

تأثیر پوشش‌های خوراکی بر حفظ ترکیب‌های زیست‌فعال و طولانی کردن دوره نگهداری اناردانه رقم رباب نی‌ریز

اصغر رمضانیان^{۱*}، پگاه احمدی^۲ و فریبرز حبیبی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۸)

چکیده

در این پژوهش، تأثیر پوشش‌های خوراکی کیتوزان، نانوکیتوزان، متیل سلولز و پکتین بر حفظ ترکیب‌های زیست‌فعال و افزایش ماندگاری اناردانه رقم رباب نی‌ریز (*Punica granatum* L. cv. Rabbab-e-Neyriz) بررسی شد. اناردانه‌ها با محلول کیتوزان ۱/۵ درصد، متیل سلولز ۳ درصد، پکتین ۳ درصد و نانوکیتوزان خالص (۱۰۰ درصد) پوشانده شدند و در دمای ۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ روز نگهداری و با فاصله زمانی هر چهار روز یکبار ارزیابی شدند. در پایان ۱۶ روز نگهداری در دمای ۵ درجه سلسیوس در همه نمونه‌ها به‌جز نمونه‌های تیمار شده با کیتوزان ۱/۵ درصد، آلودگی قارچی مشاهده شد. بیشترین و کمترین کاهش وزن اناردانه‌ها به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار کیتوزان ۱/۵ درصد به دست آمد. پوشش‌های خوراکی به‌ویژه کیتوزان به‌طور معنی‌داری از کاهش میزان آنتوسیانین کل و اسید آسکوربیک اناردانه‌ها جلوگیری کردند. فنول کل و فعالیت پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) آب‌میوه در مدت انبارداری کاهش یافت، هرچند پوشش کیتوزان به‌طور معنی‌داری باعث حفظ ترکیب‌های زیست‌فعال شد. پوشش‌های خوراکی به‌ویژه کیتوزان باعث حفظ مواد جامد محلول، اسیدیته کل و شاخص طعم آب‌میوه در مقایسه با شاهد شد. در کل، تیمار کیتوزان به‌طور مؤثری باعث کاهش از دست دادن آب، کاهش ضایعات اناردانه‌ها و حفظ ترکیب‌های زیست‌فعال در مدت انبارداری شد.

واژه‌های کلیدی: اسید آسکوربیک، آنتوسیانین، شاخص طعم، فعالیت پاداکسندگی، فنول کل.

Effect of edible coatings on maintenance of bioactive compounds and increasing the storability of pomegranate aril cv. Rabbab-e-Neyriz

Asghar Ramezani^{1*}, Pegah Ahmadi² and Fariborz Habibi³

1, 2, 3. Associate Professor, Former M.Sc. Student and Ph.D. Candidate, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
(Received: Nov. 13, 2016 - Accepted: Feb. 6, 2017)

ABSTRACT

In this research, the effect of chitosan, nano-chitosan, methylcellulose, and pectin on maintenance of bioactive compounds and storability of pomegranate aril cv. Rabbab-e-Neyriz were studied during storage time. Arils were treated with 1.5% chitosan, 3% methylcellulose, 3% pectin and pure nano-chitosan (100%) solutions and then stored at 5 °C for 16 days and sampling of stored arils was done at 4 days intervals. After 16 days of storage at 5 °C, fungal contamination was observed in all samples except for those treated with 1.5% chitosan. The most and the least weight loss in arils obtained in the control and those treated with 1.5% chitosan, respectively. The edible coatings especially chitosan significantly prevented from degradation of anthocyanin and ascorbic acid. Total phenol and antioxidant activity of juice decreased during storage; however chitosan coating significantly led to maintain these bioactive compounds. Edible coating treatments and especially chitosan maintained the TSS, TA, flavor index in comparison with control. Overall, chitosan effectively reduced water loss, aril losses and maintained bioactive compounds during storage.

Keywords: Anthocyanin, antioxidant activity, ascorbic acid, flavor index, total phenol.

* Corresponding author E-mail: ramezani@shirazu.ac.ir

مقدمه

انار با نام علمی *Punica granatum* L. از تیره Punicaceae است که در مناطق گرمسیری تا نیمه گرمسیری رشد می‌کند (Ramezani et al., 2009). اناردانه‌ها (قسمت خوراکی میوه انار) حدود ۵۲ درصد وزن میوه را تشکیل می‌دهند که شامل ۷۸ درصد آب‌میوه و ۲۲ درصد بذر هستند. اناردانه‌ها منبع غنی از قندها، پکتین، اسید آسکوربیک، اسیدهای آمینه، املاح کانی، فیبرها، فیتواستروژن و فلاونوئیدها هستند (Ozgen et al., 2008). همهٔ فعالیت‌های پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) انار به حضور ترکیب‌های فنولی پر شمار مانند ایزومرهای پونیکالاژین، مشتقات اسید الازیک و آنتوسیانین‌های ۳-گلیکوزید و ۳ و ۵ دی‌گلیکوزید (دلفینیدین، سیانیدین و پلارگونیدین) و فلاونوئیدها (کوئرستین و کامپفرول) مرتبط است، که این ترکیب‌ها در جذب رادیکال‌های آزاد نقش دارند و از اکسایش (اکسیداسیون) چربی (لیپید)ها جلوگیری می‌کنند (Al-Maiman & Ahmad, 2002). محتوای ترکیب‌های زیست‌فعال آب انار به ژنتیک، بلوغ میوه، شرایط محیطی، شرایط انبار و تیمارهای پس از برداشت بستگی دارد (Varasteh et al., 2012).

پوشش‌های خوراکی لایهٔ نازکی از مواد هستند که سدی در برابر انتقال رطوبت، اکسیژن و مواد حل‌شده در غذا ایجاد می‌کنند و می‌توانند توسط مصرف‌کننده خورده شوند. به کار بردن پوشش‌های نیمه نفوذپذیر عمر نگهداری محصولات فاسدشدنی را افزایش می‌دهد. بسیاری از اعمال فیلم‌های خوراکی همانند فیلم‌های بسته‌بندی ساختی (سنتری) هستند و انتقال رطوبت، اکسیژن، دی‌اکسید کربن و نمک‌ها را محدود می‌کنند (Yaman & Bayoindirli, 2002).

کیتوزان یک کopolیمر از گلوکز آمین و ان-استیل گلوکز آمین است که با ان-دی‌استیلاسیون^۱ کیتین تولید شده است. منابع طبیعی این پلیمر، ساختار اسکلتی سخت‌پوستان، حشرات و دیوارهٔ یاخته‌ای بعضی از باکتری‌ها و قارچ‌ها است. این پلیمر به‌صورت صنعتی از دی‌استیله کردن ضایعات میگو و پوست

خرچنگ تهیه می‌شود (Yen et al., 2009). متیل سلولز یک ترکیب شیمیایی است که به‌صورت طبیعی وجود ندارد و با متیله کردن حدود ۳۰ درصد گروه‌های هیدروکسیل در سلولز به دست می‌آید. این ترکیب در آب سرد حل می‌شود و محلولی شفاف تولید می‌کند، ولی در آب داغ نامحلول است و با افزایش دما به محلول اشباع متیل سلولز تبدیل شده و به‌صورت ته‌نشست از محلول خارج می‌شود. پکتین یکی از پرکاربردترین ترکیب‌ها در صنایع غذایی است. پکتین برای نخستین بار از سیب به دست آمد. محلول پکتین با متوکسیل پایین در سطح مادهٔ غذایی به‌کاربرده می‌شود. پوشش‌های ژل‌مانند پکتینات از کاهش آب در مادهٔ غذایی جلوگیری می‌کند (Dhall, 2013).

تأثیر پوشش کیتوزان بر ماندگاری اناردانه و آلودگی میکروبی انار رقم طارم بررسی شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد، پوشش کیتوزان از رشد باکتری و قارچ در سطح اناردانه‌ها جلوگیری کرد. میزان آب اناردانه‌ها پوشش داده‌شده با ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان در طول ۱۲ روز انبارمانی حفظ شد. کیتوزان بازدارندهٔ افزایش مواد جامد محلول (TSS) و اسیدیتهٔ قابل عیار (TA) اناردانه‌ها در طول انبارمانی شد. کمترین TSS و TA در اناردانه‌های پوشش داده‌شده با ۰/۵ و ۱ درصد کیتوزان اندازه‌گیری شد. همچنین، استفاده از کیتوزان از کاهش فنل کل، آنتوسیانین کل و ظرفیت پاداکسندگی در طول انبارداری جلوگیری کرد (Ghasemnezhad et al., 2013).

در تحقیقی کیفیت فراوری‌های حداقلی نژادگان (ژنوتیپ)های مختلف انار ایران در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۴ روز بررسی شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد، در پایان زمان انبارمانی، تفاوت معنی‌داری بین نژادگان‌ها در میزان آلودگی میکروبی اناردانه‌ها، TSS، TA، آنتوسیانین کل، کاتچین و محتوای کورستین مشاهده شد. درحالی‌که هیچ تفاوت معنی‌داری بین نژادگان‌های مورد بررسی در فعالیت پاداکسندگی، فنول کل و میزان فلاونوئید مشاهده نشد (Ghasemnezhad et al., 2015).

تحقیق در مورد استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی در سال‌های اخیر افزایش یافته و به‌عنوان

$$= \text{درصد کاهش وزن} \\ \times 100 = \frac{\text{وزن زمان نمونه برداری} - \text{وزن اولیه قبل از انبار}}{\text{وزن اولیه قبل از انبار}}$$

میزان مواد جامد محلول (TSS) آب انار با استفاده از دستگاه شکست سنج (رفراکتومتر) دیجیتالی (ATC1E, ATAGO, Japan) اندازه گیری و بر اساس درصد (/) گزارش شد. اسیدیته قابل عیار با روش عیارسنجی (TA) با سود ۰/۱ نرمال اندازه گیری شد (Sayyari *et al.*, 2011). میزان آنتوسیانین کل به روش اختلاف جذب در pHهای مختلف اندازه گیری شد (Rapisarda *et al.*, 2000).

میزان ویتامین ث به روش طیفسنج نوری (اسپکتروفتومتر، SPECTRONIC, USA) اندازه گیری شد (Klein & Perry, 2006). برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از آب میوه با ۱۰ میلی لیتر اسید متافسفریک ۱ درصد مخلوط شد. ۱ میلی لیتر از محلول حاصل با ۹ میلی لیتر ۲ و ۶ دی کلرو فنول ایندوفنول ۵۰ میکرومولار برای چند ثانیه با همزن انگشتی تکان داده شد و سپس میزان جذب در طول موج ۵۱۵ نانومتر با استفاده از دستگاه طیفسنج نوری ثبت شد. برای تهیه منحنی استاندارد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر از استاندارد اسید آسکوربیک به روش بالا تهیه شد و میزان جذب در طول موج ۵۱۵ نانومتر خوانده شد. بلنک آب مقطر بود. ضریب همبستگی شکل استاندارد $R^2 = 0.9283$ بود. اعداد به دست آمده بر حسب میلی گرم اسید آسکوربیک در ۱۰۰ گرم وزن تر گزارش شد. شاخص بلوغ یا طعم میوه (TSS/TA) با تقسیم میزان مواد جامد محلول بر میزان اسیدیته قابل عیار محاسبه شد. مواد فنولی کل با استفاده از روش فولین سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu) اندازه گیری شد (Meyers *et al.*, 2006). میزان فعالیت پاداکسندگی عصاره میوه ها به روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) اندازه گیری شد (Cam *et al.*, 2009) و توسط رابطه زیر محاسبه شد:

$$\%DPPHsc = \frac{A_{cont} - A_{samp}}{A_{cont}} \times 100$$

روشی جدید برای کاهش ضایعات، حفظ کیفیت و افزایش عمر انباری محصولات برش داده شده تازه مطرح است. با توجه به موارد یادشده، هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر پوشش های خوراکی کیتوزان، نانوکیتوزان، متیل سلولز و پکتین بر ترکیب های زیست فعال و ماندگاری اناردانه انار رباب نی ریز در دوره انبارداری بوده است.

مواد و روش ها

به منظور انجام این پژوهش، انار رقم رباب نی ریز در حدود اواسط آبان ماه سال ۱۳۹۱ در زمان رسیدن تجاری برداشت و میوه های سالم به آزمایشگاه فیزیولوژی پس از برداشت بخش علوم باغبانی منتقل شد. با استفاده از یک چاقوی فولادی ضد زنگ، میوه ها به صورت عمودی برش داده شد و اناردانه ها گردآوری شد.

شمار چهارصد بسته ۱۵۰ گرمی اناردانه استفاده شد. تیمارهای مورد استفاده شامل شاهد (بدون هیچ گونه پوشش خوراکی)، پوشش اول (۳ درصد پکتین+۴۵ درصد گلیسرول+۴۰ درصد روغن خوراکی)، پوشش دوم (۳ درصد متیل سلولز+۴۵ درصد گلیسرول+۴۰ درصد روغن خوراکی)، پوشش سوم (۱/۵ درصد کیتوزان در ۱ درصد اسید استیک ۱۰ نرمال) و پوشش چهارم (نانوکیتوزان خالص تهیه شده از شرکت نانو صنعت اصفهان) بود. اناردانه ها پس از غوطه وری به مدت ۵ دقیقه، در هوای معمولی خشک شد و سپس در سردخانه با دمای ۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 90 ± 5 درصد به مدت ۱۶ روز قرار داده شدند.

این پژوهش به صورت فاکتوریل (پوشش های خوراکی و زمان نمونه برداری) در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. هر تکرار شامل چهار بسته ۱۵۰ گرمی اناردانه بود. نمونه گیری از اناردانه ها به فاصله زمانی ۴ روز صورت گرفت.

پیش از قرار دادن نمونه ها در سردخانه و همچنین در زمان نمونه برداری، وزن میوه های هر تکرار توسط ترازوی دیجیتالی اندازه گیری و ثبت شد. میزان کاهش وزن به صورت درصد کاهش وزن نسبت به وزن اولیه توسط رابطه زیر محاسبه شد:

کیتوزان در یاخته میزبان (عامل‌های فارچی) به‌عنوان یک عامل پیوندکننده آب عمل می‌کند و آنزیم‌های مختلف را از عمل باز می‌دارد. پیوند کیتوزان با DNA و بازداشتن ساخت mRNA از طریق نفوذ کیتوزان در هسته ریزجانداران و تداخل با ساخت mRNA و پروتئین‌ها صورت می‌گیرد (Shahidi *et al.*, 1999). وجود مواد محافظ در فیلم‌های کیتوزان، دافعه الکترواستاتیکی بین مولکولی در مولکول‌های کیتوزان را کاهش می‌دهند و تشکیل پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی را آسانگری می‌کنند (Dhall, 2013).

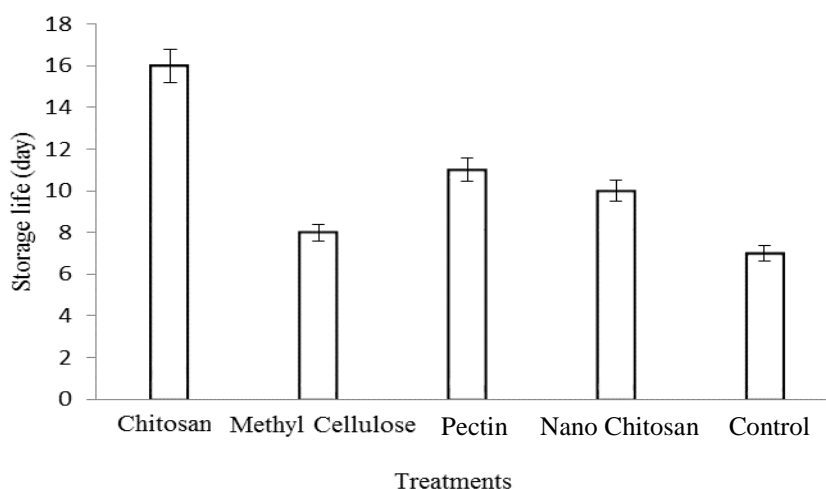
نتایج تغییرپذیری وزن اناردانه‌ها در دوره انبارداری در همه تیمارها روند کاهشی داشت (جدول ۱). هر چه زمان نگهداری افزایش یافت، درصد کاهش وزن نیز بیشتر شد. سرعت کاهش وزن در نمونه‌های شاهد بیشتر از نمونه‌های تیمار شده بود و پوشش دادن اناردانه‌ها با پوشش‌های خوراکی به‌طور قابل‌توجهی از کاهش وزن در دوره انبارداری جلوگیری کرد. پس از هشت روز نگهداری اناردانه‌ها در سردخانه (در مرحله دوم اندازه‌گیری)، بیشترین کاهش وزن در نمونه‌های تیمار متیل سلولز (۲/۲۱ درصد) مشاهده شد. در مرحله سوم اندازه‌گیری، نمونه‌های پوشش داده‌شده با کیتوزان ۱/۵ درصد کمترین کاهش وزن (۱/۸۵ درصد) مشاهده شد (جدول ۱). پوشش‌های خوراکی پکتین پس از کیتوزان بهترین تأثیر را روی کاهش وزن نمونه‌ها داشتند (جدول ۱).

واکوی داده‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

در طول مدت انبارداری مشاهده نشانه‌های ظاهری رشد قارچ به‌عنوان ایجاد آلودگی در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۱۶ روز در همه نمونه‌ها به‌جز نمونه‌های تیمار شده با کیتوزان ۱/۵ درصد، آلودگی قارچی مشاهده شد. در نمونه‌های شاهد زودتر از دیگر نمونه‌ها و پس از ۷ روز آلودگی مشاهده شد. در اناردانه‌های تیمار شده با متیل سلولز، نانوکیتوزان و پکتین به ترتیب پس از ۸، ۱۰ و ۱۱ روز انبارداری آلودگی مشاهده شد (شکل ۱).

فعل و انفعال بین مولکول‌های کیتوزان دارای بار مثبت و غشاهای یاخته‌ای میکروبی دارای بار منفی منجر به نشت پروتئین‌ها و دیگر اجزای یاخته‌ای می‌شود. سازوکار دقیق فعالیت ضد میکروبی کیتوزان و مشتقات آن‌ها هنوز نامشخص است، اما کیتوزان به‌عنوان یک عامل کلات‌کننده عمل می‌کند که به‌طور انتخابی با فلزها پیوند می‌دهد و به‌این ترتیب از تولید مواد سمی و رشد میکروبی جلوگیری می‌کند.



شکل ۱. مقایسه تأثیر پوشش‌های خوراکی مختلف بر ماندگاری اناردانه‌های رقم رباب نی‌ریز در طول مدت انبارداری در دمای ۵ °C و رطوبت نسبی ۹۰±۵ درصد

Figure 1. Comparison of the effect of different edible coatings on storage life of pomegranate aril cv. Rabbab-e-Neyriz at 5 °C and 90±5% RH

کاهش یافت. همه پوشش‌های خوراکی به‌طور معنی‌داری باعث کند شدن سرعت کاهش آنتوسیانین کل شدند. در پایان دوره انبارداری بیشترین میزان آنتوسیانین در تیمارهای کیتوزان (۷۶۴/۴۶ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین میزان آنتوسیانین در نمونه‌های تیمار پکتین (۷۱۳/۵۳۶ میلی‌گرم در لیتر) در مرحله چهارم اندازه‌گیری (روز ۱۲ انبارداری) ثبت شد (جدول ۲).

پوشش‌های خوراکی با کاهش از دست‌دهی آب، کاهش اکسیژن در دسترس برای فعالیت آنزیم‌ها و ایجاد اتمسفر تغییریافته باعث کند شدن تخریب آنتوسیانین‌ها می‌شوند. همچنین دمای پایین باعث کاهش از دست‌دهی آب و کند کردن سوخت‌وساز یاخته‌ای و فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده آنتوسیانین‌ها در دوره انبارداری می‌شود (Varasteh et al., 2012). کاهش آنتوسیانین اناردانه‌ها به میزان آب زدایی (دهیدراته شدن) آن‌ها در دوره انبارداری بستگی دارد (Ramezani et al., 2010). کیتوزان با حفظ تعادل اتمسفر و جلوگیری از فعالیت آنزیمی، از تشکیل آنتوسیانیدین بی‌رنگ جلوگیری کرده و دهیدراته شدن آنتوسیانین را کاهش می‌دهد و باعث کند شدن سرعت تخریب آنتوسیانین می‌شود (Varasteh et al., 2012).

نتایج همسان در این مورد در دوره نگهداری انار رقم آساریا در فرایند مدت نگهداری در دمای ۵ درجه سانتیگراد سلسیوس گزارش شده است. کیتوزان به‌طور معنی‌داری تخریب آنتوسیانین‌ها را به تأخیر انداخت و با افزایش غلظت، تأثیر مثبت آن افزایش یافت.

فرآوری‌های حداقلی پس از برداشت^۱ مانند برش زدن، قطعه‌قطعه کردن و دانه کردن میوه‌ها سبب حذف لایه اپیدرم طبیعی و افزایش سطح بافت‌هایی که در معرض هوای آزادند می‌شود. این امر سبب افزایش تعرق و در نتیجه کاهش وزن می‌شود (Tulinoz & Ulukanli, 2011). در نتیجه از دست دادن آب، کیفیت میوه به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌گیرد که نخستین نشانه‌های آشکار آن، پژمردگی و چروکیدگی است (Bico et al., 2009). محدوده قابل‌پذیرش کاهش وزن اناردانه‌ها بین ۴-۶ درصد است (Bico et al., 2009). در این پژوهش اگرچه در پایان زمان انبارداری میزان کاهش وزن اناردانه‌های شاهد از این میزان تجاوز نکرد، اما میزان کاهش وزن اناردانه‌ها می‌تواند نشان‌دهنده آغاز فساد باشد. در نتایج پژوهشی نشان داده شد، میوه‌های توت‌فرنگی و انگور فرنگی قرمز پوشش داده‌شده با کیتوزان، به‌طور معنی‌داری کاهش وزن کمتری در دوره انبارداری در دمای ۲ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۸۸ درصد داشتند (Hana et al., 2004).

نتایج ارزیابی آنتوسیانین کل اناردانه‌ها در دوره انبارداری در تیمارهای مختلف نشان داد، میزان آنتوسیانین تحت تأثیر تیمارهای به‌کاررفته و زمان انبارداری قرار گرفت و در طول دوره انبارداری روند کاهش داشت (جدول ۲). هرچند پس از ۴ روز انبارداری میزان آنتوسیانین اناردانه‌ها افزایش نشان داد و این افزایش در نمونه‌های پوشش داده‌شده با پکتین بیشتر از دیگر نمونه‌ها بود، اما پس از آن تا پایان دوره انبارداری

جدول ۱. اثر پوشش‌های خوراکی مختلف بر کاهش وزن (درصد) اناردانه رقم رباب نی‌ریز در طول مدت انبارداری در دمای ۵ °C و رطوبت نسبی ۹۰±۵ درصد.

Table 1. Effect of different edible coatings on weight loss (%) of pomegranate aril cv. Rabbab-e-Neyriz during storage at 5 °C and 90±5% RH.

Treatment	Storage time (day)		
	4	8	12
Chitosan	1.24 st	1.49 ^f	1.85 ^c
Methyl cellulose	2 ^{ab}	2.21 ^a	Decay
Pectin	1.54 ^{ef}	1.75 ^d	2.18 ^g
Nano chitosan	1.59 ^e	1.86 ^c	Decay
Control	1.87 ^c	Decay	Decay

* میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

* Means with similar letters are not significantly different at 5% level of probability.

1. Postharvest minimally processing

جدول ۲. تأثیر پوشش‌های خوراکی مختلف بر میزان آنتوسیانین کل (میلی‌گرم در لیتر) اناردانه رقم رباب نی‌ریز در طول مدت انبارداری در دمای ۵ °C و رطوبت نسبی ۹۰±۵ درصد

Table 2. Effect of different edible coating treatments on total anthocyanin content (mg/L) of pomegranate aril cv. Rabbab-e-Neyriz during storage at 5 °C and 90±5% RH

Treatment	Storage time (Day)			
	0	4	8	12
Chitosan	902 ^{ce}	949.25 ^b	814.28 ^d	764.46 ^e
Methyl cellulose	902 ^c	892.8 ^c	788.81 ^e	Decay
Pectin	902 ^c	983 ^a	835.43 ^d	713.36 ^f
Nano chitosan	902 ^c	920.25 ^c	834 ^d	Decay
Control	902 ^c	837.75 ^d	Decay	Decay

* میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

* Means with similar letters are not significantly different at 5% level of probability.

ویتامین ث (اسید آسکوربیک) در طول دوره انبارداری در همه تیمارها کاهش یافت (جدول ۴). سرعت کاهش میزان ویتامین ث در مرحله سوم اندازه‌گیری نسبت به دیگر مراحل اندازه‌گیری بیشتر بود. پیش از آغاز دوره انبارداری نمونه‌ها در سردخانه میزان ویتامین ث اناردانه‌ها ۱۹/۲۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر بود. بیشترین میزان ویتامین ث در مرحله چهارم اندازه‌گیری از نمونه‌های پوشیده شده با کیتوزان ۶/۷۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر ثبت شد. پس از کیتوزان، در مرحله سوم اندازه‌گیری پوشش خوراکی نانوکیتوزان (۶/۹۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر) بهترین تأثیر را روی حفظ میزان ویتامین ث نمونه‌ها داشت. در این پژوهش اناردانه‌های تیمار شده با پکتین به سرعت ویتامین ث خود را از دست دادند. در مرحله چهارم اندازه‌گیری (روز دوازدهم) کمترین میزان ویتامین ث برای نمونه‌های پوشیده شده با پکتین به میزان ۱/۲۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر ثبت شد (جدول ۴).

حفظ ویتامین ث به‌عنوان یک ترکیب زیست‌فعال، با جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های مرتبط با اکسایش آن صورت می‌گیرد (Pierce & Kader, 2003). افزون بر این، اکسایش اسید آسکوربیک به عامل‌های مختلفی مانند نور، گرما، مواد کانی، اکسیژن در دسترس و pH نیز بستگی دارد. در این پژوهش کاهش از دست‌دهی ویتامین ث احتمال دارد به علت غلظت پایین اکسیژن در نمونه‌های پوشیده‌شده با کیتوزان باشد. کاهش اکسیژن باعث کاهش سرعت اکسایش ویتامین ث می‌شود (Ayranci & Tune, 2004). میزان نفوذپذیری پوشش‌های مختلف به اکسیژن متفاوت است و تفاوت

مواد فنولی کل آب‌میوه در همه تیمارها در طول دوره انبارداری روند کاهشی داشت (جدول ۳). هرچند مواد فنولی کل در طی ۴ روز اول در تیمارهای کیتوزان، نانوکیتوزان و پکتین افزایش اندکی نشان دادند، اما پس از آن تا پایان دوره آزمایش کاهش یافتند. پوشش دادن اناردانه‌ها با پوشش‌های خوراکی به‌طور معنی‌داری سرعت تخریب مواد فنولی را کاهش داد. میانگین غلظت مواد فنولی کل در اناردانه‌ها پیش از آغاز دوره انبارداری ۲۹۸۶/۵ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در لیتر آب‌میوه بود. در مرحله چهارم اندازه‌گیری (روز دوازدهم) میزان مواد فنولی کل در آب اناردانه‌های تیمار شده با کیتوزان و پکتین به ترتیب ۲۸۹۶ و ۲۵۴۷/۳ میلی‌گرم در لیتر بود، در حالی که میزان مواد فنولی کل در آب‌میوه تیمار شاهد در مرحله دوم (روز چهارم) ۱۸۳۷/۸ میلی‌گرم در لیتر بود. بیشترین میزان مواد فنولی کل در مرحله چهارم اندازه‌گیری در تیمار کیتوزان مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار پکتین نداشت (جدول ۳).

پراکسیده شدن غشای پلاسمایی و از دست دادن آب منجر به از دست رفتن سریع تمامیت غشا شده و باعث نشت ترکیب‌های فنولی از واکوئل می‌شود. در نتیجه آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز در تماس با بستره (سوبسترا) قرار گرفته و واکنش اکسیدشدن مواد فنولی تسریع شده و واکنش قهوه‌ای شدن در حضور اکسیژن آغاز می‌شود (Aydin & Kadioglu, 2001). در این پژوهش تیمار کیتوزان بهترین تأثیر را در حفظ مواد فنولی کل در اناردانه‌ها داشت، گرچه تفاوت معنی‌داری با پوشش خوراکی پکتین نداشت. در واقع کیتوزان مراحل پراکسیده شدن چربی‌های غشا را کند کرد (Li & Yu, 2000).

بستگی دارد (Ramezani et al., 2010). مواد جامد محلول کل (TSS) اناردانه‌ها در دوره انبارداری، روند افزایشی داشت (جدول ۶). پیش از آغاز دوره انبارداری اناردانه‌ها، میزان TSS اناردانه‌ها ۱۵/۵ درصد بود و پس از ۴ روز در همه تیمارها این میزان افزایش یافت. میزان TSS اناردانه‌ها با افزایش دوره ماندگاری تغییرپذیری بیشتری نشان داد. هرچند کمترین میزان افزایش در تیمار متیل سلولز به میزان ۱۵/۸۷ درصد بود، اما میوه‌های این تیمار در مرحله چهارم اندازه گیری بازارپسندی خود را به دلیل آلودگی قارچی از دست دادند (جدول ۶).

در تجزیه و کاهش میزان ویتامین ث می‌تواند ناشی از این ویژگی باشد. فعالیت پاداکسندگی کل آب اناردانه‌ها در طول دوره انبارداری در همه تیمارها روند کاهشی داشت (جدول ۵). در مرحله دوم اندازه‌گیری، میزان فعالیت پاداکسندگی کل تیمارهای کیتوزان و پکتین آب‌میوه افزایش ناچیزی نشان دادند، اما پس از آن تا پایان دوره انبارداری از میزان فعالیت پاداکسندگی کل کاسته شد (جدول ۵). بررسی الگوی تغییرپذیری فعالیت پاداکسندگی با افزایش دوره انبارداری، نشان‌دهنده آن است که فعالیت پاداکسندگی به میزان فنول و اسید آسکوربیک

جدول ۳. تأثیر تیمارهای پوشش خوراکی مختلف بر میزان مواد فنولی کل (mg GAE/L) اناردانه رقم رباب نیریز در طول مدت انبارداری در دمای ۵ °C و رطوبت نسبی ۹۰±۵ درصد

Table 3. Effect of different edible coating treatments on total phenol content (mg GAE/L) of pomegranate aril cv. Rabbab-e-Neyriz during storage at 5 °C and 90±5% RH

Treatment	Storage time (Day)			
	0	4	8	12
Chitosan	2986.5 ^{ab}	3132.9 ^b	2288.3 ^d	2896.3 ^b
Methyl cellulose	2986.5 ^{ab}	2840.1 ^{bc}	1927.9 ^{ef}	Decay
Pectin	2986.5 ^{ab}	3121.6 ^a	3001.6 ^d	2547.3 ^{bc}
Nano chitosan	2986.5 ^{ab}	3150.6 ^a	2951.6 ^a	Decay
Control	2986.5 ^{ab}	1837.8 ^f	Decay	Decay

* میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

* Means with similar letters are not significantly different at 5% level of probability.

جدول ۴. تأثیر تیمارهای پوشش خوراکی مختلف بر میزان ویتامین ث (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر) اناردانه رقم رباب نیریز در طول مدت انبارداری در دمای ۵ °C و رطوبت نسبی ۹۰±۵ درصد

Table 4. Effect of different edible coating treatments on vitamin C (mg/100 gr FW) of pomegranate aril cv. Rabbab-e-Neyriz during storage at 5 °C and 90±5% RH

Treatment	Storage time (Day)			
	0	4	8	12
Chitosan	19.29 ^{a*}	17.65 ^b	8.56 ^c	6.77 ^f
Methyl cellulose	19.29 ^a	16.61 ^c	4.97 ^e	Decay
Pectin	19.29 ^a	6.68 ^f	3.65 ^h	1.22 ⁱ
Nano chitosan	19.29 ^a	18.95 ^a	6.92 ^f	Decay
Control	19.29 ^a	14.72 ^d	Decay	Decay

* میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

* Means with similar letters are not significantly different at 5% level of probability.

جدول ۵. تأثیر تیمارهای پوشش خوراکی مختلف بر فعالیت پاداکسندگی (٪) اناردانه رقم رباب نیریز در طول مدت انبارداری در دمای ۵ °C و رطوبت نسبی ۹۰±۵ درصد

Table 5. Effect of different edible coatings on antioxidant activity (%) of pomegranate aril cv. Rabbab-e-Neyriz during storage at 5 °C and 90±5% RH

Treatment	Storage time (Day)			
	0	4	8	12
Chitosan	70.47 ^{b*}	71.17 ^b	61.79 ^g	58.64 ^{de}
Methyl cellulose	70.47 ^b	66.09 ^c	58.98 ^{de}	Decay
Pectin	70.47 ^b	75.62 ^a	65.42 ^c	56.65 ^e
Nano chitosan	70.47 ^b	59.94 ^d	53.16 ^f	Decay
Control	70.47 ^b	53.43 ^f	Decay	Decay

* میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

* Means with similar letters are not significantly different at 5% level of probability.

کامروزا نگهداری شده در انبار سرد تحت تأثیر پوشش خوراکی کیتوزان-اسید اولئیک را بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که TSS میوه‌ها تغییر معنی‌داری در دوره انبارداری نداشت و نمونه‌ها تحت تأثیر پوشش‌ها قرار نگرفتند.

اسیدیته قابل عیار (TA) در انارخانه‌ها روند کاهشی در طول دوره انبارداری داشت (جدول ۷). لازم به یادآوری است که پس از جداسازی انارخانه‌ها و پیش از آغاز دوره انبارداری میزان TA ۱/۹۳ درصد بود و پس از ۴ روز انبارداری در مورد همه تیمارها کاهش پیدا کرد. در پایان دوره انبارداری کمترین میزان TA مربوط به نمونه‌های تیمار شده با پکتین (۱/۶۶ درصد) بود. در پایان مدت انبارداری بیشترین میزان TA در میوه‌های پوشش داده شده با کیتوزان (۱/۷۸ درصد) اندازه‌گیری شد (جدول ۷). برنامه‌های کاربردی پس از برداشت مانند پوشش‌دهی سبب کاهش میزان تنفس محصولات می‌شود و در نتیجه اسیدهای آلی انارخانه‌ها کمتر در واکنش‌های آنزیمی تنفس مصرف می‌شود (Bico *et al.*, 2009).

میزان پایین TSS در تیمار شاهد احتمال دارد به دلیل افزایش تنفس در میوه‌های شاهد در مقایسه با تیمارهای پوشش خوراکی باشد (D'Aquino *et al.*, 2010). کمترین میزان TSS در آخرین مرحله مربوط به تیمار کیتوزان (۱۷/۳۷ درصد) است که تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های تیمار شده با پکتین نداشت. نتایج آزمایش‌ها نشان داده است، میزانی نوسان در میزان مواد جامد محلول و محتوای قند، به‌ویژه در دمای معمولی وجود دارد که تا حد زیادی به غلظت پوشش‌دهنده‌ها، دما و مدت انبارداری بستگی دارد (Yaman & Bayoindirli, 2002). افزایش میزان TSS به احتمال زیاد در نتیجه تغلیظ آب‌میوه و ناشی از دست دادن رطوبت بوده است (Pierce & Kader, 2003). پوشش‌های خوراکی به‌واسطه ایجاد یک بازدارنده در برابر عبور گازها باعث کاهش تنفس، تلفات آب‌میوه، تبادل‌های گازی و فعالیت‌های سوخت‌وسازی (متابولیکی) می‌شوند و تثبیت مواد جامد محلول را به همراه دارد (Ayranci & Tune, 2004). Vargas *et al.* (2006) کیفیت توت‌فرنگی‌های

جدول ۶. تأثیر تیمارهای پوشش خوراکی مختلف بر مواد جامد محلول (%/ انارخانه رقم رباب نی‌ریز در طول مدت انبارداری در دمای ۵ °C و رطوبت نسبی ۹۰±۵ درصد

Table 6. Effect of different edible coating treatments on TSS (%) of pomegranate aril cv. Rabbab-e-Neyriz during storage at 5 °C and 90±5% RH

Treatment	Storage time (Day)			
	0	4	8	12
Chitosan	15.5 ^{de}	15.81 ^{cd}	16.81 ^{abc}	17.37 ^a
Methyl cellulose	15.5 ^d	16.06 ^{bcd}	15.87 ^{bcd}	Decay
Pectin	15.5 ^d	17.25 ^a	16.93 ^{abc}	17.37 ^a
Nano chitosan	15.5 ^d	17 ^{ab}	17.37 ^a	Decay
Control	15.5 ^d	15.25 ^d	Decay	Decay

* میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

* Means with similar letters are not significantly different at 5% level of probability.

جدول ۷. تأثیر تیمارهای پوشش خوراکی مختلف بر میزان اسیدیته قابل عیار (%/ انارخانه رقم رباب نی‌ریز در طول مدت انبارداری در دمای ۵ °C و رطوبت نسبی ۹۰±۵ درصد

Table 7. Effect of different edible coating treatments on titratable acidity (%) of pomegranate aril cv. Rabbab-e-Neyriz during storage at 5 °C and 90±5% RH

Treatment	Storage time (Day)			
	0	4	8	12
Chitosan	1.93 ^{af}	1.87 ^{ab}	1.81 ^b	1.78 ^c
Methyl cellulose	1.93 ^a	1.76 ^{cd}	1.7 ^{de}	Decay
Pectin	1.93 ^a	1.66 ^{ef}	1.61 ^h	1.66 ^{ef}
Nano chitosan	1.93 ^a	1.89 ^{ab}	1.83 ^{bc}	Decay
Control	1.93 ^a	1.57 ^g	Decay	Decay

* میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

* Means with similar letters are not significantly different at 5% level of probability.

سوم اندازه‌گیری (۸ روز از آغاز انبارداری) نسبت به تیمار پکتین (۱۰/۵۲) افزایش کمتری نشان دادند. به این ترتیب در پایان دوره انبارداری بیشترین (۱۰/۴۴) و کمترین (۹/۷۱) میزان شاخص طعم میوه، به ترتیب در اناردانه‌های پوشیده‌شده با پکتین و کیتوزان در دمای ۵ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد (جدول ۸).

شاخص طعم (TSS/TA) اناردانه‌ها روند افزایشی در طول دوره نگهداری در انبار داشت (جدول ۸). پس از جداسازی اناردانه‌ها و پیش از آغاز دوره انبارداری، شاخص طعم ۸/۰۲ بود و در طی ۱۲ روز نگهداری در سردخانه در مورد همه تیمارها افزایش نشان داد. تیمارهای کیتوزان (۹/۲۶) و نانوکیتوزان (۹/۴۵) و متیل سلولز (۹/۳) در مرحله

جدول ۸. تأثیر تیمارهای پوشش خوراکی مختلف بر شاخص بلوغ (TSS/TA) اناردانه رقم رباب نی‌ریز در طول مدت انبارداری در دمای ۵ °C و رطوبت نسبی ۹۰±۵ درصد

Table 8. Effect of different edible coating treatments on maturity index (TSS/TA) of pomegranate aril cv. Rabbab-e-Neyriz during storage at 5 °C and 90±5% RH

Treatment	Storage time (Day)			
	0	4	8	12
Chitosan	8.02 ^{fr}	8.41 ^{ef}	9.26 ^{cd}	9.71 ^b
Methyl cellulose	8.02 ^f	9.12 ^{de}	9.3 ^d	Decay
Pectin	8.02 ^f	10.33 ^a	10.52 ^a	10.44 ^a
Nano chitosan	8.02 ^f	8.99 ^e	9.45 ^{cd}	Decay
Control	8.02 ^f	9.66 ^b	Decay	Decay

* میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

* Means with similar letters are not significantly different at 5% level of probability.

پوشش‌های خوراکی باعث حفظ مواد جامد محلول، اسیدهای آلی و شاخص طعم آب‌میوه شد. به‌طور کلی کیتوزان به‌عنوان یک فیلم نیمه نفوذپذیر می‌تواند با تغییر اتمسفر درونی محصول ضمن کاهش ضایعات ناشی از تعرق باعث حفظ کیفیت پس از برداشت میوه شود. در این پژوهش تیمار پوشش‌های خوراکی به‌ویژه کیتوزان به‌طور مؤثری باعث کاهش از دست دادن آب، کاهش ضایعات اناردانه‌ها و حفظ ترکیب‌های زیست فعال در طول مدت نگهداری پس از برداشت شدند.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش از میان پوشش‌های خوراکی به‌کار رفته، کیتوزان به‌طور مؤثری باعث کاهش از دست دادن آب، کاهش وزن اناردانه‌ها و آلودگی قارچی پس از برداشت شد. پوشش‌های خوراکی به‌طور معنی‌داری از کاهش میزان آنتوسیانین کل و اسید آسکوربیک اناردانه‌ها جلوگیری کرد. فنول کل و فعالیت پاداکسندگی آب‌میوه در دوره انبارداری کاهش یافت و پوشش کیتوزان باعث حفظ این ترکیب‌ها شد. تیمار

REFERENCES

- Al-Maiman, S. A. & Ahmad, D. (2002). Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chemistry*, 76, 437-441.
- Aydin, N. & Kadioglu, A. (2001). Changes in the chemical composition, polyphenol oxidase and peroxidase activities during development and ripening of Medlar fruits (*Mespilus germanica* L.). *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 27, 85-92.
- Ayranci, E. & Tune, S. (2004). The effect of edible coatings on water and vitamin C loss of apricots (*Armeniaca vulgaris* Lam.) and green peppers (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*, 87, 339-342.
- Bico, S. L. S., Raposo, M. F. J., Morais, R. M. S. C. & Morais, A. M. M. B. (2009). Combined effects of chemical dip and/or carrageenan coating and/or controlled atmosphere on quality of fresh cut banana. *Food Control*, 20, 508-514.
- Çam, M., Hışıl, Y. & Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112, 721-726.
- D'Aquino, S., Palma, A., Schirra, M., Continella, A., Tribulato, E. & La Malfa, S. (2010). Influence of film wrapping and fluidoxonil application on quality of pomegranate fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 55, 121-128.
- Dhall, R. K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 435-450.

8. Ghasemnezhad, M., Zareh, S., Rassa, M. & Sajedi, R. H. (2013). Effect of chitosan coating on maintenance of aril quality, microbial population and PPO activity of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Tarom) at cold storage temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 368-374.
9. Ghasemnezhad, M., Zareh, S., Shiri, M. A. & Javdani, Z. (2015). The arils characterization of five different pomegranate (*Punica granatum*) genotypes stored after minimal processing technology. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2023-2032.
10. Hana, A., Zhao, S., Leonard, W. & Traber, M. G. (2004). Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria ananasa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*, 33, 67-78.
11. Klein, B. & Perry, A. (2006). Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *Journal of Food Science*, 47, 941-945.
12. Li, H. & Yu, T. (2000). Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 269-274.
13. Meyers, K. J., Watkins, C. B., Pritts, M. P. & Liu, R. H. (2003). Antioxidant and anti-proliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6887-6892.
14. Miguel, G., Fontes, C., Antunes, D., Neves, A. & Martins, D. (2004). Anthocyanin concentration of 'Assaria' pomegranate fruits during different cold storage conditions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 338-342.
15. Ozgen, M., Dugac, C., Serce, S. & Kaya, C. (2008). Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. *Food Chemistry*, 111, 703-706.
16. Pierce, B. & Kader, A. (2003). Responses of 'Wonderful' pomegranates to controlled atmospheres. *Acta Horticulturae*, 600, 751-757.
17. Ramezani, A., Rahemi, M. & Vazifeshenas, M. R. (2009). Effects of foliar application of calcium chloride and urea on quantitative and qualitative characteristics of pomegranate fruits. *Scientia Horticulturae*, 121, 171-175.
18. Ramezani, A., Rahemi, M., Maftoun, M., Bahman, K., Eshghi, S., Safizadeh, M. R. & Tavallali, V. (2010). The ameliorative effects of spermidine and calcium chloride on chilling injury in pomegranate fruits after long-term storage. *Fruits*, 65, 169-178.
19. Rapisarda, P., Fanella, F. & Maccarone, F. (2000). Reliability of analytical methods for determining anthocyanin in blood orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2249-2252.
20. Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Martinez-Romero, D., Guillen, F., Serrano, M. & Valero, D. (2011). Vapor treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chemistry*, 124, 964-970.
21. Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. & Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosan. *Journal of Food Science and Technology*, 10, 37-51.
22. Tulinoz, A. & Ulukanli, Z. (2011). Application of edible starch-based coating including glycerol plus oleum nigella on arils from long-stored whole pomegranate fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36, 81-95.
23. Varasteh, F., Arzani, K., Barzegar, M. & Zamani, Z. (2012). Changes in anthocyanin in arils of chitosan-coated pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Rabbab-e-Neyriz) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 130, 267-272.
24. Vargas, M., Albers, A., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2006). Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 164-171.
25. Yaman, O. & Bayindirli, L. (2002). Effects of an edible coating and cold storage on shelf-life and quality of cherries. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 146-150.
26. Yen, M. T., Yang, J. H. & Mau, J. L. (2009). Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 75, 15-21.