DOI: 10.22092/vj.2018.124378.1533
شماره ۱۲۴ پاییز ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تاثیر پوشش نانوکیتوزان غنی شده با و بدون عصاره چای سبز *(Camellia sinensis L.)* بر خواص فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی ماهی گیش درخشان *(Carangoides coeruleopinnatus)* طی نگهداری در یخچال

• **حلیمه آلبوغبیش**
دانشجوی کارشناسی ارشد رشته شیلات گرایش فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
• **آی ناز خدانظری(نویسنده مسئول)**
استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۹-۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۱۰-۰۴
Email: khodanazary@yahoo.com

هدف این پژوهش ارزیابی مقایسه پوشش‌های نانوکیتوزان دارای عصاره چای سبز و بدون عصاره چای سبز *(Camellia sinensis L.)* بر کیفیت ماهی گیش درخشان *(Carangoides coeruleopinnatus)* طی نگهداری در یخچال (دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد) طی ۱۲روز می‌باشد. برای این منظور فیله‌های ماهی گیش درخشان در سه گروه شامل، گروه محلول نانوکیتوزان (کیتوزان ۲٪ و تری پلی فسفات ۲٪)، گروه نانوکیتوزان حاوی ۰/۵٪ عصاره چای سبز و گروه محلول اسید استیک (به عنوان نمونه شاهد) غوطه‌ور شدند. اثر ضد میکروبی پوشش‌های نانوکیتوزان (با و بدون عصاره چای سبز)، با شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی و سرمادوست بر روی محیط کشت PCA، ارزیابی شد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی بررسی شده شامل: اندازه‌گیری pH، شاخص تیوباربیتوریک اسید (TBARS) به روش اسپکتوفتومتری، ارزیابی ترکیبات نیتروژنی فرار (TVB-N) به روش کلدال (Kjeldahl) و اسیدهای چرب (FFA) به روش تیتراسیون بودند. ارزیابی حسی ماهی گیش درخشان توسط ۱۵ نفر با بررسی طعم، بو و پذیرش کلی در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹ و۱۲ صورت گرفت. مقایسه بار باکتری‌های مزوفیل هوازی و سرمادوست نمونه شاهد و تیمار شده فیله‌های ماهی نشان داد که بیشترین میزان بار باکتری مزوفیل هوازی و سرمادوست مربوط به نمونه شاهد (Log۱۰CFU /g ۵/۱۱ و ۴/۴۳) و کمترین میزان مربوط به نمونه غوطه‌ور شده در محلول نانوکیتوزان و عصاره چای سبز (Log۱۰CFU /g ۴/۱۰ و ۳/۷۰) بود. نتایج بررسی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی و میکروبی طی ۱۲روز دوره نگهداری نشان دهنده این بود که تیمارهای حاوی پوشش نانوکیتوزان با عصاره چای سبز در مقایسه با نمونه شاهد، در پایان دوره نگهداری به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) پایین‌تر بودند. همچنین مقادیر تیوباربیتوریک اسید، اسیدهای چرب، بازهای ازته فرار و pH فیله‌های ماهی پوشش داده شده با محلول نانوکیتوزان و عصاره چای سبز، به ترتیب برابر (۰/۴۲ میلی‌گرم مالون آلدهید در کیلوگرم بافت ماهی)، (۱/۴۶ درصد اولئیک اسید)، (۱۹/۴۰ میلی‌گرم نیتروژن بر ۱۰۰ گرم نمونه(و (۷/۴۹) بود که به طور معنی‌داری کمترین تیمار از نظر شاخص‌های ذکر شده نسبت به سایر تیمارها بودند (P<۰/۰۵) میزان تری متیل آمین و سولفیدریل کل در نمونه شاهد و غوطه‌ور شده در نانوکیتوزان با و بدون عصاره چای سبز در انتهای دوره نگهداری تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). نتایج ارزیابی حسی نشان داد که فیله‌های پوشش‌دار در مقایسه با نمونه شاهد دارای امتیاز بالاتری بودند. با توجه به نتایج به دست آمده، پوشش نانوکیتوزان غنی شده با عصاره چای سبز فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی بیشتری را نسبت به نانوکیتوزان به تنهایی در طول دوره نگهداری نشان داد. بنابراین برای افزایش ماندگاری و به تاخیر انداختن فساد ماهی گیش درخشان در طی دوره نگهداری در یخچال، پوشش نانوکیتوزان غنی شده با عصاره چای سبز موثرتر است.

کلمات کلیدی: ماهی گیش درخشان، نانوکیتوزان، عصاره چای سبز، ماندگاری

Veterinary Researches & Biological Products No 124 pp: 97-109

Effect of nanochitosan coating enriched with or without green tea extract (*Camellia sinensis L.*) on physicochemical, microbial and sensory properties of Costal trevally fish (*Carangoides coeruleopinnatus*) during stored at refrigerator

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

Received: 2018-12-01 **Accepted: 2018-12-25**

Email**: khodanazary@yahoo.com**

In This study, comparative effects of nanochitosan coating enriched with or without green tea extract (*Camellia sinensis L.*) on quality of Costal trevally fish (*Carangoides coeruleopinnatus*) during refrigerated storage (4 °C) at 12 days. For this purpose, the costal trevally fillets were into three groups, immersed in nanochitosan (chitosan 2% and polyphosphate 2%), nanochitosan coated 0.5% green tea extract and acetic acid solution (control sample). Antimicrobial effects of nanochitosan coating (with or without green tea extract) evaluated by aerobic mesophilic counts and psychrophilic bacterial counts, using PCA. Physicochemical properties of samples have been investigated through, pH measurement, spectrophotometric evaluation of TBARS and TVB-N content determination using Kjheldal and titration of FFA method. Sensory evaluation determined by 15 panelists who were asked to evaluate the flavor, odor, overall acceptability in days (0, 3, 6, 9, 12), of the sample. The comparative of mesophilic count and psychrophilic count showed that the highest amount of TVC and PTC was obtained in control (5.11 and 4.43 log cfu/g) and the least amount of t mesophilic count and psychrophilic count had treatment immersed at nanochitosan coating enriched with green tea extract (4.10 and 3.70 log cfu/g). The results showed that change of physicochemical and bacterial were significantly ($p<0/05$) lowest in the samples treated with nanochitosan coating enriched with green tea extract as compared to control group ($p<0.05$). Also, TBA, FFA, TVBN and pH contents of fish fillet coated with nanochitosan and green tea extract was 0.42 mg malonaldehyde/ kg tissue, 1.46 % oleic acid, 19.40 mg N/100g sample and 7.49 that has the lowest contents comparison with other treatments ($p<0.05$). TMA content and SH content of control and coated with or without greaan tea extract showed no significant difference ($p>0.05$) at the end of storage. The results of sensory analysis showed that coated fillets had higher scores comparison with control sample. The results indicated that both nanochitosan coating enriched with geen tea extract were higher antimicrobial and antioxidan activity than nanochitosan during the storage period..Therefore, to extend the shelf life and delay the deterioration of fresh costa trevally fillets during refrigerated storage, nanochitosan coating is more effective.

Key words: Costal trevally, Nanochitosan, Green tea extract, Shelf life

مقدمه

ماهی گیش درخشان *(Carangoides coeruleopinnatus)* از خانواده *Carangidae* گونه‌ای از ماهیان دریایی است. نام فارسی این گونه حبش و نام انگلیسی آن *Costal trevally* می‌باشد که در سراسر آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری اقیانوس هند و اقیانوس آرام غربی پراکنده است. تغذیه آنها از موجودات ریز موجود در ستون آب از جمله سخت‌پوستان، ماهیان کوچک و سرپایان است. گیش ماهیان گروهی از ماهیان با ارزش اقتصادی می‌باشند که تقریبا در اکثر نقاط دنیا پراکنده‌اند. آب‌های گرمسیری مناطق حاره و نیمه حاره جایگاه اصلی زندگی آن‌ها است در ایران نیز تنوعی از آن‌ها در دریای عمان و خلیج فارس مشاهده می‌شود (۴).

آبزیان بدلیل داشتن پروتئین نسبتا بالا، ترکیبات ازت‌دار غیر پروتئینی و چربی‌های غیر اشباع فراوان در عضلات جزء فسادپذیرترین مواد غذایی محسوب می‌شوند. اکسیده شدن چربی‌های غیراشباع تحت تاثیر نور، حرارت و اکسیژن می‌باشد که دلیل اصلی بو و طعم نامطلوب در طول نگهداری بوده و سبب افت کیفیت ماهی می‌شود (۱۷).

کیتوزان یک پلی‌ساکارید طبیعی حاصل از استیل‌زدای ی کیتین، دومین پلیمر فراوان طبیعت پس از سلولز، است. ویسکوزیته وزن مولکولی کیتوزان تقریبا ۵۳۰ هزار دالتون است. کیتوزان در شرایط اسیدی محلول است. گروه‌های آزاد آمینی روی زنجیره‌های پلیمری آن در محلول می‌تواند پروتون را انتقال دهد و به ماده متقابل خود یک بار مثبت ببخشد. نانوذرات کیتوزان را می‌توان با یک ترکیب پلی آنیلیک مانند تری‌پلی‌فسفات TPP با هم زدن مداوم به محلول کیتوزان تبدیل کرد. نانوکیتوزان یک ماده طبیعی با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی عالی است که سازگار با طبیعت و زیست فعال است (۲۲). برای تهیه نانو ذرات کیتوزان حداقل چهار روش گزارش شده است که عبارتند از: Ionotropic gelatin, Microemulsion diffusion، Emusification solvent و Polyelectrolyte complex (۲). در میان این روش‌ها، روش ionic gelatin به علت ساده بودن، عدم استفاده از حلال آلی و حرارت بالا بیشتر بین گروه‌های آمین آزاد کیتوزان و گروه‌های پلی آنیون مثل تری‌پلی‌فسفات است و باعث تشکیل هیدروژلی از میکرو ذرات یا نانو ذرات می‌شود که می‌توانند برای انکپسوله شدن و یا رهایش کنترل شده داروها (سیستم آزادسازی کنترل شده دارو) و ترکیبات مختلف مورد استفاده قرار گیرند (۲، ۲۴). زیست سازگاری و غیر سمی بودن مواد نانوکیتوزان آن‌ها را یک ماده جذاب برای تحویل این عوامل فعال کرده است. نانو ذرات کیتوزان می‌توانند اثر ضد میکروبی خود را مثل یک خاصیت منحصر به فرد نشان دهند. فعالیت آنتی باکتریال نانو ذرات کیتوزان در مقابل باکتری‌های پاتوژنی همچون اشریشیا کلی و استافیلوس کوکوس ارئوس گزارش شده است (۱۷). علاوه بر این فیلم‌ها و پوشش‌های کیتوزان و نانوکیتوزان می‌تواند به عنوان وسیله‌ای برای ترکیب مواد طبیعی و شیمیایی مانند عوامل ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان‌ها، آنزیم‌ها یا مواد عملکردی مانند عصاره گیاه، پروبیوتیک، مواد معدنی یا ویتامین‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۱۴). همچنین فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات کیتوزان بر علیه اشرشیا کلی، سالمونلا کولراسویس، سالمونلا تیفیموریم و استافیلوکوکوس اورئوس توسط کای و همکاران در سال (۲۰۰۴) مورد ارزیابی قرار گرفت که نشان داد نانو ذرات کیتوزان می‌توانند از رشد انواع مختلفی از باکتری‌های آزمایش شده جلوگیری کنند (۱۵). اخیرا عصاره‌های طبیعی همانند عصاره گیاهی به عنوان افزودنی‌های غذایی طبیعی استفاده می‌گردد. گیاه چای سبز بومی آسیای شرقی می‌باشد ولی به طور گسترده در همه جهان و شمال ایران کشت می‌شود. گیاه چای سبز حاوی مقادیر بالایی از پلی‌فنول‌ها می‌باشد که کاتچین‌ها از پلی فنول‌های اصلی آن به شمار می‌آید و از بین آن‌ها اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات ترکیب اصلی و فعال آن از نظر بیولوژی می‌باشد (۲۱). زارعی و همکاران در سال ۲۰۱۵، به بررسی اثرات پوششی عصاره پوست انار به همراه نانوکیتوزان بر کیفیت فیله ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) نگهداری شده در دمای یخچال پرداختند (۲۳). نتایج نشان داد که پوشش نمونه‌های ماهی با محلول نانوکیتوزان ۲٪ و پوشش عصاره انار ۱٪ به همراه نانوکیتوزان ۲٪، سبب کاهش تعداد باکتریهای مزوفیل و سایکروفیل و کاهش میزان بازهای ازته فرار و تیوباربیتوریک اسید نسبت به گروه کنترل شد.

با توجه به توسعه و کاربرد روز افزون استفاده از نانوتکنولوژی در تولید مواد ضدمیکروبی و ضدعفونی کننده و بهبود خواص ترکیبات با اندازه نانو نسبت به ترکیبات اولیه و نیز عصاره‌های گیاهی به عنوان منبع غنی از ترکیبات زیست فعال، جهت افزایش عمر نگهداری و همچنین ارزش شیلاتی و اقتصادی گیش ماهیان، پژوهش حاضر با هدف تاثیر پوشش نانوکیتوزان غنی شده با عصاره چای سبز بر خواص فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی ماهی گیش درخشان در طی نگهداری در یخچال انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

تهیه عصاره چای سبز

چای سبز با نام علمی *Camellia sinensis L.* کشت شده در استان گیلان، به صورت برگ خشک شده چای سبز (به روش کارخانه)، از فروشگاه‌های زنجیره‌ای رفاه واقع در آبادان خریداری شد. عصاره چای سبز بر طبق روش Nirmal and Benjakul, ۲۰۱۱ (۱۳) تهیه گردید. پودر چای سبز با کلروفرم به نسبت ۱ به ۲۰ (وزنی/حجمی) جهت حذف کلروفیل به مدت۳۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی هم زده شدند. سپس مخلوط حاصل با کاغذ صافی شماره ۱ فیلتر گردید. ۲ گرم پودر چای سبز کلروفیل‌زدایی شده با۸۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت مخلوط شدند. عصاره به دست آمده با کاغذ صافی شماره ۱ فیلتر شد. جهت جدا نمودن اتانول از عصاره چای سبز، عصاره فیلتر شده در روتاری (RV 10 digital V Model, IKA Rotary Evapoators, Germany) با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به منظور خشک کردن کامل در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند. عصاره چای سبز تهیه شده تا زمان استفاده، در کیسه‌های پلی اتیلنی به دور از نور، در دسیکاتور و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۳).

تشکیل پوشش نانو ذرات کیتوزان

نانو ذرات کیتوزان با استفاده از روش ionic gelatin بوسیله کیتوزان و تری‌پلی‌فسفات آماده شد. براساس این روش کیتوزان تجاری با وزن مولکولی متوسط و ویسکوزیته CP ۸۰۰-۲۰۰ در cc۱۰۰ محلول اسید استیک ۱درصد (w/v) حل شد. محلول تری پلی فسفات ۲٪ تهیه شد و با یک عدد مگنت بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. ۴ میلی‌لیتر از محلول تری پلی فسفات را به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان که بر روی همزن مغناطیسی در حال هم زدن بود، افزوده شد و عمل هم زدن به مدت ۶۰ دقیقه ادامه یافت. سپس محلول نانوکیتوزان به مدت ۱۰ دقیقه در ۱/۵ kW در دستگاه sonication قرار داده شد (۶). اندازه، توزیع اندازه اصلی، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی در مورد نانو ذرات به دست آمده با استفاده از دستگاه Nanozeta Sizer در طول موج nm ۳۶۳ تعیین شد (۱۷). نمونه‌ها در کوت پلی استرین قرار داده شدند و شدت پراکندگی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، با ضریب شکست ۱/۳۳۵ اندازه‌گیری شد. پس از تهیه محلول نانوکیتوزان، عصاره چای سبز با غلظت ۰/۰۵ درصد (حجمی/حجمی) افزوده شده و به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد.

آماده kW سازی ماهی

ماهیان گیش درخشان با میانگین وزنی۴۰۰ تا ۵۰۰ گرم و طول متوسط ۴۰ تا ۴۵ سانتی‌متر به صورت تازه در پاییز ۱۳۹۵ از صیدگاه منطقه آزاد اروند استان خوزستان خریداری و به همراه یخ به نسبت وزنی ۱ به ۳ دورن جعبه‌های یونولیتی به آزمایشگاه شیلات واقع در دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل شدند. پس از شستشوی ماهیان با آب سرد و تخلیه امعا و احشا و جدا کردن ناحیه سر، فیله‌های ۱۰±۲۰۰ گرمی تهیه شدند و سپس شستشوی مجدد فیله‌ها انجام شد. سپس تیمارها به صورت زیر مشخص شدند:

۱-تیمار شاهد: محلول اسید استیک (۱ درصد)

۲-تیمار دارای پوشش محلول نانوکیتوزان (۲ درصد کیتوزان و ۲ درصد تری پلی فسفات)

۳-تیمار دارای پوشش محلول نانوکیتوزان و ۰/۵٪ عصاره چای سبز به ازای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

به منظور ایجاد پوشش، فیله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول‌های تهیه شده غوطه‌ور شده و سپس از محلول خارج شده و پس از پایان فرآیند آب چک، فیله‌ها به صورت جداگانه در بسته‌های زیپ پک استریل قرار گرفته، و تمام نمونه‌ها در دمای (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۲ روز نگهداری شده و در فواصل زمانی هر ۳ روز یک بار مورد ارزیابی فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی قرار گرفتند (۱۷).

آنالیز میکروبی

بررسی بار باکتریایی نمونه‌ها با هموژن کردن ۱۰گرم از نمونه فیله (که از بخش استریل زیرین بافت برداشته شده بود) در ۹۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۹٪ کلرید سدیم در شرایط استریل آغاز شد. از این محلول جهت تهیه رقت‌های متوالی و شمارش باکتری‌های مورد نظر در محیط کشت و دمای مخصوص استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر از هر رقت برای کشت باکتری‌ها به روش پورپلیت در محیط پلیت کانت آگار (PCA)، قرار گرفت. نمونه‌های کشت داده شده به منظور شمارش بار باکتری‌های مزوفیل، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای باکتری‌های سایکروفیل به مدت ۷ روز در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. شمارش کلنی‌ها بر مبنای Log۱۰ CFU /g بیان گردید (۱۸).

آزمایشات فیزیکوشیمیایی

اندازه‌گیری تیوباربیتوریک اسید (TBA)

شاخص تیوباربیتوریک اسید بر طبق روش تارلادگیش و همکاران (۱۹۶۰) اندازه‌گیری شد (۲۰). میزان شاخص تیوباربیتوریک با افزودن ۹۷/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدیک ۴ نرمال به ۱۰ گرم نمونه هموژن شده اندازه‌گیری شد. ۵ میلی‌لیتر از مایع حاصل از تقطیر این مخلوط به ۵ میلی‌لیتر معرف تیوباربیتوریک اسید (۰/۰۵۲ گرم معرف TBA۱۸+ سی‌سی اسید استیک گلاسیال)، افزوده شده و به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن میزان جذب مایع صورتی حاصل در طول موج ۵۳۸ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (opt-izem322OUV,Korea)، اندازه‌گیری شد. عدد جذب خوانده شده در ثابت ۷/۸ ضرب شد تا میزان تیوباربیتوریک اسید نمونه بدست آید (رابطه ۱). میزان تیوباربیتوریک اسید بصورت میلی‌گرم مالون آلدهید اکی والان بر کیلوگرم نمونه بیان شد.

TBA=7/8 Abs538

رابطه۱ میزان جذب در طول موج ۵۳۸نانومتر = Abs538

سنجش میزان اسید چرب آزاد (FFA)

میزان شاخص اسیدهای چرب آزاد با استخراج چربی از ۱۰ گرم نمونه گوشت با کمک کلروفرم/ متانول به روش ایگان و همکاران (۱۹۹۷) و تیتراسیون گروه‌های کربوکسیلیک آزاد موجود در آن با هیدروکسید سدیم صورت پذیرفت. کلروفرم، متانول و ۲-پروپانول به نسبت ۲:۱:۲ به همراه معرف متاکروزول ارغوانی به عصاره استخراج شده اضافه شد و تیتراسیون تا تغییر رنگ از زرد به آبی ادامه یافت (۷). این شاخص با قراردادن رابطه (۲) اندازه گیری شد. نتایج به‌صورت درصد اولئیک اسید بیان شد.

رابطه۲

$$FFA = \frac{N \times (V2-V1) \times ۲.۸۲}{W}$$

N = نرمالیته NaOH

V2= میلی لیتر NaOH مصرفی برای هر نمونه

V1= میلی لیتر NaOH مصرفی برای هر نمونه شاهد (بلانک)

W= وزن چربی (گرم)

اندازه‌گیری بازهای ازته فرار (TVB-N)

اندازه‌گیری بازهای ازته فرار با تیتراسیون عصاره بدست آمده طبق روش گولاس و کونتومیناس (۲۰۰۷) انجام گرفت (۹). بدین منظور ۱۰ گرم گوشت به همراه ۲ گرم پودر منیزیم اکسید (Mgo) با افزودن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به بالن کلدال متصل شد و عصاره حاصل از تقطیر به محلول متشکل از اسید بوریک ۲٪ و ۲-۱ قطره متیل رد به عنوان شاخص وارد شد. محلول زرد رنگ حاصله تا حاصل شدن رنگ ارغوانی با اسید سولفوریک تیتر شد. میزان بازهای ازته فرار طبق رابطه (۳) و برحسب میلی‌گرم نیتروژن در۱۰۰ گرم نمونه ماهی بدست آمد (۸).

(رابطه۳) حجم اسید سولفوریک مصرفی × ۱۴= بازهای ازته فرار

سنجش pH

جهت سنجش pH ۵ گرم گوشت را به مدت ۱ دقیقه با ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر همگن شده و میزان pH آن با دستگاه pH سنج (Metrohm) اندازه‌گیری شد (۱۷).

اندازه‌گیری تری متیل آمین

شاخص تری متیل آمین به روش آ.او.آ.سی (۱۹۹۵) اندازه‌گیری شد (۱). ۱ میلی‌لیتر از عصاره عضله را برداشته و در لوله آزمایش ریخته و به عصاره ۱ میلی‌لیتر فرمالدئید ۱۰ درصد اضافه شد و با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسید. با افزودن ۳ میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم و ۱۰ میلی‌لیتر

تولوئن با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر تغییر رنگ ایجاد شده را در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان TMA برحسب میلی‌گرم در هر۱۰۰گرم عضله ماهی محاسبه گردید.

آماده‌سازی اکتومیوزین

اکتومیوزین بر اساس روش بنجاکول و همکاران (۱۹۹۷) استخراج گردید (۳). بر اساس این روش ۴ گرم از بافت ماهی با ۴۰ میلی‌لیتر از محلول کلرید پتاسیم ۰/۶ مولار در pH =۷ به مدت ۴ دقیقه هموژن و سپس عصاره به دست آمده را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد و ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. در ادامه محلول بالایی را دور ریخته و سه برابر آب دیونیزه به رسوب اکتومیوزین اضافه شد و مجددا سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد و ۵۰۰۰ دور انجام شد، محلول بالایی را دور ریخته و محلول کلرید پتاسیم ۱/۲ مولار در pH=۷ اضافه کرده و سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای صفر درجه و ۵۰۰۰ دور انجام گردید.

اندازه‌گیری گروه سولفیدریل

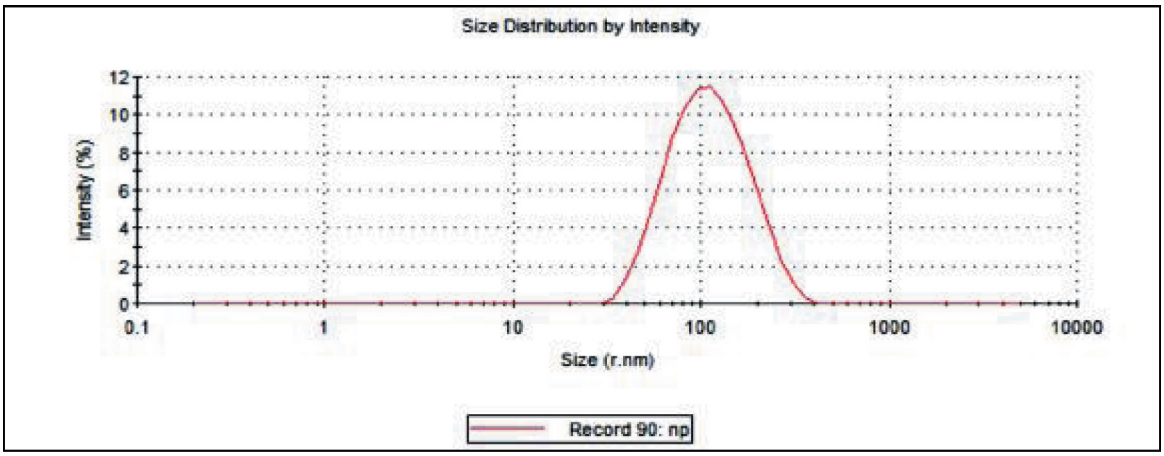
مقدار گروه سولفیدریل با استفاده از ۵ و / ۵ دی تیوبیس۲-نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) و بر اساس روش المان (۱۹۵۹) (۸) و با کمی تغییرات توسط بنجاکول و همکاران (۱۹۹۷) (۳) تعیین گردید. به ۱ میلی‌لیتر اکتومیوزین، ۹ میلی‌لیتر بافر تریس۰/۲ مولار در pH =۶/۸ که شامل ۸ مولار اوره، ۲٪ سدیم دودسیل سولفات و ۱۰ میلی مولار اتیلن دی آمید ترا استیک اسید بود، اضافه شد. ۴ میلی‌لیتر از این ترکیب برداشته شد و به محلول ۰/۴ میلی‌لیتر محلول ۰/۱٪ DTNB اضافه شد و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه انکوباسیون گردید. شاهد نیز با جایگزینی نمونه (اکتومیوزین) با کلرید پتاسیم ۰/۶ مولار آماده شد و جذب نمونه‌ها در مقابل شاهد با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار گروه سولفیدریل با استفاده از مقدار جذب اندازه‌گیری شده و ضریب خاموشی ۱-cm ۱-M ۱۳۶۰۰ به صورت مول بر ۱۰۵ گرم پروتئین بیان گردید.

ارزیابی حسی

ارزیابی نمونه‌ها به صورت آزمون مصرف‌کننده‌گرا توسط ۱۵ نفر از ارزیاب‌های آموزش دیده در گروه‌های سنی ۲۵ تا ۲۷ سال انجام شد. بدین منظور ۱/۵ درصد نمک به نمونه‌های ماهی اضافه گردید. نمونه‌های ماهی در داخل فویل آلومینیوم، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد بخارپز شدند (۱۳). طعم، بو و پذیرش کلی نمونه‌ها با مقیاس هدونیک (با اندکی تغییر) با اصطلاحات توصیفی زیر رتبه‌بندی شدند: طعم (۵، کاملا مطبوع؛ ۱، بوی فساد)؛ بو (۵، کاملا مطبوع؛ ۱، بوی فساد)؛ پذیرش کلی (۵، کاملا مقبول؛ ۱، کاملا نامقبول). نقطه بحرانی مقبولیت هر یک از ویژگی‌ها ۳ در نظر گرفته شد و پایین‌تر از آن به معنای رد خصوصیات حسی مورد نظر بود.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شدند. نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با آزمون Leven بررسی گردید. برای تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر حاصل از هر شاخص در زمان‌های مختلف نگهداری از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. به منظور مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید. همچنین



شکل ۱a- توزیع پروفایل حجمی ذرات نانو کیتوزان

به منظور بررسی اثر تیمارها بر خصوصیات حسی نمونه‌ها از آزمون فریدمن استفاده گردید. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گردید و سطح معنی‌داری قابل قبول در کلیه آزمون‌های آماری مورد استفاده به صورت ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

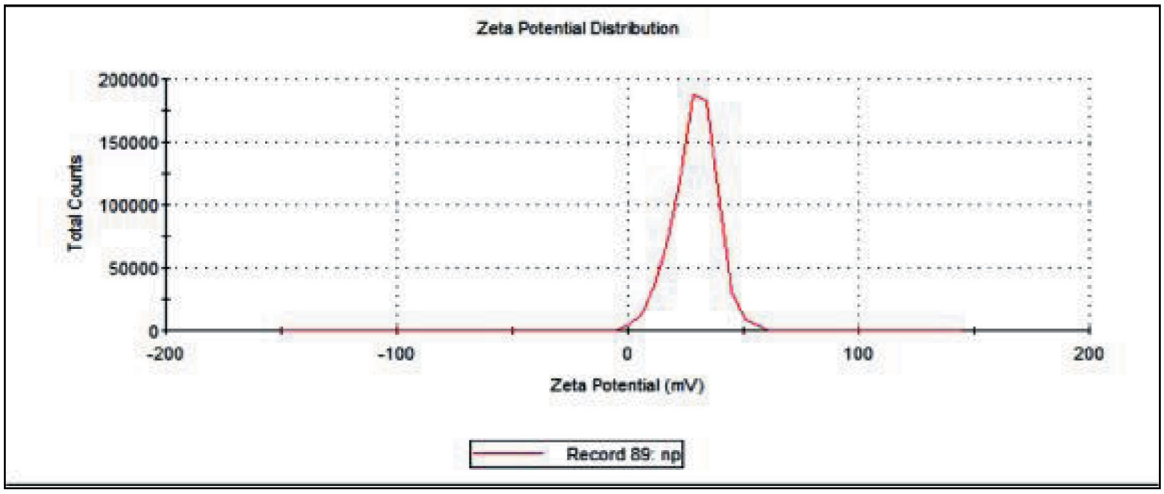
نتایج و بحث

توزیع پروفایل حجمی ذرات نانو کیتوزان در شکل a۱ مشاهده می‌شود. نانو ذرات کیتوزان دارای قطر متوسط ۱۲۰/۳ نانومتر (عرض ۵۷/۶۸ نانومتر و شاخص شدت ۱/۰۰۰) است. شکل b1 توزیع پروفایل پتانسیل ذرات نانوکیتوزان نشان می‌دهد. پتانسیل ذرات نانوکیتوزان mV ۲۸/۹ + می‌باشد. برای یک نانو ساختار فیزیکی پایدار که به وضوح توسط انفجار الکتروستاتیک تثبیت شده است پتانسیل mV۳۰< به عنوان حداقل مورد نیاز است (۱۱). تمام این داده‌ها نشان می‌دهند که نانوذرات کیتوزان مورد استفاده در این مطالعه پایدار هستند.

مورفولوژی نانو ذرات کیتوزان

به منظور بررسي جزئيات شكل و اطلاعات ريخت‌شناسي نانو ذرات كيتوزان از ميكروسكوپ الكتروني روبشي استفاده شد. تصويربرداري SEM يک ساختار هموژن و تقريبا با شكل نيم كروي و پراكنش بسيار يكنواخت را نشان داد (شكل۲).

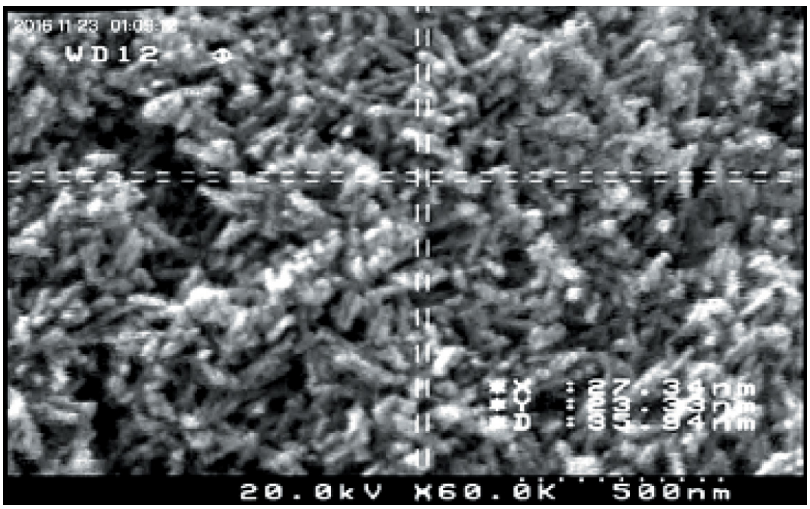
تغییرات بار باکتری‌های مزوفیل هوازی و سرمادوست ($CFU/g\ Log_{10}$) تیمارهای شاهد و پوشش‌دار (با و بدون عصاره چای سبز) طی نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) در جدول ۱ آورده شده است. تعداد باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$) البته این افزایش در تیمار شاهد بیشتر بوده به‌طوریکه بیشترین میزان بار باکتریایی مزوفیل هوازی در پایان دوره نگهداری در تیمار شاهد ۵/۱۱ ($CFU/g\ Log_{10}$) مشاهده شد. میزان باکتری‌های مزوفیل در تیمارهای پوششی نانوکیتوزان (بدون عصاره چای سبز) از $CFU/g\ Log_{10}$ ۲/۹۱ در روز صفر نگهداری به $CFU/g\ Log_{10}$ ۴/۳۷ در روز دوازدهم نگهداری افزایش یافت. میزان این شاخص در تیمارهای پوششی نانوکیتوزان (با عصاره چای سبز) در انتهای دوره نگهداری به $CFU/g\ Log_{10}$ ۴/۱۰ رسید. کمترین میزان بار باکتریایی در انتهای دوره نگهداری در تیمار پوششی نانوکیتوزان با عصاره چای سبز مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) در انتهای دوره بیشترین میزان بار باکتریایی سرمادوست در تیمار شاهد $CFU/g\ Log_{10}$ ۴/۴۳ مشاهده شد. میزان این شاخص در تیمارهای پوشش‌دار نانوکیتوزان و نانوکیتوزان با عصاره چای سبز به ترتیب از ۲/۶۶ و $CFU/g\ Log_{10}$ ۲/۶۳ در روز صفر نگهداری به ۳/۸۹۰ و $CFU/g\ Log_{10}$ ۳/۷۰ در روز دوازدهم نگهداری افزایش یافت. کمترین میزان بار باکتریایی در انتهای دوره نگهداری در تیمار پوششی نانوکیتوزان با عصاره چای سبز مشاهده شد. مقایسه بار باکتریایی مزوفیل هوازی و سرمادوست در تیمارهای پوششی نشان داد که در انتهای دوره نگهداری تیمارهای پوششی کیتوزان و نانوکیتوزان با عصاره چای سبز در هر دو گروه باکتری‌های مزوفیل هوازی و سرمادوست مورد مطالعه بار باکتریایی کمتری دارند. علت آن می‌تواند اتصال ترکیبات فنولی عصاره چای سبز با پروتئین‌ها در دیواره سلول میکروارگانیسم‌ها باشد که منجر به لیز شدن دیواره سلول می‌شود (۱۲). مقایسه تعداد باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست تیمارهای پوششی کیتوزان و نانوکیتوزان با عصاره چای سبز نشان داد که میزان بار باکتریایی



شکل b۱- توزیع پروفایل پتانسیل ذرات نانوکیتوزان

تیمار نانوکیتوزان با عصاره چای سبز نسبت به تیمار نانوکیتوزان بدون عصاره کمتر بود که دلیل آن می‌تواند فعالیت آنتی میکروبی گسترده نانوکیتوزان در برابر باکتری‌ها و قارچ‌ها باشد. مطالعات درباره خواص آنتی میکروبی نانوذرات کیتوزان برخلاف کیتوزان و مشتقات آن، محدود می‌باشد. کای و همکاران (۲۰۰۴) و شای و همکاران (۲۰۰۶) به طور تجربی فعالیت ضد باکتری نانوذرات کیتوزان در برابر اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم نسبت به کیتوزان را گزارش کردند که دلیل آن می‌تواند سطح بزرگتر نانوذرات و میل ترکیبی بیشتر با سلول باکتری باشد که ناشی از بازده اثر کوانتومی ذرات است (۱۵، ۱۹). رمضانی و همکاران (۲۰۱۵) و زارعی و همکاران (۲۰۱۵) نیز گزارش کردند که پوشش نانوکیتوزان در مقایسه با پوشش کیتوزان برای افزایش ماندگاری و جلوگیری از فساد فیله‌های کپور نقره‌ای در مدت ذخیره‌سازی یخچال مناسب‌تر است (۱۷، ۲۳). همچنین نیرمال و بنجاکول (۲۰۱۱) یافتند که ترکیبات فنولی عصاره چای سبز ممکن است با پروتئین ها در دیواره سلول میکروارگانیسم‌ها پیوند و منجر به لیز شدن دیواره سلول میکروبی شود (۱۳).

در جدول ۲ تغییرات میزان تیوباربیتوریک اسید (میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم) تیمارهای شاهد و پوشش‌دار (با و بدون عصاره چای سبز) طی نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) را نشان می‌دهد. میزان تیوباربیتوریک اسید با گذشت زمان نگهداری در تمامی تیمارها افزایش یافت ($p<0/05$) به‌طوری‌که میزان آن در نمونه شاهد از ۰/۰۰±۰/۰۱۳ (میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم) در زمان صفر نگهداری به ۰/۰۳±۱/۵۳ (میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم) در روز دوازدهم نگهداری افزایش یافت. میزان تیوباربیتوریک اسید در تیمارهای پوششی نانوکیتوزان به تنهایی به ترتیب از ۰/۰۰ ±۰/۰۱۲ (میلی‌گرم مالون آلدهید برکیلوگرم) در روز صفر نگهداری به ۰/۰۴±۰/۴۵ (میلی‌گرم مالون آلدهید برکیلوگرم) در روز دوازدهم نگهداری افزایش یافت. این شاخص در تیمارهای پوششی نانوکیتوزان با عصاره چای سبز ۰/۰۲±۰/۴۲ (میلی‌گرم مالون آلدهید برکیلوگرم) در روز دوازدهم افزایش یافت. میزان TBA در تیمار شاهد در انتهای دوره نگهداری بیشترین مقدار و تیمار پوشش نانو کیتوزان با عصاره چای سبز کمترین مقدار را نشان دادند که دلیل آن می‌تواند اثرات کاتکین و ترکیبات دیگر موجود در عصاره چای سبز باشد که دارای قدرت احیاکنندگی بالا، قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و فعالیت شلاته کنندگی فلزات می‌باشد (۱۲). مقدار شاخص TBA در حدود ۱-۲ میلی‌گرم مالون آلدهید در کیلوگرم نمونه، به عنوان حد استاندارد قابلیت پذیرش برای مصرف کننده، عنوان شده است (۸). در مطالعه حاضر شاخص TBA در طی زمان نگهداري در نمونهي شاهد و نمونه‌های پوششی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$)، به‌طوری‌که در پایان دورهي نگهداري مقدار TBA در نمونهي شاهد به حد مجاز نزدیک شد که تفاوت معنی‌داری ($p<0/05$) نسبت به تیمارهای پوششی نشان داد. نتایج مشابهی توسط اجاق و همکاران (۲۰۱۰) بدست آمده است و یافتند که پوشش کیتوزان عصاره دارچین منجر به کاهش میزان تیوباربیتوریک اسید فیله‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد شده است (۱۴). افزایش TBA در طول دوره نگهداری در یخچال ممکن است به دلیل از دست دادن بخشی از آب عضله ماهی و افزایش اکسیداسیون اسید چرب غیر اشباع نسبت داده شود. در تحقیقات زارعی و همکاران (۲۰۱۵) که به بررسی اثرات پوششی عصاره پوست انار و پرتقال به همراه نانو کیتوزان بر کیفیت فیله ماهی



شکل ۲ - تصویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) ذرات نانوکیتوزان

کپور نقره‌ای نگهداری شده در شرایط یخچال پرداختند، کاهش میزان مواد واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید و کاهش میزان اکسیداسیون چربی‌ها را گزارش کردند (۲۳). بالا بودن میزان TBA در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای پوششی ممکن است به دلیل باکتری‌های سرمادوست به ویژه سودوموناس باشد (۱۳).

تغییرات میزان اسیدهای چرب آزاد (درصد اولئیک اسید) تیمارهای شاهد و پوشش‌دار (با و بدون عصاره چای سبز) طی نگهداری در یخچال (۱ ±۴ درجه سانتی‌گراد) در جدول ۲ مشاهده می‌شود. میزان FFA در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. مقدار اسید چرب در نمونه شاهد و تیمارهای حاوی پوشش به جز روز صفر در سایر زمانها تفاوت معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) نشان داد. در نمونه شاهد میزان آن از ۰/۳۱±۰/۲۴ در روز صفر نگهداری به ۱/۹۵±۳/۲۰ (درصد اولئیک اسید) افزایش یافت. در تیمار پوششی نانوکیتوزان و نانوکیتوزان با عصاره میزان اسید چرب به ترتیب به ۱/۵۳±۰/۵۳، ۱/۸±۱/۰۵ (درصد اولئیک اسید) در روز دوازدهم نگهداری رسید. در انتهای دوره نگهداری تیمار شاهد بیشترین مقدار FFA تیمار نانوکیتوزان با عصاره چای سبز کمترین میزان اسید چرب را نشان دادند. مطالعات اجاق و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که میزان افزایش اسیدهای چرب آزاد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پوشش داده شده با کیتوزان حاوی اسانس دارچین، نسبت به نمونه شاهد کمتر بوده و علت آن فعالیت ضد باکتریایی پوشش و اسانس دارچین می‌باشد (۱۴). حد مجاز مصرف انسانی برای FFA، ۵ درصد اسید اولئیک پیشنهاد شده است (۱۰) که در این تحقیق تا پایان دوره نگهداری در حد قابل قبول بوده است. مقایسه میزان FFA در تیمارهای پوششی نشان داد در پایان دوره نگهداری تیمارهای پوششی نانوکیتوزان با عصاره چای سبز نسبت به تیمارهای پوششی نانوکیتوزان بدون عصاره چای سبز مقدار FFA کمتری دارند که دلیل آن می‌تواند کاتکین‌های موجود در چای سبز باشد که علاوه بر مهار رادیکال‌های آزاد می‌توانند از تجمع سوپراکسید و رادیکال‌های آزاد هیدروکسی از طریق ممانعت از فعالیت آنزیم اکسیداز گزانتین (Xanthine oxidase) جلوگیری کنند. همچنین کاتکین به عنوان عامل شلاته‌کننده با پاره‌ای از فلزات پیوند یافته، لذا از رشد میکروبی جلوگیری می‌کند (۱۳).

جدول ۲ تغییرات میزان بازهای نیتروژنی فرار (میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰گرم) تیمارهای شاهد و پوشش‌دار (با و بدون عصاره چای سبز) طی نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) را نشان می‌دهد. شاخص TVB-N در طول زمان نگهداری در نمونه شاهد و نمونه‌های حاوی پوشش به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). به طوریکه میزان TVB-N در نمونه شاهد از ۱۰/۲۶±۰/۱۱ (میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰گرم) در روز صفر نگهداری به ۲۶/۵۰±۱/۱۷ (میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰گرم) در روز دوازدهم نگهداری افزایش یافت. میزان TVB-N در تیمارهای پوششی نانو کیتوزان و نانوکیتوزان با عصاره چای سبز به

جدول۱- مقایسه مقادیر بار باکتریایی مزوفیل هوازی/g Log۱۰cfu تیمارهای شاهد و پوشش‌دار (با و بدون عصاره چای سبز) طی دوره نگهداری در یخچال

بار باکتریایی	تیمارها	زمان نگهداری(روز)				
		۰	۳	۶	۹	۱۲
باکتری های مزوفیل	شاهد	۲/۹۳ ±۰/۰۶ ^{Fa}	۳/۴۸±۰/۰۱ ^{Da}	۳/۸۹±۰/۰۸ ^{Ca}	۴/۲۲±۰/۰۲ ^{Ba}	۵/۱۱±۰/۱۴ ^{Aa}
	نانوکیتوزان	۲/۹۱±۰/۰۸ ^{Fa}	۳/۳۳±۰/۵ ^{Db}	۳/۸۸±۰/۰۴ ^{Ca}	۴/۰۹±۰/۰۰ ^{Bb}	۴/۳۷±۰/۰۱ ^{Ab}
	نانوکیتوزان+ عصاره چای سبز	۲/۵۱±۰/۰۴ ^{Fa}	۳/۱۷±۰/۰۴ ^{Dc}	۳/۶۴±۰/۰۲ ^{Cb}	۳/۹۳±۰/۰۲ ^{Bc}	۴/۱۰±۰/۰۰ ^{Ac}
باکتری های سرمادوست	شاهد	۲/۹۰±۰/۰۲ ^{Fa}	۳/۰۳±۰/۰۶ ^{Da}	۳/۳۷±۰/۰۳ ^{Ca}	۳/۸۹±۰/۰۴ ^{Ba}	۴/۴۳±۰/۰۹ ^{Aa}
	نانوکیتوزان	۲/۶۶±۰/۰۳ ^{Fa}	۳/۰۵±۰/۰۵ ^{Da}	۳/۳۰±۰/۰۷ ^{Ca}	۳/۵۳±۰/۱ ^{Bb}	۳/۸۹±۰/۰۴ ^{Ab}
	نانوکیتوزان+ عصاره چای سبز	۲/۶۳±۰/۰۱ ^{Fa}	۲/۷۹±۰/۰۸ ^{Db}	۳/۲۹±۰/۰۱ ^{Ca}	۳/۴۲±۰/۰۳ ^{Bc}	۳/۷۰±۰/۰۰ ^{Ac}

داده ها بر اساس میانگین±انحراف معیار است. حروف بزرگ مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار طی زمانهای مختلف نگهداری و حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است.

جدول۲- مقایسه خصوصیات فیزیکوشیمیایی تیمارهای شاهد و پوشش دار (با و بدون عصاره چای سبز) طی دوره نگهداری در یخچال

فاکتورهای فیزیکوشیمیایی	تیمارها	زمان نگهداری(روز)				
		۰	۳	۶	۹	۱۲
TBA	شاهد	۰/۰۲۹±۰/۰۰^{Ca}	۰/۰۰±۰/۰۲۹^{Ca}	۰/۰۵۳±۰/۰۰^{Ca}	۰/۱۹±۰/۰۲^{Ba}	۱/۵۳±۰/۰۳^{Aa}
	نانوکیتوزان	۰/۰۱۲±۰/۰۰^{Ca}	۰/۰۲۹±۰/۰۰^{Cc}	۰/۰۳۰±۰/۰۰^{Ca}	۰/۱۴±۰/۰۱^{Bab}	۰/۴۵±۰/۰۴^{Ab}
	نانوکیتوزان+ عصاره چای سبز	۰/۰۱۳±۰/۰۰^{Ca}	۰/۰۲۶±۰/۰۰^{Cb}	۰/۰۲۷±۰/۰۰^{Cb}	۰/۱۱±۰/۰۰^{Bb}	۰/۴۲±۰/۰۲^{Ab}
FFA	شاهد	۰/۳۱±۰/۲۴^{Da}	۰/۶۶±۰/۹۵^{Ca}	۰/۸۸±۰/۶۰^{Ca}	۱/۳۲±۱/۶۹^{Ba}	۱/۹۵±۳/۲۰^{Aa}
	نانوکیتوزان	۰/۳۰±۰/۲۸^{Da}	۰/۶۳±۰/۷۱^{Ca}	۰/۷۳±۰/۵۱^{Ba}	۱/۲۸±۰/۳۱^{Aa}	۱/۵۳±۰/۵۳^{Ab}
	نانوکیتوزان+ عصاره چای سبز	۰/۲۸±۰/۷۱^{Ca}	۰/۴۲±۰/۰۴^{CDb}	۰/۶۲±۱/۹۵^{BCb}	۰/۸۷±۱/۴۳^{ABab}	۱/۰۵±۱/۸^{Ac}
TVBN	شاهد	۱۰/۲۶±۰/۱۱^{Fa}	۱۵/۲۰±۲/۹۳^{Da}	۱۹/۱۱±۰/۹۸^{Ca}	۲۳/۰۵±۰/۶۵^{Ba}	۲۶/۵۰±۱/۱۷^{Aa}
	نانوکیتوزان	۱۰/۰۰±۰/۰۲^{Fa}	۱۴/۳۰±۰/۵۱^{Db}	۱۶/۳۱±۰/۱۴^{Cb}	۱۸/۱۰±۰/۳۰^{Bb}	۲۰/۶۰±۰/۵۵^{Aab}
	نانوکیتوزان+ عصاره چای سبز	۱۰/۰۰±۰/۲۰^{Ca}	۱۱/۲۶±۰/۳۰^{Cc}	۱۳/۷۰±۰/۳۰^{Bc}	۱۵/۴۰±۰/۶۰^{Bc}	۱۹/۴۰±۲/۳۰^{Ab}
pH	شاهد	۷/۸۹±۰/۰۰^{Aa}	۷/۷۵±۰/۱۵^{Aa}	۷/۳۴±۰/۱۰^{Ba}	۷/۱۹±۰/۳۰^{Ba}	۵/۳۵±۰/۰۴^{Ca}
	نانوکیتوزان	۷/۶۴±۰/۱۷^{Aa}	۷/۳۹±۰/۱۰^{Bab}	۷/۲۱±۰/۰۱^{Ba}	۷/۳۰±۰/۰۵^{Bab}	۵/۷۴±۰/۲۳^{Ca}
	نانوکیتوزان+ عصاره چای سبز	۷/۴۹±۰/۰۹^{Aa}	۷/۱۶±۰/۱۴^{ABb}	۷/۰۱±۰/۰۲^{Ba}	۶/۹۳±۰/۶^{Bb}	۵/۳۰±۰/۱۴^{Ca}
TMA	شاهد	۱/۴۰± ۰/۰۱^{Fa}	۲/۳۶±۰/۳۰^{Da}	۳/۶۳±۰/۱۵^{Ca}	۴/۵۳±۰/۱۵^{Ba}	۶/۵۳±۰/۱۵^{Aa}
	نانوکیتوزان	۲/۵۳±۰/۲۵^{Aa}	۲/۳۹±۰/۰۵^{Bb}	۱/۹۴±۰/۰۴^{Cb}	۱/۶۸±۰/۰^{bD}	۱/۵۰±۰/۰۰^{Fb}
	نانوکیتوزان+ عصاره چای سبز	۲/۳۳±۰/۰۸^{Aa}	۲/۰۷±۰/۰۷^{Bc}	۱/۷۸±۰/۰۴^{Cc}	۱/۵۹±۰/۰۱^{Db}	۱/۵۰±۰/۰۰^{Db}
SH	شاهد	۰/۸۷±۰/۰۱^{Fa}	۰/۶۶±۰/۰۲^{Db}	۰/۵۹±۰/۰۱^{Cc}	۰/۵۲±۰/۰۲^{Bc}	۰/۴۱±۰/۰۱^{Aa}
	نانوکیتوزان	۰/۸۸±۰/۰۰^{Fa}	۰/۷۴±۰/۰۴^{Da}	۰/۶۴±۰/۰۱^{Cb}	۰/۵۸±۰/۰۳^{Bb}	۰/۵۱±۰/۰۱^{Aa}
	نانوکیتوزان+ عصاره چای سبز	۰/۸۸±۰/۰۱^{Fa}	۰/۸۳±۰/۰۳^{Da}	۰/۷۸±۰/۰۳^{Ca}	۰/۶۸±۰/۰۳^{Ba}	۰/۶۱±۰/۰۱^{Aa}

داده ها بر اساس میانگین±انحراف معیار است. حروف بزرگ مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار طی زمانهای مختلف نگهداری و حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است.

ترتیب به ۰/۵۵±۲۰/۶۰، ۲/۳۰±۱۹/۴۰ (میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰گرم) در روز دوازدهم نگهداری رسید. در پایان دوره نگهداری بیشترین میزان بازهای نیتروژنی در تیمار شاهد و کمترین مقدار در تیمار پوشش نانوکیتوزان با عصاره چای سبز مشاهده شد که میتوان به خواص کاتکین عصاره چاي سبز اشاره کرد که به‌صورت ماده ضد میکروبی عمل کرده و باعث کاهش جمعیت باکتری‌ها یا کاهش ظرفیت باکتری‌ها برای دآمیناسیون اکسیداسیونی ترکیبات نیتروژنی، غیر نیتروژنی و یا هر دو عامل شود که بر میزان بازهای ازته فرار تاثیر می‌گذارد (۱۳). میزان ۲۵ میلی‌گرم نیتروژن به ازای۱۰۰گرم نمونه گوشت به عنوان حداکثر میزان قابل قبول بازهای ازته فرار در گوشت ماهی پیشنهاد شده است (۵). بر اساس نتایج تحقیق حاضر شاخص TVB-N در طول زمان نگهداری در نمونه شاهد و نمونه‌های پوششی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$). به‌طوری‌که در تیمار شاهد میزان بازهای نیتروژنی در انتهای دوره نگهداری از حد استاندارد تجاوز کرد. 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 پوششی به طور قابل توجهی نسبت به نمونه شاهد کندتر بود که ممکن است به دلیل کمتر بودن تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده (TMAO) به تری میتل آمین، پپتیدها، آمینو اسیدها و غیره باشد. رمضانی و همکاران (۲۰۱۵)، زارعی و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که می‌توان به میزان کمتر بازهای ازته فرار ذرات نانوکیتوزان نسبت داد که باعث حفظ کیفیت و ماندگاری بیشتر نمونه ماهی کپور نقره‌ای نگهداری شده در یخچال می‌شود (۱۷، ۲۳).

تغییرات شاخص pH تیمارهای شاهد و پوشش‌دار (با و بدون عصاره چای سبز) در جدول ۲ طی نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) مشاهده می‌شود. میزان pH در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. به‌طوری‌که میزان pH در نمونه شاهد از ۰/۰۴±۵/۳۵ در روز صفر نگهداری به ۰/۰۰±۷/۸۹ در روز دوازدهم نگهداری افزایش

جدول۳- مقایسه خصوصیات فیزیکوشیمیایی تیمارهای شاهد و پوشش دار (با و بدون عصاره چای سبز) طی دوره نگهداری در یخچال

فاکتورهای فیزیکوشیمیایی	تیمارها	زمان نگهداری(روز)				
		۰	۳	۶	۹	۱۲
طعم	شاهد	۵/۰۰±۰/۰۰^{Aa}	۴/۱۳±۰/۱۲^{Bc}	۳/۶۲±۰/۱۲^{Cb}	۲/۲۵±۰/۲۵^{Dd}	۲/۱۲±۰/۱۲^{Fc}
	نانوکیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰^{Aa}	۴/۵۰± ۰/۰۰^{Bb}	۴/۱۳±۰/۱۲^{Ca}	۳/۶۲±۰/۱۲^{Dbc}	۳/۱۳±۰/۱۲^{Fb}
	نانوکیتوزان+ عصاره چای سبز	۵/۰۰±۰/۰۰^{Aa}	۵/۰۰±۰/۰۰^{Aa}	۴/۵۰±۰/۲۵^{Ba}	۴/۱۲±۰/۳۷^{BCa}	۳/۷۵±۰/۲۵^{Ca}
بو	شاهد	۵/۰۰±۰/۰۰^{Aa}	۴/۲۶ ±۰/۲۶^{Bc}	۳/۳۷±۰/۱۲^{Cc}	۲/۵۰±۰/۲۵^{Dc}	۲/۳۷±۰/۱۲^{Fa}
	نانوکیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰^{Aa}	۴/۳۷±۰/۱۲^{Bb}	۳/۵۰±۰/۵۰^{Cb}	۳/۱۲±۰/۱۲^{Cb}	۲/۳۰±۰/۲۸^{Db}
	نانوکیتوزان+ عصاره چای سبز	۵/۰۰±۰/۰۰^{Aa}	۴/۸۷±۰/۱۲^{Aa}	۴/۰۰±۰/۲۵^{Ba}	۳/۸۷±۰/۱۲^{Ba}	۳/۲۵±۰/۲۵^{Ca}
پذیرش کلی	شاهد	۵/۰۰±۰/۰۰^{Aa}	۴/۳۷±۰/۱۲^{Ba}	۳/۵۰±۰/۲۵^{Bc}	۲/۸۷±۰/۱۲^{Cc}	۱/۸۷±۰/۱۲^{Dc}
	نانوکیتوزان	۵/۰۰±۰/۰۰^{Aa}	۴/۳۷±۰/۱۲^{Ba}	۴/۱۰±۰/۱۲^{BCb}	۳/۸۷±۰/۱۲^{Ca}	۳/۰۰±۰/۵۰^{Db}
	نانوکیتوزان+ عصاره چای سبز	۵/۰۰±۰/۰۰^{Aa}	۴/۵۸±۰/۳۸^{Ba}	۴/۶۲±۰/۱۲^{Ba}	۴/۱۳±۰/۱۲^{Ca}	۳/۷۵±۰/۰۰^{Da}

داده ها بر اساس میانگین±انحراف معیار است. حروف بزرگ مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار طی زمانهای مختلف نگهداری و حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است.

یافت. روند تغییرات در تیمار شاهد شدت بیشتری نسبت به سایر تیمار داشت به‌طوری‌که در انتهای دوره نگهداری pH بالاتری نسبت به سایر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵) میزان pH در انتهای دوره نگهداری در تیمارهای پوششی نانوکیتوزان و نانوکیتوزان با عصاره چای سبز به ترتیب به ۷/۶۴±۰/۱۷ و ۷/۴۹±۰/۰۹ رسید. کمترین میزان شاخص pH درانتهای دوره نگهداری در تیمار پوششی نانوکیتوزان با عصاره چای سبز مشاهده شد که دلیل آن می‌تواند خواص موجود در ترکیبات عصاره چای سبز به خصوص کاتکین باشد که بر سلول‌های میکروبی تاثیر گذاشته و با نفوذ عصاره به درون سلول بر متابولیسم RNA و DNA اثر کرده و از رشد و متابولیسم میکروب‌ها جلوگیری می‌کند. نتایج مشابهی توسط رمضانی و همکاران (۲۰۱۵) و زارعی و همکاران (۲۰۱۵) گزارش گردید (۱۷، ۲۳). کاهش اولیه pH عمدتا به دلیل رشد باکتری‌های اسید لاکتیک و در نتیجه تجمع اسید لاکتیک می‌باشد (۸)، درحالی‌که افزایش pH ممکن است ناشي از توليد تركيبات پايه فرار از قبيل آمونياك (آمونياك+آمونيوم)، تري متيل‌آمين (TMA) در اثر عمل آنزيم‌هاي داخلي يا آنزيم‌هاي ميكروبي باشد.

نتیجه تغییرات تری متیل آمین تیمارهای شاهد و پوشش‌دار (با و بدون عصاره چای سبز) طی نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) در جدول ۲ مشاهده می‌شود. میزان شاخص TMA با گذشت زمان نگهداری در تیمارهای مختلف افزایش یافت (p<۰/۰۵) به طوریکه در نمونه شاهد میزان TMA از ۱/۴۰±۰/۰۱ (میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه) در روز صفر نگهداری به ۶/۵۳±۰/۱ (میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه) رسید. میزان TMA در تیمارهای پوششی نانوکیتوزان بدون عصاره از ۳/۱۰±۰/۳۰ (میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه) در روز صفر نگهداری به ۲/۳۳±۰/۰۸ (میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه) در روز دوازدهم نگهداری افزایش یافت. در پایان دوره نگهداری تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای پوشش‌دار مقادیر بالاتری را نشان داد و کمترین میزان TMA در تیمار پوششی نانوکیتوزان با عصاره چای سبز مشاهده شد. مقدار ۱۰-۵ میلی گرم در ۱۰۰ گرم نمونه حد قابل قبول برای تری متیل آمین گزارش شده است (۵). باید توجه داشت که تری متیل آمین در ارتباط با فاکتورهای زیادی ارزیابی می‌شود و نمی‌توان سنجش این آمین را در ارتباط با یک فاکتور خاص دانست. در بررسی حاضر میزان TMA تا پایان دوره نگهداری در تمامی تیمارها از حد استاندارد تجاوز نکرد. مقایسه تیمارها در طول دوره نگهداری نشان می‌دهد که بیشترین میزان جهش در میانگین غلظت تری متیل آمین مربوط به تیمار شاهد می‌باشد. اگرچه در این مطالعه میزان تری متیل آمین در انتهای دوره نگهداری اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان نداد (p<۰/۰۵). مقایسه شاخص TMA در تیمارهای پوششی نشان داد که تیمارهای پوششی نانوکیتوزان با عصاره نسبت به تیمار پوششی نانوکیتوزان بدون عصاره چای سبز میزان تری متیل آمین اختلاف معنی داری نداشتند.

نتیجه تغییرات گروه سولفیدریل در تیمارهای شاهد و پوشش دار (با و بدون عصاره چای سبز) طی نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) در جدول ۲ مشاهده می‌شود. مقایسه بین تیمارها نشان داد که طی زمان نگهداری تیمار شاهد نسبت به تیمارهای پوششی میزان گروه سولفیدریل روند کاهشی بیشتری را نشان داد (p<۰/۰۵) به‌طوری‌که در تیمار شاهد میزان این شاخص از ۰/۸۷±۰/۰۱ (مول بر ۱۰۵گرم پروتئین) در روز صفر نگهداری به ۰/۴۱±۰/۰۱ (مول بر ۱۰۵ گرم پروتئین) در روز دوازدهم نگهداری کاهش یافت. کاهش میزان سولفیدریل کل ممکن است با دناتوره شده پروتئین‌های ماهیچه و شکل گیری پیوندهای دی سولفید یا اکسیداسیون گروه های سولفیدریل یا تبادلات پیوندهای دی سولفیدی در ارتباط باشد و یا ممکن است به دلیل تشکیل هیدروژن و باند های هیدروفوبیک باشد که مانع از واکنش ساختار سولفیدریل مولکول های اکتومیوزین می‌گردد (۳). میزان گروه سولفیدریل در انتهای دوره نگهداری در تیمارهای پوششی نانوکیتوزان و نانوکیتوزان با عصاره چای سبز به ترتیب به ۰/۵۱±۰/۰۱ و ۰/۶۱±۰/۰۱ (مول بر ۱۰۵ گرم پروتئین) رسید. میزان سولفیدریل کل در پایان دوره نگهداری در نمونه شاهد و تیمارهای غوطه‌ور تفاوت معنی‌دار نشان نداد (p<۰/۰۵).

نتایج ارزیابی حسی تیمارهای شاهد و پوشش‌دار (با و بدون عصاره چای سبز) طی نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) درجدول ۳ مشاهده می‌شود. شاخص‌های حسی با گذشت زمان به سرعت کاهش پیدا کرده و این کاهش کیفیت برای نمونه شاهد بیشتر بوده به‌طوری‌که از روز ۶ نگهداری به کمتر از حد مقبولیت رسید. برای تیمارهای پوششی نیز ارزیابی حسی در روز ۹ نگهداری به امتیاز کمتر از ۴ رسیدند (p<۰/۰۵) ارزیابی حسی در نمونه‌های شاهد نسبت به نمونه‌های پوششی به علت اکسیداسیون چربی و رشد میکروبی علائم فساد را به صورت بو و طعم نامناسب نشان دادند. نمونه‌های پوششی در روز ۱۲ نگهداری نمره حسی کمتر ولی قابل قبولی داشتند که دلیل آن می‌تواند مربوط به خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی پوشش و عصاره چای سبز باشد. نتایج مشابهی توسط Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) (۱۴) پیرامون خواص حسی نمونه‌های ماهی بوسیله پوشش خوراکی حاوی ترکیبات ضد میکروبی و روغن‌های گیاهی ارائه شده است. مقایسه تیمارهای پوششی نانوکیتوزان با و بدون عصاره نشان داد که امتیازات حسی تیمار نانوکیتوزان با عصاره چای سبز در پایان دوره نگهداری بالاتر است. Ramezani و همکاران (۲۰۱۵) (۱۷)، Zarei و همکاران (۲۰۱۵) (۲۳) نشان دادند که می‌توان به ارزیابی حسی بالای ذرات نانوکیتوزان نسبت داد که باعث حفظ کیفیت و ماندگاری بیشتر نمونه ماهی کپور نقره‌ای نگهداری شده در یخچال می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، استفاده از نانوکیتوزان با عصاره چای سبز در پوشش فیله ماهی گیش درخشان سبب جلوگیری از افزایش عوامل تاثیرگذار در فساد شیمیایی آن می‌شود. مدت ماندگاری محصول از لحاظ عوامل شیمیایی مورد بررسی در این مطالعه به حداقل دو برابر زمان ماندگاری معمول که در شرایط نگهداری در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳ روز تعیین شده، قابلیت افزایش دارد. همچنین نانوذرات کیتوزان به طور موثری تاثیرات مفید عصاره چای سبز از جمله خواص ضد میکروبی و فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی آن را افزایش می‌دهد. لذا استفاده از نانو پوششهای غنی شده با عصاره گیاهی می‌تواند به حفظ اسیدهای چرب ارزشمند موجود در چربی ماهی و کاهش آسیب لیپیدها طی زمان نگهداری به شکل موثری عمل نماید.

پاورقی‌ها

1- Escherichia coli
2- Staphylococcus aureus
3- Salmonella choleraesuis
4- Salmonella typhimurium
5- Commercial chitosan
6- zip pack
7- کشت آمیخته
8- Plate count agar
9- Thiobarbituric acid
10- Free Fatty Acids
11-Oleic acid
12-Blank
13-Total volatie basic-nitrogen
14-Kolmogorov-smirnov
15-One-Way ANOVA
16-Friedman
17-Escherichia coli
18-Staphylococcu aureus
19-Salmonella typhimurium
20-Pseudomonas spp.

منابع مورد استفاده

1- AOAC. 2005. Official Method cod manufacturing: Influence of salting procedure on process yield and product characteristics. *Journal of Food Engineering* 69, 467-471.

2- Bulmera C., A. Margaritisa and A. Xenocostasb. 2012. Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled releasa of rHU –Erythropoietin. *Biochemical Engineering Journal* ,pp .61-69.

3- Benjakul S., T.A. Seymour M.T. Morrissey and H. An. 1997. Physicochemicalchanges in Pacific Whiting muscle proteinsduring frozen storage. *Journal of Food Science* 62, 729-733.

4- Carpenter, K.E., P..Harrison, G. Hodgson, A.H. Alsaffar and S.H. Ahazeem. 1997. The corals and coral reef Fishes of Kuwait, Kuwait Institute for Scientific research.

5- Connell J.J. 1990. Methods of assessing and selecting for quality. In Control of Fish Quality, 2rd Ed., Springer, Berlin.

6- Du W.L., Z.R., Xu, X.Y. Han, Y.L. Xu and Z.G. Miao. 2009. Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticlesfor eosin Y as a model anionic dye. *Journal of Hazardous Material* 153, 152-156.

7- Egan H., R.S. Kirk and R. Sawyer. 1997. Pearson's chemical Analysis of Foods. 9th edition. Churchill Livingtone, Edingburgh, Scotland, UK. pp 609-643.

8- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70–77.

9- Goulas A.E. and M.G. Kontominas. 2007. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (Sparusaurata): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry* 100, 287-296.

10- Kirk R.S. and R. Sawyer. 1991. Pearsons Chemical Analysis of Foods.(9th Ed.) Longman Scientific and Technical. Harlow,Essex,UK.

11- 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.

12- Nirmal NP. and S. Benjakul. 2009. Melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3578–3586.

13- Nirmal NP, and S. Benjakul. 2011.Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of qualityloss of Pacific white shrimp during iced storage. *LWT Food Science and Technology* 44, 924–932.

14- Ojagh S.M., M. Rezaei, S.H., Razavi, S.M.H., Hosseini. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamonoil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry* 120, 193-8.

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

16- Ratnaparkhi M.P. and S.P. Chaudhari. 2011. Pandy V.A., Peptid and protein in pharmaceuticals, *International Journal of current Pharmaceutical Research,* pp.1-9.

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

18- Sallam I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodiumcitrate in refrigerated sliced salmon. *Journal Food Control* 18, 566-75.

19- Shi Z.L., K.G. Neoh, E.T. Kang, W. Wang. 2006. Antibacterial and mechanicaproperties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials* 27, 2440–2449.

20- Tarladgis, B.G., B.M. Watts and M.T. Younathan. 1960. Adistillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *The Journal of the American Oil Chemists Society* 37, 44-48.

21- Yang, T. and Koo, M. 1997. Hypocholesterolemic effect of

Chinese tea. *Pharmacological Research* 35, 505-512.
22- Yuan, Q., J. Shah, S. Hein and R.D.K. Misra. 2010. Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier. *Acta Biomaterialia* 6, 1140-1148.
23- 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.
24- 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.