مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

# اثر پوشش خوراکی کیتوزان حاوی اسانس نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) بر ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی نگهداری در دمای یخچال (۴±۱°C)

**هادی پورکارگر*، علی‌رضا رفعتی**

***دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سروستان، ایران***

**نوع مقاله:**
پژوهشی

**تاریخچه مقاله:**
دریافت: ۹۸/۰۴/۲۱
اصلاح: ۹۸/۰۷/۰۸
پذیرش: ۹۸/۰۹/۲۱

**کلمات کلیدی:**
اسانس
قزل آلای
کیتوزان
نعناع فلفلی

**چکیده**

هدف از این تحقیق استفاده از پوشش کیتوزان حاوی اسانس نعناع فلفلی جهت افزایش ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای یخچال (۴±۱°C) می‌باشد. فیله‌ها به ۵ گروه شاهد، تیمار با پوشش کیتوزان بدون اسانس، تیمار با پوشش حاوی ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اسانس تقسیم و طی ۲۰ روز در دمای یخچال نگهداری شد که هر پنج روز یک‌بار مورد انجام آزمایش‌های میکروبی شامل (TVC) و (PTC) و آزمایش‌های شیمیایی شامل pH، (PV) ، (TBA)، (TVB-N) و (FFA) قرار گرفتند. طبق نتایج، استفاده از پوشش و اسانس مقادیر تمام شاخص‌ها را در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۵). در پایان کم‌ترین میزان شاخص‌ها مربوط به تیمار با پوشش حاوی ۲ درصد اسانس و بیشترین میزان مربوط به تیمار شاهد بود. بر اساس نتایج، میزان TVC، PTC، pH، PV، TBA، TVB-N و FFA در فیله‌های پوشش داده شده با کیتوزان و ۲٪ اسانس به ترتیب ۰/۱۴±۶/۵۵ لگاریتم کلونی در گرم گوشت، ۰/۱۸±۶/۹۰ لگاریتم کلونی در گرم گوشت، ۰/۰۲±۶/۷، ۰/۰۵±۲/۸۰ میلی اکی والان پراکسید بر کیلوگرم چربی، ۰/۰۲±۰/۱۲ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم گوشت، ۰/۴۶±۲۴/۸۸ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت و ۰/۰۸±۱/۵۲ درصد اولئیک اسید بود. نتایج نشان داد پوشش کیتوزان حاوی اسانس نعناع فلفلی در کاهش اکسیداسیون و رشد باکتری‌های فیله ماهی قزل‌آلا طی نگهداری در شرایط سرد (۴±۱°C) مؤثر است.

## مقدمــه

محافظت از ماهی به عنوان مهم‌ترین منبع تغذیه‌ای اسیدهای چرب غیراشباع برای انسان، در برابر انواع فسادهای اکسایشی و میکروبی ضروری است. بررسی‌ها نشان داده که میزان پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با نام علمی (*Oncorhynchus mykiss*) به طور قابل توجهی افزایش یافته است. بر اساس گزارش FAO در سال ۲۰۱۲، این ماهی به خوبی در بازار مورد استقبال قرار گرفته و یک گونه تجاری مهم با تولید جهانی ۰/۷۷ میلیون تن در سال ۲۰۱۱ است (Kamani *et al*., 2017). در طول دهه گذشته، بیشترین میزان تولید آبزیان متعلق به ماهی قزل آلای رنگین‌کمان بوده که این میزان در ایران ۴۰٪ از کل تولیدات شیلات بوده است. ایران موفق به کسب رتبه اول در پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: hpourkargar@yahoo.com

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

در آب شیرین شده است که این میزان برابر با ۶۴ هزار تن در سال ۲۰۰۸ بود (Kalbassi *et al*., 2013). عملکرد ترکیبات شیمیایی و آنزیمی و نیز فساد میکروبی باعث کاهش عمر ماندگاری این ماهی می‌گردد. کیتوزان پلیمری زیستی متشکل از بتا ۱ و ۴ دی گلوکز آمین می‌باشد (Ojagh *et al*., 2010). این ترکیب کاربرد وسیعی در صنایع غذایی داشته و فراوان‌ترین بیوپلیمر طبیعی بعد از سلولز است. منبع عمده و تجاری کیتین، پوسته‌ی سخت‌پوستان از جمله خرچنگ، میگو و لابستر است. مطالعات نشان داده اکسیداسیون چربی در ماهی از طریق استفاده از کیتوزان محدود می‌شود (Jeon *et al*., 2002). اسانس‌ها مایعات فراری هستند که از گیاهان دارویی و ادویه‌ها به طور عمده توسط تقطیر با بخار به دست آمده‌اند. نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* L. و نام رایج Peppermint، از خانواده *Lamiaceae* از جمله گیاهان دارویی و معطر است. مقدار اسانس این گیاه بسته به شرایط کشت بین ۱ تا ۳٪ متغیر است. اصلی‌ترین ترکیب اسانس نعناع فلفلی منتول است که مقدار آن در اسانس بسته به نوع آن و شرایط محیطی از ۳۵ تا ۵۵٪ متغیر است (Kazem Alvandi *et al*., 2011). نتایج چندین مطالعه نشان داد اثر ضد میکروبی و ضداکسایشی کیتوزان تا حد زیادی با افزودن اسانس به کیتوزان افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای خواص ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی بر روی ۲۱ گونه باکتری پاتوژن بررسی گردید (Iscan *et al*., 2002). نتایج نشان داد اسانس نعناع فلفلی در برابر عوامل پاتوژن دارای اثر مهارکنندگی بسیار خوبی می‌باشد. به طوری‌که منتول به عنوان مسئول فعالیت ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی شناخته شد. نعناع فلفلی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و قادر به مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Mimica-Duki *et al*., 2003). Kanatt و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که عصاره نعناع به تنهایی فعالیت ضداکسایشی خوبی دارد، اما فعالیت ضد میکروبی آن ضعیف است، در حالی که کیتوزان به تنهایی فعالیت ضداکسایشی ضعیفی نشان داد، اما خواص ضد میکروبی آن بسیار عالی بود. طبق نتایج آن‌ها استفاده از مخلوط کیتوزان و عصاره نعناع به عنوان یک ماده نگهدارنده جدید جهت گوشت و محصولات گوشتی باعث نابودی رادیکال‌های DPPH، هیدروکسیل و سوپراکسید گردیدند که قدرت آن بیشتر از عصاره نعناع به تنهایی بود. فعالیت ضد میکروبی مخلوط کیتوزان و نعناع در برابر فسادهای شایع مواد غذایی و باکتری‌های بیماری‌زا، قابل توجه بود. Tassou و همکاران (۱۹۹۵) تأثیر اسانس نعناع فلفلی *Mentha piperita* را بر روی گونه‌های میکروبی *سالمونلا انتریدیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در مدل‌های غذایی بررسی نمودند و نشان دادند در تمام نمونه‌های غذایی بار باکتریایی نمونه شاهد بیشتر از تیمارهای دارای اسانس بود و یک رابطه معکوس بین تعداد باکتری و غلظت اسانس در مواد غذایی وجود داشت. استفاده از پوشش کیتوزان غنی‌شده با اسانس دارچین بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در یخچال، باعث حفظ کیفیت خوب ماهی در شاخص‌های شیمیایی و میکروبی و نیز افزایش مدت زمان نگهداری ماهی در یخچال شد (Ojagh *et al*., 2010). فیلم کیتوزان- ژلاتین حاوی عصاره اتانولی دانه انگور قرمز (red grape seed) و اسانس کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides*) فساد شیمیایی و میکروبی فیله ماهی قزل‌آلا را به طور قابل توجهی در نمونه دارای پوشش حاوی غلظت‌های مختلف عصاره و اسانس به تعویق انداخت (Kakaei and Shahbazi, 2016). در این رابطه Chamanara و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی ویژگی‌های تغذیه‌ای، بافتی و حسی ماهی قزل‌آلا پوشش داده شده با کیتوزان غنی شده با اسانس آویشن (*thyme*) نشان دادند پوشش کیتوزان به همراه اسانس آویشن باعث جلوگیری از تغییرات نامطلوب در طعم و مزه می‌گردد. همچنین موجب افزایش ارزش تغذیه‌ای، بافتی ویژگی‌های حسی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مدت ۱۵ روز نگهداری در یخچال خواهد شد. Jouki و همکاران (2014) در بررسی اثر لعاب به دانه (*Quince seed*) همراه با اسانس پونه کوهی (*oregano*) یا آویشن (*thyme*) بر روی عمر مفید فیله ماهی قزل‌آلا در یخچال، شاهد کاهش اکسیداسیون چربی و فساد میکروبی تیمارهای حاوی پوشش بودند. اثر پوشش‌دهی با کاراگینان حاوی اسانس لیمو بر کیفیت فیله ماهی قزل‌آلا در یخچال طی ۱۵ روز نشان داد که پوشش کیتوزان حاوی عصاره لیمو، تأثیر مثبتی بر افزایش عمر ماندگاری فیله‌ها دارد (Volpe *et al*., 2015). Berizi و همکاران (۲۰۱۸) پس از تهیه پوشش کیتوزان حاوی عصاره پوست انار به این نتیجه رسیدند که استفاده از این پوشش باعث بهبود خواص شیمیایی، میکروبی، حسی و بافتی ماهی قزل‌آلا در هنگام نگهداری به صورت منجمد می‌شود.

مطالعه حاضر با هدف درک نوع و میزان تأثیر پوشش خوراکی کیتوزان حاوی اسانس نعناع فلفلی بر کیفیت و ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلا انجام شد تا برای توسعه‌دهندگان محصولات غذایی، امکان بهره‌برداری‌های متفاوت از قابلیت‌های پوشش‌ها

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

خصوصاً پوشش کیتوزان در صنعت غذا فراهم گردد. با توجه به افزایش روزافزون میزان علاقه به مصرف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و همچنین با توجه به اثبات خواص ضد میکروبی کیتوزان و اسانس‌ها و اینکه ترکیبی از پوشش کیتوزان به همراه اسانس نعناع فلفلی مورد بررسی قرار نگرفته است، مبنای این پژوهش بررسی اثر این پوشش بر روی کیفیت و ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

پودر کیتوزان، اسانس نعناع فلفلی، کاغذ صافی، الکل اتانول ۹۶ درصد، سولفات سدیم بدون آب، اسید استیک ۱ درصد، گلیسرول، توئین ۸۰، ۱- بوتانل، پودر TBA، اکسید منیزیم، اکتانول، اسید بوریک ۲ درصد، معرف متیل رد، اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال، کلروفرم، متانول، معرف فنل فتالئین، اسیداستیک کلروفرمی، سود نرمال، یدور پتاسیم، معرف نشاسته ۱ درصد، تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال، محیط کشت پلیت کانت آگار (PCA).

### تهیه اسانس

جهت استخراج اسانس گیاه نعناع فلفلی از روش تقطیر با آب و دستگاه اسانس‌گیری کلونجر استفاده شد. حدود ۱۰۰ گرم از برگ خشک گیاه ابتدا خرد و سپس به بالن کلونجر منتقل و مقدار ۱ لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. گیاه نعناع فلفلی از گلخانه‌ای در شیراز خریداری گردید. عمل اسانس‌گیری به مدت ۴ ساعت انجام گرفت. با توجه به کم‌تر بودن چگالی اسانس نسبت به چگالی آب، اسانس استخراج شده روی فاز آبی قرار گرفته و به راحتی توسط شیر تخلیه جداسازی شد. عمل آبگیری از اسانس حاصل توسط سولفات سدیم بدون آب (Na2 So4) به مقدار بسیار جزئی (۰/۵ گرم) صورت پذیرفت. راندمان استخراج بین ۰/۹ تا ۱/۱ درصد حجمی-وزنی بود (Taherkhani *et al*., 2014).

### آماده‌سازی ماهی

تعدادی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ۵۰ ± ۵۵۰ گرم به صورت تازه از مزرعه پرورش ماهی قزل‌آلا واقع در شیراز در پاییز ۱۳۹۵ خریداری و در داخل جعبه‌های حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های ماهی پس از عملیات مربوط به سر زنی و تخلیه شکمی با آب قابل شرب شستشو، سپس استخوان‌گیری انجام شد و با آب مقطر کاملاً شسته شدند. پس از آن به وسیله چاقوی استریل فیله‌هایی در ابعاد ۳ تا ۴ سانتی‌متر و وزن حدود ۵ ± ۵۵ گرم تهیه گردید.

### تهیه محلول پوششی

بر اساس روش پیشنهادی Chamanara و همکاران (۲۰۱۲) محلول ۲ درصد (وزنی- حجمی) کیتوزان در آب مقطر تهیه و توسط همزن حرارتی مخلوط شد. کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (۱۹۰ تا ۳۱۰ کیلو دالتون) و درجه استیل‌زدایی ۸۵ درصد از شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا تهیه شد. جهت جلوگیری از لخته شدن، اسید استیک ۱٪ به مخلوط اضافه و مجدداً مخلوط شد. گلیسرول به عنوان نرم‌کننده (۰/۷۵ میلی‌لیتر به ازای هر گرم کیتوزان) به آن افزوده شد. محلول در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد مخلوط گردید. همچنین محلول کیتوزان حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اسانس تهیه و به مدت ۳ دقیقه به وسیله هموژنایزر اولتراتوراکس IKA T25 با دور ۱۳۵۰۰ rpm (دور در دقیقه) یکنواخت شدند (Chamanara *et al*., 2012).

### پوشش دهی فیله‌ها

در این مرحله از روش پیشنهادی Chamanara و همکاران (۲۰۱۲) استفاده شد. فیله‌ها به مدت ۲ دقیقه در محلول‌های آماده شده غوطه‌ور شدند. سپس به مدت ۳۰ ثانیه آویخته شد تا خشک شده و پوشش مناسب بر روی آن‌ها ایجاد شود. برای اطمینان از ایجاد پوشش بر روی ماهی‌ها این کار دوباره تکرار شد. سپس در صفحات مشبک استریل تحت جریان ملایم هوا به مدت ۱ ساعت قرارگرفته و پس از خشک شدن پوشش، فیله‌ها در ظروف دردار و استریل شده قرار گرفتند. فیله‌ها در یخچال در دمای (۴±۱°C) به مدت ۲۰ روز نگهداری شدند.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

**اندازه‌گیری pH**

۵ گرم از نمونه‌های فیله ماهی در ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر هموژن و سپس به وسیله کاغذ صافی صاف شد. سپس pH نمونه‌ها در دمای اتاق با استفاده از دستگاه pH متر متروم مدل (827 pH lab) اندازه‌گیری گردید (Suvanich *et al*., 2000).

**اندازه‌گیری تیوباربیتوریک اسید** (TBA)[1]

۲۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه توسط مخلوط کن میکس گردید. سپس نمونه به بالن ۲۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس با محلول بوتانل به حجم رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر از مخلوط فوق به لوله فالکون خشک دردار انتقال یافت و ۵ میلی‌لیتر معرف TBA به آن افزوده شد. جهت تهیه معرف TBA، ۲۰۰ میلی‌گرم از پودر TBA در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال بوتانول حل و به وسیله کاغذ صافی فیلتر گردید. لوله‌های دردار در حمام آب (بن ماری) ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند و پس از آن در دمای محیط سرد شدند. جذب نمونه (As) در ۵۳۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر در مقابل شاهد آب مقطر (Ab) اندازه‌گیری و میزان TBA (بر حسب میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهی) طبق رابطه ۱ محاسبه شد (Egan *et al*., 1997).

رابطه ۱

TBA= جذب نمونه در۵۳۰ نانومتر − جذب آب مقطر در ۵۳۰ نانومتر ×۵۰ / ۲۰۰

**اندازه‌گیری بازهای ازته فرار (TVB-N)**[2]

۱۰ گرم از فیله‌های ماهی به وسیله مخلوط کن میکس و به همراه ۲ گرم اکسید منیزیم به بالن کلدال منتقل گردید. سپس۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به اضافه ۲ تا ۳ قطره اکتانول (به عنوان ضد کف) و تعدادی ساچمه شیشه‌ای به محتویات بالون افزوده شد. لوله خروجی سیستم کلدال درون ارلنی حاوی ۲۵ میلی‌لیتر اسید بوریک ۲٪ و ۲ تا ۳ قطره معرف متیل رد قرار گرفت. گازهای متصاعد شده از محتویات بالن کلدال که معرف بازهای ازته فرار بودند در محلول درون ارلن حاوی اسید بوریک جمع‌آوری و به صورت تغییر رنگ محلول از ارغوانی به سبز روشن نمودار شد. در نهایت این محلول با اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد تا زمانی که رنگ محلول مجدداً ارغوانی گردید. میزان اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال مصرفی جهت تیتراسیون اندازه‌گیری و پس از قرار گرفتن در رابطه ۲ (TVB-N) بر حسب میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی محاسبه شد (AOAC, 1990).

فرمول (۲)

TVB-N = حجم اسید سولفوریک مصرفی ×۱۴

**اندازه‌گیری اسیدهای چرب آزاد (FFA)**[3]

جهت استخراج چربی کل، ۱۰۰ گرم از فیله به وسیله میکسر یکنواخت و به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول در مخلوط کن به مدت دو دقیقه مخلوط گردید. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مخلوط فوق اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شد. به وسیله قیف بوخنر فاز جامد از مایع جدا گردید. مایع فیلترشده به داخل دکانتر شیشه‌ای منتقل و به مدت چند دقیقه تا جداشدن لایه‌ها و شفاف شدن آن‌ها باقی ماند. فاز شفاف پایینی که شامل کلروفرم و چربی استخراجی بود، خارج گردید. سپس به منظور خارج کردن کلروفرم از محلول به دست آمده و تغلیظ چربی، محلول وارد حمام آب گرم متصل به دستگاه روتاری (N-1000 W Auto jackNAJ- 160) شد و تحت شرایط خلاء و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد کلروفرم تبخیر و از روغن جداسازی گردید (Bligh and Dyer, 1959). جهت تعیین میزان FFA از روش پیشنهادی Egan و همکاران (۱۹۹۷) استفاده شد. در ارلنی، ۲۵ میلی‌لیتر الکل اتانول ۹۶ درصد نصر ساخت ایران ریخته و سپس ۲ تا ۳

[1] Thiobarbituric acid
[2] Total volatile basic nitrogen
[3] Free fatty acids

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

قطره معرف فنل فتالئین به آن افزوده شد. جهت خنثی کردن این محلول ۱ تا ۲ قطره سود نرمال (مرک) اضافه نمودیم که با تغییر رنگ به رنگ پوست پیازی، همراه بود. سپس در ارلنی ۱ میلی‌لیتر از چربی ناشی از تبخیر حلال مابقی فاز پایینی دکانتور ریخته و محلول تهیه شده اتانول را به آن اضافه نمودیم. ارلن روی هیتر قرار گرفت و بلافاصله بعد از اولین جوش، از روی حرارت برداشته شد، ۲ تا ۳ قطره معرف فنل فتالئین به آن افزوده و بلافاصله با سود (هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال) تیتر شد و طبق رابطه ۳، میزان اسیدهای چرب آزاد (بر حسب درصد اسید اولئیک)، محاسبه شد (Egan *et al*., 1997).

رابطه (۳)

$$FFA = \text{حجم سود مصرفی} \times \text{نرمالیته سود} \times ۲۸,۲ / \text{وزن نمونه چربی}$$

**اندازه‌گیری پراکسید (PV)**

بر اساس روش پیشنهادی Egan و همکاران (۱۹۹۷)، ۲۰ میلی‌لیتر از چربی روغن استخراج شده به وسیله دکانتور به ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری سر سمباده‌ای منتقل و ۲۵ میلی‌لیتر اسیداستیک کلروفرمی به آن افزوده شد. نسبت کلروفرم به اسید استیک ۳:۲ بود. سپس به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر محلول یدور پتاسیم (مرک) اشباع و ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده و محلول مدت ۱ دقیقه استراحت داده شد. بعد مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر نشاسته ۱٪ به عنوان معرف به آن افزوده و درب ارلن را گذاشته، محلول به شدت تکان داده شد. در این مرحله به دلیل آزاد شدن ید، شاهد تغییر رنگ محلول بودیم که با محلول تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال (مرک) تیتر شد. با استفاده از رابطه (۴)، میزان پراکسید محاسبه گردید. نتایج بر حسب میلی اکی والان اکسیژن در ۱۰۰۰ گرم از بافت ماهی گزارش شد.

رابطه (۴)

$$PV= \text{حجم تیترانت مصرفی} \times \text{نرمالیته تیوسولفات} \times ۱۰۰۰/ \text{وزن روغن}$$

**شمارش کلی باکتری‌ها [۴] (TVC) و باکتری‌های سرماگرا (PTC)[۵]**

یک گرم از بخش درونی فیله برداشته و در لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل (محلول نمک طعام ۸۵٪) قرار گرفت. به مدت ۱ دقیقه توسط دستگاه ورتکس کاملاً میکس و هموژن شد. سپس از مایع رویی محلول رقت‌های متوالی تهیه و از آخرین رقت یعنی رقت $۱۰^{-۶}$ به میزان ۱ میلی‌متر به وسیله سمپلر استریل برداشته و در محیط کشت پلیت کانت آگار (PCA) که ساخت شرکت مرک کشور آلمان بود، به روش پور پلیت کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده جهت شمارش کلی باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت‌های مربوط به باکتری‌های سرماگرا در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ روز در اینکوباسیون قرار گرفتند. سپس شمارش کلونی‌ها انجام گرفت و با قرار گرفتن در رابطه (۵) محاسبه و به صورت لگاریتم تعداد کلونی در گرم گوشت ماهی بیان گردید (Javidi *et al*., 2016).

رابطه (۵) $$Cfu = \text{تعداد کلونی} \times \text{عکس ضریب رقت} / \text{گرم}$$

**آنالیز آماری**

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف- اسمیرنوف (Kolomogorav–Smirnov) بررسی گردید. جهت تعیین اختلاف بین تیمارها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه one way ANOVA استفاده گردید. برای مقایسه میانگین‌ها در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار شناخته شد از آزمون دانکن در سطح آماری ۵ درصد استفاده شد. نمونه‌ها دارای سه تکرار بودند.

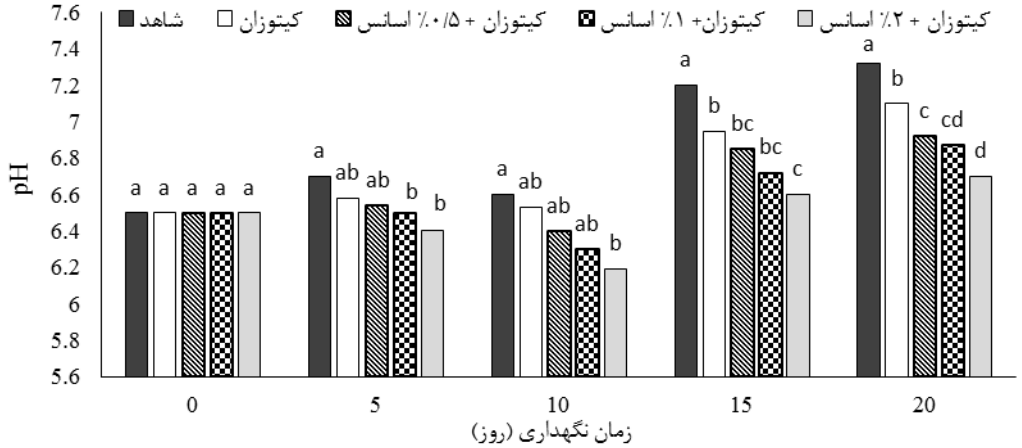
[4] Psychrotrophic bacterial count
[5] Psychrotrophic bacterial count

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

## نتایـج

### مقادیر pH

تغییرات مقادیر pH در تیمارها طی نگهداری در نمودار ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج مقادیر اولیه pH در تمام تیمارها ۶/۵±۰/۰۲ بود. همچنین در کل تیمارها در روز ۱۰ پس از نگهداری شاهد کاهش میزان pH و از روز ۱۵ به بعد شاهد افزایش میزان pH بودیم. به طوری‌که در پایان دوره این مقادیر در نمونه شاهد به ۷/۳۲±۰/۰۴ و در تیمار کیتوزان حاوی ۲٪ اسانس به ۶/۷±۰/۰۲ رسید.



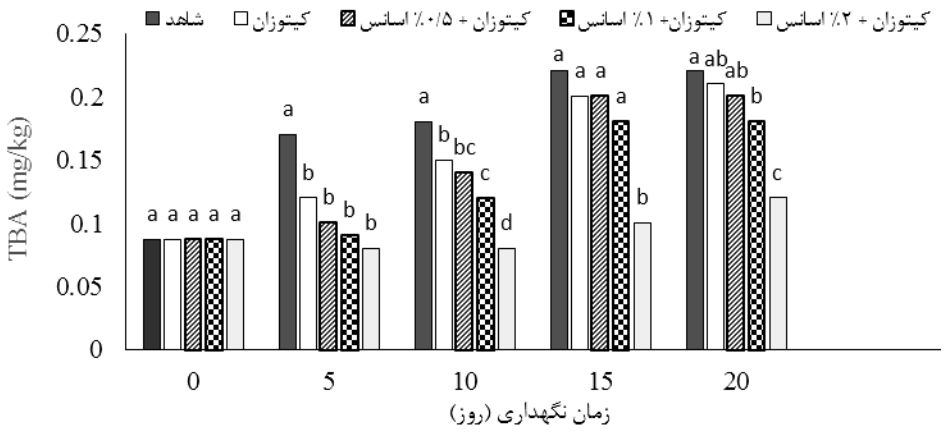

**شکل ۱.** تغییرات مقادیر pH در تیمارها در مدت زمان نگهداری در یخچال

### میزان تیو باربیتوریک اسید

نتایج اندازه‌گیری میزان TBA در نمودار ۲ مشاهده می‌شود. این شاخص در تمام تیمارها با گذشت زمان ذخیره‌سازی افزایش پیدا کرد که بیشترین میزان ۰/۲۲±۰/۰۲۶ میلی‌گرم مالون دی آلدئید در کیلوگرم گوشت ماهی مربوط به تیمار شاهد و کمترین میزان۰/۱۲±۰/۰۲۰ میلی‌گرم مالون دی آلدئید در کیلوگرم گوشت ماهی مربوط به تیمار کیتوزان و ۲٪ اسانس بود. دو تیمار حاوی ۱ و ۲٪ اسانس در انتهای دوره به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بودند ($P<0/05$).

### میزان بازهای ازته فرار

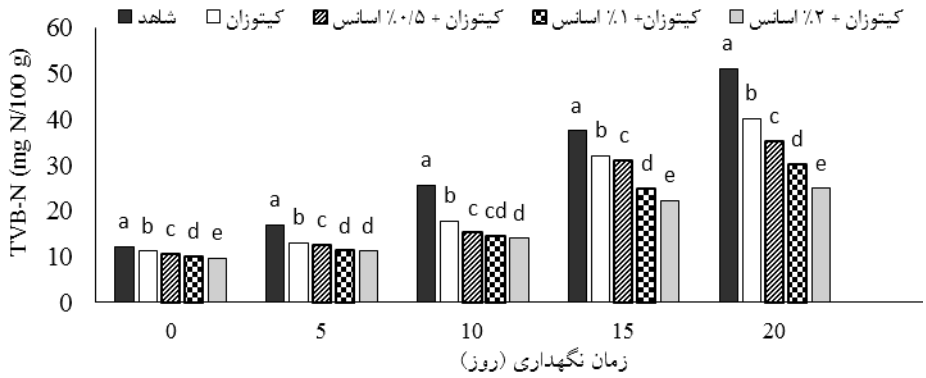
نتایج تغییرات TVB-N تیمارها در مدت نگهداری در نمودار ۳ مشاهده می‌گردد. میزان این شاخص در تمام تیمارها به شکل معنی‌داری ($P<0/05$) با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. در روز صفر این میزان در تیمار شاهد ۱۲/۰۹±۰/۱۷ و در تیمار




**شکل ۲.** تغییرات میزان TBA در نمونه‌ها طی مدت زمان نگهداری در یخچال

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

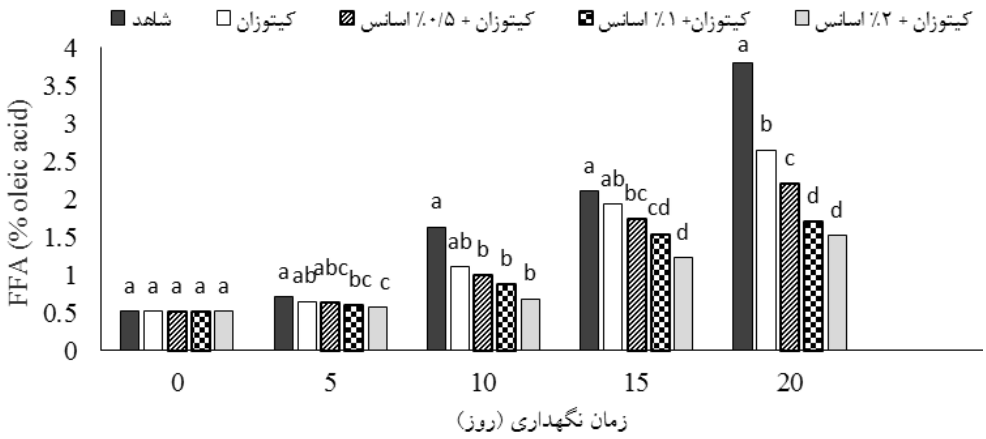
حاوی کیتوزان و ۲٪ اسانس ۹/۶۳±۰/۰۲ بود که در پایان دوره به ترتیب به ۵۱/۱۲±۰/۲۴ و ۲۴/۸۸±۰/۴۶ افزایش یافت. افزایش بار باکتریایی در طول دوره را می‌توان دلیلی برای این موضوع دانست. میزان بازهای ازته فرار در روز صفر، ۱۵ و ۲۰ همه تیمارها در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنادار بودند (P<۰/۰۵).




شکل ۳. تغییرات میزان TVB-N در نمونه‌ها طی مدت زمان نگهداری در یخچال

**میزان اسیدهای چرب آزاد**

نمودار ۴ بیانگر تغییرات FFA در تیمارهای مختلف در طی نگهداری می‌باشد. این میزان در روز صفر و در تمام تیمارها ۰/۵۲ بود. در پایان دوره بیشترین میزان مربوط به نمونه شاهد ۳/۸۰±۰/۱۷ درصد اولئیک اسید و کمترین مقدار ۱/۱۲±۰/۱۷ درصد اولئیک اسید در تیمار کیتوزان حاوی ۲٪ اسانس مشاهده شد. در انتهای دوره این شاخص در تیمارهای دارای پوشش کیتوزان به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵).

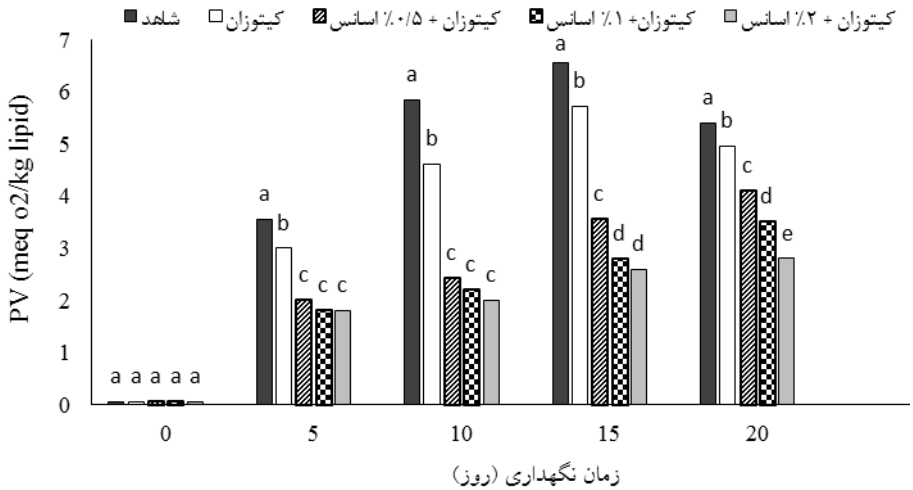



**شکل ۴.** تغییرات میزان FFA در نمونه‌ها طی مدت زمان نگهداری در یخچال

**میزان پراکسید**

تغییرات مقادیر پراکسید در نمودار ۵ مشاهده می‌گردد. مقدار PV در روز صفر در تیمارها بسیار ناچیز بود. در روز ۱۵ در تیمار شاهد به بیشترین مقدار ۶/۵۵±۰/۲۸ میلی اکی والان پراکسید بر کیلوگرم چربی رسید، سپس در روز ۲۰ کاهش یافت، اما همچنان در روز ۲۰ نسبت به سایر تیمارها به طور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵). تیمار دارای کیتوزان حاوی ۲٪ اسانس دارای کم‌ترین میزان PV است. در انتهای دوره تمام تیمارها دارای تفاوت معنی‌داری با یکدیگر بودند (P<۰/۰۵).

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021




**شکل ۵**. تغییرات مقادیر PV در نمونه‌ها طی مدت زمان نگهداری در یخچال

**شمارش کلی باکتری‌ها**

اثر پوشش‌ها بر TVC طی نگهداری در یخچال در جدول ۱ مشاهده می‌گردد. میزان اولیه در همه تیمارها ۲/۸۰±۰/۰۵ لگاریتم تعداد کلونی در گرم گوشت ماهی بود که نشان‌دهنده کیفیت بهداشتی خوب ماهی تهیه شده و بار باکتریایی نسبتاً کم آن است. مقدار مجاز بار میکروبی برای ماهی قزل‌آلا بر اساس (ICMSF، 1986)، برابر با ۷ لگاریتم تعداد کلونی در گرم گوشت ماهی است، که در تیمار شاهد در روز ۱۵ نگهداری، از حد مجاز عبور کرد (Jouki *et al*., 2014). تیمارهای حاوی ۱ و ۲٪ اسانس تا پایان دوره در دامنه قابل قبول باقی ماندند و به طور معنی‌داری دارای میزان کمتری از باکتری‌ها نسبت به سایر تیمارها بودند (P<۰/۰۵).

**جدول ۱**. تغییرات تعداد باکتری‌های کل ($log_{10}$ cfu/g) در نمونه‌ها طی مدت زمان نگهداری در یخچال

| نمونه | زمان نگهداری (روز) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | روز صفر | روز ۵ | روز ۱۰ | روز ۱۵ | روز ۲۰ |
| شاهد | ۳/۰۰±۰/۱۷ eA | ۴/۵۰±۰/۰۶ dA | ۵/۸۰±۰/۰۹ cA | ۷/۲۰±۰/۲۰ bA | ۸/۱۰±۰/۰۹ aA |
| کیتوزان | ۳/۰۰±۰/۰۸ eA | ۳/۸۰±۰/۱۷ dB* | ۵/۲۰±۰/۱۰ cB* | ۶/۸۰±۰/۱۹ bB* | ۷/۷۰±۰/۱۷ aB* |
| کیتوزان + ۰/۵ درصد اسانس | ۳/۰۰±۰/۱۸ eA | ۳/۵۰±۰/۰۹ dBC* | ۵/۰۰±۰/۳۱ cB* | ۶/۵۰±۰/۳۰ bBC* | ۷/۴۰±۰/۰۸ aC* |
| کیتوزان + ۱ درصد اسانس | ۳/۰۰±۰/۱۱ dA | ۳/۳۰±۰/۳۰ dCD* | ۴/۵۰±۰/۲۸ cC* | ۶/۲۰±۰/۰۸ bCD* | ۷/۳۰±۰/۲۲ aC* |
| کیتوزان + ۲ درصد اسانس | ۳/۰۰±۰/۱۴ dA | ۳/۱۰±۰/۱۱ dD* | ۴/۲۰±۰/۱۰ cC* | ۶/۰۰±۰/۱۵ bD* | ۶/۹۰±۰/۱۸ aD* |

داده‌ها، میانگین سه تکرار ± انحراف از معیار.

حروف بزرگ (ستون عمودی) و حروف کوچک (سطر افقی) متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد (P<۰/۰۵) در هر تیمار است.

علامت * در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) با نمونه شاهد است.

**تعداد باکتری‌های سرماگرا**

تغییرات در تعداد PTC طی نگهداری در یخچال در جدول ۲ مشاهده می‌گردد. تعداد اولیه باکتری‌ها برای تمام تیمارها در روز صفر حدود ۳ لگاریتم تعداد کلونی در گرم گوشت ماهی است. در پایان دوره تیمار حاوی ۲٪ اسانس به طور معنی‌داری کمتر از بقیه تیمارها حاوی PTC بود (P<۰/۰۵). در روز ۱۵ آزمایش میزان PTC در تیمار شاهد از حد قابل قبول بالاتر رفت (۷/۲۰±۰/۲۰) و این نشان می‌دهد که عمر ماندگاری فیله‌ها در تیمار شاهد در دمای یخچال از نظر شاخص PTC بین ۱۰ تا ۱۵ روز است.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

**جدول ۲.** تغییرات تعداد باکتری‌های سرماگرا ($log_{10}$ CFU/g) در نمونه‌ها طی مدت زمان نگهداری در یخچال

| تیمار | زمان نگهداری (روز) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | روز صفر | روز ۵ | روز ۱۰ | روز ۱۵ | روز ۲۰ |
| شاهد | ۲/۸۰±۰/۰۱ eA | ۴/۲۰±۰/۱۷ dA | ۶/۳۰±۰/۱۸ cA | ۷/۴۰±۰/۱۹ bA | ۸/۳۰±۰/۱۷ aA |
| کیتوزان | ۲/۸۰±۰/۱۴ eA | ۳/۷۰±۰/۴۳ dAB | ۵/۶۰±۰/۵۴ cB* | ۶/۶۵±۰/۲۱ bB* | ۷/۵۰±۰/۰۸ aB* |
| کیتوزان + ۰/۵ درصد اسانس | ۲/۸۰±۰/۰۹ eA | ۳/۴۰±۰/۲۰ dBC* | ۵/۲۰±۰/۴۱ cBC* | ۶/۳۰±۰/۲۵ bBC* | ۷/۲۳±۰/۱۶ aB* |
| کیتوزان + ۱ درصد اسانس | ۲/۸۰±۰/۱۷ dA | ۳/۲۰±۰/۲۰ dBC* | ۵/۰۰±۰/۴۰ cBC* | ۶/۱۰±۰/۲۰ bCD* | ۶/۷۱±۰/۲۰ aC* |
| کیتوزان + ۲ درصد اسانس | ۲/۸۰±۰/۱۲ dA | ۳/۱۰±۰/۴۰ dC* | ۴/۸۰±۰/۱۶ cC* | ۵/۸۰±۰/۲۷ bD* | ۶/۵۵±۰/۱۴ aC* |

داده‌ها، میانگین سه تکرار ± انحراف از معیار.

حروف بزرگ (ستون عمودی) و حروف کوچک (سطر افقی) متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($P<۰/۰۵$) در هر تیمار است.

علامت * در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) با نمونه شاهد است.

## بحث

**اسیدیته:** pH فیله ماهی تازه تقریباً خنثی است؛ اما پس از مرگ، تجزیه ترکیبات نیتروژنی منجر به افزایش pH شده که کیفیت محصول را در طول ذخیره‌سازی تحت تأثیر قرار می‌دهد (Abbas *et al*., 2009). در تمام تیمارهایی که ۱۰ روز نگهداری شده بودند کاهش pH رخ داد. کاهش pH در تیمارهای حاوی اسانس طی چند روز ابتدایی نگهداری بیشتر بود که دلیل آن را می‌توان وجود اسانس و خاصیت ضدمیکروبی خوب آن دانست. پس از مرگ، عمل گلیکولیز موجب شکسته شدن گلیکوژن در مسیر بی‌هوازی شده و در نتیجه لاکتیک اسید تولید می‌شود که این امر موجب کاهش اولیه مقدار pH در لاشه می‌گردد. از روز ۱۵ به بعد شاهد افزایش pH در تیمارها بودیم. Song و همکاران (۲۰۱۱) افزایش میزان pH را ناشی از افزایش بار میکروبی به خصوص کپک و مخمر و تولید ترکیبات فرار مانند آمونیاک و تری‌متیل‌آمین حاصل از فعالیت باکتری‌های عامل فساد دانستند. در پژوهش حاضر در روز ۱۵ و ۲۰ کل تیمارها با اختلاف معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود ($P<۰/۰۵$). Volpe و همکاران (۲۰۱۵) بیان نمودند اسانس از طریق کاهش رشد باکتری و تجزیه ترکیبات نیتروژنی مانند آمونیاک و تری‌متیل‌آمین، باعث پایین نگه‌داشتن pH می‌گردد. Fan و همکاران (۲۰۰۹) کمتر بودن pH در فیله‌های دارای پوشش در مدت نگهداری را به پتانسیل بازدارندگی فعالیت باکتری‌ها و پروتئازهای آنزیمی توسط پوشش‌ها مربوط دانستند. تغییرات کمتر pH در فیله‌های حاوی پوشش نسبت به فیله‌های بدون پوشش، به علت توانایی مهار فعالیت آنزیم‌های داخلی و جلوگیری از رشد میکروبی توسط پوشش می‌باشد (Chamanara *et al*., 2012). Berizi و همکاران (۲۰۱۸) کمتر بودن افزایش pH در نمونه‌های دارای پوشش را به خواص ضد میکروبی عصاره پوست انار و کیتوزان مرتبط دانستند. با بررسی میزان تغییرات pH نمونه‌ها می‌توان گفت تیمارهای حاوی اسانس وکیتوزان توانستند با کنترل بار میکروبی شاهد تغییرات کمتری در میزان pH خود باشند

**تیوباربیتوریک اسید (TBA):** شاخصی جهت اندازه‌گیری میزان محصولات اکسیداسیون ثانویه اسیدهای چرب اشباع نشده است (Jeon *et al*., 2002). از روز ۵ به بعد افزایش در تیمار شاهد نسبت به تمام تیمارها معنی‌دار بود که می‌توان آن را به افزایش آهن آزاد و دیگر پراکسیدان‌ها در ماهیچه و اکسیداسیون لیپید و تولید متابولیت‌های فرار در حضور اکسیژن مربوط دانست. از طرفی، با توجه به اینکه آلدهیدها به عنوان محصول ثانویه اکسیداسیون از تجزیه هیدروپراکسایدها ایجاد می‌شوند، روند افزایشی هیدروپراکسیدها می‌تواند دلیلی بر افزایش این شاخص طی مدت نگهداری باشد (Chidanandaiah *et al*., 2007). در اینجا میزان TBA کلیه تیمارها طی نگهداری پایین بود. جلوگیری از آغاز ایجاد زنجیره‌های رادیکال آزاد، پیوند با کاتالیزور انتقال‌دهنده یون فلزی، تجزیه پراکسید و برهم‌کنش با رادیکال‌های آزاد توسط اسانس از دلایل پایین بودن این

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

شاخص است (AL-Jabri and Hossain, 2014). در پایان دوره کاهش در تیمارهای حاوی ۱ و ۲٪ اسانس معنی‌دار بود. پایین بودن شاخص در تیمار حاوی کیتوزان را می‌توان به ممانعت پوشش در سطح فیله به عنوان مانعی بین فیله و هوای اطراف و کم شدن سرعت انتشار اکسیژن از طریق ایجاد یک پلیمر قوی توسط کیتوزان و محدود شدن جنبش در زنجیره کیتوزان سطح فیله دانست. همچنین اثر کیتوزان با مهار یون‌های آهن‌دار به‌وسیله کلاته کردن آن‌ها، توسط جلوگیری از فعالیت پراکسیدها و همچنین تأخیر در تبادل آن‌ها صورت می‌گیرد (Jeon *et al*., 2002). کم بودن شاخص در تیمار حاوی اسانس را می‌توان به علت اثر هم‌افزایی (synergistic) بین پوشش و اسانس دانست. همچنین اثرات ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی مونوترپن‌ها، سسکوئیترپن‌ها و مشتقات اکسیژنه آن‌ها موجود در اسانس نعناع، موجب کاهش TBA می‌گردد. مطابق نظر Connell (۱۹۹۰) مقدار ۱تا ۲ از TBA میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم گوشت ماهی به عنوان حد مجاز محسوب شده و میزان ۳ تا ۴ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم گوشت ماهی قابل قبول بوده و حداکثر میزان TBA در ماهی (به صورت یخ زده، سرد شده یا ذخیره شده با یخ) برابر با ۵ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم گوشت ماهی است ( Jouki *et al*., 2014). به عبارتی نمونه تازه حاوی ۱ تا ۲ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم گوشت ماهی است، ۳ تا ۴ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در کیلوگرم گوشت ماهی قابل قبول و بیش از ۵ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم گوشت ماهی منجر به فساد چربی می‌گردد (Connell, 1990). در مطالعه حاضر شاخص TBA در طول نگهداری، در کل تیمارها پایین‌تر از حد ایجاد کننده بوی فساد بود. روند افزایش TBA و نیز پایین‌تر بودن این شاخص از حد مجاز با نتایج به دست آمده برای ماهی قزل آلای رنگین‌کمان طی ۱۶روز ذخیره‌سازی در یخچال مطابق بود (Ojagh *et al*., 2010). با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان صحت اثر مثبت نگهدارنده‌های طبیعی کیتوزان و اسانس بر کاهش اکسیداسیون ثانویه چربی در فیله ماهی را گزارش نمود.

**بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N):** این شاخص عمدتاً نشان‌دهنده کیفیت ماهی و بیان‌کننده وجود مواد نیتروژنی ناشی از تخریب مولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک توسط باکتری‌های پروتئولیتیک است (Jouki *et al*., 2014). میزان اولیه TVB-N بین ۰/۱۷±۱۲/۰۹ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی در تیمار شاهد و ۰/۰۲±۹/۶۳ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی در تیمار حاوی ۲٪ اسانس بود که در مدت ذخیره‌سازی افزایش یافت. فعالیت باکتری‌های عامل فساد و نیز آنزیم‌های درونی در بافت ماهی باعث سرعت بخشیدن به روند فساد و تجمع تری‌متیل آمین، دی‌متیل آمین، آمونیاک و دیگر بازهای نیتروژنی و در نتیجه افزایش مقادیر TVB-N می‌گردند (Kyrana *et al*., 1997). طی مدت نگهداری تیمار شاهد به طور معنی‌داری دارای میزان بیشتری از این شاخص بود. مطابق با نظر (Connell, 1990) بالاترین حد مجاز TVB-N برابر با ۲۵ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم از فیله ماهی می‌باشد و بالاتر از میزان ۳۵ تا۴۰ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی باعث ایجاد فساد می‌گردد. در تحقیق حاضر این مقدار در تیمار حاوی ۲٪ اسانس تا پایان دوره کمتر از حد مجاز و برابر با ۰/۴۶±۲۴/۸۸ بود؛ در حالی‌که در تیمار شاهد در روز ۱۰ تقریباً به حد مجاز رسیده و به میزان ۰/۳۰±۲۵/۵۲ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی مشاهده شد. دلیل این امر را می‌توان تعداد بالاتر باکتری در تیمار بدون پوشش نسبت به نمونه‌های دارای پوشش دانست. پوشش حاوی اسانس باعث افزایش عمر ماندگاری فیله‌ها شد که دلیل آن را می‌توان به کاهش جمعیت باکتری‌ها یا کاهش ظرفیت باکتری‌ها برای آمین زدایی اکسیداسیونی ترکیبات نیتروژنی غیر پروتئینی و یا هر دو عامل نسبت داد و بیان نمود که ترکیب اسانس و کیتوزان منجر به کاهش سریع‌تر جمعیت باکتری‌ها می‌شود (Jouki *et al*., 2014). Volpe و همکاران (۲۰۱۵) بیان نمودند که میزان TVB-N در تیمار کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت و در این تیمار و تیمار دارای پوشش کاراگینان در پایان (روز ۱۵) بیشتر از حد قابل قبول بود؛ درحالی‌که در نمونه حاوی اسانس لیمو در پایان کمتر از حد مجاز بود. این نتایج مشابه با نتایج تحقیق حاضر بود. با توجه به نتایج حاضر، فعالیت ضد باکتریایی کیتوزان و اسانس نعناع فلفلی می‌تواند در جلوگیری از افزایش TVB-N مؤثر واقع شود.

**اسیدهای چرب آزاد (FFA):** هیدرولیز چربی به تنهایی منجر به کاهش کیفیت محصول نمی‌گردد، اما به طور مستقیم اثری منفی بر طعم ماهی خواهد داشت؛ به طوری‌که تولید FFA منجر به تشدید اکسیداسیون خواهد شد. FFA روی ثبات پروتئین‌ها تأثیر داشته و اکسید شدن پروتئین‌ها در این حالت به علت افزایش دسترسی پروتئین به اکسیژن و چربی‌های با

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

وزن مولکولی بالا (تری‌گلیسریدها و فسفولیپیدها) اتفاق می‌افتد (Rodriguez *et al.*, 2008). در روز انتهایی تیمارهای حاوی اسانس به طور معنی‌داری میزان FFA کمتری نسبت به تیمارهای بدون اسانس داشتند. پژوهشگران در بررسی اثر پوشش زیستی آلژینات سدیم غنی شده با اسانس آویشن بر فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری شده در یخچال، میزان اولیه شاخص FFA در روز صفر را برای کل تیمارها حدود ۰/۶ درصد اولئیک اسید بیان نمودند. پوشش آلژینات سدیم حاوی ۱/۵٪ اسانس آویشن کمترین مقدار اسید چرب آزاد را در پایان دوره داشت (Hamzeh and Rezaei, 2011). تولید FFA طی نگهداری به علت کاتالیز شدن چربی‌ها توسط آنزیم‌های داخلی (لیپاز و فسفولیپاز) صورت می‌گیرد. برخی از باکتری‌های ویژه فساد نیز به دلیل تولید آنزیم‌های لیپاز و فسفولیپاز اغلب مسئول افزایش FFA محصولات غذایی می‌باشند (Kykkidou *et al.*, 2009) حد مجاز مصارف انسانی برای شاخص FFA برابر با ۵ درصد است (Kirk and Sawyer, 1991) که در کلیه تیمارها تا پایان دوره کمتر از این مقدار بود.

**پراکسید (PV):** مستعد بودن چربی به اکسیداسیون یکی از مهم‌ترین دلایل پیدایش بوی تعفن، طعم نامطلوب و تغییر رنگ در مواد غذایی می‌باشد (Sallam, 2007). هیدروپراکسید، محصول اولیه اکسیداسیون چربی‌ها و اسیدهای چرب چند غیراشباعی است. به همین دلیل، اکسیداسیون اولیه چربی با اندازه‌گیری میزان پراکسید ارزیابی می‌گردد (Lin and Lin, 2004). این ترکیبات باعث تولید ترکیبات ثانویه مثل آلدئیدها و کتون‌ها می‌گردند که موجب تشخیص تند شدن اکسیداسیونی می‌شوند (Ozyurt *et al.*, 2007). به استثنای روز صفر، در کل دوره سطح PV در کلیه تیمارها به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود. کاهش ترکیبات اولیه حاصل از اکسایش در تیمارهای دارای پوشش در مقایسه با تیمار فاقد پوشش را به علت پیوند کیتوزان با آهن موجود در پروتئین‌های آهن‌دار در ماهی و جلوگیری از تولید رادیکال آزاد دانسته‌اند (Fan *et al.*, 2009). تیمار دارای کیتوزان حاوی ۲٪ اسانس دارای کم‌ترین میزان PV بود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ($P<0/05$). با توجه به خاصیت ضداکسایشی اسانس‌ها به نظر می‌رسد ترکیبات پلی فنولیک شامل فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک مسئول فعالیت ضداکسایشی اسانس‌های روغنی هستند و احتمالاً به دلیل اهدای اتم هیدروژن خود به رادیکال‌های آزاد فعال، باعث کاهش اکسیداسیون چربی‌ها می‌گردند (Raeisi *et al.*, 2015). محققین گزارش کردند که عصاره نعناع خاصیت ضداکسایشی خیلی خوبی دارد که قابل مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مانند BHT است. Mimica-Dukic و همکاران (۲۰۰۳) توانایی مهار رادیکال توسط مونوترپن‌های کتونی منتون و ایزومنتون در اسانس نعناع فلفلی را عنوان نمودند. در پایان دوره شاهد کاهش PV در تیمار شاهد بودیم که ممکن است به علت واکنش‌های ثانویه اکسیداسیون و تجزیه پراکسیدها و تبدیل شدن به ترکیبات ثانویه و تولید کربونیل‌ها و ترکیبات فرار باشد (Rezaei and Hosseini, 2008). محدوده قابل پذیرش مقدار اندیس پراکسید در حدود ۱۰ میلی اکی والان پراکسید بر کیلوگرم چربی است (Kirk and Sawyer, 1991) و در طول دوره نگهداری کلیه تیمارها از نظر اندیس پراکسید در محدوده قابل قبول بودند که مشابه با نتایج Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) بود. بنابراین ترکیب پوشش کیتوزان و اسانس نعناع فلفلی باعث کاهش در اکسیداسیون چربی می‌گردد.

**شمارش کلی باکتری‌ها (TVC):** ماهی قزل‌آلا در طول ذخیره‌سازی در سردخانه بسیار مستعد ابتلا به فساد میکروبی است. طی نگهداری، میزان TVC افزایش یافته و در پایان تیمار شاهد به طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها و تیمار دارای ۲٪ اسانس دارای کمترین مقدار TVC بود. بنابر گزارش کمیسیون بین‌المللی استانداردهای میکروبیولوژیکی مواد غذایی (ICMSF، 1986)، حداکثر قابل قبول حد میکروبی در ماهی تازه و منجمد ۷ لگاریتم تعداد کلونی در گرم فیله است (Jouki *et al.*, 2014). افزودن اسانس باعث کاهش مقدار ۱/۷ لگاریتم تعداد کلونی در گرم گوشت ماهی در نمونه دارای ۲٪ اسانس نسبت به نمونه شاهد گردید. این میزان کاهش در پوشش بدون اسانس ۰/۸ لگاریتم تعداد کلونی در گرم گوشت ماهی بود. تماس مستقیم بین ترکیبات اسانس و لایه‌های فسفولیپید در غشاء باکتریایی و نفوذپذیری یونی و در نتیجه نشت اجزای حیاتی درون سلولی باعث کاهش TVC می‌گردد. ترکیبات فنلی اسانس مسئول خواص ضد باکتریایی هستند. اثر ضد میکروبی پلی فنول اسانس احتمالاً مربوط به اثر آن‌ها بر روی آنزیم‌های هیدرولیتیک، بر همکنش با پروتئین‌های انتقال دهنده در دیواره

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

سلولی و همچنین اثر متقابل با کربوهیدارت‌ها باشد. علت خاصیت ضد میکروبی کیتوزان را ممانعت از رسیدن مواد غذایی نظیر مواد آمینی به غشاء سلولی باکتری می‌دانند. خاصیت آنیونی و کاتیونی بین قند کیتوزان و پوشش باکتریایی باعث از بین رفتن غشاء میکروبی می‌شود (Raeisi *et al.*, 2015). بر اساس نتایج Kakaei و Shahbazi (۲۰۱۶) در پایان دوره (روز ۱۱) به ترتیب بیشترین و کمترین میزان متعلق به تیمار شاهد و تیمار دارای پوشش کیتوزان- ژلاتین حاوی ۲٪ عصاره دانه انگور قرمز و ۲٪ اسانس کاکوتی کوهی بود. در پایان، تیمار شاهد با ۹/۳۱ لگاریتم تعداد کلونی در گرم گوشت ماهی بیشتر از حد مجاز و تیمارهای حاوی پوشش و اسانس و عصاره کمتر از حد مجاز بودند. افزایش عمر ماندگاری فیله‌ها بر اثر کاهش TVC بیانگر تأثیر مثبت کیتوزان و اسانس نعناع فلفلی در کاهش بار باکتریایی است، به طوری‌که تیمارهای حاوی ۱ و ۲٪ اسانس عمر ماندگاری فیله‌ها را در مقایسه با تیمار شاهد حداقل به مدت ۵ روز افزایش دادند.

**باکتری‌های سرماگرا (PTC):** بر اساس یافته‌های Tassou و همکاران (۱۹۹۵) و Sallam (۲۰۰۷) باکتری‌های گرم منفی سرمادوست (PTC) و باکتری‌های دارای اسید اوریک مانند *Pseudomonas*، *Acromobacter* و *Alcaligenes* به عنوان گروه اصلی از میکروارگانیسم‌ها، مسئول فساد هوازی ماهی تازه ذخیره شده در دماهای سرد هستند. از ویژگی‌های باکتری‌های سرمادوست دارا بودن آنزیم‌های پروتئولایتیک و لیپولایتیک قوی و سرعت تکثیر آن‌ها در زمان کوتاه می‌باشد (Sallam, 2007). با افزایش PTC در پایان دوره تیمار شاهد به طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بود ($P<۰/۰۵$) و بهترین عملکرد تا پایان دوره در تیمار دارای ۲٪ اسانس بود که تا روز پایانی کمتر از حد مجاز مشاهده گردید. کیتوزان از طریق فعل و انفعالات بین گروه‌های آمینی خود ($NH_2$) با بار مثبت و بار منفی دیواره سلولی میکروبی منجر به نشت پروتئین‌های سلولی و الکترولیت می‌شود. همچنین عملکرد دیگر آن به عنوان یک مانع جهت انتقال اکسیژن و یک عامل شلاته کننده فلزات ضروری و مواد مغذی است (Nowzari *et al.*, 2013). به نظر می‌رسد که مکانیسم اثر اسانس‌های روغنی بر روی باکتری‌های گرم منفی به صورت تجزیه غشای خارجی آن‌ها می‌باشد که موجب محدود شدن انتشار اجزاء آبگریز اسانس از طریق لایه لیپوپلی-ساکارید و افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی به ATP می‌گردد (Burt, 2004). در پژوهش Hamzeh و Rezaei (۲۰۱۱) طی مدت ۲۰ روز نگهداری فیله ماهی قزل‌آلا در یخچال، تعداد باکتری‌های سرماگرا افزایش یافت و در انتهای دوره در تیمارهای کنترل و آلژینات سدیم از حد مجاز فراتر رفت. اما تیمارهای آلژینات سدیم حاوی درصدهای مختلف اسانس آویشن دارای بار کمتری بودند. Kakaei و Shahbazi (۲۰۱۶) عنوان نمودند در پایان دوره تیمارهای حاوی درصدهای مختلف از اسانس و عصاره به طور معنی‌داری دارای PTC کمتری نسبت به تیمار شاهد بودند ($P<۰/۰۵$). همچنین افزودن اسانس و عصاره به پوشش کیتوزان- ژلاتین باعث افزایش عمر مفید نمونه‌ها تا روز ۱۱ (پایان دوره) گردید.

در مجموع، ویژگی‌های میکروبیولوژیکی و شیمیایی فیله‌ی دارای پوشش، بهتر از نمونه شاهد بود و کم‌ترین میزان شاخص‌های اندازه‌گیری شده مربوط به تیمار با کیتوزان و ۲٪ اسانس بود که نشان از فساد کمتر فیله‌های مورد بررسی داشت. بر اساس نتایج، کیتوزان در تأخیر فساد اکسیداسیونی نقش مثبتی دارد. اسانس نعناع فلفلی به علت وجود ترکیباتی نظیر منتول در غلظت‌های نسبتاً پایین روی رشد باکتری‌های مولد فساد بسیار مؤثر است. بنابراین استفاده از پوشش کیتوزان به همراه اسانس نعناع فلفلی باعث کاهش معنی‌دار تمام شاخص‌ها طی مدت نگهداری در مقایسه با تیمار شاهد می‌گردد ($P<۰/۰۵$).

## منابـع

Abbas, K.A., Saleh, A.M., Mohamed, A., Lasekan, O. 2009. The relationship between water activity and fish spoilage during cold storage: a review. Journal of Food, Agriculture and Environment. 7(3-4): 86-90.

AL-Jabri, N.N., Hossain, M.A. 2014. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. Beni-Suef University Journal Basic Applied Sciences. 3: 247-253.

AOAC. 1990. Methods of analysis. 15th edition.Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

Berizi, E., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S. Sh., Barbieri, G. 2018. Microbial, chemical, texturnal and sensory peroperties of coated rainbow trout by chitosan combined with pomegranate peel extract during frozen storage. International Journal of Biological Macromolecules. 106: 1004-1013.

Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochem and Physiology. 37: 911-917.

Burt, S.A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. International Journal Food Microbiology. 94: 223-253.

Chamanara, V., Shabanpour, Khomeiri, M. 2012. An investigation on characteristics of rainbow trout coated using chitosan assisted with thyme essential oil. International Journal of Biological Macromolecules. 50(3): 540-544.

Chidanandaiah Keshri, R.C., Sanyal, M.K. 2007. Effect of sodium alginate coating with preservatives on the quality of meat paties during refrigerated (4 ± 1°C) storage. Journal Muscle Foods. 20: 275-292.

Connell, J.J. 1990. Methods of assessing and selecting for quality, Control of Fish Quality. 3rd edition. Fishing News Books, Oxford, U.K.

Egan, H., Kirk, R.S., Sawyer, R. 1997. Pearson's chemical analysis of food. 9th edition. Longman Scientific and Technica. pp: 609-634.

Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., Chi, Y. 2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. Food Chemistry. 115: 66-70.

Hamzeh, A., Rezaei, M. 2011. Antioxidant and antibacterial effects of sodium alginate coating enriched with thyme essential oil on rainbow trout fillets during refrigerated storage. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 6(3): 11-20. (in Persian)

Iscan, G., KIrimer, N.E., Kurkcuoglu, M., Baser, H.C., DEMIrci, F. 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(14): 3943-3946.

Javidi, Z., Hosseini, S.F., Rezaei, M. 2016. Development of flexible bactericidal films based on poly (lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated rainbow trout. LWT-Food Science and Technology. 72: 251-260.

Jeon, Y.J., Kamil, J.Y., Shahidi, F. 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of Herring and Atlantic cod. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(18): 5167-5178.

Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Koocheki, A., Khazaei, N. 2014. Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. International Journal of Food Microbiology. 174: 88-97.

Kakaei, S., Shahbazi, Y. 2016. Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. LWT-Food Science and Technology. 72: 432-438.

Kalbassi, M.R., Abdollahzadeh, E., Salari-Joo, H. 2013. A review on aquaculture development in Iran. Ecopersia. 1(2): 159-178.

Kamani, M.H., Safari, O., Mortazavi, A., Mehraban Sang Atash, M., Morgan Azghadi, N. 2017. Using an image processing based technique and predictive models for assessing lipid oxidation in rainbow trout fillet. Food Bioscience. 19: 42-48.

Kanatt, S.R., Chander, R., Sharma, A. 2008. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. Food Chemistry. 107(2): 845-852.

Kazem Alvandi, R., Sharifan, A., Aghazadeh Meshghi, M. 2011. Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil. Journal of Comparative Pathobiology. 7(4): 355-364. (in Persian)

Kirk, R.S., Sawyer, R. 1991. Pearson's Chemical Analysis of Foods. 9th edition. Longman Scientific and Technical. Harlow, Essex, UK.

Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A. 2009. Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4°C. Food Chemistry. 115: 169-175.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 11:34 +0430 on Monday May 24th 2021

Kyrana, V.R., Lougovois, V.P., Valsamis, D.S. 1997. Assessment of shelf life of maricultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. Internatinal Journal Food Science and Technology. 32: 339-347.

Lin, C.C., Lin, C.S. 2004. Enhancement of the storage quality of frozen bonito fillet by glazing with tea. Food Chemistry. 16(2): 169-175.

Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Mihajlovic, B., Matavulj, M. 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha species essential oils. Planta Medica. 69(5): 413-419.

Nowzari, F., Shabanpour, B., 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(3): 1667-1672.

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.M. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry. 120(1): 193-198.

Ozyurt, G., Polat, A., Tokur, B. 2007. Chemical and sensory changes in frozen (-18 ºC) wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) captured at different fishing seasons. Journal Food Science Technology. 42: 887- 893.

Raeisi, M., Tajik, H., Aliakbarlu, J., Mirhosseini, S.H., Hosseini, S.M. 2015. Effect of carboxymethyl cellulose-based coatings incorporated with *Zataria multiflora* Boiss, essential oil and grape seed extract on the shelf life of rainbow trout fillets. LWT-Food Science and Technology. 64(2): 898-904.

Rezaei, M., Hosseini, S. 2008. Quality assesssment of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during Chilled Storage. Journal Food Science. 73: 93-106.

Rodriguez, A., Carriles, N., Cruz, M., Aubourg, J.P. 2008. Changes in the of farmed salmon *(Oncorhynchus kisutch)* with previous storage in slurry ice (-1.5 °C). LWT-Food Science and Technology. 41: 1726-1732.

Sallam, Kh.I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control. 18: 566-575.

Song, Y., Liu, L., Shen, H., You, J., Luo, Y. 2011. Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). Food Control. 22(3): 608-615.

Suvanich, V., Jahncke, M.L., Marshall, D.L. 2000. Changes in selected chemical quality characteristics of channel cat fish frame mince during chill and frozen storage. Journal of Food Science. 65(1): 24-29.

Taherkhani, P., Noori, N., Akhondzadeh Basti, A., Gandomi, H., Alimohammadi, M. 2014. Antimicrobial effects of Kermanian Black Cumin (*Bunium persicum* Boiss.) essential oil in gouda cheese matrix. Journal Medicinal Plants. 54(2): 76-86.

Tassou, C.C., Drosinos, E.H., Nychas, G.J. 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10 C. Journal Applied Bacteriology. 78(6): 593-600.

Volpe, M.G., Siano, F., Paolucci, M., Sacco, A., Sorrentino, A., Malinconico, M., Varricchio, E. 2015. Active edible coating effectiveness in shelf-life enhancement of trout (Oncorhynchusmykiss) fillets. LWT-Food Science and Technology. 60(1): 615-622.