نمودار ۱- a، ۱- b و نمودار ۲- a، ۲- b، مشاهده می‌شود. نانوذرات کیتوزان دارای قطر متوسط ۲۰۸ نانومتر و نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره ۱۷۷/۵ نانومتر می‌باشند. پتانسیل ذرات نانوکیتوزان  $36/2 +$  و نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره  $32/95 +$  میلی ولت می‌باشد. ضریب بس پاشیدگی نانوذرات کیتوزان  $0/360$  و نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره  $0/385$  تعیین گردید.

## – کارایی ریزپوشانی نانو ذرات و ظرفیت بارگذاری عصاره در نانوذرات کیتوزان

درصد کارایی ریزپوشانی  $48/95\%$  و میزان ظرفیت بارگذاری عصاره در نانوذرات کیتوزان،  $6/19\%$  تعیین گردید.

/ بدون) عصاره، از روش رقت سازی در لوله استفاده گردید. پس از تهیه بچ نانو ذرات در ۲۰ میلی لیتر از بافر نمکی ( $\text{pH} \sim 6/5$ ) و سانتیفریوژ، ذرات به حالت معلق در آمده و ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون نانوذرات به اولین لوله‌های حاوی ۲۵ میلی لیتر BHI اضافه و رقیق سازی متوالی تا حصول غلظت  $2/8 - 0/55$  برای نانو ذرات کیتوزان حاوی عصاره و  $3/25 - 0/655$  برای نانوذرات کیتوزان ادامه یافت. نهایتاً تلقیح لوله‌های حاوی نانوذرات با سوسپانسیون‌های میکروبی در شرایط سترون جهت حصول سطح تلقیح ( $10^3 - 10^6$  CFU/ml) صورت گرفت. لوله‌ها در  $37^\circ\text{C}$  و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شده و پس از آن MIC و MBC مشابه بخش قبل، برای نانوذرات تعیین گردید. (Ghaderi Ghahfarokhi *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2004)

## – تعیین محدوده بازدارندگی (IZ)

سوسپانسیون باکتری‌های مورد نظر به طور جداگانه با غلظت ( $10 - 10^8$  CFU/ml) در سویا آگار آماده و از محیط کشت مولر هیلتون آگار (MHA) استفاده گردید. حفره‌ای در حدود ۶ میلی متر بوسیله پاستور پیپت استریل در آگار ایجاد گردید و پس از قرار دادن قطره مولر هیلتون آگار سطح آن بسته شد. ۵۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده از باکتری‌ها در درون پلیت‌ها تلقیح گردیده و در دمای  $4^\circ\text{C}$  تا زمانی که مواد به طور کامل به داخل آگار نفوذ پیدا کند نگهداری شدند و پس از آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شدند. (Aliasghari *et al.*, 2016)

## – تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از نرم افزار SSPS (ver.19) و نرم‌افزار اکسل جهت رسم نرم‌افزار استفاده گردید. از تست Kolmogorov – Simirnov جهت نرمال سازی داده‌ها و سپس جهت تعیین معنی‌دار یا غیر معنی‌دار بودن تفاوت‌ها استفاده گردید. بین اعداد مربوط به هر شاخص و مقایسه میانگین تیمارها از تست Tukey و One – way آنالیز واریانس (ANOVA one – way) سطح ۵ درصد ( $p < 0.05$ ) استفاده گردید.

آن در روز نهم  $0/18 \pm 7/95$  مشاهده گردید. در نمونه سوریمی به همراه نانوذرات کیتوزان، مقادیر باکتری‌ها، از روز صفر تا روز نهم، افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0/15 \pm 4/28$  و بیشترین در روز نهم  $0/22 \pm 7/03$  تعیین گردید. در نمونه‌های سوریمی به همراه عصاره، از روز صفر تا روز نهم مقادیر باکتری‌ها روند افزایشی معنی‌داری را طی می‌کند ( $p < 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0/15 \pm 4/18$  و بیشترین آن در روز نهم  $0/21 \pm 6/99$  تعیین گردید. در نمونه‌های سوریمی به همراه نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره، مقدار باکتری‌ها افزایش معنی‌دار را از خود نشان دادند ( $p < 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0/19 \pm 4/29$  و بیشترین در روز نهم  $0/29 \pm 6/35$  بود.

### – تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

همانطور که در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره انگور  $32/8\%$ ، نانوذرات کیتوزان  $4/9\%$  و عصاره ریزپوشانی شده در نانوذرات کیتوزان  $42/1\%$  می‌باشد. عصاره انکپسوله شده در نانوذرات کیتوزان نسبت به عصاره آزاد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی تری از خود نشان می‌دهد.

### – تعیین باکتری‌های سرما دوست (سایکروفیل) در طی دوره نگهداری

همان طور که در جدول ۲ (a) نشان داده شده است، باکتری‌های سرما دوست در نمونه سوریمی، از روز صفر تا روز نهم روند افزایشی معنی‌داری را طی می‌کند ( $p < 0.05$ ) کمترین مقدار در روز صفر  $0/16 \pm 4/56$  و بیشترین مقدار

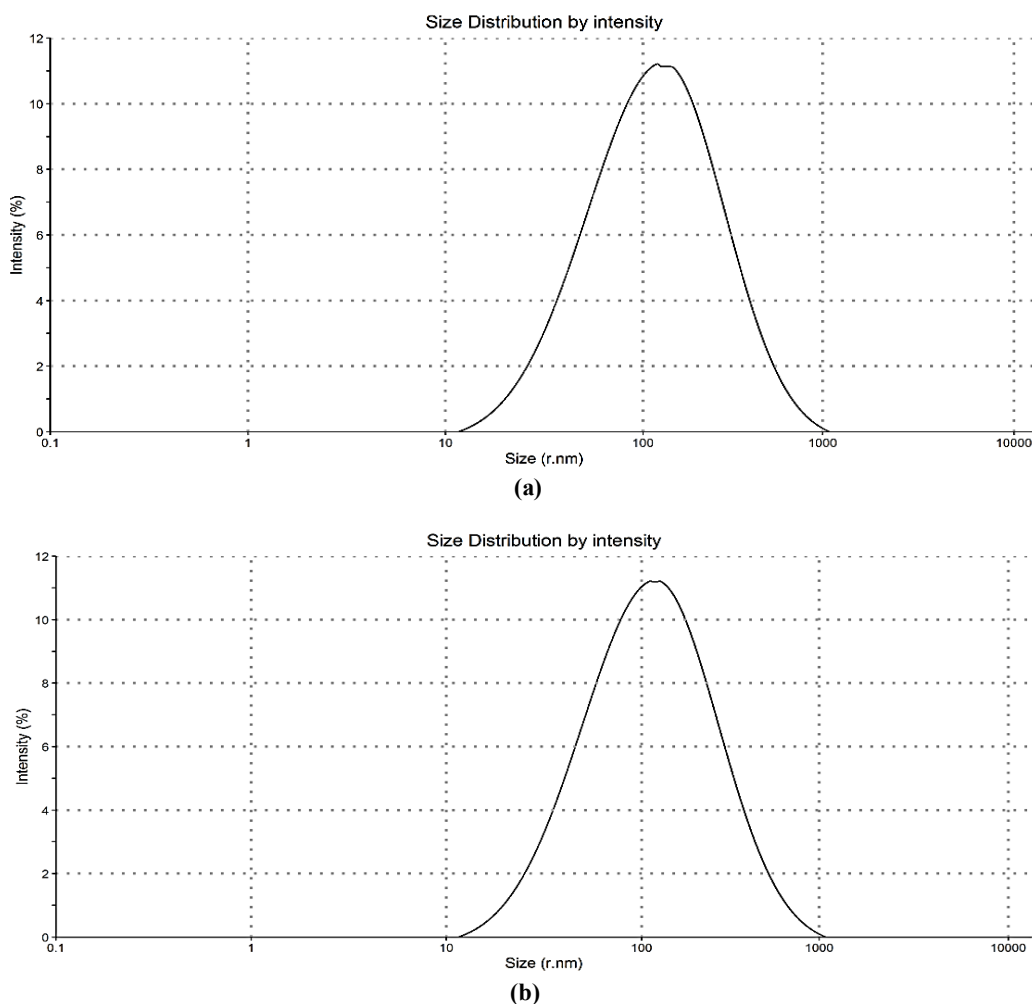
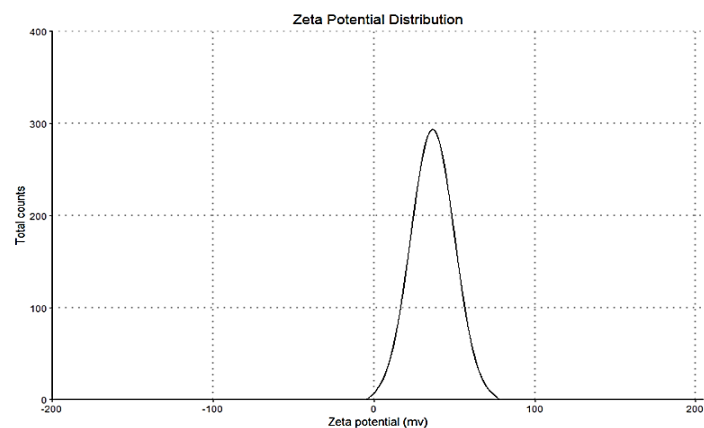


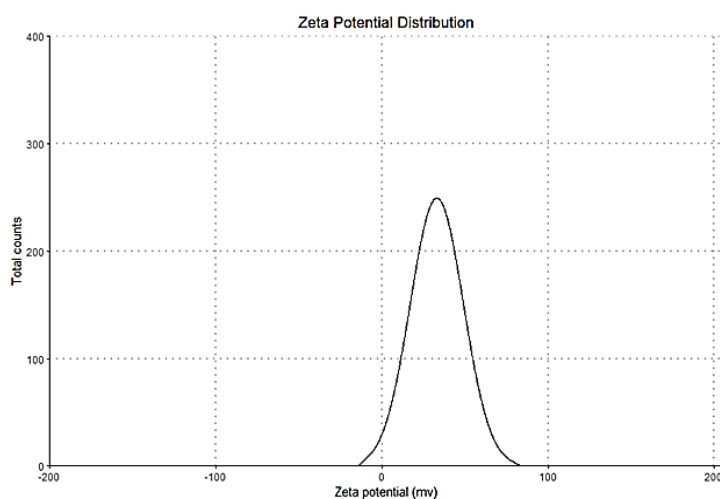
Figure 1 – size distribution intensity graphs of nano chitosan (a) and nano chitosan with extract (b)

نمودار ۱ – پروفایل توزیع حجمی اندازه ذرات نانوکیتوزان (a) و نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره (b)

تعیین اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره انگور ریزپوشانی شده در نانوذرات کیتوزان - تری پلی فسفات



(a)



(b)

Figure 2- Zeta potential distribution intensity of nano chitosan (a) and nano chitosan with extract (b)  
نمودار ۲ - پروفایل توزیع پتانسیل زتا در نانوکیتوزان (a) و نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره (b)

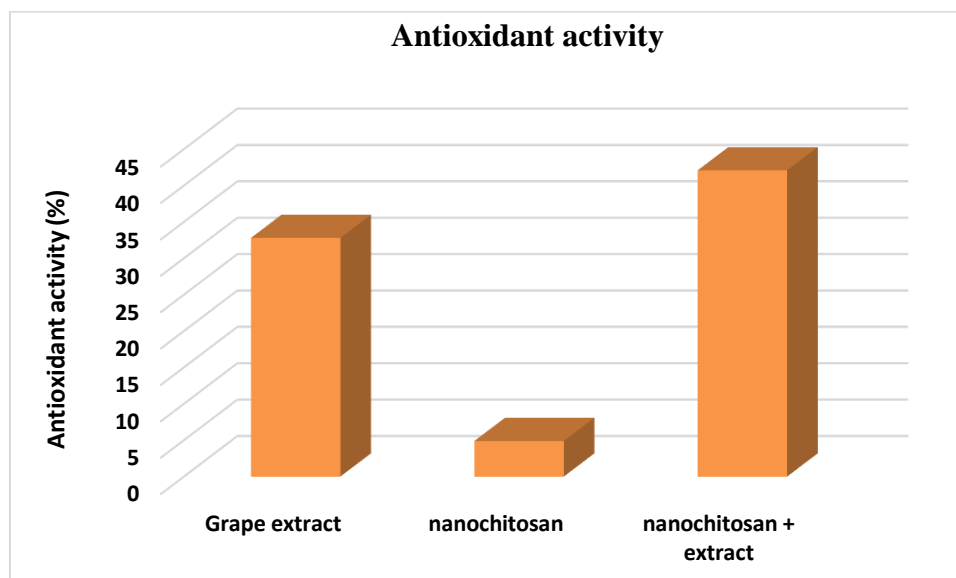


Figure 3 - Antioxidant activity of free grape extract, nano chitosan and nano chitosan with extract  
نمودار ۳ - میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در نانوذرات کیتوزان (با و بدون عصاره) و عصاره آزاد



معنی‌داری را طی کرد ( $p < 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0.27 \pm 0.09$  و در روز نهم  $0.14 \pm 0.41$  مشاهده گردید.

#### – شمارش کپک و مخمر در تیمارهای مختلف در طی دوره نگهداری در یخچال

همان طور که در جدول ۲ (d) نشان داده شده است، در خصوص نمونه‌های سوری می‌توان از روز صفر تا روز نهم افزایش معنی‌دار در جمعیت کپک‌ها و مخمرها رخ می‌دهد ( $p < 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0.15 \pm 0.46$  و بیشترین در روز نهم  $0.1 \pm 0.46$  مشاهده گردید. در مورد نمونه‌های سوری می‌توان از روز صفر تا روز نهم روند افزایش معنی‌داری دیده می‌شود. ( $p < 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0.51 \pm 0.4$  و بیشترین آن  $0.1 \pm 0.25$  تعیین گردید. در نمونه‌های سوری می‌توان عصاره، جمعیت کپک و مخمر از روز صفر تا روز نهم سیر افزایشی را طی می‌کند و این افزایش به صورت غیر معنی‌دار وجود دارد ( $p > 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0.3 \pm 0.63$  و بیشترین آن مربوط به روز نهم  $0.16 \pm 0.98$  وجود داشت. در نمونه‌های سوری می‌توان همراه نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره، جمعیت کپک و مخمر از روز صفر تا روز نهم تغییرات معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0.25 \pm 0.95$  و بیشترین در روز نهم  $0.26 \pm 0.45$  دیده شد.

#### – تعیین MIC و MBC و IZ در باکتری‌های منتخب گرم منفی

همان طور که در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است، در نمونه سوری می‌توان تغییرات MIC در بین باکتری‌های منتخب، به صورت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) و بالاترین باکتری *P. aeruginosa*  $0.99 \pm 0.33$  و کمترین باکتری *E. coli*  $0.45 \pm 0.8$  تعیین گردید. تغییرات MBC به صورت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) و بالاترین *E. coli*  $0.74 \pm 0.73$  و کمترین *P. aeruginosa*  $0.12 \pm 0.61$  می‌باشد. تغییرات IZ، به صورت غیر معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) و بالاترین مربوط به *S. tiphymurium*  $0.3 \pm 0.76$  و کمترین *E. coli*  $0.75 \pm 0.27$  بود.

#### – تعیین باکتری‌های میانه دوست (مزوفیل) در طی دوره نگهداری

همان طور که در جدول ۲ (b) قابل مشاهده می‌باشد، در نمونه سوری مقدار باکتری‌های مزوفیل از روز صفر تا روز نهم روند افزایشی معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ) که کمترین در روز صفر  $0.32 \pm 0.13$  و بیشترین در روز نهم  $0.51 \pm 0.43$  مشاهده گردید. در نمونه‌های سوری می‌توان نانوذرات کیتوزان، مقدار باکترها از روز صفر تا روز نهم افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند ( $p < 0.05$ ) که کمترین مربوط به روز صفر  $0.5 \pm 0.96$  و بیشترین در روز نهم  $0.15 \pm 0.93$  تعیین گردید. در نمونه‌های سوری می‌توان به همراه نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره، از روز صفر تا روز نهم افزایش معنی‌دار دیده شد ( $p < 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0.55 \pm 0.39$  و بیشترین مقدار آن در روز نهم  $0.27 \pm 0.18$  تعیین گردید. در مورد نمونه‌های سوری می‌توان عصاره، مقدار باکتری‌ها افزایش معنی‌داری را در طی دوره نگهداری نشان داد ( $p < 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0.36 \pm 0.08$  و بیشترین در روز نهم  $0.19 \pm 0.67$  تعیین گردید.

#### – شمارش باکتری‌های سودوموناس در طی دوره نگهداری در یخچال

همانطور که در جدول ۲ (c) نشان داده شده است، در نمونه سوری مقدار باکتری‌های سودوموناس، از روز صفر تا روز نهم افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ) کمترین مربوط به روز صفر  $0.46 \pm 0.19$  و بیشترین مقدار مربوط به روز نهم  $0.36 \pm 0.91$  تعیین گردید. در نمونه سوری می‌توان نانوذرات کیتوزان، از روز صفر تا روز نهم روند افزایشی معنی‌داری را طی کرد ( $p < 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0.38 \pm 0.52$  و بیشترین مقدار در روز نهم  $0.47 \pm 0.95$  تعیین گردید. در نمونه سوری می‌توان عصاره از روز صفر تا روز نهم افزایش معنی‌دار مشاهده گردید ( $p < 0.05$ ) کمترین در روز صفر  $0.31 \pm 0.75$  و بیشترین در روز نهم  $0.7 \pm 0.1$  مشاهده شد. در نمونه سوری می‌توان به همراه نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره، تغییرات در مقادیر سودوموناس از روز صفر تا روز نهم روند افزایشی

تعیین اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره انگور ریزپوشانی شده در نانوذرات کیتوزان - تری پلی فسفات

جدول ۲ - شمارش کلی باکتری‌های سرما دوست (a)، میانه دوست (b) سودوموناس (c) و کپک و مخمر (d) در روزهای مختلف آزمایش

Table 2 - Total count of Psychrophile (a), Mesophile (b), Pseudomonas (c) bacteria & Yeast and Mold (d) in differences treatments in exam's days

Treatments Day of exam	Surimi	Surimi + nanochitosan	Surimi + extract	Surimi + nanochitosan with extract
Day 0	4.56 ± 0.16 <sup>Ad</sup>	4.28 ± 0.15 <sup>Ad</sup>	4.18 ± 0.15 <sup>Ad</sup>	4.29 ± 0.19 <sup>Ac</sup>
Day 1	4.95 ± 0.1 <sup>Ac</sup>	4.78 ± 0.45 <sup>Ad</sup>	4.41 ± 0.25 <sup>Ad</sup>	4.56 ± 0.037 <sup>Ac</sup>
Day 3	5.60 ± 0.22 <sup>Ac</sup>	5.65 ± 0.22 <sup>Ac</sup>	5.64 ± 0.35 <sup>Ac</sup>	5.55 ± 0.25 <sup>Ab</sup>
Day 6	6.78 ± 0.5 <sup>Ab</sup>	6.85 ± 0.25 <sup>Ab</sup>	6.93 ± 0.07 <sup>Ab</sup>	5.9 ± 0.09 <sup>Bb</sup>
Day 9	7.95 ± 0.18 <sup>Aa</sup>	7.03 ± 0.22 <sup>Ba</sup>	6.99 ± 0.21 <sup>Ba</sup>	6.35 ± 0.29 <sup>Ca</sup>

(a)

Treatments Day of exam	Surimi	Surimi + nanochitosan	Surimi + extract	Surimi + nanochitosan with extract
Day 0	4.13 ± 0.32 <sup>Ac</sup>	3.96 ± 0.5 <sup>Ad</sup>	4.08 ± 0.36 <sup>Ac</sup>	3.93 ± 0.55 <sup>Ac</sup>
Day 1	5.06 ± 0.15 <sup>Ac</sup>	4.66 ± 0.28 <sup>Abd</sup>	4.85 ± 0.1 <sup>ABc</sup>	4.26 ± 0.37 <sup>Bbc</sup>
Day 3	6.9 ± 0.26 <sup>Ab</sup>	5.75 ± 0.25 <sup>Bc</sup>	5.9 ± 0.13 <sup>Bb</sup>	4.53 ± 0.42 <sup>Cabc</sup>
Day 6	7.31 ± 0.46 <sup>Ab</sup>	6.65 ± 0.3 <sup>Ab</sup>	6.7 ± 0.65 <sup>Ab</sup>	5.8 ± 1.17 <sup>Aab</sup>
Day 9	8.43 ± 0.51 <sup>Aa</sup>	7.93 ± 0.15 <sup>Aa</sup>	7.67 ± 0.19 <sup>Aa</sup>	6.18 ± 0.27 <sup>Ba</sup>

(b)

Treatments Day of exam	Surimi	Surimi + nanochitosan	Surimi + extract	Surimi + nanochitosan with extract
Day 0	4.19 ± 0.46 <sup>Ad</sup>	3.52 ± 0.38 <sup>Ad</sup>	3.75 ± 0.31 <sup>Ac</sup>	3.09 ± 0.27 <sup>Ac</sup>
Day 1	4.86 ± 0.85 <sup>Ac</sup>	3.65 ± 0.31 <sup>Ad</sup>	3.86 ± 0.22 <sup>Ac</sup>	3.56 ± 0.5 <sup>Abc</sup>
Day 3	6.11 ± 0.24 <sup>Abc</sup>	5.2 ± 0.27 <sup>Bc</sup>	5.37 ± 0.34 <sup>Abb</sup>	4.48 ± 0.47 <sup>Bab</sup>
Day 6	7.01 ± 0.12 <sup>Ab</sup>	7.65 ± 0.75 <sup>Ab</sup>	6.5 ± 0.52 <sup>Ab</sup>	5.1 ± 0.1 <sup>Bb</sup>
Day 9	8.91 ± 0.36 <sup>Aa</sup>	8.95 ± 0.47 <sup>Aa</sup>	8.1 ± 0.7 <sup>Aa</sup>	5.41 ± 0.14 <sup>Ba</sup>

(c)

Treatments Day of exam	Surimi	Surimi + nanochitosan	Surimi + extract	Surimi + nanochitosan with extract
Day 0	2.46 ± 0.15 <sup>Ad</sup>	2.4 ± 0.51 <sup>Ac</sup>	2.63 ± 0.3 <sup>Ac</sup>	1.95 ± 0.25 <sup>Bb</sup>
Day 1	2.18 ± 0.12 <sup>Ad</sup>	2.75 ± 0.32 <sup>ABbc</sup>	2.65 ± 0.45 <sup>ABc</sup>	1.96 ± 0.25 <sup>Bb</sup>
Day 3	3.31 ± 0.17 <sup>Ac</sup>	3.16 ± 0.38 <sup>Aabc</sup>	3.1 ± 0.25 <sup>Ac</sup>	2.08 ± 0.18 <sup>Bb</sup>
Day 6	3.81 ± 0.17 <sup>Ab</sup>	3.58 ± 0.48 <sup>Ab</sup>	3.56 ± 0.25 <sup>Ab</sup>	2.13 ± 0.18 <sup>Bb</sup>
Day 9	4.46 ± 0.1 <sup>Aa</sup>	4.25 ± 0.1 <sup>Aa</sup>	3.98 ± 0.16 <sup>Ba</sup>	2.45 ± 0.26 <sup>Ca</sup>

(d)

Means with differences small letters in the same column represent significant differences at days of exams ( $p < 0.05$ ) and Capital letters in the same row indicate significant differences at treatments ( $p < 0.05$ )

در نمونه‌های سوریمی حاوی نانوذرات کیتوزان، MIC تغییرات معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) را نشان داد. کمترین مقدار *E. coli*  $0.16 \pm 0.03$  و بیشترین آن مربوط به *P. aeruginosa*  $0.36 \pm 0.05$  می‌باشد. تغییرات MBC، *S. typhimurium*  $0.14 \pm 0.06$  و کمترین *E. coli*، به مقدار  $0.14 \pm 0.06$  بود. تغییرات IZ، غیر معنی‌دار و ( $P > 0.05$ ) بیشترین *P. aeruginosa*  $1.35 \pm 1.11$  و کمترین به *E. coli*  $1.53 \pm 0.9$  تعلق داشت.

در نمونه‌های سوریمی به همراه نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره، تغییرات MIC، تغییرات غیر معنی‌دار *S. typhimurium* ( $P > 0.05$ ) و بیشترین مقدار MIC، در *S. typhimurium*  $1.15 \pm 0.25$  و کمترین مقدار آن مربوط به

در نمونه‌های سوریمی حاوی نانوذرات کیتوزان، MIC تغییرات معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) را نشان داد. کمترین مقدار *E. coli*  $0.62 \pm 0.185$  و بیشترین آن مربوط به *P. aeruginosa*  $0.36 \pm 0.05$  می‌باشد. تغییرات MBC، *S. typhimurium*  $0.75 \pm 0.33$  و کمترین آن *E. coli*  $0.12 \pm 0.48$  می‌باشد. تغییرات IZ، به صورت غیر معنی‌دار ( $P > 0.05$ ) و بالاترین در *P. aeruginosa*  $2.08 \pm 0.12$  و پایین‌ترین در *S. typhimurium*  $0.16 \pm 1.0$  مشاهده گردید.

در نمونه‌های سوریمی حاوی عصاره، تغییرات MIC،

تغییرات IZ، غیر معنی‌دار ( $P>0.05$ ) و بیشترین  $P. aeruginosa$   $14/73 \pm 0/75$  و کمترین مقدار در  $S. typhimurium$   $13/2 \pm 1/12$  می‌باشد.

$P. aeruginosa$   $0/94 \pm 0/15$  می‌باشد. تغییرات MBC  $P. aeruginosa$  غیر معنی‌دار ( $p>0.05$ ) و بیشترین  $E. coli$   $1/4 \pm 0/42$  و کمترین  $2/03 \pm 0/3$

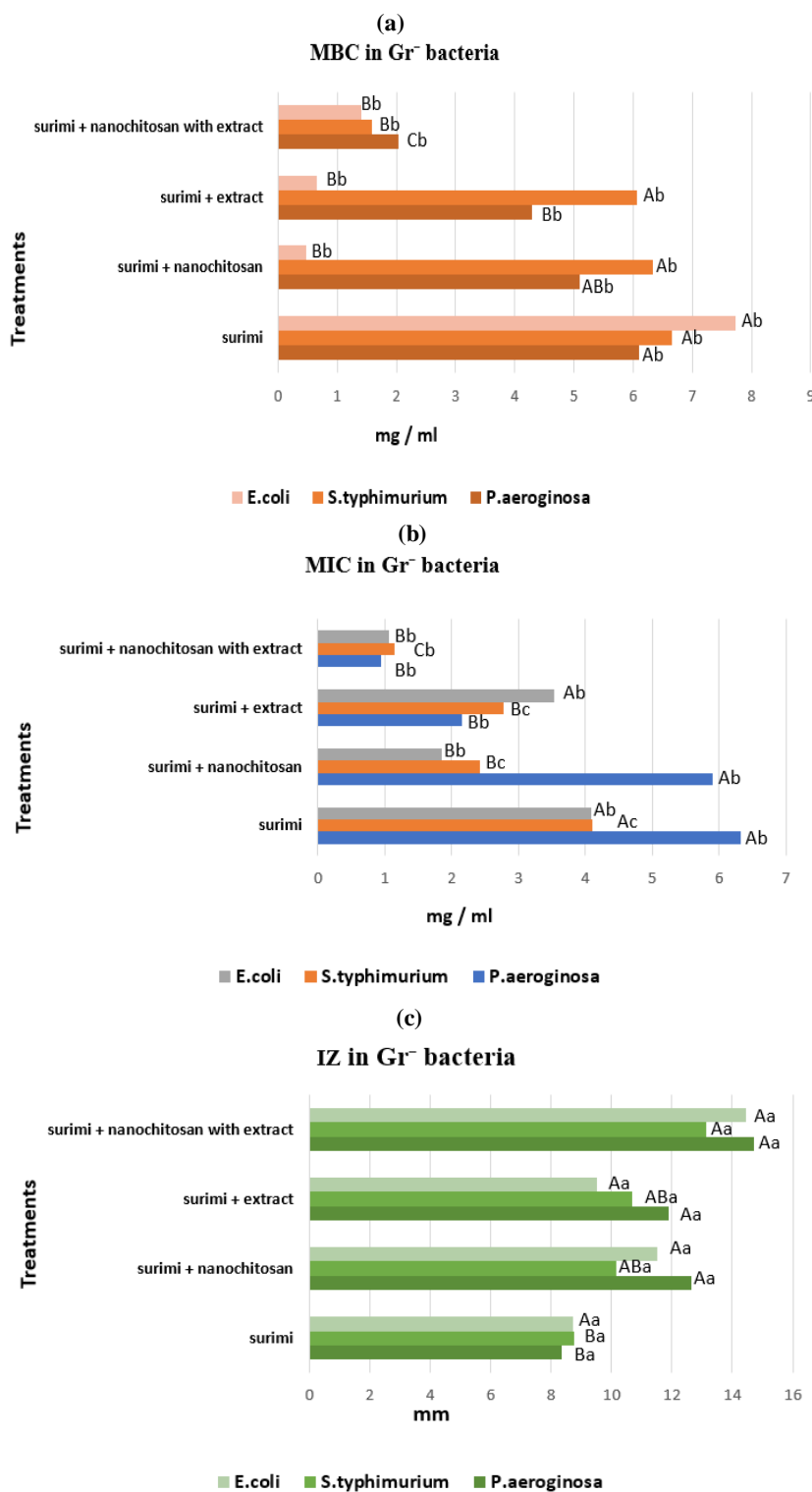


Figure 4- MIC (a), MBC (b), IZ (c) in selected Gr<sup>-</sup>bacteria in differences treatments in exam's days

نمودار ۴- مقادیر MIC (a)، MBC (B)، IZ (C) در باکتری‌های منتخب گرم منفی طی دوره نگهداری

Means with differences small letters in the same column represent significant differences at days of exams ( $p<0.05$ ) and capital letters in the same row indicate significant differences at treatments ( $p<0.05$ )

تعیین اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره انگور ریزپوشانی شده در نانوذرات کیتوزان - تری پلی فسفات

- تعیین MIC و MBC و IZ در باکتری‌های منتخب گرم مثبت همان طور که در نمودار شماره ۵ نشان داده شده است، در نمونه سوریمی تغییرات MIC معنی دار ( $p < 0.05$ ) و بیشترین در *S.aureus*  $0.2 \pm 0.172$  و کمترین *L.monocytogenes*  $0.1 \pm 0.06$  تعیین گردید. تغییرات MBC، غیر معنی دار ( $p > 0.05$ ) و بیشترین *L.monocytogenes*  $0.1 \pm 0.03$  می باشد. تغییرات IZ، غیر معنی دار ( $p > 0.05$ ) کمترین *L.monocytogenes*  $2.37 \pm 18.83$  و بیشترین *B.cereus*  $1.06 \pm 20.56$  می باشد.

#### - تعیین MIC/ MBC/ IZ توسط A.niger در تیمارهای مختلف تحقیق

همان طور که در نمودار شماره ۶ نشان داده شده است، در نمونه سوریمی در *A.niger* مقادیر MIC، MBC و IZ به ترتیب:  $0.16$ ،  $0.1 \pm 0.043$  و  $0.55 \pm 12.66$  و در نمونه سوریمی حاوی نانوذرات کیتوزان به ترتیب:  $0$ ،  $0$  و  $1.63 \pm 14.9$  و در نمونه سوریمی عصاره، به ترتیب  $0.13$ ،  $0.1 \pm 0.027$  و  $1.8 \pm 14.76$  و در نمونه سوریمی به همراه نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره به ترتیب:  $0$ ،  $0$  و  $1.6 \pm 18.36$  می باشد.

#### - تعیین MIC/ MBC/ IZ در C.albicans در تیمارهای مختلف تحقیق

همان طور که در نمودار شماره ۷ نشان داده شده است، در نمونه سوریمی در *C. albicans* مقادیر MIC، MBC و IZ به ترتیب:  $0.05$ ،  $0.11$  و  $0.5 \pm 12.5$  در نمونه سوریمی حاوی نانوذرات کیتوزان به ترتیب:  $0.02$ ،  $0.05$  و  $0.76 \pm 13.33$  و در نمونه سوریمی عصاره به ترتیب:  $0.03$ ،  $0.07$  و  $0.4 \pm 14.13$  و در نمونه سوریمی به همراه نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره به ترتیب:  $0.02$ ،  $0.03$  و  $0.85 \pm 16.7$  می باشد.

#### بحث

بالاترین مقدار اسیدهای فنولیک موجود در عصاره انگور مربوط به الازیک اسید و کمترین میزان آن مربوط به رسوراترول می باشد که با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی دارد. علاوه بر اسیدهای فنولیک، سایر ترکیبات

#### - تعیین MIC و MBC و IZ در باکتری‌های منتخب گرم مثبت

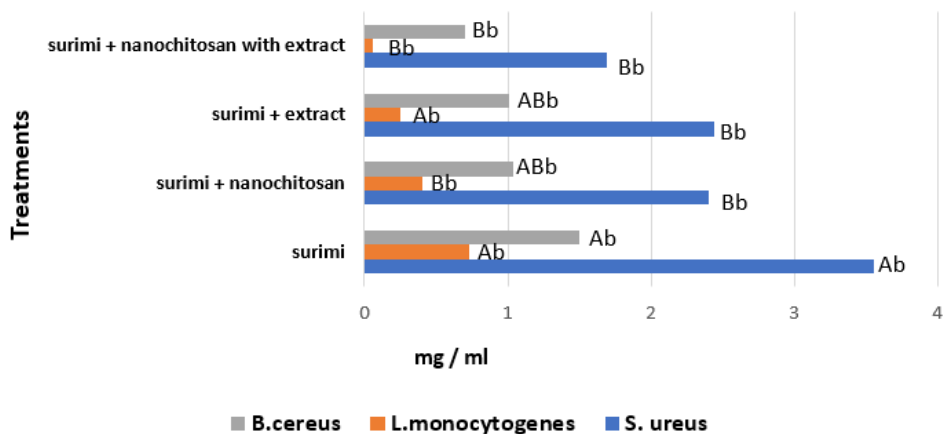
همان طور که در نمودار شماره ۵ نشان داده شده است، در نمونه سوریمی تغییرات MIC معنی دار ( $p < 0.05$ ) و بیشترین در *S.aureus*  $0.68 \pm 3.56$  و کمترین در *L.monocytogenes* به مقدار  $0.08 \pm 0.73$  مشاهده گردید. تغییرات MBC، غیر معنی دار ( $p > 0.05$ ) و بیشترین در *S.aureus*  $0.22 \pm 2.67$  و کمترین آن در *B.cereus* به مقدار  $0.05 \pm 0.74$  می باشد. تغییرات IZ، غیر معنی دار ( $P > 0.05$ ) و بیشترین در *B.cereus*  $1.15 \pm 11.8$  و کمترین در *S. aureus*  $1.75 \pm 10.23$  می باشد. در نمونه‌های سوریمی حاوی نانوذرات کیتوزان، تغییرات MIC، غیر معنی دار ( $p > 0.05$ ) و بیشترین در *S. aureus*  $0.36 \pm 2.4$  و کمترین مقدار در *L. monocytogenes*  $0.1 \pm 0.4$  می باشد. تغییرات MBC، غیر معنی دار ( $p > 0.05$ ) و بیشترین در *S.aureus*  $0.26 \pm 2.6$  و کمترین در *L. monocytogenes*  $0.2 \pm 0.35$  می باشد. تغییرات IZ، غیر معنی دار ( $p > 0.05$ ) بیشترین *B.cereus*  $1.75 \pm 17.33$  و کمترین در *L.monocytogenes*  $3.89 \pm 11.04$  تعیین گردید.

در نمونه‌های سوریمی حاوی عصاره، تغییرات MIC، غیر معنی دار ( $p > 0.05$ ) و بیشترین *S. aureus*  $0.5 \pm 2.44$  و کمترین *L. monocytogenes*  $0.13 \pm 0.25$  تعیین گردید. تغییرات MBC، غیر معنی دار ( $p > 0.05$ ) و بیشترین *S. aureus*  $0.15 \pm 1.33$  و کمترین مقدار آن مربوط به *B. cereus*  $0.1 \pm 0.55$  می باشد. تغییرات IZ، غیر معنی دار ( $p > 0.05$ ) و بیشترین *L. monocytogenes*  $2.53 \pm 15.4$  و کمترین آن مربوط به *B. cereus*  $2.94 \pm 13.53$  می باشد.

در نمونه‌های سوریمی به همراه نانو ذرات حاوی عصاره، تغییرات MIC، غیر معنی دار ( $p > 0.05$ ) و بیشترین *S.aureus*  $0.17 \pm 1.69$  و کمترین

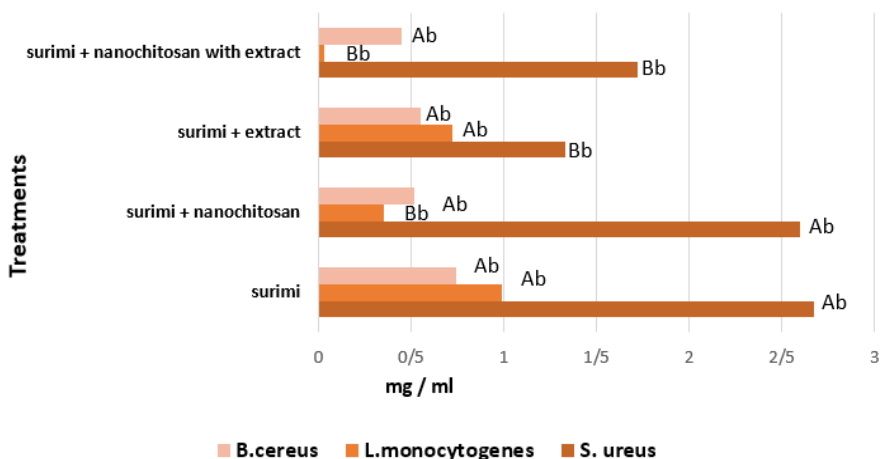
(a)

MIC in Gr<sup>+</sup> bacteria



(b)

MBC in Gr<sup>+</sup> bacteria



(c)

IZ in Gr<sup>+</sup> bacteria

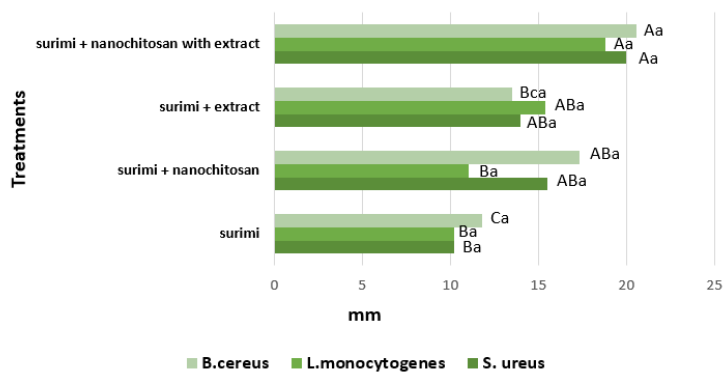


Figure 5- MIC (a), MBC (b), IZ (c) in selected Gr<sup>+</sup> bacteria in difference treatments in exam's days

نمودار ۵ - مقادیر MIC (a)، MBC (b)، IZ (c) در باکتری‌های منتخب گرم مثبت طی دوره نگهداری

Means with difference small letters in the same column represent significant difference at days of exams ( $p < 0.05$ ) and Capital letters in the same row indicate significant difference at treatments ( $p < 0.05$ )

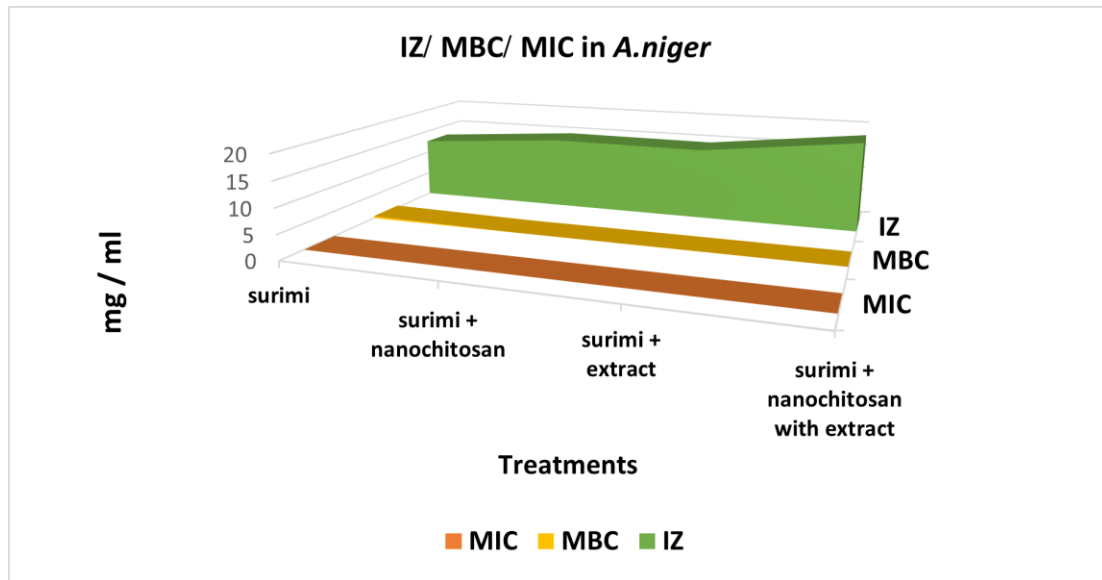


Figure 6- MIC, MBC and IZ (c) in *A.niger* on different treatments in exam's days  
نمودار ۶ - مقادیر MIC، MBC، IZ در تیمارهای متفاوت در روزهای مختلف آزمایش

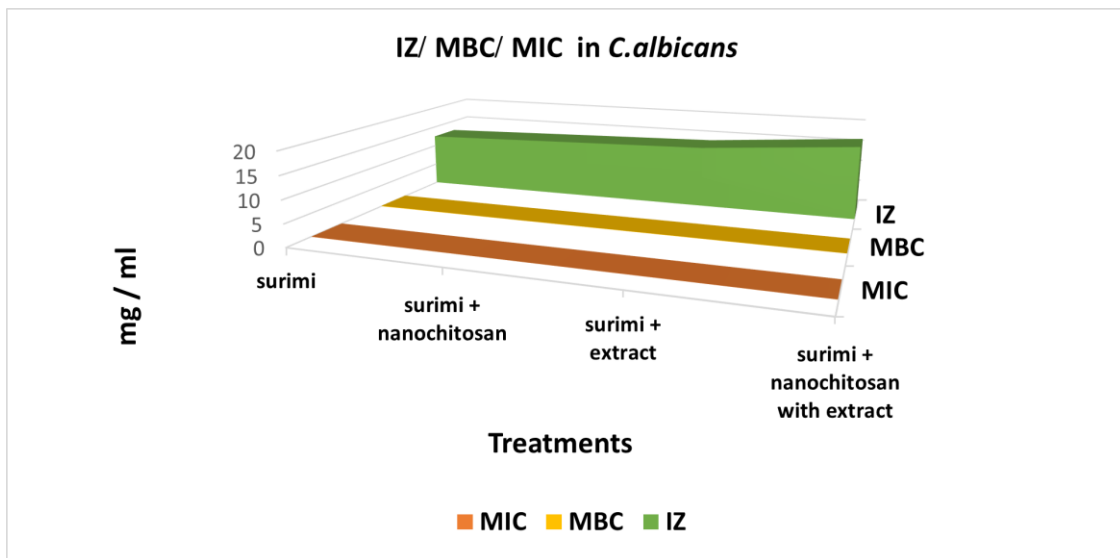


Figure 7- MIC, MBC and IZ(c) in *C.albicans* on different treatments in exam's days  
نمودار ۷ - مقادیر MIC، MBC، IZ در تیمارهای متفاوت در روزهای مختلف آزمایش

در ریزپوشانی عصاره پوسته سبز پسته در نانوذرات کیتوزان، محتوای فنلی عصاره را  $10 \pm 0.05$  میلی گرم بر میلی لیتر گزارش کردند. (Roostae et al., 2017) در ریز پوشانی عصاره پوست انار و پرتقال در نانوذرات کیتوزان، محتوای فنلی عصاره پوست انار و پوست پرتقال را به:  $0.364 \pm 0.1$  و  $0.350 \pm 0.064$  mg TAE/g گزارش کردند. (Silva et al., 2020)

فنولی در عصاره انگور موجود می باشد که در مقادیر آن ها در مبحث محتوای کل فنولی تاثیر گذار می باشد. تفاوت در مقادیر اسیدهای فنولیک در مطالعات مختلف می تواند به دلیل اختلاف در شرایط آب و هوایی، شرایط کشت، زمان برداشت، شرایط و مدت نگهداری انواع گونه های انگور باشد. (Silva et al., 2020)

سلولهای میکروبی باشد که اجازه می‌دهند تراوش (چکه) اجزای داخل سلولی ایجاد شود. (Jeyakumari *et al.*, 2016)

کمیسیون بین المللی ویژه برای مواد غذایی، برای ماهی تازه و محصولات دریایی میزان اولیه باکتری‌ها، بالای  $7 \log \text{CFU/g}$  را حد غیر قابل پذیرش دانست. (Lambridini *et al.*, 2019)

از جمله دلایلی که سودوموناس در آلودگی‌های مواد غذایی دارای اهمیت می‌باشد این است که سودوموناس دارای ویژگی‌های لیپولیتیک و پروتئولیتیک است که باعث ایجاد عطر و طعم نامطلوب در محصولات گوشتی در نتیجه تخریب پروتئین و چربی‌ها که به صورت لعابی سطح محصول را در بر می‌گیرد، می‌باشد. (Rezaeian *et al.*, 2021)

حد استاندارد باکتری‌های مزوفیل تا  $7 \log \text{CFU/g}$  می‌باشد. (Alves *et al.*, 2018; Maghami *et al.*, 2019) حد مجاز درخصوص محصولات بازسازی شده حد مجاز قابل پذیرش میزان  $5 \log \text{CFU/g}$  می‌باشد (Hajji *et al.*, 2019) و برای این محصولات بازسازی شده طی نگهداری در یخچال در هفت روز بین  $3/5 \log \text{CFU/g}$  -  $3/02 \log \text{CFU/g}$  قابل پذیرش می‌باشد. (Jeyakumari *et al.*, 2016)

مقادیر MIC و MBC در باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی اثرات ضد میکروبی بالاتری را از خود نشان دادند زیرا غشا خارجی باکتری‌های گرم مثبت که شامل لیپو پلی ساکاریدها هستند و دارای گروه‌های فسفات و پیروفسفات می‌باشند، باعث انتقال شارژ منفی سطح سلول شده و می‌توانند به زنجیره کاتیونی پلی مر کیتوزان اتصال پیدا کرده و واکنش الکترو استاتیک بالاتری از باکتری‌های گرم منفی را ایجاد کنند. از دیگر دلایل اثرات ضد باکتریایی بالاتر عصاره‌های فنولی در برابر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، می‌توان به ماهیت هیدروفوبیک ساختار غشا خارجی لیپوپلی ساکاریدی باکتری‌های گرم منفی اشاره کرد که آزاد سازی ترکیبات

جهت پایداری فیزیکی نانو سوسپانسیون توسط، صرفاً، دافعه الکترواستاتیک، حداقل پتانسیل زتای  $30 \pm$  میلی ولت نیاز است است. (Zarei *et al.*, 2015) پتانسیل زتای مثبت باعث بالا بردن پایداری نانو ذرات می‌شود و از تراکم (تجمع) آنها جلوگیری کرده و از چسبندگی زیستی به خوبی پیشگیری می‌کند. (Dube *et al.*, 2010)

PDI بین  $0/1$  تا  $0/25$  توزیع یکنواخت نانوذرات و بالاتر از  $0/5$  توزیع غیر یکنواخت آنها را نشان می‌دهد. (Cho *et al.*, 2013)

کارایی ریز پوشانی مبتنی بر میزان اولیه عصاره می‌باشد که می‌تواند در درون نانوذرات کیتوزان به تله بیفتد. کارایی ریزپوشانی عصاره به نسبت کیتوزان به عصاره در نمونه مرتبط است. یکی از دلایل بالا نبودن کارایی ریز پوشانی، اشباع شدن عصاره در بارگذاری نانوذرات کیتوزان است، بنابراین مازاد عصاره به سختی توسط سطح جذب می‌شود و به راحتی در طی سانتیفریوژ نانوذرات حاوی عصاره جدا می‌شود. (Ghaderi Ghahfarokhi *et al.*, 2016) همچنین در رابطه با عصاره در عمل، با محدودیت در ریزپوشانی مواجه هستیم Keawchaoon & Yoksan 2011. و Dube *et al.*, 2010 و Haider *et al.*, 2017 و Yoksan *et al.*, 2010 نتایج مشابهی را گزارش کردند.

بهبود در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را می‌توان اینگونه توضیح داد که پس از به تله افتادن عصاره در نانو ذرات کیتوزان بدلیل حضور بیشتر مقادیر عصاره، قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. (Ghaderi Ghahfarokhi *et al.*, 2016)

فعالیت آنتی‌اکسیدانی زنجیره‌های کیتوزان مربوط به گروه‌های هیدروکسیل و آمینو می‌باشد که می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش نشان دهند. این فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دلیل اتصال عرضی گروه‌های آمینو با پلی‌آنیون‌های TPP می‌باشد. (Rassaei *et al.*, 2016)

اثرات ضد میکروبی کیتوزان می‌تواند مربوط به برهمکنش الکترواستاتیک بین بار مثبت گروه  $\text{NH}_3^+$  مونومر گلوکز آمین مولکول‌های کیتوزان و شارژ منفی غشا

<http://dorl.net/dor/20.1001.1.20088787.1400.1.8.121.5.9> [In Persian]

Ahmed, F., Soliman, F. M., Adly, M. A., Soliman, H. A., El-Matbouli, M. & Saleh, M. (2020). In vitro assessment of the antimicrobial efficacy of chitosan nanoparticles against major fish pathogens and their cytotoxicity to fish cell lines. *Journal of Fish Diseases*, 43(9), 1049-1063. <https://doi.org/10.1111/jfd.13212>

Aliasghari, A., Khorasgani, M. R., Vaezifar, S., Rahimi, F., Younesi, H. & Khoroushi, M. (2016). Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic streptococci: An in vitro study. *Iranian Journal of Microbiology*, 8(2), p.93. <http://ijm.tums.ac.ir/>

Alves, V. L., Rico, B. P., Cruz, R. M., Vicente, A. A., Khmelinskii, I. & Vieira, M. C. (2018). Preparation and characterization of a chitosan film with grape seed extract-carvacrol microcapsules and its effect on the shelf-life of refrigerated Salmon (*Salmo salar*). *Lwt- Food Science and Technology*, 89, 525-534. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.013>

Amorati, R., Foti, M. C. & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(46), 10835-10847. <https://doi.org/10.1021/jf403496k>

Chandrasekaran, M., Kim, K. D. & Chun, S. C. (2020). Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: A review. *Processes*, 8(9), 1173. <https://doi.org/10.3390/pr8091173>

Cho, E. J., Holback, H., Liu, K. C., Abouelmagd, S. A., Park, J. & Yeo, Y. (2013). Nanoparticle characterization : state of the art, challenges, and emerging technologies. *Molecular pharmaceutics*, 10(6), 2093-2110. <https://doi.org/10.1021/mp300697h>

Dube, A., Ng, K., Nicolazzo, J. A. & Larson, I. (2010). Effective use of reducing agents and nanoparticle encapsulation in stabilizing catechins in alkaline solution. *Food Chemistry*, 122(3), 662-667. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.027>

Fakharzadeh, M. E., Haghghi, M., Sharifrouhani, M., Sharifpoor, I. & Hamidi, M. (2020). An In vitro and in vivo study on antimicrobial activity of *Origanum vulgare* extract and its nano form against *Streptococcus iniae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19 (5),

ضد میکروبی را در فضای داخلی میکروارگانیزم کاهش می‌دهد. (Shahbazi & Shaveisi, 2018)

اندازه منطقه بازدارندگی در دیسک حاوی کیتوزان در مقایسه با دیسک حاوی نانوکیتوزان، کمتر بود. زمانی که کیتوزان تنها حل شونده در محیط اسیدی است، پس از افزودن سوسپانسیون باکتریایی، رسوب محلول کیتوزان در اسید استیک رخ می‌دهد، در حالیکه کیتوزان به فرم نانوذرات به خوبی و یکنواخت در سوسپانسیون باکتریایی بعد از شوک خفیف انتشار می‌یابد. (Qi et al., 2004) هر چه نسبت کیتوزان به TPP افزایش یابد، مقدار MBC نیز افزایش می‌یابد. (Aliasghari et al., 2016; Hajji et al., 2019)

## نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، زمانی که عصاره انگور در نانوذرات کیتوزان بارگذاری می‌گردد نسبت به ژل نانوکیتوزان و عصاره آزاد اثرات مهارکنندگی بالاتری را در مقابل رادیکال‌های آزاد از خود نشان می‌دهد و زمانی که در نمونه‌های سوریمی استفاده می‌شود، سبب کاهش سرعت فساد میکروبی در انتهای دوره نگهداری در دمای یخچال می‌شود. لذا با توجه به یافته‌های ذکر شده استفاده از نانوذرات کیتوزان حاوی عصاره انگور می‌تواند بعنوان نگهدارنده طبیعی در سوریمی کیلکا مورد استفاده قرار بگیرد.

۶۴

## منابع

Abdeltwab, W. M., Abdelaliem, Y. F., Metry, W. A. & Eldeghedy, M. (2019). Antimicrobial effect of chitosan and nano-chitosan against some pathogens and spoilage microorganisms. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 10(1), 8-15. <https://e-journal.sospublication.co.in/>

Abdolahi-Cheleh bary, Z., Latifi, Z., Mourki, N. & Khoshkhou, J. (2022). Huso fillet preservation with coating contained *Spirulina* algae extract at  $4 \pm 1$  °C. *Iranian Journal of Food Science and Technology. JFST No. 121, Vol. 18.*



pp.2454-2463.

<https://doi.org/10.22092/ijfs.2020.122452>

Ghaderi Ghahfarokhi, M. Barzegar, M. Sahari, M. A., & Azizi, M. H. (2016). Enhancement of thermal stability and antioxidant activity of thyme essential oil by encapsulation in chitosan nanoparticles. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(7), 1781-1792. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807073.2016.18.7.20.0>

Gibis, M., Rahan, N. & Weiss, J. (2013). Physical and Oxidative Stability of Uncoated and Chitosan-Coated Liposoma Containing Grape Seed Extract. *Journal of Pharmaceutics*, 5, 421-433. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5030421>

Haider, J., Majeed, H., Williams, P. A., Safdar, W. & Zhong, F. (2017). Formation of chitosan nanoparticles to encapsulate krill oil (*Euphausia superba*) for application as a dietary supplement. *Food Hydrocolloids*, 63, 27-34.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.020>

Hajji, S., Hamdi, M., Boufi, S., Li, S. & Nasri, M. (2019). Suitability of chitosan nanoparticles as cryoprotectant on shelf life of restructured fish surimi during chilled storage. *Cellulose*, 26(11), 6825-6847. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02555-1>

Hassanzadeh, P., Moradi, M., Vaezi, N., Moosavy, M. H. & Mahmoudi, R. (2018). Effects of chitosan edible coating containing grape seed extract on the shelf-life of refrigerated rainbow trout fillet. In *Veterinary Research Forum (Vol. 9, No. 1, p. 73)*. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Downloads/vrf.iranjournals.ir>

Hu, Z. & Gänzle, M. G. (2019). Challenges and opportunities related to the use of chitosan as a food preservative. *Journal of Applied Microbiology*, 126(5), pp.1318-1331. <https://doi.org/10.1111/jam.14131>

Isamaleki, Z., Muraki, N., Khoshkhou, Zh. & Moini, S. (2020). Effect of (*Satureja hortensis*) on Shelf life of fish (*Scomberomorus guttatus*) in Cold Storage. *Journal of Animals Environments* .12 (1): spring 2020. <https://doi.org/10.22034/aej.2020.105136>. [In Persian]

Jeyakumari, A., Ninan, G., Joshy, C. G., Parvathy, U., Zynudheen, A. A. & Lalitha, K.

V. (2016). Effect of chitosan on shelf life of restructured fish products from pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) surimi during chilled storage. *Journal of Food science and Technology*, 53(4), 2099-2107. <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs13197-016-2174-3>

Keawchaon, L. & Yoksan, R. (2011). Preparation, characterization and in vitro release study of Carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. 2011. *J. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84, 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.031>

Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H. & Torronen, A.R. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf062897a>

Lambrianidi, L., Savvaidis, I. N., Tsiraki, M. I. & El-Obeid, T. (2019). Chitosan and oregano oil treatments, individually or in combination, used to increase the shelf life of vacuum-packaged, refrigerated European eel (*Anguilla anguilla*) fillets. *Journal of food protection*, 82(8), 1369-1376. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-050>

Maghami, M., Motalebi, A. A. & Anvar, S. A. A. (2015). Influence of chitosan nanoparticles and fennel essential oils (*Foeniculum vulgare*) on the shelf life of Huso huso fish fillets during the storage. *Food science & nutrition*, 7(9), 3030-3041. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1161>

Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K. & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities—Potentials and challenges. *Food Control*, 47, pp.381-391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023>

Puligundla, P., Mok, C., Ko, S., Liang, J. & Recharla, N. (2017). Nanotechnological approaches to enhance the bioavailability and therapeutic efficacy of green tea polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 34, 139-151. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.023>

Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. & Zou, X. (2004). Preparation and antimicrobial activity of chitosan nanoparticles. *Journal of Carbohydrate Research* 339:2693-2700. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.09.007>

- Rajaei, A., Barzegar, M., Hamidi, Z. & Sahari, M. A. (2010). Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from pistachio (*Pistachia vera*) green hull through response surface method. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12, 605-615.  
<http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807073.2010.12.5.9.3>
- Rasaee, I., Ghannadnia, M. & Honari, H. (2016). Antibacterial properties of biologically formed chitosan nanoparticles using aqueous leaf extract of *Ocimum basilicum*. *Nanomedicine Journal*, 3(4), 240-247.  
<https://doi.org/10.22038/nmj.2016.7580>
- Rezaeian, M., Khanzadi, S., Hashemi, M. & Azizzadeh, M. (2021). Antimicrobial Effect of Gel-Type Nanoemulsion of Chitosan Coating Containing Essential Oils of *Zataria multiflora* and *Bunium persicum* on *Pseudomonas* Artificially Inoculated onto Salmon Fillets. *Medical Laboratory Journal*, 15(3), 14-19.  
<file:///E:/semnani/2020/4%20Jul-Aug%202020/1-article%20A-10-913-1-nasir/10.29252/mlj.14.4.1>
- Roostaei, M., Barzegar, M., Sahari, M. A. & Rafiee, Z. (2017). The enhancement of pistachio green hull extract functionality via nanoliposomal formulation: studying in soybean oil. *Journal of food science and technology*, 54(11), 3620-3629.  
<https://doi.org/10.1007%2Fs13197-017-2822-2>
- Shahbazi, Y. & Shaveisi, N. (2018). Characterization of active nanochitosan film containing natural preservative agents. *Journal of Nanomes Research*, 3(2), 109-116.  
<https://doi.org/10.22034/nmrj.2018.02.008>
- Silva, V., Singh, R. K., Gomes, N., Soares, B. G., Silva, A., Falco, V. & Poeta, P. (2020). Comparative insight upon chitosan solution and chitosan nanoparticles application on the phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of individual grape components of Sousão variety. *Antioxidants*, 9(2), 178.  
<https://doi.org/10.3390/antiox9020178>
- Tang, D-W, Yu, S-H., Ho, Y-C., Huang, B-Q, Tsai, G-J, Hsieh, H-Y, Sung, H-W, MI, F-W. (2013). Characterization of tea catechins - loaded nanoparticle prepared from chitosan and an edible polypeptide. *Journal of Food Hydrocolloids*, 30: 33-41.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.014>
- Vekiari, S. A., Gordon, M. H., Garcia-Macias, P. A. & Labrinea, H. (2008). Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit. *Journal of Food Chemistry*, 110(4), 1007-1011.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.005>
- Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J. & Arpo, K. (2010). Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Journal of Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 292-297.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.007>
- Zamani, A. (2019). Assessment of Spearmint (*Mentha spicata. L*) Extract Effect on Chemical and Bacterial Quality of Common Kilka (*Clupeonella cultriventris*) Surimi during Short Term Storage in Refrigerator. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 8 (2), 99-108.  
<http://dorl.net/dor/20.1001.1.23225513.1398.8.2.4.2>. [In Persian]
- Zarei, M., Ramezani, Z., Ein-Tavasoly, S., & Chadorbaf, M. (2015). Coating effects of orange and pomegranate peel extracts combined with chitosan nanoparticles on the quality of refrigerated silver carp fillets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2180-2187.  
<https://doi.org/10.1111/jfpp.12462>

# Antioxidant and Antimicrobial Effect of Encapsulated Grape Extract in Nanochitosan-TPP on Shelf life of Surimi (*Clupeonella cultriventris*) in Refrigerator

S. Soleymanfallah<sup>a</sup>, Zh. Khoshkhoo<sup>b\*</sup>, S.E. Hosseini<sup>c</sup>, M. H. Azizi<sup>d</sup>

<sup>a</sup> PhD of the Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>b</sup> Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>c</sup> Professor of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>d</sup> Professor of the Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: 13 May 2023

Accepted: 8 July 2023

## Abstract

**Introduction:** In this study, the effect of an aqueous extract of grape microencapsulated in chitosan nanoparticles (0.5 / 1) was used to evaluate the shelf life of surimi prepared from Kilka fish by ionic gelation method.

**Materials and Methods:** Grape was extracted aqueously, and total phenol content was detected by spectrophotometry and phenolic acids of the extract by HPLC method. Physical properties of nanoparticles including particle size, zeta potentia and PDI were determined with zeta-sizer, and microencapsulation efficiency was determined by spectrophotometer and loading capacity of nanoparticles by HPLC method. Antioxidant activity of free extract and chitosan nanoparticles with / without extract (by DPPH test) was determined. The total count was determined by cryophilic, mesophilic, pseudomonas, mold, and yeast and inhibition capacity (MIC, MBC and IZ) of selected Gram positive and Gram negative bacteria and mold and yeast in different treatments days (0 , 1 , 3 , 6 and 9 ) at refrigeration temperature.

**Results:** The data showed that the produced nanoparticles were in a favorable condition (particle size, zeta potential and PDI: 177.5 nm, +32.95 mV and 0.385 and the efficiency of microencapsulation and loading of nanoparticles were 48.95 and 6.19 percent, respectively). The phenolic content of the extract was  $2896 \pm 18$  mg/g and the extract in the loaded state showed a higher percentage of antioxidant activity (42.1%). Growth inhibition in microorganisms (gram positive and negative) is also increased and the overall amounts of bacteria and mold and yeast decreased, and the total values of cryophilic bacteria ( $6.35 \pm 0.29$  CFU/g), mesophilic bacteria ( $6.18 \pm 0.27$  CFU/g), Pseudomonas ( $5.41 \pm 0.14$  CFU/g), and mold and yeast ( $2.45 \pm 0.26$  CFU/g) in the last day of experiment, showed a significant decrease in the growth of microorganisms.

**Conclusion:** According to the results, the use of chitosan nanoparticles containing extract in surimi of Kilka fish can delay microbial decay and increase the product resistance to free radicals and thus increase the shelf life of the product during the storage period in the refrigerator.

**Keywords:** Antimicrobial Activity, Antioxidant Activity, Chitosan Nanoparticles, Grape Seed Extract, Surimi Kilka.

\* Corresponding Author: zh\_khoshkhoo@iau-tnb.ac.ir