

تهیه و ارزیابی خصوصیات فیلم آنتی اکسیدان کیتوزان حاوی عصاره دانه انگور

مهران مرادی^۱، حسین تاجیک^{۲*}، سیدمهدی رضوی روحانی^۳، عبدالرسول ارومیه‌ای^۴، حسن ملکی نژاد^۵،
هادی قاسم مهدی^۶

۱- استادیار بهداشت مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز

۲- استاد بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۳- استاد بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۴- دانشیار شیمی پلیمر، گروه پلیاستیک، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران

۵- دانشیار فارماکولوژی و سم شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۶- کارشناس میکروبیولوژی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

*آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،

صندوق پستی: ۱۱۷۷، تلفن و نمابر: ۲۷۷۱۹۲۶ (۰۴۴۱)

پست الکترونیک: h.tajik@urmia.ac.ir

تاریخ تصویب: ۹۰/۱/۱۸

تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۲۵

چکیده

مقدمه: استفاده از فیلم‌های آنتی اکسیدان روشی مؤثر در کنترل فساد شیمیایی در مواد غذایی است.

هدف: هدف این مطالعه، تهیه فیلم آنتی اکسیدان کیتوزان حاوی عصاره دانه انگور و ارزیابی خصوصیات آن در شرایط آزمایشگاهی است.

روش بررسی: فیلم کیتوزان به روش کاستینگ تهیه گردید و اثرات غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد عصاره بر روی ویژگی‌های مکانیکی، رنگ [L^* (شفافیت)، a^* (قرمزی)، b^*]، آنتی اکسیدان، درصد تورم و محتوای تام فنلی فیلم، ارزیابی شد.

نتایج: به طور کلی مقاومت در برابر پارگی فیلم کیتوزان تحت تأثیر میزان عصاره بود و در عصاره ۲ درصد، بهترین میزان یعنی مشابه مقاومت در برابر پارگی فیلم کیتوزان خالی را نشان داد. بالاترین میزان کشش در فیلم حاوی عصاره ۰/۵ درصد گزارش شد. اضافه کردن عصاره ضمن تغییر شاخص‌های شفافیت، قرمزی و زردی رنگ، موجب تولید فیلم‌های رنگی شد. قدرت آنتی اکسیدان فیلم کیتوزان حاوی عصاره به دلیل غنی بودن عصاره از ترکیبات فنلی، بسیار قابل توجه بود. این خصوصیت متأثر از میزان عصاره بوده و در عصاره (۸۵/۳۷ درصد) ۰/۵، (۱۶/۳۹ درصد) ۱ و ۲ درصد (۵۷/۴۱ درصد) نسبت به گروه کنترل (۳۴/۱۲ درصد) افزایش معنی‌داری نشان داد. ($p < ۰/۰۵$). نتایج آزمون محتوای تام فنلی و درصد تورم نشان از افزایش میزان هر دو ویژگی در اثر اضافه شدن عصاره داشت.

نتیجه‌گیری: خصوصیات فیلم کیتوزان کاملاً متأثر از میزان عصاره مورد استفاده داشت و در مجموع موجب بهبود خصوصیات آنتی اکسیدان و فنل کل فیلم کیتوزان شد. چنین فیلم‌هایی بسیار مناسب برای استفاده در مواد غذایی هستند.

کل واژگان: بسته‌بندی فعال، فیلم کیتوزان، عصاره دانه انگور، آنتی اکسیدان



مقدمه

استفاده از آنتی اکسیدان‌ها در بسته‌بندی مواد غذایی، به دلیل کنترل بو و طعم تند ناشی از اکسیداسیون چربی و افزایش ماندگاری ماده غذایی بسیار مورد توجه است. بوتیلات هیدروکسی آنیزول و بوتیلات هیدروکسی تولوئن، مهم‌ترین آنتی اکسیدان‌های مورد استفاده در نگهداری مواد غذایی است. با وجود اینکه هر دو ترکیب بالا، ترکیباتی مؤثر، ارزان و پایدار هستند، ولی مشکلات ناشی از اثرات سمی آنها باعث شده که امروزه استفاده از این مواد محدود شود [۱،۲].

در بسیاری از کشورهای دنیا، درخواست فزاینده‌ای برای استفاده از نگهدارنده‌های سالم و دوستدار محیط زیست در نگهداری مواد غذایی به وجود آمده است. روش‌های سنتی نگهداری غذا، تأثیر نامطلوبی بر جذابیت محصولات غذایی تازه دارند. بنابراین جستجو برای یافتن جایگزین طبیعی برای افزودنی‌های شیمیایی منطقی است، چون طبیعت برای طولانی مدت، منبع مناسبی برای این ترکیبات به شمار می‌رود [۳]. انگور یکی از قدیمی‌ترین میوه‌هایی است که در جهان مورد کشت و بهره برداری قرار می‌گیرد [۴]. عصاره دانه انگور (GSE) Grape Seed Extract محصول جانبی انگور می‌باشد که حاوی مخلوطی از منومرهای کاتکین، الیگومرهای پروسیانیدین و پلی‌مرهای پروسیانیدین است که از دانه‌های ویتیس وینیفر (*Vitis vinifera*) استخراج می‌شود [۵].

امروزه استفاده از فیلم‌های خوراکی (Edible films) و زیست تخریب‌پذیر، به عنوان یکی از روش‌های بسته‌بندی فعال، جایگزین مناسب برای پوشش‌های پلاستیکی غیرتخریب‌پذیر، مورد توجه قرار گرفته است [۶]. بيو پلیمرهای مورد استفاده در تهیه فیلم‌های خوراکی را می‌توان بر اساس نوع تهیه آنها به سه دسته، لیپیدی (واکس‌ها و اسیدهای چرب)، پلی‌ساکاریدی (کیتوزان، سلولز، آلژینات و نشاسته) و پروتئینی (پروتئین‌های آب پنیر، سویا و ذرت) تقسیم‌بندی نمود [۷]. کیتوزان، پلی‌ساکاریدی است که از استیل‌زدایی کیتین تهیه می‌شود. این پلیمر کاتیونی، از نظر فراوانی در طبیعت دومین

پلی‌ساکارید مهم بعد از سلولز می‌باشد. کیتوزان با ساختمان منحصر به فرد کاتیونی، دارای خصوصیات مطلوب و گوناگونی همچون غیرسمی بودن، قابلیت بازیافت و خصوصیت ضد میکروبی، ضدقارچی، آنتی اکسیدان و ویژگی تشکیل فیلم و پوشش است. فیلم کیتوزان اولین بار در سال ۱۹۳۶ توسط ریگبای (*ybgIR*) به روش کاستینگ تهیه شد [۸،۹،۱۰].

ایده افزودن ترکیبات آنتی اکسیدان به فیلم‌های خوراکی، علاوه بر بهبود خصوصیات فیزیکی - مکانیکی، کنترل فساد شیمیایی و بهبود طعم و رنگ است [۱۱]. در این روش، ترکیب بیواکتیو، به صورت افزودنی به طور مستقیم به ماده غذایی اضافه نمی‌شود و لذا امکان تغییر در ترکیب آنتی اکسیدان در حین فرآوری که در روش استفاده مستقیم افزودنی اتفاق می‌افتد، مشاهده نمی‌شود. مزیت دیگر این روش، رهایش آهسته و تدریجی ترکیبات بیواکتیو، به داخل غذا است [۶].

در فیلم کیتوزان استفاده از مواد بیواکتیو طبیعی با منشاء حیوانی، گیاهی و میکروبی، با اهداف متفاوتی از جمله بهبود خصوصیت نفوذپذیری، افزایش فعالیت آنتی اکسیدان، ضد میکروبی و ضدقارچی فیلم مورد مطالعه قرار گرفته شده است [۸]. هدف این مطالعه بررسی اثرات اضافه کردن سه غلظت ۰/۵، ۱، ۲ درصد عصاره دانه انگور بر روی خصوصیات مکانیکی، رنگ، محتوای تام فنلی، قدرت آنتی اکسیدان و درصد تورم فیلم خوراکی کیتوزان در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره دانه انگور

عصاره دانه انگور با نام تجاری مگا نچرال (Mega Natural Inc., Madera, CA, (MegaNatural®) USA) به صورت پودر با مشخصات ذیل تهیه شد: محتوای تام فنلی ($\geq 90 \text{ g GAE}/100 \text{ g}$) و پروفایل فنلی (منومر $> 10\%$)، الیگومر (۶۰ - ۸۰ درصد) و پلیمر ($< 25\%$) ارزیابی شده به روش (HPLC). روزانه محلول استوک عصاره در داخل



آب مقطر تهیه و پس از عبور فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی، مورد استفاده قرار گرفت.

صورت گرفت و میانگین اعداد در آزمون های مکانیکی مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه فیلم کیتوزان

برای تهیه محلول کیتوزان، از کیتوزان با وزن مولکولی متوسط، درجه استیل زدایی (Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, USA) $\geq 75\%$ ابتدا محلول اسید استیک یک درصد حجمی / حجمی تهیه و سپس محلول کیتوزان دو درصد وزنی / حجمی در اسید مذکور تهیه و پس از حل شدن کامل (در دمای اتاق، به مدت یک شبانه روز)، در شرایط خلاء و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۳ صاف شد. سپس به میزان ۰/۵ گرم گلیسرول به ازاء هر گرم کیتوزان به محلول اضافه و به مدت نیم ساعت دیگر در دمای اتاق هم زده شد.

برای تهیه فیلم، تیمارهای لازم با استفاده از عصاره در غلظت های ۰، ۰/۵، ۱، ۲ درصد در محلول کیتوزان تهیه شد. سپس محلول در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک دقیقه توسط دستگاه هموریزاتور هم زده شد. سپس حباب های هوای داخل آن در شرایط تحت خلاء و نیز با استفاده از گاز نیتروژن گرفته شد. برای تهیه فیلم، از روش کاستینگ استفاده شد. برای این منظور، به میزان لازم از محلول، در قالب های از جنس پلی تترافلورواتیلن با سطح ۲۶۹ متر مربع به وسیله پیت های استریل ریخته و سپس قالب به منظور پخش یکنواخت محلول به آرامی تکان داده شد. نهایتاً جهت خشک شدن فیلم، قالب ها در یک سطح کاملاً صاف، در دمای اتاق، به مدت ۳۶ ساعت نگهداری شد. پس از خشک شدن کامل و قبل از انجام آزمایش های مربوطه، فیلم ها در شرایط ثابت رطوبت ($50 \pm 2\%$) و دما ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) در داخل دسیکاتور حاوی محلول اشباع برومید سدیم به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند.

ارزیابی خصوصیات فیلم ها

تعیین ضخامت

ضخامت فیلم ها با استفاده از میکرومتر دیجیتالی اندازه گیری شد. اندازه گیری در پنج نقطه از فیلم به صورت تصادفی

ارزیابی خصوصیات مکانیکی

خصوصیات مکانیکی شامل مقاومت فیلم در برابر پارگی (Tensile strength) (TS) و میزان کشش تا نقطه پاره شدن (Elongation at break) (%E) بر اساس روش ASTM شماره D 882 اندازه گیری شد [۱۲]. از هر فیلم، نوارهایی در اندازه 7×1 سانتی متر تهیه و مقاومت در برابر پارگی و میزان کشش با دستگاه یونیورسال تعیین شد. فاصله اولیه بین دو فک دستگاه ۵۰ میلی متر و فیلم ها با لود سل ۵۰ نیوتن و با سرعت ۱ میلی متر در ثانیه کشیده شدند.

اندازه گیری رنگ

شاخص های رنگ هانتر (L^* , a^* , b^*) توسط دستگاه رنگ سنج مینولتا اندازه گیری شد. L^* شاخص شفافیت نمونه (سیاه = ۰ و سفید = ۱۰۰)، a^* شاخص قرمزی (سبز = -۶۰ و قرمز = ۶۰) و b^* شاخص زردی (آبی = -۶۰ و زردی = ۶۰) می باشند. ابتدا دستگاه با کاشی سفید استاندارد مخصوص دستگاه، کالیبره شده و سپس شاخص های رنگ هانتر فیلم بررسی شد. ارزیابی رنگ در چهار نقطه از فیلم یکی در وسط و سه نقطه در کنار انجام شد. شاخص سفیدی (Whitish index) (WI) و تغییرات کلی رنگ (ΔE) از فرمول ذیل محاسبه شد.

$$\Delta L = L - L_{\text{نمونه}}, \Delta a = a - a_{\text{نمونه}}, \Delta b = b - b_{\text{نمونه}}$$

درصد شاخص تورم (%SI) (Swelling index)

قطعاتی در اندازه $1 \times 5 \times 15$ میلی متر از فیلم تهیه و وزن اولیه آن بر حسب گرم و با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم تعیین شد. سپس نمونه ها در داخل پتری دیش های حاوی ۳۰ میلی لیتر آب مقطر قرار داده و در دمای 25 ± 1 درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس پس از ۲۴ ساعت، نمونه ها از پتری دیش برداشته و به آرامی آب اضافی آنها با کاغذ فیلتر گرفته و وزن نهایی فیلم ها



تعیین شد. درصد شاخص تورم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$SI (\%) = W_f - W_i / W_i \times 100$$

W_f و W_i به ترتیب وزن اولیه و وزن نهایی فیلم‌ها به گرم می‌باشد.

تعیین محتوای تام فنلی

برای اندازه‌گیری محتوای تام فنلی فیلم‌ها، از روش رنگ سنجی فولین سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) استفاده شد [۲]. ۲۵ میلی‌گرم از فیلم در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده و به مدت ۵ دقیقه به آرامی هم زده شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره فیلم، با ۷ میلی‌لیتر آب مقطر را در داخل لوله آزمایشگاهی ریخته و در مرحله بعد، ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین (Merck Company, Darmstadt, Germany) را اضافه کرده و محتویات با هم مخلوط شد. پس از ۸ دقیقه، ۵/۱ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به لوله اضافه و حجم مخلوط با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. لوله‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس مقدار جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. اسید گالیک (Fluka Chemical Company, St. Louis, MO, USA) به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. غلظت‌های صفر تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای رسم منحنی استاندارد انتخاب شد و نتایج با استفاده از معادله زیر تعیین و به صورت میلی‌گرم اکسی‌والان اسید گالیک بر گرم وزن فیلم بیان شد (mg GAE/ g film).

به طوری که محتوای تام فنلی = T (میلی‌گرم اکسی‌والان اسید گالیک)، غلظت اسید گالیک = C به دست آمده از منحنی استاندارد (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، حجم عصاره فیلم = V (میلی‌لیتر) و وزن فیلم خشک = M گرم است.

اندازه‌گیری میزان خواص آنتی‌اکسیدان

درصد به دام اندازی رادیکال (۲) و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) با استفاده از روش تغییر یافته سیرپاتراون و

هارت (۲۰۱۰) انجام گرفت [۲]. ۲۵ میلی‌گرم از فیلم در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۵ دقیقه به آرامی هم زده شد. سپس ۸/۲ میلی‌لیتر از عصاره فیلم به لوله‌های آزمون حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر محلول یک میلی‌مولار DPPH (Fluka Chemical Company, St. Louis, MO, USA) در متانول افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در اتاق نگهداری شد. میزان جذب لوله‌های آزمون و شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. درجه بی‌رنگ شدن این ترکیب بیانگر قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان مربوطه می‌باشد. در نهایت با استفاده از فرمول زیر، درصد فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها، در قالب طرح کاملاً تصادفی و در حداقل سه تکرار انجام شد. آنالیز بر اساس مدل فاکتوریال صورت گرفت. تحلیل و ارزیابی اطلاعات به دست آمده با استفاده از مدل خطی نرم‌افزار آماری SPSS 15 در سطح معنی‌دار $p > 0.05$ و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار GraphPad Prism 5 استفاده شد.

نتایج

خصوصیات مکانیکی

از لحاظ ظاهری، فیلم کیتوزان تهیه شده به رنگ زرد متمایل به سفید، انعطاف‌پذیر و تا حدودی محکم بود و به راحتی از قالب جدا می‌شد. فیلم‌های آنتی‌اکسیدان کیتوزان حاوی عصاره دانه انگور به دلیل رنگ مخصوص عصاره، به رنگ قهوه‌ای کم رنگ و براق بودند. ضخامت، مقاومت در برابر پارگی و میزان کشش فیلم‌های تهیه شده در جدول شماره ۱ آورده شده است. عصاره دانه انگور در غلظت‌های پایین (۱ و ۰/۵ درصد) تأثیری بر روی ضخامت نداشت و تنها عصاره ۲ درصد باعث افزایش



جدول شماره ۱- اثرات افزودن عصاره دانه انگور بر روی ضخامت، مقاومت در برابر پارگی و میزان کشش فیلم کیتوزان

میزان عصاره (درصد)	ضخامت فیلم (میلی متر)	مقاومت در برابر پارگی (مگا پاسکال)	میزان کشش (درصد)
۰	0.08 ± 0.01^a	24 ± 0.2^a	$29/33 \pm 1/0.8^c$
۰/۵	0.08 ± 0.01^a	$15/40 \pm 0.7^b$	$59 \pm 1/64^d$
۱	0.08 ± 0.01^a	$16/23 \pm 0.76^b$	$67/21 \pm 2/0.5^b$
۲	0.1 ± 0.01^b	$22/57 \pm 0.93^a$	$3/66 \pm 0.57^a$

*نتایج حاصل از میانگین حداقل سه تکرار بعلاوه منهای انحراف معیار. حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) است

فیلم می شد. حداکثر درصد میزان تورم ($38/687$)، در مدت ۲۴ ساعت، در فیلم حاوی ۲ درصد عصاره مشاهده شد.

محتوای تام فنلی و خصوصیات آنتی اکسیدان

محتوای تام فنلی فیلم کیتوزان حاوی عصاره در نمودار شماره ۲ آورده شده است. ترتیب محتوای تام فنلی فیلمها: عصاره ۲ درصد < عصاره ۱ درصد < عصاره ۰/۵ درصد < کیتوزان خالی، است. که به ترتیب حاوی $75/112, 92/36$ ، $22/92$ و $4/4$ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم فیلم است. افزایش میزان عصاره، اثر معنی داری بر روی محتوای تام فنلی نشان داد ($p < 0.05$). بر اساس نتایج درصد به دام اندازی رادیکال DPPH، تمامی فیلمهای تهیه شده، دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بودند (نمودار شماره ۳) فیلم کیتوزان همانند خود کیتوزان دارای فعالیت آنتی اکسیدانی ($12/34$ درصد) مناسبی است (نمودار شماره ۳). چنانچه در نمودار شماره ۳ گزارش شده است، قدرت آنتی اکسیدان فیلم کیتوزان با افزودن عصاره افزایش می یابد. این میزان افزایش در استفاده از عصاره ۰/۵ درصد ($37/85$ درصد)، ۱ درصد ($39/16$ درصد) و ۲ درصد ($41/57$ درصد) نسبت به گروه کنترل معنی دار بود ($p < 0.05$).

بحث

نتایج آزمون مکانیکی فیلم کیتوزان خالی این مطالعه مشابه نتایج (سرنیواسا و همکاران) [۱۳] مقاومت در برابر پارگی $10/39$ مگا پاسکال و میزان کشش $84/10$ درصد و متفاوت از

معنی دار ضخامت فیلم شد ($p < 0.05$). میزان مقاومت در برابر پارگی و میزان کشش فیلم کیتوزان خالی به ترتیب ۲۴ مگا پاسکال و $33/29$ درصد بود. بالاترین میزان مقاومت در برابر پارگی و میزان کشش به ترتیب در فیلم حاوی عصاره ۲ و ۰/۵ درصد گزارش شد.

خصوصیات رنگ و شاخص تورم

اثرات اضافه شدن عصاره دانه انگور، بر روی شاخصهای رنگ هانتر (L^* , a^* , b^*)، تغییرات کلی رنگ و شاخص سفیدی در جدول شماره ۲ آورده شده است. مقایسه نتایج (شفافیت L^*)، (قرمزی a^*) و (زردی b^*) نشان از تغییر معنی دار شفافیت، قرمزی و زردی فیلم کیتوزان خالی در اثر اضافه کردن عصاره دارد. همچنین تغییرات هر سه شاخص به طور معنی داری متأثر از میزان عصاره ۰/۵، ۱، ۲ درصد بود ($p < 0.05$) با وجود مشاهده تغییرات در شاخصهای هانتر، نتایج تغییرات کلی رنگ نشان از تغییر معنی دار رنگ فیلم کیتوزان نداشت. بیشترین میزان شاخص سفیدی در فیلمها به ترتیب مربوط به فیلمهای کیتوزان خالی > عصاره ۰/۵ درصد > عصاره ۱ درصد > عصاره ۲ درصد بود.

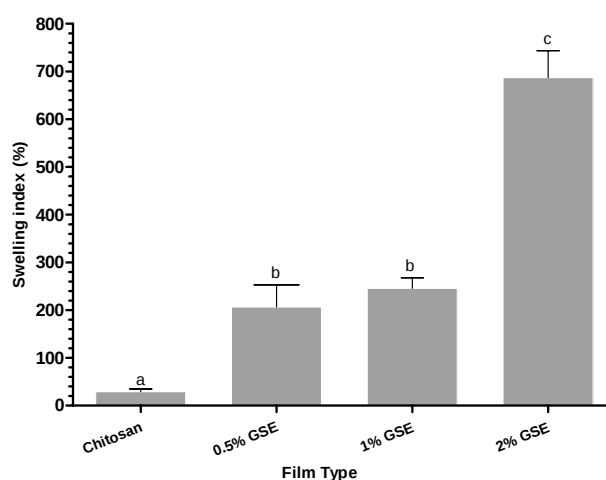
نتایج درصد شاخص تورم فیلمهای کیتوزان حاوی در نمودار شماره ۱ آمده است. میزان درصد شاخص تورم فیلم کیتوزان حاوی عصاره دانه انگور، در غلظتهای ۰/۵، ۱ و ۲ به ترتیب $206/59$ ، $245/55$ و $687/38$ درصد بود، که اختلاف معنی داری با میزان تورم در فیلم کیتوزان خالی ($31/29$ درصد) ندارد. افزایش میزان عصاره باعث تغییر معنی دار در میزان تورم



جدول شماره ۲- پارامترهای مربوط به رنگ فیلم کیتوزان حاوی عصاره دانه انگور

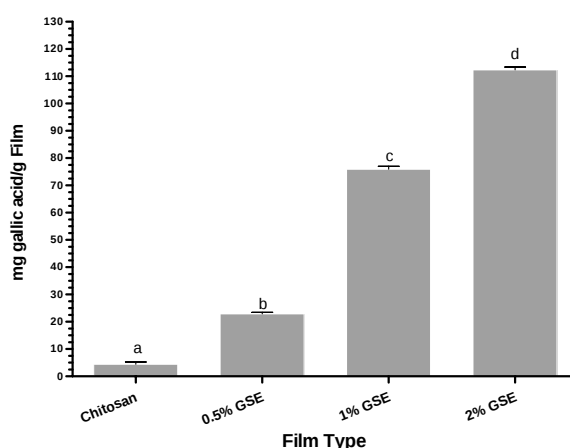
شاخص سفیدی	تغییرات کلی رنگ	شاخص زردی	شاخص قرمزی	شاخص شفافیت	میزان عصاره (درصد)
62.71 ± 2.99^a	62.41 ± 0.13^b	29.39 ± 1.99^a	-0.74 ± 0.97^a	77.08 ± 1.34^a	۰
35.18 ± 2.50^b	67.66 ± 0.12^b	18.22 ± 0.96^b	19.46 ± 1.52^b	40.94 ± 1.4^b	۰/۵
30.80 ± 1.83^c	69.69 ± 0.09^b	16.50 ± 0.17^b	21.33 ± 0.88^c	36.27 ± 1.7^{cd}	۱
27.51 ± 3.53^c	72.80 ± 0.1^a	15.67 ± 3.78^b	26.35 ± 0.32^d	34.44 ± 3.1^d	۲

نتایج حاصل از میانگین حداقل سه تکرار بعلاوه منهای انحراف معیار. حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) است.



نمودار شماره ۱- درصد شاخص تورم فیلم کیتوزان حاوی عصاره دانه انگور (ESG).

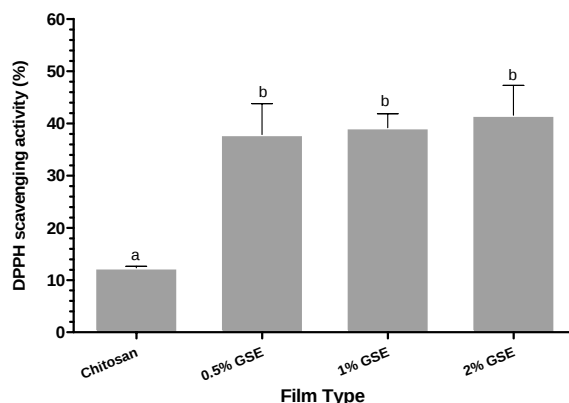
نتایج حاصل از میانگین حداقل سه تکرار بعلاوه منهای انحراف معیار بوده و حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) است.



نمودار شماره ۲- محتوای تام فنلی فیلم کیتوزان حاوی عصاره دانه انگور (GSE).

نتایج حاصل از میانگین حداقل سه تکرار بعلاوه منهای انحراف معیار بوده و حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) است.





نمودار شماره ۳- میزان به دام اندازی رادیکال DPPH فیلم کیتوزان حاوی عصاره دانه انگور (GSE).

نتایج حاصل از میانگین حداقل سه تکرار بعلاوه منهای انحراف معیار بوده و حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) است.

۵۰ درصدی میزان مقاومت در برابر پارگی فیلم می‌شود. سیواروبان و همکاران نیز نشان دادند، که اضافه کردن ۱ درصد عصاره دانه انگور به فیلم پروتئین سویا موجب افزایش مقاومت در برابر پارگی از ۸/۸ به ۷/۱۰ مگا پاسکال می‌شود [۱۷]. پایین بودن میزان کشش در فیلم حاوی ۲ درصد عصاره دانه انگور، به دلیل حضور میزان زیادی عصاره در داخل فیلم است که باعث پخش نشدن کامل عصاره در فیلم شده و در نهایت موجب ایجاد پیوندهای ضعیف بین پلیمر و عصاره می‌شود. این حالت باعث ایجاد یکسری نقاط با عدم تحمل به کشش بر روی فیلم می‌شود. پارامترهای رنگی فیلم‌های مورد استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی، به دلیل اثرات آنها در مقبولیت مصرف‌کننده ماده غذایی، از اهمیت زیادی برخوردار است. در صورت تلفیق شاخص شفافیت و زردی و براساس فرمول‌های ریاضی، شاخصی تحت عنوان شاخص سفیدی یا WI به دست می‌آید. هرچه این شاخص بالا باشد، نشان از سفید رنگ بودن فیلم دارد. چنانچه در جدول شماره ۲ آورده شده است، افزودن عصاره موجب تغییر معنی‌دار در میزان شاخص سفیدی فیلم کیتوزان (۷۱/۶۲) می‌شود. این نتایج مشابه با مطالعه دو و همکاران است که نشان دادند تغییر رنگ فیلم‌ها کاملاً متأثر از نوع و میزان اسانس مورد استفاده، حتی در غلظت‌های پایین است [۱۸]. فیلم‌های کیتوزان حاوی عصاره، به دلیل داشتن شاخص شفافیت پایین و

نتایج (سانچزگونزالس و همکاران) [۱۴] مقاومت در برابر پارگی ۱۱۳ مگا پاسکال و میزان کشش ۲۲ درصد بود. تفاوت‌های موجود، ناشی از نوع کیتوزان، نوع اسید مورد استفاده در تهیه فیلم، شرایط تهیه و میزان و نوع پلاستی‌سایزر مورد استفاده است [۱۴].

به طور کلی مقاومت در برابر پارگی و میزان کشش فیلم کیتوزان حاوی عصاره، بستگی به میزان عصاره اضافه شده دارد. مقاومت در برابر پارگی فیلم با اضافه شدن ۰/۵ درصد عصاره کاهش معنی‌داری با گروه کنترل نشان می‌دهد ولی با افزایش میزان عصاره، مقاومت در برابر پارگی فیلم افزایش پیدا کرده و حتی در استفاده از عصاره ۲ درصد، مقاومت در برابر پارگی به بهترین حالت خود یعنی تقریباً مشابه فیلم کیتوزان خالی رسید جدول شماره ۱ افزایش ضخامت و مقاومت در برابر پارگی فیلم حاوی عصاره ۲ درصد، ممکن است به دلیل پیوندهای عرضی باشد که بین کیتوزان و ترکیبات فنلی با وزن مولکولی بالای موجود در عصاره ایجاد می‌شود. این ترکیبات فنلی به دلیل خاصیت آب دوستی و وزن مولکولی بالا، موجب کاهش اثرات نرم‌کنندگی فیلم و نهایتاً باعث افزایش ضخامت و میزان مقاومت در برابر پارگی و میزان کشش فیلم خوراکی می‌شوند [۱۵]. کورالس و همکاران نشان دادند که افزودن عصاره دانه انگور به میزان ۱ درصد، باعث افزایش ضخامت و میزان کشش فیلم نشاسته نخود می‌شود [۱۶]. در حالی که، عصاره باعث کاهش



شاخص‌های قرمزی و (ΔE) تغییرات کلی رنگ) بالا، دارای یک رنگ قهوه‌ای متمایل به خاکستری بودند. این حالت به دلیل رنگ قهوه‌ای عصاره دانه انگور می‌باشد ΔE شانگر تغییرات کلی رنگ فیلم می‌باشد و هر چه میزان آن افزایش می‌یابد، نشان‌دهنده تغییر رنگ کلی فیلم است. میزان ΔE با اضافه شدن عصاره دانه انگور، افزایش یافته جدول شماره ۲ و باعث ایجاد فیلم‌هایی کاملاً رنگی می‌شوند.

شاخص تورم به صورت درصد افزایش وزن فیلم در طی غوطه‌وری در آب مقطر در مدت ۲۴ ساعت تعریف می‌شود. نتایج مربوط به استفاده از غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد عصاره بر روی شاخص تورم، تا حدودی ایده‌آل است نمودار شماره ۱، چرا که در صورت استفاده از چنین فیلم‌هایی در مواد غذایی مرطوب، امکان پارگی و متلاشی شدن فیلم در اثر جذب آب وجود ندارد. این در حالی بود که میزان بالای شاخص تورم در فیلم حاوی عصاره ۲ درصد (۶۷۸/۳۸ درصد)، باعث می‌شد حتی حین انجام آزمایش، فیلم‌های مربوطه، ساختار خود را از دست داده و پاره شوند. این حالت به دلیل ایجاد تداخلات بین مولکولی ترکیبات آب دوست همچون عصاره با پلیمر، ایجاد می‌شود [۱۹].

افزودن عصاره دانه انگور به فیلم کیتوزان، باعث افزایش معنی‌داری در محتوای تام فنلی شد ($p < ۰/۰۵$) (نمودار شماره ۲). به طوری که محتوای فنل کیتوزان حاوی ۰/۵، ۱ و ۲ درصد عصاره دانه انگور، به ترتیب ۵، ۱۷، ۲۵ برابر میزان فنل گروه کنترل (۴/۴ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم فیلم) شد (نمودار شماره ۲) نتایج مشابهی توسط سیریپاتراون و هارت در فیلم کیتوزان حاوی عصاره چای سبز گزارش شد [۲]. یافته جالب توجه که در این مطالعه مشاهده شد وجود مقدار کمی (۴/۴ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم فیلم) فنل کل در فیلم کیتوزان فاقد اسانس است. این یافته شاید به دلیل تشکیل یک کمپلکس رنگی در اثر واکنش معرف فولین سیوکالتو با یک سری ترکیبات احیاءکننده غیرفنلی کیتوزان باشد. عصاره دانه انگور از نظر ترکیبات فنلی منومری، مثل کاتکین، ابی کاتکین، ابی کاتکین ۳-۱-گالات و

پروسیانیدین‌های دیمری، تریمری و تترامری بسیار غنی بوده و لذا به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی با قدرت ضد میکروبی مناسب مطرح است [۲۰]. پروسیانیدین‌ها، شاخص‌ترین ترکیبات فنلی موجود در عصاره دانه انگور می‌باشند. همچنین، ترکیبات منومری و پرو آنتو سیانیدین‌های پلیمری دانه انگور، توانایی به دام انداختن رادیکال‌های سوپر اکسید، هیدروکسیل، نیتریک اسید، پروکسی نیترات و آنیون نیتروکسیل را دارند [۲۱، ۲۲] در تحقیق حاضر، فعالیت آنتی‌اکسیدان فیلم‌ها به صورت درصد به دام اندازی رادیکال DPPH بیان شد. همچنان که متصور بود، فیلم کیتوزان دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی بود (نمودار شماره ۳) در بین پلیمرهای زیستی مختلف، این خاصیت تا حدودی منحصر به کیتوزان و برخی از فیلم‌های پروتئینی می‌باشد [۸، ۲۳] فیلم کیتوزان حاوی ۲ درصد عصاره، دارای قدرت به دام اندازی بالا (۴۱/۵۷ درصد) است، به طوری که این میزان ۳/۵ برابر قدرت آنتی‌اکسیدان فیلم کیتوزان خالی است (نمودار شماره ۳) به طور کلی قدرت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های خوراکی تابعی از نوع و میزان ترکیب آنتی‌اکسیدان مورد استفاده در فیلم و خاصیت آنتی‌اکسیدانی ذاتی فیلم خوراکی است [۲۳]. اما در این مطالعه، افزایش میزان عصاره در فیلم، اثرات معنی‌داری بر روی میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی نشان نداد.

نتایج این مطالعه که در شرایط آزمایشگاهی صورت پذیرفت، نشان داد که می‌توان بسته و فیلم فعال کیتوزان با استفاده از عصاره دانه انگور تهیه نمود. افزودن عصاره، موجب بهبود خصوصیات آنتی‌اکسیدان و محتوای تام فنلی فیلم می‌شود. تغییرات نامناسب به وجود آمده در برخی از خصوصیات فیلم همچون خصوصیات مکانیکی و درصد تورم، که به دلیل اثرات برخی از غلظت‌های بالای عصاره که دارای ترکیبات فنلی با وزن مولکولی بالا است را می‌توان با تهیه فیلم‌های کامپوزیت بهبود داد. با بهینه‌سازی بیشتر فیلم آنتی‌اکسیدان کیتوزان تهیه شده در این مطالعه، می‌توان از آنها برای کنترل فساد شیمیایی مواد غذایی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

همکاری‌های خانم دکتر زمردی، آقای دکتر ناصری، خانم پادار، آقای طباطبایی و شرکت پلی فنلیک به خاطر در اختیار قرار دادن عصاره دانه انگور قدردانی می‌شود.

بدین‌وسیله از حوزه تحصیلات تکمیلی و دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به خاطر تأمین هزینه اجرای این طرح، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. همچنین از

منابع

1. Yanishlieva N and Marinova E. Natural antioxidants from herbs and spices Eur. *J. Lipid Sci. Technol.* 2006; 108: 776 – 79.
2. Siripatrawan U and Harte BR. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloid.* 2010; 24: 770 - 5.
3. Smid EJ and Gorris LGM. Natural Antimicrobials for Food Preservation. In: Rahman MS (edi). Handbook of Food Preservation. CRC press. 2007.
4. Pinelo M, Arnous A and Meyer AS. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends. Food. Sci. Tech.* 2006; 17: 579 - 90.
5. Clouatre DL and Kandaswami C. Grape seed extract. Encyclopedia of Dietary Supplements. Marcel Dekker. USA. 2005, pp: 309 - 25.
6. Dainelli D, Gontard N, Spyropoulos D, Zondervan-van den Beuken E and Tobback P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends Food. Sci. Tech.* 2008; 19: S99 - S108.
7. Quintero-Salazar B and Ponce-Alquicira E. Edible Packaging for Poultry and Poultry Products. In: Handbook of Food Products Manufacturing. John Wiley & Sons, Inc. 2007, pp: 797 - 815.
8. Moradi M, Tajik H, No HK, Razavi Rohani SM, Oromiehie A and Ghasemi S. Potential inherent properties of chitosan and its applications in preserving muscle food. *J. Chitin Chitosan.* 2010; 15: 35 - 45.
9. Bégin A, Calsteren MRV. Antimicrobial films produced from chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 1999; 26: 63 - 7.
10. Suyatma NE, Copinet A, Tighzert L, Coma V. Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends. *J. Polym. Environ.* 2004; 12: 1 – 6.
11. Martín-Belloso O, Rojas-Graü M.A and Soliva-Fortuny R. Delivery of flavor and active ingredients using edible films and coatings. In: Embuscado ME and Huber KC. (ed). Edible films and coatings for food applications. Springer, New York, NY. pp: 2009, 295 - 314.
12. ASTM. Annual book of ASTM standards. Pennsylvania: American Society for Testing and Materials. 2003.
13. Srinivasa PC, Ramesh MN and Tharanathan RN. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloid.* 2007; 21: 1113 - 22.
14. Sánchez-González L, Cháfer M, Chiralt A and González-Martínez C. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydr. Polym.* 2010; 82: 277 - 83.
15. Adams B, Sivarrooban T, Hettiarachchy NS and Johnson MG. Inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* by soy protein edible film



containing grape seed extract, nisin, and malic acid. *Discovery* 2005; 6: 3 - 9.

16. Corrales M, Han JH and Tauscher B. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2009; 44: 425 – 33.

17. Sivarooban T, Hettiarachchy NS and Johnson MG. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Res. Int.* 2008; 41: 781 - 5.

18. Du WX, Olsen CW, Avena- Bustillos RJ, Mchugh TH, Levin CE and Friedman M. Effects of allspice, cinnamon, and clove bud essential oils in edible apple films on physical properties and antimicrobial activities. *J. Food Sci.* 2009; 74: M372 - 378.

19. Mayachiew P, Devahastin S. Effects of drying

methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. *Food Chem.* 2010; 118: 564 - 601.

20. FDA. (2008). Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) website at <http://www.cfsan.fda.gov/dms/eafus.html>.

21. Yilmaz Y and Toledo RT. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends. Food. Sci. Tech.* 2004; 15: 422 – 33.

22. Bañón S, Díaz P, Rodríguez M, Garrido MD and Price A. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat Sci.* 2007; 77: 626 – 33.

23. Gómez-Estaca J, Gimnez B, Montero P and Gómez-Guillén MC. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *J. Food Eng.* 2009; 92: 78 - 85.