DOI: 10.22092/vj.2017.109890
شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تاثیر مقایسه‌ای لفاف و پوشش خوراکی کیتوزان بر خواص کیفی ماهی شعری معمولی *Lethrinus nebulosus* طی نگهداری در یخچال

• **مژگان کریمی رضاآباد**
دانشجوی کارشناسی ارشد رشته شیلات گرایش فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
• **آی‌ناز خدانظری (نویسنده مسئول)**
استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
• **سیدمهدی حسینی**
استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۹-۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۱۰-۱۹
Email: khodanazary@yahoo.com

چکیده

با توجه به اهمیت مصرف ماهی در برنامه غذایی و مسئله فسادپذیری سریع آن، نیاز به استفاده از روش‌های بسته‌بندی نوین رو به افزایش است. استفاده از پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی زیست-کافت از روش‌هایی می‌باشد که طی سالیان اخیر مورد توجه فراوان قرار گرفته است. قابلیت تشکیل لفاف و خواص حفاظتی کیتوزان موجب شده که به عنوان پوشش‌ها و لفاف های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار بگیرند.در این بررسی، تاثیر لفاف و پوشش تهیه شده از محلول کیتوزان بر ماندگاری فیله شعری معمولی نگهداری شده در یخچال به مدت ۱۲ روز مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که بار باکتریایی کل و سرمادوست با دو روش لفاف‌پیچی (به ترتیب ۱۱/۳۷ log_{10} cfu/g و ۶/۶۶ log_{10} cfu/g) و پوشش‌دهی (به ترتیب ۸/۷۲ log_{10} cfu/g و ۶/۶۷ log_{10} cfu/g) نسبت به نمونه شاهد (به ترتیب ۱۳/۲۴ log_{10} cfu/g و ۸/۷۰ log_{10} cfu/g) بطور معنی‌دار در روز ۱۲ کاهش یافتند ($p<$ ۰/۰۵). میزان شاخص‌های تیوباربیتوریک اسید و اسیدهای چرب آزاد در نمونه‌های پوشش‌دهی شده و نمونه‌های دارای لفاف در انتهای دوره ۱۲ روزه نگهداری بطور معنی‌دار کمتر از نمونه‌های شاهد شد. pH، TVBN و TMA نیز در این دوره اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌های تیمار شده با شاهد مشاهده شد ($p<$ ۰/۰۵). ارزیابی حسی نشان داد که فیله‌های لفاف پیچ و پوشش دار در یخچال در مقایسه با شاهد ماندگاری (۳روز) بیشتر داشت. بطور کلی، اعمال کیتوزان به عنوان پوشش و فیلم خوراکی منجر به افزایش عمر ماندگاری فیله ماهی شعری معمولی در شرایط یخچال شد.

کلمات کلیدی: *Lethrinus nebulosus*، لفاف، پوشش، خواص کیفی

Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 252-263

Comparative effect of edible film and coating chitosan on quality properties of Spangled emperor ***Lethrinus nebulosus*** stored in refrigerator

By: Karimi Rezaabad, M., M.Sc student of Khorramshahr University of Marine Science and Technology. Khodanazary, A., (Corresponding Author) Assistant professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology. and Hosseini, S. M., Assistant professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology.

Email: khodanazary@yahoo.com

Received: 2016-11-24 Accepted: 2017-01-08

According to the importance of fish in the diet and the fact of being quickly spoilable, the necessity of using the new methods of packing is increasing. Interest in biodegradable coatings and films has been intensified in recent years. Chitosan is biopolymers with preservative effects and film forming ability to form antimicrobial and antioxidant coatings and films. This study, effect of film and coating prepared with chitosan solution on shelf-life *Lethrinus nebulosus* fillet stored in refrigerator during 12 days examined. The results was showed that total bacteria and pscychrophil counts with film (11.37 $\log_{10}$ cfu/g and 6.66 $\log_{10}$ cfu/grespectively) and coating (8.72$\log_{10}$ cfu/g and 6.67 $\log_{10}$ cfu/g respectively) significantly decreased in comparison with control sample (13.24 $\log_{10}$ cfu/g and 8.70 $\log_{10}$ cfu/g respectively) in the end of 12 days ($P<0.05$). TBA and FFA contents of coating and film samples significantly were lower than control samples in the end of 12 days. TVBN, pH and TMA were shown significantly different between treatment samples with control ($P<0.05$).Sensory evaluations showed that refrigerated coated and film-wrapped samples had more durability (3 days) than control.Generally, chitosan as edible coating and film would enhance shelf life of Spangled emperorfillet during refrigerated storage.

Key words: *Lethrinus nebulosus*, Film, Coating, Quality properties

مقدمه

ماهی شعری معمولی *Lethrinus nebulosus* از ماهیان دریایی پرطرفدار در جنوب کشور است (شکل ۱) که منبع غنی مواد مغذی از جمله اسیدچرب امگا-۳، پروتیین، مواد معدنی و ویتامین می‌باشد (۲) که به صورت تازه، منجمد و یا فیله منجمد به دست مصرف‌کنندگان می‌رسد. فساد ماهی خام با استفاده از آنزیم‌های داخلی و فعالیت‌های میکروبی در نتیجه تغییر ماهیت پروتئین، اکسیداسیون لیپید و تغییرات شیمیایی اتفاق می‌افتد(۳۲). بنابراین افزایش طول مدت ماندگاری جهت افزایش کیفیت می‌تواند در صنعت غذاهای دریایی و همچنین برای مصرف‌کنندگان مفید باشد. ماهی به دلیل داشتن مقادیر کم کلسترول، میزان فراوان اسیدهای چرب چندغیراشباع (Polyunsaturated Fatty Acids)، پروتئین و موادمعدنی از جمله کلسیم، فسفر، سدیم، پتاسیم و منیزیم شناخته شده است.کیفیت گوشت ماهی و فرآورده‌های دریایی بازتابی از وضعیت میکروبی، فیزیکی و شیمیایی اولیه و همچنین شرایط آن در طول نگهداری می‌باشد (۱۰). منظور از فساد ماهی، فساد شیمیایی (اکسیداسیون)، فساد بیوشیمیایی یا اتولیز (Autolysis) و فساد میکروبی (آلودگی با میکروارگانیسم‌ها و رشد آن‌ها) است (۳۳).برای حفظ خواص حسی و تغذیه‌ای ماهی از روش نگهداری در سرما بسیار استفاده می‌شود. اما وجود فراوان چربی‌های غیر اشباع و مقادیر بالای ملکول‌های پرواکسیدان باعث می‌شود فساد آنزیمی و غیرآنزیمی که بر ماندگاری فراورده‌های ماهی تاثیر بسزایی دارد در نگهداری انجمادی نیز ادامه پیدا کند (۵). ازاین‌رو نگهدارنده‌های مصنوعی مانند هیدروکسی آنیزول بوتیله (Butylatedhydroxy anisole) وهیدروکسی تولوئن بوتیله (Butylated hydroxy toluene)، عوامل شلاته‌کننده (Chelatingagents) و ترکیبات ضدمیکروبی ممکن است جهت بهبود تازگی به آن‌ها افزوده شود با این وجود مصرف‌کنندگان تمایل بیشتری به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی به جای مصنوعی نشان می‌دهند. این امر منجر به مطالعات بیشتری در این زمینه شده است (۱۸،۲۳،۳۳).

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه بسته‌بندی و با هدف بهبود خواص فیزیکی، شیمیایی و ارگانولپتیک محصولات غذایی صورت گرفته است (۲۷). امروزه در بسته‌بندی موادغذایی، فیلم و پوشش‌های خوراکی در بسیاری موارد بطور کامل جایگزین فیلم‌های پلیمری سنتزی یا ترموپلاستیک (Thermoplastic) شده‌اند. از آن جمله می‌توان به استفاده از انواع این پوشش‌ها و فیلم‌ها بر سطح فراورده‌های غذایی نظیر فراورده‌های قنادی، میوه‌ها و سبزی‌های تازه، برخی فراورده‌های گوشتی، طیور و ماهی، فراورده‌های منجمد، خشک شده و

خشک شده انجمادی (Freeze-dried) و نظیر این‌ها اشاره داشت (۱). از این رو، در سال‌های اخیر کاربرد پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی در مواد غذایی تازه و یا فراوری نشده مورد توجه بسیار قرار گرفته است (۲۳،۳).

کیتوزان یک پلی‌ساکارید طبیعی حاصل از استیل‌زدایی کیتین، دومین پلیمر فراوان طبیعت پس از سلولز است که به صورت یک زیست-پلیمر خطی از واحدهای بتا- (۱و۴)- ان-استیل-دی-گلوکز آمین (β-(۱،۴)-N-acetyl-D-glucosamine) و بتا-(۱و۴)-دی-گلوکز آمین (β-(۱،۴)-D-glucosamine) تشکیل شده است (۳۶، ۴۱، ۴۸). کیتوزان از کیتین موجود در اسکلت خارجی بندپایانی مانند حشرات، سخت‌پوستانی مانند خرچنگ‌ها، میگوها و لابسترها و نیز دیواره سلولی نوع خاصی از جلبک‌ها تولید می‌شود (۴۱،۴۳).کیتوزان بواسطه‌ی خاصیت ضدمیکروبی ذاتی، قابلیت تشکیل فیلم و خواص منحصر به فرد افزایش ویسکوزیته به محض آبگیری می‌تواند به عنوان پوشش و فیلم ضدمیکروبی فعال مورد استفاده قرار بگیرد (۳۶،۳۹،۴۱). وجود گروه آمینو در کربن شماره ۲ کیتوزان خواص منحصر به فردی به آن داده است (۹).

هدف اصلی در بسته‌بندی‌های معمولی یا غیرفعال، فراهم نمودن یک لایه نفوذناپذیر بر روی محصول است، در حالی که در بسته‌بندی فعال، به منظور بهبود خصوصیات پوشش و افزایش مدت ماندگاری ماده غذایی، از یک سری ترکیبات شیمیایی و فیزیکی در پوشش و لفاف بسته‌بندی استفاده می‌گردد. در این میان، لفاف‌ها و پوشش‌های خوراکی زیست‌کافت (Biodegradable) به عنوان ابزاری برای دستیابی به بسته‌بندی فعال و جهت ایجاد جایگزینی مناسب برای پوشش‌های پلاستیکی غیرزیست‌کافت (Non-biodegradable) هم تلقی می‌شوند (۱۲،۲۸،۴۱).پوشش‌های خوراکی لایه‌ای نازک از مواد قابل خوردن است که به شکل مایع بوده و با غوطه‌ور کردن محصول مورد نظر بصورت یک پوشش روی آن قرار می‌گیرد در حالی که لفاف خوراکی یک لایه نازک پیش‌ساخته از مواد خوراکیست که در مرحله‌ای جداگانه بصورت ورقه‌های جامد ساخته شده سپس در میان ماده غذایی قرار می‌گیرد و یا به دور آن پیچیده می‌شود. این پوشش‌ها و لفاف ها منجر به کاهش فعل و انفعالات ماده غذایی با محیط شده و با حفاظت فراورده در برابر عوامل شیمیایی، فیزیکی و میکروبی، فساد را به تاخیر می‌اندازد (۱۱،۱۳). استفاده از پوشش‌ها و لفاف‌های خوراکی در افزایش ماندگاری و بهبود کیفیت مواد غذایی تازه و منجمد روشی است که طی سالیان اخیر مورد توجه فراوان قرار گرفته است (۴۳). تحقیقات بسیاری در زمینه تهیه لفاف‌های خوراکی از مواد مختلف صورت گرفته است از جمله تهیه لفاف آلجینات-کلسیم (۳۴)، لفاف ایزوله سویا-گلیسرول (۲۲)، لفاف مخلوط کیتوزان-گلوکز (۱۹)، لفاف کیتوزان-ژلاتین دارای پیوندهای عرضی با پرانتوسیانیدین (Proanthocyanidin) (۲۱). با توجه به تقاضای مصرف‌کنندگان جهت استفاده از مواد خوراکی با کیفیت بالا و نگرانی آنها به دلیل مشکلات ناشی از مصرف نگهدارنده‌های مصنوعی، ایده استفاده از لفاف‌ها و پوشش‌های زیست‌کافت با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی بالا به عنوان جایگزینی مناسب گرفته است. بنابراین، هدف از این تحقیق تاثیر لفاف و پوشش کیتوزان فیله ماهی شعری معمولی بر خواص فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی طی نگهداری در یخچال بود

مواد و روش کار

تعداد ۶۰ نمونه ماهی شعری معمولی در زمستان ۱۳۹۴ از صیدگاه منطقه آزاد اروند استان خوزستان با میانگین وزن ۴۰۰ گرم به صورت تازه و همزمان خریداری شدند. نمونه‌های ماهی و یخ به نسبت ۱ به ۳ (وزنی/ وزنی) درون جعبه‌های یونولیتی فورا به آزمایشگاه شیلات واقع در دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردیدند. ماهیان سرزنی و تخلیه امعا احشا گردیدند. از هر ماهی فیله تهیه گردید (۱۷). فیله ماهی با آب سرد شستشو داده شد. محلول کیتوزان با حل کردن ۲ درصد وزنی/ حجمی کیتوزان (شرکت سیگما، وزن ملکولی متوسط، ویسکوزیته cp ۲۰۰-۸۰۰) در اسیداستیک ۱ درصد حجمی/ حجمی بدست آمد. برای حل شدن بهتر کیتوزان، محلول به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق با همزن مغناطیسی هم زده شدند (۳۳). به منظور نرم شدن و انعطاف‌پذیرتر شدن پوشش‌ها، ۰/۷۵ درصد (حجمی/ حجمی) گلیسرول

شکل ۱- ماهی شعری معمولی مورد مطالعه (عکس از نویسنده)

به عنوان نرم‌کننده به محلول اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شدند (۳۳). لفاف با قالب‌ریزی در قالب‌های طلقی نچسب و خشک کردن تهیه شدند. بدین ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان در قالب ریخته و در دمای ۲۰ درجه اتاق قرار داده شدند. لفاف‌ها پس از خشک شدن از قالب جدا شده و به دور فیله‌ها پیچانده شدند. پوشش دهی فیله‌های ماهی مورد نظر به مدت ۳۰ ثانیه در محلول کیتوزان غوطه‌ور شدند سپس ۲ دقیقه از محلول خارج و مجددا ۳۰ ثانیه در محلول غوطه‌ور شدند پس از آن به مدت ۲ ساعت در دمای محیط (۲۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد تا خشک شده و پوشش به دور فیله‌ها شکل بگیرد (۳۳،۱۸). سپس فیله‌ها تیمار بندی شدند. تیمارها شامل: ۱- فیله‌های بسته‌بندی شده در فشار اتمسفر(بسته‌بندی با پلاستیک‌های زیپ کیپ معمولی) که به عنوان گروه کنترل استفاده می گردند (فیله +بسته‌بندی در فشار اتمسفر(بسته‌بندی معمولی). ۲- فیله‌های پیچانده شده در لفاف کیتوزان و بسته‌بندی شده در فشار اتمسفر(فیله+لفاف کیتوزان+بسته‌بندی معمولی) و ۳- فیله‌ها پیچانده شده در پوشش کیتوزان و بسته‌بندی شده در فشاراتمسفر(فیله+پوشش کیتوزان+بسته‌بندی معمولی). به ازای هرتیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. همه گروه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا ۱۲ روز نگهداری شدند و هر سه روز آنالیزهای فیزیکوشیمیایی، میکروبی و ارزیابی حسی اندازه گیری شدند.

آزمون میکروبی نمونه‌ها

بار باکتریایی نمونه‌ها با هموژن کردن ۱۰ گرم نمونه در ۹۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم در شرایط استریل آغاز شد. از این محلول جهت تهیه رقت‌های متوالی استفاده شد. کشت باکتریایی مورد نظر با ریختن میزان مشخصی از نسبت‌های بدست آمده در پلیت‌های یکبار مصرف استریل و ریختن محیط کشت آگار بر آن صورت گرفت. برای شمارش کلنی‌های باکتریایی کل پلیت‌های تهیه شده به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای باکتری‌های سرمادوست به مدت ۷ روز در ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. شمارش کلنی‌ها بر مبنای log۱۰ cfu/g بیان گردید (۲۵).

اندازه‌گیری بازهای ازته فرار (Total Voletile bases- Nitrogen)(TVB-N)

اندازه‌گیری بازهای ازته فرار به روش کلدال و با تیتراسیون عصاره بدست آمده از آن انجام گرفت. بدین منظور۱۰ گرم نمونه به همراه ۲ گرم اکسید منیزیم با افزودن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به بالن کلدال متصل شد و عصاره مورد نظر به محلول متشکل از اسید بوریک ۲ درصد و ۲-۱ قطره متیل رد به عنوان شاخص وارد شد. محلول زردرنگ حاصله با اسید سولفوریک تا حاصل شدن رنگ ارغوانی تیتر شد و به صورت میلیگرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی بیان شد (۱۵). میزان بازهای ازته فرار از رابطه ۱محاسبه گردید.

رابطه ۱ بازهای ازته فرار= حجم اسید سولفوریک مصرفی ×۱۴

اندازه گیریpH

بدین منظور ۵ گرم از نمونه به مدت ۱ دقیقه با ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر همگن شده و میزان pH آن با دستگاه pH سنج (Metrohm) اندازه‌گیری شد (۴۵)

اندازه گیری تیوباربیتوریک اسید (TBA)

شاخص تیوباربیتوریک اسید طبق روشSiripatrawan و Noipha در سال ۲۰۱۲ (۴۲) اندازه گیری می‌شود. بدین صورت که دستگاه تقطیر با افزودن ۱۰ گرم نمونه ماهی هموژن شده با ۹۷/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۴ نرمال بهمراه چند قطره ضد کف و سنگ جوش در ارلن راه‌اندازی شد. ۵ میلی‌لیتر از مایع حاصل از تقطیر این مخلوط را به ۴ میلی‌لیتر معرف تیوباربیتوریک اسید (برای تهیه معرف از مخلوط معرف تیوباربیتوریک اسید با اسید استیک گلاسیال محلول یکنواختی ایجاد می‌کنند.) افزوده و در حمام بن ماری ۳۵ دقیقه قرار می‌گیرد. سپس میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۳۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. طبق رابطه۲ میزان تیوباربیتوریک اسید بدست آمد. میزان تیوباربیتوریک اسید بصورت میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم نمونه بیان شد.

رابطه ۲ $TBAvalue = V/8\ Abs_{538}$

Abs_{538} = میزان جذب درطول موج ۵۳۸ نانومتر

اندازه گیری اسیدهای چرب آزاد (FFA)

میزان شاخص اسیدهای چرب آزاد با استفاده از روش Woyewoda و همکاران در سال ۱۹۸۶ (۴۹) اندازه گیری شد. در این روش از ۱۰ گرم نمونه ماهی هموژن شده با کمک کلروفرم/ متانول استخراج روغن صورت گرفت. در ادامه به محلول باقی مانده کلروفرم، متانول و ۲-پروپانول به نسبت ۲:۱:۲ به همراه معرف متاکروزول ارغوانی (جهت تهیه معرف به همراه پودر معرف متاکروزول، سود۰/۰۵ نرمال و آب مقطر اضافه شد.) اضافه شد. تیتراسیون گروه‌های کربوکسیلیک آزاد موجود در آن با سود ۰/۰۵ نرمال تا تغییر رنگ از زرد به ارغوانی ادامه یافت. بدین ترتیب. طبق رابطه ۳ میزان اسیدهای چرب آزاد بصورت درصد اولئیک اسید (Oleic acid) بیان شد.

رابطه ۳

$$FFA = \frac{N \times (V2 - V1) \times 2.82}{W}$$

N = میزان نرمالیته سود

(V۱ -V۲) = تفاضل مقدار مصرفی سود رمیلی لیتر

W = وزن چربی (گرم)

اندازه گیری تری متیل آمین (TMA)

برای اندازه گیری تری متیل آمین از روش AOAC در سال ۱۹۹۵ (۴) استفاده شد.جهت تهیه عصاره بافت ماهی۱۰ گرم از عضله ماهی را وزن کرده و با ۳۰ میلی لیتر از ماده تری کلرواستیک اسید ۷/۵ درصد مخلوط کرده و سپس با دستگاه یکنواخت کن (هموژنایزر) به مدت ۲دقیقه یکنواخت گردیده تا محلول شیری رنگ حاصل شود. در مرحله بعد بافت یکنواخت شده در سرعت۲۵۰۰ دور و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مواد جامد ته نشین‌شده و محلول فوقانی که شفاف می باشد، به

عنوان عصاره بافت عضله ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور تهیه محلول‌های استاندارد، به ترتیب۲،۱و۳ میلی لیتر از محلول استاندارد (working solution TMA)، با آب مقطر به ۴ میلی‌لیتر رسانده و سپس با تعیین میزان جذب نور منحنی استاندارد رسم شد. در این آزمایش یک لوله به عنوان شاهد نیز در نظر گرفته شد. جدول ۱میزان مواد و محلول‌های هر سه لوله شاهد، استاندارد و مجهول را نشان می‌دهد. با تعیین میزان جذب نور در نمونه مجهول و با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده میزان TMAدر عضله ماهی محاسبه شد.

ارزیابی حسی

ارزیابی نمونه‌ها توسط ۱۰ نفر گروه پانل ارزیاب آموزش دیده در گروه‌های سنی ۲۵ تا ۲۷ سال انجام پذیرفت. ۱/۵ درصد نمک به نمونه‌های ماهی اضافه گردید (۲۹). نمونه‌های ماهی در داخل فویل آلومینیوم، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد بخارپز شدند. بافت، طعم، بو رنگ‌پذیرش کلی نمونه‌ها با مقیاس هدونیک (Hedonic) (با اندکی تغییر) با اصطلاحات توصیفی زیر رتبه‌بندی شدند: بافت (۵، دارای انسجام ماهی تازه، ۱، خمیری)، رنگ (۵، بدون تغییر رنگ، ۱، کاملا رنگ پریده)، طعم (۵، مطلوب، ۱، کاملا نامطلوب)، بو (۵، مطبوع، ۱، کاملا نامطبوع)، پذیرش کلی (۵، خیلی خوب، ۱، خیلی بد) (۳۳)

آنالیز آماری

تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی با آزمون واریانس یک طرفه (One- way ANOVA)بررسی گردید و نتایج بصورت میانگین ±خطای معیار بیان شدند. جهت نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو ویلک (Shapiro Wilk) اطمینان حاصل شد و سپس همگنی واریانس داده‌ها با آزمون لون (Leven) بررسی گردید. جهت انجام مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ با استفاده از نرم‌افزار آنالیز آماری SPSS استفاده گردید.از آزمون ناپارامتری KruskL-Wallis و به دنبال آن برای مقایسه دو به دو تیمارها و تعیین وجود اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از آزمون Mann-Whitney استفاده شد.

نتایج

تغییرات بار باکتریایی کل و سرمادوست نمونه‌ها طی نگهداری در یخچال

در جدول ۱تغییرات بار باکتریایی کل نمونه شاهد و تیمارهای دارای لفاف و پوشش کیتوزان در طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۲ روز مشاهده می‌شود. میزان این شاخص در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. در نمونه شاهد میزان آن از $\log_{10}$ cfu/g ۲/۸۰ در روز صفر به $\log_{10}$ cfu/g ۱۳/۲۴ در روز ۱۲ افزایش یافت. در آغاز دوره نگهداری میزان بار باکتریایی کل در نمونه‌های دارای لفاف و پوشش به ترتیب $\log_{10}$ cfu/g ۳/۰۲ و $\log_{10}$ cfu/g ۲/۷۳ بود. در پایان دوره میزان این شاخص در نمونه‌های دارای لفاف و پوشش به ترتیب $\log_{10}$ cfu/g ۱۱/۷۳ و $\log_{10}$ cfu/g ۸/۷۲ بود. در کل دوره نگهداری، نمونه‌های شاهد بیشترین بار باکتریایی کل را داشتند. کمترین میزان بار باکتریایی مربوط به نمونه های پوشش می باشد. در جدول ۱ تغییرات بار باکتریایی سرمادوست نمونه شاهد و تیمارهای دارای لفاف و پوشش کیتوزان در طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۲ روز مشاهده می‌شود. میزان این شاخص در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. در نمونه شاهد میزان آن از $\log_{10}$ cfu/g ۳/۹۳ در روز صفر به $\log_{10}$ cfu/g ۸/۷۰ در روز ۱۲ افزایش یافت. میزان باکتری‌های سرمادوست تیمارهای لفاف و پوشش در روز صفر به ترتیب $\log_{10}$ cfu/g ۳/۷۶ و $\log_{10}$ cfu/g ۳/۸۴ و در روز ۱۲ نگهداری در یخچال $\log_{10}$ cfu/g ۳/۶۶ و $\log_{10}$ cfu/g ۶/۶۷ بودند. در کل دوره میزان متوسط بار باکتریایی سرمادوست بطور معنی‌دار بالاتر از نمونه‌های تیمار شده بود.

تغییرات بازهای ازته فرار نمونه‌ها طی نگهداری در یخچال

در جدول ۲ تغییرات بازهای ازته فرارنمونه شاهد و تیمارهای دارای لفاف و پوشش کیتوزان طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۲ روزمشاهده می‌شود. میزان بازهای ازته فرار در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. در نمونه بسته‌بندی در اتمسفر میزان آن از ۲۱/۱۳ میلی‌گرم نیتروژن بر ۱۰۰ گرم نمونه در روز صفر به ۵۷/۰۶ میلی‌گرم نیتروژن بر ۱۰۰ گرم نمونه در روز ۱۲ افزایش یافت. میزان این شاخص در نمونه‌های دارای لفاف و پوشش کیتوزان در ابتدای دوره نگهداری به ترتیب ۲۵/۰۰ و ۲۰/۶۶ و در انتهای دوره ۴۵/۹۳ و ۴۴/۶۶ میلی‌گرم نیتروژن بر ۱۰۰ گرم نمونه بود. در کل دوره میزان متوسط بازهای ازته فرار در نمونه شاهد بطور معنی‌دار بالاتر از نمونه‌های تیمار شده بود. کمترین میزان بازهای ازته فرار مربوط به تیمار پوشش کیتوزان مشاهده شد.

تغییرات pH نمونه‌ها طی نگهداری در یخچال

در جدول ۲ تغییرات شاخص pH نمونه شاهد و تیمارهای دارای لفاف و پوشش کیتوزان طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۲ روز مشاهده می‌شود. میزان pH در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. در نمونه شاهد میزان آن از ۷/۲۱ در روز صفر به ۸/۲۷ در روز ۱۲ افزایش یافت. تیمارهای دارای لفاف و پوشش در روز صفر نگهداری میزان pH برابر با ۶/۹۴ و ۶/۷۶ داشتند که در روز ۱۲ نگهداری به ۷/۷۶ و ۷/۸۰ رسید. بطور متوسط بالاترین میزان pH در نمونه شاهد کمترین میزان pH متعلق به تیمار لفاف و پوشش بود.

تغییرات میزان تیوباربیتوریک اسید نمونه‌ها طی نگهداری در یخچال

در جدول ۲ تغییرات میزان تیوباربیتوریک اسید نمونه شاهد و تیمارهای دارای لفاف و پوشش کیتوزان طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۲ روزمشاهده می‌شود. میزان تیوباربیتوریک اسید در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. در نمونه شاهد میزان آن از ۰/۵۰ میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم نمونه در روز صفر به ۳/۰۷ میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم نمونه در روز ۱۲ افزایش یافت. این شاخص در روز صفر ۰/۳۷ و ۰/۳۱ و در روز ۱۲ نگهداری ۲/۰۱ و ۲/۸۷ میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم نمونه، به ترتیب در لفاف و پوشش مشاهده شد. در کل دوره بالاترین میزان متوسط تیوباربیتوریک اسید مربوط به نمونه شاهد و کمترین آن متعلق به نمونه‌های دارای پوشش بود.

تغییرات میزان اسیدهای چرب آزاد نمونه ها طی نگهداری در یخچال

در جدول ۲ تغییرات اسیدهای چرب آزاد تیمارهای مختلف در طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۲ روزمشاهده می‌شود. میزان این شاخص در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. در نمونه شاهد میزان آن از ۱/۵۶ درصد اولئیک اسید در روز صفر به ۵/۲۷ درصد اولئیک اسید در روز ۱۲ افزایش یافت. میزان اسیدهای چرب آزاد در نمونه‌های دارای لفاف و پوشش در روز صفر نگهداری به ترتیب ۱/۷۷ و ۱/۱۶ و در پایان ۱۲ روز نگهداری ۳/۳۷ و ۲/۶۱ درصد اولئیک اسید بود.

تغییرات تری متیل آمین نمونه‌ها طی نگهداری در یخچال

در جدول ۲ تغییرات میزان تری‌متیل آمین تیمارهای مختلف در طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۲ روزمشاهده می‌شود. میزان تری متیل آمین در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. در نمونه شاهد میزان آن از ۷/۲۵ میلی گرم تری‌متیل آمین بر ۱۰۰ گرم نمونه در روز صفر به ۱۶/۲۷ میلی گرم تری متیل آمین بر ۱۰۰ گرم نمونه در روز ۱۲ افزایش یافت. این شاخص در روز صفر ۷/۰۴ و ۶/۱۵ و در روز ۱۲ نگهداری ۱۳/۷۹ و ۹/۴۰ میلی گرم تری متیل‌آمین بر ۱۰۰ گرم نمونه ، به ترتیب در لفاف و پوشش مشاهده شد. در کل دوره بالاترین میزان متوسط تری متیل آمین مربوط به نمونه شاهد و کمترین آن متعلق به نمونه‌های دارای پوشش بود.

خواص حسی پخته شده ماهی نگهداری شده در یخچال

در جدول ۳ نتایج ارزیابی حسی پخته شده ماهی طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۲ روز نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود ویژگی بافت، طعم، رنگ و پذیرش کلی تمامی تیمارها و نمونه شاهد با گذشت زمان کاسته شد. در مورد تمامی ویژگی‌های حسی اندازه‌گیری شده، نمونه‌های دارای پوشش و لفاف بطور معنی‌دار بهتر از نمونه شاهد بود بطوری که نمونه شاهد در روز ۶ و نمونه‌های دارای پوشش و لفاف در روز ۱۲ به امتیاز کمتر از ۴ رسیدند.

بحث

در این بررسی الگوی رشد هر دو گروه باکتری‌های کل و سرما دوست مورد مطالعه در کل دوره، روند افزایشی داشت اما در روز ۶ نگهداری بار باکتریایی کل در فیله‌های شاهد به $7/12 \log_{10}$ cfu/g رسید که بالاتر از حد مجاز اعلام شده برای ماهی خام ($7 \log_{10}$ cfu/g) است (۴۰). در حالی که برای تمامی نمونه‌های تیمار شده تا پایان روز ۶ به این محدوده نرسید. نمونه‌های پوشش داده شده دارای کمترین بار باکتریایی اولیه بودند که می‌تواند به علت شستشوی فیله‌ها هنگام غوطه‌وری در محلول پوششی باشد. بالا بودن بار باکتریایی در فیله‌های بسته‌بندی شده با لفاف می‌تواند بخاطر آلودگی هنگام دستکاری و پیچاندن فیله‌ها در لفاف رخداده باشد. گزارشات فراوانی از تاثیر ضدمیکروبی کیتوزان وجود دارد (۳۳،۲۳،۱۸). Jeon و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۱۸) طی تحقیقی مشاهده کردند که تعداد کل باکتری‌های سرمادوست در ماهی کاد (*C. morhua*) پوشش داده شده با کیتوزان کمتر از $6 \log_{10}$ cfu/g در کل دوره ۱۲ روزه بود در حالی که در نمونه‌های بدون پوشش مقدار آن در روز ۶ از این میزان تجاوز نمود. Tsai و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۴۷) نیز گزارش نمودند که در فیله‌های ماهی قزل‌آلای گوژپشت (*Oncorhynchus nerka*) تیمار شده با محلول ۱ درصد کیتوزان به مدت ۳ ساعت از میزان انواع باکتری‌ها شامل مزوفیل‌ها، سایکروتروفیل‌ها، کلی‌فرم‌ها (*Coliform spp*)، آئروموناس‌ها (*Aeromonas spp*) و ویبریوها کاسته شد. علت همسویی نتایج مطالعه با این محققین را می‌توان در خاصیت ضدمیکروبی کیتوزان دانست. فاکتورهای متعددی بر فعالیت ضدباکتریایی کیتوزان اثرگذار است. اگرچه مکانیسم دقیق آن هنوز به روشنی مشخص نشده اما نظرات متفاوتی برای آن ارائه شده است. نظریه‌ای این اثر کیتوزان را به وجود گروه‌های آمینوی با بار مثبت نسبت داده است که با درشت ملکول‌های دارای بار منفی در سطح سلول میکروبی پیوند ایجاد نموده و منجر به گسیختگی غشای سلول باکتری، نشت مواد درون سلولی و در نهایت مرگ آن می‌شود (۳۰). علاوه بر این مکانیسم عمل کیتوزان می‌تواند بصورت خراشیدن لایه لیپو پلی ساکاریدی غشای خارجی باکتری (۳۶) و یا عملکرد آن بصورت سدی در مقابل نفوذ اکسیژن باشد (۱۸).

بازهای ازته فرار یک شاخص کیفی است که نشانگر میزان فساد، تجزیه و شکستن پروتئین‌ها بود (۱۰) و بواسطه فعالیت باکتریایی و آنزیم‌های درونی خود ماهی افزایش می‌یابد. سوخت و ساز باکتریایی آمینواسیدها در ماهی منجر به تجمع آمونیوم، مونواتیل‌آمین (Mono-Ethyle Amine)، دی اتیل آمین (D- Ethyle Amine)، تری اتیل آمین (Tri-Ethyle Amine) و سایر بازهای فرار می‌شود که همگی موجب بد طعمی ماهی می‌گردند (۱۵). میزان ۲۵ میلی‌گرم نیتروژن به ازای ۱۰۰ گرم نمونه گوشت به عنوان حداکثر میزان قابل قبول بازهای ازته فرار در گوشت ماهی خام پیشنهاد شده است (۲۰،۳۳). در تحقیقات دیگر میزان۳۵-۳۰ میلی‌گرم نیتروژن به ازای ۱۰۰ گرم نمونه گوشت ماهی خام به عنوان حداکثر میزان قابل قبول بازهای ازته فرار در گوشت ماهی پیشنهاد شده است (۸). در روز ۹ نگهداری مقدار بازهای ازته فرار نمونه شاهد بطور معنی‌دار بالاتر از تمامی نمونه‌های پوشش‌دار و دارای لفاف شد. در انتهای دوره میزان این شاخص در نمونه شاهد بطور معنی‌دار بیشتر از نمونه‌های تیمار شده بود. کمترین میزان بازهای ازته فرار نمونه در فیله‌های دارای پوشش مشاهده شد. می‌توان نتیجه گرفت که پوشش‌دهی در کاهش بازهای ازته فرار فیله‌های ماهی شعری معمولی طی نگهداری در یخچال موثرتر بوده است. پوشش‌های خوراکی به صورت ماده ضد میکروبی عملکرد میزان بازهای ازته فرار اثر می‌گذارد. Lopez-caballero و همکاران در سال ۲۰۰۵ (۲۳) اثر محافظتی پوشش ترکیبی کیتوزان- ژلاتین را در کم کردن میزان بازهای ازته فرار و متعاقبا فساد میکروبی راگزارش نمودند. Jeon و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۱۸) نیز با استفاده از انواع مختلفی از پوشش‌های کیتوزانی بر فیله ماهی کاد (*C. morhua*) کاهش۳۵-۳۳ درصد تولید بازهای ازته فرار را در دوره ۱۲ روزه نگهداری در یخچال مشاهده کردند که مشابه نتایج مطالعه حاضر است. از آن‌جا که حضور باکتری‌ها در گوشت منجر به اتولیز پروتئین‌ها و تجزیه آن‌ها (۱۰)، شکستن ترکیباتی از جمله تری‌متیل‌آمین اکسیدها، پپتیدها، آمینواسیدها و غیره می‌شود (۱۶). مقادیر بیشتر بار باکتریایی مشاهده شده در نمونه‌های شاهد می‌تواند توجیهی برای افزایش میزان بازهای نیتروژنی در آن‌ها باشد (۲۶).

بطور کلی میزان pH عضله ماهی زنده نزدیک به ۷ است. پس از مرگ براساس فصل، گونه و فاکتورهای دیگر از ۶ تا ۷ تغییر می‌کند (۶) .در تمام نمونه‌های ماهی مقدار این شاخص در طول دوره افزایش پیدا کرد. افزایش pH با گذشت زمان نگهداری را می‌توان به فعالیت آنزیم‌های اتولیتیک و باکتری‌های پروتئولیتیک فاسد کننده ماهی نسبت داد (۲۰). در بررسی حاضر با افزایش میزان بازهای ازته فرار در طول دوره چنین روندی برای pH انتظار می‌رفت. نتایج مشابهی توسط Fan و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۱۲) گزارش شد. آنها مشاهده کردند که میزان pH نمونه‌های کپور نقره‌ای دارای پوشش کیتوزان افزایش کندتری نسبت به نمونه‌های شاهد داشت و بیان کردند که وجود کیتوزان، فعالیت پروتئازهای درونی را کاهش می‌دهد که بدین ترتیب تولید بازهای ازته فرار مثل آمونیاک و تری‌متیل‌آمین حاصل از آنزیم‌های میکروبی یا درونی خود ماهی کاهش پیدا می‌کند. از آنجا که آلودگی باکتریایی در نمونه شاهد بیشتر از نمونه‌های پوشش‌دار و لفاف‌دار بود که متعاقبا منجر به تولید ترکیبات نیتروژنی می‌گردد، نمونه شاهد بالاترین میزان pH را به خود اختصاص داد. کمترین میزان این شاخص در پوشش و لفاف مشاهده شد.

مکانیسم آنتی‌اکسیدانی کیتوزان را می‌توان با فعالیت گروه‌های آمینوی اولیه کیتوزان توضیح داد. این عوامل فعال با گروه‌های آلدهیدی فرار حاصل از شکستن چربی‌ها طی اکسیداسیون (مثل مالون آلدهید)یک میکرواسفر پایدار تشکیل می‌دهد. از بین تمام تیمارها لفاف و پس از آن پوشش دارای کمترین میزان تیوباربیتوریک اسید بودند. بدین‌معنی که لفاف کیتوزان توانست بیشتر از پوشش کیتوزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی کیتوزان را بروز دهد. پیشنهاد شده که حداکثر میزان قابل قبول تیوباربیتوریک اسید برای کیفیت مطلوب ماهی (منجمد، یخچال‌گذاری شده و یا نگهداری شده در یخ) ۵ میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم نمونه است در حالی که تا ۸ میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم نمونه هم قابل مصرف است (۴۰). Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) (۳۳) اعلام کردند که پوشش کیتوزان-عصاره‌دار چین منجر به کاهش میزان تیوباربیتوریک اسید فیله‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای۴ درجه سانتی‌گراد شده است. Antoniewski و همکاران (۲۰۰۷) (۳) بیان کردند که پوشش ژلاتینی بر فراورده‌های گوشتی تفاوتی بین تیوباربیتوریک اسید هیچ یک از نمونه‌های گوشت گوساله، مرغ، خوک و ماهی سالمون ایجاد نکرد. Lopez-caballero و همکاران (۲۰۰۵) (۲۳) گزارش کردند که پوشش کیتوزان-ژلاتین بر پیراشکی ماهی کاد (*C. morhua*) در طول نگهداری در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد هیچ اثر آنتی‌اکسیدانی در مدت ۱۵ روز از خود نشان نداد. اما در تحقیق حاضر، تمامی تیمارهای دارای پوشش و لفاف کیتوزان منجر به کاهش سرعت تشکیل تیوباربیتوریک اسید در فیله‌های نگهداری شده در یخچال شد. Jeon و همکاران (۲۰۰۲) (۱۸) نیز اثر بخشی پوشش کیتوزان بر ماهی کاد (*C. morhua*) و هرینگ (*C. harengus*) را در کاهش تیوباربیتوریک اسید گزارش کردند. در بررسی حاضر میزان تیوباربیتوریک اسید برای نمونه شاهد، لفاف و پوشش پایین‌تر از حد مجاز بود.

وجود اسید چرب آزاد به واسطه اکسایش و آبکافت آنزیمی چربی‌های استری بوده و یک ترکیب نامطلوب می‌باشد چون اسیدهای چرب آزاد می‌توانند به ترکیبات فرار بدبو تبدیل شوند (۳۵، ۳۸). با این که تولید اسیدهای چرب آزاد به خودی خود منجر به افت کیفیت تغذیه‌ای نمی‌شود اما آزمون میزان آبکافت چربی به نظر مهم می‌رسد چون آبکافت چربی در شرایط سرما و انجماد نیز ادامه می‌یابد که تاثیر شدیدی بر اکسیداسیون چربی و دناتوره شدن پروتئین دارد (۵). تأثیر پرواکسیدانی اسیدهای چرب آزاد بر چربی نیز گزارش شده است بدین صورت که اسیدهای چرب آزاد بر گروه کربوکسیل اثر تحریک‌کننده (Catalytic effect) داشته و تشکیل هیدروپروکسیدها و متعاقبا رادیکال‌های آزاد را تسریع می‌بخشد. علاوه بر این به دلیل کوچک بودن اندازه ملکول‌های اسیدچرب آزاد نسبت به چربی‌های بزرگتر (مهم‌ترین

جدول ۱- تغییرات بار باکتریایی کل و سرمادوست (log_{10} cfu/g) نمونه شاهد و تیمارهای دارای لفاف و پوشش کیتوزان طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۲ روز

		روز ۰	روز ۳	روز ۶	روز ۹	روز ۱۲
باکتری کل	بسته بندی معمولی	۲/۸۰±۰/۳۷eA	۴/۹۸±۰/۳۸dA	۷/۱۲±۰/۵۷cA	۹/۴۸±۰/۶۲bA	۱۳/۲۴±۰/۷۱aA
	لفاف کیتوزان	۳/۰۲±۰/۳۵dA	۴/۰۸±۰/۳۴dA	۵/۹۸±۰/۱۶cAB	۷/۹۰±۰/۳۴bB	۱۱/۳۷±۰/۶۴aA
	پوشش کیتوزان	۲/۷۳±۰/۲۴eA	۳/۹۱±۰/۲۰dA	۵/۵۷±۰/۲۷cB	۷/۱۶±۰/۱۱bB	۸/۷۲±۰/۳۰aB
باکتری سرمادوست	بسته بندی معمولی	۳/۹۳±۰/۲۴dA	۴/۲۴±۰/۱۷dA	۵/۹۷±۰/۴۳cA	۷/۰۳±۰/۴۰bA	۸/۷۰±۰/۳۰aA
	لفاف کیتوزان	۳/۷۶±۰/۳۹cA	۴/۰۵±۰/۱۶cA	۵/۰۳±۰/۱۵bAB	۵/۵۷±۰/۱۷bB	۶/۶۶±۰/۲۸aB
	پوشش کیتوزان	۳/۸۴±۰/۱۶cA	۳/۷۲±۰/۰۹cA	۴/۶۰±۰/۳۵cB	۵/۶۳±۰/۴۱bB	۶/۶۷±۰/۲۹aB

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می باشد (P<۰/۰۵).
حروف بزرگ متفاوت در هرستون نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵).

آنها تری آسیل گلیسرول‌ها و فسفولیپیدها) بیشتر در معرض اکسیداسیون توسط آنزیم‌هایی چون لیپازها و فسفولیپازها می‌باشد. این مسئله به شدت بر کیفیت حسی فراورده‌های غذایی دریایی تاثیرگذار است (۲۴). میزان متوسط اسیدهای چرب آزاد نمونه شاهد بالاترین میزان را داشت اما بین نمونه‌های دارای لفاف و پوشش تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. تأثیر پرواکسیدانی اسیدهای چرب آزاد بر چربی نیز گزارش شده است بدین صورت که اسیدهای چرب آزاد بر گروه کربوکسیل اثرتحریک کننده داشته و تشکیل هیدروپروکسیدها و متعاقبا رادیکال‌های آزاد را تسریع می‌بخشد. میزان اولیه این شاخص در این آزمایش در نمونه‌های نگهداری شده در یخچال از ۱/۱۶ تا ۱/۷۷ درصد اولئیک اسید متغیر بود. افزایش تدریجی در تولید اسید چرب آزاد در تمام نمونه‌ها مشاهده شد اما در فیله‌های پوشش داده شده و یا لفاف این افزایش در طول نگهداری کندترشد. شاخص اسید چرب آزاد نمونه‌های شاهد به طور معنی‌دار بیشتر از نمونه‌های تیمار شده بود ($p < ۰/۰۵$). دلیل پایین‌تر بودن میزان اسیدهای چرب آزاد در تیمارهای دارای لفاف و پوشش را شاید بتوان به فعالیت شلاته کنندگی کیتوزان نسبت داد چرا که کیتوزان به عنوان عامل شلاته کننده با پاره‌ای از فلزات پیوند یافته و لذا از رشد میکروبی جلوگیری می‌کند، همچنین کیتوزان به عنوان باز دارنده فعالیت آنزیم‌های مختلف شناسایی شده است (۳۳). در بررسی حاضر، بین نمونه شاهد و انواع دارای پوشش و لفاف تفاوت معنی‌دار وجود داشت

جدول ۲- تغییرات خواص فیزیکوشیمیایی نمونه شاهد و تیمارهای دارای لفاف و پوشش کیتوزان طی نگهدارمدت ۱۲ روز

		روز ۰	روز ۳	روز ۶	روز ۹	روز ۱۲
TVBN(میلی‌گرم نیتروژن بر ۱۰۰ گرم نمونه)	بسته بندی معمولی	۲۱/۱۳±۰/۶۹cA	۳۸/۳۳±۳/۴۲bA	۴۰/۰۶±۴/۲۱bA	۴۷/۶۶±۱/۵۵abA	۵/۴۴±۵۷/۰۶aA
	لفاف کیتوزان	۲۵/۰۰±۶/۵۱bA	۲۶/۶۶±۲/۹۰bB	۳۲/۲۰±۳/۲۹abA	۴۱/۸۰±۰/۹۸abAB	۴۵/۹۳±۹/۱۴aA
	پوشش کیتوزان	۲۱/۱۳±۰/۶۹dA	۲۱/۹۳±۰/۴۶dB	۳۱/۰۰±۰/۶۴cA	۳۷/۷۳±۳/۲۹bB	۴۴/۶۶±۲/۰۹aA
pH	بسته بندی معمولی	۷/۲۱±۵۰bA	۷/۴۴±۰/۱۶abA	۷/۵۱±۰/۰۲abB	۸/۱۵±۰/۴۲abA	۸/۲۷±۰/۰۵aA
	لفاف کیتوزان	۶/۹۴±۰/۴۰bA	۷/۴۲±۰/۰۰abA	۷/۲۷±۰/۰۶abC	۷/۷۲±۰/۰۷abA	۷/۷۶±۰/۳۲aA
	پوشش کیتوزان	۶/۷۶±۰/۳۴bA	۷/۴۷±۰/۰۷abA	۷/۸۵±۰/۰۲aA	۷/۸۹±۰/۳۶aA	۷/۸۰±۰/۲۰aA
TBA (میلی‌گرم مالون آلدهید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه)	بسته بندی معمولی	۰/۵۰±۰/۰۵bA	۰/۵۹±۰/۱۸bA	۱/۶۷±۰/۱۲abAB	۲/۴۸±۰/۳۷aA	۳/۰۷±۰/۸۶aA
	لفاف کیتوزان	۰/۳۷±۰/۰۹aA	۰/۴۳±۰/۰۶aA	۰/۸۵±۰/۶۲aB	۱/۶۴±۰/۵۰aAB	۲/۰۱±۱/۱۲aA
	پوشش کیتوزان	۰/۳۱±۰/۰۴cA	۰/۷۲±۰/۱۲cA	۱/۹۸±۰/۳۳bA	۰/۷۵±۰/۱۹cB	۲/۸۷±۰/۲۹aA
FFA (درصد اولئیک اسید)	بسته بندی معمولی	۱/۵۶±۰/۳۹bA	۲/۲۳±۰/۳۶abA	۲/۷۶±۰/۶۱abA	۳/۵۴±۱/۰۵abA	۵/۲۷±۱/۵۲aA
	لفاف کیتوزان	۱/۷۷±۰/۰۸bA	۱/۶۷±۰/۴۶bA	۱/۹۸±۰/۵۰bA	۲/۲۲±۰/۱۵abA	۳/۳۷±۰/۶۱aA
	پوشش کیتوزان	۱/۱۶±۰/۱۴cA	۱/۶۸±۰/۱۴bcA	۱/۷۰±۰/۲۰bcA	۲/۳۸±۰/۳۱abA	۲/۶۱±۰/۳۳aA
TMA (میلی گرم تری متیل آمین بر ۱۰۰ گرم نمونه)	بسته بندی معمولی	۷/۲۵±۰/۰۷dA	۸/۹۸±۱/۱۴cA	۱۰/۴۰±۰/۴۱cA	۱۳/۳۸±۰/۰۷bA	۱۶/۲۷±۰/۱۰aA
	لفاف کیتوزان	۷/۰۴±۰/۵۳cA	۶/۴۲±۰/۴۶cA	۵/۵۷±۱/۱۹cB	۹/۱۳±۰/۱۰bB	۱۳/۷۹±۰/۲۸aB
	پوشش کیتوزان	۶/۱۵±۱/۱۵aA	۶/۶۰±۱/۴۳aA	۶/۲۱±۰/۶۵aB	۶/۵۱±۱/۷۷aB	۹/۴۰±۰/۶۶aC

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می باشد (P<۰/۰۵).
حروف بزرگ متفاوت در هرستون نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵).

(p < ۰/۰۵) اما بین نمونه‌های دارای لفاف و نمونه‌های پوشش‌دهی شده تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج مشابه توسط Gómez-Estace و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۱۴) و Nowzari و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۳۱) گزارش گردید.

تری‌متیل‌آمین‌اکساید (TMAO) بخشی از ترکیبات بازی فرار است که از تجزیه تری‌متیل‌آمین‌اکساید موجود در گوشت ماهیان توسط فعالیت آنزیمی باکتریایی تولید می شود (۷). Regenstein در سال ۱۹۹۱ (۳۷) مقدار مجاز تری‌متیل‌آمین را ۸-۶ میلی گرم تری‌متیل‌آمین در ۱۰۰ گرم نمونه برای ماهی عنوان کردند، در حالی که Teskerdzic و Pifeifer در سال ۱۹۸۷ (۴۶) یافتند که مقدار ۱۰ میلی‌گرم تری‌متیل‌آمین در ۱۰۰ گرم نمونه را به عنوان حد مجاز این شاخص برای ماهی پیشنهاد کردند. در بررسی حاضر میزان تری‌متیل‌آمین برای نمونه لفاف و پوشش تا روز ۹، پایین‌تر از حد مجاز بود. کمترین میزان تری‌متیل‌آمین نمونه در فیله‌های دارای پوشش مشاهده شد. می‌توان نتیجه گرفت که پوشش‌دهی در کاهش تری‌متیل‌آمین فیله‌های ماهی شعری معمولی طی نگهداری در یخچال موثرتر بوده است. مطالعه Mohan و همکاران (۲۰۱۲) (۲۶) نشان داد که پوشش ۱ درصد و ۲ درصد کیتوزان باعث کاهش میزان تری‌متیل‌آمین به اندازه ۲۶/۱ درصد و ۴۹ درصد نسبت به نمونه شاهد شد. می توان نتیجه گرفت که پوشش کیتوزان با ممانعت از رشد میکروب‌ها باعث تولید کمتر تری متیل آمین می‌شود.

حد نهایی مطلوبیت برای نمونه‌های ماهی جهت مصرف انسانی تا امتیاز ۴ در نظر گرفته شد (۳۳). شاخص حسی پخته در نمونه شاهد از روز ۶ نگهداری در یخچال به درجه عدم مقبولیت رسیدند. این نتیجه با نتایج حاصل از آزمایشات میکروبی منطبق بود. فیله‌های شعری معمولی بواسطه اکسیداسیون چربی و فساد میکروبی دچار بدبویی، رنگ پریدگی و طعم نامطلوب در طول دوره می‌شود. نتیجه‌ای که از ارزیابی حسی بدست آمد نشان داد که تمامی امتیازات با گذشت زمان نگهداری بطور معنی‌دار کاهش پیدا کردند (p<۰/۰۵). تاثیرات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و حفاظت در برابر اکسیژن حاصل از پوشش و لفاف باعث کاهش بار باکتریایی و همچنین کمتر شدن اکسیداسیون در آزمایشات اندازه‌گیری پراکسید و تیوباربیتوریک اسید شد، در ارزیابی حسی نیز این تأثیر مشاهده شد چنانچه نمونه‌های دارای پوشش و لفاف از روز ۱۲ نگهداری به امتیاز رد مقبولیت رسیدند. بین نمونه‌های دارای لفاف و پوشش در هیچ یک از شاخص‌های حسی خام و پخته تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. Fan و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۱۲) در ارزیابی حسی فیتوفاگ *(H. molitrix)* پوشش داده شده با کیتوزان و نمونه شاهد حاکی از کاهش قابلت وجه ارزیابی حسی در تیمار مورد مطالعه در طول زمان بود اما بطور کلی نمونه‌های پوششی در مقایسه با شاهد ارزیابی حسی بهتری نشان دادند. مشخص شده که فساد ماهی افزایش شدیدتر بوی ماهی مثل بوی فساد و تعفن را به دنبال دارد که در این صورت ماهی

جدول ۳- ارزیابی حسی نمونه پخته شده شاهد و تیمارهای پوشش دهی و لفاف پیچی شده طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۲ روز

		روز ۰	روز ۳	روز ۶	روز ۹	روز ۱۲
بافت	بسته بندی معمولی	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۲۱±۰/۱۲bA	۳/۳۲±۰/۲۱cB	۲/۳۵±۰/۳۲cA	۱/۶۴±۰/۲۵dA
	لفاف کیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۴۱±۰/۱۳bA	۴/۱۶±۰/۱۷bA	۲/۹۶±۰/۳۷cA	۲/۱۰±۰/۳۲dA
	پوشش کیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۵۰±۰/۱۱abA	۴/۱۴±۰/۲۲bA	۳/۱۲±۰/۲۹cA	۲/۱۹±۰/۲۵dA
طعم	بسته بندی معمولی	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۵۰±۰/۱۰aA	۳/۵۷±۰/۱۶bA	۲/۳۲±۰/۳۳cA	۱/۶۷±۰/۲۴dA
	لفاف کیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۵۷±۰/۲۰abA	۴/۰۶±۰/۱۵bA	۲/۸۵±۰/۳۲cA	۱/۹۲±۰/۳۰dA
	پوشش کیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۸۲±۰/۰۸aA	۳/۹۱±۰/۲۳bA	۳/۱۰±۰/۳۳cA	۲/۲۵±۰/۲۷dA
رنگ	بسته بندی معمولی	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۳۰±۰/۱۲bB	۳/۵۱±۰/۲۴cB	۲/۳۲±۰/۳۳cB	۱/۶۷±۰/۲۳dA
	لفاف کیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۴۱±۰/۱۶aB	۴/۳۵±۰/۲۱aA	۲/۹۶±۰/۳۱cAB	۲/۰۳±۰/۲۸dA
	پوشش کیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۸۵±۰/۰۶aA	۳/۸۹±۰/۹۱bAB	۳/۴۶±۰/۲۸bA	۲/۴۲±۰/۲۸cA
پذیرش نهایی	بسته بندی معمولی	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۴۲±۰/۱۱bB	۳/۸۳±۰/۱۳cB	۲/۴۲±۰/۳۶cB	۱/۷۱±۰/۲۴dB
	لفاف کیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۵۰±۰/۱۳abAB	۴/۳۰±۰/۱۵bA	۳/۱۶±۰/۳۰dAB	۲/۲۳±۰/۲۶eAB
	پوشش کیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰aA	۴/۷۸±۰/۰۶aA	۴/۱۴±۰/۱۵bAB	۳/۴۴±۰/۲۶cA	۲/۵۳±۰/۲۳dA

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می باشد (P<۰/۰۵).
حروف بزرگ متفاوت در هرستون نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵).

توسط شخص ارزیابی کننده طعم، برای مصرف مورد تایید قرار نمی‌گیرد.

نتیجه گیری کلی

با توجه به تقاضای مصرف‌کنندگان برای دسترسی به مواد غذایی با کیفیت بالا و نگرانی آن‌ها به دلایل مشکلات ناشی از مصرف نگهدارنده‌های مصنوعی و نیز نگرانی‌های زیست محیطی ناشی از تجمع پلیمرهای مصنوعی، تکنولوژی استفاده از پوشش‌های زیست‌کافت با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی بالا می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. لذا در تحقیق حاضر اقدام به تهیه پوشش و لفاف کیتوزان نموده و از آن در نگهداری فیله ماهی شعری در شرایط نگهداری در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد تا محصولی با کیفیت بالاتر و ایمن‌تر به دست مصرف‌کنندگان رسانده شود. بطور کلی نتایج تحقیق حاضر به ترتیب زیر بودند:

نتایج مطالعات میکروبی کل و سرمادوست حاکی از پایین‌تر بودن تعداد این باکتری‌ها در تیمارهای دارای پوشش و لفاف بود. پوشش و لفاف کیتوزان در مقایسه با نمونه‌های شاهد تاثیر آشکاری بر کاستن از بار آلودگی میکروبی فیله ماهی شعری داشته اما تفاوت معنی‌داری بین پوشش و لفاف در کاهش آلودگی میکروبی وجود نداشت. نتایج آزمایش اندازه‌گیری بازهای ازته فرار، پوشش‌دهی را در کاهش بازهای ازته فرار حاصل از تولیدات باکتریایی موثرتر از لفاف نشان داد.

این پوشش‌ها و لفاف‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را با کمتر بودن شاخص‌های تیوباربیتوریک اسید، اسیدهای چرب آزاد،pH و تری متیل آمین در نمونه‌های دارای پوشش و لفاف نسبت به نمونه شاهد نشان دادند. علاوه براین در شرایط نگهداری در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) تاثیر پوشش در ممانعت از اکسیداسیون چربی بیشتر از لفاف بود. آزمون‌های حسی نیز مؤثر بودن لفاف و پوشش کیتوزان را بر خواص حسی فیله‌های خام نشان داد.

به طور کلی، از نظر خواص کیفی فیله های ماهی شعری پوشش دهی شده در مقایسه با لفاف پیچی به علت شستشوی فیله‌ها هنگام غوطه‌وری در محلول پوششی و سطح تماس بین فیله و کیتوزان بیشتر در حالت پوشش‌دهی بهتر نشان داد.

منابع مورد استفاده

۱- مرتضویان، س. ا. م.، عزیزی، م. ح. و سهراب‌وندی، س. ۱۳۸۹، مروری بر کاربرد لفاف‌های خوراکی در مواد غذایی، فصل‌نامه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تربیت مدرس، ۱، ۱۳۱-۱۱۱.

2- Aberomand, A., Zyaei Nezhad, S and Baesi, F. 2016. Evaluation of nutritional value of raw and fried Shaary *(Lethrinus nebulosus)*. *Journal Exploitation and Aquaculture* 4: 1-14 (In Persian)

3- Antoniewski, M. N., Barringer, S. A., Knipe, C. L and Zerby, H. N. 2007. Effect of a gelatin coating on the shelf life of fresh meat. *Journal of Food Science* 72: 382-387.

4- A.O.A.C.(1995). Official methods of analysis (14th ED).Whashington, DC: Association of Official analytical chemists.

5-Aubourg, S. P., Rodríguez, Aand Gallardo, J. 2005. Rancidity development during frozen storage of mackerel (*Scomber scombrus*): Effect of catching season and commercial presentation. European *Journal of Lipid Science and Technology*107: 316–323

6- Arashisar, X., Hisar, O., Kaya, M and Yanik, T. 2004. Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology* 97: 209– 214.

7- Connell, JJ. 1990. Methods of assessing and selecting for quality.In: Connell JJ (ed) Control of fish quality. Fishing News Books, Oxford, pp 122–150.

8- Connell, J. J. (1995). Control of Wsh quality (4thed.). London: Fishing News Books Limited.

9- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K and Dutta, J. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*114: 1173–1182.

10- El-Deen, G and El-Shamery, M. R. 2010. Studies on contamination and quality of fresh fish meats during storage. *Academic Journal of Biological Science* 2: 65-74.

11- Falguera, V., Quintero, J. P., Jimenez, A., Munoz, J. Aand Ibarz, A. 2011. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology* 22: 292-303.

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

13- Gomez-Estaca, J., Gomez-Guillen. M. C., Fernandez-Martin, F., and Montero, F. 2011. Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films. *Journal of Food Hydrocolloids* 25: 1461-1469.

14- Gomez-Estaca, J., Montero, P., Gimenez, B., and Gomez-Guillen, M. C. 2007. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine *(Sardina pilchardus)*. *Food chemistry*. 105: 511–520.

15- 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.

16- Gram, L and Huss, H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Food Microbiology* 33: 121-137.

17- Günlü, A and Koyun, K. 2013. Effects of Vacuum packaging and wrapping with chitosan-based edible film on the extension of the shelf life of sea bass *(Dicentrarchus labrax)* fillets in cold storage (4). *Food and Bioprocess Technology* 6: 1713- 1719.

18- Jeon, C. O., Kamil,Y.V.A and Shahidi, F. 2002. Chitosan as an

edible invisible film for quality pereservation of Herring and Atlantic Cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistery* 50:5167-5178.

19- Kanatt, S. R., Chander, R and Sharma, A. 2008. Chitosan glucose complex – A novel food preservative. Food chemistry 106: 521–528.

20- Kilincceker, O., Dogan, I. S and Kucukoner, E. 2009. Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *LWT- Food Science and Technology* 42: 868–873.

21- Kim, S., Nimni, M. E., Yang, Z and Han, B. 2005. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. *Journal of Biomedical Material Research* 75: 442–450.

22- Kunte, L. A., Gennadios, A., Cuppett, S. L., Hanna, M. A and Weller, C. L .1997. Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal chemistry* 74(2): 115–118.

23- Lopez-Caballero, M., Gomez-Guillen, M. C., Perez-Matoes, M and Montero, P. 2005. A Chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids* 19:303-311.

24- Losada, V., Barros-Velazquez, J and Aubourg, S. P. 2007. Rancidity development in frozenpelagic fish: Influence of slurry ice as preliminary chilling treatment. *LWT- Food Science and Technology* 40: 991–999.

25- Harrigan, W. F and McCance, M. E. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. London Academic Press Inc.

26- Mohan, C. O., Ravishankar, C. N., Lalitha, K. V and Srinivasa Gopal, T. K. 2012. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine *(Sardinella longiceps)* during chilled storage. *Food Hydrocolloids* 26: 167–174.

27- Moradi, M., Tajik. H., RazaviRohani, S. M. Oromiehie, A., Malekinejad, H and Saei Dehkordi, S. S. 2011. Antioxdidant, color and Antibacterial properties of edible chitosan film Inocorporated with *Zataria multifiora* Bioss essential oil againt *Listeria monocytogenes. Armaghane-edanesh.yasouj.iran* 15:303-315.

28- Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S. M., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J and Hadian, M. 2012. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT - Food Science and Technology* 46: 477-484.

29- Nirmal, N. P and Benjakul, S. 2011. Retardation of quality changes of pacific white shrimp by green tea extract treatment and modified atmosphere packaging during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*149:247-253

30- No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul,Wand Xu. Z. 2007.Application effects of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. *Journal of Food Science* 72:R87-R100.

31- Nowzari, F., Shabanpour, B and Ohagh, S. M. 2013. Comparision of chitosan-gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry* 141: 1667-1672.

32- Ojagh, S. M. 2010. Effect of chitosan coating enriched with cinnamon essential oil rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* fillet. Thesis of PhD. degree. Faculty of Natural Resources and Marine Sciences. Tarbiat Modares University. 105 p (In Persian)

33- 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.

34- Olivasa, G. I., and Barbosa-Canovas, G. V. 2008.. Alginate–calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT.* 41: 359–366.

35- Ozyurt, G., Kuley, E., Ozkutuk, S and Ozogul, F. 2009. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and gold band goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. *Food Chemistry*114: 505–510.

36- Pereda, M., Ponce, A. G., Marcovich, N. E., Ruseckaite, R. A and Martucci, J. F. 2011. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids* 25: 1372-1381.

37- Regenstein, J. M. 1991. Introduction to Fish Technology. Van Nostrand Reinhold, New York. Pp. 19-20.

38- Rezaei, M and Hosseini, S. F. 2008. Quality assessment of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *Journal of Food Science* 73(6): H93–H96.

39- Rivero, S., Garcia, M. A and Pinotti, A. 2009. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Food Engineering* 9: 531–539.

40- Sallam, K. I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food control* 18: 566–575.

41- Sathivel, S., Liu, Q., Huang, J and Prinyawiwatkul, W. 2007. The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Engineering* 83: 366–373.

42- Siripatrawan, U and Noipha, S. 2012. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food hydrocolloids* 27: 102-108.

43- Shahidi, F., Kamil, J., Arachchi, V and Jeon, Y. J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology* 10: 37-51.

44- Shakila R., Jeyasekaran G. and Vijayalakshmi S. 2005.Effect of vacuum packaging on the qualitycharacteristics of seer fish (*Scomberomoru commersonii*) chunks during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology* 42:438-443.

45- Suvanich, V., Jahncke, M. L and Marshall, D. L. 2000. Changes selected chemical quality characteristics of channel catfish frame mince during chill and frozen storage. *Food Science* 65(1): 24-29.
46- Teskeredzic, Z and Pfeifer, K. 1987. Determining the degree of freshness ofrainbow trout (*Salmo gairdneri*) cultured inbrackish water. *Journal of Food Science* 52: 1101–1102.
47- Tsai, G. J., Su, W. H., Chen, H. C and Pan, C. L. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science* 68: 170–177.
48- Vasconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J and Gerschenson, L. N. 2009. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research Internationa*l 42: 762–769.
49- Woyewoda, A. D., Shaw, S. J., Ke, P. J and Burns, B. G. 1986. Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. *Canadian technical report of fish and aquatic science*, 1448..