(مقاله پژوهشی)

تولید و ارزیابی فیلم زیست‌تخریب‌پذیر کیتوزان حاوی عصاره شیرین بیان (Glycyrrhiza glabra) به منظور بسته‌بندی فیله ماهی فیتوفاگ (Hypophthalmichthys molitrix)

هانیه رستم زاد[1*]، اسحق زکی پور[1]

۱-گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران.

تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۰۹/۰۵

چکیده

بسته‌بندی مواد غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و با توجه به نگرانی‌های ناشی از مصرف نگهدارنده‌های مصنوعی و همچنین مشکلات زیست محیطی ناشی از تجمع پلیمرهای مصنوعی، استفاده از پوشش‌های زیست تخریب پذیر در حال گسترش است. لذا در تحقیق حاضر اقدام به تهیه فیلم های زیست تخریب پذیر از کیتوزان شد. در این تحقیق اثر سه غلظت عصاره آبی گیاه شیرین بیان (۵، ۱۰ و ۱۵٪) بر خواص کاربردی و ضد میکروبی فیلم ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون‌ها حاکی از این بود که بهترین خصوصیات کاربردی را فیلم کیتوزان حاوی ۱۰٪ عصاره شیرین‌بیان دارا بود ($P<۰/۰۵$)، لذا از فیلم های بهینه به منظور بسته بندی فیله ماهی فیتوفاگ جهت نگهداری در یخچال (۱۲ روز) استفاده شد. علاوه بر تیمار ذکر شده به منظور مقایسه تاثیر بسته بندی بر مدت ماندگاری فیله‌ها، یک گروه از فیله‌های ماهیان نیز با پوشش‌های کیتوزان فاقد عصاره و گروهی دیگر با بسته-بندی‌های معمول شیلات بسته‌بندی شدندو قابلیت و کارایی پوشش‌ها از طریق سنجش خصوصیات شیمیایی و میکروبی فیله‌ها (فواصل زمانی ۴ روزه)مورد بررسی قرارگرفت.نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم کیتوزان حاوی عصاره شیرین بیان کمترین مقادیر پراکساید، تیوباربیتوریک اسید، بازهای ازته فرار، بار میکروبی کل و بار میکروبی سرمادوست را در مقایسه با سایر تیمارها نشان دادند. طبق نتایج تحقیق حاضر، استفاده فیلم کیتوزان حاوی عصاره شیرین بیان در بسته بندی فیله‌های ماهی می‌تواند به شکل معنی‌داری موجب افزایش ماندگاری آن‌ها شود.

واژه های کلیدی: فیلم زیست تخریب پذیر، کیتوزان، شیرین بیان، نگهداری

[*]مسؤول مکاتبات: hrostamzad@guilan.ac.ir

۱-مقدمه

غذاهای دریایی منبع پروتئینی با ارزشی می‌باشند و نقش مهمی در رژیم غذایی انسان‌ها دارند. امروزه به طور گسترده‌ای از ماهی و سایر آبزیان جهت تولید فراورده‌هایی با ارزش اقتصادی بالا استفاده می‌شود (۲۲). حفظ تازگی و کیفیت محصولات گران قیمتی مانند فرآورده‌های دریایی به دلیل دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع و حساسیت به اکسیداسیون همواره از دغدغه‌های محققین بوده است. علاوه بر این، امروزه تمایل مصرف کنندگان به خریداری محصولاتی که تازگی و کیفیت خود را حفظ می‌کنند، افزایش یافته است. به‌منظور حفظ کیفیت مواد غذایی، بسته‌بندی و پوشش‌دهی آن ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به توسعه روزافزون تکنولوژی، رشد صنایع پتروشیمی و بسته‌بندی چشمگیر بوده و طی سال‌های اخیر در ایران نیز پلیمرهای مختلف مانند پلی پروپیلن، پلی‌اتیلن، پلی‌استایرن و غیره در مقیاس بالا تولید و در صنایع بسته بندی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به رشد تولید پلیمرهای مصنوعی، بخش عمده‌ای از آلودگی محیط زیست را آلودگی توسط پلاستیک‌های سنتزی که به آلودگی سفید مشهور است، تشکیل می‌دهد. از این رو استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی که آلودگی کمتری را ایجاد می‌کنند و زیست تخریب پذیر[1] می‌باشند، رواج یافته است (۳). فیلم خوراکی به لایه نازکی از یک ماده خوراکی اطلاق می‌شود که روی سطح ماده غذایی به عنوان پوشش قرار داده می‌شود تا مانعی در برابر عوامل مخرب مانندگازهایی چون اکسیژن، دی‌اکسید کربن، رطوبت و غیره بوده و از این طریق موجب افزایش ماندگاری ماده غذایی شود. علاوه بر این، فیلم‌های خوراکی می‌توانند حاوی ترکیبات آنتی اکسیدان و مواد ضد میکروبی باشند و این در حالی است که بسته‌بندی‌های مرسوم قادر به رقابت در این زمینه با فیلم‌های خوراکی نمی‌باشند. فیلم‌های خوراکی دارای مزایای بسیاری هستند که برخی از آن ها عبارتند از : جلوگیری از انتقال رطوبت، جلوگیری ازخروج ترکیبات فرار موجود در ماده غذایی، کاهش در سرعت تنفس، ممانعت دربرابر عبور چربی‌ها و روغن ها، به تاخیر انداختن تغییرات در بافت ماده غذایی و عبوردهی انتخابی گازهایی نظیر اکسیژن و دی اکسید کربن (۱۰). کیتوزان یک کربوهیدرات کاتیونی اصلاح شده است که با استیل زدایی کیتین بدست می‌آید. کیتین ترکیب اصلی اسکلت خارجی بندپایایان مانند حشرات، خرچنگ ها، میگوها، لابسترهاست و در دیواره سلولی نوع خاصی از جلبک‌ها نیز یافت می شود که پس از سلولز، فراوانترین پلی ساکارید موجود در طبیعت می باشد (۳۶). کیتوزان طی سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب نموده است و قابلیت و کابرد در پزشکی، کشاورزی، صنایع غذایی و صنایع شیمیایی به اثبات رسیده است. کیتوزان به عنوان یک ترکیب غیر سمی، زیست سازگار، زیست فعال، زیست تخریب پذیر، شناخته می‌شود و در مطالعات متعددی خواص ضد میکروبی و ضدقارچی آن را گزارش نموده اند. به دلیل وزن مولکولی بالا و قابلیت انحلال در محلول‌های اسیدی قابلیت تشکیل ژل و فیلم را دارا می باشد. نتایج مقایسه کیتوزان با سایر فیلم‌های فعال با پایه مولکول‌های زیستی نشان داده است که کیتوزان به دلیل فعالیت ضدباکتریایی و قابلیت کلاته کردن مواد معدنی دو ظرفیتی آن مزایای بیشتری دارد. کیتوزان به‌دلیل خواص تشکیل فیلم و خواص منحصر به فرد افزایش ویسکوزیته به محض آبگیری، قابلیت استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی به ویژه به عنوان پوشش و فیلم خوراکی را دارا می‌باشد. برای فیلم‌های کیتوزان برخی خواص کاربری شامل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و نفوذناپذیری در برابر عبور اکسیژن گزارش شده است(۸، ۱۱، ۳۶). بسته بندی فعال نیز یکی از انواع بسته‌بندی است و حاصل تعامل بین ترکیبات سازنده بسته بندی با اجزای آن و غذا یا اتمسفر داخل غذا بوده و سبب حفظ کیفیت و تازگی فرآورده می‌شود (۱۹). بسته‌بندی فعال موجب مهار اکسیژن و اتیلن، ورود و خروج دی‌اکسیدکربن، تنظیم رطوبت، انتشار آنتی اکسیدان‌ها، انتشار یا جذب مولکول‌های عطر و طعم و یا جلوگیری از

1- Biodegradable

رشد باکتری‌ها می‌شود (۱۶). بسته بندی‌های فعال آنتی اکسیدانی دسته مهمی از بسته بندی‌ها می‌باشند که به عنوان یک روش نوید بخش جهت گسترش مدت ماندگاری مواد غذایی مطرح می‌باشند. عصاره استخراج شده از گیاهان و ادویه جات منابع غنی از ترکیبات فعال بیولوژیکی مانند ترپنوئیدها و فنولیک اسیدها می‌باشند (۴۰). فیلم‌هایی که به وسیله بیوپلیمرهای طبیعی تهیه شده‌اند دوستدار محیط زیست بوده و در عین حال همه مزایای مورد انتظار از بیوپلیمرها و مواد بسته‌بندی را دارا می‌باشند (۳۰). علاوه براین، زمانی‌که عوامل ضد میکروبی و ضداکسیداسیونی به فیلم‌های خوراکی اضافه می‌شوند به آهستگی رها می‌شوند، در نتیجه در یک مدت زمان طولانی و در یک غلظت بالا بر روی مواد غذایی باقی می‌مانند (۲۸). استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به جای مواد نگهدارنده شیمیایی نگرانی‌های ناشی از مصرف اینگونه مواد را کاهش می‌دهند. ترکیب، ساختار و گروه‌های عاملی اسانس‌ها و عصاره ها نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی آن ها ایفا می‌کنند (۱۳). شیرین بیان با نام علمی (Glycyrrhiza glabra) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی بومی ایران است که میزان قابل توجهی از آن سالیانه به سایر کشورها صادر می‌شود. ماده اصلی این گونه، ترکیب ساپونین تری ترپنوئیدی به نام اسید گلیسیریزیک یا گلیسریزین با شیرینی ۳۰ تا ۵۰ برابر ساکارز است که در صنایع غذایی و دارویی کاربرد دارد. ریشه آن حاوی قندهای مختلف فلاونوئیدها، استرول ها، نشاسته، اسیدهای آمینه، صمغ و روغن‌های اساسی است (۴). از لحاظ تجاری عمده شیرین بیان دنیا توسط کشورهای اسپانیا، عراق، ایران، روسیه و چین تولید می‌شود (۱۵). محققین متعددی خواص آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی گیاه شیرین بیان را مورد بررسی قرار داده‌اند و به این نتیجه رسیدند که این گیاه از خواص بسیار خوبی علیه باکتری‌های سالمونلا تیفی، شیگلا فلکستری، شیگلاسونتی و اشرشیاکلای (۲ و ۳۴) و بر روی باکتری‌های استرپتوکوک کوتانز، استرپتوکوکوس سانگوئیس(۳۲) برخوردار است. همچنین در تحقیق دیگری (۵) که به بررسی مقایسه‌ای فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره شیرین بیان و آنتی‌اکسیدان‌های تجاری پرداختند، مشخص شد که عصاره گیاه مذکور از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری برخوردار بوده و استفاده از غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد آن به‌منظور افزایش ماندگاری مواد غذایی پیشنهاد می‌شود .با توجه به اهمیت گیاه شیرین بیان و به منظور دستیابی به حداکثر بهره وری از این محصول و ضایعات حاصل از آن پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر استفاده از عصاره شیرین بیان در تهیه فیلم خوراکی کیتوزان انجام شد. پس از تهیه فیلم مذکور به بررسی خواص کاربردی آن پرداخته شد و در مرحله نهایی از فیلم تهیه شده جهت بسته بندی فیله‌های تازه ماهی فیتوفاگ استفاده شد، تا تاثیر استفاده از عصاره شیرین بیان در حفظ کیفیت و ماندگاری فیله‌ها تعیین شود.

۲- مواد و روش

۲-۱- مواد مصرفی

ماهی فیتوفاگ، کیتوزان (سیگما)، عصاره شیرین بیان (شرکت شیرین بیان زاگرس)، کلروفرم، سود، اتانول، ۱-بوتانل، معرف TBA، معرف نشاسته، معرف فنل فتالئین، اکسید منیزیم، محیط های کشت Brain Heart Infusion broth (BHI), Muller Hinton, Plate Count Agar، باکتری‌های لیستریا مونو سایتوژنز[1] (PTCC 1162) و اشرشیاکلی[2](PTCC 1533) تهیه شده از مرکز پژوهش-های علمی و صنعتی ایران، اسید استیک گلاسیال، تیوسولفات سدیم، متانول،اسید بوریک، متیل‌رد، اسید سولفوریک، کاغذ صافی بدون خاکستر واتمن ۴۲، آب مقطر، فویل آلومینیومی.

۲-۲- تجهیزات

هموژنایزر (IKA, T25 digital, ULTARA-TURRAX, Germeny)، همزن مغناطیسی (Yellow line MSH basic, Germeny)، آون

1-Listeria Monocytogenes PTCC 1162
2-Eschericha Coli PTCC 1533

inder 7200, Germeny)، ترازوی ۰/۰۰۰۱ (Sartorius, TE 2145, Germeny)، ترازوی ۰/۰۰۱ (Sartorius,BP 310P, Germeny)، دستگاه pH سنج (Metrohm 713 pH meter, Germeny) دستگاه خرد کن (Moulinex)، فریزر، یخچال، سلول شیشه‌ای اندازه گیری نفوذپذیری به بخار آب، بن ماری (Memmert, Germeny)، اتوکلاو (ریحان طب، ایران)، هود میکروبیولوژی مجهز به لامپ یو وی و شعله گازی، دسیکاتور، دسیکاتور ایجاد کننده خلاء، میکرومتر و کولیس از نوع Mitutoyo ساخت کشور ژاپن.

۲-۳ - مراحل انجام پژوهش

به منظور انجام تحقیق حاضر، در مرحله اول فیلم کیتوزان (۲٪) تهیه شد و به منظور بررسی خواص گیاه شیرین بیان از عصاره آن با غلظت‌های مختلف (۵-۱۰-۱۵ درصد حجمی/ حجمی) استفاده شد. در مرحله بعد، پس از تهیه تیمارهای مختلف فیلم کیتوزان حاوی عصاره‌های گیاهی، به بررسی خواص کاربردی فیلم‌های تولیدی پرداخته شد. خصوصیات مورد بررسی شامل موارد زیر می‌باشند:

۲-۳-۱ - سنجش ضخامت فیلم‌ها

ضخامت فیلم‌های تولید شده با استفاده از میکرومتر دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ اندازه گیری شد. اندازه‌گیری در پنج نقطه از هر نمونه تکرار شد. میانگین ضخامت نقاط مختلف هر فیلم در محاسبات ویژگی‌های مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب مورد استفاده قرار گرفت (۳۸).

۲-۳-۲ - نفوذ پذیری در برابر بخار آب[1]

اندازه‌گیری میزان نفوذ پذیری فیلم تولید شده در برابر بخار آب روش E96 مصوب ASTM انجام شد (۶). از سلول‌های اندازه‌گیری استفاده شد و درون آن‌ها آب ریخته شد و سطح سلول با فیلم پوشانده شد و سپس فیلم توسط گریس و پارافیلم به سلول اندازه‌گیری فیکس شده و درون دسیکاتور حاوی سلیکاژل قرار داده شدند. آب در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد رطوبت ۱۰۰٪ ایجاد می کند. اختلاف رطوبت در دو سمت روکش در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد اختلاف فشار بخاری معادل $۲/۳۳۷ \times ۱۰^{۳}$ پاسکال ایجاد می کند. تغییرات وزن سلول‌ها در طول زمان (با فاصله هر یک ساعت در مدت ۸ ساعت) با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. سپس با رسم منحنی تغییرات وزن سلول نسبت به زمان، یک خط راست حاصل شد. نرخ انتقال بخار آب معادل با شیب خط حاصله تقسیم بر سطح سلول است و از رابطه ۱ بدست می آید.

رابطه(۱) سطح سلول/شیب خط= نرخ انتقال بخار آب ($^{-۲}$متر $^{-۱}$ ثانیه گرم)

جهت محاسبه میزان نفوذپذیری به بخار آب از رابطه۲ استفاده شد.

رابطه(۲) $۲/۳۳۷ \times ۱۰^{۳}$ (ضخامت فیلم × نرخ انتقال بخار آب) =نفوذپذیری به بخار آب ($^{-۱}$ پاسکال $^{-۱}$ متر $^{-۱}$ ثانیه گرم)

۲-۳-۳- سنجش میزان جذب آب فیلم تولید شده

نمونه‌ها در اندازه ۲ × ۲ سانتی‌متر آماده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دسیکاتور قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ توزین گردید تا وزن اولیه نمونه‌ها محاسبه شود. سپس نمونه‌ها در ظرف درب دار حاوی ۳۰ میلی لیتر آب مقطر با pH=۷ و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد قرار داده شد. به منظور تعیین میزان جذب، نمونه فیلم به صورت دوره‌ای و در فواصل زمانی معین از ظرف خارج شده و تا رسیدن به وزن ثابت توزین شد و میزان جذب رطوبت از رابطه زیر محاسبه گردید (۲۲).

رابطه (۳)

[(وزن فیلم قبل از غوطه وری-وزن فیلم پس از غوطه وری)/(وزن فیلم قبل از غوطه وری)]×۱۰۰=درصد جذب رطوبت

۲-۳-٤ - سنجش میزان حلالیت فیلم‌ها

جهت اندازه‌گیری حلالیت فیلم‌ها ابتدا وزن اولیه نمونه‌ها (۴×۴ سانتیمتر) پس از خشک شدن در دمای ۱۰۵ درجه‌ی سانتیگراد مشخص شد. سپس نمونه‌ها در داخل ظروف حاوی ۵۰ سی سی آب مقطر قرار گرفتند و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد تکان داده شدند. پس از این مدت نمونه‌ها توسط کاغذ صافی که از قبل خشک شده و توزین شده بود فیلتر شدند و مجددا در دمای

1-Water Vapor Permeability

۱۰۵ درجه‌ی سانتیگراد خشک شدند و میزان حلالیت فیلم تولیدی از رابطه ۴ محاسبه گردید (۲۲).

رابطه(۴) وزن نمونه خشک اولیه/ ۱۰۰× (وزن فیلم بعد از غوطه وری- وزن نمونه خشک اولیه) = درصد حلالیت فیلم

۲-۳-۵ - سنجش خواص ضد میکروبی فیلم

به‌منظور تعیین اثرات ضدمیکروبی از فیلم‌های تولید شده بر علیه باکتری‌های اشرشیاکلی، لیستریا مونو سیتوژنز از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد (۱۱). سویه‌های باکتریایی مورد استفاده از مرکز کلکسیون میکروبی ایران تهیه شدند. به این منظور ابتدا یک لوپ از هر یک از دو گونه باکتری در لوله‌های حاوی ۱۰ سی سی محیط کشت BHI افزوده شد و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شد تا تعداد باکتری‌ها به اندازه کافی افزایش یابد. سپس از طریق سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه محیط کشت از باکتری جدا گردید و از طریق میزان جذب با اسپکتروفتومتر تعداد باکتری‌ها به 10^8 رسانده شد و میزان جذب به عنوان شاخصی از بار باکتریایی استفاده گردید. به این صورت که پس از کشت جذب‌های مختلف مشخص گردید که جذب ۰/۱-۰/۰۸ معادل 10^8 بار باکتریایی می‌باشد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از مایع حاوی هر باکتری بر روی محیط مولر هینتون آگار بصورت چمنی کشت داده شد. سپس دیسک‌هایی به قطر ۶ میلی متر از فیلم ها که قبلا در شرایط استریل تولید شده بودند بر روی پلیت‌ها قرار داده شدند (۱۱). در پایان پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. اختلاف قطر هاله‌های تشکیل شده از قطر دیسک‌ها به عنوان شاخص فعالیت ضدمیکروبی فیلم ها در نظر گرفته شد. پس از انتخاب مناسب ترین فیلم‌ها، از آن‌ها به منظور پوشش فیله ماهی فیتوفاگ جهت نگهداری در یخچال استفاده شد. آزمایشات فساد شیمیایی روی فیله های ماهی در طی ۱۲ روز نگهداری در یخچال (با فاصله ۴ روز) انجام شد.

۲-٤- مرحله دوم: بررسی اثر فیلم‌های تولید شده بر ماندگاری فیله‌های ماهی

۲-٤-۱- آماده سازی ماهی

۳۰ کیلوگرم ماهی فیتوفاگ با میانگین وزنی ۱۰۰±۱۰۰۰ گرم از بازار ماهی فروشان تهیه شد و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از شستشو، تخلیه شکمی و سرزنی، فیله‌های ماهی تهیه شدند و پس از شستشوی مجدد جهت پوشش‌دهی توسط فیلم‌های تولیدی، در مجاورت یخ نگهداری شدند. فیله‌های تازه ماهی فیتوفاگ در فیلم های تولید شده، بسته بندی شدند و به مدت ۱۲ روز در یخچال نگهداری شدند (۳۵). در طی این مدت (فواصل زمانی ۴ روز) فاکتورهای سنجش کیفیت فیله‌ها و تاثیر فیلم‌های مورد استفاده بر حفظ کیفیت آن‌ها بر طبق روش‌های زیر مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-٤-۲- اندازه‌گیری میزان پراکساید (PV) [1]

۱۵۰گرم نمونه به کمک همزن مکانیکی با ۲۵۰میلی‌لیتر کلروفرم کاملا مخلوط شد (۱۰دقیقه)، سپس از یک صافی فیلترگردیدومحلول صاف شده ازصافی دیگری که تا نیمه ازسولفات سدیم خشک پر شده بود، عبورداده شد،این محلول برای مراحل دیگرحفظ گردید. ۱۰ میلی‌لیتر ازاین محلول دریک پتری دیش کاملا خشک و وزن شده (با دقت هزارم) ریخته شد و زیرهود قرارداده شد تاکلروفرم آن تبخیرشود و پس ازآن به مدت یک ساعت درآون ۱۰۵ درجه‌ی سانتیگراد قرارداده شد تا خشک گردد و پس ازسردشدن در دسیکاتور، وزن گردید. وزن چربی حاصل برای محاسبه پراکسید استفاده گردید.۲۵ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده برداشته شد و ۳۷ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱ سی سی یدید پتاسیم اشباع اضافه گردید و دقیقا بعد از یک دقیقه ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر و کمی معرف چسب نشاسته به آن اضافه شد و در ادامه ید آزاد شده با محلول تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تا ظهور رنگ شیری تیتر گردید و مقدار پراکسید بر حسب میلی اکی والان گرم

1-Peroxide Value

اکسیژن در کیلوگرم ماده چرب طبق رابطه ۵ محاسبه شد (۹).

رابطه (۵) (وزن نمونه روغن) / (۱۰۰۰ × نرمالیته × حجم تیو سولفات مصرفی)=PV

۲-٤-۳-اندازه گیری میزان تیو باربیتوریک اسید[1](TBA)

اندازه گیری TBA به وسیله روش رنگ سنجی انجام گرفت. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه چرخ شده ماهی به یک بالن ۲۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس با ۱- بوتانل به حجم رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر از مخلوط فوق به لوله های خشک دربدار وارد شده و به آن ۵ میلی‌لیتر از معرف TBA افزوده شد (معرف TBA به وسیله حل شدن ۲۰۰ میلی‌گرم ت در ۱۰۰ میلی لیتر حلال ۱- بوتانل پس از فیلتر شدن بدست می آید). لوله‌های دربدار در حمام آب با دمای ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفته و پس از آن در دمای محیط سرد شدند. سپس مقدار جذب (As) در ۵۳۲ نانومتر در مقابل شاهد آب مقطر (Ab) خوانده شد. مقدار TBA (میلی گرم مالون دی آلدئید در کیلوگرم بافت ماهی) بر اساس رابطه۶ محاسبه گردید (۱۹).

رابطه (۶) TBA = (مقدار جذب شاهد-مقدار جذب نمونه)×۵۰/۲۰۰

۲-٤-٤- اندازه‌گیری میزان بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)

۱۰ گرم از نمونه گوشت چرخ شده ماهی را همراه با ۲ گرم اکسید منیزیم و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل بالن کلدال ریخته، سپس بالن را به دستگاه وصل کرده و از زیر به آن حرارت داده شد. در انتهای دستگاه یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محلول اسید بوریک ۲٪ (۲ گرم اسید بوریک در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر به حجم رسانده) به همراه چند قطره معرف متیل رد (۰/۱ گرم متیل رد در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول به حجم رسانده) قرار داده شد. عمل تقطیر تا گذشت ۴۵ دقیقه از زمان جوشش مواد درون بالن، با جمع شدن حدود ۵±۱۰۰ میلی‌لیتر مایع در ارلن مایر ادامه یافت. محلول اسید بوریک به محض قلیایی شدن توسط بازهای ازته فرار تقطیر شده زرد رنگ می شود. عمل تیتراسیون توسط اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تا جایی ادامه یافت که محلول دوباره قرمز رنگ شود. مقدار TVB-Nبه صورت میلی‌گرم در صد گرم گوشت ماهی با توجه به رابطه ۷ به‌دست می‌آید.

رابطه(۷)

TVB-N= حجم سود مصرفی ×۱۴

۲-٤-۵- آنالیز میکروبی

به‌منظور انجام آزمایشات میکروبی ۵ گرم از نمونه گوشت ماهی (که از بخش استریل زیرین بافت برداشته شده بود) با ۴۵ میلی‌لیتر از محلول سرم فیزیولوژی مخلوط و هموژن شده و متعاقب آن رقت‌های مورد نیاز تهیه شد. ۱ میلی لیتر از هر رقت برای کشت باکتری‌ها در محیط پلیت کانت آگار (PCA[2]) قرار گرفت. نمونه های کشت داده شده در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت برای شناسایی بار کل باکتریایی[3] و در انکوباتور ۷ درجه‌ی سانتیگراد (به دلیل تشکیل کلونی های قابل شمارش در این دما) به مدت ۱۰ روز برای شناسایی باکتری‌های سرمادوست قرار گرفتند و پس از طی مدت انکوباسیون، کلونی‌ها شمارش شدند (۳۵).

۲-٤-٦-تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS انجام گرفت و تمام آزمایش‌ها با حداقل ۳ تکرار انجام گرفتند. در مرحله اول به منظور بررسی خواص کاربردی تیمارها به تفکیک از تجزیه واریانس یک طرفه[4] استفاده شد. همچنین جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح اطمینان ۵٪ استفاده گردید. پس از تعیین مناسب‌ترین تیمارها از لحاظ خواص فیزیکی و مکانیکی به منظور بررسی تاثیر همزمان دو عامل زمان و پوشش خوراکی از طرح کاملا تصادفی در

1-Thiobarbituric Acid

2-Plate Count Agar
3-Total Count

قالب اسپلیت پلات در زمان استفاده شد. همچنین به منظور مقایسه میانگین ها از آزمون LSD در سطح اطمینان ۵٪ استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

در تحقیق حاضر پس از تهیه فیلم های حاوی عصاره شیرین بیان به بررسی خواص کاربردی آن‌ها پرداخته شد. نتایج حاصل از آزمون‌های اندازه گیری خواص فیزیکی، نوری و میکروبی فیلم های مذکور در زیر آمده است.

۳-۱- خواص فیزیکی فیلم‌ها (نفوذپذیری به بخار آب، حلالیت و رطوبت)

مقادیر درصد حلالیت، تورم‌پذیری، نفوذپذیری به بخار آب و ضخامت فیلم‌های مختلف در جدول ۱ آمده است. نفوذپذیری به بخار آب یکی از مهمترین ویژگی‌های فیلم‌های زیست تخریب پذیر است که از طریق سنجش نرخ انتقال بخار آب نسبت به زمان سنجیده می شود. در نمونه فیلم‌های تولید شده، فیلم کیتوزان (شاهد) دارای ۰/۷۱۵ (10^{-10}×پاسکال×$^{-1}$متر$^{-1}$ثانیه گرم) نفوذپذیری به بخار آب بود و کمترین نفوذپذیری به بخار آب مربوط به نمونه ها حاوی ۵٪ و ۱۰٪ عصاره شیرین بیان بود($P<0/05$) افزایش میزان عصاره شیرین بیان تا ۱۰٪ کاهش نفوذپذیری به بخار آب همراه داشت($P<0/05$) اماافزایش درصد عصاره به ۱۵٪ سبب افزایش نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های تولیدی شد($P<0/05$) که این امر می‌تواند به دلیل تخریب ساختار فیلم در حضور ۱۵٪ عصاره باشد. لازم به ذکر است که با وجود افزایش نفوذپذیری در غلظت ۱۵٪ عصاره، همچنان تیمار شاهد دارای بالاترین میزان نفوذ پذیری به بخار آب بود ($P<0/05$). ماهیت شیمیایی مولکول‌ها، وزن مولکولی، جهت‌گیری[1] و میزان اتصالات عرضی، جذب سطحی، رطوبت نسبی و میزان نرم‌کننده بر خواص بازدارندگی فیلم‌ها تاثیر می‌گذارد. علاوه بر موارد فوق افزایش مواد آب دوست، به دلیل جذب و دفع مولکول‌های آب، به‌عنوان افزایش‌دهنده نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌ها شناخته شده است (۷، ۳۷ و ۳۹). این نتایج همسو با گزارش پایرز[2] و همکاران (۲۷) در مورد اثر اسانس‌های مختلف بر خصوصیات فیلم پروتئین ماهی هیک بود. نتایج آن‌ها نشان داد کهافزودن اسانس باعث کاهش نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌ها شد، این نتیجه به آبگریزی بیشتر فیلم‌های حاوی اسانس مربوط می‌شود.

جدول ۱- خواص فیزیکی و نفوذپذیری فیلم‌ها

تیمار	نفوذ پذیری به بخار آب (10^{-10}×پاسکال×$^{-1}$متر$^{-1}$ثانیه گرم)	حلالیت (٪)	ضخامت (میلیمتر)	تورمپذیری (٪) (جذب رطوبت)
کیتوزان (شاهد)	۰/۷۱۵^{a}±۰/۰۱۵	۲۳/۵۷^{a}±۰/۶	۰/۰۵^{a}±۰/۱	۶۲/۴۰^{a}±۱/۱۴
کیتوزان-ش ۵٪	۰/۲۶۳^{d}±۰/۰۰۵	۱۴/۰۹^{b}±۰/۱۹	۰/۰۲۵^{b}±۰/۰۱	۵۶/۰۹ ^{a}±۰/۳۹
کیتوزان-ش ۱۰٪	۰/۲۶۵^{d}±۰/۰۱۵	۱۹/۷۵^{c}±۰/۲۵	۰/۰۲۴^{b}±۰/۱۶	۵۷/۳۵^{a}±۱/۲۶
کیتوزان-ش ۱۵٪	۰/۶۰۶^{b}±۰/۰۱۱	۱۹/۱۲^{d}±۰/۰۸	۰/۰۶^{a}±۰/۰۶	۵۹/۵۴^{a}±۱/۶۴

× کیتوزان- شیرین بیان

حروف کوچک لاتین در هر ستون، نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح$P<0/05$ می باشد.

1-Orientation
2-Pires

حلالیت یک خصوصیت مهم در فیلم‌های زیست تخریب پذیر است، زیرا می‌تواند تعیین‌کننده میزان مقاومت فیلم نسبت به آب خصوصا در محیط‌های مرطوب مواد غذایی گوشتی باشد. از سویی دیگر حلالیت تعیین‌کننده سرعت آزاد شدن ترکیبات ضداکسیداسیونی و ضد میکروبی از فیلم در زمان تماس با ماده غذایی باشد (۱۱). همانطور که در جدول ۱ مشخص است، افزودن عصاره شیرین بیان سبب کاهش میزان حلالیت فیلم‌ها شد ($P<۰/۰۵$) و نمونه شاهد بیشترین حلالیت را در بین نمونه‌های تولیدی داشت ($P<۰/۰۵$).این امر را می توان با توجه به ساختار و عملکردهای متفاوت اسانس‌ها و عصاره های گیاهی مختلف در ماتریکس پلیمر نسبت داد. این پدیده به علت تشکیل اتصالات کووالانسی بین زنجیرهای کیتوزان و عصاره گیاهی می باشد. ایجاد این اتصالات منجر به کاهش گروههای هیدروکسیل و آمین آزاد موجود در شبکه فیلم شده و اتصالات هیدروژنی موجود را کاهش داده و در نتیجه سبب کاهش میزان نفوذ پذیری به بخار آب می‌شود. یکی دیگر از معیارهایی که برای تعیین خواص جذب رطوبت در فیلم مورد استفاده قرار می‌گیرد، تعیین میزان جذب آب و یا تورم‌پذیری فیلم‌ها می باشد. دانستن روند جذب رطوبت در پیش بینی کیفیت و مقاومت فیلم طی بسته‌بندی و نگهداری مواد غذایی کمک می‌کند. در فیلم‌های تهیه شده در تحقیق حاضر، بیشترین میزان جذب رطوبت مربوط به تیمار شاهد می‌باشد و در فیلم‌های تولیدی، افزایش غلظت عصاره شیرین بیان موجب کاهش جذب رطوبت توسط فیلم‌ها شده است اما اختلاف معنی دار آماری میان تیمارها مشاهده نشد.

۳-۲- خواص ضد میکروبی فیلم‌ها

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی فیلم های کیتوزان (شاهد) و کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف عصاره شیرین بیان در جدول۲ آمده است.

جدول ۲- خواص ضد میکروبی فیلم های تولیدی

نوع فیلم	باکتری	
	E.coli	L. monocytogenes
کیتوزان (شاهد)	-	-
کیتوزان-ش ۵٪	-	+
کیتوزان-ش ۱۰٪	++	++
کیتوزان-ش ۱۵٪	++	++

++: اثر مهار کنندگی خوب و ایجاد هاله در اطراف دیسک،

+: اثر مهار کنندگی ضعیف (عدم رشد باکتری در زیر دیسک و عدم ایجاد هاله در اطراف آن)، -: فاقد اثر مهار کنندگی (۱۱).

همان طور که در جدول۲مشخص است، فیلم کیتوزان (شاهد) از رشد باکتری‌ها جلوگیری نکرده و هر دو باکتری اشرشیاکلی و لیستریا بر روی دیسک فیلم مورد نظر رشد کردند. در تیمارهای کیتوزان-ش ۵٪، افزودن عصاره شیرین بیان به فیلم بازدارندگی کمی در برابر رشد باکتری *L. monocytogen* ایجاد کرد و باکتری‌ها در زیر دیسک‌های فیلم رشد نکردند، اما هاله ای هم در اطراف دیسک ایجاد نشد.با افزودن غلظتعصاره شیرین بیان به میزان ۱۰ و ۱۵٪ به محلول فیلم ساز، بازدارندگی فیلم‌های تولید شده در برابر باکتری‌های مورد بررسی افزایش معنی‌داری داشت بطوریکه در فیلم کیتوزان-شیرین بیان ۱۵٪ هاله‌ای به قطر ۱۱ میلی‌متر علیه باکتری *E.coli* و هاله‌ای به قطر ۱۴ میلی‌متر علیه باکتری *L. monocytogen* در اطراف فیلم تشکیل شد. تاثیر عصاره بر باکتری گرم مثبت بیشتر از باکتری گرم منفی بوده که با تحقیق سایر محققین (۱) همخوانی داشت. در توضیح خاصیت ضدباکتریایی فیلم

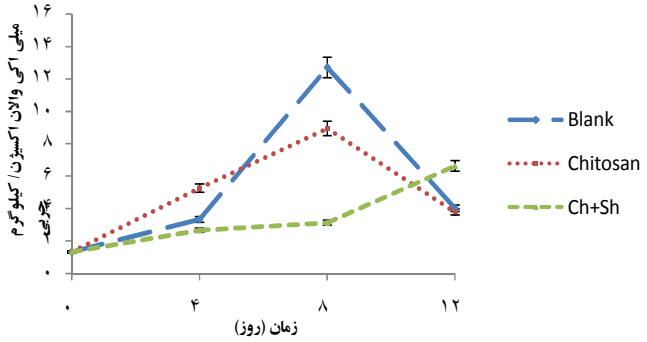
های تولید شده می‌توان گفت که ریشه شیرین بیان حاوی ترکیبات متعددی چون روغن‌های فرار، استرول گیاهی، فلاونوئیدها و ساپونین‌ها می‌باشد و به‌عنوان یک منبع غنی از ترکیبات ساپونین در نظر گرفته می‌شود. فعالیت ضد میکروبی ساپونین در برابر تعداد زیادی از پاتوژن‌های بیماری‌زا به اثبات رسیده است (۲۱ و ۳۳). در تحقیقات سایر محققین اثر ضدباکتریایی عصاره شیرین بیان بر روی باکتری‌های سالمونلاتیفی، شیگلا فلکستری، شیگلا سونتی و اشرشیاکلای (۲ و ۳۴) و بر روی باکتری های استرپتوکوک کوتانز، استرپتوکوکوس سانگوئیس(۳۲) گزارش شده است.

۳-۳- بررسی اثر فیلم‌های تولید شده بر ماندگاری فیله‌های ماهی

بعد از انجام آزمون‌های سنجش کیفیت انواع فیلم‌های ساخته شده، از فیلم‌هایی که از لحاظ خصوصیات کاربردی بهتر از سایر فیلم‌ها بودند(تیمار کیتوزان- شیرین بیان ۱۰٪) به منظور بسته بندی فیله های ماهی فیتوفاگ استفاده شد. همچنین جهت مقایسه میزان حفظ کیفیت فیله‌ها از فیلم شاهد (کیتوزان) نیز استفاده شد تا تاثیر افزودن عصاره شیرین بیان به فیلم در حفظ کیفیت ماهی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

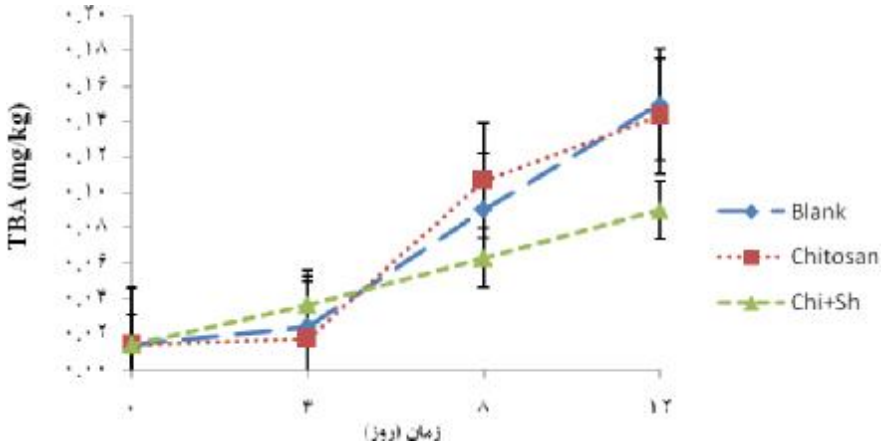
۳-۳-۱- اکسیداسیون چربی

اکسیداسیون چربی یکی از مهمترین دلایل فساد گوشت و کاهش کیفیت آن می‌باشد که سبب کاهش ارزش غذایی و تولید ترکیبات سمی می‌شود (۲۶). در اثر اکسیداسیون چربی، هیدروپراکسید تولید می‌شود که هیدروپراکسیدهای حاصله در اثر واکنش با سایر مولکول‌ها سبب از دست رفتن رنگ و ایجاد بوی نامطلوب می‌شوند. کاراکام و بوران (۱۶) گزارش کردند که میزان پراکسید در ماهی بسیار تازه باید زیر ۲ میلی اکی والان اکسیژن در کیلوگرم چربی باشد و در ماهی تازه مقدار آن نباید بیشتر از ۵ میلی اکی والان اکسیژن در کیلوگرم چربی باشد. از این‌رو با اندازه‌گیری میزان پراکسید تولیدی می‌توان به تازگی و قابل مصرف بودن یا نبودن گوشت پی برد. از آنجا که پراکسیدها ترکیباتی بدون طعم و بو هستند، نمی‌توانند به وسیله مصرف کنندگان تشخیص داده شوند. این ترکیبات باعث به وجود آمدن ترکیبات ثانویه مثل آلدئیدها و کتون ها می شوند که سبب تشخیص تند شدن اکسیداسیونی می‌شوند (۲۶). همانطور که در شکل ۱ مشخص است، میزان پراکسید در تمام تیمارها طی دوره نگهداری افزایش یافته است ($P<۰/۰۵$). در تیمار شاهد و تیمار پوشیده شده با فیلم کیتوزان این میزان در روز هشتم نگهداری به بیشترین حد خودرسید ($P<۰/۰۵$) و پس از آن روندی کاهشی داشت. در تیمارهای پوشیده شده با فیلم کیتوزان حاوی عصاره شیرین بیان روند افزایشی میزان پراکسید تا روز دوازدهم ادامه داشت ($P<۰/۰۵$).



شکل ۱- مقادیر پراکسید فیله‌های ماهی بسته‌بندی شده (شاهد، کیتوزان، کیتوزان حاوی شیرین‌بیان) طی نگهداری در یخچال

پراکسید تولیدی در طی فرایند اکسیداسیون ناپایدار است و تبدیل به یکسری ترکیبات دیگر از جمله آلدهیدها، الکل‌ها و کتون‌ها می‌شود. به همین دلیل اندازه‌گیری پراکسید به تنهایی جهت ارزیابی فساد کافی نبوده و استفاده از سایر روش‌ها ضروری به نظر می‌رسد. مرحله دوم اکسیداسیون با ظهور ترکیبات کربونیل آغاز می‌شود که با شاخص TBA می‌توان یکی از انواع آلدهیدهای تولیدی به‌نام مانول آلدهید را اندازه‌گیری کرد. تست TBA به شکل گسترده‌ای جهت ارزیابی گوشت مورد استفاده قرار می‌گیرد. همانطور که در شکل ۲ مشخص است، در ابتدای دوره نگهداری میزان تیوباربیتوریک اسید فیله‌های ماهی بسیار پایین بوده که نشان از تازگی ماهی مورد استفاده دارد. در طی دوره نگهداری میزان تیوباربیتوریک اسید تمام نمونه‌ها روند افزایشی داشت که این امر به‌دلیل تشکیل ترکیبات آلدهیدی حاصل از شکست پراکسیدها می‌باشد.



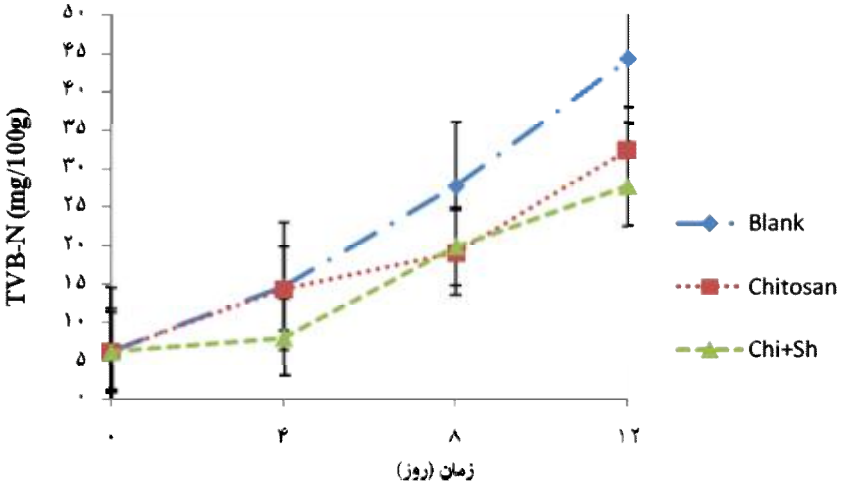
شکل ۲- مقادیر تیوباربیتوریک اسید فیله‌های ماهی بسته‌بندی شده (شاهد، کیتوزان، کیتوزان حاوی شیرین‌بیان) طی نگهداری در یخچال

همان طور که در شکل ۲ دیده می‌شود میزان تیوباربیتوریک اسید نمونه‌های فیله ماهی در زمان صفر بسیار پایین و در حدود ۰/۰۱۴ میلی گرم مالون آلدئید بر کیلوگرم گوشت بود. در طی دوره نگهداری در یخچال میزان تیوباربیتوریک اسید نمونه‌ها افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). این افزایش در تیمار پوشیده شده با کیتوزان حاوی عصاره کمتر از سایر تیمارها بود($P<۰/۰۵$).علاوه بر موارد ذکر شده، در بین تیمارهای اعمال شده، فیله‌های پوشیده شده با فیلم حاوی عصاره شیرین بیان ۱۰٪ کمترین میزان تیوباربیتوریک اسید را نشان داد که این امر می تواند به دلیل خاصیت ضد اکسیداسیونی عصاره شیرین بیان باشد که سبب کندتر کردن روند اکسیداسیون چربی در فیله‌های ماهی بسته بندی شده باشد. برخی از اجزاء شیمیایی شیرین بیان مانند فلاونوئیدهای پلی فنولیک، به عنوان آنتی‌اکسیدان شناخته شده اند. این احتمال می رود که تاثیر سینرژیستیک فلاونوئیدهای فوق سبب بروز اثرات آنتی‌اکسیدانی بالای این گیاه شود (۵).

۳-۳-۲-مقادیر بازهای ازته فرار بافت ماهی

یکی از شاخص‌های تشخیص تازگی ماهی اندازه‌گیری کل بازهای نیتروژنی فرار است که دامنه وسیعی از ترکیبات فرار نظیر آمونیاک، متیل آمین، دی متیل آمین، تری متیل آمین و ... را شامل می‌شود و در اثر فعالیت‌های میکروبی تولید می‌شوند (۳۱). در حالت کلی میزانTVB-Nتحت تاثیر گونه، جنس، محل صید، فصل و سن ماهی تغییر می‌کند

(۱۸) همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، در ابتدای دوره نگهداری (روز صفر) میزان بازهای ازته فرار فیله ها بسیار کم و در حدود ۶/۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت بوده است که با گذشت زمان در همه تیمارها افزایش آن دیده شد (P<۰/۰۵) در بین تیمارهای مورد آزمون نیز اختلاف معنی‌دار آماریی وجود داشت (P<۰/۰۵). در پایان دوره نگهداری (روز دوازدهم) بیشترین میزان بازهای ازته فرار در تیمارهای شاهد دیده شد (۴۴/۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت) و کمترین میزان بازهای ازته فرار در فیله‌های پوشیده شده با کیتوزان حاوی عصاره (۲۷/۷ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت) گزارش شد (P<۰/۰۵).



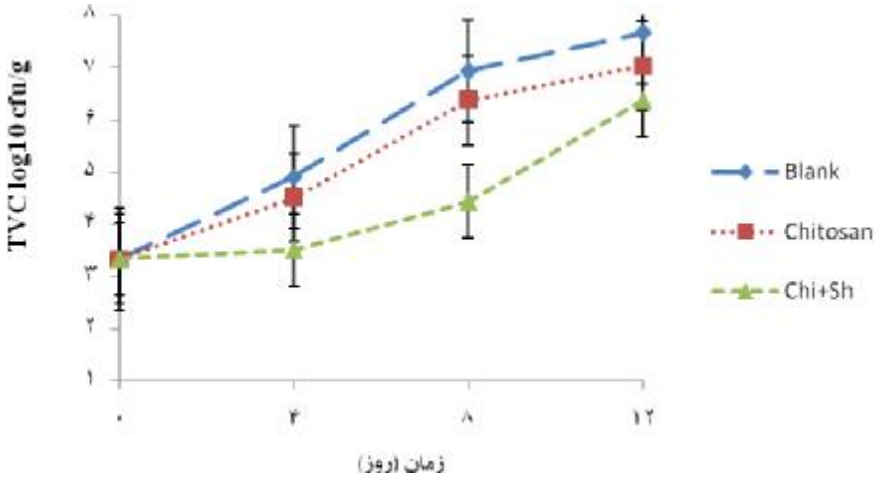
شکل ۳- مقادیر بازهای ازته فرار فیله‌های ماهی بسته‌بندی شده (شاهد، کیتوزان، کیتوزان حاوی شیرین بیان) در طی نگهداری در یخچال

زمانی که میزان TVB-N در بافت ماهی به بالاتر از ۳۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم بافت برسد، از نظر مصرف کننده فاسد می‌باشد. در تحقیق حاضر میزان TVB-N تیمارهای پوشیده شده با کیتوزان تا روز هشتم نگهداری کمتر از این مقدار بود و در روز دوازدهم نیز میزان TVB-N تیمار پوشیده شده با کیتوزان حاوی عصاره از این مقدار کمی پایین‌تر (۲۷/۷ میلی گرم در ۱۰۰ گرم بافت) بود و این امر نشان از تاثیر خوب فیلم های تولیدی در ماندگاری و به تعویق انداختن فساد در فیله‌های ماهی دارد. این پدیده می‌تواند به دلیل قابلیت ترکیبات ضد باکتری موجود در عصاره شیرین بیان جهت کاهش رشد باکتری ها یا کاهش ظرفیت آن‌ها در دآمیناسیون اکسیداتیو باشد که توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (۱، ۲، ۳۳ و ۳۵).

۳-۳-۳- تعداد باکتری‌های کل فیله ماهی

حضور باکتری‌ها یکی از دلایل مهم فساد و کاهش کیفیت فیله ماهی در طول دوره نگهداری است زیرا گوشت ماهی حاوی ترکیبات مناسبی برای رشد میکروب‌ها می باشد. از این‌رو برآورد میزان بار باکتریایی کل (TVC) معمولا به عنوان شاخص پذیرش در استانداردها و معیارها استفاده می‌شود.کمیته بین المللی تعیین ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذایی (ICMSF، ۱۹۸۶) حد مجازی را برای بار باکتریایی کل در ماهی خام تعیین کرده است که این میزان ۷ $\log_{10}$ CFU/g می‌باشد. بطور کلی می‌توان گفت که میزان فساد میکروبی ماهی و فراورده‌های آن بسته به فلور میکروبی، دمای محیط، وضعیت آب و شرایط نگهداری مانند دما و دسترسی به اکسیژن می باشد که خود مرتبط با نوع بسته بندی متفاوت خواهد بود (۱۲). عوامل متعددی

نظیر دستکاری حین تهیه فیله، آلودگی وسایل و بهداشت افراد درگیر در کار تعیین کننده میزان اولیه باریاکتریایی فیله می باشد. در تحقیق حاضر میزان بار باکتریایی فیله‌های مورد استفاده در روز صفر (ابتدای دوره) ۳/۳۳ $\log_{10}$ CFU/g بوده است که نشان‌دهنده کیفیت مناسب ماهیان بکار رفته و رعایت نکات بهداشتی حین تهیه فیله‌ها و بسته بندی می‌باشد (کمتر از ۴ $\log_{10}$ CFU/g). مقادیر شمارش شده کل باکتری فیله‌های نگهداری شده در یخچال در شکل ۴آورده شده است. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد، در طول دوره نگهداری میزان بار باکتریایی تمامی تیمارها افزایش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). افزایش میزان بار باکتریایی در تیمار شاهد بیشتر بقیه بود بطوریکه از $\log_{10}$ ۳/۳۳CFU/g در روز صفر به ۷/۶۶$\log_{10}$ CFU/g در روز دوازدهم رسید. در بین تیمارهای اعمال شده تعداد باکتری‌های کل نمونه‌های پوشش داده شده با کیتوزان حاوی عصاره در طول زمان نگهداری به شکل معنی‌داری کمتر از نمونه شاهد بود ($P<۰/۰۵$) و در روز دوازدهم تعداد باکتری‌ها حداکثر تا ۶/۳۶ $\log_{10}$ CFU/g افزایش یافت. این نتیجه می تواند به دلیل اثر ضد میکروبی عصاره شیرین‌بیان باشد که قبلا نیز در آزمون میکروبی دیسک دیفیوژن فیلم‌های تولیدی به اثبات رسیده است. در واقع اثر ضد میکروبی عصاره شیرین بیان در کنار تاثیر مطلوب پوشش ها در جلوگیری از ورود اکسیژن منجر به این نتیجه شده است. در نتایج مشابهی پایرز و همکاران (۲۷) نیز گزارش کردند که استفاده از پوشش‌های خوراکی به همراه بعضی از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی موجب جلوگیری از افزایش بار باکتریایی کل نمونه ها می شود.

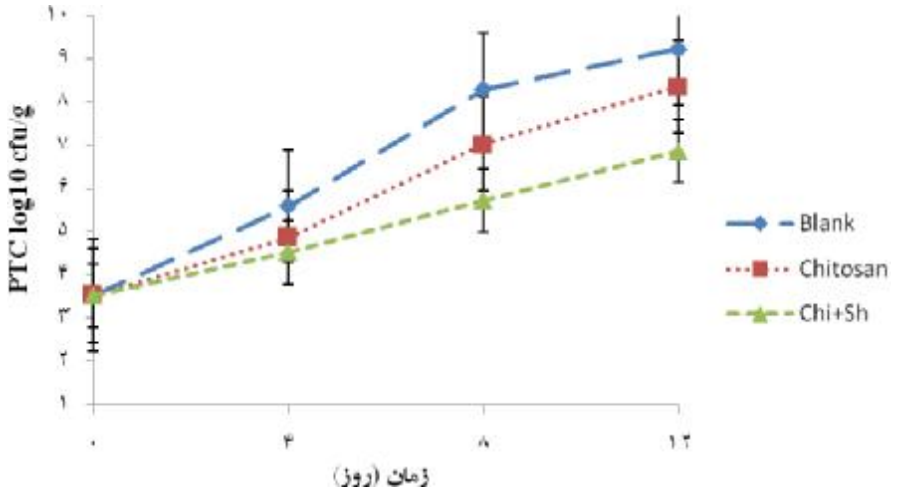


شکل ٤- مقادیر بار باکتریایی کل فیله‌های ماهی بسته‌بندی شده (شاهد، کیتوزان، کیتوزان حاوی شیرین بیان) در طی نگهداری در یخچال

۳-۳-٤ - تعداد باکتری‌های سرما دوست بافت فیله ماهی

میزان بار باکتریایی سرما دوست در ابتدای دوره $\log_{10}$ ۳/۵۳ CFU/g بود و در طول دوره نگهداری با سرعت بیشتری نسبت به بار باکتریایی کل افزایش یافت، به طوری که بار باکتریایی نمونه شاهد و نمونه پوشیده شده با فیلم کیتوزان در روز هشتم نگهداری از حد مجاز مصرف (۷) بالاتر رفت (به‌ترتیب ۸/۳ و ۷/۰۳ $\log_{10}$ CFU/g). این پدیده نشان می‌دهد که فلور باکتریایی غالب نمونه‌ها را باکتری‌های سرما دوست تشکیل می‌دهد. نتایج این تحقیق با یافته‌های سایر محققان (۸ و ۲۵) پیرامون بار باکتریایی سرما دوست در سایر گونه‌ها طی نگهداری در سرما همخوانی

داشت.در تحقیق حاضر فیلم حاوی عصاره شیرین بیان بهترین تاثیر را در نگهداری فیله‌های ماهی داشت به طوری که تعداد باکتری کل و سرما دوست در نمونه‌های مورد آزمون در روزهای ۸ و ۱۲ به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵) و پوشش حاوی عصاره شیرین بیان توانست میزان بار باکتریایی سرما دوست فیله‌ها را تا روز دوازدهم زیر حد مجاز نگه دارد (۶/۸۶ $\log_{10}$ CFU/g) در نتیجه فیله‌ها قابلیت مصرف داشتند. این امر به‌دلیل خاصیت ضدباکتریایی عصاره شیرین بیان می‌باشد که در آزمون دیسک دیفیوژن به اثبات رسید.



شکل ۵- مقادیر بار باکتریایی سرما دوست فیله‌های ماهی بسته‌بندی شده (شاهد، کیتوزان، کیتوزان حاوی شیرین بیان) در طی نگهداری در یخچال

با توجه به در دسترس بودن گیاه شیرین بیان در کشور ما و به خصوص در دامنه‌های زاگرس و امکان تهیه آن با هزینه کم نسبت به سایر مواد آنتی اکسیدان و ضد میکروب و به منظور بهره مندی از خواص خوب و منحصر به فرد گیاه مذکور، استفاده از آن در تولید فیلم‌های زیست تخریب پذیر به منظور حفظ بهتر کیفیت مواد غذایی پیشنهاد می‌شود.گروهی از محققین (۲۴ و ۳۶)اثر افزودن ترکیبات گیاهی را بر فیلم کیتوزان بررسی نموده‌اند و نتایج آن‌ها گویای خواص مثبت ترکیبات گیاهی بر خواص ضد میکروبی و ضد اکسیداسیونی فیلم‌های کیتوزانی بوده است.

٤- نتیجه‌گیری

با توجه به تقاضای مصرف‌کنندگان برای دسترسی به مواد غذایی با کیفیت بالا و نگرانی‌های ناشی از مصرف نگهدارنده‌های مصنوعی و نیز نگرانی‌های زیست محیطی ناشی از تجمع پلیمرهای مصنوعی، استفاده از پوشش‌های زیست تخریب پذیر با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی بالا می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. لذا در تحقیق حاضر اقدام به تهیه پوشش‌های خوراکی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی از کیتوزان در ترکیب با عصاره شیرین بیان شد. در این تحقیق اثر سه غلظت عصاره شیرین بیان (۵، ۱۰ و ۱۵٪) بر خواص فیزیکی، مکانیکی و ضد میکروبی فیلم ها به منظور انتخاب بهترین پوشش جهت کاربرد در نگهداری ماهی فیتوفاگ مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آزمون‌های بیان شده نشان دادند که بهترین خصوصیات کاربردی را فیلم کیتوزانحاوی۱۰٪ عصاره شیرین بیاندارا بود (P<۰/۰۵)، لذا از فیلم های تیمار مذکور به منظور بسته‌بندی فیله ماهی فیتوفاگ جهت نگهداری در یخچال (۱۲ روز) استفاده شد. علاوه بر تیمار ذکر شده به منظور مقایسه تاثیر بسته‌بندی بر مدت ماندگاری فیله‌ها، یک

گروه از فیلههای ماهیان نیز با پوششهای کیتوزان فاقد عصاره و گروهی دیگر با بستهبندی های معمول شیلات بسته بندی شدندو قابلیت و کارایی پوششها از طریق سنجش خصوصیات شیمیایی و میکروبی فیلهها بررسی قرارگرفت. در بین فیلمهای مورد استفاده، کارایی فیلم کیتوزان حاوی ۱۰٪ عصاره شیرین بیان با ثبت کمترین مقدار پراکساید، تیوباربیتوریک اسید، بارمیکروبی کل و سرما دوست در مقایسه با سایر تیمارها بخصوص تیمار شاهد طی دوره ۱۲ روزه نگهداری به اثبات رسید. لذا استفاده از فیلم زیست تخریب پذیر کیتوزان حاوی ۱۰٪ عصاره شیرین بیان میتواند تقاضای مصرف کنندگان به مواد غذایی عاری از مواد شیمیایی مضر را تامین نماید.

٤- سپاسگزاری

مقاله حاضر نتیجه طرح مصوب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه گیلان میباشد، لذا نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از آن معاونت محترم اعلام میدارند.

٥- منابع

۱. اسلامی، گ.، طاهری، س.، آیت الهی، ع. و باقرپور، س. ۱۳۸۹. مقایسه تاثیر گیاه شیرین بیان با آنتی بیوتیکهای نالیدیکسیک اسید و نیتروفورانتوئین بر باکتریهای جدا شده از بیماران مبتلا به سنگ ها و عفونت های اداری. مجله پژوهش در پزشکی. دوره ۳٤، شماره ۳، ۱۷۸-۱۸۱.

۲. بروجیان بروجنی، س.، کاوه باباحیدری، ا.، مرتضایی، س.، کریمیان، م.، شیرزاد، م. و ولیدی، م. ۱۳۹۵. اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی آلوئه ورا و شیرین بیان بر روی باکتریهای عامل پوسیدگی دندان در شرایط آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل. دوره هجدهم، شماره ٤، ۲۰-۱٤.

۳. قنبرزاده، ب.، الماسی، ه. و زاهدی، ی. ۱۳۸۸. بیوپلیمرهای زیست تخریب پذیر و خوراکی در بستهبندی مواد غذایی و دارویی. انتشارات دانشگاه صنعتی امیر کبیر. ۵۲۰ صفحه.

٤. کاراژیان، ح.، حسینی بای، ا. و میرزایی، ح. ۱۳۹۵. خصوصیات رئولوژیکی عصاره شیرین بیان. پژوهشهای علوم و صنایع غذایی. جلد ۱۲ (۱): ۲۰۰-۱۹۳.

۵. مرتضی سمنانی، ک.، سعیدی، م.، شهنوا، ب. ۱۳۸۲. مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره شیرین بیان با آنتیاکسیدانهای تجاری در کرم هیدروکینون ۲ درصد. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران. جلد ۱۳،٤۲-۳۸.

6. ASTM. 1995. Standard test methods for water vapor transmission of material, E 96–95. Annual Book of American Standard. American Society for Testing and Material. Philadelphia, PA.
7. De Carvalho, R.A. and Grosso, C.R.F. 2004. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal, and formaldehyde. *Food Hydrocolloid*, 18(5): 717-730.
8. Duan, J., Cherian, G. and Zhao, Y. 2010. Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (Ophiodon elongates) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. *Food Chemistry*, 119: 524-532.
9. Egan, H., Krik, R.S. and Sawyer, R. 1997. Pearson´s chemical Analysis of food. 9th. Pp: 609-634
10. Gennadios, A., Hanna, M.A. and Kurth, L.B. 1997. Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods. Lebensm.-Wiss. *u.-Techno*, 30: 337–350.
11. Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P. 2010. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27: 889–896.
12. Guillerm-Regost, C., Haugen, T., Nortvedt, R., Carlehöug, M.,

Lunestad, B. T. and Kiessling, A. 2006.Quality characterization of farmed Atlantic halibut during ice storage. *Journal of Food Science*, 71, S83-S90.

13. Holley, R.A. and Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials (Review). *Food Microbiology*, 22: 273-292.
14. Hosseini, M., Razavi, S., Mousavi, M. 2009. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33(6), 727-743.
15. Isbrucker, R.A., Burdock, G.A. 2006. Risk and safety assessment on the consumption of licorice root (Glycyrrhiza sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 46: 167-192.
16. Karakam, H. and Boran, M.1996. Quality changes in frozen whole and gutted anchovies during storage at -18 °C. *International Journal of Food Science and Technology*, 31:527-531.
17. Kerry, J.P., O'Grady, M.N. and Hogan, S.A., 2006. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: a review. *Meat Science*, 74: 113–30.
18. Kilinc, B. and Cakli, S. 2005. Determination of the shelf life of sardine (Sardina pilchardus) marinades in tomato sauce stored at 4C. *Food Control*, 16(7): 639-644.
19. Kirk, R. and Sawyer, R. 1991. Pearson's Composition and Analysis of Foods.9th edn. Singapore: Longman Scientific and Technical. Pp. 642–643.
20. Labuza, T.P and Breene, W. 1989. Application of "active packaging" technologies for the improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *Bibliotheca Nutritio et Dieta*, 43: 252–259.
21. Lakshmi, T and Geetha, RV. 2011. Glycyrrhizan glabra Linn. Commonly known as licorice: a therapeutic review. *Int J Pharm Sci*. 4: 20-25.
22. Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P. and Buonocore, G. 2010.Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82: 291–298.
23. Losada, V., Barros-Velazquez, J., Gallardo, J.M. and Aubourg, S. P. 2004. Effect of advanced chilling methods on lipid damage during sardine (Sardina pilchardus) storage.European Journal of Lipid *Science and Technology*, 106: 844-850.
24. Mayachiew, P. and Devahastin, S. 2010. Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. *FoodChemistry*, 118(3): 594-601.
25. 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 (Sardinellalongiceps) during chilled storage. *Food Hydrocolloids*, 26: 167-174.
26. Ozyurt, G., Polat, A. and Tokur, B. 2007. Chemical and sensory changes in frozen (-18ºC) wild sea bass (Dicentrarchuslabrax) captured at different fishing seasons. *Journal of Food Science and Technology*, 42: 887-93.
27. Pires, C., Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Nunes, M.L. and Marques, A. 2013. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 30: 224-231.
28. Portes, E., Gardrat, C., Castellan, A., and Coma, V. 2009. Environmentally friendly films based on chitosan and tetrahydrocurcuminoid derivatives exhibiting antibacterial and antioxidative properties. *Carbohydrate Polymers*, 76(4): 578-584.

29. Pranoto, Y., Salokhe, V.M. and Rakshit, S.K. 2005. Physical and antibacte rial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, 38(3): 267-272.
30. Rhim J.W. 2011 .Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 86: 691-699.
31. Rodríguez, A., Carriles, N., Cruz, J. M. and Aubourg, S.P. 2008. Changes in the flesh of cooked farmed salmon (Oncorhynchus kisutch) with previous storage in slurry ice (-1.5°C). *LWT-Food Science and Technology*, 41(9): 1726-1732.
32. Sedighinia, F. and Afshar, AS. 2012. Antibacterial activity of Glycyrrhiza glabra against oral pathogens: an in vitro study. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2(3):118.
33. Sharma, V., Agrawal, RC. 2013. Glycyrrhizan glabra-a plant for the future. MJPMS. 15-20.
34. Shirazi, M., Ranjbar, R., Eshraghi, S., Sadeghi, G., Jonaidi, N., Bazzaz, N. and et al. 2007. An evaluation of antibacterial activity of Glycyrrhiza glabra extract on the growth of Salmonella, Shigella and ETEC E. coli. *Journal of Biological Science*.7 (5):827-9.
35. Song, H., Shin, Y. and Song, K. 2012. Preparation of a barley bran protein–gelatin composite film containing Grapefruit seed extract and its application in salmon packaging. *Journal of Food Engineering*, 113: 541-547.
36. Sunchez-Gonzolez, L., Chofer, M., Chiralt, A. and Gonzolez-Martinez, C. 2010.Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on Penicillium italicum. *Carbohydrate Polymers*, 82(2): 277-283.
37. Tang, C.H. and Jiang, Y. 2007. Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment. *Food Research International*, 40: 504-509.
38. Tongnuanchan, P., Benjakul, S. and Prodpran, T. 2012. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*, 134: 1571-1579.
39. Yi, J.B., Kim, Y.T., Bae, H.J., Whiteside, W.S. and Park, H.J., 2006. Influence of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin films. *Journal of Food Science*, 71: 376-383.
40. Youdim K.A. and Deans S.G., 2000. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *British Journal of Nutrition*, 83(1): 87-93.

(Original Research Paper)

Production and Evaluation of Chitosan Film Incorporated Licorice Extract for Fish Packaging

Haniyeh Rostamzad[1*], Eshagh Zakipour[1]

1-Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Gilan, Sowmeh Sara, Gilan, Iran.

Received:30/04/2018 Accepted:26/11/2018

Abstract

Packaging is an important process to keep high quality of marine foods. Due to huge pollution of natural resources by synthetic plastics, using biodegradable films and packages has been considered as a proper alternative. In this study, chitosan use in order to produce biodegradable and edible films and licorice extract (5, 10 and 15 % v/v) were incorporated to improve antimicrobial and antioxidant properties. Finally, best film applied to preserve refrigerated silver crap (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during 12 days period. Results showed that best structural properties observed in chitosan films that contained 10% v/v licorice extract. Fish fillets, whichwere coated with chitosan films that contained 10% licorice extract, showed lowest amount of peroxide value, thiobarbiotoric acid, total volatile basic nitrogen, total plate count and phycrortophic bacteria in compare with other treatments specially control. Consequently, present study confirms that this packaging has significant positive effect of preservation ability of films for as packing materials for foods such as silver carp.

Keywords: biodegradable film, licorice, chitosan, storage.

*Corresponding Author: hrostamzad@guilan.ac.ir