DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/JIFT.2019.3628.1869

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، دوره ۷، شماره ۲، صفحه ۲۴۲-۲۲۳، زمستان ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

اثر فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه کیتوسان/ پلی‌وینیل‌الکل/ژلاتین حاوی سینامالدهید در افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*

جابر قادری[1]، سید فخرالدین حسینی[2*]، ماریا کارمن گومز گیلن[3]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه فراوری‌محصولات‌شیلاتی، دانشکده‌علوم‌دریایی، دانشگاه تربیت‌مدرس، نور، ایران

۲. دانشیار، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۳- استاد، موسسه علوم و تکنولوژی مواد غذایی و تغذیه (ICTAN-CSIC)، مادرید، اسپانیا

(تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۱، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۸/۳/۲۶، تاریخ پذیرش: ۹۸/۴/۱۶)

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی مقایسه‌ای اثر افزودن سینامالدهید به دو شکل آزاد ۱/۶٪، حجمی/حجمی و نانوکپسوله‌شده ۰/۳۷۵٪، وزنی/وزنی بر خصوصیات فیلم زیست تخریب‌پذیر بر پایه کیتوسان/پلی‌وینیل الکل/ژلاتین ماهی و در ادامه پتانسیل آن جهت افزایش زمان ماندگاری فیله تازه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان،*Oncorhynchus mykiss*، در دمای یخچال صورت پذیرفت. نتایج نشان داد افزودن سینامالدهید به صورت آزاد و نانوکپسوله‌شده باعث افزایش نفوذپذیری به بخارآب، WVP، فیلم‌ها شده، همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، SEM، تفاوت‌های قابل توجه در ریخت‌شناسی سطح بین فیلم خالص و فیلم‌های حاوی سینامالدهید آزاد و کپسوله‌شده را آشکار نمود. در فاز دوم مطالعه حاضر، اثرات ضداکسیداسیونی/ضدمیکروبی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر تهیه‌شده جهت افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی در چهار تیمار به‌ترتیب شامل شاهد بدون پوشش،Control، نمونه پوشش داده شده با فیلم خالص بدون سینامالدهید آزاد و نانوکپسوله‌شده، CT؛ فیله‌های پوشش داده شده با فیلم حاوی ۱/۶٪، حجمی/حجمی سینامالدهید آزاد، FCCT؛ و نمونه پوشش داده شده با فیلم حاوی ۰/۳۷۵٪ وزنی/وزنی سینامالدهید نانوکپسوله‌شده، NCCT، مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده، مقادیر تیوباربیتوریک اسید، TBA، فیله‌ها در تیمار FCCT به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود ($p<0.05$). آزمون رنگ‌سنجی فیله‌ها نیز نشان داد که شاخص روشنایی، *L، از روز ۱۲ نگه‌داری در تیمار FCCT کمتر از سایر تیمارها بوده است. همچنین، تیمار FCCT حاوی مقادیر کمتری از بار باکتریایی کل، TVC، و نیز باکتری‌های سرمادوست، PTC، در سراسر دوره نگه‌داری بود به‌طوری‌که در روز ۱۲ نگه‌داری به حد نهایی بار باکتریایی اجازه داده شده برای مصرف انسانی برسد. در مجموع، فیلم زیست-تخریب‌پذیر حاوی سینامالدهید به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی می‌تواند جهت افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بسته‌بندی زیست‌تخریب‌پذیر؛ سینامالدهید؛ ماهی قزل‌آلای‌رنگین کمان؛ بار باکتریایی؛ زمان ماندگاری.

* نویسنده مسئول: hosseinisf@modares.ac.ir

۱. مقدمه

به‌طور تقریبی سالانه ۲۰٪ کل جمعیت جهان به عوامل بیماری‌زای غذا زاد مبتلا می‌شوند که از این میزان ۰/۵٪ آن‌ها دچار مرگ و میر می‌شوند [۱]. براساس گزارش مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها در سال ۲۰۱۲، هر ساله در ایالات متحده آمریکا حدود ۱۲۸۰۰۰ نفر به علت بیماری‌های غذازاد در بیمارستان بستری شده و ۳۰۰۰ نفر نیز جان خود را از دست می‌دهند [۲]. از سوی دیگر، فراورده‌های غذایی تازه مورد تقاضا و استقبال مصرف‌کننده در صنعت غذایی می‌باشد، اما ماندگاری کوتاه این محصولات، نگرانی شرکت‌های غذایی را به‌همراه داشته است [۳]. در این بین، فراورده‌های تازه ماهی معمولاً فسادپذیری بالاتری نسبت به بسیاری از مواد غذایی دارند. جهت کاهش خطرات حاصل از عوامل بیماری‌زای غذازاد و همچنین افزایش زمان ماندگاری موادغذایی از روش‌های مختلفی مانند اشعه‌دهی، فشار هیدرواستاتیک بالا، پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون استفاده می‌گردد. از آن‌جایی که در رابطه با برخی موادغذایی مانند فراورده‌های گوشتی، استفاده از این روش‌ها مطلوب نمی‌باشد، استفاده از بسته‌بندی‌های فعال می‌تواند بسیار کاربردی باشد [۴]. بسته‌بندی فعال نوعی بسته‌بندی می‌باشد که با ایجاد تغییرات شیمیایی یا زیستی در محتویات یا فضای داخل بسته‌بندی، ایمنی و مدت‌زمان نگه‌داری موادغذایی افزایش می‌یابد. به منظور تولید بسته‌بندی‌های فعال از پلیمرهایی با منشاء فسیلی استفاده می‌گردد که دارای مزایایی از قبیل سهولت تولید، سبک بودن، خواص فیزیکی و ممانعت‌کنندگی مناسب می‌باشند؛ با این حال، با توجه به خاصیت زیست‌تخریب‌ناپذیری، استفاده از آن‌ها سبب ایجاد نگرانی‌های روز افزون زیست‌محیطی گشته است؛ گزارشی مبنی بر تولید سالانه ۱۵ و ۳۰ میلیون تن ضایعات پلاستیکی به‌ترتیب در آمریکا و غرب اروپا وجود دارد [۵]. این چالش‌های زیست‌محیطی، محققان را به استفاده از مواد زیست-تخریب‌پذیر به‌منظور جایگزینی با اجزاء پلاستیکی واداشته است؛ در این زمینه، زیست‌پلیمرهایی مانند پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، و نیز کامپوزیت آن‌ها به‌عنوان جایگزین‌های امیدبخش به‌واسطه زیست‌تخریب‌پذیری، فراوانی و تجدیدپذیری مدنظر قرار داده می‌شوند.

ژلاتین ماهی، به‌عنوان فراورده جنبی صنعت فراوری آبزیان، توجه فزاینده‌ای را در سال‌های اخیر به‌عنوان یک جایگزین دلگرم‌کننده برای ژلاتین پستانداران به‌واسطه نگرانی‌های گیاه-خواری و نیز دارا بودن پتانسیل بازار حلال و پاک، به‌دست آورده است؛ همچنین ژلاتین ماهی به دلیل دارا بودن پرولین و هیدروکسی‌پرولین کمتر در ساختار خود، ممانعت‌کنندگی بهتری در برابر رطوبت نسبت به انواع دیگر ژلاتین از خود نشان می‌دهد؛ با این‌حال، خاصیت ممانعت‌کنندگی در برابر رطوبت فیلم‌های برپایه ژلاتین از سایر پلیمرها ضعیف‌تر است، زیرا پرولین و هیدروکسی‌پرولین قادر به ایجاد پیوند هیدروژنی با مولکول‌های آب می‌باشند [۶]. به منظور کاهش خواص آب‌دوستی و بهبود ویژگی‌های فیزیکی و نیز القاء فعالیت ضدمیکروبی/ضداکسیدانی، یک سیستم چندترکیبی مانند ترکیب ژلاتین با سایر زیست-پلیمرها مانند کیتوسان که توانایی حمل ترکیبات زیست‌فعال را نیز دارا باشد، مناسب است [۷]. کیتوسان یک پلی‌الکترولیت کاتیونی با خواص چسبندگی مخاطی عالی می‌باشد که از استیل-زدایی کیتین ایجاد شده و از واحدهای گلوکزآمین تشکیل شده و تحت عنوان amino-2-deoxy-(1–4)-β-D-glucopyranan-2 شناخته می‌شود؛ کیتوسان دارای خواص تشکیل فیلم و فعالیت-های ضدمیکروبی شناخته‌شده‌ای است؛ فیلم‌ها و پوشش‌های تولیدی بر مبنای کیتوسان، سخت، پایدار، انعطاف‌پذیر و مقاوم در برابر پارگی می‌باشند؛ هم‌چنین کیتوسان از خاصیت ممانعت-کنندگی مطلوبی در برابر اکسیژن و رطوبت برخوردار است، و از همین رو ترکیب آن با ژلاتین، زیست‌کامپوزیتی با خواص فیزیکی مطلوب‌تر ارائه خواهد داد [۶].

امروزه ترکیبات زیست‌تخریب‌پذیر طبیعی با انواع سنتزی که زیست‌تخریب‌پذیر می‌باشند نیز ترکیب می‌گردند که موجب کاهش هزینه‌های اجرایی در مقیاس تجاری و نیز بهبود خواص فیزیکی زیست‌کامپوزیت‌ها می‌گردند؛ در همین رابطه، کیتوسان به علت حضور گروه‌های هیدروکسیل و آمین در ساختار خود می‌تواند با ایجاد پیوند هیدروژنی با پلی‌وینیل‌الکل (PVA) اتصال یابد و سبب ایجاد زیست‌کامپوزیتی بهینه گردد [۸]. PVA، پلیمری سنتزی که از هیدرولیز پلی‌وینیل‌استات به‌دست می‌آید، نیمه متبلور، ترموپلاستیک و غیرسمی با منشاء فسیلی می‌باشد که به علت ترکیب ویژه ساختاری و نادر خود یعنی پیوند یگانه کربن-کربن تجزیه آن آسان و زیست‌تخریب‌پذیر می‌باشد؛ PVA خواص ممانعتی مطلوبی در برابر گازها و رایحه‌ها دارد [۹] و فیلم‌های حاصل از آن دارای خواص فیزیکی مناسب و نیز

استحکام کششی، TS، بالایی می‌باشند و در نتیجه می‌تواند در ترکیب با سایر پلیمرها مانند کیتوسان در جهت بهبود خواص زیست‌کامپوزیت‌ها استفاده گردد؛ PVA توسط سازمان کشاورزی آمریکا، USDA، جهت به کارگیری در پوشش بسته‌بندی محصولات گوشتی و شیلاتی تایید گشته است [۸].

از سوی دیگر چون بیشترین آلودگی‌ها درطی تولید، فرایند و یا حمل ماده‌غذایی رخ می‌دهد، چنانچه ماده‌غذایی در دمای یخچال نگه‌داری گردد همچنان خطر فساد و سمیت ناشی از میکروارگانیسم‌هایی مثل *لیستریا منوسیتوژنز* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* که قادر به رشد در دمای پایین هستند وجود دارد؛ بنابراین به منظور محافظت ماده‌غذایی از فساد میکروبی و جلوگیری از شیوع عوامل بیماری‌زای غذازاد، یک روش ممکن استفاده از پوشش‌های ضدمیکروبی در تماس با ماده‌غذایی، AFCMs(Antimicrobial food contact materials)، به‌منظور نابودی و یا مهارآلودگی‌های میکروبی و اطمینان از امنیت غذا در طول نگه‌داری و همچنین توزیع می‌باشد [۲].

بسته‌بندی‌های ضدمیکروبی با آزادسازی تدریجی و یا کنترل-شده ترکیبات ضدمیکروبی به ماده‌غذایی از فساد آن‌ها جلوگیری می‌نمایند. عموما عوامل ضدمیکروبی به‌کارگرفته شده در AFCMs شامل مواد آلی، معدنی و ترکیبات زیست‌فعال می-باشند، به ویژه مواد ضدمیکروبی شناخته شده با عنوان طبیعی و غیرسمی به‌دلیل مسائل زیست‌محیطی و سلامتی ارجحیت داده می‌شوند.

روغن‌های اساسی نوعی از مواد طبیعی هستند که فعالیت ضدمیکروبی قوی در برابر طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا دارند و تحت عنوان GRAS (Generally Recognized as Safe) توسط سازمان غذا و داروی آمریکا به رسمیت شناخته می‌شوند [۱۰]. افزودن روغن‌های اساسی به فرمولاسیون فیلم‌های بر پایه مواد تجزیه‌پذیر در جهت بهبود ویژگی‌های ضدمیکروبی و نیز خواص دیواره‌ای آن‌ها می‌باشد. خواص ضداکسیدانی و ضدمیکروبی روغن‌های اساسی متعددی از جمله آویشن، میخک، رزماری، پونه‌کوهی، مریم‌گلی و مرزه بر طیف وسیعی از باکتری‌ها به اثبات رسیده است [۱۱، ۱۲]. یکی از این ترکیبات ضدمیکروبی، سینامالدهید حاصل از روغن اساسی دارچین است که ۷۵-۶۰٪ کل آن را تشکیل می‌دهد و به‌عنوان افزودنی طعم-دهنده به ماده‌غذایی توسط FDA مورد تایید قرار گرفته است [۲]؛ سینامالدهید عملکرد مناسبی در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مضر از خود نشان داده است. با این‌حال استفاده از روغن‌های اساسی و ترکیبات موثره آن در نگه‌داری غذا تا حدی به‌علت حلالیت کم در آب، فراریت بالا و ایجاد طعم خاص و تغییر ویژگی‌های حسی غذا محدود شده است [۱۰].

امروزه در صنایع‌غذایی فرایند نوظهور نانوانکپسولاسیون در راستای پایدار نمودن، افزایش زیست‌دسترسی و نیز رهایش پایدار ترکیبات زیست‌فعال مانند روغن‌های اساسی، پپتیدها و آنزیم‌ها به‌کار گرفته می‌شود [۱۳]. در سال‌های اخیر، نانوذرات زیست-تخریب‌پذیر به‌عنوان سیستم‌های رهایش ترکیبات زیست‌فعال غذایی چربی‌دوست توجه چشمگیری را به خود جلب نموده است؛ نانوذرات کیتوسان، CSNPs، به‌دلیل زیست‌تخریب‌پذیری، سمیت کم و زیست‌سازگاری به‌عنوان سیستم‌های حمل برای ترکیبات زیست‌فعال از قبیل داروها، ژن‌ها، پروتئین‌ها، پپتیدها، فلاونوئیدها، و روغن‌های اساسی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۴]. بنابراین و با درنظر گرفتن مطالب مطرح شده، اهداف این مطالعه عبارت بودند از: ۱) سنتز نانوذرات کیتوسان حاوی سینامالدهید و مشخصه‌یابی نانوذرات به‌دست آمده، ۲) تهیه و ارزیابی خواص فیلم‌های بسته‌بندی زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/ژلاتین ماهی غنی‌شده با سینامالدهید به دو شکل آزاد و نانوکپسوله‌شده و ۳) ارزیابی اثربخشی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر تهیه شده بر حفظ کیفیت و افزایش زمان ماندگاری فیله تازه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق اندازه-گیری ترکیبات شیمیایی فیله، شاخص‌های شیمیایی pH و TBA (Thiobarbituric acid)، فیزیکی مانند رنگ‌سنجی و میکروبی شامل TVC(Thiobarbituric acid) و Psychrophilic) PTC (total counts طی نگه‌داری در دمای سرد، ۴ ± ۱ °C.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد

کیتوسان وزن مولکولی متوسط، درجه استیل‌زدایی ۸۵-۷۵٪، ژلاتین به‌دست آمده از پوست ماهیان آب‌های سرد، پلی‌وینیل الکل PVA، وزن مولکولی ۹۸۰۰۰-۸۹۰۰۰، ۹۹٪+ هیدرولیز شده، و سدیم تری‌پلی‌فسفات TPP از شرکت سیگما-آلدریچ ساخت کشور آمریکا خریداری شدند. دی‌کلرومتان از شرکت کارلوارِبا ساخت کشور ایتالیا، سینامالدهید با درجه خلوص

۱۰۰٪، اسید استیک، توئین ۸۰، گلیسرول، کاغذ صافی واتمن ۴۲، کلروفرم، اسیدکلریدریک، متانول و محیط کشت تریپتون سوی براث TSB و نوترینت آگار NA از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. سویه‌های باکتریایی شامل *لیستریا مونوسیتوژنز* ATCC 13932، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، *سالمونلا اینتریتیدیس* ATCC 18034 و *اشرشیاکلی* ATCC 25922 از انستیتو پاستور آمل تهیه شد.

۲.۲. تهیه نانوذرات کیتوسان حاوی سینامالدهید

نانوذرات کیتوسان طبق روش انعقاد یونی حسینی و همکاران [۱۳] تهیه گردید. محلول کیتوسان ۰/۵ ٪ وزنی/حجمی به‌وسیله هم‌زدن کیتوسان در استیک اسید ۱٪ حجمی/حجمی، pH=۵، به مدت یک شبانه‌روز بر روی همزن مغناطیسی (۴۰۰ rpm) در دمای محیط حاصل شد. سپس محلول به‌دست‌آمده سانتریفیوژ شده (۷۰۰۰ g، ۳۰ min، ۴ °C) و مایع رویی از میان فیلترهای ۱ µm عبور داده شد. در ادامه، توئین ۸۰ به‌عنوان عامل فعال سطحی به محلول اضافه گردید و به مدت ۲ h در دمای ۵۰ °C هم‌زده شد تا محلول کاملا یکنواختی به‌دست آید. سپس فاز آلی که حلال دی‌کلرومتان حاوی سینامالدهید ۰/۳۷۵٪ وزنی/وزنی بود به تدریج به محلول کیتوسان اضافه گردید. سپس محلول تری‌پلی‌فسفات‌سدیم TPP ۰/۴٪ وزنی/حجمی به‌عنوان عامل اتصال‌دهنده عرضی به صورت قطره قطره با کمک سرنگ به امولسیون تشکیل‌شده اضافه شد (۲۰۰۰ g، ۲ h). در ادامه، ذرات تشکیل‌شده به‌وسیله سانتریفیوژ جمع‌آوری شدند (۷۰۰۰ g، ۳۰ min، ۴ °C). از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM جهت ریخت‌شناسی و تعیین اندازه نانوذرات کیتوسان حاوی سینامالدهید استفاده شد.

۳.۲. آماده‌سازی و انجام بررسی‌های میکروبی

۱.۳.۲. نگه‌داری سویه‌های میکروبی

به‌منظور نگه‌داری طولانی‌مدت سویه‌های باکتریایی، ابتدا محیط کشت TSB به همراه ۳۰٪ گلیسرول به‌عنوان یک ماده ضد انجماد تهیه و به میزان ۱/۵ ml درون میکروتیوب ریخته شد. پس از اتوکلاو، به هر اپندورف میزان ۱۰۰ µl محیط کشت حاوی سویه‌های باکتریایی اضافه گردید و در دمای ۲۰- °C نگه‌داری شدند. مراحل توضیح داده شده هر ۲ ماه یک‌بار تکرار گردید.

۲.۳.۲. آماده‌سازی سویه‌های باکتریایی

جهت فعال‌سازی سویه‌های باکتریایی، میزان ۱۰۰ µl از استوک اصلی باکتری‌ها در شرایط استریل به لوله‌های فالکون حاوی ۱۰ cc محیط کشت TSB منتقل و به مدت ۲۴-۴۸ h ساعت در دمای ۳۷ °C درون انکوباتور شیکردار نگه‌داری شد. سپس محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۵ min سانتریفیوژ شده و مایع رویی برداشته و محلول ۰/۹٪ آب‌نمک جایگزین آن گردید. در ادامه، به منظور جداسازی کامل محیط کشت از باکتری‌ها، دوباره محلول حاصل به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ گشت. سپس جهت تعیین تعداد باکتری‌ها، از روش کدورت‌سنجی در طول موج ۶۰۰ nm استفاده شد، بدین طریق که جذب نوری ۰/۱-۰/۰۸ معادل $۱×۱۰^{۸}$ باکتری در هر ml می‌باشد [۱۰].

۳.۳.۲. سنجش فعالیت ضدمیکروبی سینامالدهید

فعالیت ضدمیکروبی سینامالدهید در برابر ریزسازواره‌های معمول ناشی از موادغذایی شامل *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا اینتریتیدیس* و *اشرشیاکلی* با استفاده از روش چاهک و انتشار دیسک ارزیابی شد. ابتدا ۱۰۰ µl از محیط کشت براث حاوی مقدار تقریبی $۱۰^{۸}$ CFU/mL از باکتری‌های مدنظر به‌صورت جداگانه بر روی محیط کشت نوترینت اگار استریل شده کشت داده شد. برای روش انتشار دیسک دو طرف کاغذ صافی Ø=6 mm تحت اتوکلاو استریل شده، به دنبال آن ۵ µl سینامالدهید به هر کدام اضافه شده و سپس کاغذ حاوی سینامالدهید در قسمت بالای پلیت‌ها قرار داده شد و به مدت ۲۴ h ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری گردید [۱۰]. قطر منطقه بازداری با استفاده از کولیس اندازه‌گیری گردید.

۴.۲. تولید فیلم‌های بسته‌بندی زیست‌تخریب‌پذیر حاوی سینامالدهید آزاد و کپسوله‌شده

جهت تولید فیلم زیست‌تخریب‌پذیر کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/ژلاتین ماهی حاوی سینامالدهید آزاد و کپسوله‌شده، ابتدا محلول‌های ۱/۵٪ وزنی/حجمی کیتوسان ۲٪، ژلاتین وزنی/حجمی و ۲ ٪ پلی‌وینیل‌الکل وزنی/حجمی تهیه شدند. پس از آماده‌سازی محلول‌ها، ابتدا محلول کیتوسان و پلی‌وینیل‌الکل با یکدیگر مخلوط شده و به مدت ۴۵ min در دمای ۴۵ °C

بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شدند [۱۵]؛ پس از اختلاط، محلول ژلاتین نیز به آن‌ها افزوده شده و محلول حاصل در همان دما به مدت 45 min دیگر بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد؛ سپس گلیسرول به میزان ۰/۳٪ به محلول اضافه شده و 15 min در همان دما بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. در ادامه، توئین ۸۰ نیز به مخلوط نهایی اضافه شده و به مدت 30 min در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. به منظور تهیه فیلم‌های ضدمیکروبی، سینامالدهید به دو شکل آزاد ۱/۶٪ حجمی/حجمی و نانوکپسوله‌شده ۰/۳۷۵٪ وزنی/وزنی، به تدریج به محلول کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/ژلاتین ماهی به مدت 30 min بر روی همزن مغناطیسی اضافه گردید. در ادامه محلول تشکیل فیلم حاوی سینامالدهید آزاد و کپسوله‌شده به مدت 45 min داخل آون خلاء قرار داده شد تا عمل حباب‌زدایی انجام گردد. پس از حباب‌گیری، محلول به آرامی درون پلیت منتقل شد و به مدت 48 h ساعت در دمای 40 °C در آون قرار گرفته تا خشک شوند.

۵.۲. سنجش خواص فیزیکی و ساختاری فیلم‌های تولیدی

۱.۵.۲. سنجش ضخامت فیلم‌ها

جهت اندازه‌گیری ضخامت نمونه‌ها از ریزسنج دیجیتالی Mitutoyo با دقت 0/0001 mm ساخت کشور ژاپن استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها به صورت تصادفی در ۹ نقطه از هر نمونه تکرار شد. میانگین ضخامت این نقاط برای تعیین ویژگی‌های فیزیکی فیلم‌ها استفاده گردید [۶].

۲.۵.۲. سنجش میزان نفوذپذیری در برابر بخارآب WVP

این آزمون طبق روش مصوب ASTM E96/E96M-05 انجام شد [۱۶]. ابتدا فیلم‌ها به مدت 48 h در دسیکاتور حاوی نیترات منیزیم اشباع با رطوبت نسبی ۴ ±۵۰٪ جهت مشروط‌کردن قرار داده شدند [۶]. جهت انجام این آزمون، فیلم‌های تولیدی توسط گریس سیلیکون بر روی یک فنجان شیشه‌ای با قطر دهانه‌ی 49 mm حاوی 6 ml آب مقطر دارای رطوبت نسبی ۱۰۰٪ و فشار بخار $2/337 \times 10^3$ پاسکال در دمای 20 °C چسبانده شدند. دور فنجان‌ها نیز به آرامی با پارافیلم پوشش داده شد؛ سپس فنجان‌های توزین شده در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل در دمای محیط قرار گرفتند؛ وزن فنجان‌ها در فواصل زمانی 2 h طی 12 h گزارش شد. در نهایت میزان نفوذپذیری فیلم‌ها در برابر بخار آب طبق رابطه شماره (۱) زیر محاسبه شد.

$$WVP=\frac{WVTR \times L}{\Delta P} \quad (1)$$

WVTR = ($g\ mm/KPa\ h\ m^2$) نرخ عبور بخار آب از فیلم

L = میانگین ضخامت فیلم بر حسب mm

ΔP = اختلاف فشار بخار آب دو طرف فیلم

۳.۵.۲. آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی

به منظور بررسی شکل و اندازه نانوذرات کیتوسان حاوی سینامالدهید از تصویربرداری SEM استفاده شد. بدین منظور 2 mg از نانوذرات خشک‌شده در 20 cc آب مقطر رقیق و سپس به مدت 4 min فراصوت شد. سپس چند قطره از محلول به‌دست آمده بر روی لامل قرار داده شد و در دمای محیط خشک گردید. سپس نانو ذرات خشک شده تحت شرایط خلاء با لایه نازکی از طلا پوشش داده شد و مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی ریخت‌شناسی سطح و مقطع عرضی فیلم‌های تولیدشده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل XL30 ESEM شرکت PHilips ساخت کشور هلند استفاده شد. جهت بررسی مقطع عرضی، نمونه‌های فیلم که به‌وسیله قرار دادن در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل به مدت ۲ هفته به‌دست آمد در نیتروژن مایع غوطه‌ور و سپس به‌صورت دستی شکسته شد. به منظور بررسی ریخت‌شناسی سطح نیز فیلم‌ها در ابعاد بسیار کوچک بریده و به کمک چسب نقره بر روی پایه آلومینیومی چسبانده شدند. پایه‌ها در یک دستگاه پوشش دهنده-پاشنده تا نقطه‌ی بحرانی خشک شده و به مدت 5 min با طلا پوشش داده شدند. تصویربرداری از نمونه‌ها به‌وسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی روبشی با کاربری 10kV و در بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ انجام شد.

۶.۲. آماده‌سازی ماهی و پوشش‌دهی آن با فیلم‌های ضدمیکروبی

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی 50 gr ± 300 در دی ماه ۱۳۹۷ از مزرعه پرورش ماهی واقع در کشپل، شهرستان نور، استان مازندران خریداری و در کنار یخ به آزمایشگاه فراوری دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. بعد از عملیات مربوط به تخلیه شکمی، سرزنی و استخوان‌گیری، فیله‌های تهیه‌شده به خوبی شستشو و جهت حذف آب اضافی زیر هود قرار گرفتند. در مرحله بعد فیله‌ها با فیلم‌های مورد نظر

پوشانده شده و تیماربندی بدین شکل صورت گرفت: شاهد یا نمونه‌های فاقد پوشش فیلم Control؛ فیله پوشش داده شده با فیلم کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/ژلاتین ماهی CT؛ فیله‌های پوشش داده شده با فیلم‌های حاوی غلظت ۱/۶٪ حجمی/حجمی سینامالدهید آزاد FCCT؛ نمونه پوشش داده شده با فیلم حاوی سطح ۰/۳۷۵٪ وزنی/وزنی سینامالدهید نانوکپسوله‌شده NCCT. در پایان فیله‌های مربوطه در ظروف مخصوص داخل یخچال قرار گرفته و به مدت ۱۶ روز در فواصل زمانی ۴ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۱.۶.۲. تعیین ترکیب شیمیایی فیله و اندازه‌گیری pH

میزان رطوبت در دمای ۱۰۳ °C به مدت ۲۴ h و خاکستر نیز در دمای ۵۵۰ °C به مدت ۵ h تعیین شد؛ پروتئین نمونه‌ها به روش کلدال، با ضریب تبدیل ۶/۲۵ و مقدار چربی به کمک دستگاه سوکسله محاسبه گردید [۱۷]. جهت سنجش pH، ۵ g از نمونه ماهی همگن شده و با ۱۰ ml آب مقطر مخلوط و در نهایت pH نمونه با کمک دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد.

۲.۶.۲. اندازه‌گیری تیوباربیتوریک اسید TBA

اندازه‌گیری TBA به‌وسیله روش رنگ‌سنجی صورت گرفت. مقدار ۲۰۰ mg از نمونه چرخ شده ماهی به یک بالن ۲۵ ml انتقال یافت و سپس با بوتانل به حجم رسانده شد. از مخلوط فوق ۵ ml به لوله‌های خشک دربدار وارد شده و به آن ۵ ml معرف TBA اضافه گردید. لوله‌های دربدار در حمام آب با دمای ۹۵ °C به مدت ۲ h قرار گرفته و پس از آن در دمای محیط سرد شدند. سپس مقدار جذب یا As در ۵۳۲ nm در مقابل شاهد آب مقطر یا Ab خوانده شد. مقدار TBA بر حسب MDA/kg sample mg و بر اساس رابطه شماره (۲) محاسبه گردید [۱۸].

$$TBA=\frac{(As-Ab)\times 50}{200} \qquad (۲)$$

As= جذب نمونه

Ab = جذب شاهد

۳.۶.۲. رنگ‌سنجی

به منظور سنجش میزان رنگ سطحی، پس از عکس‌برداری اولیه مقادیر L^*، a^* و b^* که به‌ترتیب بیانگر روشنایی luminosity، سبز-قرمز greenness-redness و آبی-زرد blueness-yellowness هستند، با دستگاه رنگ‌سنج مدل BYK Gardner ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد و شاخص رنگ در تیمارهای مختلف مورد آزمون قرار گرفت. شاخص سفیدی یا WI نیز با کمک رابطه شماره (۳) محاسبه شد [۱۹]. سه تکرار برای هر نمونه به‌طور تصادفی از مکان‌های سطحی نمونه ثبت گردید.

$$WI = 100 - [(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \qquad (۳)$$

۴.۶.۲. بررسی میزان بار میکروبی

بدین منظور، ابتدا ۵ g گرم فیله ماهی تحت شرایط استریل با ۴۵ ml محلول سرم فیزیولوژی مخلوط و سپس همگن گردید. در ادامه رقت‌های مورد نیاز تهیه و میزان ۱ ml از هر کدام جهت کشت و بررسی بار باکتریایی به روش پورپلیت مورد استفاده قرار گرفت. شمارش تعداد باکتری‌های کل TVC و باکتری‌های سرمادوست PTC در محیط کشت آگار به‌ترتیب در دماهای ۳۷ °C به مدت ۲ روز و ۷ °C به مدت ۱۰ روز با شمارش کلنی‌های موجود روی پلیت انجام و به صورت log CFU/g گزارش شد [۲۰].

۷.۲. تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شده و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. ابتدا بررسی نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و سپس همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون لون Leven انجام شد. برای تعیین اختلاف بین تیمارها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه One way ANOVA استفاده شد. در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار بود، برای مقایسه میانگین‌ها آزمون دانکن به کار رفت. خطای مجاز برای رد H_0، در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل ۵٪ در نظر گرفته شد.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. سنجش فعالیت ضدباکتریایی سینامالدهید به دو روش دیسک و چاهک

نتایج بررسی خواص ضدباکتریایی سینامالدهید در مقابل ۴ سویه باکتریایی *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*،

سالمونلا اینتریتیدیس و *اشرشیاکلی* طی آزمایشات دیسک و چاهک که در جدول (۱) نشان داده شده است حاکی از فعالیت ضدمیکروبی موثر سینامالدهید بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مورد مطالعه می‌باشد که در توافق با نتایج محققین دیگر می‌باشد [۲۱، ۲۲]. در پژوهش صورت گرفته توسط آتف و همکاران [۲۱] فعالیت مهارکنندگی روغن اساسی مرزه بر علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* بیشتر از باکتری *اشرشیاکلی* بود. هاله ایجادشده توسط باکتری‌های گرم‌مثبت *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در روش دیسک و چاهک بزرگ‌تر از هاله ایجادشده توسط باکتری *اشرشیاکلی* بود. ترکیبات ضدمیکروبی موجود در روغن‌های اساسی، معمولاً به‌طور قابل توجهی در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت موثرتر از باکتری‌های گرم‌منفی عمل می‌نمایند که می‌تواند به علت تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتری‌های موجود باشد [۲۳]؛ ترکیب دیواره سلولی باکتری‌های گرم‌منفی با وجود ضخامت کمتر، پیچیدگی بیشتری داشته و علاوه بر پپتیدوگلیکان حاوی پلی‌ساکاریدهای مختلف، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌باشد. همچنین دیواره سلولی باکتری‌های گرم‌منفی دارای یک غشای خارجی می‌باشد که سطح خارجی دیواره را پوشانده و از نفوذ ترکیبات ضدمیکروبی به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری می‌نماید [۲۳].

۲.۳. بررسی شکل و اندازه نانوذرات

به منظور بررسی جزئیات شکل و اطلاعات ریخت‌شناختی نانوذرات کیتوسان حاوی سینامالدهید از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM استفاده شد. تصاویر SEM حاکی از آن است که نانوذرات حاوی سینامالدهید کروی شکل بوده و دارای توزیع یکنواختی می‌باشد و همانطور که مشخص است نانوذرات کیتوسان حامل سینامالدهید دارای قطر کمتر از ۱۰۰ nm می‌باشند (شکل ۱). فیزی‌اوگلو و تورنک [۲۴] میانگین قطر nm ۲۵۰-۱۰۰ را برای نانوذرات کیتوسان حاوی روغن اساسی مرزه تابستانی گزارش نمودند. همچنین، حسینی و همکاران [۱۳] قطر میانگین nm ۸۰-۴۰ را برای نانوذرات کیتوسان حاوی روغن اساسی پونه کوهی گزارش نمودند که با تصویربرداری میکروسکوپ نیروی اتمی AFM اثبات گردید.

۳.۳. توصیف فیلم‌ها

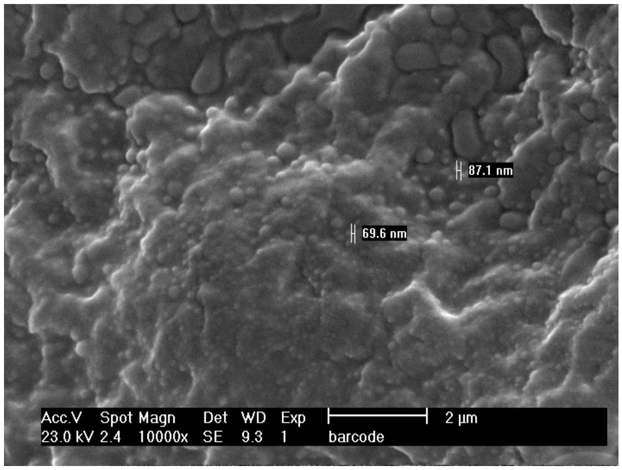
۱.۳.۳. ارزیابی ضخامت فیلم‌های سه‌جزئی حاوی سینامالدهید آزاد و نانوکپسوله‌شده

ضخامت فیلم سه‌جزئی کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/ژلاتین ماهی یا فیلم شاهد در مطالعه حاضر ۰/۸ ± ۴۶ μm بود، که با افزودن ۱/۶٪ سینامالدهید آزاد و ۰/۳۷۵٪ وزنی/وزنی سینامالدهید نانوکپسوله‌شده به‌ترتیب به ۱ ± ۶۴ μm و ۳ ± ۵۸ μm افزایش پیدا نمود. این افزایش ضخامت در فیلم‌های حاوی سینامالدهید آزاد را می‌توان به محبوس‌شدن میکروقطره‌های سینامالدهید در فیلم‌های سه‌جزئی نسبت داد [۲۵]. روند مشابهی در مورد فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه ژلاتین ماهی حاوی روغن اساسی مرکبات گزارش شده است [۲۶]. از سوی دیگر، یافته‌های سانچز-گونزالز و همکاران [۲۷] حاکی از کاهش ضخامت فیلم‌های بر مبنای کیتوسان به‌واسطه اضافه نمودن روغن اساسی درخت چای می‌باشد. این محققان پیشنهاد نمودند ازدست رفتن احتمالی روغن طی مرحله خشک‌شدن فیلم، می‌تواند مقدار کل مواد جامد مشارکت‌کننده در ضخامت فیلم را کاهش دهد. بنابراین، می‌تواند استنباط گردد که هم غلظت فیلم و هم پارامترهای فراوری ضخامت فیلم را تحت تاثیر قرار دهد.

جدول (۱) اثر ضدمیکروبی سینامالدهید در مقابل ریزسازواره‌های مورد آزمون.
Table 1 Antimicrobial effect of cinnamaldehyde against tested microorganisms.

نوع آزمون Test type	*L. monocytogenes* *لیستریا مونوسیتوژنز*	*E.coli* *اشریشیاکلی*	*S. enteritidis* *سالمونلا انتریتیدیس*	*S.aureus* *استافیلوکوکوس اورئوس*
تست چاهک Well test	+++	++	+++	+++
تست دیسک Disk diffusion	+++	++	+++	+++

ممانعت‌کنندگی ضعیف (20 mm>) (+)، ممانعت‌کنندگی متوسط (20-30 mm) (++)، ممانعت‌کنندگی قوی (30mm<) (+++)، بدون ممانعت‌کنندگی (-) [۲۲].
+: slightly inhibited (<20 mm); ++: partially inhibited (20-30 mm); +++: totally inhibited (>30 mm); -: no inhibited [22].



شکل (۱) تصویر SEM نانوذرات کیتوسان حاوی سینامالدهید.
Fig. 1 SEM micrograph of the cinnamaldehyde-loaded chitosan nanoparticles.

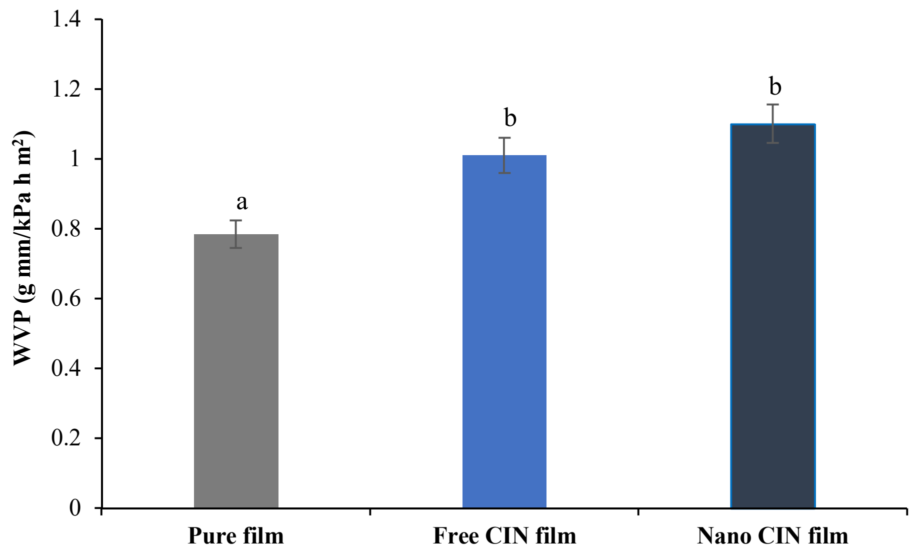
سانچز-گونزالز و همکاران [۲۷] حاکی از کاهش ضخامت فیلم‌های بر مبنای کیتوسان به‌واسطه اضافه نمودن روغن اساسی درخت چای می‌باشد. این محققان پیشنهاد نمودند ازدست رفتن احتمالی روغن طی مرحله خشک‌شدن فیلم، می‌تواند مقدار کل مواد جامد مشارکت‌کننده در ضخامت فیلم را کاهش دهد. بنابراین، می‌تواند استنباط گردد که هم غلظت فیلم و هم پارامترهای فراوری ضخامت فیلم را تحت تاثیر قرار دهد.

۲.۳.۳. نفوذپذیری در برابر بخارآب WVP

یکی از وظایف اصلی مواد بسته‌بندی غذایی، جلوگیری و یا به حداقل‌رساندن انتقال رطوبت بین موادغذایی و محیط اطراف آن می‌باشد؛ بنابراین میزان نفوذپذیری به بخار آب به منظور افزایش عمرماندگاری محصول باید در صورت امکان به حداقل برسد [۲۸]. نتایج حاصل از افزودن سینامالدهید به دو شکل آزاد و نانوکپسوله‌شده بر میزان WVP فیلم سه‌جزئی کیتوسان/پلی-وینیل‌الکل/ژلاتین ماهی در نمودار (۲) نشان داده شده است. همان‌طور که قابل مشاهده می‌باشد، افزودن ۱/۶٪ حجمی/حجمی سینامالدهید آزاد و ۰/۳۷۵٪ وزنی/وزنی سینامالدهید نانوکپسوله‌شده منجر به افزایش میزان نفوذپذیری به بخارآب از $0/785 \pm 0/05$ g mm/kPa h m^2 در فیلم سه‌جزئی به‌ترتیب به $1/01 \pm 0/03$ و $1/10 \pm 0/03$ g mm/kPa h m^2 در فیلم سه‌جزئی حاوی سینامالدهید آزاد و نانوکپسوله‌شده شد. نتایج مشابهی توسط احمد و همکاران [۲۹] در مورد فیلم ژلاتین حاوی اسانس ترنج و نیز بونیلا و همکاران [۳۰] در خصوص فیلم کیتوسان حاوی اسانس ریحان گزارش شد. سوزا و همکاران [۳۱] گزارش نمودند میزان WVP فیلم بر پایه نشاسته حاوی اسانس دارچین از ۳/۶۱ در فیلم شاهد به ۱۴/۷۹ g mm m^{-2} d^{-1} kPa^{-1} در فیلم حاوی اسانس افزایش یافت. محققین علت این امر را به ناپیوستگی ایجادشده در شبکه‌ی پلیمری فیلم توسط قطره‌های روغنی اسانس نسبت دادند که تاحدی می‌تواند موجب از دست-رفتن ساختار یکپارچه فیلم گردد که به نوبه خود سبب انتقال رطوبت می‌گردد [۲۸]. بنابراین نمی‌توان به آسانی فرض نمود که با افزودن اجزاء آب‌گریز به درون فرمولاسیون فیلم، WVP فیلم‌های خوراکی کاهش یابد، اگرچه تأثیر ترکیب لیپید روی ریزساختار فیلم امولسیفیه‌شده یک عامل تعیین‌کننده در توانایی ممانعت‌کنندگی در برابر بخارآب می‌باشد [۲۸]. نتایج آزمون WVP در تطابق با ریز ساختار مشاهده شده در تصاویر SEM می‌باشد.

۳.۳.۳. آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM

ریخت‌شناسی فیلم‌های کامپوزیت ویژگی مهمی در تعیین بسیاری از خواص فیلم‌هاست. شکل (۳) تصاویر میکروسکوپ الکترونی سطح و مقطع عرضی فیلم‌های حاوی سینامالدهید آزاد و کپسوله‌شده را نشان می‌دهد. همان‌طور که در تصاویر قابل مشاهده است فیلم شاهد دارای سطحی صاف، فاقد بی‌نظمی و بدون هیچ‌گونه حباب، منفذ و یا ترک می‌باشد که با یافته‌های



شکل (۲) نفوذپذیری در برابر بخار آب فیلم خالص (Pure film) و فیلم حاوی سینامالدهید آزاد (Free CIN film) و نانوکپسوله‌شده (Nano CIN film)
Fig. 2 Water vapor permeability (WVP) of pure film and the films containing free (FCF) and nanoencapsulated cinnamaldehyde (NCF)

بونیلا و همکاران [۱۵] در مورد فیلم کامپوزیت پلی‌وینیل-الکل/کیتوسان هم‌خوانی دارد که به پیوستگی شبکه‌ی پلیمری فیلم نسبت داده شده است. با این‌حال، افزودن ۱/۶٪ حجمی/حجمی سینامالدهید آزاد به‌واسطه‌ی تغییر در شبکه پلیمری فیلم و ایجاد آرایش جدید مولکول‌های پلیمری در حین تشکیل فیلم منجر به ایجاد ساختار سطحی ناهمگن و شنی گردید؛ در واقع فرایند تبخیر روغن که در حین خشک‌شدن فیلم اتفاق می‌افتد منجر به تشکیل خلل و فرج میکروسکوپی در سرتاسر ماتریس فیلم می‌گردد [۲۸]، که به نوبه خود سبب افزایش نفوذپذیری به بخارآب در فیلم حاوی سینامالدهید گشته است [۳۰]. داشی پور و همکاران [۲۵] همچنین گزارش نمودند فرایند همگن‌سازی که در تهیه فیلم حاوی روغن‌های اساسی استفاده می‌شود منجر به محبوس‌شدن حباب‌های هوا و ایجاد منفذ در ماتریس فیلم می‌شود. نتایج مشابهی توسط شجاعی علی‌آبادی و همکاران [۳۲] بر روی فیلم کاراگینان حاوی روغن ضروری مرزه خوزستانی *Zataria multiflora* گزارش شده است. همچنین نتایج ریزنگاشت مقطع عرضی فیلم‌ها، ساختار متراکم و پیوسته بدون جدایش فازی، یکنواخت، و فاقد بی‌نظمی‌هایی مانند حباب‌های هوا یا منافذ را در فیلم سه جزئی خالص اثبات نمود که نشان‌دهنده سازگاری خوب بین سه پلیمر می‌باشد. در مقایسه با فیلم شاهد، هرچند اضافه نمودن سینامالدهید تاحدی موجب تغییراتی در بستر فیلم گردید، اما تصاویر مقطع عرضی (شکل ۳) توزیع مناسب سینامالدهید آزاد و نانوکپسوله شده را در بستر فیلم کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/ژلاتین ماهی اثبات نمود؛ البته تاحدی تجمع ذرات در مورد فیلم حاوی سینامالدهید کپسوله‌شده ۰/۳۷۵٪ وزنی/وزنی نیز قابل مشاهده می‌باشد. سانچز-گونزالز و همکاران [۲۷] بیان نمودند که ریزساختار فیلم می‌تواند مرتبط با کاهش استحکام کششی و افزایش نفوذپذیری در برابر بخار آب باشد.

۴.۳. ترکیبات شیمیایی و مطالعه شاخص‌های فساد فیله ماهی طی دوره نگه‌داری

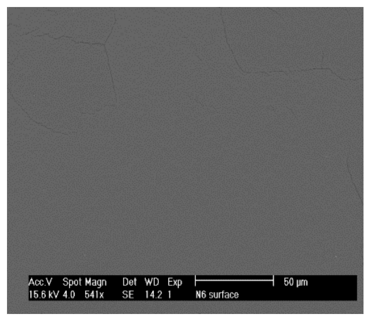
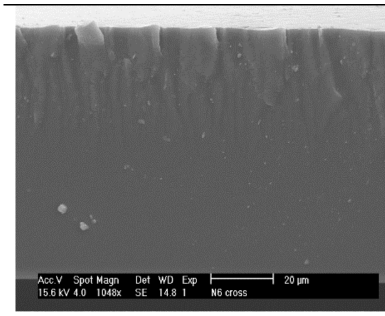
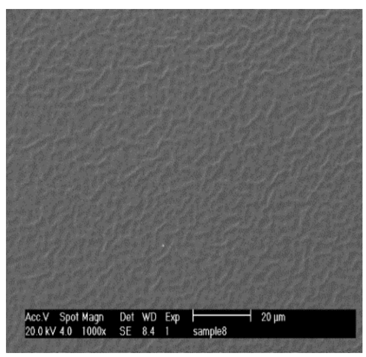
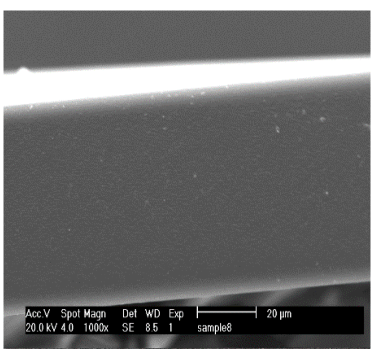
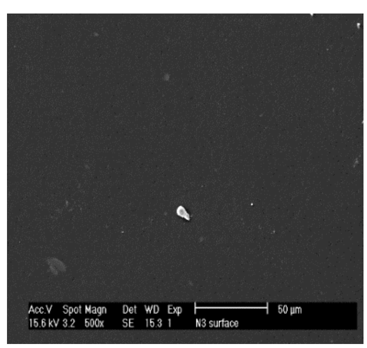
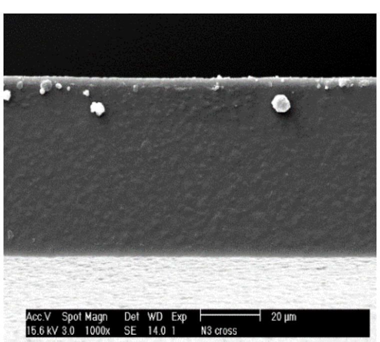
۱.۴.۳. آنالیز تقریبی

نتایج آنالیز تقریبی شامل میزان چربی، پروتئین، رطوبت و خاکستر به‌ترتیب ۱/۵۹ ± ۶/۸۲، ۱/۳۴ ± ۲۱/۸۵، ۱/۹۴ ± ۶۹/۱۷ و ۰/۱۰ ± ۱/۹۷٪ به‌دست آمد. آنالیز تقریبی فیله ماهی قزل‌آلا در مطالعات مختلفی گزارش شده است؛ در تحقیقی که اجاق و همکاران [۱۱] بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن تقریبی gr ۶۰۰-۵۵۰ انجام دادند مقادیر چربی، رطوبت، پروتئین و خاکستر به‌ترتیب برابر با ۰/۳۷± ۲/۲، ۲/۱۳ ± ۶۹/۷۰، ۰/۳۶

± ۲۳/۲۱ و ۰/۳ ± ۲/۱۲٪ گزارش شد. تفاوت در ترکیبات شیمیایی گوشت ماهی در میان افراد یک گونه عمدتاً ناشی از تنوع تغذیه‌ای، فصل صید، جنس، اندازه ماهی و شرایط محیطی زندگی ماهی می‌باشد [۲۰].

۲.۴.۳. pH

در نمودار (۴) تغییرات میزان pH تیمارهای مختلف ماهی طی نگه‌داری در یخچال دمای ۴ °C مشاهده می‌شود. به‌طور کلی نتایج نشان داد مقادیر pH در طول نگه‌داری برای همه تیمارها با گذشت زمان، ابتدا کاهش و سپس افزایش معنی‌داری یافته است (p<۰/۰۵)، به‌طوری‌که میزان آن در روز صفر نگه‌داری در نمونه شاهد Control و نمونه پوشش داده شده با فیلم خالص کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/ژلاتین ماهی CT از ۶/۷۶ به‌ترتیب به ۷/۳۱ و ۷/۱۷ در روز ۱۶ نگه‌داری افزایش یافت. در تیمارهای پوششی با فیلم سه‌جزئی حاوی ۱/۶٪ حجمی/حجمی سینامالدهید آزاد FCCT و فیلم سه‌جزئی حاوی ۰/۳۷۵٪

فیلم Film	سطح Surface	مقطع عرضی Cross-section
فیلم خالص Pure film		
فیلم حاوی سینامالدهید آزاد Free CIN film		
فیلم حاوی سینامالدهید نانوکپسوله‌شده Nano CIN film		

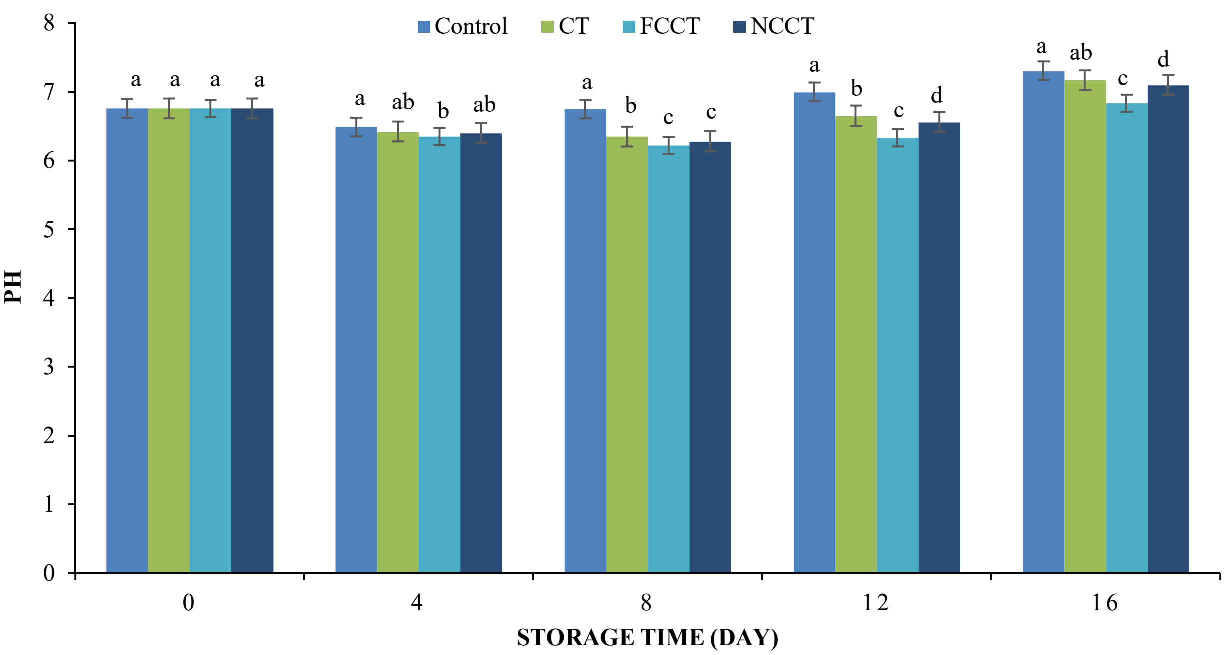
شکل (۳) ریزنگاشت میکروسکوپ الکترونی از سطح و مقطع عرضی فیلم شاهد و فیلم حاوی سینامالدهید آزاد و نانوکپسوله شده.

Fig. 3 SEM micrographs of the surface and cross-section of films containing free and nanoencapsulated cinnamaldehyde.

وزنی/وزنی سینامالدهید کپسوله‌شده NCCT نیز میزان pH در انتهای دوره به‌ترتیب به ۶/۹۷ و ۷/۱۰ رسید که به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار فیله بدون پوشش و نیز فیله پوشش داده شده با فیلم سه‌جزئی بدون سینامالدهید آزاد و نانوکپسوله‌شده بوده است (p<۰/۰۵). همان‌طور که در نمودار (۴) قابل مشاهده می‌باشد، در ابتدای دوره یا روز ۴ نگه‌داری یک کاهش جزئی در مقدار pH در تمامی تیمارها مشاهده شد که می‌تواند نتیجه‌انحلال CO_2 حاصل از تجزیه گلیکوژن در بافت و ایجاد اسیدکربونیک باشد [۱۲]. در ادامه، یک روند افزایشی در مقدار pH در همه تیمارها مشاهده گردید که احتمالا ناشی از افزایش تولید بازهای فرار مثل آمونیاک و تری‌متیل‌آمین TMA به‌واسطه‌فعالیت‌های آنزیمی باکتری‌ها و آنزیم‌های درونی می‌باشد [۳۳]. به هر حال، کمتر بودن pH در فیله‌های پوشش داده شده با فیلم‌های حاوی سینامالدهید آزاد و کپسوله‌شده در کل دوره نگه‌داری را می‌توان مرتبط با پتانسیل ضدباکتریایی سینامالدهید دانست [۱۲].

۳.۴.۳. عدد تیوباربیتوریک اسید TBA

شاخص TBA به‌طور گسترده‌ای به منظور ارزیابی درجه اکسیداسیون لیپید در ماهیان استفاده می‌شود که میزان محصولات ثانویه اکسیداسیون به ویژه آلدئیدها و کتون‌ها را نشان می‌دهد [۷، ۱۳]. همزمان با پیشرفت واکنش‌های اکسیداسیون، هیدروپراکسیدها به ترکیبات فرار و معطر از جمله آلدئیدها و کتون‌ها شکسته می‌شوند که ارزیابی ترکیبات مذکور از طریق واکنش با معرف تیوباربیتوریک اسید به‌عنوان عدد TBA گزارش می‌شود [۳۴]. در مطالعه حاضر میزان TBA در ابتدای دوره نگه‌داری، ۰/۱۲ mgMDA/kg of flesh بود که با گذشت زمان در همه تیمارها مقدار TBA افزایش یافته که در تیمار شاهد این افزایش با شدت بیشتری همراه بوده است (نمودار ۵). افزایش میزان TBA در طول دوره را می‌توان با اکسیداسیون لیپید و تولید متابولیت‌های فرار در حضور اکسیژن مربوط دانست [۳۵]. بیشترین و کمترین میزان TBA در انتهای دوره نگه‌داری به‌ترتیب مربوط به تیمار شاهد یا Control به میزان



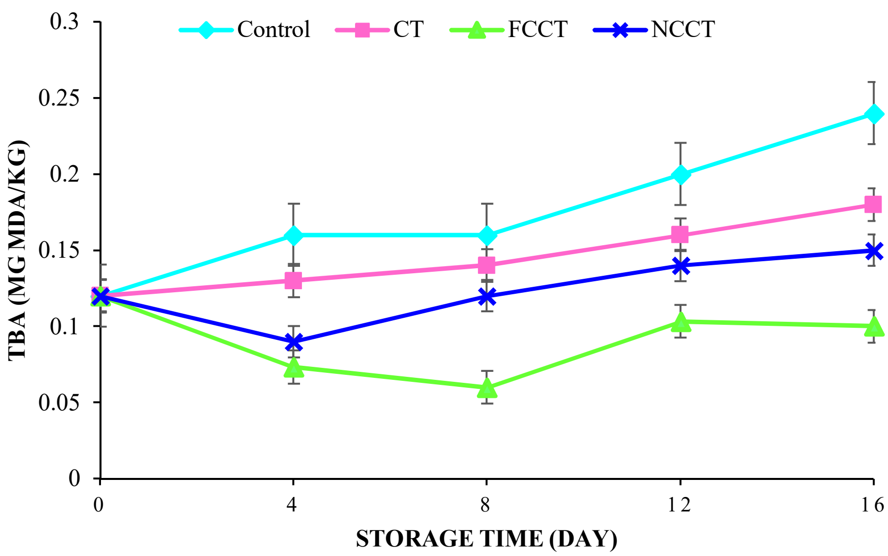
شکل (۴) تغییرات مقادیر pH فیله‌های قزل‌آلا پوشش داده شده با تیمارهای مختلف طی نگه‌داری در دمای°C ۴؛ شاهد (نمونه های فاقد پوشش فیلم) (Control)؛ فیله پوشش داده شده با فیلم زیست‌تخریب‌پذیر خالص (CT)؛ فیله‌های پوشش داده شده با فیلم‌های حاوی سینامالدهید آزاد (FCCT)؛ نمونه پوشش داده شده با فیلم حاوی سینامالدهید نانوکپسوله‌شده (NCCT). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند.

Fig. 4 Changes in the pH values of rainbow trout fillets coated without and with biodegradable materials during storage at 4 °C: Control: uncoated; CT: coated with pure biodegradable film; FCCT: coated with biodegradable film containing free cinnamaldehyde; NCCT: coated with biodegradable film containing nanoencapsulated cinnamaldehyde. Data shown are the means ± standard deviation.

mg MDA/kg of flesh ۰/۲۴ و فیله پوشش داده شده با فیلم حاوی ۱/۶ ٪ حجمی/حجمی سینامالدهید آزاد یا FCCT به میزان mg MDA/kg of flesh ۰/۱ بود. سطوح پایین‌تر TBA در تیمار پوشش داده شده با فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر کیتوسان/پلی-وینیل‌الکل/ژلاتین ماهی در مطالعه حاضر نسبت به تیمار شاهدرا می‌توان به خواص ممانعت‌کنندگی فیلم‌ها در برابر اکسیژن و نیز اثر ضداکسیدانی سینامالدهید ربط داد [۳۶]. پوشش‌های حاوی پروتئین به‌واسطه تشکیل باندهای هیدروژنی، لایه‌محافظی را در برابر اکسیژن ایجاد می‌نماید و بدین‌صورت می‌تواند موجب کاهش میزان اکسیداسیون فیله‌ها شود [۳۷]؛ همچنین با افزایش قطبیت فیلم‌ها، به‌واسطه انحلال سخت‌تر اکسیژن، نفوذپذیری به اکسیژن کاهش یافته که به نوبه خود می تواند در کاهش اکسیداسیون فیله ها موثر باشد. بر طبق کانل [۳۸]، مقادیر mg MDA/kg of flesh TBA ۲-۱ معمولا به‌عنوان حدی که بالاتر از آن ماهی دارای بوی تند می‌گردد مدنظر قرار داده می‌شود. در مطالعه حاضر، مقادیر TBA برای نمونه‌های فیله ماهی قزل‌آلا کمتر از حدود پیشنهاد شده در طی ۱۶ روز نگه‌داری بود.

۴.۴.۳. رنگ‌سنجی

رنگ گوشت ناشی از عملکرد دو رنگدانه گوشت به نام‌های میوگلوبین و هموگلوبین و ویژگی پراکندگی نور است؛ احساسی که به‌وسیله تحریکات عصبی با تماشای رنگ گوشت و فراورده‌های گوشتی به بیننده دست می‌دهد در تصمیم‌گیری خرید این فراورده غذایی بسیار مؤثر است [۳۹]. از این رو متخصصان بازاریابی فراورده‌های گوشتی بیان نمودند اسامی رنگ‌ها با احساسی که در افراد ایجاد می‌کند، مطابقت نمی‌کند؛ بنابراین سنجش رنگ‌ها با دستگاه‌های رنگ‌سنج را توصیه نمودند. امروزه به منظور اندازه‌گیری رنگ‌ها از روش‌های تعیین‌شده توسط کمیسیون بین‌المللی روشنایی CIE استفاده می‌شود؛ با روش‌های فوق نوع رنگ مربوط به طول موج است و همچنین میزان اشباعیت یا روشنایی رنگ که مربوط به خالص‌بودن آن یعنی یک طول موج معین یا ترکیب آن با سایر طول موج‌ها خواهد بود، سنجیده می‌شود [۳۹]. بر اساس نتایج رنگ‌سنجی (نمودار ۶)، شاخص روشنایی *L در تیمار شاهد یا Control با گذشت زمان از روز صفر تا روز چهار تغییر مشهودی نشان نداد، اما از روز چهار تا روز شانزده کاهش معنی‌داری در میزان روشنایی مشاهده شد



شکل (۵) تغییرات مقادیر TBA (mg MDA)/kg sample) فیله‌های قزل‌آلا پوشش داده شده با تیمارهای مختلف طی نگه‌داری در دمای ۴°C؛ شاهد (نمونه های فاقد پوشش فیلم) (Control)؛ فیله پوشش داده شده با فیلم زیست‌تخریب‌پذیر خالص (CT)؛ فیله‌های پوشش داده شده با فیلم‌های حاوی سینامالدهید آزاد (FCCT)؛ نمونه پوشش داده شده با فیلم حاوی سینامالدهید نانوکپسوله‌شده (NCCT). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند.

Fig. 5 Changes in the thiobarbituric acid (TBA, mg malondialdehyde (MDA)/kg sample) values of rainbow trout fillets coated without and with biodegradable materials during storage at 4 °C: Control: uncoated; CT: coated with pure biodegradable film; FCCT: coated with biodegradable film containing free cinnamaldehyde; NCCT: coated with biodegradable film containing nanoencapsulated cinnamaldehyde. Data shown are the means ± standard deviation.

(p<۰/۰۵). در فیله‌های قزل‌آلای پوشش داده شده با فیلم سه-جزئی بر پایه کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/ژلاتین ماهی بدون سینامالدهید آزاد و نانوکپسوله‌شده یا CT نیز میزان روشنایی از روز ۴ تا روز ۱۲ کمترین تغییر شاخص روشنایی را نشان داد، اما از روز ۱۲ تا ۱۶ میزان روشنایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵). با اضافه کردن ۱/۶ ٪ حجمی/حجمی سینامالدهید آزاد و ۰/۳۷۵٪ وزنی/وزنی سینامالدهید نانوکپسوله‌شده میزان روشنایی از روز چهار تا روز شانزده نگه‌داری به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا نمود که این روند در خصوص شاخص سفیدی WI فیله‌ها نیز مشاهده شد (p<۰/۰۵). تغییر در مقادیر روشنایی فیله‌ها مرتبط با اضافه نمودن عامل ضدمیکروبی به فیلم می‌باشد همان‌طور که در مطالعه آلوز و همکاران [۴۰] نیز مشاهده گردید. همچنین، در تیمار پوششی با فیلم سه‌جزئی حاوی سینامالدهید آزاد FCCT کمترین تغییرات رنگ از لحاظ شاخص‌های روشنایی، قرمزی *a، زردی *b و سفیدی WI مشاهده شد که نسبت به تیمار حاوی سینامالدهید نانوکپسوله‌شده NCCT کارایی بالاتری نشان داد. نتایج به‌دست‌آمده درباره شاخص روشنایی و زردی، مشابه نتایج اثر کیتوسان بر خواص ژل، اکسیداسیون چربی و بار میکروبی ژل سوریمی ساخته شده از گربه‌ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* می‌باشد [۴۱]. همچنین، بر طبق یافته‌های واتاوالی و همکاران [۴۲] پوشش زیست‌تخریب‌پذیر بر مبنای کیتوسان ۲٪ و روغن اساسی پونه کوهی ۰/۱٪ رنگ قرمز فیله ماهی سرخو حرّا *Pagrus pagrus* را بین روزهای ۶ و ۲۰ نگه‌داری در دمای $^{\circ}C$ ۴ حفظ نمود.

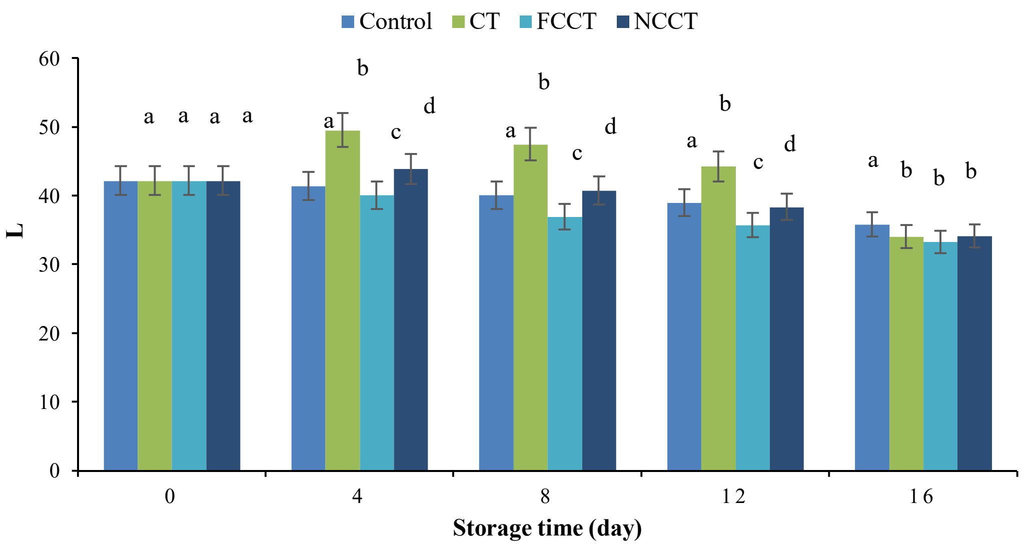
۳.۴.۵. نتایج آنالیز میکروبی

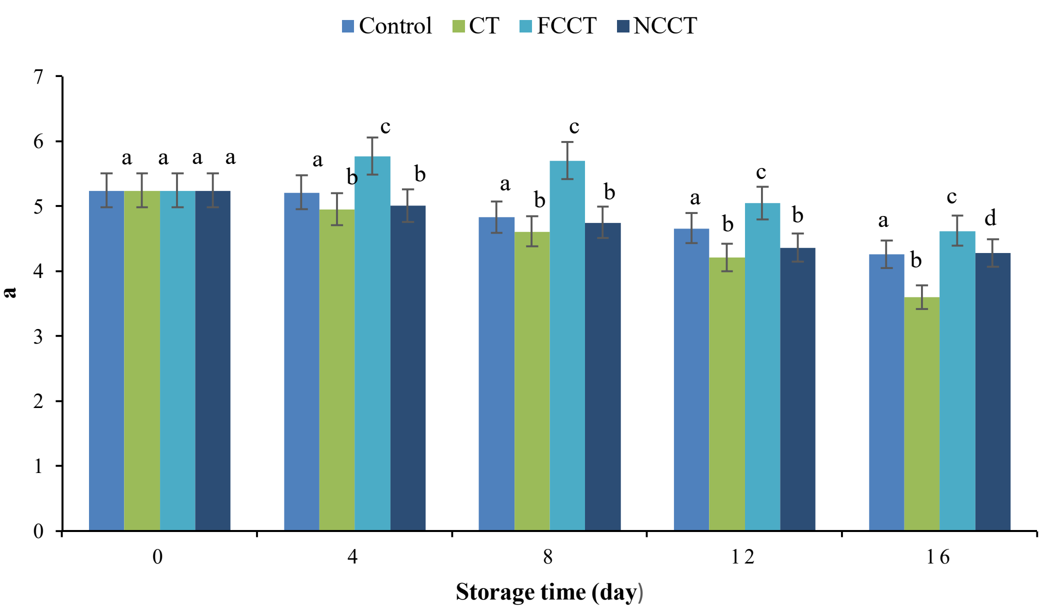
۳.۴.۵.۱. بررسی میزان بار باکتریایی کل TVC

به‌طور کلی علت اصلی فساد بسیاری از غذاهای سردشده، رشد میکروب روی سطح فراورده است [۴۳]. روش متداول شمارش بار باکتریایی کل TVC، جهت تعیین کمیت ریزسازواره‌های زنده موجود در نمونه به کار می‌رود [۲۰]. تغییرات بار میکروبی کل در فیله ماهی قزل‌آلا طی نگه‌داری در دمای $^{\circ}C$ ۴ در نمودار (۷) نشان داده شده است. میزان اولیه بار باکتریایی کل برای فیله‌ها در روز صفر نگه‌داری log CFU/g ۲/۹۴ بود که نشان‌دهنده کیفیت خوب فیله‌های مورد آزمون بود [۲۰]. بار باکتریایی کل با گذشت زمان برای همه تیمارها افزایش یافت به‌طوری که میزان TVC در روز ۱۲ نگه‌داری برای تیمار شاهد به log CFU/g ۷/۷۵ رسید که فراتر از حد قابل قبول یعنی log CFU/g ۷ برای ماهی قزل‌آلا می‌باشد [۲۰]. در مطالعه اجاق و همکاران [۱۱] نیز بار باکتریایی کل در فیله ماهی قزل‌آلا طی ۱۲ روز نگه‌داری بیش از حد مجاز گزارش گردید. همچنین کیکیدو و همکاران [۴۴] نشان دادند که بار باکتریایی فیله شمشیرماهی مدیترانه‌ای *Mediterranean swordfish* طی ۶ روز نگه‌داری در دمای $^{\circ}C$ ۴ به بالاتر از log CFU/g ۷ رسید. پوشش فیله ماهی قزل‌آلا با فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر خالص CT، و فیلم‌های حاوی سینامالدهید آزاد FCCT و نانوکپسوله‌شده NCCT سبب کاهش log CFU/g ۰/۹۷، ۱/۵۵ و ۱/۳۷ در میزان TVC به‌ترتیب در پایان روز ۱۲ نگه‌داری گردید (شکل ۷)، به‌طوری‌که مقادیر TVC برای این نمونه‌ها کمتر از log CFU/g ۷ بود. به‌هرحال، در تحقیق حاضر میزان TVC برای نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم‌های بسته‌بندی ضدمیکروبی در پایان روز ۱۶ نگه‌داری از حد مجاز فراتر رفت که در این میان تیمار سینامالدهید آزاد FCCT دارای کمترین بار باکتریایی بود (p<۰/۰۵). در این ارتباط اوآتارا و همکاران [۴۵] بیان نمودند که فعالیت ضدمیکروبی دارچین در جلوگیری از دکربوکسیلاسیون آمینواسیدها مرتبط با حضور سینامالدهید می‌باشد؛ به‌علاوه، ونداکون و ساکاگوچی [۴۶] نیز تشریح نمودند سینامالدهید با الکترونگاتیوی بالا در سیستم‌های بیولوژیکی میکروارگانیسم‌ها از طریق انتقال الکترون دخالت کرده و با ترکیبات نیتروژن‌داری نظیر پروتئین و نوکلئیک اسید واکنش داده و بدین طریق مانع از رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود. البته بایستی اشاره گردد حضور کیتوسان در فیلم سه‌جزئی نیز تاحدی مانع از رشد باکتریایی می‌گردد؛ مکانیزم فعالیت ضدباکتریایی کیتوسان فرایند پیچیده‌ای می‌باشد که بین باکتری‌های گرم-مثبت و گرم‌منفی به دلیل تفاوت در مشخصات سطح سلول متفاوت می‌باشد [۴۷]. ویژگی کلیدی کیتوسان بار مثبت گروه‌های آمینی آن می‌باشد، به‌طوریکه بیان شده ارتباط قوی بین فعالیت ضدباکتریایی و گروه‌های کاتیونی NH_3^+ کیتوسان وجود دارد [۴۸]؛ در واقع این یک ساختار پلی‌کاتیونیک ایجاد می‌نماید که می‌تواند با اجزاء آنیونی غالب، لیپوپلی‌ساکاریدها و پروتئین‌های سطح واکنش دهد که موجب خروج الکترولیت‌های درون سلولی و ترکیبات پروتئینی و نهایتا مرگ سلول گردد [۴۹].

۲.۵.۴.۳. باکتری‌های سرمادوست PTC

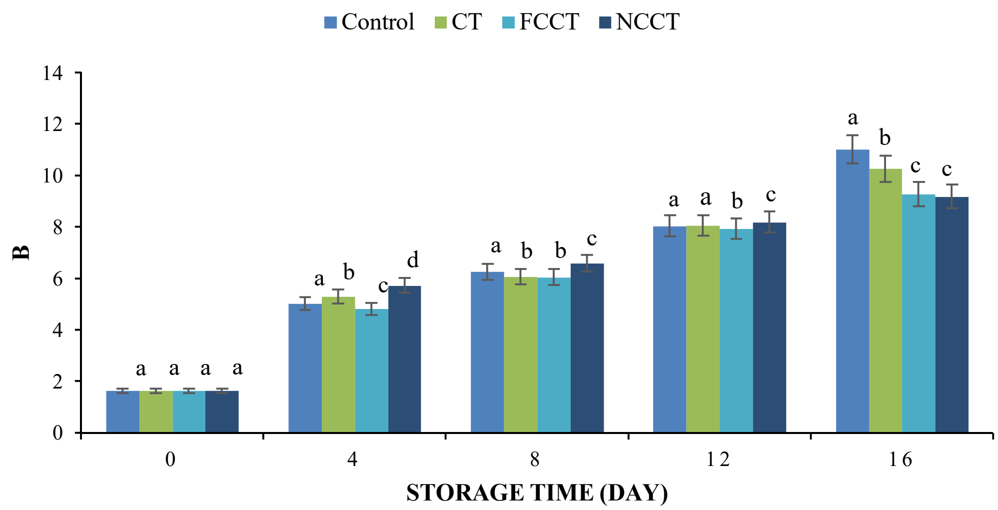
باکتری‌های سرمادوست PTC مانند سویه‌های شوانلا *Shewanella* نقش مهمی در فساد فراورده‌های دریایی دارند به‌طوریکه قادرند در دماهای صفر درجه سانتی‌گراد و بیشتر فعالیت نموده و پس از گذراندن مرحله سکون یا فاز تأخیری به سرعت وارد فاز لگاریتمی شده و در شرایط هوازی یا بی‌هوازی تکثیر نمایند [۵۰]. تغییرات مربوط به تعداد باکتری‌های سرمادوست فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی نگه‌داری در دمای یخچال در نمودار (۸) نشان داده شده است. تعداد اولیه باکتری‌های سرمادوست در روز صفر برای فیله‌ها ۳/۲۳ log CFU/g بود که

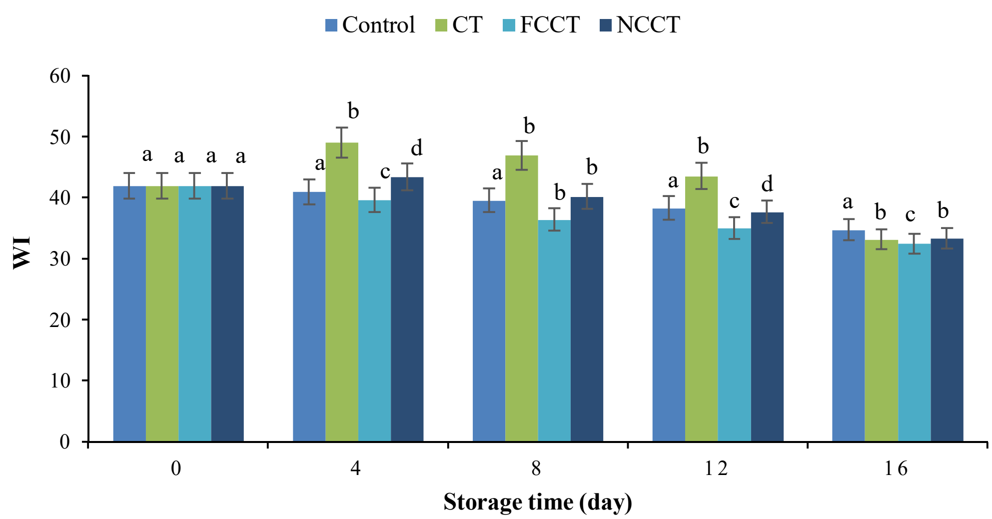




شکل (۶) مقادیر رنگ‌سنجی فیله‌های قزل‌آلا پوشش داده شده با تیمارهای مختلف طی نگه‌داری در دمای ۴ °C؛ شاهد (نمونه های فاقد پوشش فیلم (Control)؛ فیله پوشش داده شده با فیلم زیست‌تخریب‌پذیر خالص (CT)؛ فیله‌های پوشش داده شده با فیلم‌های حاوی سینامالدهید آزاد (FCCT)؛ نمونه پوشش داده شده با فیلم حاویسینامالدهید نانوکپسوله‌شده (NCCT). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند.

Fig. 6 *Lab* color values of rainbow trout fillets coated without and with biodegradable materials during storage at 4 °C: Control: uncoated; CT: coated with pure biodegradable film; FCCT: coated with biodegradable film containing free cinnamaldehyde; NCCT: coated with biodegradable film containing nanoencapsulated cinnamaldehyde. Data shown are the means ± standard deviation.

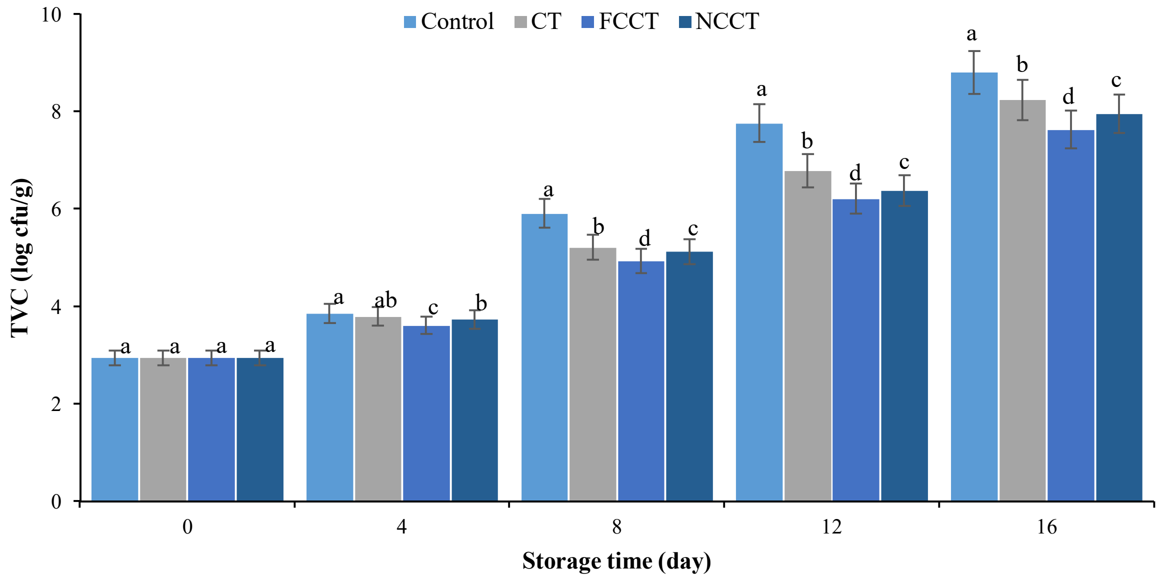




ادامه شکل (۶) مقادیر رنگ‌سنجی فیله‌های قزل‌آلا پوشش داده شده با تیمارهای مختلف طی نگه‌داری در دمای°C ۴؛ شاهد (نمونه های فاقد پوشش فیلم (Control)؛ فیله پوشش داده شده با فیلم زیست‌تخریب‌پذیر خالص (CT)؛ فیله‌های پوشش داده شده با فیلم‌های حاوی سیناماالدهید آزاد (FCCT)؛ نمونه پوشش داده شده با فیلم حاویسیناماالدهید نانوکپسوله‌شده (NCCT). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند.

Fig. 6 *Lab* color values of rainbow trout fillets coated without and with biodegradable materials during storage at 4 °C: Control: uncoated; CT: coated with pure biodegradable film; FCCT: coated with biodegradable film containing free cinnamaldehyde; NCCT: coated with biodegradable film containing nanoencapsulated cinnamaldehyde. Data shown are the means ± standard deviation.

در پایان دوره نگه‌داری یعنی روز ۱۶ به log CFU/g ۹/۰۷، ۹ ، ۸/۰۱ و ۸/۸۴ به‌ترتیب برای تیمار شاهد Control، تیمار پوشش داده شده با فیلم سه‌جزئی خالص بر پایه کیتوسان/پلی‌وینیل الکل/ژلاتین ماهی CT، تیمار ۱/۶٪ حجمی/حجمی سیناماالدهید آزاد FCCT و ۰/۳۷۵٪ وزنی/وزنی سیناماالدهید نانوکپسوله‌شده NCCT رسید. به‌طور کلی استفاده از بسته‌بندی فعال در فیله ماهی سبب شد بالاترین حد مجاز بار باکتریایی سرمادوست یعنی log CFU/g ۷ از روز ۸ در تیمار شاهد به روز ۱۲ در تیمار حاوی ۱/۶ ٪ حجمی/حجمی سیناماالدهید آزاد افزایش یابد. احمد و همکاران [۵۱] نتایج مشابهی را در زمینه کاهش بار باکتریایی سرمادوست به‌وسیله کاربرد فیلم‌های خوراکی فعال با اسانس علف لیمو گزارش نمودند. همچنین فیلم‌های بر پایه کیتوسان حاوی اسانس دارچین در کاهش میزان رشد باکتری‌های سرمادوست فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیر معنی‌داری نشان دادند [۲۳].



شکل (۷) تغییرات مقادیر بارباکتریایی کل (TVC) فیله‌های قزل‌آلا پوشش داده شده با تیمارهای مختلف طی نگه‌داری در دمای°C ۴؛ شاهد (نمونه های فاقد پوشش فیلم) (Control)؛ فیله پوشش داده شده با فیلم زیست‌تخریب‌پذیر خالص (CT)؛ فیله‌های پوشش داده شده با فیلم‌های حاوی سینامالدهید آزاد (FCCT)؛ نمونه پوشش داده شده با فیلم حاوی سینامالدهید نانوکپسوله‌شده (NCCT). حروف کوچک (a، b، c) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح p<۰/۰۵ است.

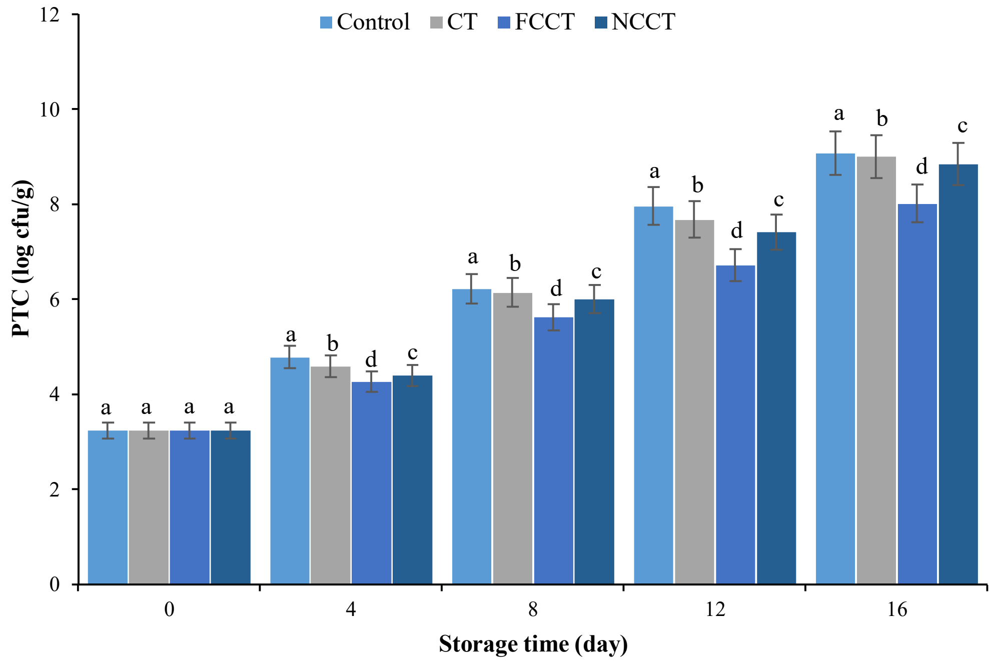
Fig. 7 Changes in the total viable counts (TVC) values of rainbow trout fillets coated without and with biodegradable materials during storage at 4 °C: Control: uncoated; CT: coated with pure biodegradable film; FCCT: coated with biodegradable film containing free cinnamaldehyde; NCCT: coated with biodegradable film containing nanoencapsulated cinnamaldehyde. Different letters (a, b, c) indicate significant difference at $p < 0.05$.

۴. نتیجه‌گیری

در این پژوهش برخی خواص فیزیکی و ریزساختاری فیلم‌های کامپوزیت بر مبنای کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل/ژلاتین ماهی حاوی سینامالدهید آزاد و نانوکپسوله‌شده و نیز اثربخشی فیلم‌های تهیه‌شده جهت افزایش زمان ماندگاری ماهی مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر SEM تهیه شده تأثیر سینامالدهید آزاد و کپسوله-شده بر ساختار فیلم‌ها از لحاظ وجود حفره، شکل سطحی و الگوی فشردگی به ویژه در سطح ۱/۶٪ حجمی/حجمی در مقایسه با فیلم‌های شاهد را آشکار نمود. نتایج آزمون‌های مختلف شیمیایی از جمله pH و TBA، فیزیکی مانند رنگ‌سنجی و میکروبی شامل TVC و PTC نشان داد که کاربرد فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر هر چند در حالت خالص یا بدون نگه‌دارنده طبیعی تأثیر چندانی از جنبه کنترل عوامل فساد و متعاقبا افزایش مدت زمان ماندگاری نداشت، اما تقویت آن به‌وسیله سینامالدهید هم در حالت آزاد و هم ریزپوشانی‌شده توانست روند رشد باکتری‌های مختلف را طی زمان نگه‌داری کنترل کرده و مدت ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلا را در مقایسه با تیمار شاهد تا حد قابل قبولی افزایش دهد. به‌هرحال، تیمار FCCT یا همان فیله پوشش داده شده با فیلم زیست‌تخریب‌پذیر حاوی ۱/۶٪ حجمی/حجمی سینامالدهید آزاد به‌طور موثری فساد شیمیایی و میکروبی فیله ماهی را در مقایسه با سایر تیمارها کاهش داد. بر پایه نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های میکروبی می‌تواند بیان گردد مدت زمان ماندگاری نمونه‌های شاهد یا بدون پوشش و نمونه‌های تیمارشده با فیلم خالص در حدود ۸-۶ روز می‌باشد، در حالیکه نمونه‌های پوشش داده شده با فیلم سه‌جزئی حاوی سینامالدهید آزاد و نانوکپسوله شده ۱۰-۸ روز قابل قبول بودند. به‌طور کلی برپایه یافته‌های تحقیق حاضر، می‌تواند بیان گردد افزودن سینامالدهید دورنمای مطلوبی را جهت توسعه فیلم‌های بسته-بندی بر پایه زیست‌پلیمرها ارائه می‌نماید.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.



شکل (۸) تغییرات مقادیر بار باکتریایی کل (PTC) فیله‌های قزل‌آلا پوشش داده شده با تیمارهای مختلف طی نگه‌داری در دمای °C ۴؛ شاهد (نمونه های فاقد پوشش فیلم) (Control)؛ فیله پوشش داده شده با فیلم زیست‌تخریب‌پذیر خالص (CT)؛ فیله‌های پوشش داده شده با فیلم‌های حاوی سینامالدهید آزاد (FCCT)؛ نمونه پوشش داده شده با فیلم حاوی سینامالدهید نانوکپسوله‌شده (NCCT). حروف کوچک (a، b، c) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح p<۰/۰۵ است.

Fig. 8 Changes in the total viable counts (TVC) values of rainbow trout fillets coated without and with biodegradable materials during storage at 4 °C: Control: uncoated; CT: coated with pure biodegradable film; FCCT: coated with biodegradable film containing free cinnamaldehyde; NCCT: coated with biodegradable film containing nanoencapsulated cinnamaldehyde. Different letters (a, b, c) indicate significant difference at $p < 0.05$

منابع

[1] FDA/CFSAN. (2008). Foodborne pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, Washington, DC, US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, available at: www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html, accessed November, 2008.

[2] Makwana, S., Choudhary, R., Dogra, N., Kohli, P., Haddock, J. (2014). Nanoencapsulation and immobilization of cinnamaldehyde for developing antimicrobial food packaging material. *LWT-Food Sci. Technol.,* 57(2), 470-476.

[3] Pietrasik, Z., Dhanda, J. S., Shand, P. J., Pegg, R. B. (2006). Influence of injection, packaging, and storage conditions on the quality of beef and bison steaks. *J. Food Sci.*, 71, 110-118.

[4] Günlü, A. Koyun, E. (2013). Effects of vacuum packaging and wrapping with chitosan-based edible film on the extension of the shelf life of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets in cold storage (4 C). *Food Bioprocess Tech*, 6(7), 1713-1719.

[5] Qiu, K., & Netravali, A. N. (2012). Fabrication and characterization of biodegradable composites based on microfibrillated cellulose and polyvinyl alcohol. *Compos Sci Technol.*, 72(13), 1588-1594.

[6] Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Ghavi, F. F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. *Food Chem.*, 136(3-4), 1490-1495.

[7] Dammak, I., Bittante, A. M. Q. B., Lourenço, R. V., & do Amaral Sobral, P. J. (2017). Properties of gelatin-based films incorporated with chitosan-coated microparticles charged with rutin. *Int. J. Biol. Macromol.,* 101, 643-652.

[8] Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2012). Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocoll.,* 29(2), 290-297.

[9] Limpan, N., Prodpran, T., Benjakul, S., & Prasarpran, S. (2010). Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. *J. Food Eng.,* 100(1), 85-92.

[10] Wen, P., Zhu, D. H., Wu, H., Zong, M. H., Jing, Y. R. Han, S. Y. (2016). Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active

(*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. *LWT-Food Sci. Technol.*, 70, 104-110.
[25] Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., German, J. B., Ghanati, K., ... & Khaksar, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing Zataria multiflora essential oil. *Int. J. Biol. Macromol.,* 72, 606-613.
[26] Tongnuanchan, P., Benjakul, S., Prodpran, T. (2012). Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chem.*, 134(3), 1571-1579.
[27] Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *J. Food Eng.,* 98(4), 443-452.
[28] Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., Farahmandghavi, F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Ind Crops Prod*., 67, 403-413.
[29] Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T., Agustini, T. W. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocoll*., 28, 189-199.
[30] Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M. Chiralt, A. (2012). Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food Hydrocoll*., 26(1), 9-16.
[31] Souza, A. C., Goto, G. E. O., Mainardi, J. A., Coelho, A. C. V. Tadini, C. C. (2013). Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT-Food Sci. Technol*., 54(2), 346-352.
[32] Shojaee-Aliabadi, S., Mohammadifar, M. A., Hosseini, H., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, S. M., ... & Khaksar, R. (2014). Characterization of nanobiocomposite kappa-carrageenan film with Zataria multiflora essential oil and nanoclay. *Int. J. Biol. Macromol.*, 69, 282-289.
[33] Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I. N. Kontominas, M. G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiol.*, 26(5), 475-482.
[34] Lindsay, R. C. (1991). Flavour of fish. Procceding of the 8th World Congress of Food Science and Technology; 29th September-4October; 1991, Toronto, Canada.
[35] Keshri, R. C. Sanyal, M. K. (2009). Effect of sodium alginate coating with preservatives on the quality of meat patties during refrigerated (4±1c) storage. *J. Muscle Foods*, 20(3), 275-292.
[36] Lu, F., Liu, D., Ye, X., Wei, Y. Liu, F. (2009). Alginate-calcium coating incorporating nisin and EDTA food packaging. *Food Control*, 59, 366-376.
[11] Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem.*, 120(1), 193-198.
[12] Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A. Koocheki, A. (2014). Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocoll.*, 36, 9-19.
[13] Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M. Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and *in vitro* release study. *Carbohydr Polym*., 95(1), 50-56.
[14] Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, J., Yokoyama, W. Zhong, F. (2015). Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids Surf. A.*, 465, 137-146.
[15] Bonilla, J., Fortunati, E. L. E. N. A., Atarés, L., Chiralt, A. Kenny, J. M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol-chitosan biodegradable films. *Food Hydrocoll*., 35, 463-470.
[16] ASTM. (2005). Standard test method for water vapor transmission of materials (E96-05). In Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA.
[17] AOAC. (2005) .AOAC Official methods of analysis (16th ed.), Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC (2005).
[18] Natseba, A., Lwalinda, I., Kakura, E., Muyanja, C. K. Muyonga, J. H. (2005). Effect of pre-freezing icing duration on quality changes in frozen Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Res. Int.*, 38(4), 469-474.
[19] Schanda, J. (Ed.). (2007). *Colorimetry: understanding the CIE system.* John Wiley & Sons.
[20] Sallam, K. I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18(5), 566-575.
[21] Atef, M., Rezaei, M., Behrooz, R. (2015). Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. *Food Hydrocoll*., 45, 150-157.
[22] Gómez-Estaca, J., De Lacey, A. L., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C. Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiol.*, 27(7), 889-896.
[23] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94(3), 223-253.
[24] Feyzioglu, G. C., Tornuk, F. (2016). Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory

[49] Bazargani-Gilani, B., Aliakbarlu, J., & Tajik, H. (2016). Influence of Coating Based on Pomegranate Juice–Chitosan–Zataria multiflora Oil on Chemical Stability of Chicken Meat during Frozen Storage. *J. Food Process Preserv.,* 40(2), 192-201.

[50] Kanatt, S. R., Chander, R. Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem.*, 100(2), 451-458.

[51] Ahmad, M., Benjakul, S., Sumpavapol, P. Nirmal, N. P. (2012). Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil. *Int. J. Food Microbiol.*, 155(3), 171-178.

maintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4 C. *J. Sci. Food Agric.*, 89(5), 848-854.

[37] Antoniewski, M. N., Barringer, S. A., Knipe, C. L. Zerby, H. N. (2007). Effect of a gelatin coating on the shelf life of fresh meat. *J. Food Sci.*, 72(6), 382-387.

[38] Connell, J. J. (1990). Methods of assessing and selecting for quality, Control of Fish Quality, 3rd ed. Fishing News Books, Oxford, U.K.

[39] Jeddi, S., Jafarpour, S. A., Yeganeh, S. Naseri, M. (2018). Evaluation of color and tissue of rainbow trout fillet by chitosan edible coating incorporated with marjoram essential oil during refrigerated storage. *Fisheries Science and Technology*, 7(1), 33-39.

[40] Alves, V. L., Rico, B. P., Cruz, R. M., Vicente, A. A., Khmelinskii, I., & Vieira, M. C. (2018). Preparation and characterization of a chitosan film with grape seed extract-carvacrol microcapsules and its effect on the shelf-life of refrigerated Salmon (*Salmo salar*). *LWT-Food Sci. Technol.*, 89, 525-534.

[41] Amiza, M. A. Kang, W. C. (2013). Effect of chitosan on gelling properties, lipid oxidation, and microbial load of surimi gel made from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Int. Food Res. J.*, 20(4), 1585-1594.

[42] Vatavali, K., Karakosta, L., Nathanailides, C., Georgantelis, D., & Kontominas, M. G. (2013). Combined effect of chitosan and oregano essential oil dip on the microbiological, chemical, and sensory attributes of red porgy (Pagrus pagrus) stored in ice. *Food Bioprocess Tech,* 6(12), 3510-3521.

[43] Neetoo, H. (2007). Effectiveness of antimicrobial packaging in controlling the growth of listeria monocytogenes on cold-smoked salmon. Master of Science Thesis, University of Delaware, Newark.

[44] Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A., Kontominas, M. G. Savvaidis, I. N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 C. *Food Chem.*, 115(1), 169-175.

[45] Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P. Bégin, A. (1997). Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria. *J Food Prot.*, 60(3), 246-253.

[46] Wendakoon, C. N. Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobacter aerogenes by active components in spices. *J Food Prot.*, 58(3), 280-283.

[47] Licciardello, F., Kharchoufi, S., Muratore, G., & Restuccia, C. (2018). Effect of edible coating combined with pomegranate peel extract on the quality maintenance of white shrimps (Parapenaeus longirostris) during refrigerated storage. *Food Packaging Shelf*, 17, 114-119.

[48] Tsai, G. J., Su, W. H., Chen, H. C., & Pan, C. L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Sci*, 68(1), 170-177.

Research Article

Effect of biodegradable films based on chitosan/polyvinyl alcohol/fish gelatin incorporated with cinnamaldehyde on shelf-life extension of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets

Bardia Sodeifi[1], Noredin Nazarnezhad [2*], Seyed Hassan Sharifi[3]

1. Former M.Sc. Student, Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
2. Associate Professor, Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
3. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN, CSIC), Calle José Antonio Novais, 10, 28040 Madrid, Spain.

Abstract

The present study was conducted to compare the effect of adding cinamaldehyde in two forms i.e. free 1.6% v/v and nanoencapsulated 0.375% w/w on the properties of biodegradable film based on chitosan/polyvinyl alcohol/fish gelatin, and then it's potential on shelf-life extension of chilled rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fillets at cold temperature. The results showed that the addition of free and nanoencapsulated cinnamaldehyde contributes to the increase of water vapor permeability WVP, as well as scanning electron microscopy SEM images revealed remarkable differences in the surface morphology between pure films and films containing free and encapsulated cinemaldehyde. In the second phase of the present study, the antioxidant/antimicrobial effects of the developed biodegradable films to increase the shelf-life of fish fillets in four treatments include Control i.e. without coating, samples coated with pure film i.e. without free and nanoencapsulated cinnamaldehyde CT; fillets coated with film containing 1.6% v/v free cinnamaldehyde FCCT; and the samples coated with a film containing 0.375% w/w nanoencapsulated cinnamaldehyde NCCT was investigated. Based on the results, the thiobarbituric acid levels in FCCT treatment were significantly lower than other treatments ($p<0.05$). The colorimetric test of fillets also showed that the luminosity index L* was lower than the other treatments from day 12 in FCCT treatment. The FCCT treatment showed also lower values of total viable TVC and psychrophilic bacteria PTC counts, reaching the maximum limit allowed for the human consumption only on the 12th day of storage. So, biodegradable films containing the cinnamaldehyde as a natural biopreservative might be used to extend the trout shelf-life.

Keywords: Biodegradable packaging; Cinnamaldehyde; Rainbow trout; Bacterial counts; Shelf-life.

* Corresponding author: hosseinisf@modares.ac.ir