تأثیر پوشش نگهدارنده خوراکی کیتوزان حاوی اسانس مرزنجوش (Origanum vulgare L.) بر ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Oncorhynchus mykiss) در یخچال

سمیرا جدی[1]، سکینه یگانه*[2]، سید علی جعفرپور[2]، محمود ناصری[3]

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ، ساری، ایران

۲- دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ، ساری، ایران

۳- دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ، شیراز، ایرن

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۰۳

چکیده

به‌منظور افزایش کیفیت و ماندگاری مواد غذایی روش‌های مختلفی در صنایع غذایی به کار می‌رود، در این تحقیق اثر پوشش نگهدارنده خوراکی کیتوزان و اسانس مرزنجوش بر شاخص‌های شیمیایی و میکروبی فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور، محلول آبی کیتوزان ۲ درصد در دو تیمار فاقد اسانس مرزنجوش و ۰/۵ درصد اسانس آماده شده و نمونه‌های فیله در محلول‌های تهیه شده غوطه‌ور شده و سپس در دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. فیله-های بدون محافظ (شاهد) و فیله‌های دارای پوشش با فاصله زمانی ۷ روزه (روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) مورد آزمایش‌های شیمیایی (TVN ,TBA ,PV) و میکروبی (باکتری‌های سرماگرا و سودوموناس‌ها) قرار گرفتند. در بررسی نتایج مشخص شد که نمونه‌های پوششی کیتوزان دارای اسانس مرزنجوش، بار باکتریایی و شاخص‌های فسادی کمتری را نشان داده و اثر بازدارندگی بهتری نشان دادند و بعد از آن تیمار پوششی ۲ درصد کیتوزان قرار داشت. با توجه به نتایج این تحقیق به دلیل محدودیت استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و تمایل مصرف‌کنندگان به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توان ۰/۵ درصد اسانس مرزنجوش را به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان موثر همراه با پوشش کیتوزان جهت افزایش ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای ۴ درجه سانتی-گراد معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی:قزل‌آلای رنگین‌کمان، کیتوزان، اسانس مرزنجوش، ماندگاری

*مسوول مکاتبات: skyeganeh@gmail.com

۱-مقدمه

منابع پروتئین دریایی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اقلام تأمین‌کننده پروتئین حیوانی در سبد غذایی ملت‌ها، سابقه بس طولانی دارد. گوشت ماهی با دارابودن اسیدهای چرب غیراشباع نوع امگا- ۳ و همچنین اسیدهای آمینه ضروری باقابلیت هضم بالا، کلسیم، فسفر و ویتامین‌های محلول در چربی، منبع غذایی سالمی در رژیم غذایی جوامع شهری محسوب می‌شود. قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای ارزش غذایی بالایی بوده و تولید آن از دهه ۱۹۵۰ به‌طور تصاعدی در سراسر دنیا، افزایش‌یافته است. بر اساس سالنامه آماری سازمان شیلات ایران میزان تولید این ماهی به بیش از ۱۳۱۰۰۰ تن در سال ۱۳۹۱و به ۱۴۰۰۰۰ تن در سال ۱۳۹۲ در کشور رسیده است(۱). ازآنجایی‌که محصولات غذایی درمناطقی دورتر از محل تولیدشان به فروش می‌رسند، لازم است که عمر ماندگاری این محصولات افزایش یابد(۱۰).برای افزایش ماندگاری مواد غذایی روش‌های سنتی مختلفی در صنایع غذایی بکار می‌رود، برای مثال نگهداری در سرما و یا به صورت منجمد روش مناسبی برای نگهداری ماهیان است، اما نمی‌تواند به‌طور کامل مانع واکنش‌های میکروبی و شیمیایی که منجر به کاهش کیفیت ماهی می‌شوند، گردد (۱۷). ترکیبات فرار حاصل از اکسیداسیون و واکنش هیدرولیتیک چربی‌ها (هیدروپراکسیدها، آلدئیدها، کتون‌ها، اسیدهای چرب و...) مشخصات بو، طعم، رنگ، بافت، ارزش غذایی و به‌طورکلی کیفیت ماهی را دستخوش تغییر می‌کنند و باعث عدم مطلوبیت برای مصرف‌کنندگان می‌شوند (۲۳). از این رو برای بهبود کیفیت و افزایش ماندگاری این فرآورده‌ها در مدت نگهداری، به‌طور متداول، آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند هیدروکسی‌آنیزول‌بوتیله[1] و هیدروکسی تولوئن بوتیله[2] عوامل کلاته‌کننده و ترکیبات ضدمیکروبی مورداستفاده قرار می‌گیرند (۱۷).اما امروزه با توجه به وجود عوارض استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعیواثرات نامطلوب آن‌ها مانندا‌ثر جهش‌زایی، ایجاد مسمومیت و سرطان‌زایی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند ترکیبات پلی‌فنل موجود در گیاهان که آثار محافظتی در برابر بیماری‌های مزمن، سرطان، بیماری‌های قلبی- عروقی و جهش‌زایی دارند، توصیه می‌شود (۲۵). ازآنجایی‌که مهم‌ترین دلیل فساد،رشد میکروبی روی سطح فرآورده غذاییاست،به کار بردن عوامل ضدمیکروبی در بسته‌بندی می‌تواند سبب به‌تأخیرانداختن یا حتی جلوگیری از رشدمیکروارگانیسم‌های عامل فساد شده و درنتیجه باعث افزایش مدت‌زمان ماندگاری و بهبود ایمنی فرآورده‌ی غذایی شود (۱۱).فیلم‌های ضدمیکروبی می‌توانند مدت‌زمان ماندگاری غذا و سلامت آن را از طریق ممانعت رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد با افزایش فاز تأخیری و یا کاهش سرعت رشد آن‌ها، افزایش دهند. از طرفی قابلیت فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی برای کندکردن نفوذ رطوبت، اکسیژن،مواد فرّار و محلول را می‌توان با افزودن موادی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها، مواد ضدمیکروبی، موادرنگی، طعم‌دهنده‌ها، ادویه‌ها و ... در ساختار فیلم، افزایش داد (۲). مبارزه با مشکل افزایش زباله‌های ناشی از مواد بسته‌بندی، اخیراً مطالعات در زمینه‌ی به‌کارگیری فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی که موادی زیست تخریب‌پذیر و سازگار با محیط‌زیست هستند را افزایش داده است (۲).کیتوزان یکی از بهترین زیست‌بسپارهایی است که تاکنون برای تهیه فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به‌کار رفته است. که از N- استیل- زدایی قلیایی جزیی کیتین به دست می‌آید، کیتین عموماً در اسکلت خارجی یا محافظ پوشش سخت‌پوستان دریایی یافت می‌شود، این ماده به‌عنوان یک منبع مهم تجدیدپذیر و دومین پلیمر زیستی طبیعی فراوان بعد از سلولز است (۳۸).در مولکول کیتوزان تعداد زیادی گروه‌های آمین و هیدروکسید وجود دارد. این ساختار منجر به توانایی بالقوه کیتوزان در تشکیل کمپکس‌های قوی با فلزات می‌شود (۴۳). توانایی کیتوزان در اتصال به یون‌های فلزی مانند مس، کروم، روی، وانادیوم و آهن به اثبات رسیده است (۲۴). کیتوزان به دلیل خواص تشکیل روکش و خواص منحصربه‌فرد افزایش ویسکوزیته به‌محض آبگیری، قابلیت

BHA

BHT

استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی به‌ویژه به‌عنوان پوشش و یا روکش خوراکی را دارا است. برای روکش‌های کیتوزان تعدادی از خواص کاربردی شامل: خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و نفوذناپذیری در برابر عبور اکسیژن گزارش‌شده است (۴۲). استفاده از اسانس‌های طبیعی به دلیل محتوای گروه‌هایی از ترکیبات پلی‌فنلیکه به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند، از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و موجب حفظ ویژگی‌های گوشت ماهی می‌شود.گیاه (Origanum vulgare L.) با نام مرزنجوش وحشی یا اروپایی که در ایران نیز پراکنش وسیعی یافته است، گیاهی معطر از خانواده‌ی نعناعیان (Labiatae) می‌باشد، که از دیرباز در غذاهای سنتی بعنوان عطر و طعم‌دهنده و در طب سنتی بعنوان گیاه دارویی پرخاصیت کاربرد فراوانی دارد. مطالعات محققان مختلف نشان داده است که اسانس این گیاه، دارای فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد اکسیدانی می‌باشد (۱۳، ۱۴، ۱۵). ترکیبات مؤثره‌ی موجود در اسانسمرزنجوش وحشی ترکیبات فنلی تیمول، کارواکرول، رزمارینیک‌اسید و ترپنوئیدهای تقویت‌کننده‌ی اثر آن‌ها ارتوسایمن، گاماترپینن و لینالول می‌باشد که محققان بیشترین عملکرد آنتی‌باکتریالی و آنتی‌اکسیدانی آن را به تیمول و کارواکرول نسبتداده‌اند (۱۲). اثر آنتی‌میکروبی اسانس این گیاه بر تعداد زیادی از باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های پاتوژنیک و مولد فساد در مواد غذایی به اثبات رسیده است(۹، ۲۷، ۳۵). مطالعاتی در ارتباط با تاثیر فیلم پوششی کیتوزان (۲، ۶، ۴۲، ۱۷، ۷، ۴۰) و اسانس‌های گیاهی مرزنجوش (۴۵)به‌طور مجزا در ماندگاری انواعی از ماهیان انجام شده است، اما تحقیقی در ارتباط استفاده از این دو به صورت مکمل انجام نشده است. لذا به منظور افزایش فرهنگ تازه‌خوری فرآورده‌های شیلاتی،هدف از این مطالعه بررسی کارآیی استفاده از پوشش نگهدارنده کیتوزان حاوی اسانس مرزنجوش در بهبود ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره نگهداری در یخچال می‌باشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- تهیه محلول کیتوزان و کیتوزان حاوی اسانس مرزنجوش

کیتوزان به شکل پودر(شرکت سیگما) تهیه شد و اسانس مرزنجوش از شرکت گیاه-اسانس گرگان خریداری شد. پس از تهیه محلول ۱٪ حجمی- حجمی اسیداستیک،۰/۲ گرم از کیتوزان با جرم مولکولی پائین به۱۰۰ سی‌سی محلول اسیداستیک یک درصد اضافه‌شده،سپس به‌تدریج ۲ گرم کیتوزان با جرم مولکولی بالا به محلول اسیداستیک در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد افزوده شد و عمل هم‌زدن به‌آرامی انجام شد تا کیتوزان به‌طور کامل حل شود. پس از ۳ ساعت کیتوزان در اسیداستیک حل‌شده و محلولی به رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ تشکیل گردید. در این مرحله گلیسرول به میزان ۱/۵ سی‌سی به‌عنوان نرم‌کننده افزوده شد، بعد از ۳۰ دقیقه محلول موردنظر به دلیل وجود ناخالصی با کاغذ واتمن ۳ تحت خلاء صاف گردید. قبل از افزودن اسانس، توئین ۸۰ به‌عنوان امولسی‌فایر به میزان ۰/۰۲ درصد به محلول کیتوزان اضافه شده و جهت پخش یکنواخت امولسی‌فایر درون محلول هم‌زدن تا ۳۰ دقیقه ادامه یافت.درنهایت محلول به‌عنوان فیلم پوشش‌دهنده مورداستفاده قرار گرفت (۳۳).محلول کیتوزان - مرزنجوش با افزودن مقدار ۰/۵ درصد از اسانس مرزنجوش به محلول پایه کیتوزان تهیه شد.

۲-۲- آماده‌سازی نمونه

ماهی قزل‌آلا با وزن حدود ۴۰۰-۵۵۰ گرم بعد از خرید از مزرعه پرورش قزل‌آلادر شیراز با جعبه‌های محتوی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. پس از سر و دم‌زنی و جداسازی پوست‌واستخوان در دمای اتاق از هر ماهی ۲ فیله تهیه شد. بخشی از فیله‌ها بدون محافظ (شاهد) و بخشی، با محلول کیتوزان ۲ درصد و محلول کیتوزان ۲ درصد و اسانس ۰/۵ درصد تیمار شده و به روش غوطه‌وری در محلول قرار داده شد، از محلول خارج‌شده و به مدت چند دقیقه در مجاورت هوا قرار گرفت تا فیلم نگهدارنده روی فیله تشکیل شود پس از شکل‌گیری پوششاز هر تیمار سه تکرار تهیه شد (۲). سپس نمونه‌ها دریخچال نگهداری شده و آزمایش‌های زیر

در فواصل زمانی صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز روی ماهی‌های تیمار و شاهد انجام گرفت.

۲-۳- آزمایش‌های شیمیایی

۲-۳-۱- اندازه‌گیری پراکسید (PV)[۳]

۱۵گرم از گوشت بدون استخوان ماهی خوب میکس شده، در دکانتور قرار داده شد، سپس ۶۰ سی‌سی کلروفرم (شارلو) و بعد ۶۰ سی‌سی متانول (مرک) به آن افزوده شد. پس از ۱۲-۲۴ ساعت، ۳۶ سی‌سی آب مقطر به نمونه افزوده شده و به مدت ۱-۲ ساعت استراحت داده شد تا ۳ فاز تشکیل شود. با دقت، ۲۰ سی‌سی از فاز پایین، درون ارلن انتقال یافته، ۲۵ سی‌سی اسیداستیک (Applichem) کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسیداستیک ۳:۲) به آن افزوده شد. سپس ۰/۵ سی‌سی محلول یدور پتاسیم (مرک) اشباع ، ۳۰ سی‌سی آب‌مقطر به محتویات ارلن اضافه شده، به مدت ۱ دقیقه استراحت داده شد و بعد مقدار ۰/۵ سی‌سی معرف نشاسته ۱٪ به آن افزوده شد و درب ارلن را گذاشته، محلول به شدت تکان داده شد. ید آزاد شده، باعث تغییر رنگ محلول شد که با محلول تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال (مرک)، تیتر شد (۱۶). سپس با استفاده از رابطه زیر، میزان پراکسید محاسبه گردید.

$$PV = \frac{\text{حجم مصرفی تیوسلفات} \times \text{نرمالیته} \times ۱۰۰}{\text{وزن نمونه روغن}}$$

۲-۳-۲- اندازه‌گیری تیوباربیتوریک اسید(TBA)[۴]

۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه گوشت میکس شده، به بالن ۲۵ سی-سی انتقال یافته، با ۱- بوتانول به حجم رسانده شد.۵ سی‌سی از این محلول به لوله فالکون خشک درب‌دار انتقال یافت و ۵ سی‌سی معرفTBA(که از انحلال ۲۰۰ میلی‌گرم پودر TBAدر ۱۰۰ سی‌سی حلال ۱-بوتانول و صاف‌کردن بوسیله کاغذ صافی به دست آمد) به آن افزوده شد. بعد لوله‌ها در بن‌ماری با دمای $۹۵^{\circ C}$، به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. سپس در دمای محیط سرد شدند و بعد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب(As) آنها در ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد آب مقطر (Ab) خوانده شد. با استفاده از رابطه زیر، میزان TBA(بر حسب میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهی) مورد محاسبه قرار گرفت (۳۱).

$$TBA = \frac{(As - Ab) \times ۵۰}{۲۰۰}$$

۲-۳-۳- اندازه‌گیری بازهای ازته فرار (TVB-N)[۵]

ابتدا ۱۰ گرم از گوشت میکس‌شده ماهی و ۲ گرم اکسید منیزیم در یک بالون کلدال توزین شد. سپس ۳۰۰ سی‌سی آب مقطر، ۲ تا ۳ قطره اکتانول(به‌عنوان ضد کف) و تعدادی ساچمه شیشه‌ای نیز به محتویات بالن افزوده شد. سپس سیستم کلدال نصب‌شده و در زیر لوله خروجی سیستم، ارلنی حاوی ۲۵ سی‌سی اسیدبوریک ۲ درصد دارای ۲-۳ قطره معرف متیل‌رد قرار گرفت به‌طوری‌که سر لوله خروجی کاملاً درون محلول ارلن بود تا پس از برقراری جریان آب سرد و روشن‌کردن هیتر و جوشیدن محتویات بالن کلدال، گازهای متصاعدشده که معرف بازهای ازته فرار هستند در محلول درون ارلن جمع‌آوری شوند که به‌صورت تغییر رنگ محلول از ارغوانی به سبز روشن نمودار شد. درنهایت این محلول با اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد تا رنگ محلول مجدداً ارغوانی شود. با قرار دادن میزان اسید مصرفی جهت تیتراسیون در رابطه زیر، بازهای ازته فرار برحسب میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی محاسبه شد (۲۰).

TVB-N = حجم اسیدسولفوریک مصرفی ×۱۴

---

[۳] Peroxide value

[۴] Thiobarbituric acid

[۵] Total volatile basic nitrogen

۲-۳-۴- شمارش باکتری‌های سرماگرا[۶](TPC)

برای شمارش باکتری‌های سرماگرا (TPC) از نمونه‌های تهیه‌شده، از محیط تریپتیک سوی آگار (TSA) استفاده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های تهیه‌شده، برروی محیط کشت به‌طور سطحی پخش شده و پلیت‌های مربوط به باکتری‌های سرماگرا بعد از ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی-گراد شمارش شدند (۲۸).

۲-۳-۵- شمارش سودوموناس‌ها[۷]

برای شمارش سودوموناس‌ها از محیط کشت ستریمید آگار استفاده‌شده و از رقت‌های تهیه‌شده مقداری مشخصی از آن به‌صورت سطحی در محیط کشت ستریمید آگار کشت داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. باکتری‌های رشدیافته بر روی محیط نشان‌دهنده‌ی جنس سودوموناس بودند (۲۸).

۲-۴- تجزیه وتحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تیمار و هر تیمار سه تکرار انجام شد. به منظورتجزیه وتحلیل مقادیرکمی به دست آمده ازآزمایش‌ها پس ازکنترل نرمال بوده داده‌هابااستفاده ازآزمون (Shapiro-Wilk) به‌صورت آزمایش فاکتوریل با بررسی اثر اسانس مرزنجوش-کیتوزان در سه سطح (صفر-صفر، صفر-۲ درصد و ۰/۵-۲ درصد) و در ۴ زمان (صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) به روش آنالیزواریانس دوطرفه(Two–Way ANOVA) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS۲۲برای آنالیز آماری و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

۳- نتایج

۳-۱- پراکسید

میزان پراکسید با افزایش زمان نگهداری در همه تیمارها افزایش یافت (P<۰/۰۵، جدول ۱)، به‌طوری‌که میزان پراکسید از ۰/۰۲± ۰/۸۶ در زمان صفر نگهداری تا۰/۰۲± ۵/۵۶ میلی‌اکی‌والان اکسیژن بر کیلوگرم چربی در روز ۱۴ نگهداری، درتیمار شاهد افزایش یافت و در تیمارهای پوششی کیتوزان و کیتوزان– اسانس از ۰/۰۰± ۰/۸۶ و ۰/۰۱± ۰/۸۸در زمان صفر نگهداری به ۰/۱۲±۴/۲۳ و ۰/۰۳± ۳/۷۸ در روز ۱۴ نگهداری، افزایش یافت. میزان پراکسید تیمارهای مختلف در روز صفر نگهداری فاقد اختلاف معنی‌دار بودند (P>۰/۰۵)، اما باگذشت ۲۱ روز نگهداری، عدد پراکسید تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها از خود نشان داد، به‌طوری‌که میزان پراکسید در تمامی زمان‌های نگهداری در تیمار پوششی کیتوزان– اسانس مرزنجوش کمترین میزان را نشان داد و بعدازآن تیمار پوششی کیتوزان قرار داشت(P<۰/۰۵).آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان نگهداری بر شاخص پراکسید معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

۳-۲- میزان تیوباربیتوریک‌اسید

میزان TBAدر تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری به-طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵، جدول ۲)، به-طوری‌که میزان آن در نمونه‌های شاهد از۰/۰۱± ۰/۶۳ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهیدر روز صفر نگهداری تا ۰/۰۴± ۴/۵۱، در روز ۱۴نگهداری افزایش یافت، در تیمارهای پوششی کیتوزان و تیمار پوششی کیتوزان– اسانس مرزنجوش این میزان به ترتیب از۰/۰۱± ۰/۶۳ و ۰/۰۸± ۰/۶۳ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهیدر روز صفر نگهداریتا۰/۲۲±۳/۱۳ و ۰/۰۹± ۲/۲۴در روز ۱۴ نگهداری افزایش یافت. میزانTBAدر پایان زمان نگهداری، بین تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت(P<۰/۰۵).به طوری‌که در تیمار پوششی کیتوزان– اسانس مرزنجوش کمترین میزان را نشان داد و بعدازآن تیمار پوششی کیتوزان قرار داشت(P<۰/۰۵).در روزهای صفر، ۷ و ۲۱ بین تیمارهای کیتوزان و کیتوزان-اسانس تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (p> ۰/۰۵).آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل

---

[۶] Totalpsychotropic count

[۷] Total pseudomonas count

تیمار و زمان نگهداری بر شاخص TBAمعنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

۳-۳- میزان بازهای ازته فرار

میزان TVB-N باگذشت زمان نگهداری به‌طور معنی‌داری در همه تیمارها افزایش یافت (P<۰/۰۵، جدول ۳)، به‌طوری‌که میزانآن از ۰/۲۳ ± ۱۰/۳۴در زمان صفر نگهداری تا۰/۵۹±۳۸/۲۱میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهیدر روز ۱۴ نگهداری، درتیمار شاهد افزایش یافت و این میزان در تیمارهای پوششی کیتوزان و کیتوزان–اسانس از۰/۰۴± ۱۰/۱۷ و ۰/۰۵ ± ۱۰/۱۲میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهیدر زمان صفر نگهداری به۰/۰۹± ۲۶/۴۳و ۰/۶۲± ۲۳/۷۵ در روز ۱۴ نگهداری، افزایش یافت.میزان TVB-N در تیمارهای مختلف روز صفر نگهداری فاقد اختلاف معنی‌دار بودند (P>۰/۰۵)، اما در سایر روزهای نگهداری تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها از خود نشان داد (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که میزان بازهای ازته فرار در تمامی زمان‌های نگهداری در تیمار پوششی کیتوزان – اسانس مرزنجوش کمترین میزان را نشان داد و بعدازآن تیمار پوششی کیتوزان قرار داشت.آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان نگهداری بر شاخص TVB-N معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

۳-۴- شاخص‌های میکروبی

۳-۴-۱- باکتری‌های سرماگرا

میزان باکتری‌های سرماگرا در طول دوره نگهداری افزایش یافت، همچنین میزان باکتری‌های سرماگرا در بین تیمارها دارای تفاوت معنی‌دار بود(جدول ۴، P<۰/۰۵). به‌طوری‌که میزان اولیه این باکتری‌ها در روز صفر نگهداری، برای تیمارهای شاهد (فاقد پوشش)، کیتوزان و کیتوزان–اسانس به‌ترتیب۰/۰۹±۳/۶۳، ۰/۰۷±۳/۴۸ و۰/۰۲±۳/۴۱لگاریتم تعداد کلونی گرم نمونه بود و در روز ۱۴ نگهداری، این میزان در فیله شاهد به۴۰/۰۶±۷/۰لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه بود و در فیله پوششی کیتوزان به۰/۱۰±۶/۲۲لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه بود، اما در نمونه پوششی کیتوزان و اسانس مرزنجوش این میزان به۰/۰۸±۵/۷۴لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونهافزایش‌پیدا کرد. به‌طوری‌که نمونه‌های پوششی با کیتوزان – مرزنجوش بار باکتریایی کمتری داشتند(P<۰/۰۵).آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثرمتقابل تیمار و زمان نگهداری بر شاخص باکتری‌های سرماگرا معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

۳-۴-۲- باکتری‌های سودوموناس

در شمارش میزان اولیه این باکتری‌ها در روز صفر نگهداری در فیله شاهد و فیله‌های تیمار شده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۵، P>۰/۰۵). باگذشت زمان تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف مشاهده شده به‌طوری‌که مقدار سودوموناس‌ها در روز صفر در فیله قزل-آلای رنگین‌کمان از حدود۰/۱۶±۲/۲۷ لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه در فیله شاهد تا حدود۰/۲۱ ± ۵/۸۸ لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه در روز ۱۴ افزایش یافت، درحالی‌که این میزان در تیمار پوششی کیتوزان در روز ۱۴، حدود۰/۲۴±۴/۹۱ مشاهده شد و کمترین میزان سودوموناس‌ها مربوط به تیمار پوششی کیتوزان و اسانس به میزان۰/۰۶± ۴/۳۱ لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونهبود (P<۰/۰۵).آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که اثر تیمار، زمان و اثر متقابل تیمار و زمان نگهداری بر شاخص باکتری-های سودوموناس معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

جدول ۱: مقادیر پراکسید (میلی‌اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم چربی) در تیمارهای مختلف فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (شاهد، فیله با پوشش کیتوزان و فیله با پوشش کیتوزان-اسانس مرزنجوش) در زمان نگهداری در یخچال.

تیمار	زمان			
	روز صفر	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱
فاقد پوشش (شاهد)	۰/۰±۸۶/۰۲^{Aa}	۳/۰±۵۰/۳۸^{Bb}	۵/۰±۵۷/۰۹^{Cd}	۵/۰±۵۶/۰۲^{Cc}
کیتوزان	۰/۰±۸۶/۰۰^{Aa}	۳/۰±۱۷/۰۶^{ABb}	۴/۰±۲۳/۱۲^{Bc}	۴/۰±۱۰/۱۰^{Bc}
کیتوزان - اسانس	۰/۰±۸۸/۰۱^{Ba}	۲/۰±۷۸/۳۶^{Ab}	۳/۰±۷۸/۰۳^{Ad}	۳/۰±۵۰/۳۷^{Ac}
P value				
تیمار	۰۰۰			
زمان	۰۰۰			
زمان× تیمار	۰۰۰			

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت کوچک و بزرگ به‌ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در هر سطر و ستون است (P<۰/۰۵).

جدول ۲: مقادیر تیوباربیتوریک‌اسید (میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهی) در تیمارهای مختلف فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (شاهد، فیله با پوشش کیتوزان و فیله با پوشش کیتوزان-اسانس مرزنجوش) در زمان نگهداری در یخچال.

تیمار	زمان			
	روز صفر	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱
فاقد پوشش (شاهد)	۰/۰±۶۳/۰۱^{Aa}	۲/۰±۵۰/۰۶^{Ab}	۴/۰±۵۱/۰۴^{Cc}	۵/۰±۵۵/۲۸^{Bd}
کیتوزان	۰/۰±۶۳/۰۱^{Aa}	۲/۰±۲۴/۰۳^{Ab}	۳/۰±۱۳/۲۲^{Bc}	۴/۰±۳۷/۰۴^{Ad}
کیتوزان - اسانس	۰/۰±۶۳/۰۸^{Aa}	۲/۰±۰۰/۲۳^{Ab}	۲/۰±۲۴/۰۹^{Ac}	۴/۰±۲۸/۰۷^{Ad}
P value				
تیمار	۰۰۰			
زمان	۰۰۰			
زمان× تیمار	۰۰۰			

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت کوچک و بزرگ به‌ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در هر سطر و ستون است (P<۰/۰۵)

جدول ۳: مقادیر بازهای ازته فرار (میلی‌گرم نیتروژندر ۱۰۰ گرم نمونه ماهی) در تیمارهای مختلف فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (شاهد، فیله با پوشش کیتوزان و فیله با پوشش کیتوزان-اسانس مرزنجوش) در زمان نگهداری در یخچال.

تیمار	زمان			
	روز صفر	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱
فاقد پوشش (شاهد)	۱۰/۰±۳۴/۲۳^{Aa}	۲۰/۰±۷۶/۵۹^{Cb}	۳۸/۰±۲۱/۵۹^{Cc}	۶۴/۱±۲۲/۵۳^{Cd}
کیتوزان	۱۰/۰±۱۷/۰۴^{Aa}	۱۶/۰±۸۶/۱۸^{Bb}	۲۶/۰±۴۳/۰۹^{Bc}	۳۸/۲±۹۲/۴۹^{Bd}
کیتوزان – اسانس	۱۰/۰±۱۲/۰۵^{Aa}	۱۴/۰±۲۲/۱۱^{Ab}	۲۳/۰±۷۵/۶۲^{Ac}	۳۴/۱±۰۱/۸۰^{Ad}
P value				
تیمار	۰۰۰			
زمان	۰۰۰			
زمان× تیمار	۰۰۰			

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت کوچک و بزرگ به‌ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در هر سطر و ستون است (P<۰/۰۵).

جدول ۴: میزان باکتری‌های سرماگرا (لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه)در تیمارهای مختلف فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (شاهد، فیله با پوشش کیتوزان و فیله با پوشش کیتوزان-اسانس مرزنجوش) در زمان نگهداری در یخچال.

تیمار	زمان			
	روز صفر	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱
فاقد پوشش (شاهد)	۳/۰±۶۳/۰۹^{Ba}	۵/۰±۶۲/۱۲^{Cb}	۷/۰±۴۰/۰۶^{Cc}	۹/۰±۴۰/۱۶^{Cd}
کیتوزان	۳/۰±۴۸/۰۷^{Aa}	۴/۰±۳۹/۰۷^{Bb}	۶/۰±۲۲/۱۰^{Bc}	۷/۰±۴۶/۱۰^{Bd}
کیتوزان – اسانس	۳/۰±۴۱/۰۲^{Aa}	۴/۰±۰۹/۰۲^{Ab}	۵/۰±۷۴/۰۸^{Ac}	۶/۰±۹۹/۱۴^{Ad}
P value				
تیمار	۰۰۰			
زمان	۰۰۰			
زمان× تیمار	۰۰۰			

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت کوچک و بزرگ به‌ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در هر سطر و ستون است (P<۰/۰۵)

جدول ۵:میزان باکتری‌های سودوموناس (لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه)در تیمارهای مختلف فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان (شاهد، فیله با پوشش کیتوزان و فیله با پوشش کیتوزان-اسانس مرزنجوش) در زمان نگهداری در یخچال.

تیمار	زمان			
	روز صفر	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱
فاقد پوشش (شاهد)	۲/۰±۲۷/۱۶^{Aa}	۴/۰±۶۹/۱۳^{Bb}	۵/۰±۸۸/۲۱^{Cd}	۸/۰±۱۰/۲۴^{Bd}
کیتوزان	۲/۰±۲۱/۰۴^{Aa}	۳/۰±۳۷/۰۵^{ABb}	۴/۰±۹۱/۲۴^{Bc}	۶/۰±۵۱/۰۸^{Ad}
کیتوزان- اسانس	۲/۰±۲۵/۰۴^{Aa}	۳/۰±۲۰/۰۶^{Ab}	۴/۰±۳۱/۰۶^{Ad}	۶/۰±۲۶/۰۳^{Ad}
P value				
تیمار	۰۰۰			
زمان	۰۰۰			
زمان× تیمار	۰۰۰			

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف متفاوت کوچک و بزرگ به‌ترتیب نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در هر سطر و ستون است (P<۰/۰۵).

۴- بحث

۴-۱- پراکسید

پیشرفت تندشدن در ماهی ناشی از اکسیداسیون چربی‌های موجود در بافت‌ها است. اندازه‌گیری پراکسید جهت تعیین محصولات اولیه اکسیداسیون چربی(هیدروپراکسیدها) به کارمی‌رود و تولید آن تغییری در ویژگی‌های حسی ماهی ایجاد نمی‌کند، اما ممکن است منجر به ایجاد مخاطراتی برای مصرف‌کننده گردد(۳۴). در این مطالعه مقدار پراکسید در روز صفر در همه تیمارها ناچیز بود و باگذشت زمان در همه تیمارها افزایش یافت. میزان پراکسید در بین تیمار شاهد و تیمار پوششی کیتوزان ۲ درصد و تیمار پوششی کیتوزان ۲ درصد و اسانس ۰/۵ درصد به‌جز روز صفر در سایر روزها تفاوت معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵).افزایش مقادیر پراکسید حاکی از توسعه تندی و فساد در طول زمان نگهداری ماهیان در یخچال بوده و کاهش آن در انتهای دوره نگهداری احتمالاً به دلیل پیروی از مکانیسم مونومولکولار و بی‌مولکولار و تبدیل پراکسید به ترکیبات ثانویه اکسیداسیونی (کربونیل‌ها و ترکیبات فرار) می‌باشد. واکنش‌های ثانویه اکسیداسیون ازجمله واکنش با پروتئین‌های قابل‌حل در نمک و تولید ترکیبات کربونیلی نظیر استالدئید، پروپیونالدئید، استون و اسیدهای چرب فرار نظیر اسیدکاپروئیک، اسیدپروپیونیک و گازهای فرار نیز می‌توانند دلایل چنین کاهشی باشند(۳). در بین تیمارهای مورد مطالعه، تیمار شاهد بیشترین میزان پراکسید را از خود نشان داد و کمترین میزان پراکسید در روز ۲۱ مربوط به تیمارپوششی کیتوزان – اسانس، در زمان نگهداری در یخچال بود. زرگر و همکاران (۱۳۹۰)، در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر پوشش نگهدارنده خوراکی کازئینات سدیم غنی‌شده با اسانس آویشن شیرازی (با غلظت صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) بر کیفیت و ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری‌شده در یخچال پرداختند (۴). طبق نتایج به‌دست‌آمده در پایان مدت ذخیره‌سازی نمونه‌های دارای اسانس با تفاوت معنی‌دار دارای سطح پایین‌تری از پراکسید نسبت به دو تیمار شاهد و کازئینات سدیم بودند(P<۰/۰۵).Ozogulو Uçar(۲۰۱۳)،در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی عصاره‌های مرزنجوش، چای سبز، مریم‌گلی و برگ‌بو با دوز ۰/۳ و ۰/۶ درصد بر کیفیت برگر ماهی منجمد ماکرل (Scomber japonicus) دریافتند که تمام عصاره‌ها به‌جز عصاره مریم‌گلی مانع از اکسیداسیون برگر ماهی شده و پس از ۶ ماه از ذخیره‌سازی، تفاوت معنی‌داریدر میزان پراکسید در هر دو غلظت از عصاره‌ها به‌جز عصاره‌ی برگ‌بو و مریم‌گلی مشاهده شد (۳۶).مطالعات محققان مختلف نشان داده است که اسانس گیاه مرزنجوش، دارای فعالیت‌های آنتی‌میکروبی و آنتی

اکسیدانی می‌باشد(۱۳، ۱۴، ۱۵). بیشترین عملکرد آنتی-باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی آن را به تیمول و کارواکرول نسبت داده‌اند (۱۲، ۴۴). بررسی پوشش خوراکی کیتوزان ۱ و ۲ درصددر تغییرات کیفیت روغن ساردین در شرایط سرد نشان داد که پوشش‌های خوراکی کیتوزان در مهار رشد باکتریها مؤثر بوده و تشکیل TVB-N و فرایندهای اکسیداسیون را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند (۳۰).اجاق و همکاران(۱۳۸۹)، در مطالعه‌ای تأثیر استفاده از پوشش نگهدارنده کیتوزان(۲ درصد) غنی‌شده با اسانس دارچین(صفر، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۵ و ۲ درصد) را بر کیفیت و ماندگاری فیله سردشده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در یخچال مورد بررسی قراردادند(۲)، آنالیزهای میکروبی، مکانیکی و فیزیکی در فواصل زمانی ۴ روز تا روز ۱۶ نشان داد که تیمارهای‌پوششی مخصوصا تیمارهای با پوشش اسانس تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشت، بنابراین مشخص شد افزایش اسانس به کیتوزان به‌عنوان پوشش خوراکی موجب بهبود عملکرد این پوشش بر ماندگاری قزل‌آلای‌رنگین‌کمان شد.Jeonو همکاران (۲۰۰۲)، اثر کیتوزان با ۳ ویسکوزیته متفاوت ۱۴، ۵۷ و ۳۶۰ سانتی‌پوآز با وزن مولکولی متناظر ۶۶۰، ۹۶۰ و ۱۸۰۰ کیلودالتون را در افزایش ماندگاری فیله‌های ماهی کاد اطلسی Gadus morhuaو هرینگ Clupea harengus تا پایان ۱۲ روز نگهداری در دمای یخچال مطالعه کردند (۲۴). پوشش کیتوزانی به شکل معنی‌داری اکسیداسیون چربی، فساد شیمیایی و رشد میکروارگانیزم‌ها را در هر دو ماهی در مقایسه با نمونه‌های فاقد پوشش، کاهش دادSathivel.و همکاران (۲۰۰۷)،در بررسی اثرات کیتوزان به‌عنوان پوشش خوراکی بر کیفیت فیله‌های سالمون صورتی پوست‌زدایی-شده (Oncorhynchus gorbucha) در طی ۳ و ۸ ماه نگهداری در انجماد، گزارش کردند که پوشش‌های کیتوزانی از کاهش رطوبت فیله‌ها به میزان حدود ۵۰ درصد در مقایسه با فیله‌های فاقد پوشش (شاهد) جلوگیری کرده و در تأخیر اکسیداسیون چربی موثر بودند (۴۲). همچنین فیله‌های پوشش‌داده‌شده با کیتوزان پس از انجمادزدایی بازده محصول بیشتری نسبت به فیله‌های فاقد پوشش نشان دادند.

۴-۲- تیوباربیتوریک اسید

تیوباربیتوریک‌اسید به طورگسترده به عنوان شاخص میزان کسیداسیون ثانویه چربی مورد استفاده قرارمی‌گیرد وناشی از وجود مواد واکنش‌دهنده با TBAحاصل ازمرحله دوماتواکسیداسیون است که طی آن ، پراکسیده اب همودی مثل آلدئیدها و کتون‌ها اکسیدمی‌شوند (۱۸). طبق گزارشAubourg(۲۰۰۱) ازآنجاکه مالون‌آلدئیدها می-توانند با سایر ترکیبات بدن ماهی واکنش دهند، مقدار TBAممکن است نشان‌دهنده درجه واقعی اکسیدشدن چربی‌ها نباشد. چنین ترکیباتی می‌توانند شامل آمین‌ها، نوکلئوتیدها و اسیدنوکلئیک، پروتئین‌ها، فسفولیپیدها و دیگر آلدئیدهای تولیدی در پایان اکسیداسیون چربی باشند. چنین رویکردی در بسیاری از ماهیان دیده‌شده است (۴۱).در این تحقیق میزان اولیه TBA،۰/۶۳ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهیبود، در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری به‌طور معنی‌داریافزایش یافت به‌طوری‌که میزان آن در روز ۱۴ نگهداری در یخچال در نمونه‌های شاهد، کیتوزان و کیتوزان-اسانسبه-ترتیب۰/۰۴± ۴/۵۱، ۰/۲۲± ۳/۱۳ و ۰/۰۹± ۲/۲۴ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهیبه‌دست آمد. روند افزایش این شاخص در طول مدت نگهداری ممکن است به دلیل افزایش آهن آزاد و دیگر پراکسیدان‌ها در ماهیچه باشد، روند افزایشی هیدروپراکسیدها نیز می‌تواند دلیلی بر این امر باشد(۱۹). در تمامی زمان‌های نگهداری تیمار پوششی کیتوزان – اسانس مرزنجوش کمترین میزان TBAرا نشان داد و بعدازآن تیمار پوششی کیتوزان قرار داشت که باعث کاهش میزانTBAنسبت به تیمار شاهد(فیله بدون محافظ) در طی ۲۱ روز نگهداری در دمای ۴°C شد. اما با این‌وجود کاهش میزان تیوباربیتوریک اسید در بعضی از روزهای نگهداری ممکن است به دلیل کاهش هیدروپرکسیدها وواکنش بین مالون‌آلدهید با انواع ترکیبات یا اجزاء موجود در عضلات ازجمله پروتئین‌ها ،اسیدهای

آمینه و گلیکوژن باشدکه علی‌رغم افزایش فساد ماهی باعث کاهش مقادیرمالون‌آلدهید و متعاقباً کاهش تیوباربیتوریکاسیدمی‌شود(۱۹).مقدار TBAدر دو تیمار دارای پوشش در طول دوره نگهداری پائین‌تر از حدی است که در آن طعم فساد مشخص گردد(کمتر از ۵میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در هر کیلوگرم از بافت ماهی).به نظر می‌رسد استفاده از اسانس‌های طبیعی مانند مرزنجوش به دلیل محتوای گروه‌هایی از ترکیبات پلی‌فنلیکه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند، از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند و با نقش محافظتی از اکسیداسیون چربی ها باعث حفظ ویژگی‌های گوشت ماهی می‌شود(۱۴).زرگر (۱۳۹۳) با بررسی تأثیر پوشش نگهدارنده خوراکی کازئینات سدیم غنی‌شده با اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) بر کیفیت و ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری‌شده در یخچال نیزمشاهده کردند که در پایان مدت ذخیره‌سازی، تیمار شاهد بالاترین مقادیر TBAرا نسبت به سایر تیمارها داشت و تیمار کازئینات سدیم محتوی ۱٪ اسانس کمترین مقدار را نسبت به سایر تیمارها داشت (۴، ۵).Bensidو همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای به بررسی اثر عصاره‌های آویشن، مرزنجوش و میخک بر پارامترهای کیفی ماهی کولی (Engraulis encrasicholus) در طول ذخیره‌سازی در یخ پرداختند (۸). طبق این نتایج مقدار TBAدر گروه شاهد، در هرروز از مدت ذخیره‌سازی بالاتر از (P<۰/۰۵) ماهی کولی ذخیره‌شده در یخ با عصاره مرزنجوش بود، بنابراین مشخص شد، سطوح بالای محتوای کل ترکیبات فنلی عصاره‌ی پونه کوهی و میخک، می‌تواند در تأخیر پراکسیداسیون لیپیدی و از این رو به‌دست‌آوردن مقدار کمتر TBAنقش داشته باشد (۳۲).فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی قابلیت کندکردن نفوذ رطوبت، اکسیژن، مواد فرّار و محلول را دارند که از این مسیر می‌توانند در کاهش اکسیداسیون موثر باشند، همچنین می‌توان این خصوصیات را با افزودن موادی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها، مواد ضدمیکروبی، موادرنگی، طعم‌دهنده‌ها، ادویه‌ها و ... در ساختار فیلم، افزایش داد (۳۳).

۴-۳- بازهای ازته فرار

TVB-N از ترکیبات مختلف ازجمله آمونیاک، متیل‌آمین، دی‌متیل‌آمین و همچنین تری‌متیل‌آمین تشکیل شده‌است که محصولات به‌دست‌آمده از فعالیت باکتری‌های عامل فساد و آنزیم‌های درونی است (۳۹) واغلب به‌عنوان یک شاخص برای فساد ماهی استفاده می‌شود. Özyurtو همکاران (۲۰۰۹)ماهی و محصولات ماهی را بر اساس شاخص TVB-Nبه چهار گروه شامل۱- تا ۲۵میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی: کیفیت عالی،۲- تا ۳۰میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی: کیفیت خوب،۳- تا ۳۵میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی: محدودیت مصرف، ۴- بالای۳۵میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی: فاسد طبقه‌بندی کردند (۳۷). نویسندگان مختلف گزارش کرده‌اند که حد قابل‌قبول برای ماهی تازه،۳۰میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهیاست(۲۲). در تحقیق حاضر میزان بازهای ازته فرار باگذشت زمان نگهداری در همه تیمارها افزایش یافت، به‌طوری‌که میزان بازهای ازته فرار از۰/۲۳± ۱۰/۳۴میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهیدر زمان صفر نگهداری تا ۰/۵۹±۳۸/۲۱ در روز ۱۴ نگهداری، درتیمار شاهد افزایش یافت و این میزان در تیمارهای پوششی کیتوزان و کیتوزان – اسانس از۰/۰۴± ۱۰/۱۷ و ۰/۰۵± ۱۰/۱۲میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهیدر زمان صفر نگهداری به ۰/۰۹± ۲۶/۴۳و ۰/۶۲± ۲۳/۷۵ در روز ۱۴نگهداری، افزایش یافت. در تمامی زمان‌های نگهداری تیمار پوششی کیتوزان–اسانس مرزنجوش کمترین میزان را نشان داد و تا روز ۱۴ نگهداری در تیمار پوششی کیتوزان و تیمار پوششی کیتوزان– اسانس از سطح قابل‌قبول بازهای ازته فرار در گوشت ماهی(۳۰میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی) فراتر نرفت. مقادیر پائین‌تر TVB-N در تیمار پوششی حاوی اسانس را می‌توان به خواص آنتی‌باکتریایی حاصل از ترکیبات فنلی کارواکرول و تیمول نسبت داد(۴۴).مقدار TVB-Nدر فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای پوشش کازئینات سدیم و کازئینات سدیم حاوی اسانس آویشن در زمان نگهداری در یخچال، کمتر از تیمار فاقد پوشش

گزارش شد، به طوری که در روز ۱۶ نگهداری در تیمار شاهد و کازئینات سدیم بیش از حد مجاز، اما در تیمارهای حاوی اسانس آویشن این میزان کمتر از حد مجاز به دست آمد و با توجه به اینکه در تیمار شاهد و تیمار پوششی کازئینات هر دو خارج از محدوه‌ی مجاز بودند، دلیل این امر را به خواص آنتی‌باکتریایی آویشن نسبت دادند(۴، ۵).Bensidو همکاران (۲۰۱۴) در بررسی اثر عصاره‌های آویشن، مرزنجوش و میخک بر پارامترهای کیفی ماهی کولی (Engraulis encrasicholus) در طول ذخیره‌سازی در یخ گزارش کردند (۸) که مقدار TVB-N برای ماهی-های کولی ذخیره‌شده در یخ با عصاره آویشن، مرزنجوش و میخک پس از ۱۲ روز قابل‌قبول (کمتر از۳۰میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی) بود و دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵).نتایج تحقیق موسوی-نسب و همکاران (۱۳۹۲) نیزنشان داد که اسانس فلفل سیاه و کیتوزان اثر سینرژیستی فراوانی در کاهش شمارش باکتری‌های کل، باکتری‌های سرمادوست، باکتری‌های اسیدلاکتیک و اینتروباکترها دارند. همچنین این دو ترکیب منجر به کاهش میزان بازهای ازته فرار در نمونه‌های پوشش-دار شدند (۶).Ramezaniو همکاران (۲۰۱۵)، گزارش کردند که پوشش کیتوزان و نانوکیتوزان برای حفاظت از فیله ماهی کپور نقره‌ای(Hypophthalmicthys molitrix) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد موثر بود، البته نانوکیتوزان فعالیت ضدمیکروبی بالاتر از کیتوزان نشان داد و توانایی بیشتری در مهار مقادیر TVB_N در طول دوره نگهداری در یخچال داشت، غوطه‌ورسازی فیله‌های کپور در محلول کارواکرول/تیمول، موجب افزایش ماندگاری فیله از ۴ روز به حداقل ۱۲ روز گردید ومقادیر برای فیله‌های کپور غوطه‌ور شده در محلول (v/v)۰/۵ درصد تیمول و کارواکرول، بعد از ۱۲روز نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد۳۰میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهیگزارش کردند (۴۰)، در حالیکه تیمار شاهد تنها بعد از ۴ روز به این مقدار رسید(۲۹).

۴-۴- شاخص‌های میکروبی (باکتری‌های سرماگرا و سودوموناس‌ها):

اسانس مرزنجوش به خاطر مشتقات فنلی مانند کارواکرول و تیمول دارای فعالیت ضدمیکروبی گسترده‌ای می‌باشد و یکی از مؤثرترین اسانس‌ها در رابطه با کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها به‌حساب می‌آید. مطابق با یافته‌هایKurita و Koike(۱۹۸۳) اثر آنتی‌میکروبی اسانس مرزنجوش مربوط به فنل، الکل‌ها، آلدئیدها، کتونها، استرها و هیدروکربن‌های موجود در ترکیبات آن است (۲۶).باکتری‌های سرمادوست گرم منفی گروه اصلی میکروارگانیزم‌های عامل فساد ماهی نگهداری‌شده در دماهای سرد هستند (۶).باکتری‌های سرماگرا و عمدتاً گونه‌های سودوموناس آنزیم‌های لیپاز و فسفولیپاز تولید می‌کنند که سبب افزایش اسیدهای چرب آزاد می‌شوند. حد مجاز این باکتری‌ها در طول دوره ذخیره‌سازی۷ (لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونه)است (۲۱).در مطالعه‌ی حاضر تعداد باکتری‌های سرماگرا و سودوموناس با افزایش زمان نگهداری افزایش یافت. همچنین میزان باکتری‌های سرماگرا در بین تیمارها دارای تفاوت معنی‌دار بودو با افزایش زمان نگهداری به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). در روز ۱۴ نگهداری، این میزان در فیله شاهد به۰/۰۶±۷/۴۰ لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونهکه بالاتر از حد مجاز توصیه‌شده برای ماهی خام بود و در فیله پوششی کیتوزان۰/۱۰± ۶/۲۲ لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونهافزایش یافت، اما در نمونه پوششی کیتوزان و اسانس مرزنجوش این میزان به حدود۰/۰۸±۵/۷۴لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونهافزایش پیدا کرد. میزان اولیه باکتری-های سودوموناس در روز صفر نگهداری در فیله شاهد و فیله‌های تیمارشده ۰/۱۶± ۲/۲۷ لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونهبود که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. باگذشت زمان مقدار سودوموناس‌ها در روز صفر در فیله قزل‌آلادر فیله شاهد تا حدود۰/۲۱± ۵/۸۸ لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونهدر روز ۱۴ افزایش یافت، درحالی‌که این میزان در تیمار پوششی کیتوزان حدود۰/۲۴ ±۴/۹۱ مشاهده شد و کمترین میزان سودوموناس مربوط به تیمار

پوششی کیتوزان و اسانس به میزان۰/۰۶± ۴/۳۱لگاریتم تعداد کلونی در گرم نمونهبود. نمونه‌های پوششی با کیتوزان–مرزنجوش بار باکتریایی کمتری داشتند و اثر بازدارندگی بهتری نشان دادند. زرگر (۱۳۹۰) در بررسی تأثیر پوشش نگهدارنده خوراکی کازئینات سدیم غنی‌شده با اسانس آویشن شیرازی بر کیفیت و ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری‌شده در یخچال گزارش کردند که در پایان مدت ذخیره‌سازی (۲۰ روز)، شمارش باکتری‌های کل دو تیمار کازئینات محتوی ۰/۵ و ۱ درصد اسانس آویشن، با اختلاف معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها قرار داشتند (۴).در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی-باکتریایی عصاره‌های مرزنجوش، چای سبز، مریم‌گلی و برگ‌بو با دوز ۰/۳ و ۰/۶ درصد بر کیفیت برگر ماهی منجمد ماکرل (Scomber japonicus) مشخص شد کهشمارش باکتری‌های کل در برگر ماهی برای همه تیمارهای حاوی اسانس در طول دوره ذخیره‌سازی از حد مجازتجاوز نمی‌کند. در میان تیمارهای حاوی اسانس نیز تفاوت معنی‌داریمشاهده شد (P<۰/۰۵)و به‌طورکلی در میان عصاره‌ها، عصاره مرزنجوش (۰/۶ درصد) در کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها موثرتر بود. در این تحقیقاستفاده از عصاره در دوز ۰/۶ درصد نسبت به دوز ۰/۳ درصد، منجر به رشد پایین‌تر باکتری در برگر ماهی شد. تعداد باکتری‌هایسرماگرا (TPC) نیز در تیمارهای برگر ماهی حاوی عصاره مرزنجوش (۰/۶ درصد) و پس از آن عصاره چای سبز ۰/۶ درصد کاهش بیشتری را نشان داده است(P<۰/۰۵؛ ۳۶). مطالعه‌ی اجاق و همکاران (۱۳۸۹)، با استفاده از پوشش نگهدارنده کیتوزان غنی‌شده با اسانس دارچین در غلظت-های کیتوزان (۲درصد) و اسانس (۰، ۰/۴، ۰/۸ و۱/۵و ۲ درصد) بر کیفیت و ماندگاری فیله سردشده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که تیمارهای‌پوششی مخصوصا تیمارهای با پوشش اسانس تفاوت معنی‌داری از نظر آنالیزهای میکروبی، با تیمار شاهد داشتند (۲).

۵- نتیجه‌گیری

با توجه به تقاضای مصرف‌کنندگان برای دسترسی به مواد غذایی باکیفیت بالا و نگرانی آن‌ها به دلایل مشکلات ناشی از مصرف نگهدارنده‌های مصنوعی و نیز نگرانی‌های زیست‌محیطی ناشی از تجمع پلیمرهای مصنوعی، تکنولوژی استفاده از پوشش‌های زیست‌تخریب‌پذیر با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی بالا می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. با توجه به تحقیق حاضر می‌توان گفت اضافه‌کردن ۰/۵ درصد اسانس مرزنجوش به پوشش کیتوزان به دلیل داشتن خواص آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی موجب بهبود پارامترهای بیوشیمیایی و میکروبی در طول دوره ۲۱ روزه نگهداری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری‌شده در دمای یخچال می‌گردد، به‌طوری‌که روند فساد بیوشیمیایی و میکروبی در فیله‌های پوشش داده شده با کیتوزان غنی‌شده با ۰/۵ درصد اسانس مرزنجوش نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت و پس از آن تیمار پوششی ۲ درصد کیتوزان بدون اسانس در شرایط بهتری نسبت به شاهد قرار داشت.

۶- منابع

۱. آمارنامه دریایی ایران، ۱۳۹۴. معاونت علمی و فناوری ستاد توسعه فناوری و صنایع دانش بنیان دریایی. ۱۰۶ص.

۲. اجاق، س.م.۱۳۸۹.تأثیر استفاده از پوشش نگهدارنده کیتوزان غنی‌شده با اسانس دارچین بر کیفیت و ماندگاری فیله سرد شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Oncorhynchus mykiss). رساله دکتری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی. دانشگاه تربیت مدرس. ۱۰۷ صفحه

۳. اعتمادی، ح. ۱۳۸۷. پتانسیل آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری (Rosmarinus officinalis) در افزایش عمر ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Oncorhynchus mykiss)، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره ۵، شماره ۴، صفحات ۶۷-۷۷

۴. زرگر، م. ۱۳۹۰، تأثیر پوشش نگهدارنده خوراکی کازئینات سدیم غنی‌شده با اسانس آویشن شیرازی بر کیفیت و ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری‌شده در یخچال، پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. ۷۲ صفحه.

۵. زرگر، م.، یگانه، س.، رضوی، س.ه. و اجاق، م. ۱۳۹۳. تأثیر پوشش خوراکی کازئینات سدیم بر کیفیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی نگهداری در یخچال. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۴۴، دوره ۱۱، صفحه ۸۱-۷۱.

۶. موسوی‌نسب، م.، گلمکانی، م.ت.، ضیایی، ا.، عزیزی‌نیا، م.، شاد، ا. و یوسف‌آباد، م.ح.۱۳۹۲. اثر پوشش تهیه‌شده از کیتوزان و اسانس فلفل سیاه بر خصوصیات میکروبی و فیزیکوشیمیایی ماهی کپور معمولی. بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، ۶ صفحه

7. Aider, M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. LWT-Food Science and Technology,43: 837-842.
8. Bensid, A., Ucar, Y., Bendeddouche, B.and Özogul, F. 2014. Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (Engraulis encrasicholus) during chilled storage. Food chemistry, 145: 681-686.
9. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
10. Cagri, A., Ustunol, Z.and Ryser, E.T. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. Journal of Food Protection, 67(4): 833-848.
11. Cha, D.S.and Chinnan, M.S. 2004. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44(4):223-237.
12. Didry, N., Dubreuil, L.and Pinkas, M. 1993. Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination." Journal Article, 48: 301-304.
13. Dorman, H.J.D. and Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88: 308-316.
14. Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K.and Blomhoff, R. 2003. Several Culinary and Medicinal Herbs Are Important Sources of Dietary Antioxidants. Human Nutrition and Metabolism, 133: 1286-1290.
15. Economou, K.D., Oreopoulou,V. and Thomopoulos C.D. 1991.Antioxidant activity of some plant extracts of the family labiatae. Journal of the American Oil Chemists Society, 68 (2): 109-113.
16. Egan, H., Kirk, R.S. and Sawyer, R. 1997. Pearson’s chemical analysis of food, 9th EditionLongman Scientific and Technica, pp: 609-634.
17. Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., and Chi, Y.2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. Food Chemistry, 115(1): 66-70.
18. Fernández-Saiz, P., Sánchez, G., Soler, C., Lagaron, J.M.and Ocio, M.J. 2013. Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. Food Control, 34(1): 61-68.
19. Gomes, H.A., Silva, E.N., Nascimento, M.R.L.andFukuma, H.T. 2003. Evaluation of the 2- thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. Food Chemistry, 80: 433 – 437.
20. 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(3): 511-520.
21. Hamzeh, A, and Rezaei, M. 2011. Antioxidant and antibacterial effects of

during chilled storage. Food Hydrocolloids, 26(1): 167-174.
31. Namulema, A., Muyonga, J.H. and Kaaya A.N. 1999. Quality deterioration in frozen Nile perch (Lates niloticus) stored at -13 and -27°C, Food Research International, 32: 151-156.
32. Negi, P.S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology, 156(1): 7-17 .
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. Olafsdottir, G, Martinsdóttir, E, Oehlenschläger, J, Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., et al., 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. Trends in Food Science & Technology, 8(8): 258-265.
35. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L.andLacroix, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli, SalmonellaTyphimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control,18(5): 414-420.
36. Ozogul, Y.and Uçar, Y. 2013. The effects of natural extracts on the quality changes of frozen chub mackerel (Scomber japonicus) burgers. Food and Bioprocess Technology, 6(6): 1550-1560.
37. Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S. and Özogul, F. 2009. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (Mullus barbatus) and goldband goatfish (Upeneus moluccensis) during storage in ice. Food chemistry, 114(2): 505-510.
38. Peniche, C., Argüelles-Monal, W.and Goycoolea, F.M. 2008. Chitin and chitosan: major sources, properties and applications. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources,517-542.

sodiumalginate coating enriched with thyme essential oil on rainbow trout fillets during refrigerated storage. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 6(3): 11-20.
22. Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V.and Gelman, A. 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (Lates calcarifer). Journal of Food Protection, 66(3): 410-417.
23. Higdon, J.V.and Frei, B. 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions.Critical Reviews in Food Science and Nutrition,43(1): 89-143
24. Jeon, Y.J., Kamil, J.Y. and 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.
25. Kaitaranta, J.K. 1992. Control of lipid oxidation in fish oil with various antioxidative compounds. Journal of the American Oil Chemists Society, 69(8): 810-813.
26. Kurita, N. and Koike, S. 1983. Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oil components. Agricultural and Biological Chemistry, 47(1): 75-67.
27. López, P., Sanchez, C.Batlle, R.and Nerin, C. 2007. Vapor-Phase Activities of Cinnamon, Thyme, and Oregano Essential Oils and Key Constituents against Foodborne Microorganisms. Food Chemistry,55(11): 4348-4356.
28. Mac Faddin, J.F. 1997. Biochemical tests for identification of medical bacteria, Williams & Wikins Co. pp. 312.
29. Mahmoud, B.S.M., Yamazaki, K., Miyashita, K., Shin, S.and Suzuki, T. 2004. Bacterialmicroflora of carp (Cyprinus carpio) and its shelf-life extension by essential oilcompounds. Food Microbiology. 21: 657 – 666.
30. Mohan, C.O., Ravishankar, C.N., Lalitha, K.V.andSrinivasa Gopal, T.K. 2012. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (Sardinella longiceps)

39. Rahimabadi, E.Z.and Divband, M. 2012. The effects of coating and Zataria multiflora Boiss essential oil on chemical attributes of silver carp fillet stored at 4°C. International food research journal, 19(2): 685-690.
40. Ramezani, Z., Zarei, M.and Raminnejad, N. 2015. Comparing the effectiveness of chitosan and nanochitosan coatings onthe quality of refrigerated silver carp fillets. Food Control, 51: 43-48.
41. Rezaei, M.and Hosseini, S.F. 2008. Quality assessment of farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during chilled storage. Journal of Food science, 73(6): 93-96 .
42. 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(3): 366-373.
43. Wang, C.and Shelef, L.A. 1992. Behavior of Listeria monocytogenes and the spoilage microflora in fresh cod fish treated with lysozyme and EDTA. Food microbiology,9(3): 207-213.
44. Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, M.H.and Raneva, V.G. 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. Food Chemistry, 64(1): 59-66.
45. Yasin, N.M.N.and Abou-Taleb, M. 2007. Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. World J. Dairy Food Sci, 2: 1-9.