DOI: 10.22092/vj.2018.123422.1501
شماره ۱۲۳ تابستان ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی اثرات پوشش نانوکیتوزان بر خواص کیفی و فیزیکوشیمیایی ماهی کفشک زبان گاوی *Cynoglossus arel* (Bloch & Schneider, 1801) در طول نگه‌داری در دمای فرا سرما (دمای ۳- درجه سانتی‌گراد)

• **رسا السادات غرابی (نویسنده مسئول)**
دانشجوی فراوری محصولات شیلاتی آبزیان، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خوزستان-ایران
• **آی‌ناز خدانظری**
استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خوزستان، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۷-۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۹-۱۱
Email: rasa.ghorabi@gmail.com

چکیده

فساد به دلیل واکنش‌های زیستی مانند رشد میکروبی، اکسیداسیون لیپیدها و فعالیت آنزیم‌های اتولیتیک رخ می‌دهد که سبب کوتاه شدن عمر مفید ماهی و سایر فراورده‌های دریایی می‌گردد. در مطالعه حاضر اثرات پوشش نانوکیتوزان بر کیفیت فیله‌ی ماهی کفشک زبان گاوی (*Cynoglossus arel*) در طی نگه‌داری در دمای فرا سرما (دمای ۳- درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، فیله‌های ماهی کفشک زبان گاوی را در سه گروه به ترتیب نانوکیتوزان (کیتوزان ۲٪ و تری پلی فسفات ۲٪)، محلول اسید استیک و محلول آب مقطر به عنوان نمونه شاهد غوطه‌ور شدند. نمونه‌های کنترل و پوشش داده‌شده (محلول اسید استیک و نانوکیتوزان) از نظر میکروبیولوژی (شمارش باکتری‌های کل (TVC))، فیزیکوشیمیایی (بازهای ازته فرار (TVBN)، تیوباربیتوریک اسید (TBA) و تری متیل آمین (TMA)) و خواص حسی (طعم و بو) به‌طور دوره‌ای ارزیابی شدند (تعداد نمونه‌ها=۴۵). نتایج نشان داد که نمونه‌های پوشش داده‌شده با نانوکیتوزان ازنظر شمارش باکتری‌های کل، میزان بازهای ازته فرار، تیوباربیتوریک اسید، تری متیل آمین و خواص حسی کمتر از گروه شاهد و نمونه‌های غوطه‌ور شده در اسید استیک بودند. به‌طورکلی، نتایج نشان داد پوشش ماهی با محلول نانوکیتوزان می‌تواند به‌طور مؤثر سبب حفظ کیفیت مطلوب نمونه‌ها و افزایش عمر مفید آن‌ها در مقایسه با گروه کنترل در طول نگه‌داری در دمای فرا سرما (دمای ۳- درجه سانتی‌گراد) گردید.

کلمات کلیدی: کفشک زبان گاوی (*Cynoglossus arel*) پوشش، نانوکیتوزان، دمای فراسرما

Veterinary Researches & Biological Products No 123 pp: 96-104

Evaluation Of The Effects Of Nano-Chitosan Coating On Quality Properties Of *Cynoglossus arel* Fish (Bloch & Schneider, 1801) During Superchilling (-3° C)

By: GHorabi, S.R., (Corresponding Author), Khoramshahr University of Marine Science and Technology; KHodanazari, I., Assistant Professor, Departmentof fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khoozestan, Iran.

Received: 2018-09-25 Accepted: 2018-12-02

Email: rasa.ghorabi@gmail.com

Fish corruption is due to biological reactions such as microbial growth, lipid oxidation and the activity of fish autolysis enzymes, resulting in a shorter shelf life of fish and other marine products. In the present study, the effects of nano-chitosan coating on the quality of fillets of *Cynoglossus arel* fish were measured during superchilling (-3°C). Thus, large-escale tonsole fillets were coated at three groups including the following: nanochitosan (% w/v chitosan and 2% sodium tripolyphosphate, Nanochitosan), treated with 1% glacial acetic acid and distilled water as control sample. The control and coated sample were periodically evaluated for microbiological (total bacterial count (TVC)), physicochemical (to**tal volat***ile nitrogen (TV*BN), thiobarbituric acid (TBA), and trimethylamine (TMA)) and sensory properties (flavor and odor) (the number of sapmles= 45). Results showed that the samples coated with nano-chitosan, had lower Total viable bacteria, volatile nitrogen, thiobarbituric acid, trimethylamine and sensory properties than the control group.In general, the results showed that fish coating with nano-chitosan solution could effectively preserve the optimum quality of the samples and increase their useful life compared to the control group during superchilling at -3°C.

Keyword:Cynoglossus arel, Coating, Nanochitosan, Superchiling

مقدمه

کیتوزان [poly [B-(1-4)-amino-deoxy-d-glucopyronose عمدتاً از پوسته‌ی سخت‌پوستان تشکیل‌شده است که برای انسان، حیوانات خانگی، حیات‌وحش و محیط‌زیست بی‌ضرر است. نتایج تحقیقات مختلف نشان داد که کیتوزان در بسته بندی مواد غذایی دارای فعالیت ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی می‌باشد (۱۳). مولکول کیتوزان به‌راحتی قابلیت تغییر شیمیایی را دارد و دارای خصوصیات بیولوژیکی متنوعی ازجمله سازگاری زیستی (Biocompatibility)، کمپلکس شدن با فلزات (Metal complexation)، فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی شود و در زمینه‌های مختلف مانند بیوتکنولوژی، داروسازی، پزشکی، تصفیه فاضلاب، صنایع آرایشی و بهداشتی، صنایع غذایی، کشاورزی و صنعت نساجی به‌صورت منفرد و یا مخلوط با پلیمرهای طبیعی دیگر ازجمله نشاسته، ژلاتین، آلژینات کاربرد وسیعی هستند (۱۰). کیتوزان و مشتقات آن فعالیت ضد باکتریایی با طیف وسیع و میزان کشندگی بالا در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انسان و میکروارگانیسم‌های مربوط به مواد غذایی دارد ولی برای سلول پستاندارن سمیت خیلی کمی دارد (۱۵). فیلم‌های کیتوزان نفوذپذیری کمی نسبت به اکسیژن و رطوبت دارند؛ بنابراین مانع بسیار خوبی برای گازها و بخارآب می‌باشند (۶). نانو ذرات از پلیمرهای طبیعی یا مصنوعی در اندازه‌ی ۱۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر ساخته می‌شوند (۸). نانو ذرات دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی یکنواخت بوده و تاثیراتی مانند اندازه کوانتوم (کوچک‌ترین واحد از یک کمیت فیزیکی)، اندازه ریز، تاثیر سطحی و تونل ماکروکوانتوم (ویژگی‌های مکانیک کوانتومی و خاصیت دوگانگی موج-ذره درجسم) را نشان می‌دهند. نانوکیتوزان یک ماده‌ی طبیعی با خواص فیزیکیوشیمیایی عالی است. نانوکیتوزان را می‌توان به روش‌های مختلف آماده کرد از جمله روش ژلاسیون یونوتروپیک بین کیتوزان و سدیم تری پلی‌فسفات. نانو ذرات کیتوزان تری پلی فسفات عمدتاً به‌عنوان داروی حامل استفاده می‌شود (۴). علاوه بر این فعالیت آنتی باکتریایی نانو ذرات کیتوزان نیز گزارش‌شده است (۶). ماهی تازه به دلیل ترکیب بیولوژیکی آن سریع فاسد می‌شود. فساد ماهی ناشی از واکنش‌های بیولوژیکی مانند اکسیداسیون لیپیدها، تغییر عملکرد پروتئین‌ها، واکنش‌های ناشی از فعالیت‌های آنزیم‌های اتولیتیک ماهی و فعالیت‌های متابولیت میکروارگانیسم‌ها است (۲). مطالعه رمضانی و همکاران (۲۰۱۵) در استفاده از نانو ذرات کیتوزان به عنوان پوشش خوراکی برای حفظ کیفیت فیله ماهی کپور نقره ای نگهداری شده در شرایط یخچال نشان دادکه هر دو پوشش کیتوزان و نانوکیتوزان برای حفظ فیله در طول نگهداری در یخچال موثر بود (۱۳). پژوهش حاضر باهدف افزایش عمر نگه‌داری محصولات غذایی دریایی صورت پذیرفت. علاوه بر این با توجه به گسترش روزافزون استفاده از نانوتکنولوژی در تولید مواد

ضد میکروبی و ضدعفونی‌کننده و بهبود خواص ترکیبات با اندازه نانو نسبت به ترکیبات اولیه، در مطالعه حاضر از نانو ذرات کیتوزان نیز علاوه بر کیتوزان در تهیه پوشش خوراکی به‌منظور افزایش عمر نگه‌داری ماهی استفاده شد. لذا مطالعه حاضر تاثیر مقایسه‌ای پوششهای نانوکیتوزان بر کیفیت ماهی کفشک زبان گاوی طی نگهداری در دمای فرا سرما (دمای ۳- درجه سانتی‌گراد) را بررسی نموده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۵ نمونه ماهی به وزن g ۵۰±۲۰۰ از صیدگاه منطقه آزاد اروند استان خوزستان به‌صورت تازه خریداری شدند. نمونه‌های ماهی و یخ به نسبت ۱ به ۳ (وزنی/ وزنی) درون جعبه‌های یونولیتی بلافاصله به آزمایشگاه شیلات واقع در دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردید. سر ماهی کفشک زبان گاوی حذف و امعا و احشا ماهیان تخلیه شدند. از هر ماهی دو عدد فیله تهیه گردید و با آب سرد شست‌وشو داده شدند. سپس نمونه‌های ماهی به ۳ گروه تقسیم شدند. گروه ۱: فیله ماهی در آب مقطر استریل در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شدند و در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (نمونه شاهد). گروه ۲: فیله ماهی در اسید استیک ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور می‌شوند و نمونه‌ها در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شوند. گروه ۳: فیله‌ها در محلول نانوکیتوزان ۲٪ به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور می‌شوند سپس در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. به ازای هر تیمار سه تکرار برای هر دوره زمانی در نظر گرفته شد. همه گروه‌ها در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد تا ۱۶ روز نگه‌داری شدند و هر سه روز آنالیزهای فیزیکوشیمیایی، میکروبی و ارزیابی حسی اندازه‌گیری شدند.

تبدیل کیتوزان به نانوکیتوزان

تبدیل کیتوزان به نانوکیتوزان به روش ژلاسیون یونوتروپیک و با محلول تری پلی فسفات سدیم انجام پذیرفت. به‌طور مختصر، کیتوزان ۲٪ با وزن مولکولی متوسط و ویسکوزیته cp ۸۰۰-۲۰۰ در اسید استیک ۱٪ حل شد. محلول تری پلی فسفات با غلظت ۲٪ در آب حل شد سپس mL۴ از آن به محلول کیتوزان mL ۱۰۰ اضافه شد. محلول به مدت ۶۰ دقیقه با مگنت در دمای اتاق حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه سونیکیشن (Model 300VT, 115 V, 60Hz, VA, USA) در kW ۱/۵ برای تجزیه‌ی بیشتر مورداستفاده قرار گرفت (۱۳). اندازه‌ی ذرات با استفاده از دستگاه زتا سایزر (Malvern Instruments, Nano-ZS-90, Malvern, UK) اندازه‌گیری شد.

آزمون میکروبی نمونه‌ها

اندازه‌گیری بار باکتریایی کل نمونه‌ها، با هموژن کردن g ۱۰ نمونه در mL ۹۰ محلول ۰/۹٪ کلرید سدیم در شرایط استریل انجام شد. از این محلول جهت تهیه رقت‌های متوالی استفاده گردید. کشت باکتریایی موردنظر با ریختن میزان مشخصی از نسبت‌های به‌دست آمده در پلیت‌های یک‌بارمصرف استریل و ریختن محیط کشت آگار بر آن صورت گرفت. برای شمارش کلنی‌های باکتریایی کل پلیت‌های تهیه‌شده به مدت دو روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. شمارش کلنی‌ها بر مبنای log10 cfu/g بیان گردید (۱۶).

اندازه‌گیری بازهای ازته فرار

اندازه‌گیری بازهای ازته فرار به روش کلدال و با تیتراسیون عصاره به‌دست‌آمده از آن انجام گرفت. بدین منظور ۱۰ نمونه به همراه g ۲ اکسید منیزیم با افزودن mL ۵۰۰ آب مقطر به بالن کلدال متصل شد و عصاره موردنظر به محلول متشکل از اسید بوریک ۲٪ و ۲-۱ قطره متیل رد به‌عنوان شاخص وارد شد. محلول زردرنگ حاصله با اسیدسولفوریک تا حاصل شدن رنگ ارغوانی تیتر شد و به‌صورت میلی‌گرم نیتروژن در g ۱۰۰ نمونه ماهی بیان شد (۵). میزان بازهای ازته فرار طبق گولاس و کونتومیناس (۲۰۰۵) از رابطه زیر محاسبه گردید:

بازهای ازته فرار= حجم اسیدسولفوریک مصرفی ×۱۴

اندازه‌گیری تیوباربیتوریک اسید

شاخص تیوباربیتوریک اسید طبق روش سیریپاترون و نوفیا در سال ۲۰۰۰ اندازه‌گیری شد (۱۷). بدین‌صورت که دستگاه تقطیر با افزودن g ۱۰ نمونه ماهی هموژن شده با mL 5/97 آب مقطر و mL 2/5 اسیدکلریدریک N 4 به همراه چند قطره ضد کف و سنگ جوش در ارلن راه‌اندازی گردید. mL 5 از مایع حاصل از تقطیر این مخلوط را به mL 4 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 گرفت. سپس میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتری (ساخت شرکت یونیک امریکا uv-331) در طول‌موج nm ۵۳۸ اندازه‌گیری شد. طبق رابطه زیر، میزان تیوباربیتوریک اسید به دست آمد. میزان تیوباربیتوریک اسید به‌صورت mg MDA Eq/kg نمونه بیان شد (۱۷).

آنالیز آماری

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) آنالیز شدند. تمامی پارامترهای مورد مطالعه بین گروه‌های کنترل و تیمار با استفاده از ANOVA یکطرفه مقایسه شدند. داده‌های پردازش شده به شکل میانگین± انحراف معیار نمایش داده شد. همچنین داده‌ها در سطح احتمال ۵ درصد ($p<0/05$) مورد بررسی قرار گرفتند.

TBAvalue =Abs538 8/7

اندازه‌گیری تری متیل آمین

برای اندازه‌گیری تری متیل آمین از روش AOAC (۱۹۹۰) (۲) استفاده شد. جهت تهیه عصاره بافت ماهی g ۱۰ از عضله ماهی را وزن کرده و با mL۳۰ از ماده‌تری کلرواستیک اسید ۷/۵٪ مخلوط کرده و سپس با دستگاه هموژنایزر (T 10 basic ULTRA-TURRAX®, IKA, Staufen, Germany) به مدت دو دقیقه یکنواخت گردیده تا محلول شیری‌رنگ حاصل شود. در مرحله بعد بافت یک نواخت شده در سرعت ۲۵۰۰ دور و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مواد جامد ته‌نشین شده و محلول فوقانی که شفاف است، به‌عنوان عصاره بافت عضله ماهی مورداستفاده قرار گرفت. به‌منظور تهیه محلول‌های استاندارد، به ترتیب ۱،۲ و ۳ mL

از محلول استاندارد TMA (working solution)، با آب مقطر به ۴ mL رسانده و سپس با تعیین میزان جذب نور منحنی استاندارد رسم شد. در این آزمایش یک لوله به‌عنوان شاهد نیز در نظر گرفته شد. با تعیین میزان جذب نور در نمونه مجهول و با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده میزان تری متیل آمین در عضله ماهی محاسبه شد.

ارزیابی حسی

ارزیابی نمونه‌ها از سوی ۱۰ نفر گروه پانل ارزیاب آموزش‌دیده در گروه‌های سنی ۲۵ تا ۲۷ سال انجام پذیرفت. ۱/۵٪ نمک به نمونه‌های ماهی اضافه گردید. نمونه‌های ماهی در داخل فویل آلومینیوم، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سانتی گراد بخارپز شدند. طعم و بو نمونه‌ها با مقیاس هدونیک (Hedonic) با اندکی تغییر با اصطلاحات توصیفی زیر رتبه‌بندی شدند: طعم (۵، مطلوب، ۱، کاملاً نامطلوب) و بو (۵، مطبوع، ۱، کاملاً نامطبوع) (۱۱).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست‌آمده در این تحقیق به‌وسیله نرم‌افزار SPSS16 و با آزمون واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) بررسی‌شده و نتایج به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد (Standard Error) بیان شد. برای انجام مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵٪ استفاده گردید.

نتایج

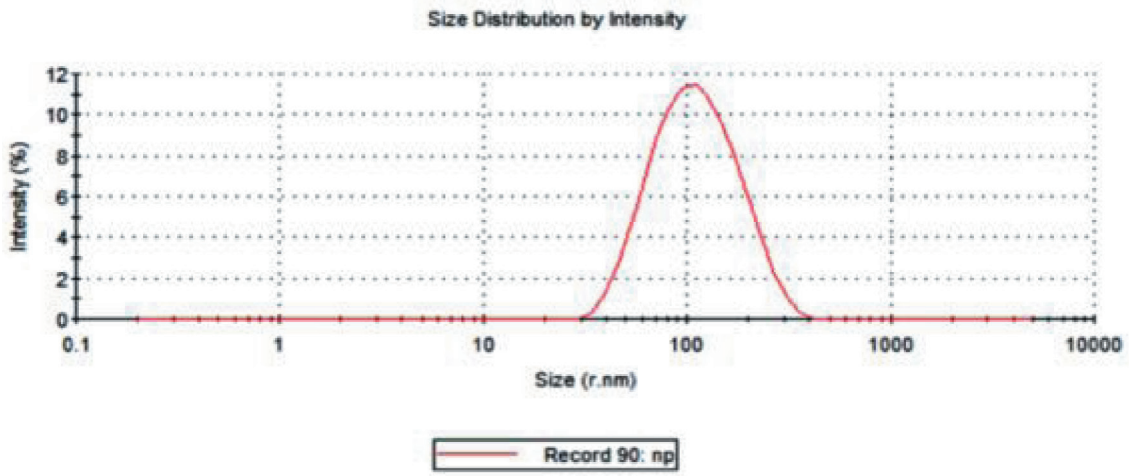
مشخصات توزیع اندازه نانو ذرات کیتوزان در شکل ۱ نشان داده شده است. نانو ذرات کیتوزان دارای عرض ۵۷/۶۸ نانومتر و سایز ذرات آن ۱۲۰/۳ نانومتر است که در شکل نشان داده شده است.

تغییرات بار باکتریایی کل (log 10 cfu/g) نمونه‌ها طی نگه‌داری در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد

جدول ۱ تعداد باکتری‌های کل تیمارهای مختلف ماهی کفشک زبان گاوی نگه‌داری شده در دمای فرا سرما (دمای ۳- درجه سانتی‌گراد) طی دوره نگه‌داری ۱۶ روز را نشان می‌دهد. تعداد باکتری‌های کل با افزایش دوره‌ی نگه‌داری در تیمارهای مختلف به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$). تعداد باکتری‌های بار باکتریایی کل در روز صفر بین ۲/۳۱ تا ۲/۸۳ Log cfu/g متغیر بود. بیشترین میزان باکتری‌های کل در روز شانزدهم متعلق به تیمار شاهد (۶/۱۳ Log cfu/g) و کمترین میزان متعلق به تیمار نانوکیتوزان (۳/۳۰ Log cfu/g) بود. میزان بار باکتریایی کل در فیله‌های غوطه‌ور شده در نانوکیتوزان در مقایسه با سایر تیمارها با سرعت کمتری افزایش یافت.

تغییرات بازهای ازته فرار (mg نیتروژن در ۱۰۰g بافت) نمونه‌ها طی نگه‌داری در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد

جدول ۲ تغییرات میزان بازهای ازته فرار (mg نیتروژن در ۱۰۰g بافت) تیمارهای مختلف ماهی کفشک زبان گاوی نگه‌داری شده در دمای فرا سرما (دمای ۳- درجه سانتی‌گراد) طی دوره نگه‌داری ۱۶ روز را نشان می‌دهد. میزان بازهای ازته فرار تیمارهای مختلف در طی دوره نگه‌داری روند افزایشی داشت ($p<0/05$). میزان بازهای ازته فرار در روز صفر از ۷/۰۰ تا ۱۰/۸۰ mg نیتروژن در ۱۰۰ g بافت متغیر بود. کمترین میزان بازهای ازته فرار متعلق به تیمار نانو کیتوزان (۱۳/۳۰ mg نیتروژن در ۱۰۰ g بافت) و بیشترین میزان متعلق به نمونه شاهد بود (۳۵ mg نیتروژن در ۱۰۰ g بافت). به‌طورکلی میزان بازهای ازته فرار در نمونه‌های



شکل ۱- نمودار اندازه ذرات نانو کیتوزان اندازه گیری شده با زتا سایزر (Zeta Sizer)

نانوکیتوزان با سرعت کمتری افزایش یافت.

تغییرات میزان تیوباربیتوریک (mg MDA Eq/kg) اسید نمونه‌ها طی نگه‌داری در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد

در جدول ۳ تغییرات میزان تیوباربیوتوریک اسید (mg MDA Eq/kg) تیمارهای مختلف ماهی کفشک زبان گاوی نگه‌داری شده در دمای فرا سرما (دمای ۳- درجه سانتی‌گراد) طی دوره نگه‌داری ۱۶ روز را نشان می‌دهد. میزان تیوباربیتوریک اسید در روز صفر از ۰/۱۱ تا ۰/۱۹ mg MDA Eq/kg متغیر بود. نتایج نشان داد میزان تیوباربیتوریک اسید در تیمارهای مختلف طی افزایش دوره‌ی نگه‌داری افزایش یافت. کمترین میزان تیوباربیتوریک اسید، متعلق به فیله‌های غوطه‌ور شده در نانوکیتوزان (۰/۲۷ میلی‌گرم مالون آلدهید اکی والان بر کیلوگرم) و بیشترین میزان تیوباربیتوریک اسید در نمونه شاهد (۰ /۵۸ mg MDA Eq/kg) مشاهده شد. میزان تیوباربیتوریک اسید در فیله‌های غوطه‌ور شده با نانوکیتوزان با افزایش دوره‌ی نگه‌داری به میزان کمتری افزایش یافت.

تغییرات تری متیل آمین(mg بر ۱۰۰g نمونه) نمونه‌ها طی نگه‌داری در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد

در جدول ۴ تغییرات میزان تری متیل آمین تیمارهای مختلف ماهی کفشک زبان گاوی نگه‌داری شده در دمای فرا سرما (دمای ۳- درجه سانتی‌گراد) طی دوره نگه‌داری ۱۶ روز را نشان می‌دهد. میزان تری متیل آمین اکساید در طول دوره نگه‌داری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$). میزان تری متیل آمین اکساید درروز صفر از ۲/۳۱ تا ۷/۶۲ متغیر بود. بیشترین میزان تری متیل آمین متعلق به نمونه‌های غوطه‌ور شده در اسید استیک (۱۲/۹۳) و کمترین میزان را نمونه‌های غوطه‌ور شده در نانوکیتوزان (۶/۲۹) داشتند.

جدول ۱- میزان بار باکتریایی کل (log ۱۰ cfu/g) تیمارهای مختلف ماهی کفشک زبان گاوی در طول نگه‌داری در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد طی ۱۶ روز

تیمارها	دوره‌ی نگه‌داری (روز)				
	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
کنترل	۲/۸۳±۰/۰۱Ae	۳/۲۸±۰/۰۷Ad	۴/۵۵±۰/۰۲Ac	۵/۴۱±۰/۰۸Ab	۶/۱۳±۰/۰۷ Aa
اسیداستیک	۲/۶۱±۰/۰۲Bd	۲/۹۵±۰/۰۲Bd	۳/۵۰±۰/۱۴Bc	۴/۶۱±۰/۰۶Bb	۵/۰۹±۰/۲۵Ba
نانوکیتوزان	۲/۳۱±۰/۰۴Cc	۲/۵۲±۰/۰۷Cb	۲/۷۰±۰/۰۱Db	۳/۱۳±۰/۰۴Da	۳/۳۰±۰/ ۱Da

حروف غیر هم نام بزرگ در هر ستون نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف و حروف غیر هم نام کوچک درهر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در روزهای مختلف است.

جدول ۲- میزان بازهای ازته فرار (mg نیتروژن در ۱۰۰g بافت) تیمارهای ماهی کفشک زبان گاوی در طول نگه‌داری در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد طی ۱۶ روز

تیمارها	دوره‌ی نگه‌داری (روز)				
	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
کنترل	۸/۴±۰/۸Be	۱۱/۲±۰/۸Ad	۲۰/۲±۰/۴Ac	۲۵/۹±۱/۲۱Ad	۳/۵۰۰±۰/۸Ae
اسیداستیک	۱۰/۸±۰/۸۷Ac	۹/۸±۰/۸ABc	۱۶/۷±۰/۸۶Bb	۱۹/۴۰±۰/۲Ba	۲۱/۶±۰/۲۶Ba
نانوکیتوزان	۷/۰±۰/۸Bb	۷/۷±۰/۴Bb	۱۱/۹±۰/۴Ca	۱۲/۶±۰/۸Da	۱۳/۳۰±۰/۴Da

حروف غیر هم نام بزرگ در هر ستون نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف و حروف غیر هم نام کوچک درهر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در روزهای مختلف است.

خواص حسی ماهی خام نگه‌داری شده در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد

در جدول ۵ نتایج ارزیابی حسی ماهی خام طی نگه‌داری در یخچال به مدت ۱۶ روز نشان داده‌شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود ویژگی بو و طعم و تمامی تیمارها و نمونه شاهد با گذشت زمان کاسته شد. در مورد ویژگی‌های حسی بو و طعم اندازه‌گیری شده، نمونه‌های دارای پوشش نانوکیتوزان به‌طور معنی‌دار بهتر از نمونه شاهد بود به‌طوری‌که نمونه‌های شاهد در روز ۴، نمونه غوطه‌ور شده در اسید استیک در روز ۸ و نمونه‌های دارای پوشش نانوکیتوزان در روز ۱۲ به امتیاز کمتر از ۴ رسیدند.

بحث

نتایج آزمون میکروبی نشان داد که فیله‌هایی که با پوشش خوراکی نانوکیتوزان بسته بندی شدند در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری (P□۰/۰۵) کمتر بودند که علت آن ممکن است خاصیت آنتی‌میکروبی پوشش و ممانعت از رسیدن مواد غذایی نظیر مواد آمینی به غشای سلولی باکتری و اتصال ترکیبات فنولی عصاره چای سبز با پروتئین‌ها در دیواره سلول میکروارگانیسم‌ها که منجر به لیز شدن دیواره سلول می‌گردد، باشد (۹). در این پژوهش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد در هیچ کدام از تیمارها از حد مجاز تجاوز نکرد و مقدار شاخص باکتری مزوفیل در همه تیمارها تا مقدار پایان دوره نگهداری قابل قبول بود. برخلاف کیتوزان و مشتقات آن، مطالعات درباره خواص آنتی‌میکروبی نانو ذرات کیتوزان هنوز هم محدود است (۱۲) به طور تجربی فعالیت ضد باکتری نانو ذرات کیتوزان در برابر اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم نسبت به کیتوزان را گزارش کردند که احتمالا به دلیل سطح بزرگتر نانو ذرات و میل ترکیبی بیشتر با سلول باکتری، که بازده اثر کوانتومی ذرات می‌باشد (۳) گزارش کردند که نانو ذرات سدیم لود شده با یونهای مختلف فلزی فعالیت ضد میکروبی بالاتری را در برابر اشرشیاکلی، سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند. اجاق و همکاران (۲۰۱۰) و رمضانی و همکاران (۲۰۱۵) نیز در مطالعات خود کاهش بار باکتریایی سطح گوشت ماهی را نشان دادند (۱۱). زارعی و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که میزان باکتری‌های مزوفیل در فیله ماهی

جدول ۳- میزان تیوباربیتوریک اسید (mg MDA Eq/kg) تیمارهای ماهی کفشک زبان گاوی در طول نگه‌داری در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد طی ۱۶

تیمارها	دوره‌ی نگه‌داری (روز)				
	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
کنترل	۰/۱۹±۰/۰۶ABc	۰/۲۷±۰/۰۲Bc	۰/۵۸±۰/۰۶Aa	۰/۷۴±۰/۰۲Aa	۰/۵۸±۰/۰۲Bb
اسیداستیک	۰/۱۱±۰/۰۲Bc	۰/۴۶±۰/۰۸Ab	۰/۷۰±۰/۰۴Aa	۰/۶۶±۰/۰۲Aa	۰/۶۶±۰/۰۲Aa
نانوکیتوزان	۰/۱۵±۰/۰۴ABb	۰/۱۱±۰/۰۲Bb	۰/۳۰±۰/۰۳Ba	۰/۳۱±۰/۰۴Ba	۰/۲۷±۰/۰۲Da

حروف غیر هم نام بزرگ در هر ستون نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف و حروف غیر هم نام کوچک درهر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در روزهای مختلف است.

جدول ۴- میزان تری متیل آمین (mg بر ۱۰۰g نمونه) کل تیمارهای مختلف ماهی کفشک زبان گاوی در طول نگه‌داری در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد طی ۱۶ روز

تیمارها	دوره‌ی نگه‌داری (روز)				
	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
کنترل	۲/۳۲±۰/۵۱Bd	۴/۵۲±۰/۷۶Bc	۷/۶۲±۰/۵۱ABb	۸/۸۱±۰/۳۳Bb	۱۰/۷۲±۰/۲۵Ba
اسیداستیک	۷/۶۲±۰/۵۱Ac	۸/۰۶±۰/۲۵Ac	۸/۹۵±۰/۲۵Ac	۱۱/۱۲±۰/۵۳Ab	۱۲/۹۳±۰/۵۱Aa
نانوکیتوزان	۲/۳۱±۰/۵۱Bd	۳/۶۴±۰/۲۵Bcd	۴/۵۲±۰/۷۶Ccb	۵/۴۱±۰/۲۵Dab	۶/۲۹±۰/۲۵Da

حروف غیر هم نام بزرگ در هر ستون نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف و حروف غیر هم نام کوچک درهر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در روزهای مختلف است.

کپور نقره‌ای (*Silver carp*) در طول دوره نگه‌داری در همه‌ی تیمارها افزایش یافت و در انتهای دوره‌ی نگه‌داری میزان باکتری‌های مزوفیل در تیمار کنترل و اسید استیک در مقایسه با تیمارهای دارای پوشش خوراکی کیتوزان و نانوکیتوزان به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P□۰/۰۵) (۲۰). بازهای ازته فرار یک شاخص کیفی است که نشانگر میزان فساد، تجزیه و شکستن پروتئین‌ها است و به‌واسطه فعالیت باکتریایی و آنزیم‌های درونی خود ماهی افزایش می‌یابد. سوخت‌وساز 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 بدطعمی ماهی می‌گردند (۱۰). میزان ۲۵ میلی گرم نیتروژن به ازای ۱۰۰گرم نمونه گوشت (۷) به عنوان حداکثر میزان قابل قبول بازهای ازته فرار در گوشت ماهی پیشنهاد شده است. در بررسی حاضر باگذشت زمان میزان بازهای ازته فرار در فیله‌های نگه‌داری شده در دمای فرا سرما در کلیه گروه‌ها افزایش یافت، اما این افزایش در تیمارهای حاوی نانوکیتوزان به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای کنترل بود (P□۰/۰۵). به‌طوری‌که پس از ۱۶ روز نگه‌داری نمونه‌های غوطه‌ور شده در نانوکیتوزان به ترتیب، ۱۳/۳۰ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰g بافت بود که نسبت به نمونه شاهد (۳۵ mg نیتروژن در g ۱۰۰) و نمونه‌های غوطه‌ور شده در اسید استیک (۲۱/۶ mg نیتروژن در g ۱۰۰) به‌طور معنی‌داری کمتر بود (P□۰/۰۵). این مسأله به دلیل اثرات ضد باکتریایی این ترکیبات و درنتیجه تولید کمتر بازهای ازته فرار ناشی از تجزیه پروتئینی بافت است. مقادیر بیشتر بار باکتریایی مشاهده شده در نمونه‌های شاهد می‌تواند توجیهی برای افزایش میزان بازهای نیتروژنی در آنها باشد. با این حال میزان افزایش TVB-N در تیمارهای پوشش داده شده به طور قابل توجهی نسبت به نمونه شاهد کندتر بود که دلیل آن می‌تواند به خواص آنتی میکروبی پوشش (۱۱) که بصورت ماده ضدمیکروبی عمل کرده و بر میزان بازهای ازته فرارتاثیر می گذارد باشد. میزان این شاخص در تیمار حاوی پوشش نانوکیتوزان کمتر بوده که میتواند به فعالیت آنتی میکروبیال بالای نانوکیتوزان دانست به طوری که رمضانی و همکاران (۲۰۱۵) در تیمارهای پوشش داده شده با کیتوزان و نانوکیتوزان کپور نقره‌ای (*Hypophthalmicthys molitrix*) نتایج مشابهی را به دست آوردند (۱۳).

به منظور ارزیابی درجه‌ی اکسیداسیون لیپید در ماهی به طور وسیعی از شاخص TBA استفاده می‌شود که میزان محصولات ثانویه‌ی اکسیداسیون به ویژه آلدهیدها را نشان می‌دهد. اکسیداسیون چربی‌ها بر اساس مقدار مالون دی آلدهید (MDA) است. مقدار این شاخص در حدود ۱-۲ میلی گرم مالون آلدهید در کیلوگرم نمونه (۵)، به عنوان حد محدودکننده قابلیت پذیرش برای مصرف کننده، به دلیل بو و طعم نامطلوب آن می‌باشد. 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 اکیوالان بر کیلوگرم نمونه است در حالی که تا ۸ میلی‌گرم مالون آلدهید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه هم قابل مصرف است (۱۶). در پژوهش حاضر، میزان TBA در طی زمان نگهداری به طور معنی‌داری در نمونه‌ی شاهد نسبت به نمونه‌های تیمار افزایش

جدول ۵-میزان خواص حسی طعم و بوتیمارهای مختلف ماهی کفشک زبان گاوی در طول نگه‌داری در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد طی ۱۶ روز

طعم	دوره‌ی نگه‌داری (روز)				
تیمارها	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
کنترل	۵/۰۰±۰/۰۰ Aa	۳/۸۵±۰/۱۷Ab	۳/۵۰±۰/۲۲Bbc	۳/۲۸±۰/۴۶Bc	۲/۷۱±۰/۱۶Cd
اسیداستیک	۵/۰۰±۰/۰۰ Aa	۴/۱۴±۰/۱۷ABb	۳/۶۴±۰/۱۹Bc	۳/۳۵±۰/۱۹Bc	۲/۸۵±۰/۱۴Bc
نانوکیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰ Aa	۴/۵۰±۰/۱۳Ab	۴/۲۸±۰/۲۲Ab	۴/۰۰±۰/۱۸Abc	۳/۵۷±۰/۲۰Ac
بو	دوره‌ی نگه‌داری (روز)				
تیمارها	۰	۴	۸	۱۲	۱۶
کنترل	۵/۰۰±۰/۰۰ Aa	۳/۸۵±۰/۰۹Cb	۳/۷۸±۰/۱۱Bb	۳/۳۵±۰/۱۳Ac	۲/۵۷±۰/۱۳Bd
اسیداستیک	۵/۰۰±۰/۰۰ Aa	۴/۲۸±۰/۱۲Bb	۳/۸۵±۰/۱۴Bc	۳/۴۲±۰/۱۳Ad	۲/۴۶±۰/۱۴Be
نانوکیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰ Aa	۴/۷۱±۰/۱۲Aab	۴/۳۵±۰/۱۹Ab	۳/۷۸±۰/۲۱Ac	۳/۳۵±۰/۱۳Ac

حروف غیر هم نام بزرگ در هر ستون نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف و حروف غیر هم نام کوچک درهر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در روزهای مختلف است.

یافت، به طوری که این مقدار در نمونه‌ی شاهدو اسید استیک در پایان دوره‌ی نگهداری به ترتیب به ۰/۵۸ و ۰/۶۶ میلی گرم مالون آلدهید در کیلوگرم بافت ماهی رسید که تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) را نسبت به تیمارهای حاوی پوشش نشان داد که می‌تواند ناشی از شکست و تجزیه مالون آلدهید به سایر مواد (آلدهیدها و کتون‌ها) باشد (۱۹). زارعی و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیقی که با عنوان اثرات پوششی عصاره پوست انار و پرتقال به همراه نانو کیتوزان برکیفیت فیله ماهی کپور نقره‌ای نگهداری شده در شرایط یخچال انجام دادند که کاهش میزان مواد واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید و کاهش میزان اکسیداسیون چربی‌ها را نشان دادند (۲۰). اعتقاد بر این است که استفاده از نانوذرات کیتوزان باعث حفظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله اثر کلات‌های فلزات یونی و/ یا ترکیبی با چربی‌های گوشت در طول ذخیره‌سازی شود. زیرا با توجه به اندازه کوچک ذرات و سطح بالاتری در واحد حجم، نانو ذرات کیتوزان اثر کاهنده رادیکال‌های OH را نسبت به کیتوزان بهبود می‌بخشد (۲۱).

تری متیل آمین بخشی از ترکیبات بازی فرار است که از تجزیه تری متیل آمین اکساید موجود در گوشت ماهیان توسط فعالیت آنزیمی باکتریایی تولید می‌شود. رگنستین در سال ۱۹۹۱ مقدار مجاز تری متیل آمین را ۶-۸ mg تری متیل آمین در ۱۰۰ g نمونه برای ماهی عنوان کردند (۱۴)، درحالی‌که تسکردزیک و پفیفر (۱۹۸۷) مقدار ۱۰ mg تری متیل آمین در ۱۰۰ g نمونه را به‌عنوان حد مجاز این شاخص برای ماهی پیشنهاد کردند (۱۸). در پژوهش حاضر میزان تری متیل آمین در روز ۱۶ نگه‌داری برای همه نمونه‌ها به‌جز نمونه‌های غوطه‌ور شده در نانو کیتوزان از حد مجاز تعیین‌شده عبور کرد. کمترین میزان تری متیل آمین متعلق به نمونه‌های غوطه‌ور شده در نانوکیتوزان (۶/۲۹ mg تری متیل آمین در ۱۰۰ g نمونه) مشاهده شد. در روز ۱۶ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد (p<۰/۰۵) و بیشترین میزان تری متیل آمین در نمونه‌های غوطه‌ور شده اسید استیک مشاهده شد (۱۲/۹۳ mg تری متیل آمین در ۱۰۰ g نمونه).

حد نهایی مطلوبیت برای نمونه‌های ماهی جهت مصرف انسانی تا امتیاز ۴ در نظر گرفته شد. طعم و بو در نمونه‌های حاوی پوشش نانوکیتوزان در روزهای ۱۲ و ۸، امتیاز حسی کمتر از حد مجاز بودند و این مربوط به خصوصیات خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی پوشش نانوکیتوزان میباشد. زارعی و همکاران (۲۰۱۵) و رمضانی همکاران (۲۰۱۵) نتایج مشابهی را نشان دادند که می‌توان به خصوصیات میکروبی و فیزیکوشیمیایی بالای ذرات نانوکیتوزان نسبت داد که باعث حفظ کیفیت و ماندگاری بیشتر نمونه ماهی می‌شود (۱۳، ۲۰).

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، میزان تیوباربیتوریک اسید و اسیدهای چرب آزاد در فیله‌های بسته‌بندی شده با نانوکیتوزان در مقایسه با دو گروه دیگر پایین‌تر بود که این حاکی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوکیتوزان در بسته‌بندی ماهی دارد. میزان بازهای ازته فرار و تری متیل آمین در نمونه‌های فیله بسته‌بندی شده در نانوکیتوزان پایین ترین مقدار را داشت که با تعداد باکتری‌های کل همخوانی داشت. کاهش معنی‌دار میزان بار باکتری‌های کل در نانوکیتوزان حاکی از فعالین آنتی‌میکروبی آن می‌باشد. لذا استفاده از نانوکیتوزان می‌تواند به حفظ اسیدهای چرب ارزشمند موجود در چربی ماهی، همچنین کند شدن رشد باکتری و بهبود خواص حسی ماهی کفشک زبان گاوی طی زمان نگهداری شود.

منابع مورد استفاده

1- AOAC. 1990. Methods of Analysis (15th ed.). Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.

2- Arashisara, S., O, Hisara., M, Kay and T. Yanik. 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.

3- Du, W.L., S.S. Niu, Y.L. Xu, Z.R. Xu and C.L. Fan. 2009. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers*, 75, 385-389.

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

5- Goulas, A.E and M.G, Kontominas. 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.

6- Jeon, Y. J., J.Y.V.A. Kamil and F. Shahidi. 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5167-5178.

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

8- Muller, R.H., C. Jacobs and O. Kayser. 2001. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47: 3-19.

9- Nirmal, N.P and S. Benjakul. 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.

10- No, H.K., N.Y. Park, S.H. Lee and S.P. Meyers. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology* 74: 65-72.

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

12- Qi, L.F., Z.R. Xu., X, Jiang., C.H. Hu and X.F. Zou. 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* 339: 2693-2700.

13- Ramezani, Z., M. Zarei and N. Raminnejad. 2015. Comparing the effectiveness of chitosan and nanochitosan coatings on the quality of refrigerated silver carp fillets. *Food Control* 51: 43-48.

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

15- Sadeghi, A.M.M., F.A, Dorkoosh., M.R. Avadi., P. Saadat., M. Rafiee-Tehrani and H.E. Junginger. 2008. Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. *International Journal of Pharmaceutics* 355: 299-306.

16- 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.

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

18- Teskeredzic, Z. and K. Pfeifer. 1987. Determining the degree of freshness of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) cultured in brackish water. *Journal of Food Science* 52: 1101–1102.

19- Woyewoda, A.D., S.J. Shaw, P.J. Ke and B.G. Burns. 1986. Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. Canadian Technical Report of Fish and Aquatic Science, 1448p.

20- Zarei, M., Z. Ramezani, S. Ein-Tavasoly and M. Chadorbaf. 2015. Coating effects of orange and pomegranate peel extracts combined with chitosan nanoparticles on the quality of refrigerated silver carp fillets. *Journal of Food Processing and Preservation* 39: 2180-2187.

21- Zhang, Y., Y. Yang, K. Tang, X. Hu and G. Zou. 2008. Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* 107: 891–897.