

مقاله علمی- پژوهشی

بررسی فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن نانوکپسوله در برابر *Botrytis cinerea* در انگور
قرمز شاهرودیحدیثه کریمی¹ - حجت اله بداتی^{2*} - احمد رجایی³ - شیده موجرلو²

تاریخ دریافت: 1397/08/12

تاریخ پذیرش: 1398/06/23

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی فعالیت ضدقارچی و پایداری اسانس آویشن درون پوشانی در نانوزل کیتوزان - مرستیک اسید در برابر قارچ *Botrytis cinerea* در انگور قرمز شاهرودی انجام گرفت. اثر نانوزل کیتوزان - مرستیک اسید در سه سطح صفر، 150 و 300 میکرولیتر در لیتر، اسانس آویشن خالص و اسانس آویشن درون پوشانی شده در نانوزل کیتوزان - مرستیک اسید در سه سطح 0، 75 و 150 میکرولیتر در لیتر در شرایط آزمایشگاهی و بر ماندگاری میوه‌های انگور در شرایط اتمسفر تعدیل یافته در طی 72 روز نگهداری در دمای 2 تا 4 درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) اتصال موفقیت‌آمیز بین گروه‌های آمین کیتوزان و گروه‌های کربوکسیلیک اسید - مرستیک اسید را تایید کرد و تصویر میکروسکوپ الکترونی روشی اندازه ذرات نانوزل کیتوزان - مرستیک اسید حاوی اسانس را کمتر از 100 نانومتر نشان داد. تست رهایش نشان داد که انتشار اسانس آویشن از نانوزل کیتوزان - مرستیک اسید روندی دو مرحله‌ای دارد. نتایج حاصل از جبهه‌های آلوده بسته‌بندی شده تایید کرد با افزایش غلظت اسانس آویشن، اثر ضدقارچی نیز افزایش یافته است. کمترین میزان هدایت الکتریکی و تغییر رنگ، بالاترین مولفه L^* و شاخص کروما در تیمار اسانس آویشن با غلظت 75 میکرولیتر در لیتر مشاهده گردید. نتایج نشان دادند که غلظت‌های پایین اسانس درون پوشانی شده در کنترل عامل قارچ بوتریتیس انگور بهتر از اسانس خالص با همان غلظت عمل کرد، در حالی که در آزمایش‌های مربوط به قابلیت انبارمانی میوه انگور تیمار اسانس آویشن با غلظت 75 میکرولیتر در لیتر مطلوبترین نتیجه را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: نانوکپسوله، اثر ضدقارچی، اسانس آویشن، *Botrytis cinerea*، انگور

مقدمه

کنترل قارچ *Botrytis cinerea* در پس از برداشت انگور از روش‌هایی نظیر استفاده از عوامل کنترل زیستی، ضد میکروبی‌های طبیعی، روش‌های فیزیکی، عوامل ضد عفونی‌کننده GRAS⁴ (ازن، اتانول، استیک اسید) استفاده شده است (Romanazzi et al, 2012). صابونچی و مسعود (2016)، با بررسی اثر عصاره روغنی آویشن شیرازی بر برخی ویژگی‌های انگور تازه‌خوری رقم سلطانان⁵ آلوده شده با قارچ *Botrytis cinerea* بیان کردند، با افزایش غلظت عصاره روغنی فعالیت ضدقارچی در برابر این قارچ افزایش یافته است. مصرف کیتوزان در انگور رقم شاهرودی در مرحله پس از برداشت، از دست رفتن وزن، فساد میکروبی، قهوه ای شدن، ترک خوردگی و ریزش حبه‌ها را کاهش و کیفیت را افزایش داده است (مستوفی، 1390). Romanazzi و همکاران (2007) اثر ترکیبی کیتوزان و اتانول را بر کنترل بیماری کپک خاکستری در پس از برداشت انگور

انگورهای تازه‌خوری (*Vitis vinifera* L.) در مرحله پس از برداشت و حین انبارداری ضایعات شدیدی را نشان می‌دهد. کاهش کیفیت عمدتاً به علت کاهش وزن در اثر از دست دادن آب، نرم شدن بافت، قهوه‌ای شدن چوب خوشه، از دست رفتن عطر و طعم، و رایحه غیرعادی مربوط به رسیدگی بیش از حد که در بیشتر موارد با حضور عظیم جبهه‌های آلوده توسط قارچ *Botrytis cinerea* همراه است، ایجاد می‌شود (Carvajal- Milla'n et al, 2001; Crisosto et al, 2002). کاهش کیفیت انگور در مرحله بعد از برداشت مصرف و تجاری‌سازی آن را محدود می‌کند (Castillo et al, 2010). برای

1 و 2 - به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم باغبانی و گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.
3 - استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.

* - نویسنده مسئول: (Email: hbodaghi@shahroodut.ac.ir)

DOI: 10.22067/ifstrj.v16i4.76390

4 Generally recognized as safe
5 Sultana

و محدود، بروز مسمومیت احتمالی و اثرات نامطلوب گاز دی‌اکسید گوگرد بر کیفیت حبه‌های انگور در زمان نگهداری در سردخانه وجود دارد، هدف از این پژوهش درون‌پوشانی کردن اسانس آویشن در نانوزل کیتوزان به منظور افزایش و تداوم اثر ضدقارچی آن در برابر *Botrytis cinerea* در شرایط آزمایشگاهی و انبار بر انگور قرمز شاهرودی بود.

مواد و روش‌ها

کیتوزان، مرستیک اسید، استیک اسید، متانول، اتانول، سدیم کلراید، هیدروکسید سدیم، PDA¹ از شرکت مرک آلمان خریداری شد. 1-اتیل-3-(3-دی متیل آمینو پروپیل) کربو دی ایمید (EDC) از شرکت فلوکا آمریکا و توئین 80 از شرکت سامچون کره تهیه گردید. اسانس آویشن از شرکت باریج اسانس خریداری شد. قارچ *Botrytis cinerea* از میوه توت‌فرنگی جداسازی، خالص‌سازی و تست بیماری‌زایی آن انجام شد و این جدایه (BC01) در آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود نگهداری شد.

تهیه نانوزل کیتوزان

مرستیک اسید از طریق اتصالات آمیدی و از طریق واکنش‌های واسطه‌ای 1-اتیل-3-(3-دی متیل آمینو پروپیل) کربودی ایمید (EDC) به کیتوزان متصل شد. در ابتدا، 0/5 گرم کیتوزان در 100 میلی لیتر استیک اسید آبی (1% حجمی/حجمی) حل شد. پس از افزودن 85 میلی لیتر اتانول، محلول حاصل تحت امواج فراصوت در محدوده 35 KHz به مدت 5 دقیقه با توان 240 W (Elma Sonic, E30H, Germany) قرار داده شد. سپس 668 میکرولیتر EDC با 250 میلی گرم مرستیک اسید حل شده در مقدار مشخصی اتانول مخلوط شد. هر دو محلول به مدت 5 ساعت مخلوط و بهم زده شد. بعد از آن pH با استفاده از هیدروکسید سدیم (1 مولار) برای آماده‌سازی نانوزل، توسط دستگاه pH متر روی 9-8/5 تنظیم شد. سپس مخلوط برای بهبود یافتن نانوزل آماده شده توسط سانتریفیوژ با دور 9000 rpm به مدت 5 دقیقه (Sigma 3-16 KL, Germany) سانتریفیوژ شد و در نهایت برای حذف مواد واکنش نداده توسط اتانول و آب مقطر چندین مرتبه شسته شد و توسط فیلتر واتمن با مش 0/2 میکرومتر فیلتر شد (Beyki et al, 2014).

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوزل کیتوزان - مرستیک

اسید

طیف سنجی مادون قرمز

1 Potao Dextro Agar

بررسی کردند. در این آزمایش ترکیبی از غلظت‌های پایین کیتوزان و اتانول باعث بهبود کنترل کیک خاکستری در انگور نسبت به کاربرد هر کدام از آن‌ها به تنهایی گردید.

درون‌پوشانی کردن مواد (یک ماده جامد، مایع یا گاز) به منظور حفظ خواص و انتشار کنترل شده ماده موثر انجام می‌گیرد (مهدوی و همکاران، 2014; Gray & Hammer, 2015). در برخی از پژوهش‌های گذشته، از کیتوزان به عنوان یک عامل درون پوشان‌کننده برای رهایش کنترل شده روغن جلیک و رسوراترول، مواد آروماتیک و متانول استفاده شد (2010a و 2010b) Peng et al (2013a) و *Estevinho et al* (2013) و *Nuisin et al* (2013)، چرا که کیتوزان به دلیل ایجاد پیوندهای یونی یا کوالانسی با عوامل پیونددهنده، توانایی تشکیل شبکه سازمان‌دهی شده‌ای را دارد که سبب محافظت ماده فعال می‌شود، از این رو این پیوندهای شیمیایی یک رهایش کنترل شده را در پی خواهند داشت (Estevinho et al., 2013). علاوه بر خواص مطلوب اسانس‌ها در حفظ کیفیت پس از برداشت محصولات و کاهش فساد قارچی، استفاده از اسانس‌ها به دلیل داشتن ترکیبات فرار که به راحتی تحت تاثیر عواملی از قبیل گرما، فشار، نور و اکسیژن تخریب می‌شوند یک محدودیت محسوب می‌شود. همچنین آن‌ها در آب نامحلول و برای کاربردهای مشخص به آزاد شدن تحت شرایط کنترل شده نیاز دارند (Martin et al, 2010). درون‌پوشانی کردن اسانس‌ها، کارایی آن‌ها را به واسطه افزایش دوره اثرگذاری نسبت به اسانس اولیه، افزایش خواهد داد (Silva et al, 2010). اخیراً کیتوزان به منظور درون‌پوشانی ترکیبات فعال زیستی مورد توجه زیادی قرار گرفته است، چراکه به طور کلی ایمن شناخته شده و دارای خواص بیولوژیکی برتر مثل تجزیه پذیری، زیست سازگاری و غیرسمی بودن (Keawchaoon & Yoksan, 2011) هستند. محافظت کامل میوه‌های گوجه فرنگی با کاربرد اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوزل کیتوزان بنزوئیک اسید در غلظت‌های بالای 700 میلی گرم در لیتر طی یک ماه نگهداری صورت گرفت (خلیلی و همکاران، 2015). محمدی و همکاران (2015) نشان دادند که کاربرد اسانس آویشن شیرازی در پوشش نانوذرات کیتوزان به طور قابل توجهی شیوع و شدت بیماری توت فرنگی آلوده به *Botrytis cinerea* را در میوه‌هایی که پس از اعمال تیمار 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 روز در دمای 20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، کاهش داد. Hsieh و همکاران (2006) نیز گزارش کردند کارایی درون‌پوشانی کردن کیتوزان با افزایش غلظت آن، بهبود نمی‌یابد.

بنابراین با توجه به نقصی که در استفاده از اسانس‌های گیاهی رایج به عنوان پوشش خوراکی (به عنوان مثال، اسانس‌ها به دلیل داشتن ترکیبات فرار و همچنین نامحلول بودن در آب نیازمند آزاد شدن تحت شرایط کنترل شده هستند) و همچنین محدودیت استفاده از گوگرد و پدهای سولفور به دلیل کارایی آن‌ها در مدت زمان مشخص

دو طرف کیسه بسته شد. در نهایت این کیسه به بطری شیشه‌ای مات که حاوی 450 میلی‌لیتر آب مقطر و اتانول با نسبت یکسان بود منتقل شد. میزان جذب در طول موج 279 نانومتر، در هفته اول به صورت روزانه و در هفته‌های دوم تا چهارم به صورت یک مرتبه در هفته با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نور مرئی (UV2150، آمریکا) اندازه‌گیری شد. شاهد حاوی اتانول و آب مقطر با نسبت یکسان بود (Beyki et al, 2014).

آزمایش شرایط آزمایشگاهی

در این روش غلظت‌های مشخص از هر تیمار با 15 میلی‌لیتر محیط کشت PDA مخلوط و در پتری دیش‌های 8 سانتی‌متری به منظور به دست آوردن غلظت نهایی ریخته شد. غلظت‌های مورد استفاده به صورت زیر استفاده شد: برای اسانس آویشن: 37/5، 75، 112/5، 150 و 300 میکرولیتر در لیتر، نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید: 75، 150، 225، 300، 450، 600 میکرولیتر در لیتر و اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید: 37/5، 75، 112/5، 150، 300 میکرولیتر در لیتر. بعد از قراردادن میسلیوم‌های قارچ *Botrytis cinerea* در مرکز محیط کشت، با استفاده از پارافیلیم دورگیری و در انکوباتور با دمای 27 درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرار داده شد و در روز هفتم که تیمار شاهد به طور کامل پر شد میزان رشد میسلیوم‌های قارچ بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شدند. غلظت‌های بهینه به دست آمده با علامت اختصاری در جدول 1 نمایش داده شده‌اند.

جدول 1- علائم اختصاری تیمارها با غلظت‌های بهینه شده

تیمار	علامت اختصاری
شاهد - بدون تیمار	Conrtol
اسانس آویشن 75 میکرولیتر در لیتر	E1
اسانس آویشن 150 میکرولیتر در لیتر	E2
نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید 150 میکرولیتر در لیتر	N1
نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید 300 میکرولیتر در لیتر	N2
75 میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید	NE1
150 میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید	NE2

cinerea روی محیط PDA سوسپانسیون اسپور تهیه شد و غلظت سوسپانسیون با استفاده از لام هماسپتور $2/5 \times 10^6$ اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. بعد از گذشت 45 دقیقه میزان 15 میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی $2/5 \times 10^6$ اسپور قارچ *Botrytis cinerea* در محل اتصال حبه و خوشه قرار داده شد. سپس حبه‌ها با استفاده از غلظت‌های نهایی تعیین شده در آزمایش شرایط آزمایشگاهی تیمار شده و در فیلم بسته‌بندی پلی‌اتیلن قرار داده شد و سپس فیلم‌ها

طیف مادون قرمز نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید با استفاده از اسپکتروفتومتر مادون قرمز 430FT-IR (JASCO، ژاپن) در دمای 20 درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. دستگاه با محدوده فرکانس $500-4000 \text{ cm}^{-1}$ عمل کرد. برای آنالیز مرستیک اسید، کیتوزان و نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید خشک شده، به صورت جداگانه با 100 میلی‌گرم KBr مخلوط شد و پس از تهیه قرص توسط دستگاه اندازه‌گیری شد (Beyki et al, 2014).

میکروسکوپ الکترونی رویشی

مورفولوژی نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید با اسانس درون‌پوشانی شده با استفاده از دستگاه SEM آنالیز شد. بدین منظور 1 قطره از نمونه‌ها به صورت جداگانه بر روی لام ریخته و در دمای محیط خشک شد. در نهایت یک قطره از نمونه پس از خشک شدن در دمای محیط و پوشش‌دهی با طلا برای آنالیز استفاده شد (Beyki et al, 2014).

تست رهایش

این پارامتر به منظور تعیین میزان آزاد شدن اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید انجام گرفت. بدین جهت غلظت 5000 میکرولیتر در لیتر از اسانس آویشن و نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید تهیه گردید. سپس این مخلوط به مدت 10 دقیقه در دستگاه اولتراسونیک جهت بارگذاری اسانس در نانوذله قرار گرفت. میزان 2 میلی‌لیتر از این مخلوط در کیسه دیالیز قرار گرفت و

آزمایش آلوده‌سازی حبه‌ها

به منظور تایید نتایج شرایط آزمایشگاهی، ارزیابی اثر تیمارهای اسانس و نانوذله اسانس روی حبه‌های انگور آلوده به قارچ بوتریتیسی بر اساس روش Mlikota Gabler و همکاران (2001) نیز انجام شد. حبه‌های سالم، یک شکل و یک رنگ جدا شده و در هیپوکلرید سدیم 1/5 درصد به مدت 1 دقیقه قرار داده شده و سپس 3 مرتبه با آب مقطر شست و شو داده شدند. از کشت 5 تا 7 روزه قارچ *Botrytis*

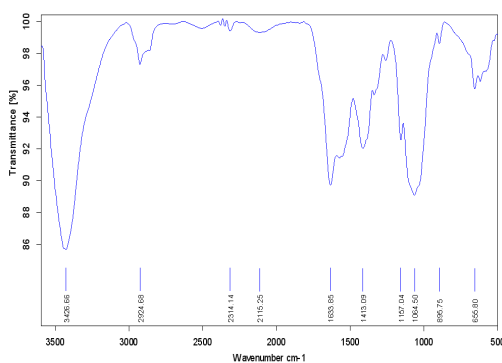
مدت 60 دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد. بخش چهارم میوه‌ها به‌عنوان میوه‌های شاهد با استفاده از آب مقطر استریل محلول‌پاشی شدند. پس از خشک شدن میوه‌ها در حدود 250 گرم از میوه‌های انگور در کیسه‌های پلی‌اتیلنی 40 میکرومتر بسته‌بندی شدند و در شرایط دمایی 4-2 درجه سانتی‌گراد به مدت 72 روز نگهداری قرار گرفتند. در حین دوره نگهداری، ارزیابی صفاتی از قبیل سفتی گوشت میوه توسط پنترومتر دستی، هدایت الکتریکی بافت میوه توسط روش Sayram و همکاران (1997)، برخی از مولفه‌های رنگ پوست میوه براساس روش Muftuoglu و همکاران (2010) با اندکی تغییر، و مواد جامد محلول توسط دستگاه رفراکتومتر (ATAGO master SEM، ژاپن) انجام گرفت.

نتایج و بحث

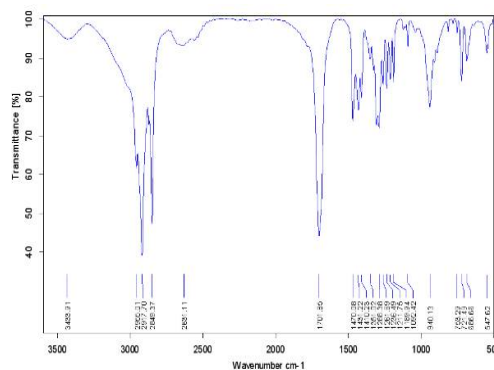
FTIR

مشخصات ساختاری به‌دست آمده برای کیتوزان، مریستیک اسید و نانوذله کیتوزان مریستیک اسید در شکل (1-الف) نشان داده شده است.

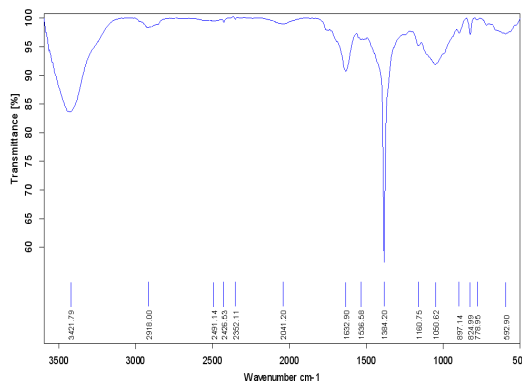
الف



ب:



ج



شکل 1- طیف‌های FTIR مربوط به الف: کیتوزان، ب: مریستیک اسید، ج: نانوذله کیتوزان - مریستیک اسید.

دوخت حرارتی شده و در انکوباتور با دمای 20 درجه به مدت 7 روز قرار گرفت. در نهایت شمارش تعداد اسپور برای هر نمونه با سه تکرار انجام گرفت.

ارزیابی ماندگاری میوه‌های تیمار شده در شرایط اتمسفر تعدیل یافته

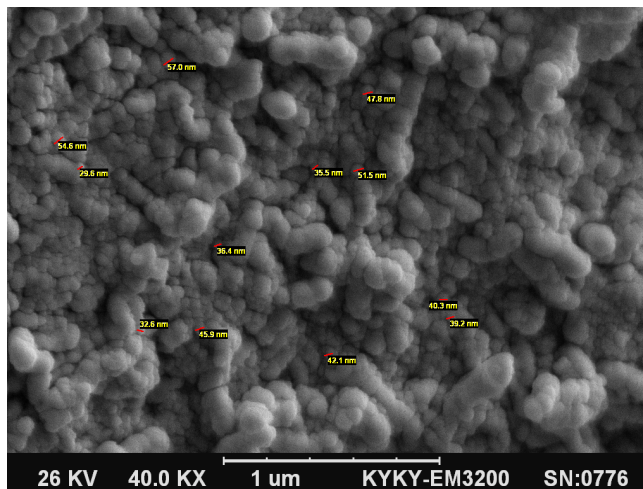
برای انجام این منظور، بعد از انتقال میوه‌ها از باغ به آزمایشگاه، انگورهای سالم از انگورهای آلوده و خراب جدا گردید. سپس به‌منظور حذف آلودگی‌های مزرعه میوه‌ها 3 مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. پس از خشک شدن، میوه‌ها به چهار گروه جهت اعمال تیمار تقسیم شدند. یک بخش از نمونه‌ها با محلول اسانس 75 و 150 میکرولیتر در لیتر (برای تهیه این غلظت‌ها مقدار 75 و 150 میکرولیتر اسانس به همراه اتانول و توئین 80 درصد در یک لیتر آب مقطر حل گردید)، بخش دیگر میوه‌ها با محلول 150 و 300 میکرولیتر در لیتر نانوذله و بخش سوم با محلول 75 و 150 میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوذله اسپری شدند. قبل از محلول‌پاشی به‌منظور بارگذاری اسانس در نانوذله، مخلوط حاصل به

مربوط به کیتوزان و نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید می‌توان مشاهده کرد که شدت پیک در ناحیه 1630 (مربوط به گروه $C=O$) نسبت به 1525 (مربوط به گروه‌های NH_2 آزاد) در نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید در مقایسه با شدت این پیک‌ها در کیتوزان افزایش پیدا کرده است که این می‌تواند به افزایش پیوندهای آمیدی مربوط باشد. تشکیل پیوندهای آمیدی موفق بین کیتوزان و گالیک اسید (Guo et al, 2016)، کیتوزان و بنزوئیک اسید (Hadian et al, 2017)، کیتوزان و اسیدهای دی‌کربوکسیلیک (Valderruten et al, 2014) و کیتوزان و کولائژن (Wang et al, 2003) نیز گزارش شده است.

SEM

در شکل 2، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید حاوی اسانس آویشن نشان داده شده است.

طیف کیتوزان جذب در ناحیه $3400-3500\text{ cm}^{-1}$ را نشان می‌دهد که این مربوط به گروه هیدروکسیل کیتوزان است. در 1580 cm^{-1} پیک مربوط به ارتعاشات خمشی پیوندهای امید و آمین و در 2924 cm^{-1} پیک مربوط به ارتعاش کششی $C-H$ گروه‌های متیل و متیلن است. در شکل (1-ب) طیف مربوط به مرستیک اسید نشان داده شده است. پیک‌های شناسایی شده در 2917 cm^{-1} و 2849 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی $C-H$ ، پیک 1701 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی $C=O$ ، 1470 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی $C-H$ ، 1261 cm^{-1} ارتعاش کششی $C-O$ ، 940 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی $O-H$ ، و پیک‌های 721 cm^{-1} و 686 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی $C-H$ است. در شکل (1-ج) طیف مربوط به نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید نشان داده شده است. با مقایسه طیف‌های



شکل 2- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید حاوی اسانس آویشن.

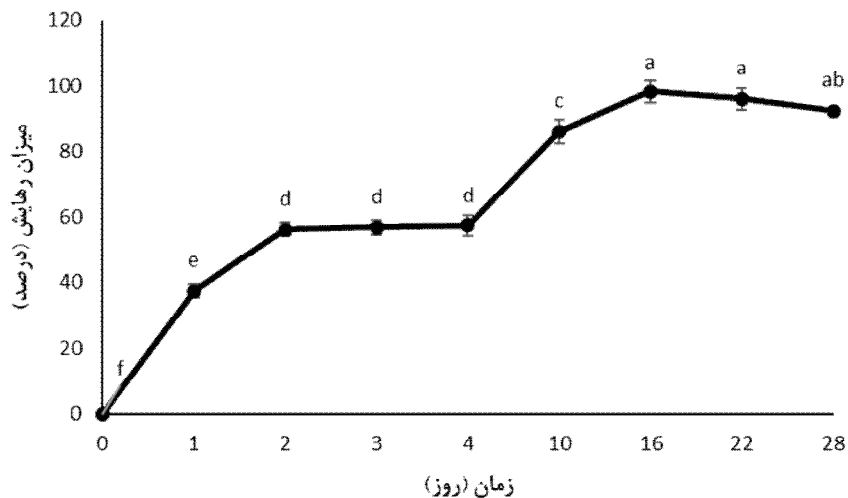
اندازه ذرات نانوذله کیتوزان - مرستیک اسید حاصل در این مطالعه کوچکتر و یکنواخت‌تر بود که این تفاوت می‌تواند به چندین عامل نسبت داده شود؛ اول این که، فراصوت اولیه، زنجیره طولانی کیتوزان را به قطعات کوچک‌تر تبدیل کرد که مانع از شکل‌گیری نانوذله بلند زنجیر شد. عامل دوم می‌تواند به نقش مهم فراصوت مجدد در کاهش اندازه ذرات مربوط باشد و عامل سوم نیز عبور نانوذله از درون فیلتر بود. همچنین در این مطالعه، مرستیک اسید به‌عنوان پیونددهنده برای تشکیل پلیمر کیتوزان (نانوذله) استفاده شد که در مقایسه با سایر پیوند دهنده‌ها مثل گلووتارآلدهید و گلیکول که سمی هستند، ایمن است (Embuscado & Huber, 2009).

تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که مورفولوژی نانوذله‌ها تقریباً کروی و اندازه این ذرات کمتر از 100 نانومتر است. اتصال اسیدچرب مرستیک اسید غیرقطبی به پلیمر کیتوزان و قرار گرفتن کمپلکس در یک محیط قطبی باعث تجمع سرهای غیرقطبی به داخل و سرهای قطبی به خارج و تشکیل یک ساختار مجتمع تقریباً کروی شکل گردید. Nasti و همکاران (2009) از پلیمر کیتوزان نانوذراتی در مقیاس 160 و 260 نانومتر با استفاده از اتصالات جانبی تری پلی فسفات ساختند. در پژوهش Lee و همکاران (2012) از پلیمر کیتوزان و گلیکول با استفاده از روش تولید خودبه‌خودی، نانوذله در ابعاد 200 نانومتر تهیه شد. با مقایسه اندازه ذرات حاصل از این تحقیق با کارهای قبلی (Nasti et al, 2009, Lee et al, 2012)

مریستیک اسید) است که این ساختار موجب شد که ترکیبات اسانس آویشن که ماهیت آبگریز داشتند به صورت تدریجی در محیط آزاد شوند. پژوهش حاضر با نتایج مطالعات محمدی و همکاران (2015)، در مورد اسانس آویشن شیرازی درون پوشانی شده، مطابقت دارد.

تست رهایش

نتایج حاصل از آزادسازی اسانس آویشن از ساختار نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید در دمای محیط (شکل 3) نشان داد، انتشار اسانس آویشن از نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید روندی دو مرحله ای دارد. نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید تهیه شده در این پژوهش دارای نواحی آبدوست (پلیمر کیتوزان) و آبگریز (زنجیره اسیدچرب



شکل 3- آزادسازی اسانس آویشن درون پوشانی شده در نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید به محیط مایع در طی 28 روز نگهداری در دمای محیط.

کیتوزان، غلظت‌های 1500، 750 و 375 میکرولیتر در لیتر توانستند بیشتر از 50% رشد میسلیوم‌های قارچ *Botrytis cinerea* را کاهش دهند. تصاویر مربوط به رشد میسلسوم‌های قارچ *Botrytis cinerea* تحت تیمارهای مختلف پوششی در شکل 4- د نشان داده شده است.

نتایج آزمون در انگور قرمز شاهرودی

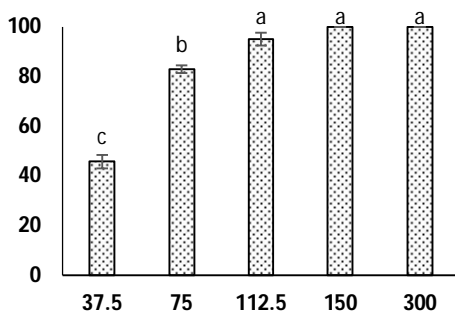
بررسی اثر تیمارهای اسانس و نانوزل - اسانس بر جبهه‌های انگور آلوده شده به اسپور *Botrytis cinerea* (شکل 5) نشان داد بیشترین تعداد اسپور در تیمار شاهد ($10^5 \times 10/125$ در میلی‌لیتر) و کمترین تعداد آن در تیمار NE2 ($10^5 \times 1/375$ در میلی‌لیتر) مشاهده شد (شکل 4). تیمارهای پوششی نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید و اسانس آویشن درون پوشانی شده در نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید در غلظت‌های بالاتر موفق‌تر عمل کردند، اما در مورد اسانس، غلظت پایین‌تر تعداد اسپور کمتری را نشان داد. احتمالاً افزایش غلظت اسانس باعث تخریب بافت میوه می‌شود. همچنین در تیمار NE2 احتمالاً به دلیل درون پوشانی شدن اسانس آویشن و آزاد شدن تدریجی آن، تعداد اسپور کمتری مشاهده می‌شود. اگرچه نمونه‌های موفق در استفاده از ضد میکروب‌های طبیعی

تعیین غلظت بهینه در شرایط آزمایشگاهی:

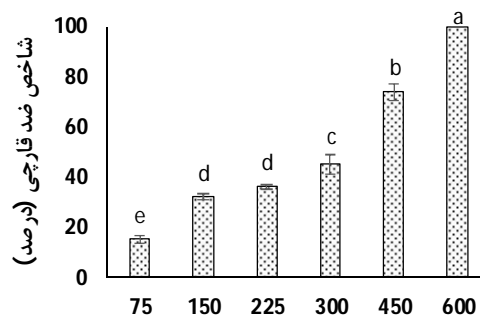
اثر تیمارهای پوششی بر میزان رشد میسلیوم‌های قارچ *Botrytis cinerea* در شکل 4 نشان داده شده است. با افزایش غلظت اسانس آویشن، فعالیت ضدقارچی نیز افزایش یافت (شکل 4- الف). در این راستا نتایج پژوهش حاضر با نتایج Abdolah و همکاران (2010) در استفاده از اسانس آویشن بر قارچ *Botrytis cinerea* و *Mucor piriformis* و Shin و همکاران (2014) در استفاده از تیمول بر قارچ *Botrytis cinerea* هم‌راستا است. غلظت 600 میکرولیتر در لیتر نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید به‌طور کامل خاصیت قارچ‌کشی نشان داد (شکل 4- ب). محمدی و همکاران (2015) نیز گزارش کردند نانوذره کیتوزان در غلظت 1500 میکرولیتر در لیتر فقط توانست بیشتر از 50% رشد میسلیوم‌های قارچ *Botrytis cinerea* را کاهش دهد، اما نتوانست به‌طور کامل مانع از رشد آن شود. نتایج حاصل از بررسی شکل 4- ج نشان داد، غلظت‌های 112/5، 150 و 200 میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون پوشانی شده در نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید به‌طور کامل مانع از رشد قارچ شدند. محمدی و همکاران (2015) نیز گزارش کردند از بین چهار غلظت به‌کار گرفته شده اسانس آویشن شیرازی درون پوشانی شده در نانوذره

500، 1000، 1500 میلی‌گرم در لیتر) تاثیر یکسانی بر کنترل پوسیدگی داشتند. همچنین بیان کردند کاربرد اسانس آویشن روی انارهای آلوده شده به اسپور قارچ، به‌طور موثری پوسیدگی را کاهش داد. Mohammadi و همکاران (2015) نیز با کاربرد نانوذره کیتوزان و اسانس آویشن شیرازی نانوکپسوله شده در نانوذره کیتوزان بر توت فرنگی‌های غوطه ور شده در سوسپانسیون *Botrytis cinerea* پس از 9 روز نگهداری، بیان کردند در غلظت 1500 میکرولیتر در لیتر، پایین‌ترین درصد آلودگی توت فرنگی‌ها، برای اسانس نانوکپسوله شده در نانو ذره کیتوزان (16/67 درصد) و بعد از آن نانو ذره کیتوزان (66/67 درصد) مشاهده شد. این در حالی است که میوه‌های تیمار نشده آلودگی 100 درصد نشان دادند.

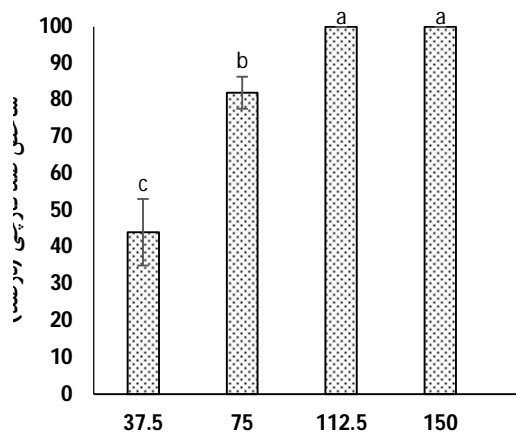
به‌عنوان نگهدارنده مواد غذایی گزارش شده است، ممکن است بعضی از آنها به دلیل انتشار سریع در بخش عمده مواد غذایی، اثرات ناکارآمد داشته و یا با اجزای مواد غذایی اثر متقابل نشان دهند که ممکن است باعث کاهش فعالیت ضد میکروبی آنها در برابر سلول هدف شود (Perricone et al, 2015). Moret و Munoz (2010) اثر ضدقارچی پوشش کیتوزان را روی انگور زمانی مشاهده کردند، که غلظت کیتوزان در محلول حداقل 0/25 درصد بود. Lopez-Reyes و همکاران (2010) نیز بیان کردند، اسانس پونه کوهی، مرزه و آویشن اثرات معنی‌داری را در برابر پاتوژن‌های *B.cinerea* و *Penicillium expansum* نشان دادند. غفوری و همکاران (1394) نیز با محلول‌پاشی پس از برداشت اسانس آویشن بر عمر انبارمانی میوه انار بیان کردند، هر سه سطح تیمار آویشن به‌کار گرفته شده



الف-غلظت اسانس آویشن (میکرولیتر/لیتر)



ب-نانوزل کیتوزان-مریستیک اسید (میکرولیتر در لیتر)

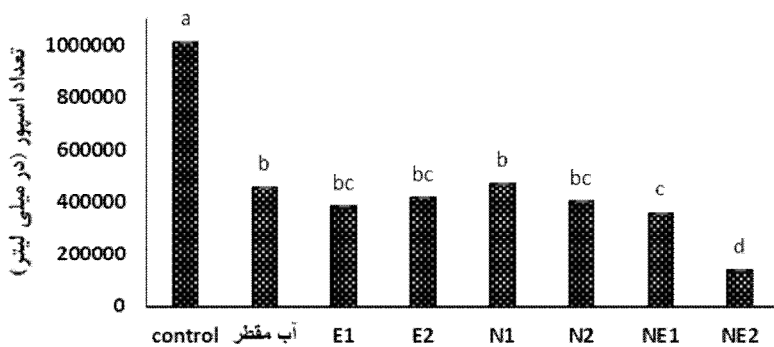


آویشن در نموشان شده در نانوا کیتوزان مریستیک



د-بالاچپ: شاهد، بالا راست: اسانس آویشن با غلظت 75 میکرولیتر در لیتر، پایین چپ: نانوزل کیتوزان-مریستیک اسید، پایین راست: نانوزل و اسانس با غلظت 75 میکرولیتر در لیتر

شکل 4- اثر اسانس آویشن، نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید و اسانس آویشن درون پوشانی شده در نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید بر رشد قارچ *Botrytis cinerea*.



تیمار



شکل 5- اثر تیمارهای پوششی بر تعداد اسپور قارچ *Botrytis cinerea* در شرایط این ویوو.

(E1): اسانس آویشن 75 میکرولیتر در لیتر، E2: اسانس آویشن 150 میکرولیتر در لیتر، N1: نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید 150 میکرولیتر در لیتر، N2: نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید 300 میکرولیتر در لیتر، NE1: 75 میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون پوشانی شده در نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید، NE2: 150 میکرولیتر در لیتر اسانس آویشن درون پوشانی شده در نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید) شکل سمت چپ، پائین: اسپور *Botrytis cinerea*.

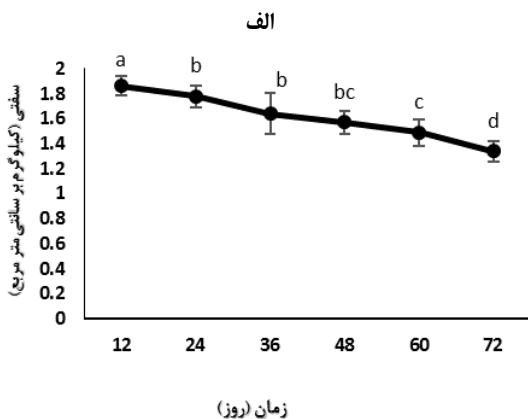
مشخص کننده نرم شدن میوه است نتیجه افزایش دپلی‌مریزه شدن و تجزیه پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی است. همچنین نتایج حاصل از بررسی جدول تجزیه واریانس نشان داد، که میزان سفتی نمونه‌ها تحت اثر تیمارهای پوششی و همچنین اثر متقابل تیمارهای پوششی × زمان قرار نگرفت (داده‌ها نشان داده نشده است). علت عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف پوشش خوراکی می‌تواند به دلیل ایجاد اتمسفر تعدیل‌یافته توسط فیلم بسته‌بندی و ممانعت از تبخیر و کاهش فرایند تنفس میوه‌های بسته‌بندی شده شاهد و تیمار شده باشد به‌نحوی که پوشش‌های خوراکی اثر افزایشی در حفظ سفتی بافت میوه نشان ندادند.

با توجه به شکل 6- ب، میزان هدایت الکترولیتی در طی زمان روندی افزایشی داشته است. در انتهای دوره نگهداری بیشترین میزان

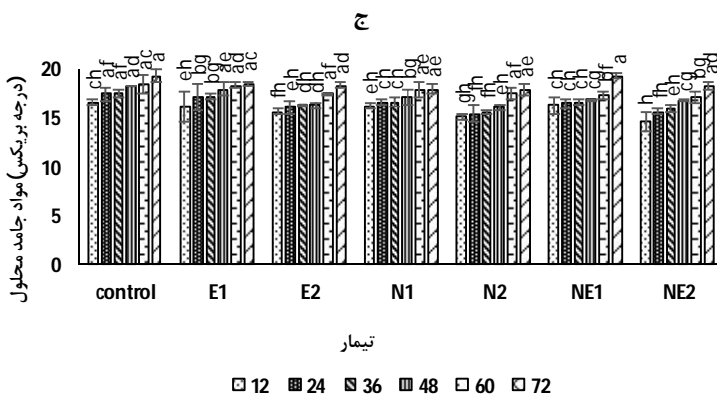
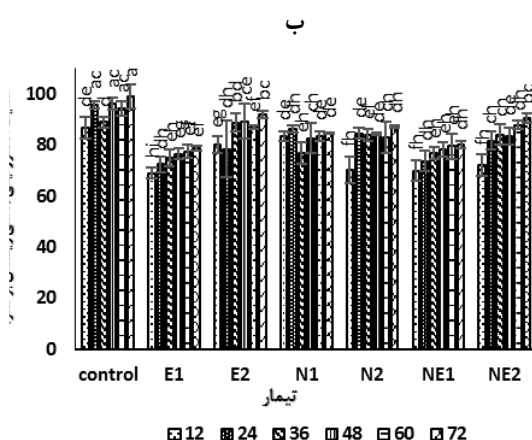
سفتی بافت میوه

همانطور که در شکل 6- الف مشاهده می‌گردد، سفتی گوشت میوه با گذشت زمان روند کاهشی داشته است به‌طوری که میزان آن از 1/86 (کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع) در ابتدای زمان نگهداری، به 1/34 (کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع) در انتهای دوره رسید. بین تیمارهای مختلف پوشش خوراکی تفاوت معنی‌داری از نظر سفتی بافت میوه مشاهده نشد. نتایج به‌دست آمده با نتایج مستوفی و همکاران (1390) که بیان کردند با گذشت زمان میزان سفتی جبهه‌ها در انگور سرخ فخری شاهرودی به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است، مطابقت داشت. همچنین Harpster و Brummell (2002) در یک بررسی گزارش کردند کاهش سفتی میوه انگور طی انبارمانی با کاهش همی‌سلولز، سلولز و پکتین همراه شده است و این تغییرات که

مربوط به تیمار E1 بود.



هدایت الکترولیتی مربوط به تیمار شاهد و کمترین میزان آن هم



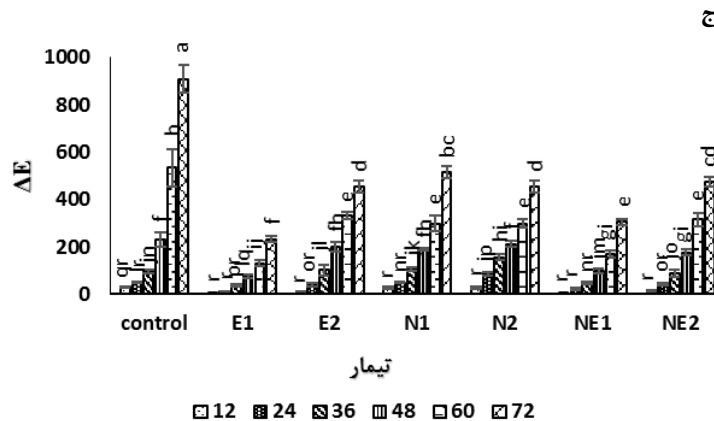
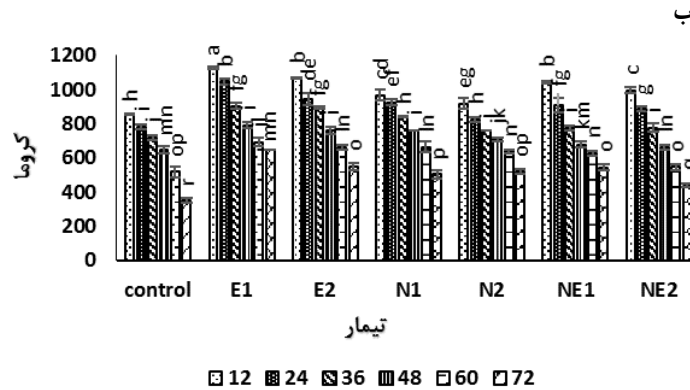
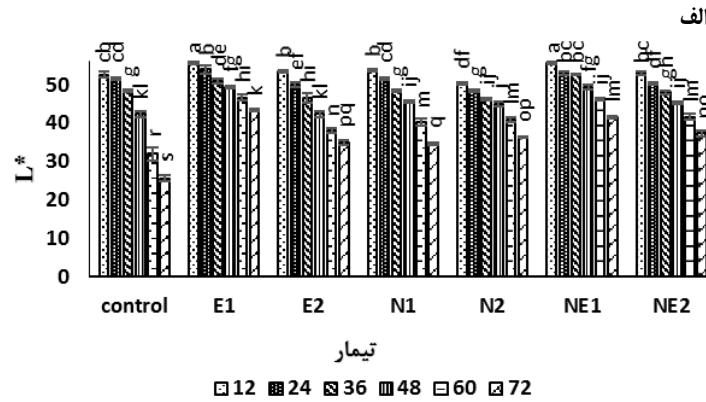
شکل 6- اثر متقابل تیمارهای پوششی × زمان بر سفتی، هدایت الکترولیتی و میزان مواد جامد محلول کل.

متجر به افزایش نشت یونی از غشاء سلول می‌شود. به نظر می‌رسد اسانس آویشن در دمای پایین با تاثیر در حفظ سیالیت ساختار غشای پلاسمایی و اندامک داخلی از جمله تونوپلاست مانع از هم پاشیدن آنها و در نتیجه باعث کنترل نشت یون‌ها و مواد موجود در واکوئول به سیتوزول و فضاهای سیتوپلاسمی شده است.

میزان مواد جامد محلول در طی زمان روندی افزایشی نشان داد (شکل 6- ج). در ابتدای نگهداری، کمترین میزان مواد جامد محلول، در تیمار NE2 (14/66 درجه بریکس) مشاهده گردید که البته با تیمار N2 (15/16 درجه بریکس) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در این زمان بیشترین میزان این صفت، در تیمار شاهد مشاهده گردید که البته تفاوت معنی‌داری با تیمارهای E1 (16/16 درجه بریکس) و NE1 (16/33 درجه بریکس) نداشت. در انتهای نگهداری نیز بیشترین میزان مواد جامد محلول برای تیمار شاهد (19/33 درجه

در پژوهشی Mohammadrezakhani و Pakkish (2015) با کاربرد پرولین و آسکوربیک اسید بر کاهش شاخص سرمازدگی و پروکسید هیدروژن بر انگور رقم تامسون در طی انبارمانی بیان کردند، در تمامی تیمارهای بکار گرفته شده و همچنین تیمار شاهد، نشت الکترولیتی روندی افزایشی داشته است. همچنین شاخص سرمازدگی و نشت الکترولیتی در میوه‌های تیمار شده با پرولین و آسکوربیک اسید به‌طور قابل توجهی نسبت به میوه‌های شاهد پایین‌تر بود. غفوری و همکاران (1394) با کاربرد اسانس آویشن در پس از برداشت میوه انار بیان کردند، اسانس آویشن نشت یونی را کاهش داده و با افزایش مدت انبارمانی نشت یونی افزایش یافت. همچنین تاثیر مثبت اسانس آویشن در کاهش خسارت سرمازدگی و نشت یونی در مدت انبارمانی را بیان کردند. سرما در بافت‌های گیاهی باعث کاهش سیالیت غشای سلولی و بروز سرمازدگی در غشاء سلولی آسیب دیده می‌شود که

بریکس) ثبت گردید که تفاوت معنی‌داری با تیمار NE1 (19/31 درجه بریکس) نشان نداد.



شکل 7- اثر متقابل تیمارهای پوششی × زمان بر مولفه‌های رنگی.

مواد جامد محلول در نمونه‌های شاهد دیده شد که با نتایج این محققان مطابق است. Topalovic و Milukovic (2010) نیز گزارش کردند که افزایش میزان مواد جامد محلول در مرحله رسیدن

با توجه به نتایج بالا بیشترین میزان مواد جامد محلول در شاهد وجود دارد، اگرچه تیمارها به لحاظ مواد جامد محلول، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، اما به لحاظ عددی بیشترین

زمان افزایش یافته است و این افزایش در شاهد بیشتر از سایر تیمارها است (910/33 به 31/16). در مورد اختلاف رنگ کل از هر سه مولفه رنگ (L,a,b) استفاده شده است که می‌تواند شاخص مناسب‌تری برای نشان دادن تغییرات رنگ باشد (Nopwinyuwong *et al.*, 2010). همچنین گزارش شده است که تاخیر در پیری در اثر کاربرد اسانس‌ها، به واسطه کاهش تغییرپذیری رنگ میوه و کاهش شاخص تیرگی است (Valero *et al.*, 2006).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش اسانس آویشن درون‌پوشانی شده در نانوزل کیتوزان - مریستیک اسید تهیه شد. سپس ویژگی‌های مورفولوژیکی و ساختاری نانوزل کیتوزان حاوی اسانس آویشن ارزیابی شد. تصاویر SEM و ارزیابی آزمایش‌های FTIR ساختار نانویی و اتصالات موفق پیوندی مورد انتظار را تایید کردند. از طرف دیگر آزمون‌های رهایش، این ویترو و این ویوو محصول سنتز شده قابلیت رهایش اسانس از نانوزل کیتوزان و خاصیت ضدقارچی آن را تایید کردند. بررسی اثر نانوزل اسانس و اسانس به تنهایی بر ماندگاری پس از برداشت انگورهای بسته‌بندی شده با فیلم پلی‌اتیلنی، کارایی بهتر اسانس به تنهایی را نسبت به نانوزل اسانس تایید کرد. کارایی کمتر نانوزل اسانس نسبت به اسانس می‌تواند به دلیل ممانعت از انتشار اسانس به واسطه فیلم بسته‌بندی باشد. در صورتی که اسانس محبوس شده در کپسول کیتوزان به علت رهایش کندتر نسبت به اسانس به تنهایی، احتمالاً اثر خود را در مدت زمان بیشتری از آنچه در این پژوهش برای دوره نگهداری انگور در نظر گرفته شده نشان بدهد. با توجه به این مورد و قابلیت ضد میکروبی نانوزل اسانس، بررسی اثر نانوزل اسانس در مقایسه با اسانس بر ماندگاری انگور برای مدت طولانی‌تر ضروری به نظر می‌رسد.

انگور نتیجه کاهش آب میوه، تجزیه قندهای مرکب و تبدیل آنها به قندهای ساده و هضم سلولی است. به نظر می‌رسد با توجه به نافرآزگرا بودن و عدم وجود ذخایر نشاسته در میوه انگور و این که از دست‌دهی رطوبت منجر به تجمع قندها می‌شود استفاده از فیلم بسته‌بندی و ایجاد شرایط اتمسفر تعدیل‌یافته از تبخیر آب در میوه‌های شاهد و تیمار شده ممانعت کرده است و اثر افزایشی پوشش‌های خوراکی توام با فیلم بسته‌بندی در کاهش تبخیر آب از بافت میوه، به لحاظ آماری معنی‌دار نشده است.

رنگ‌سنجی

مشاهده شکل 7- الف نشان می‌دهد با گذشت زمان تیرگی میوه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. این افزایش در نمونه‌های شاهد بیشتر از سایر تیمارها بوده است. Supapvanich و Tucker (2011) گزارش کردند که کاهش شاخص L^* در انتهای نمونه‌برداری به دلیل توسعه شیشه‌ای شدن در سطح میوه می‌باشد. کاهش L^* به از دست‌دهی آب بافت انگور مربوط است. با این حال به نظر می‌رسد که کاهش در L^* در این آزمایش رابطه تنگاتنگی با افزایش میزان قهوه‌ای شدن حبه‌ها داشته است. به نظر می‌رسد افزایش تجمع ترکیبات رنگی ملانین که باعث قهوه‌ای شدن بافت‌ها می‌شود موجب افزایش تیرگی رنگ حبه‌ها شده است (Artes-Hernandez & Aguayo, 2004).

با توجه به شکل 7- ب، شاخص کروما در تمامی تیمارها در طی زمان کاهش یافته است که این کاهش در شاهد بیشتر از سایر تیمارهاست. همچنین تمامی تیمارها میزان کرومای بیشتری را نسبت به شاهد نشان دادند. رحیمی و همکاران (1393) نیز به تاخیر افتادن تغییر در شاخص‌های درخشندگی L^* ، کروما و هیو انگل را در میوه‌های انگور تیمار شده با پوترسین گزارش کردند. با توجه به شکل 7- ج، در تمامی تیمارها، تغییرات رنگ کلی در طی

منابع

- رحیمی، س.، میردهقان، ح.، اسماعیلی‌زاده، م. 1393. تأثیر تیمار پوترسین به روش غوطه‌وری تحت فشار بر کیفیت پس از برداشت دو رقم انگور. نشریه علوم باغبانی ایران، جلد 45، شماره 2، 149 - 137.
- غفوری، م.، سلیمانی، ع.، ربیعی، و.، همتی، ر. 1394. تأثیر محلول‌پاشی پس از برداشت اسانس آویشن بر عمر انبارمانی و کیفیت میوه انار (رقم پوست قرمز طارم). نشریه علوم باغبانی، جلد 29، شماره 4، 555-547.
- مستوفی، ی.، دهستانی، م.، رضوی، ه. 1390. اثر کیتوزان بر افزایش عمر پس از برداشت و ویژگی‌های کیفی انگور رقم شاه‌رودی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره 8، جلد 30، 102-93.
- Abdolahi, A., Hassani, A., Ghuosta, Y., Bernousi, I. & Meshkatsadat, M.H., 2010, In vitro efficacy of four plant essential oils against *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. and *Mucor piriformis* A. Fischer. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(1), 97-107.
- Artes-Hernandez, F., Aguayo, E. & Artes, F., 2004, Alternative atmosphere treatments for keeping quality of 'autumn seedless' table grapes during long-term cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 31(1), 59-67.
- Beyki, M., Zhavah, S., Khalili, S. T., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., Bayat, M., Tabatabaei, M. & Mohsenifar, A.,

- 2014, Encapsulation of *Mentha piperita* essential oil in chitosan-cinamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops products*, 54, 310-319.
- Brummell, D.A. & Harpster, M.H., 2001, Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant molecular biology*, 47(1-2), 311-339.
- Carvajal-Millan, E., Carvallo, T., Orozco, J.A., Martinez, M.A., Tapia, I., Guerrero, V.M., Chu, A.R., Llamas, J. & Gardea, A.A., 2001, Polyphenol oxidase activity, color changes, and dehydration in table grape rachis during development and storage as affected by N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 946-951.
- Castillo, S., Navarro, D., Zapata, P.J., Guillen, F., Valero, D., Serrano, M. & Martinez-Romero, D., 2010, Antifungal efficacy of Aloe vera in vitro and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. *Postharvest Biology and technology*, 57(3), 183-188.
- Chauhan, S., Gupta, K.C. & Agrawal, M., 2014, Application of Biodegradable Aloe vera gel to control post harvest decay and longer the shelf life of Grapes. *International Journal of Current Microbiology Applied Science*, 3(3), 632-642.
- Crisosto, C.H., Garner, D. & Crisosto, G., 2002, Carbon dioxide-enriched atmospheres during cold storage limit losses from Botrytis but accelerate rachis browning of 'Redglobe' table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 26, 181-189.
- Embuscado, M.E. & Huber, K.C., 2009, Edible films and coatings for food applications. New York, NY, USA: *springer*. pp. 213-214.
- Estevinho, B.M.A.N., Rocha, F.A.N., Santos, L.M.D.S. & Alves, M.A.C., 2013a, Using water-soluble chitosan for flavour microencapsulation in food industry. *Journal of microencapsulation*, 30(6), 571-579.
- Estevinho, B.N., Rocha, F., Santos, L. & Alves, A., 2013b, Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications—A review. *Trends in Food Science and Technology*, 31(2), 138-155.
- Gray, S.J. & Hammer, K.A., 2015, Recent developments in the bioactivity of mono-and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. *Phytochemistry reviews*, 14(1), 1-6.
- Guo, P., Anderson, J.D., Bozell, J.J. & Zivanovic, S., 2016, The effect of solvent composition on grafting gallic acid onto chitosan via carbodiimide. *Carbohydrate polymers*, 140, 171-180.
- Hadian, M., Rajaei, A., Mohsenifar, A. & Tabatabaei, M., 2017, Encapsulation of Rosmarinus officinalis essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antibacterial activity in beef cutlet against *Salmonella typhimurium* during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 394-401.
- Hsieh, W.C., Chang, C.P. & Gao, Y.L., 2006, Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(2), 209-214.
- Keawchaoon, L. & Yoksan, R., 2011, Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), 163-171.
- Khalili, S.T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhavah, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A. & Tabatabaei, M., 2015, Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 502-508.
- Lee, J., Lee, C., Kim, T.H., Lee, E.S., Shin, B.S., Chi, S.C., Park, E.S., Lee, K.C. & Youn, Y.S., 2012, Self-assembled glycol chitosan nanogels containing palmityl-acylated exendin-4 peptide as a long-acting anti-diabetic inhalation system. *Journal of controlled release* 161(3), 728-734.
- Lopez-Reyes, J.G., Spadaro, D., Gullino, M.I. & Garibaldia, A., 2010, Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples in vivo. *Flavour Fragr Journal*, 25, 171-177.
- Mahdavi, S.A., Jafari, S.M., Ghorbani, M. & Assadpoor, E., 2014, Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: A review. *Drying technology*, 32(5), 509-518.
- Martin, A., Varona, S., Navarrete, A. & Cocero, M.J., 2010, Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *Open Chemical Engineering Journal*, 4(1), 31-41.
- Mlikota Gabler, F. & Smilanick, J.L., 2001, Postharvest control of table grape gray mold on detached berries with carbonate and bicarbonate salts and disinfectants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(1), 12-20.
- Mohammadi, A., Hashemi, M. & Hosseini, S.M., 2015, Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 28, 73-80.
- Mohammadrezakhani, S. & Pakkish, Z., 2015, Reduction of chilling injury and peroxide hydrogen accumulation in Thompson grape (*Vitis vinifera* L.) fruit by proline and ascorbic acid during storage. *Journal of Plant Physiology & Breeding*, 5(1), 1-12.
- Muftuoglu, F., Ayhan, Z. & Esturk, O., 2010, Modified atmosphere packaging of kabaasi apricot (*Prunus armeniaca*

- L.Kabaasi): Effect of atmosphere, packaging material type and coating on the physicochemical properties and sensory quality. *Food and Bioprocess Technology*, 12.
- Munoz, Z. & Moret, A., 2010, Sensitivity of *Botrytis cinerea* to chitosan and acibenzolar-S-methyl. *Pest management science*, 66(9), 974-979.
- Nasti, A., Zaki, N.M., de Leonardis, P., Ungphaiboon, S., Sansongsak, P., Rimoli, M. G. & Tirelli, N., 2009, Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. *Pharmaceutical research*, 26(8), 1918-1930.
- Nopwinyuwong, A., Trevanich, S. & Suppakul, P., 2010, Development of a novel colorimetric indicator label for monitoring freshness of intermediate-moisture dessert spoilage. *Talanta*, 81(3), 1126-1132.
- Nuisin, R., Krongsin, J., Noppakundilokrat, S. & Kiatkamjornwong, S., 2013, Microencapsulation of menthol by crosslinked chitosan via porous glass membrane emulsification technique and their controlled release properties. *Journal of microencapsulation*, 30(5), 498-509.
- Peng, H., Xiong, H., Li, J., Chen, L. & Zhao, Q., 2010a, Methoxy poly (ethylene glycol) -grafted-chitosan based microcapsules: Synthesis, characterization and properties as a potential hydrophilic wall material for stabilization and controlled release of algal oil. *Journal of Food Engineering*, 101, 113-119.
- Peng, H., Xiong, H., Li, J., Xie, M., Liu, Y., Bai, C. & Chen, L., 2010b, Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. *Food Chemistry*, 121(1), 23-28.
- Perrico, M., Arace, E., Corbe, M.R., Sinigagila, M. & Bevilacqua, A., 2015, Bioactivity of essential oils. A review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology*, 1-7.
- Romanazzi, G., Karabulut, O.A. & Smilanick, J.L., 2007, Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest biology and technology*, 45(1), 134-140.
- Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, F.M. & Smilanick, J.L., 2012, Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 63(1), 141-147.
- Sabounchi, S. & Massoud, R., 2016, The effects of *Zataria multiflora* essential oil on some characteristics of sultana table grapes contaminated with *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 6(1), 49-54.
- Shin, M.H., Kim, J.H., Choi, H.W., Keum, Y.S. & Chun, S.C., 2014, Effect of thymol and linalool fumigation on postharvest diseases of table grapes. *Mycobiology*, 42(3), 262-268.
- Silva, P.S., Viccini, L.F., Singulani, J.L., de Siqueira, E.P., Zani, C.L. & Alves, T.M.A., 2010, Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 20(6), 843-849.
- Supapvanich, S. & Tucker, G.A., 2011, Physicochemical changes in fresh-cut Honeydew melon fruit during storage. *African Journal of Agricultural Research*, 6(12), 2737-2742.
- Topalovic, A. & Milukovic-Petkovsek, M., 2010, Changes in sugars, organic acids and phenolics of grape berries of cultivar Cardinal during ripening. *Journal Food Agriculture Environ*, 8(3&4), 223-7.
- Valderruten, N.E., Valverde, J.D., Zuluaga, F. & Ruiz-Durántez, E., 2014, Synthesis and characterization of chitosan hydrogels cross-linked with dicarboxylic acids. *Reactive and Functional Polymers*, 84, 21-28.
- Valero, D., Valverde, J.M., Martínez-Romero, D., Guillen, F., Castillo, S. & Serrano, M., 2006, The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety and functional properties of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 41(3), 317-327.
- Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Feng, Q.L., Cui, F.Z., Xu, Y.X. & van der Werf, M., 2003, Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, 24(19), 3213-3220.

Investigation of antifungal activity of nanoencapsulation of *Thyme vulgaris* essential oil against *botrytis cinerea* in red shahroodi grape (*Vitis vinifera* CV. Red)

H. Karimi¹- H. Bodaghi^{2*}, A. Rajaei³, Sh. Mojerlou²

Received: 2018.11.03

Accepted: 2019.09.14

Introduction: Fresh grapes (*Vitis vinifera* L.) show severe lesions at the post-harvest stage and during the storage period. Decreasing the quality of grapes in the post-harvest stage limits its consumption and commercialization. Some methods such as using bio-control agents, natural antimicrobials, physical methods, disinfectants agents, GRAS, (ozone, ethanol, acetic acid) have been used to control *Botrytis cinerea* after harvest. Encapsulation of the essential oils will increase their ability by increasing the effectiveness of the essential oils. Currently, chitosan has been interested for encapsulating bioactive compounds, as they are generally known to be safe and possess superior biological properties such as biodegradability, biocompatibility and non-toxicity. The aim of this study was to encapsulate thyme essential oil in chitosan nanogels to enhance and maintain its antifungal effect against *B. cinerea* in vitro and in vitro on Shahroodi red grape.

Materials and methods: For the purpose of this study, chitosan nanogels were first prepared and the infrared spectrum of chitosan-meric acid nanogels was measured using FT-IR430 infrared spectrophotometer at 20 ° C. The morphology of chitosan-meric acid nanogels and encapsulated essential oil was analyzed by SEM. Release test was then performed to determine the release rate of thyme essential oil encapsulated in chitosan-meric acid nanogels. Effect of chitosan-meristic acid nanogels at three levels of 0, 150 and 300 µl/L, pure thyme essential oil and thyme essential oil encapsulated in chitosan-meristic acid nanogels at three levels of 0, 75 and 150 µl / L in vitro and on the shelf life of grape fruits was studied under modified atmospheric conditions during 72 days storage at 2 to 4 °C. During storage, some traits such as firmness by manual penetrometer, electrical conductivity of fruit tissue, some components of fruit skin color and soluble solids were assessed by a refractometer.

Results and discussion: Infrared spectroscopy (FTIR) results confirmed the successful coupling between chitosan amin groups and carboxylic acid-meristic acid groups and scanning electron microscopy image showed that the particle size of chitosan-meric acid nanogel was than 100 nm. The Comparison of the particle size in the present study with the previous studies on the size of chitosan-meric acid nanogels was smaller and more uniform. These differences could be related to several reasons, transform the long chitosan chain into smaller fragments by initial sonication, the important role of ultrasound in the reduction of the particle size and passing the nanogels through the filter. Release test showed that the diffusion of thyme essential oil from chitosan-meric acid nanogels has a two-step process. The chitosan-meric acid nanogels prepared in this study have hydrophilic (chitosan polymer) and hydrophilic (meristic acid fatty acid chain) regions, which led to the gradual release of thyme essential oil due to their hydrophobic nature. The results of the infected packaged berries confirmed that with increasing concentration of thyme essential oil, the antifungal effect was also increased. Evaluation of the effects of essential oil and nanogels - essential oils on grape berries infected with pathogenic spores showed the highest number of spores in control treatment (10.125×10^5 per ml) and the lowest number in NE2 (1.375×10^5 per ml) were observed. Coating treatments of chitosan-meric acid nanogel and thyme essential oil encapsulated in chitosan-meric acid nanogels showed better results at higher concentrations, but in the case of essential oil, lower spores were observed. The lowest electrical conductivity and discoloration, the highest L* component and chroma index were observed in thyme essential oil treatment with concentration of 75 µl/l. The results showed that the lower concentrations of the essential oil in the control of *botrytis cinerea* was better than the pure essential oils, whereas in the experiments on the storage of grape fruit, the treatment of thyme essential oil with a concentration of 75 µl/l It showed the most favorable result. Based on the results of the present study, the effect of essential oil nano-gel and essential oil alone on the shelf life after harvesting of grapes packed with polyethylene film confirmed that the essential oil performance was better than the essential oil nanogel. The lower performance of the essential oil nanogel than that of the essential oil alone can be due to inhibition of the essential oil diffusion through the packaging film while, the encapsulated essential oil release slower than the essential oil alone, it is likely to have an effect longer than expected in this study for the storage period of the grape. Considering this case and the antimicrobial

(* - Corresponding Author Email: hbodaghi@shahroodut.ac.ir)

capability of essential oil nanogel, it is necessary to investigate the effect of essential oil nanogel compared to essential oil on longevity of grapes for a longer of storage period.

Key words: Nanoencapsulation; anti-fungal; Thyme essential oil; *Botrytis cinerea*; grape