مقاله علمی–پژوهشی:

بررسی اثر پوشش کیتوزان نانوکپسوله در ترکیب با استات سدیم جهت افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) در دمای یخچال

جعفر کمانی[۱]، عباسعلی مطلبی مغانجوقی*[۱]، ودود رضویلر[۱]، نوردهر رکنی[۱]

*abbasalimotallebi@gmail.com

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۸

چکیده

فیله قزل آلای رنگین کمان محصولی با ارزش تغذیه‌ای بالاست که از بازارپسندی مناسب برخوردار بوده و عمر کوتاهی دارد. در این مطالعه اثرات پوشش‌های کیتوزان نانوکپسوله به تنهایی و همراه با استات سدیم در افزایش زمان ماندگاری فیله‌های قزل آلای رنگین کمان، طی نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) و در کیسه‌های زیب‌دار پلی اتیلنی، در مدت ۱۶ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور، فیله‌های قزل آلای رنگین‌کمان، در پنج تیمار شامل محلول‌های کیتوزان نانوکپسوله ۱٪، کیتوزان نانوکپسوله۲٪، کیتوزان نانوکپسوله ۱٪ + استات سدیم ۱/۵ ٪، کیتوزان نانوکپسوله ۲٪ + استات سدیم ۱/۵ ٪ و محلول آب مقطر به عنوان نمونه شاهد، غوطه‌ور شدند. اثر ضد میکروبی پوشش کیتوزان نانوکپسوله و کیتوزان نانوکپسوله + استات سدیم با شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی، لاکتیک، سرمادوست و خصوصیات شیمیایی با اندازه‌گیری میزان pH، تیوباربیتوریک اسید (TBA)، پراکسید (PV) و ترکیبات نیتروژنی فرار (TVB-N) ارزیابی شد. ۵ نفر ارزیاب با بررسی طعم، بو، رنگ، بافت، ارزیابی حسی فیله قزل آلای رنگین‌کمان را انجام دادند و پذیرش کلی در روزهای ۰، ۳، ۶، ۱۰، ۱۲ و ۱۶ صورت گرفت. نتایج حسی، شیمیایی و میکروبی با آزمون‌های ANOVA و Duncan مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج شاخص‌های شیمیایی، میکروبی و حسی در پایان دوره نگهداری نشان دادند که نمونه‌های حاوی پوشش کیتوزان نانوکپسوله + استات سدیم ۱/۵ ٪ و کیتوزان نانوکپسوله بدون استات سدیم ۱/۵ ٪، در مقایسه با نمونه شاهد به طور معنی‌داری بهتر بودند ($p<0.05$). در این مطالعه نمونه حاوی پوشش کیتوزان نانوکپسوله۲٪+ استات سدیم ۱/۵ ٪ بهترین نتایج نگهداری را نشان داد. نتایج آزمون‌های حسی، شیمیایی و میکروبی تیمارهای کیتوزان نانوکپسوله و کیتوزان نانوکپسوله + استات سدیم نشان دادند که زمان ماندگاری از ۶ روز در تیمار کنترل به‌ترتیب به ۱۲ و ۱۶ روز افزایش یافت.

لغات کلیدی: کیتوزان نانوکپسوله، استات سدیم، قزل آلای رنگین کمان، زمان ماندگاری

*نویسنده مسئول

مقدمه

در سال‌های اخیر پرورش آبزیان یکی از بخش‌های مهم تولید غذا در جهان محسوب می‌شود که به دلیل روی آوردن مردم به استفاده از این منابع پروتئینی، صنایع مربوط به آن هم روز به روز در حال گسترش می‌باشد. مدت زمان کوتاه ماندگاری قزل آلای رنگین کمان به دلیل درصد بالای اسیدهای چرب غیراشباع در ماهی و بی‌توجهی در جابجایی و نگهداری آن در مراحل بعد از صید، از مشکلات مهم عرضه آن به بازار محسوب می‌شود. سریع الفساد بودن ماهی باعث شده است تا از روش‌هایی مانند سرد کردن محصول بلافاصله بعد از صید و بکارگیری مواد ضد میکروبی مثل اسیدهای آلی و نمک آنها برای افزایش زمان ماندگاری استفاده شود (Gelman *et al.*, 2001). افزودن مواد شیمیایی همانند نیتریت و سدیم بنزوات به منظور نگهداری مواد غذایی معمولاً بر مبنای جلوگیری از رشد میکروبی یا کشتن و از بین بردن گروه‌هایی از میکروارگانیسم‌های مضر می اشد (Gould and Russell, 2003; Ortiz *et al.*, 2013). با توجه به نگرانی‌های عمومی در خصوص عوارض نگهدارنده‌های شیمیایی مانند بیماری سرطان، تمایل به مصرف محصولاتی است که فاقد نگهدارنده بوده یا از نگهدارنده طبیعی در آنها استفاده شده است. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی پیرامون نگهدارنده‌های طبیعی صورت گرفته است. یکی از افزودنی‌های با خاصیت آنتی میکروبی، استفاده از نمک اسیدهای ضعیف همانند استات سدیم، لاکتات سدیم و سیترات سدیم می‌باشد که سبب کنترل رشد میکروبی، بهبود خصوصیات حسی و افزایش ماندگاری فیله ماهی سالمون طی مدت نگهداری در دمای ۱ درجه سانتی‌گراد شد (Sallam, 2007). استفاده از استات سدیم به عنوان یک نمک با خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی در بسیاری از مطالعات به اثبات رسیده است (صفری و همکاران، ۱۳۹۴; احمدی، ۱۳۹۶). استفاده از استات سدیم با برچسب (i)262، به عنوان یک نگهدارنده مجاز از طرف کمسیون مشترک برنامه استاندارد غذایی FAO وWHO (کدکس) (۲۰۱۹) به صورت حد مجاز GMP اعلام شده است (FAO/WHO, 2019). فهیم‌دژبان و معراجی (۱۳۹۸) اثر ضد اکسیداسیونی پوشش عصاره‌های طبیعی را بر افزایش ماندگاری فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان گزارش کردند. استفاده از پوشش کیتوزان ۲ درصد با عصاره آبی ۲ درصد میوه پنیرباد سبب حفظ کیفیت و افزایش زمان ماندگاری فیله کپور نقره‌ای طی یخچال‌گذاری گردید (صادقی و همکاران، ۱۳۹۸). یکی دیگر از این نگهدارنده‌های طبیعی، پلیمرکیتوزان است که به صورت تجاری از آلکالین د - استیلیشن کیتین به‌دست می‌آید. کاربردهای فراوان کیتوزان در شلاته کردن فلزات سنگین آبهای تیمار شده، کاهندگی کلسترول خون و ... بیان شده است. چنین مطالعاتی نشان می‌دهد که از کیتوزان می‌توان به عنوان یک نگهدارنده جدید در مواد غذایی استفاده کرد. کیتوزان به عنوان یک ماده غیر سمی در فهرست نگهدارنده‌های مجاز اروپا قرار دارد و سازمان غذا و داروی آمریکا این ماده را در فهرست[1] GRAS قرار داده است. کیتوزان در قالب پوشش مواد غذایی با اثرات ضد میکروبی، کاهش از دست روی رطوبت، ممانعت از انتقال اکسیژن و محدود کردن تنفس محصول باعث افزایش ماندگاری مواد غذایی می‌گردد (Lucera *et al.*, 2012). Nowzari و همکاران (۲۰۱۳) اعلام کردند که پوشش کیتوزان-ژلاتین منجر به کاهش تولید اسیدهای چرب آزاد، رشد میکروبی می‌شود. نانوتکنولوژی در سال‌های اخیر، روشی سیستماتیک را جهت مطالعه و بهبود عملکرد مواد فراهم نموده است. مواد نانویی به ترکیباتی گفته می‌شود که ابعاد خارجی آنها در محدوده ۱۰۰ نانومتر باشد. ترکیباتی که سه بعد آن در محدوده نانو باشد، نانوذرات (نانوپارتیکل) نامیده می‌شوند. در یک وزن برابر از مواد، ترکیبات نانو به دلیل کوچک بودن ذرات، سطح بیشتری را نسبت به فرم معمولی همان مواد پوشش می‌دهند. اندازه بسیار کوچک ذرات نانو منافع دیگری هم می‌تواند داشته باشد برای مثال، ذرات نانو غیر محلول در آب به‌راحتی و به صورت یکسان می‌تواند در فرمول منتشر گردد. این عمل با انتشار بهتر افزودنی‌های مواد غذایی از جمله نگهدارنده‌ها در زمینه و بافت مواد غذایی سبب کاهش استفاده از آنها می‌گردد (Chaudhry *et al.*, 2010). در یک تحقیق، پوشش کیتوزان نانوکپسوله و کیتوزان در خصوص فیله‌های کپور نقره‌ای نگهداری شده در یخچال توانایی ضد میکروبی بالایی را نشان داد (Ramezani *et al.*, 2015). هدف از این مطالعه بررسی اثر کیتوزان به صورت نانوکپسوله در مقادیر ۱ و ۲ درصد به صورت ترکیب با استات سدیم ۱/۵ درصد در خصوص افزایش زمان ماندگاری فیله‌های قزل آلای رنگین کمان در طول مدت نگهداری در دمای یخچال بود. در این مطالعه شاخص‌های حسی در کنار مقادیر مجاز شیمیایی و میکروبی، بررسی گردید.

[1] Generally recognized as safe

مواد و روش کار

تهیه محلول استات سدیم ۱/۵ ٪

انحلال ۱/۵ گرم از پودر استات سدیم خریداری شده از شرکت مرک آلمان در ۹۸/۵ سی سی آب مقطر در مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی صورت گرفت (اسدی‌زاده، ۱۳۹۳). در تهیه تیمارهای دارای استات سدیم ۱/۵ درصد برای مثال، تیمار کیتوران یک درصد حاوی استات سدیم ۱/۵ ٪، از ترکیب ۱/۵ گرم استات سدیم و ۱ گرم کیتوزان به همراه ۹۷/۵ سی سی اسید استیک یک درصد استفاده شد. در تهیه محلول تیمار نانوکیتوزان ۱ و۲ درصد به همراه استات سدیم ۱/۵ درصد، به ۹۸/۵ سی سی از محلول‌های نانوکیتوزان ۱ و ۲ درصدی از قبل تهیه شده، به میزان ۱/۵ گرم از استات سدیم اضافه کرده و در دمای اتاق حل گردید.

تهیه محلول کیتوزان، اسید استیک و نانوکیتوزان

برای تهیه محلول کیتوزان جهت استفاده در تهیه محلول نانوکیتوزان، از پودر کیتوزان برند سیگما آلدریچ کشور آلمان (کد محصول ۴۲۳۴۴) و با وزن مولکولی متوسط (۱۴۱ کیلو دالتون) و درجه استیل زدایی ۷۵ درصد استفاده شد. ابتدا محلول اسید استیک یک درصد حجمی / حجمی تهیه و سپس محلول کیتوزان یک و دو درصد وزنی / حجمی در اسید مذکور تهیه و جهت انحلال کامل به مدت ۳ ساعت در روی هیتر مغناطیسی با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، محلول گردید. سپس جهت منعطف سازی به میزان ۰/۷۵ گرم گلیسرول به ازاء هر گرم کیتوزان به عنوان پلاستی سایزر به محلول اضافه شده و به مدت نیم ساعت دیگر در دمای اتاق مخلوط گردید. سوسپانسیون حاصله با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۳ صاف گردید (Ojagh *et al.*, 2010). سپس سدیم تری پلی فسفات برای ایجاد غلظت ۱ و ۲ درصد در آب حل شد و در دمای اتاق و در کنار مگنت استیرر به میزان ۴ میلی لیتر از محلول تری پلی فسفات، به ۱۰۰ میلی لیتر از محلول کیتوزان یک و دو درصد تهیه شده اضافه شد. محلول به مدت ۶۰ دقیقه تکان داده شد و سپس با استفاده از دستگاه Misonix Sonicator S-4000, USA به مدت ۱۰ دقیقه در معرض امواج صوتی با قدرت ۱/۵ کیلووات قرار گرفت (Due *et al.*, 2009). اندازه ذرات و پتانسیل ذرات با دستگاه Nano ZS ZEN 3600 ساخت شرکت Malvern انگلستان اندازه گیری شد. تصاویر مربوط به محلول نانوکیتوزان با میکروسکوپ الکترونی مدل CM120 شرکت Philips هلند مورد سنجش قرار گرفت.

آماده سازی نمونه های فیله قزل آلای رنگین کمان و پوشش دهی فیله‌ها

تعداد ۳۰ عدد قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۵۰۰ گرم از یکی از استخرهای پرورش ماهی استان تهران خریداری شد و درون جعبه‌های حاوی یخ خشک به آزمایشگاه منتقل گردید. عمل آماده سازی نمونه‌ها شامل شستشو و تخلیه شکمی ماهیان انجام شده و فیله‌های ۱۰۰ گرمی تهیه شدند. فیله شاهد در آب مقطر غوطه‌ورسازی شده و سایر فیله‌ها در محلول‌های ساخته شده مشتمل بر کیتوزان نانوکپسوله با غلظت ۱ درصد، کیتوزان نانوکپسوله با غلظت ۲ درصد، کیتوزان نانوکپسوله با غلظت ۱ درصد به همراه استات سدیم ۱/۵ درصد و کیتوزان نانوکپسوله با غلظت ۲ درصد به همراه استات سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفته و پس از خروج از محلول‌ها، در دمای اتاق (۲۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند تا پوشش روی فیله ها شکل گیرد (Ojagh *et al.*, 2010). فیله‌های پوشش داده شده و همچنین فیله شکل‌دهنده تیمار شاهد، به صورت مجزا در کیسه های زیپ‌دار پلی‌اتیلنی بسته‌بندی شده، در دمای یخچال برای بررسی‌های میکروبی، شیمیایی و حسی در روزهای ۰، ۳، ۶، ۱۰، ۱۲ و ۱۶ نگهداری شدند. تیمارهای حسی مجزا بسته‌بندی شدند.

ارزیابی میکروبی نمونه‌ها

۱۰ گرم از گوشت ماهی از بسته بندی جدا شده و همراه با ۹۰ میلی لیتر آب پپتونه استریل در داخل کیسه‌های Bag mixer ریخته و داخل دستگاه استومیکر با سرعت ۲ و زمان ۲ دقیقه قرار داده شد و محیط هموژن گردید بعد از تهیه رقت‌های ۱۰ تایی متوالی، کشت و گرمخانه گذاری، باکتری های مورد نظر، شمارش شدند. به منظور شمارش باکتری‌های گروه لاکتیک، کشت به صورت سطحی و در محیط MRS آگار و گرمخانه‌گذاری در شرایط بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Jones *et al.*, 2008). برای ایجاد شرایط بی‌هوازی از دستگاه JAR GASSING SYSTEM استفاده شد و همچنین به منظور شمارش کل باکتریها (TVC) و باکتریهای سرماگرا (PTC) از محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) به روش کشت سطحی استفاده شد

. پلیت‌های کشت داده شده مربوط به شمارش کل باکتری‌ها بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه و پلیت‌های مربوط به باکترهای سرمادوست بعد از گذشت ۱۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد شمارش شدند (McMeekin, 1993).

ارزیابی شیمیایی نمونه‌ها

جهت تعیین ویژگی‌های شیمیایی، شاخص‌های ترکیبات ازته فرار، پراکسید، pH و تیوباربیتوریک اسید مورد آزمایش قرار گرفتند (Namulema *et al*., 1999; AOAC, 2002; AOAC, 2005; Sallam, 2007).

ارزیابی حسی

۵ ارزیاب حسی شامل دانشجویان رشته بهداشت مواد غذایی که قبلا آموزش داده شده بودند در دانشگاه آزاد اسلامی علوم و تحقیقات، ارزیابی حسی را در زمان‌های مشخص شده به روش هدونیک ۵ نقطه‌ای انجام دادند. از افراد گروه تست پنل خواسته شد در خصوص موارد خواسته شده در جدول ارزیابی حسی که به آنها ارائه شد (شامل: رنگ، طعم، بافت، بو و پذیرش کلی) به روش هدونیک ۵ نقطه ای امتیاز دهند (۱ : خیلی بد ، ۵ : خیلی خوب). هر فرد به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شده بود. نمره ۳ هم به عنوان حد مقبولیت مورد توافق قرار گرفت. فیله ماهی به صورت بخارپژ در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد و در مدت ۱۵ دقیقه در داخل فویل آلومینیومی، مورد آزمایش و ارزیابی حسی قرار گرفت.

روش تجزیه و تحلیل و آنالیز داده ها

تحلیل آماری داده‌های حاصله با نرم افزار SPSS انجام پذیرفت. بررسی نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و همگنی واریانس داده‌ها با آزمون لون انجام شد. جهت ارزیابی پارامترهای مختلف شیمیایی، میکروبی وحسی در زمان‌های مختلف از تست Anova استفاده شد. جهت مقایسه واریانس‌ها و ارزیابی معنی‌دار بودن داده‌ها، از تست Duncan استفاده گردید.

نتایج

نتایج تهیه محلول نانوکیتوزان

بعد از ساخت کیتوزان نانوکپسوله ۱ و ۲ درصد، جهت تایید اندازه و تصاویر مربوط به نانوذرات، از میکروسکوپ الکترونی و جهت تعیین پتانسیل زتا و pdi، از دستگاه DLS مرکز تحقیقات دارویی پشمینه تبریز کمک گرفته شد. بر اساس اعلام میکروسکوپ الکترونی، میانگین اندازه ذرات در کیتوزان نانوکپسوله ۱٪ برابر ۲۰ نانومتر شد. بر طبق اعلام دستگاه DLS[1] که نشانگر میزان Zeta Average و Pdi[2] می‌باشد، اندازه ذرات برابر۳۴/۰۱ نانومتر اعلام گردید که تفاضل آن با متوسط اندازه ذره، برابر ۱۴/۰۱ نانومتر شد. که این موضوع نشانگر کپسولیشن ذرات نانوکیتوزان بود. ضمن اینکه بر طبق اعلام میکروسکوپ الکترونی(TEM[3])، ذرات به صورت کروی بودند. ذرات کروی دارای سطح انرژی سطحی پایین می باشند که باعث پایداری بالای ذره می‌شود. تایید این موضوع با عدد Zeta که برابر ۴۱/۱+ الکترون ولت (ev) بود مشخص شد. زیرا هرچه این عدد بالاتر باشد، انرژی سطحی پایین را نشان می‌دهد. Pdi هم عددی بین صفر و یک می باشد که هرچه به طرف صفر میل کند، پیک بدست آمده در شکل، حالت Sharp پیدا می‌کند. اگر عدد Pdi کوچکتر باشد، بدان معناست که اندازه ذرات بهم نزدیکتر می‌باشد. Pdi برابر ۰/۵۴۰ اعلام گردید که هرچه به صفر میل کند، مطلوب‌تر خواهد بود. بر این اساس حد متوسطی از Pdi بدست آمد. در خصوص کیتوزان نانوکپسوله ۲٪، میزان متوسط قطر ذرات برابر ۴۰ نانومتر بود که پارتیکل سایز هم بر طبق DLS برابر ۱۱۷/۹ نانومتراعلام گردید. بنابراین، کپسولیشن ذرات در این مورد به اندازه ۷۷/۹ نانومتر ایجاد شد که ذرات کروی‌شکل بودند و دارای پتانسیل Zeta = ۴۷/۵ الکترون ولت و Pdi برابر ۳۲۹/داشتند که بدان معنا بود که ذرات دارای اندازه‌ای نزدیک به‌هم بودند.

نتایج بار میکروبی کل

نتایج بار میکروبی کل در شکل ۱ نشان داده شده است. گروه کنترل در روز آخر نگهداری فیله قزل آلا دارای بیشترین میزان بار میکروبی بود (۹/۸۵ log cfu/g). در میان نتایج حاصله، تیمار کیتوزان نانوکپسوله ۲٪+ استات سدیم ۱/۵٪، کمترین و بیشترین میزان بار میکروبی را به‌ترتیب در روزهای صفر و شانزدهم نشان داد. تیمار شاهد از روز سوم نمونه‌برداری تا آخر دوره نگهداری در سرما، دارای اختلاف معنی‌داری با تمام تیمارها بود ($p<0.05$).

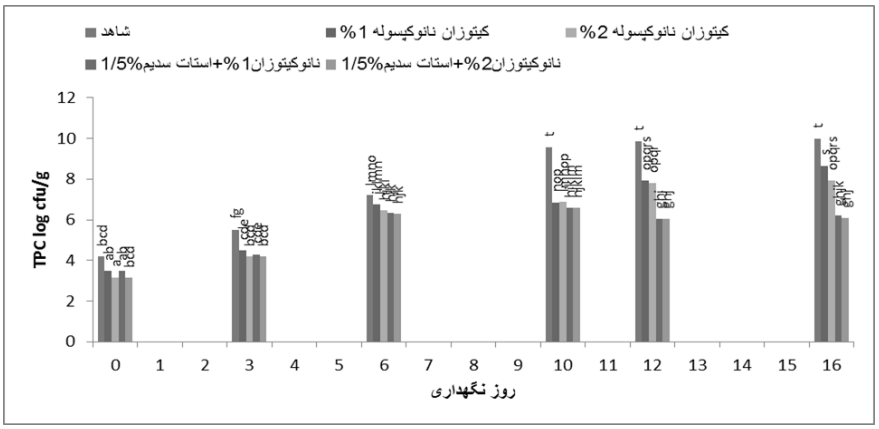
[1] Dynamic light scattering
[2] Polydispersity Index
[3] Transmission electron

شکل ۱: تغییرات تغییرات بار میکروبی کل فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین‌کمان طی نگهداری در یخچال
حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.
Figure 1: TVC changing in rainbow trout filets during refrigerator storage

نتایج باکتریهای سرمادوست و لاکتیک

بر اساس نتایج آزمایش‌های میکروبی نشان داده شده در شکل‌های ۲ و ۳، میزان باکتریهای سرمادوست و لاکتیک طی نگهداری در سرما افزایش یافت. تیمار شاهد میزان بار میکروبی سرمادوست بالایی را در روزهای ۱۶-۱۰ از خود نشان داد اما کمترین میزان میکروب‌های سرمادوست در تیمار کیتوزان نانوکپسوله ۲٪ + استات سدیم۱/۵٪ مشاهده شد. نتایج بدست آمده، اختلاف معنی‌داری را بین تیمار شاهد با سایر تیمارها از روز سوم نمونه‌برداری به بعد نشان داد ($p<0.05$). در ضمن، مقادیر کیتوزان نانوکپسوله۱٪ و کیتوزان نانوکپسوله۱٪+ استات سدیم ۱/۵٪ در روز صفر، مشابه هم بود اما در روزهای آخر نگهداری اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($p<0.05$).

بر اساس نتایج نشان داده شده در شکل ۳، بالاترین میزان باکتری‌های لاکتیک در تیمار شاهد و در آخرین روز نمونه‌برداری مشاهده شد. کمترین میزان، در روز اول و در دو تیمار کیتوزان نانو کپسوله+ استات سدیم ۱/۵٪مشاهده گردید (۲/۱ log cfu/g). در طول نگهداری از نظر بارمیکروبی لاکتیک، تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت ($p<0.05$).



شکل ۲: تغییرات بار میکروبی سرمادوست فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین‌کمان طی نگهداری در یخچال
حروف کوچک غیر مشترک نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.
Figure 2: TPC changing in rainbow trout filets during refrigerator storage

شکل ۳: تغییرات بار میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین‌کمان طی نگهداری در یخچال
حروف کوچک غیر مشترک در هر ستون نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.
Figure 3: Lactic acid bacteria changing in rainbow trout filets during refrigerator storage

نتایج مجموع بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)

بر اساس شکل ۴، بیشترین میزان TVB-N در روز شانزدهم نگهداری در تیمار شاهد مشاهده شد (۷۰/۴۶ میلی گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم بافت ماهی). اما کمترین میزان آن در تیمار نانوکیتوزان ۲٪+ استات سدیم ۱/۵٪ و در روز صفر نگهداری، گزارش شد (۷/۴۶ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم بافت). بین تیمار شاهد و سایر تیمارها در مدت زمان نگهداری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. این اختلاف بین دو تیمار کیتوزان نانوکپسوله و همچنین بین دو تیمار کیتوزان نانوکپسوله+استات سدیم ۱/۵٪ معنی‌دار نبود ($P<0.05$).

شکل ۴: تغییرات مجموع بازهای نیتروژنی فرار فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین‌کمان طی نگهداری در یخچال
حروف کوچک غیر مشترک نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.
Figure 4: TVB-N changing in rainbow trout filets during refrigerator storage

نتایج pH

براساس نتایج ارائه شده در شکل ۵، افزایش آرامی را در میزان pH وجود داشت. اما تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و سایر تیمارها مشاهده شد ($p<0.05$). تیمار کیتوزان نانوکپسوله۲٪+ استات سدیم۱/۵٪، کمترین میزان pH را از بین نتایج بدست آمده در روز صفر و آخر نگهداری به‌خود اختصاص داد.

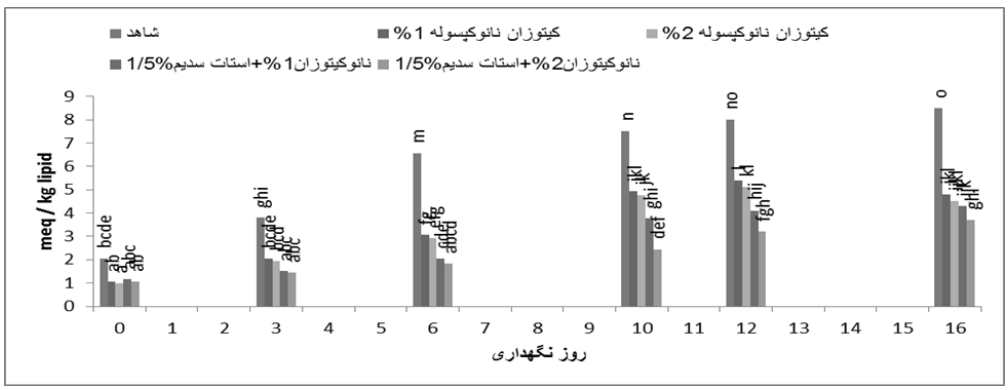
شکل ۵: تغییرات pH فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین‌کمان طی نگهداری در یخچال

حروف کوچک غیر مشترک نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.

Figure 5: pH changing in rainbow trout filets during refrigerator storage

نتایج پراکسید

بر طبق نتایج مندرج در شکل ۶، در ابتدای نگهداری، کیتوزان نانوکپسوله۲٪+ استات سدیم۱/۵٪، کمترین میزان پراکسید را با رقم ۱/۰۶میلی اکی والان گرم پراکسید در کیلوگرم بافت ماهی به‌خود اختصاص داد در حالی‌که این عدد در تیمار شاهد برابر ۲/۰۳ بود. در ادامه روند نگهداری، میزان پراکسید در تیمار مذکور و در روز ۱۶ به رقم ۳/۷ افزایش یافت در صورتی که در تیمار شاهد، میزان پراکسید در این روز نگهداری به عدد ۸/۵ (بیشترین میزان در بین نتایج) افزایش یافته بود. بر اساس این نتایج در بین تیمار شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p<0.05$).



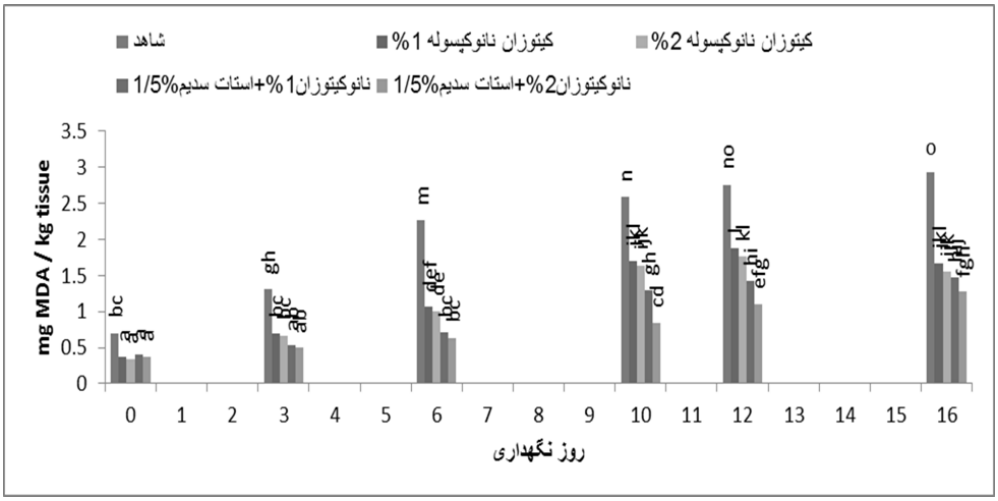
شکل ۶: تغییرات پراکسید فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین‌کمان طی نگهداری در یخچال

حروف کوچک غیر مشترک نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.

Figure 6: PV changing in rainbow trout filets during refrigerator storage

نتایج تیوباربیتوریک اسید

TBA شاخص اندازه‌گیری شده دیگری است که نتایج آن در شکل ۷ نشان داده شده است. این شاخص در نمونه شاهد به میزان ۲/۹۳-۰/۷ میلی‌گرم مالون آلدهید، در طول دوره نگهداری افزایش یافت. با در نظر گرفتن سطح احتمال ۵٪، کیتوزان نانوکپسوله۲٪ + استات سدیم۱/۵٪ در روزهای صفر و ۱۶ به‌ترتیب با ثبت عدد ۰/۳۷ و ۱/۲۸ کمترین میزان تیوباربیتوریک اسید را نشان داد.



شکل ۷: تغییرات تیوباربیتوریک اسید فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین‌کمان طی نگهداری در یخچال
حروف کوچک غیر مشترک نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.
Figure 7: TBA changing in rainbow trout filets during refrigerator storage

نتایج ارزیابی حسی

ارزیابی حسی فیله های شاهد و تیمارهای دارای پوشش صورت گرفت. نتایج طعم، رنگ، بو، بافت و پذیرش کلی در جدول ۱ ارائه شده است. با افزایش طول دوره نگهداری از کیفیت نمونه‌های شاهد کاسته شد. با توجه به اینکه امتیاز ۳ به عنوان حداقل امتیاز قابل قبول برای مصرف قرار داده شده بود، فیله‌های شاهد و کیتوزان نانوکپسوله به‌ترتیب در روزهای ۶ و ۱۲ به این رقم رسیدند ولی فیله‌های دارای پوشش کیتوزان نانوکپسوله+استات سدیم٪۱/۵ روز ۱۶، به این رقم رسیدند. بین تیمار شاهد با تیمارهای کیتوزان نانوکپسوله+استات سدیم٪۱/۵ از روز سوم تا آخرین روز نگهداری در یخچال، اختلاف معنی‌داری ایجاد شد ($p<0.05$).

جدول۱: ارزیابی حسی فیله های ماهی قزل آلای رنگین کمان طی نگهداری در یخچال
Table 1: Sensorial evaluation of rainbow trout filets during refrigerator storage

	تیمار	روز نگهداری					
		روز ۰	روز ۳	روز ۶	روز ۱۰	روز ۱۲	روز ۱۶
طعم	شاهد	۴/۶۰^{abc}	۴/۰۰^{de}	۲/۸۰^{g}	۲/۰۰^{h}	۱/۲۰^{i}	۱/۰۰^{i}
	کیتوزان نانوکپسوله ۱٪	۵/۰۰^{a}	۴/۴۰^{bcd}	۴/۰۰^{de}	۴/۰۰^{de}	۳/۰۰^{fg}	۲/۶۰^{g}
	کیتوزان نانوکپسوله ۲٪	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۰۰^{de}	۴/۰۰^{de}	۳/۰۰^{fg}	۲/۶۰^{g}
	کیتوزان نانو۱٪ +استات سدیم	۵/۰۰^{a}	۴/۶۰^{abc}	۴/۲۰^{cde}	۴/۰۰^{de}	۴/۰۰^{de}	۳/۰۰^{fg}
	کیتوزان نانو۲٪ +استات سدیم	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۴۰^{bcd}	۴/۰۰^{de}	۴/۰۰^{de}	۳/۴۰^{f}
رنگ	شاهد	۵/۰۰^{a}	۴/۶۰^{abc}	۳/۴۰^{fg}	۲/۸۰^{h}	۱/۸۰^{ij}	۱/۲^{k}
	کیتوزان نانوکپسوله ۱٪	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۸۰^{ab}	۴/۶۰^{abc}	۴/۰۰^{de}	۳/۰۰^{e}
	کیتوزان نانوکپسوله ۲٪	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۰۰^{de}	۳/۰۰^{e}
	کیتوزان نانو۱٪ + استات سدیم	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۸۰^{ab}	۴/۲۰^{cd}	۴/۰۰^{de}
	کیتوزان نانو۲٪ + استات سدیم	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۸۰^{ab}	۴/۴۰^{bcd}	۴/۰۰^{de}

	تیمار	روز نگهداری					
		روز ۰	روز ۳	روز ۶	روز ۱۰	روز ۱۲	روز ۱۶
بافت	شاهد	۴/۴۰^{bcd}	۴/۰۰^{d}	۳/۰۰^{ef}	۲/۰۰^{h}	۱/۰۰^{i}	۱/۰۰^{i}
	کیتوزان نانوکپسوله ۱٪	۵/۰۰^{a}	۴/۶۰^{abc}	۴/۰۰^{d}	۴/۰۰^{d}	۳/۰۰^{ef}	۲/۴۰^{gh}
	کیتوزان نانوکپسوله ۲٪	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۰۰^{d}	۴/۰۰^{d}	۳/۰۰^{ef}	۲/۴۰^{gh}
	کیتوزان نانو۱٪ +استات سدیم	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۲۰^{cd}	۴/۰۰^{d}	۴/۰۰^{d}	۳/۴۰^{e}
	کیتوزان نانو۲٪ +استات سدیم	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۲۰^{cd}	۴/۰۰^{d}	۴/۰۰^{d}	۳/۲۰^{ef}
پذیرش کلی	شاهد	۵/۰۰^{a}	۴/۲۰^{cd}	۲/۸۰^{f}	۲/۸۰^{g}	۱/۶۰^{i}	۱/۲۰^{j}
	کیتوزان نانوکپسوله ۱٪	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۸۰^{ab}	۴/۰۰^{de}	۲/۸۰^{f}	۲/۸۰^{f}
	کیتوزان نانوکپسوله ۲٪	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۴۰^{bcd}	۳/۶۰^{e}	۲/۸۰^{f}
	کیتوزان نانو۱٪ + استات سدیم	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۶۰^{abc}	۴/۲۰^{cd}	۴/۰۰^{de}
	کیتوزان نانو۲٪ + استات سدیم	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۸۰^{ab}	۴/۴۰^{bcd}	۴/۰۰^{de}
	شاهد	۴/۶۰^{abc}	۴/۰۰^{d}	۳/۰۰^{ef}	۲/۰۰^{g}	۱/۰۰^{h}	۱/۰۰^{h}
	کیتوزان نانوکپسوله ۱٪	۵/۰۰^{a}	۴/۸۰^{ab}	۴/۰۰^{d}	۴/۰۰^{d}	۳/۰۰^{ef}	۲/۶۰^{f}
	کیتوزان نانوکپسوله ۲٪	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۰۰^{d}	۴/۰۰^{d}	۳/۰۰^{ef}	۲/۶۰^{f}
	کیتوزان نانو۱٪ + استات سدیم	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۴۰^{bcd}	۴/۰۰^{d}	۴/۰۰^{d}	۳/۴۰^{e}
	کیتوزان نانو۲٪ + استات سدیم	۵/۰۰^{a}	۵/۰۰^{a}	۴/۶۰^{abc}	۴/۰۰^{d}	۴/۰۰^{d}	۴/۰۰^{d}

حروف مشترک در ستون‌ها، نشانگر اختلاف غیر معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد.

بحث

ارزیابی میکروبی

ماهی نگهداری شده در دمای یخچال، به دلیل وجود پروتئین‌ها، pH، اسیدهای چرب غیر اشباع، فعالیت آبی بالا و حضور آنزیم‌ها به‌سرعت دچار فساد می‌شوند (Gomez *et al.*, 2010). بخشی از فساد در ماهیان تازه به دلیل فعالیت و رشد ارگانیسم‌های ویژه عامل فساد (SSO)[1] و تولید متابولیت‌های مختلف صورت می‌گیرد و سبب ایجاد طعم و بوی نامطبوع در ماهی می‌شوند (Huss and Gram, 1996). در مطالعات انجام شده مشخص شد که میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی در موارد مشابه نیز یکسان نبودند به‌طوری‌که نوع و میزان میکروب‌ها در هر مطالعه با توجه به گونه ماهی و محیط زندگی آنها، وضعیت اقلیمی، نحوه صید، نوع محصول فرآوری شده (فیله، ماهی کامل شکم پر، ماهی شکم خالی و ...)، دما و نحوه نگهداری متفاوت خواهد بود (Gram and Dalgaard, 2002). سطوح SSO رابطه مستقیمی با زمان ماندگاری ماهی تازه دارد (Sallam, 2007). فقدان اطلاعات در خصوص اثر همزمان نانوکیتوزان و استات سدیم بر زمان ماندگاری محصولات دریایی در شرایط نگهداری در یخچال سبب شکل‌گیری این تحقیق شد. محققان شمارش کل بار باکتریایی اولیه را برای ماهیان آب شیرین همانند قزل آلای رنگین کمان، log cfu/g ۶-۲ بیان کردند (Chytiri *et al.*, 2004; Rezaei *et al.*, 2008). کیفیت اولیه فیله‌های مطالعه حاضر با توجه به شکل ۳، مناسب مشاهده گردید(log cfu/g ۴/۱-۳/۵). افزایش بار باکتریایی کل در طول دوره نگهداری به صورت سرد به اثبات رسیده است (محمدزاده و همکاران، ۱۳۹۶;Fan *et al*, 2009) .در این مطالعه نیز بار باکتریایی کل در طول مدت زمان نگهداری در یخچال افزایش یافت. بیشترین حد پیشنهادیMRL[2] برای TVC در ماهی log ۷cfu/g است (ICMSF, 1986). بر طبق شکل ۳، از نظر بار میکروبی کل، تیمارهای کیتوزان نانوکپسوله ۱٪ و ۲٪ + استات سدیم در روز ۱۶ام نگهداری در یخچال به مرز مجاز پیشنهادی

[1] Specific spoilage organis

[2] Maximal recommended limit

رسیدند. همراه نبودن استات سدیم در تیمارهای کیتوزان ۱٪ و۲٪ باعث شد تا این تیمارها در روز ۱۲ نگهداری از مرز مجاز پیشنهادی رد شوند در حالی‌که نمونه شاهد در روز ششم، از حد مجاز پیشنهادی رد شد. توجه به رشد میکروبی بالا در نمونه شاهد نشانه اثر ضدمیکروبی کیتوزان نانوکپسوله بود. رشد بالای میکروبی در تیمارهای نانوکپسوله همراه با استات سدیم٪۱/۵ نسبت به تیمارهای فاقد استات سدیم٪۱/۵ نشان از اثر سینرژیک ضد میکروبی استات سدیم٪۱/۵ با کیتوزان نانوکپسوله داشت. اثرات ضد میکروبی استات سدیم با مقادیر مختلف، در سایر مطالعات به اثبات رسیده است (Sallam, 2007; Yagin and Buyukurok, 2017). بر طبق شکل‌های۳، ۴ و ۵، میزان بار میکروبی کل، سرمادوست و لاکتیک در تیمار کیتوزان نانوکپسوله۲٪+ استات سدیم ۱/۵٪، به‌ترتیب از cfu/g ۳/۵، ۳/۱۵ و ۲/۱ در روز صفر به cfu/g ۷/۰۵، ۶/۱ و ۴ در روز ۱۶ افزایش یافت. بر اساس تحقیق انجام شده در گذشته، میزان بار میکروبی کل، سرمادوست و لاکتیک در خصوص فیله‌های سالمون پوشش داده شده با استات سدیم۲/۵ ٪ به‌ترتیب از cfu/g ۳/۳۲، ۳/۵۹ و ۲/۵ در روز صفر به cfu/g ۶/۸، ۷/۱۲ و ۵/۲۳ در روز ۱۵ افزایش یافت (Sallam, 2007). با توجه به تاثیر تفاوت یک روزه و درصد بالای استات سدیم در نتایج تحقیق Sallam (۲۰۰۷) نسبت به تحقیق حاضر و شباهت نتایج دو تحقیق مذکور، می‌توان نتیجه گرفت که اثر سینرزیک استات سدیم و کیتوزان نانوکپسوله نتایج بهتری را نسبت به یافته تحقیق مشابه نشان داده است. مشاهده نتایج بار میکروبی کل، سرمادوست و لاکتیک تیمار شاهد تحقیق حاضر، به‌ترتیب از cfu/g۴/۱، ۴/۲ و ۲/۶۲ در روز صفر به cfu/g۹/۸۵، ۱۰ و ۵/۵ در روز ۱۶ و مقایسه آن با تیمار کیتوزان نانوکپسوله۲٪+استات سدیم۱/۵ ٪، تاثیر مثبت پوشش کیتوزان نانوکپسوله را در افزایش زمان ماندگاری نشان می‌دهد. همراهی استات سدیم با نانوکیتوزان نتایج بهتری را نیز نسبت به تحقیق مشابه دیگری نشان داد (Nowrozi, 2013). براساس گزارش Caballero و همکاران (۲۰۰۵) پوشش ترکیبی کیتوزان با ژلاتین، اثر مهاری بر رشد باکتری‌های گرم منفی دارد. Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که کیتوزان به همراه روغن دارچین سبب افزایش زمان ماندگاری فیله قزل آلای رنگین کمان نگهداری شده در سرما از طریق کاهش میزان بارمیکروبی کل و سرمادوست شده است. کیتوزان در قالب پوشش مواد غذایی با اثرات ضد میکروبی، کاهش از دست دادن رطوبت، ممانعت از انتقال اکسیژن و محدود کردن تنفس محصول باعث افزایش ماندگاری مواد غذایی می‌گردد (Lucera *et al.*, 2012). تاثیر متقابل مولکول‌های پلی‌کاتیونی کیتوزان با اجزای آنیونی دیواره سلولی میکروارگانیسم سبب تغییراتی در نفوذپذیری دیواره سلولی می‌شود. در نتیجه، بخشی از مواد داخل سلول به بیرون تراوش می‌کند و از ورود مواد غذایی به داخل سلول جلوگیری می‌شود. کیتوزان بعد از ورود به داخل سلول و پیوند با پروتئین‌ها موجب اختلال در عملکرد سلول می‌شود. فعالیت ضد میکروبی کیتوزان ناشی از شارژ مثبتی است‌که با شارژ منفی ماکرومولکول‌های سطح سلول میکروب در تعامل است (Siripatrawan and Harte, 2010). اثر ضد میکروبی بالای پوشش کیتوزان نانوکپسوله و کیتوزان در خصوص فیله‌های کپور نقره‌ای نگهداری شده در یخچال گزارش شده بود (Ramezani *et al*., 2015).

ارزیابی شیمیایی

کل بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N) به عنوان یکی از شاخص‌های تشخیص تازگی ماهی، دامنه وسیعی از ترکیبات فرار نظیر آمونیاک، متیل آمین، دی متیل آمین، تری متیل آمین و سایر ترکیبات مشابه را شامل می‌شود که در اثر فعالیت‌های میکروبی و آنزیمی تولید می‌شوند (Goulas and Kontominas , 2007; Fan *et al.*, 2009). میزان ۲۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بالاترین سطح مورد قبول برای TVB-N می‌باشد (Gimenez, 2002). میزان TVB-N در روز صفر (۱۲/۳۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گوشت) بیشتر از میزان گزارش شده از طرف Shokri و همکاران(۲۰۱۷) بود. اگرچه تغییرات TVB-N به گونه ماهی، نوع تغذیه، نوع صید، اندازه ماهی و سایر عوامل محیطی بستگی دارد اما مهمترین نکته آن است که به میزان فعالیت باکتری در بافت ماهی نیز بستگی دارد (Goulas and Kontominas, 2005). در این تحقیق تیمار شاهد بالاترین میزان TVB-N را در روز شانزدهم به‌خود اختصاص داد اما هیچکدام از تیمارها تا روز آخر نگهداری به رقم ۲۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماهی نرسیدند. نکته مهم اینکه اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای کیتوزان نانوکپسوله + استات سدیم٪۱/۵ با کیتوزان‌های نانوکپسوله و آن هم با تیمار شاهد وجود داشت که نشان از اثر ضد میکروبی کیتوزان و اثر سینرژیست آن با استات سدیم بود. با توجه به اینکه رشد و فعالیت کم باکتری‌ها سبب کاهش فعالیت پروتئولیتک آنها شده

است، می‌توان نتیجه گرفت که به این دلیل میزان TVB-N نهایی نیز کاهش نیز یافته است. میزان بالای فعالیت باکتری‌ها ترکیباتی نظیر تری متیل آمین اکساید، پپتیدها و آمینو اسیدها را به بازهای فرار میشکند (Caballero *et al*., 2004). مقادیر بالای بار میکروبی تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها طی مدت نگهداری، می‌تواند توضیح مناسبی برای میزان بالای TVB-N باشد . میزان بازهای فرار کل در فیله ماهی یلوفین پوشش داده شده با نانوکیتوزان نگهداری شده در دمای یخچال، به طور معنی‌داری کاهش یافت (Tapilatu *et al*., 2016). نتایج پژوهش مذکور با دستاوردهای تحقیق حاضر همخوانی داشت. میزان pH گوشت ماهی تازه بالای ۷ و حدود ۷/۳ می باشد اما این رقم به دلیل فعل و انفعالات ناشی از جمود نعشی متاثر از اسیدلاکتیک کاهش می‌یابد. در بسیاری از گونه‌ها میزان pH بعد از مرگ حدود ۶/۸-۶ می‌باشد. تغییرات pH در شکل ۷ نشان داده شده است. میزان pH طی نگهداری در سرما افزایش آرامی داشته است. احتمالاً این افزایش به دلیل تولید ترکیبات فرار مثل آمونیوم از طرف باکتری‌های عامل فساد ماهی می‌باشد (Sallam, 2007; Abbas *et al*., 2008). این روند در تیمار شاهد با افزایش از ۶/۸ در روز صفر به ۷/۴۷ در روز ۱۶ام نگهداری در سرما، بیشترین میزان تغییر را به‌خود اختصاص داد که این نتایج با تحقیقات صفری و همکاران (۱۳۹۴) همخوانی داشت. میزان pH در سایر تیمارها کمتر از نمونه شاهد مشاهده شد. تیمار کیتوزان نانوکپسوله + استات سدیم٪۱/۵ بیشترین تفاوت را با گروه کنترل نشان داد. این موضوع بیشتر به لحاظ جلوگیری از فعالیت باکتری‌ها بود که طبیعتاً منجر به افزایش pH در بافت فیله ماهی در مدت نگهداری می‌شد. این نتایج با تحقیق آلبوغبیش و نظری (۱۳۹۶) همخوانی داشت. ماهیان پرچرب به اکسیداسیون چربی حساس هستند که این امر موجب ایجاد مشکلات کیفیتی مانند طعم و بوی نامناسب، تند شدگی و همچنین تغییراتی در بافت، رنگ و ارزش غذایی حتی در زمانی که در یخچال قرار دارد، می‌شود (Losada *et al*., 2007). نتایج تغییرات پراکسید (شکل ۸)، با نتایج سایر محققین بر میزان PV اولیه گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان تقریباً برابر می‌باشد (Ojagh *et al*., 2010 ، صفری و همکاران، ۱۳۹۴). شاخص پراکسید در این تحقیق در تمام تیمارها افزایش یافت اما میزان آن در تیمار شاهد با افزایش از ۲/۰۳ در روز صفر به ۸/۵ میلی‌اکی‌والان پراکسید بر کیلوگرم روغن ماهی در روز ۱۶، دارای بیشترین میزان تغییر بود. کمترین میزان تغییرات مربوط به کیتوزان نانوکپسوله ۲٪ + استات سدیم ٪۱/۵ بود که از ۱/۰۶ به ۳/۷ میلی اکی والان پراکسید بر کیلوگرم روغن ماهی رسید. حد قابل قبول پیشنهادی برای میزان پراکسید، ۱۰ میلی اکی والان پراکسید بر کیلوگرم چربی ماهی می‌باشد (Ojagh *et al*., 2010). بر این اساس هیچکدام از تیمارها به بالاتر از این حد نرسیدند. اما میزان پایین پراکسید در تیمارهای کیتوزان نانوکپسوله + استات سدیم ٪۱/۵ نسبت به تیمارهای کیتوزان نانوکپسوله، نشانگر اثر سینرژیستی این دو ماده بود. به‌نظر رسید، فعالیت ضد باکتریایی نانوکیتوزان و استات سدیم سبب جلوگیری از اکسیداسیون چربی بواسطه باکتری‌های لیپولیتیک و کاهش واکنش‌های آنزیمی باکتریایی مرتبط با اکسیداسیون چربی در ماهیان می‌باشد. تیوباربیتوریک اسید به طور وسیعی جهت تعیین میزان اکسیداسیون ثانویه لیپیدها بکار می‌رود (Ghorabi and Khodanazary, 2017). در صورت واکنش مالون آلدئیدها با سایر ترکیبات بدن ماهی، ممکن است مقدار TBA نشان‌دهنده درجه واقعی اکسید شدن چربی‌ها نباشد (Aubourg, 2004). افزایش مقدار TBA طی نگهداری در یخچال، ممکن است ناشی از دهیدروژن شدن جزئی بافت ماهی و افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع باشد (Chytiri *et al*., 2004). بر طبق نتایج ارائه شده در شکل ۹ میزان TBA در گروه کنترل از ۰/۷ میلیگرم مالون آلدهید در کیلوگرم گوشت در روز صفر به ۲/۹۳ در روز آخر نگهداری افزایش یافت. میزان مجاز TBA برابر۲ میلی‌گرم مالون آلدئید در کیلوگرم گوشت ماهی قبلا گزارش شده است (Goulas and Kontominas, 2007). بر این اساس نمونه شاهد در روز ششم نگهداری از حد مجاز مصرف انسانی عبور کرد اما نتایج نشان داد تیمار کیتوزان نانوکپسوله در حضور و فقدان استات سدیم ٪۱/۵ تا روز ۱۶ نگهداری از حد مجاز عبور نکرد. ضمن اینکه مقادیر کیتوزان نانوکپسوله + استات سدیم ٪۱/۵ کمتر از مقادیر بدست آمده در کیتوزان نانوکپسوله بود. کاهش جمعیت باکتریایی در اثر خاصیت ضد میکروبی کیتوزان نانوکپسوله و افزایش اثر ضد میکروبی آن با استات سدیم که سبب کاهش میزان اکسیداسیون اولیه شده بود، نهایتاً موجب کاهش اکسیداسیون ثانویه می‌گردد. بنابراین، در تیمارهای حاوی کیتوزان و استات سدیم میزان کمتری از TBA وجود خواهد داشت. این نتایج با نتایج Kashiri و همکاران(۲۰۱۱) همخوانی داشت. مکانیسم عمل نمک اسیدهای آلی، مختل نمودن فعالیت

سلول و اجزای درون سلولی می‌باشد. اثرات مختلف آنها می‌تواند به نوع و غلظت مصرف آنها، گستره رشد میکروبی، نوع بسته‌بندی و مدت زمان نگهداری مرتبط باشد (Sallam, 2007). استفاده از نمک سدیم اسیدهای آلی سبب کاهش میزان تولید TBA در ماهی می‌شود که نشان از تأثیر مثبت این نمک‌ها بر کاهش سرعت اکسیداسیون در طول نگهداری در یخچال دارد (Kashiri *et al.*,2011).

ارزیابی حسی

این بخش از تحقیق دارای اهمیت بالایی است زیرا بالارفتن زمان ماندگاری مواد غذایی در کنار ذائقه مصرف کننده قابل قبول می‌باشد. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۱، تیمار شاهد در تمام شاخص‌های مورد بررسی، در روز سوم نگهداری به زیر رقم ۳ (حد مقبولیت) رسید اما تیمارهای کیتوزان نانوکپسوله در تمام شاخص‌ها در روز ۱۲ به رقم مقرر ۳ رسیدند (بجز شاخص رنگ که در روز ۱۶به رقم ۳ رسید). نمونه‌های شاهد از نظر طعم، بافت، بو و پذیرش کلی، از روز ۳ و از نظر بو از روز اول نگهداری دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها بودند ($P<0.05$). ترکیب استات سدیم با کیتوزان نانوکپسوله باعث شده بود که این تیمارها از روز ۱۲ تا آخر دوره نگهداری، اختلاف معنی‌داری با تیمارهای کیتوزان نانوکپسوله داشته باشند ($P<0.05$). نتایج بدست آمده با نتایج آنالیزهای شیمیایی و میکروبی این تحقیق همخوانی داشت. نتایج مشابهی را Fan و همکاران (۲۰۰۹)، آلبوغبیش و نظری (۱۳۹۶) و Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) اعلام کرده بودند.

نتیجه‌گیری

افزایش زمان ماندگاری موضوعی است که باید براساس تمام نتایج حاصل از آزمون‌های شیمیایی، میکروبی و حسی نظر داد. با در نظر گرفتن این شاخص‌ها، فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین‌کمان را بدون مواد نگهدارنده (نمونه شاهد) تا روز ششم می‌توان در یخچال نگهداری کرد. این در حالی است که با افزودن کیتوزان نانوکپسوله به فیله‌های ماهی، مدت زمان نگهداری به روز ۱۲ رسید و ۶ روز ارتقاء یافت. ترکیب استات سدیم ٪۱/۵ با کیتوزان نانوکپسوله، زمان نگهداری فیله‌های ماهی قزل آلای رنگین‌کمان را از ۶ روز به ۱۶ روز افزایش داد. نکته نهایی اینکه افزایش میزان کیتوزان از ٪۱ به ٪۲ نتوانست اختلاف معنی‌داری را در بین تیمارهای همنام ایجاد کند ($P<0.05$).

منابع

احمدی، ع.، ۱۳۹۶. استفاده از کیتوزانهای مختلف و استات سدیم به منظور افزایش زمان ماندگاری فیله فیل ماهی(*Husohuso*) طی نگهداری در یخچال(۱°C±۴). پایاننامه کارشناسی ارشد، رشته شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۹۶ صفحه.

اسدی‌زاده، ل.، ۱۳۹۳. ثاثیر پیش تیمار زمانهای غوطه وری و غلظتهای مختلف استات سدیم روی ماندگاری فیله کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) هنگام نگهداری در یخچال. پایاننامه کارشناسی ارشد، رشته فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه زابل. ۹۰ صفحه.

آلبوغبیش، ح. و نظری، آ.، ۱۳۹۶. مقایسه تاثیر پوششهای کیتوزان و نانوکیتوزان غنی شده با عصاره چای سبز بر کیفیت ماهی گیش درخشان طی نگهداری در یخچال. مجله علمی شیلات ایران، ۵: ۱۰۹-۹۵

صادقی، م.، ارشدی، ع.، میردار هریجانی، ج. و حدادی، ف.، ۱۳۹۸. بررسی اثر ضد باکتریایی پوشش خوراکی کیتوزان همراه با عصاره آبی میوه گیاه پنیرباد *whitania coagulans* بر فیله ماهی کپور نقرهای طی نگهداری در یخچال مجله علمی شیلات ایران، سال ۲۹، شماره ۲، صفحات ۲۰۱-۲۱۰.
DOI:10.22092/ISFJ.2019.121213

صفری، ر. و یعقوب زاده، ز.، ۱۳۹۴. اثر ترکیبی نایسین و استات سدیم بر افزایش زمان ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان‌شکم خالی. مجله علمی شیلات ایران، ۴: ۱۵۵-۱۶۸

فهیم دژبان، ی. و معراجی، م.، ۱۳۹۸. مطالعه اثر ضداکسیداسیونی عصاره های آویشن(*Zataria multifloria*)، موسیر(*Allium ascalonicum*) و زردچوبه(*Curcuma longa*) بر ماندگاری فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) طی دوره نگهداری در یخچال. مجله علمی شیلات ایران، سال ۲۹، شماره ۴، صفحات ۸۳-۷۳.
DOI:10.22092/ISFJ.2020.122996

محمدزاده، ب.، رضایی، م.، حسنی نژاد، م. و برزگر، م.، ۱۳۹۶. تعیین عمر ماندگاری فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) پوشش داده شده با آلژینات سدیم حاوی اینولین طی نگهداری در شرایط یخچال(۴±۲C°). فصلنامه علمی پژوهشی علوم و فنون شیلات، ۶: ۷۴-۵۷.

Abbas, K.A., Mohamed, A., Jamilah, B. and Ebrahimian, M., 2008. A Review on Correlations between Fish Freshness and pH during Cold Storage. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 4 (4): 416-421. DOI**:**10.3844/ajbbsp.2008.416.421

AOAC (Association of Official Analytic Chemists). 2002. Official methods of analysis 17th ed. Washington DC.

AOAC (Association of Official Analytic Chemists), 2005. Official methods of analysis 18th ed, Washington DC.

Aubourg, S.P., Perez-Alonso, F. and Gallardo, J.M., 2004. Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel (Trachurus trachurus) by citric acid and ascorbic acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106: 232-240. Doi:org/10.1002/ejlt.200400937

Caballero, M.E., Gomez, M.C., Perez, M. and Montero, P., 2005. A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19: 303–311. DOI:10.1016/j.foodhyd.2004.06.006

Chaudhry, Q., Castle, L. and Watkins, R. (Eds.), 2010. Nanotechnologies in Food. Royal Society of Chemistry Publishers, Cambridge, UK. 229P

Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I.N. and Kontominas, M.G., 2004. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Journal of Food Microbiology*, 21: 157–165. Doi: 10.1016/S0740-0020(03)00059-5

Du, W.L., Xu, Z.R., Han, X.Y.; Xu, Y.L. and Miao, Z.G., 2009. Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticles for eosin Y as a model anionic dye. *Journal of Hazardous Material*, 153: 152-156. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.08.040

Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y. and Chi, Y., 2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, 115: 66–70. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.11.060

FAO, 2019. Joint FAO/WHO food standards programme codex alimentarius commission., Rome, 65 and 104.

Gelman, A., Glatman, L., Drabkin, V. and Harpaz, S., 2001. Effects of storage temperature and preservative treatment on shelf life of the pond raised freshwater fish, silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Journal of Food Protet*, 64: 1584–1591. Doi:10.4315/0362-028x-64.10.1584

Ghorbani, R.S. and Khodanazary, A., 2017. Effects of chitosan and nano-chitosan as coating materials on the quality properties of large scale tongue sole Cynoglossus arel during super-chilling storage. Iranian *Journal of Fisheries Sciences*, Vol.19, Issue.5, pp.2242-2257. Doi: 10.22092/ijfs.2018.119689.

Gimenez, B., Roncales, P. and Beltran, J.A., 2002. Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1154–1159. DOI: 10.1002/jsfa.1136

GómezEstaca, J., De Lacey, A.L., LópezCaballero, M.E., GómezGuillén, M.C. and Montero, P., 2010. Biodegradable

gelatinchitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7): 889-896. Doi:10.1016/j.fm.2010.05.012

Goulas, A.E. and Kontominas, M.G., 2005. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (Scomber japonicus): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 93: 511-520. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.09.040

Gould, G.W. and Russell, N.J., 2003. *Food Preservatives*, 2nd Edn, Kluwer Academic Plenum Publishers, New York. 370 P.

Goulas, A.E. and Kontominas, M.G., 2007. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (Sparus aurata), biochemical and sensory attributes. *Food chemistry*, 100: 287-296. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.045

Gram, L. and Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 262-266. Doi:10.1016/S0958-1669(02)00309-9

Huss, H. and Gram, H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish Products. *Journal Food Microbiology*, 33:589–595. Doi:org/10.1016/0168-1605(96)01134-8

ICMSF (International Commission on Microbiological Species cation for Foods1),1986. Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: principle sand species applications(2nded.).Buffalo, NY: University of Toronto Press.

Jones, N., Ray, B., Ranjit, K. and Manna, A., 2008. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 279:71-76. Doi: :10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x

Kashiri, H., Haghparast, S. and Shabanpour, B., 2011. Effects of Sodium Salt Solutions (Sodium Acetate, Lactate and Citrate) on Physico-chemical and Sensory Characteristics of Persian Sturgeon (Acipenser persicus) Fillets under Refrigerated Storage. *Journal of Agricultural Technology*, 13: 89-98.

Losada, V., Barros-Velazquez, J. and Aubourg, S.P., 2007. Rancidity development in frozen pelagic fish: Influence of slurry ice as preliminary chilling treatment. *Learning with Technologies*, 40: 991–999. Doi: 10.1016/j.lwt.2006.05.011

Lucera, A., Costa, C., Conte, A. and Del Nobile, M.A., 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3:287. Doi:10.3389/fmicb.2012.00287

McMeekin,T.A., Olley, J.N., Roos, T. and Ratkowsky, D.A., 1993. Predictive microbiology. Theory and Application. Resaerch Studies Press Taunton, England: chapter 6, section 6.1 Specified Spoilage level, pp. 199-200.

Namulema, A., Muyonga, J.H. and Kaaya, A.N., 1999. Quality deterioration in frozen Nile perch (Lates niloticus) stored at -13 and -27°C. *Food Research International*, 32: 151-156.

Nowzari, F., Shábanpour, B. and Ojagh, S.M., 2013. Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 141: 1667–1672. Doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.022

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H., 2010. Effect of chitosan

coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120: 193–198. Doi: 10.1155/2015/835151.

Ortiz, J., Larraín, M.A., Pacheco, N., Vivanco, J.P. and Aubourg, S.P., 2013. Effect of the antioxidant profile in the diet of farmed Coho salmon (Oncorhynchus kisutch) on the nutritional value retention during frozen storage. *Grasasy Aceites*, 64(3): 311-319. Doi: org/10.3989/gya.107612.

Ramezani, Z., Zarei, M. and Raminnejad, N., 2015. Comparing the effectiveness of chitosan and nanochitosan coating on the quality of refrigerated silver carp fillets. *Food Control*, 51: 43-48. Doi: 10.1016/j.foodcont.2014.11.015

Rezaei, M. and Hosseini, S., 2008. Quality assesssment of farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during Chilled Storage. *Journal of Food Science*; 73: 93-6. DOI:10.1111/j.17503841.2008.00792.x.

Sallam, K.I., 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Journal of Food Control*, 18: 566-575. Doi: 10.1016/j.foodcont.2006.02.002

Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. and Jeon, Y.J., 1999. Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Science and Technology*, 10:37–51. Doi:org/10.1016/S0924-2244(99)00017-5

Shokri, S., Ehsani, A. and Jasour, M.A., 2017. Efficacy of Lacto -peroxidase System-Whey Protein Coating on Shelf-life Extension of Rainbow Trout Fillets during Cold Storage (4°C). *Food and Bioprocess Technology*, 8: 54–62. Doi: 10.1007/s11947-014-1378-7

Siripatrawan, U., Harte, B.R., 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocoll*, 24(8): 770-75. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.04.003

Tapilatu, Y., Nugraheni, P.S., Ginzel, T., Latumahina, M., Limmon, G.V. and Budhijanto, W., 2016. Nano-chitosan Utilization for Fresh Yellowfin Tuna Preservation. Aquatic procedia, 7:285-295. DOI. .org/10.1016/j.aqpro.2016.07.040

Yagin, C. and Buyukurok, S., 2017. The effects of chitosan, sodium lactate and sodium diacetate on the shelf life of hot smoked and vacuum packed rainbow trout fillets. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 64:1-6. Doi: 10.1501/Vetfak_0000002765

Study the effect of nanochitosan with sodium acetate coating on shelf life of Rainbow trout filet (*Onchorynchus mykiss*) in refrigerator temperature

Kamani J.[1]; Motalbei Moghanjoghi A.A.[1*]; Razavilar V.[1]; Rokni N.[1].

[*]abbasalimotallebi@gmail.com

1-Department of Food Hygiene and Quality control, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Rainbow trout filet is a high nutritive value product that can be introduced to consumers successfully which have short shelf life. In this study, the effects of Nano-capsulated chitosan analyzed with and without sodium acetate coatings on increasing the shelf life of refrigerated Rainbow trout filets (*Onchorynchus mykiss*) during refrigerator storage (4±1°C) and in polyethylene with zipper bag during 16 days. For this purpose, the Rainbow trout filets were immersed in five treatments that included: solutions of NCH1%, NCH2%, NCH1%+NaOAC1.5%, NCH2%+ NaOAC1.5% and distilled water solution as a control sample. The antimicrobial effect of Nano-capsulated chitosan coating with and without sodium acetate was evaluated by counting of aerobic mesophilic bacteria, lactic, psychrophilic bacteria and chemical properties including pH, TBA, PV and TVB-N. Sensory evaluation determined by 5 evaluator persons who were asked to evaluate the flavor, odor, color, texture and overall acceptability of samples in days 0, 3, 6, 10, 12. Sensorial, chemical and microbial results evaluated by ANOVA and Duncan tests. Sensorial, chemical and microbial results showed that in end of storage Nano-capsulated chitosan with and without sodium acetate 1.5% were better significantly compared to control group ($p<0.05$). In this study, the sample contained NCH2%+ NaOAC1.5% coating treatment showed the best results of storage. The results of Sensorial, chemical and microbial tests of Nano-capsulated chitosan and Nano-capsulated chitosan with sodium acetate indicted that shelf life storage were increased from 6 days in control treatment to 12 and 16 days, respectively.

Keywords: Nanochitosan, Sodium acetate, Rainbow trout, Shelf life

[*]Corresponding author