

بررسی ویژگی‌های کیفی فیلم نانو کامپوزیت در ترکیب با اسانس مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) به عنوان پوشش نگهدارنده در فیله ماهی قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی نگهداری در یخچال

سید مهدی اجاق^{۱*}، فاطمه شریعتمداری^۱، معظمه کردجزی^۱، مهدی عبداللهی^۲

^۱ گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲ گروه زیست شناسی و مهندسی زیست شناسی، علوم غذایی و تغذیه، دانشگاه صنعتی چالمرز، گوتنبرگ SE 412 96، سوئد

چکیده

به منظور بهبود خواص فیزیکی و مکانیکی، کاهش نفوذپذیری به بخار آب، ایجاد خواص ضد میکروبی و افزایش آب‌گریزی، اسانس مریم‌گلی با فیلم کیتوزان-کتیرا-نانورس ترکیب گردید. ترکیب نانوکامپوزیت با سه غلظت اسانس مریم‌گلی (۱، ۱/۵ و ۲٪) به منظور انتخاب بهترین پوشش جهت کاربرد در نگهداری ماهی قزل آلی رنگین کمان مورد مطالعه قرار گرفت. بهترین خصوصیات (خواص مکانیکی و ضد باکتریایی و جذب آب) فیلم در غلظت ۱/۵٪ اسانس مریم‌گلی در ترکیب با نانوکامپوزیت مشاهده شد. نمونه‌های پوشش داده شده با این نانوکامپوزیت زیست فعال مقدار بار باکتریایی کل و سرمادوست کم‌تری در مقایسه با تیمار شاهد طی دوره ۱۶ روزه نگهداری نشان دادند ($P < 0.05$). با توجه به نتایج، ترکیب کیتوزان-کتیرا-نانورس با اسانس مریم‌گلی، می‌تواند ضمن بهبود ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی کیتوزان در حالت فیلم، کارایی آن را در نگهداری محصولات غذایی دریایی نظیر ماهی قزل آلا بهبود بخشد.

کلمات کلیدی: کیتوزان، کتیرا، نانورس، اسانس مریم‌گلی، قزل آلا

مقدمه

بدن انسان توانایی ساخت اسیدهای چرب چندغیراشباع امگا-۳ و امگا-۶ را ندارد و اینها باید از جیره غذایی (به ویژه با مصرف ماهی) تامین شوند (De Castro, et al., 2007). این اسیدهای چرب بسیار آسیب پذیر بوده و اکسید می شوند، به گونه ای که فسادپذیری و طول عمر کوتاه یک مشکل اصلی در نگهداری ماهی و فرآورده های آن می باشد (Schirmer, et al., 2009). کیتوزان پلی ساکارید خطی است که از استیل زدایی کیتین تهیه می شود و قابلیت تشکیل ژل و استفاده در بسته بندی مواد غذایی به ویژه به عنوان پوشش و فیلم خوراکی را دارا می باشد. برای فیلم های کیتوزان برخی خواص کاربردی شامل خواص آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، نفوذناپذیری در برابر عبور اکسیژن گزارش شده است (Sathivel, et al., 2007). صمغ ها نیز در تهیه فیلم های بسته بندی به کار می روند و به دلیل ایجاد شبکه در فیلم باعث افزایش میزان مقاومت به کشش فیلم می شوند (Bosquez-Molina, et al., 2010; Chen & Lai, 2007). کتیراپلیمری طبیعی است که به عنوان یک هیدروکلوئید با کیفیت، در فهرست افزودنی های سالم قرار دارد (Weiping, et al., 2010). در آب محلول بوده و قابلیت تورم این صمغ برای ایجاد قوام، امولسیون کنندگی و ویسکوزیته از اهمیت ویژه ای برخوردار است (Anonymous, 1991). طی سال های اخیر تحقیقات انجام یافته در زمینه بیوپلیمرها، روی اصلاح خواص این فیلم ها و بهبود خواص مکانیکی و بازدارندگی نسبت به بخار آب آنها متمرکز شده است. یکی از مهم ترین پیشرفت ها که در این زمینه حاصل شده است ورود فناوری نانو در این عرصه می باشد (Cole & Bergeson, 2006). کاربرد تکنولوژی نانو در این پلیمرها می تواند راه های نوینی نه تنها برای بهبود خصوصیات آنها فراهم کند بلکه هزینه های آنها را نیز کاهش دهد (Azeredo, 2009; Arora & Padua, 2010). صنعت بسته بندی به طور خاصی توجه خود را روی ترکیبات جامد معدنی نظیر رس ها و سیلیکات ها متمرکز کرده است. از آنجایی

که لایه های رس سدی در برابر گازها و آب ایجاد می کنند و باعث می شوند تا فضای پر پیچ و خمی را طی کنند، بنابراین افزودن آن به پلیمرهای زیستی موجب افزایش خواص سدی آنها می شود (Adame & Beall, 2009). برای کاهش فساد مواد غذایی ناشی از فعالیت میکروارگانیسم ها، عوامل ضد میکروبی مصنوعی معمولاً به صورت مستقیم به مواد غذایی افزوده می شوند، این روش معایب بسیاری دارد، از جمله این که، مصرف کنندگان به دلیل نگرانی در مورد عوارض جانبی این ترکیبات، ترجیح می دهند مواد غذایی عاری از مواد افزودنی و یا حداقل افزودنی های مصنوعی استفاده کنند (Kuorwel, et al., 2011). از جمله نگه دارنده های طبیعی اسانس ها هستند. در بین اسانس های مختلف اسانس پونه کوهی، میخک، آویشن، دارچین و مریم گلی دارای بیشترین اثر ضد میکروبی می باشند (Burt, 2004; Holley & Patel, 2006; Seydim & Sarikus, 2005). مریم گلی گیاه اسانس دار از خانواده نعنائیان می باشد که در طب سنتی مورد استفاده قرار می گیرد (Arrieta, et al., 2001). در تحقیق رسولی و رضایی (۱۳۷۹) اسانس مریم گلی تاثیر ضد میکروبی بیش تری روی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اسانس گل اسطوخدوس داشت. بنابراین، با توجه به این که ماهی قزل آلا رنگین کمان از جمله ماهیان تجاری بوده و نیز قابلیت فسادپذیری بالائی دارد، لذا استفاده از روش های جدید که بتواند باعث حفظ و بهبود کیفیت این فرآورده شوند و در عین حال رفع نگرانی های ناشی از مصرف مواد نگه دارنده ی مصنوعی، امری ضروری به نظر می رسد. از این رو در این تحقیق سعی بر آن است، که در وهله ی اول پوششی که ضمن دارا بودن خواص مکانیکی ایده آل، زیست تخریب پذیر و فعال نیز می باشد، تهیه شده و در ادامه اثر آن در کنترل رشد باکتری های کل و باکتری های سرمادوست در شرایط آزمایشگاهی و فیله ماهی در دمای یخچال مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش

اسانس مجدداً وزن گردید و از تفاوت وزن اولیه (وزن شیشه) و ثانویه (وزن شیشه و اسانس) میزان اسانس به دست آمد که به صورت درصد وزنی در صد گرم ماده خشک بیان شد. میزان خلوص ۹۷ درصد بود (امیدبگی، ۱۳۷۸).

تهیه نانوکامپوزیت‌های زیست‌فعال جهت تهیه کامپوزیت، ترکیب ۷۰ به ۳۰ محلول کیتوزان و کتیرا ترکیب شده، همچنین نانوکامپوزیت حاوی ۳ درصد نانورس از طریق انحلال نانورس در آب مقطر و هم‌زدن شدید با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه با هم‌زن مغناطیسی به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط تهیه گردید. در مرحله بعد محلول ۳۰ درصد کیتوزان و کتیرا به محلول نانورس اضافه شد. در ابتدا به وسیله هم‌زنایزر دو محلول به مدت ۵ دقیقه هم‌وزن شده و سپس با هم‌زن مغناطیسی به مدت ۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد هم‌زده می‌شد. بعد از گذشت این مدت زمان گلیسرول به میزان ۵۰ درصد وزن پلیمر به محلول اضافه و با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط گردید. محلول حاصله پس از فیلتر توسط پارچه تنظیف و هواگیری توسط پمپ خلاء روی پلیت ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Chen, et al., 2008). با توجه به آزمون‌های فیزیکی و مکانیکی انجام شده روی آن‌ها به‌عنوان تیمار بهینه انتخاب شدند. پس از تهیه نانوکامپوزیت بهینه، ۰/۷۵ w/v، نسبت به میزان اسانس، توئین ۸۰ به‌عنوان امولسیفایر به محلول‌ها اضافه گردید و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد عمل هم‌زدن آرام صورت گرفت تا امولسیفایر به‌طور یکنواخت در محلول پخش شد. سرانجام اسانس مریم‌گلی به میزان ۱، ۱/۵ و ۲ v/v% محلول نانوکامپوزیت به محلول‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه عمل هم‌زدن به‌کمک هم‌زنایزر با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه صورت گرفت تا اسانس‌ها به‌طور یکنواخت در مجموعه پخش شوند. محلول حاصله به‌کمک پمپ خلاء هواگیری گردید. سپس فیلم‌ها روی پلیت ریخته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

مواد شیمیایی مصرفی از شرکت سیگما و مرک آلمان تهیه شدند. ماهی قزل‌آلا با میانگین وزنی 100 ± 100 گرم از بازار ماهی در شهرستان گرگان خریداری شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه شیمی دانشکده شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردید. بعد از عملیات مربوط به تخلیه شکمی و سرزنی، از هر ماهی فیله‌هایی به ابعاد ۴×۳ سانتی‌متر تهیه شد و پس از شستشو جهت پوشش کردن، مجدداً در مجاورت یخ نگهداری گردید.

استخراج و اندازه‌گیری اسانس

گیاه مریم‌گلی از ارومیه در سال ۹۲ جمع‌آوری گردید و اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجرو به روش تقطیر با آب، در شرایط کاملاً یکسان به مدت ۳ ساعت انجام شد. برای اسانس‌گیری سی و پنج گرم از گل‌های گیاه را به همراه ۵۰ میلی‌لیتر آب و ۱ گرم کلرید سدیم (افزایش نقطه جوش و خروج کامل اسانس) به بالن ۵۰۰ میلی‌لیتر اضافه گردید. در اثر حرارت فشار بخار آب افزایش یافته و غدد حاوی اسانس شکسته شده و اسانس به همراه بخار آب وارد سرد کننده (مبرد) می‌شود، در سرد کننده میعان صورت گرفته و قطرات اسانس درون آب به صورت دو فاز مشخص به طرف لوله مدرج حرکت می‌کند و در آن‌جا به علت سبک‌تر بودن روی آب تجمع می‌یابد. روش تجربی برای تشخیص پایان مرحله تقطیر هنگامی است که در لوله‌های سردکن اثری از قطره‌های اسانس مشاهده نگردد و تنها قطره‌های آب در آن جاری باشد. برای جدا کردن اسانس، ابتدا آب و نمک تا حد فاصل خط اسانس تخلیه گردید. سپس محلول حاصله (اسانس) در ظرف‌های شیشه‌ای کوچک ریخته و درصد اسانس پس از رطوبت زدائی آن تعیین گردید (باقری و همکاران، ۱۳۸۷).

تعیین درصد اسانس

جهت تعیین درصد اسانس از روش وزنی استفاده شد، به این ترتیب که ابتدا ظرف شیشه‌ای کوچک تمیز که در آن به وزن ثابت رسیده بود، توزین گردید. آنگاه نمونه حاوی اسانس که از دستگاه کلونجر جدا شده بود به دستگاه تبخیر گردان منتقل گردید. سپس ظرف حاوی

قرار گرفتند تا خشک شوند و برای انجام تست های بعدی از روی پلیت جداسازی شدند. روش ارزیابی خصوصیات و ویژگی های فیلم سنجش ضخامت فیلم ضخامت نمونه ها با یک ریزسنج دیجیتالی (0/001 میلی متر) اندازه گیری شد. اندازه گیری ها در پنج نقطه از هر نمونه مورد آزمون تکرار شد. میانگین ضخامت محاسبه شده و در تعیین خواص مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب استفاده گردید.

اندازه گیری نفوذپذیری به بخار آب فیلم سنجش میزان نفوذپذیری فیلم نسبت به بخار آب مطابق روش شماره E96 مصوب ASTM (2002) صورت گرفت. درون سلول های اندازه گیری نفوذپذیری، آب ریخته شد و سپس سطح سلول به وسیله فیلم پوشانده شده و لبه سلول با استفاده از گریس در برابر نفوذ هوا و مخصوصا بخار آب درزبندی شد و سلول ها درون دسیکاتور حاوی سلیکاژل قرار گرفتند. تغییرات وزن سلول ها طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتالی با دقت 0/0001 توزین گردید تا وزن خشک اولیه نمونه ها محاسبه گردد و پس از آن نمونه در ظروف درب دار حاوی 50 میلی لیتر آب مقطر با و در دمای 25 درجه سانتی گراد قرار داده شد. به منظور تعیین میزان جذب، نمونه ها هر 5 دقیقه یکبار از ظرف خارج شدند و پس از خشک کردن سطح آن ها به وسیله دستمال کاغذی مجدد توزین شدند و سپس به ظرف آب باز گردانده می شدند. فرآیند توزین تا زمان رسیدن نمونه ها به تعادل رطوبتی ادامه پیدا کرد. محتوای رطوبت فیلم نسبت به زمان از طریق رابطه 3 محاسبه گردید.

رابطه (3) وزن فیلم خشک پس از غوطه وری (IFDW) - وزن خشک فیلم اولیه (PFDW) / وزن خشک اولیه فیلم (PFDW) = جذب رطوبت (AM)

حلالیت در آب وزن اولیه نمونه های فیلم 2/5 × 2/5 پس از خشک شدن در دمای 105 درجه سانتی گراد تعیین شد و سپس نمونه های فیلم در ظروف حاوی 50 سی سی آب مقطر قرار گرفت. ظروف به مدت 24 ساعت در دمای محیط قرار

قرار گرفتند تا خشک شوند و برای انجام تست های بعدی از روی پلیت جداسازی شدند. روش ارزیابی خصوصیات و ویژگی های فیلم سنجش ضخامت فیلم ضخامت نمونه ها با یک ریزسنج دیجیتالی (0/001 میلی متر) اندازه گیری شد. اندازه گیری ها در پنج نقطه از هر نمونه مورد آزمون تکرار شد. میانگین ضخامت محاسبه شده و در تعیین خواص مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب استفاده گردید.

اندازه گیری نفوذپذیری به بخار آب فیلم سنجش میزان نفوذپذیری فیلم نسبت به بخار آب مطابق روش شماره E96 مصوب ASTM (2002) صورت گرفت. درون سلول های اندازه گیری نفوذپذیری، آب ریخته شد و سپس سطح سلول به وسیله فیلم پوشانده شده و لبه سلول با استفاده از گریس در برابر نفوذ هوا و مخصوصا بخار آب درزبندی شد و سلول ها درون دسیکاتور حاوی سلیکاژل قرار گرفتند. تغییرات وزن سلول ها طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتالی با دقت 0/0001 گرم اندازه گیری شد. در تمام نمونه ها با رسم منحنی تغییرات وزن سلول نسبت به زمان، یک خط راست ($R2 > 0.99$) حاصل شد. نرخ انتقال بخار آب بر حسب (2- متر 1- ثانیه گرم) معادل با شیب خطوط (SL) حاصله تقسیم بر سطح سلول (CS) بود و از رابطه 1 حاصل شد. سطح سلول ها 0/00287 متر مربع بود.

رابطه (1) (سطح سلول) CS / (شیب خط) SL = نرخ انتقال بخار آب (WVTR)

از ضرب نمودن نرخ انتقال بخار آب در ضخامت فیلم ها و تقسیم آن در اختلاف فشار موجود در دو سمت فیلم میزان نفوذپذیری بخار آب به دست آمد و به صورت 1- پاسکال 1- متر 1- ثانیه گرم گزارش شد.

رابطه (2) 103 × 2/337 / (ضخامت فیلم) (FT) × نرخ انتقال بخار آب (WVTR) = نفوذپذیری به بخار آب (WVP)

اندازه گیری خواص مکانیکی فیلم اندازه گیری خواص مکانیکی فیلم با استفاده از دستگاه بافت سنج (Instronuniversal testing)

۰/۰۸ معادل CFU/ml108 می‌باشد. برای سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر از مایع حاوی هر باکتری بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به دو قسمت تقسیم گردید. در تعدادی از آن‌ها چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد گردید و در آن‌ها ۵۰ میکرولیتر اسانس ریخته شد. دیسک‌های به قطر ۶ میلی‌لیتر از فیلم‌ها که از قبل در شرایط استریل تهیه شده بود روی پلیت‌های دیگر قرار داده شد (Gómez-Estaca, et al., 2010). در نهایت پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند. اختلاف قطر هاله‌های تشکیل شده از قطر دیسک‌ها به‌عنوان شاخص فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها در نظر گرفته شد.

بررسی اثر پوشش‌ها بر ماندگاری نمونه‌های ماهی آماده‌سازی ماهی

۳۰ کیلوگرم ماهی قزل‌آلا با میانگین وزنی 100 ± 1000 گرم و طول متوسط $32/5$ سانتی‌متر از بازار ماهی در شهرستان گرگان خریداری شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. بعد از عملیات مربوط به تخلیه شکمی و سرزنی، از هر ماهی فیله‌هایی به ابعاد 3×4 سانتی‌متر و وزن تقریبی 27 ± 3 تهیه شد و پس از شستشو جهت پوشش کردن، مجدداً در مجاورت یخ نگهداری گردید.

پوشش‌دهی فیله‌ها با بهترین فیلم تولیدی

از مجموع ۳ تیمار حاصل از نانوکامپوزیت با ترکیب ۳ غلظت $1/5$ ، $1/1$ و $2/1$ اسانس مریم‌گلی، بهترین خواص در فیلم حاوی $1/5$ اسانس شناسایی گردید. به‌منظور بررسی کارایی نانوکامپوزیت فعال شده به‌وسیله اسانس تولیدی در محیط واقعی، دو تیمار به شرح زیر انتخاب گردید.

۱- شاهد؛ فاقد پوشش و ۲- نانوکامپوزیت کیتوزان/کتیرا - رس $3/1$ - مریم‌گلی $1/5$ ، پس از تهیه فیلم فوق در شرایط استریل تعداد ۱۲ فیله با ابعاد 3×4 سانتی‌متر برای هر تیمار در نظر گرفته شد. فیله‌ها پس از روکش‌دهی شدن توسط نانوکامپوزیت زیست‌فعال درون زیپ‌کیپ قرار داده شدند و نهایتاً نمونه‌ها در دمای ۴

داده شد. پس از این مدت محلول حاوی نمونه‌ها به وسیله کاغذهای صافی که قبلاً خشک شده بود فیلتر و مجدداً در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. میزان حلالیت فیلم‌ها به کمک رابطه ۴ محاسبه گردید (Hosseini, et al., 2009).

رابطه (۴) وزن فیلم خشک (FDW) / $100 \times$ وزن فیلم خشک بعد از غوطه وری (IFDW) - وزن فیلم خشک (FDW) = میزان حلالیت (S%).

سنجش میزان رطوبت فیلم

نمونه‌های فیلم با وزن مشخص درون پلیت‌های شیشه‌ای که از قبل به تعادل رطوبتی رسیده و توزین شده بودند قرار گرفت. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. نمونه‌ها همراه با پلیت پس از این مدت خارج شده و پس از سرد شدن در دسیکاتور مجدداً توزین گردید. محتوای رطوبت روکش‌ها بر پایه وزن مرطوب از رابطه ۵ محاسبه گردید (Ojagh, et al., 2010).

رابطه (۵) وزن فیلم اولیه (PFW) / $100 \times$ وزن فیلم خشک (DFW) - وزن فیلم اولیه (PFW) = میزان رطوبت (S%).

سنجش خواص ضد میکروبی فیلم‌ها

به‌منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های تولیدی از روش نفوذ در محیط آگار استفاده گردید. به این منظور ابتدا یک لوپ از هر یک از ۳ گونه باکتری *Listeria* و *Staphylococcus aureus monocytoenes* در *Escherichia coli* در لوله‌های حاوی ۱۰ سی‌سی محیط کشت BHI افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا تعداد باکتری‌ها به اندازه کافی افزایش یابد. سپس از طریق سانتریفیوژ با 3000 دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد محیط کشت از باکتری جدا گردید و از طریق میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر تعداد باکتری‌ها به ۱۰۸ رسانده شد. میزان جذب به‌عنوان شاخصی از بار باکتریایی استفاده گردید. به این صورت که میزان جذب مایع حاوی باکتری در ۶۰۰ نانومتر، $0/1$ -

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام پذیرفت. ابتدا بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف - اسمیرنوف انجام گردید که نتایج این آزمون‌ها جهت آنالیز آماری داده‌های مربوط به تیمارهای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی هم‌زمان دو عامل زمان و پوشش خوراکی بر شاخص میکروبی در تیمارهای مورد نظر و بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین مقادیر حاصل از هر شاخص در زمان‌های مختلف نگهداری از روش تجزیه واریانس دوطرفه و برای مقایسه میانگین‌ها در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار شناخته شد از آزمون دانکن استفاده گردید. هم‌چنین به‌منظور بررسی اثر تیمارها بر خصوصیات حسی نمونه‌ها از آزمون کوروسکال والیس و آزمون من ویتنی یو برای پیدا نمودن اختلاف معنی‌دار در بین نتایج حاصل از آزمون‌های حسی تیمارهای مورد آزمایش استفاده گردید.

نتایج

خواص فیزیکی وابسته به آب (درصد رطوبت، درصد حلالیت، نفوذپذیری به بخار آب و جذب آب) خواص فیزیکی وابسته به آب نانوکامپوزیت‌ها در جدول ۱ آورده شده است. نانوکامپوزیت‌های حاوی اسانس در مقایسه با نانوکامپوزیت فاقد اسانس اختلاف معنی‌داری ($p > 0.05$) از نظر میزان رطوبت نشان ندادند. ولی نانوکامپوزیت‌های حاوی اسانس ۲٪ بیش‌ترین میزان رطوبت (۴۵/۶۴ درصد) نسبت به نمونه شاهد داشتند. با افزودن اسانس به فیلم نانوکامپوزیت اختلاف معنی‌داری از نظر درصد حلالیت مشاهده شد ($p < 0.05$). در تیمار شاهد و اسانس ۱/۵٪ کم‌ترین درصد حلالیت و در اسانس ۱٪ و ۲٪ بیش‌ترین درصد حلالیت را دارا بودند. افزودن اسانس مریم‌گلی موجب افزایش میزان نفوذپذیری به بخار آب در فیلم نانوکامپوزیت حاوی اسانس شد.

درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۶ روز نگهداری شدند و در فواصل زمانی ۴ روز مورد ارزیابی میکروبی و حسی قرار گرفتند.

آنالیز میکروبی

برای آزمایشات میکروبی ۵ گرم از نمونه گوشت فیله با ۴۵ میلی‌لیتر از محلول سرم فیزیولوژی مخلوط و هموزن شده و متعاقب آن رقت‌های مورد نیاز تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از هر رقت برای کشت باکتری‌ها به‌روش پور پلت در محیط پلیت کانت آگار (PCA) قرار گرفت. نمونه‌های کشت داده شده در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت برای مشاهده و شمارش بار کلی باکتریایی و در انکوباتور ۷ درجه سانتی‌گراد (به‌دلیل تشکیل کلنی‌های قابل شمارش در این دما) به‌مدت ۱۰ روز برای شناسایی باکتری‌های سرمادوست قرار گرفتند و پس از طی مدت انکوباسیون، کلونی‌ها شمارش شدند.

ارزیابی حسی

ارزیابی نمونه‌ها توسط ۵ فرد آموزش دیده (۲ مرد و ۳ زن در رنج سنی ۲۰ تا ۴۰ سال) انجام پذیرفت. ارزیابی نمونه‌ها به‌روش ۵ امتیازی انجام پذیرفت. امتیازدهی هر یک از ویژگی‌ها به‌صورت زیر انجام پذیرفت: بافت (۵)، بافت سفت؛ ۴، بافت تا حدودی سفت؛ ۳، تا حدودی له شدگی و نرم شدگی؛ ۲، له شدگی شدید؛ ۱، بافت خیلی نرم بوده و تقریباً حالت خمیری دارد؛ رنگ (۵، سفید و شفاف؛ ۴، سفیداندرکی مات؛ ۳، تقریباً خاکستری با ظاهر غیر شفاف؛ ۲، خاکستری مایل به زرد؛ ۱، خاکستری تیره و کدر)؛ بو (۵، کاملاً مطبوع و ملایم؛ ۴، بوی مشابه ماهی تازه؛ ۳، بوی ماهی با اندکی بوی ترشیدگی؛ ۲، بوی ترشیدگی کاملاً محسوس و نامطبوع؛ ۱، بوی تعفن و ترشیدگی شدید)؛ مقبولیت کلی (۵، کاملاً قابل قبول؛ ۴، قابل قبول؛ ۳، نامناسب برای مصرف؛ ۲، نامقبول؛ ۱، کاملاً نامقبول) (Rehbein & Oehlenschläger, 2009; Nollet & Toldrá, 2010). میانگین امتیاز ۴ برای فیله‌ها در ارزیابی حسی به‌عنوان حد مقبولیت برای مصارف انسانی در نظر گرفته شد (Fan, et al., 2009; Ojagh, et al., 2010).

جدول ۱: خواص فیزیکی نانوکامپوزیت‌های زیست‌فعال

نوع فیلم	ضخامت (میلی‌متر)	رطوبت (%)	حلالیت (%)	نفوذپذیری به بخار آب (g/mPa)
شاهد	0.09 ± 0.007^b	$42/71 \pm 3/65^a$	$15/46 \pm 6/86^b$	$4/63 \pm 0/3^c$
ن-مریم‌گلی ۱٪	0.14 ± 0.02^a	$44/51 \pm 3/13^a$	$27/81 \pm 10/9^a$	$6/66 \pm 0/28^b$
ن-مریم‌گلی ۱/۵٪	0.15 ± 0.01^a	$44/61 \pm 1/34^a$	$9/51 \pm 3/53^b$	$7/36 \pm 0/18^a$
ن-مریم‌گلی ۲٪	0.12 ± 0.01^a	$45/64 \pm 0/6^a$	$30/98 \pm 8/21^a$	$7/28 \pm 0/34^a$

a, b و c حروف کوچک در هرستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح $p < 0.05$; n: نانوکامپوزیت

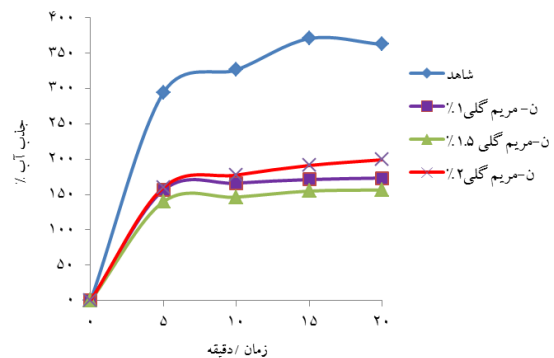
اسانس)، (a, b و c حروف کوچک در شکل نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح $(p < 0.05)$)

خواص مکانیکی نانوکامپوزیت‌های زیست‌فعال

(مقاومت به کشش، درصد افزایش طول)

با توجه به جدول ۲ مقاومت کششی نانوکامپوزیت با افزودن اسانس به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. درصد افزایش طول با افزودن ۱٪ اسانس تغییر معنی‌داری نشان نداد اما با افزایش سطح اسانس تا سطوح ۲٪ و ۱/۵٪ این شاخص نیز بطور معنی‌داری کاهش یافت ($p > 0.05$). در واقع کم‌ترین درصد افزایش طول در اسانس ۲٪ و بیش‌ترین در فیلم شاهد و نانوکامپوزیت حاوی اسانس ۱٪ مشاهده گردید.

در شکل ۱ مقادیر جذب آب نانوکامپوزیت‌های زیست‌فعال آورده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود کم‌ترین میزان جذب در نانوکامپوزیت با افزودن اسانس ۱/۵ درصد مشاهده شد.



شکل ۱: جذب آب در فیلم نانوکامپوزیت زیست‌فعال (ن-مریم‌گلی: نانوکامپوزیت حاوی درصد‌های مختلف

جدول ۲: خواص مکانیکی نانوکامپوزیت‌های زیست‌فعال

نوع فیلم	مقاومت کششی (مگاپاسکال)	افزایش طول (%)
شاهد	$5/02 \pm 0/86^a$	$37/1 \pm 1/86^a$
ن-مریم‌گلی ۱٪	$3/2 \pm 0/53^b$	$37/39 \pm 2/54^a$
ن-مریم‌گلی ۱/۵٪	$2/62 \pm 0/22^b$	$31/80 \pm 1/62^b$
ن-مریم‌گلی ۲٪	$2/42 \pm 0/34^c$	$28/56 \pm 4/22^b$

a, b و c حروف کوچک در هرستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح $p < 0.05$; n: نانوکامپوزیت

خواص ضد میکروبی فیلمها

نتایج بررسی اثر ضد باکتریایی نانوکامپوزیت فاقد اسانس و نانوکامپوزیت های حاوی درصد های مختلف اسانس مریم گلی بر سه گونه باکتریایی *S.aureus*، *L.monocytogenes* و *E.coli* طی آزمایش دیسک در جدول ۳ قرار دارد. همان طور که ملاحظه می شود اسانس

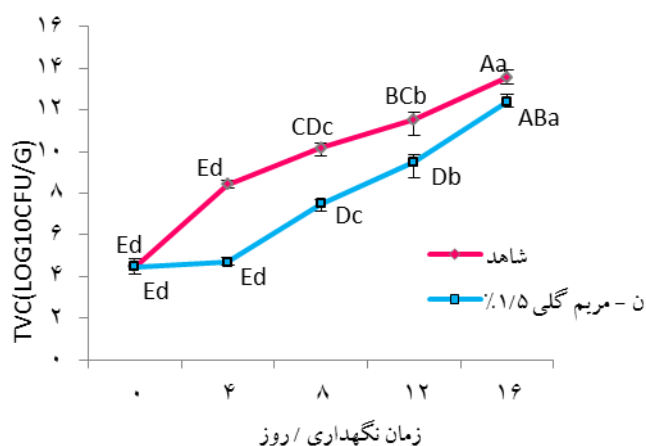
جدول ۳: خواص ضد میکروبی فیلم های تولیدی در آزمایش دیسک

نوع فیلم	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
شاهد	-	-	-
ن - مریم گلی ۱٪	+	+	-
ن - مریم گلی ۱/۵٪	++	++	-
ن - مریم گلی ۲٪	++	++	-

++ اثر مهارکنندگی خوب، + اثر مهارکنندگی ضعیف و - فاقد اثر مهارکنندگی (گومز استاکا و همکاران، ۲۰۱۰)

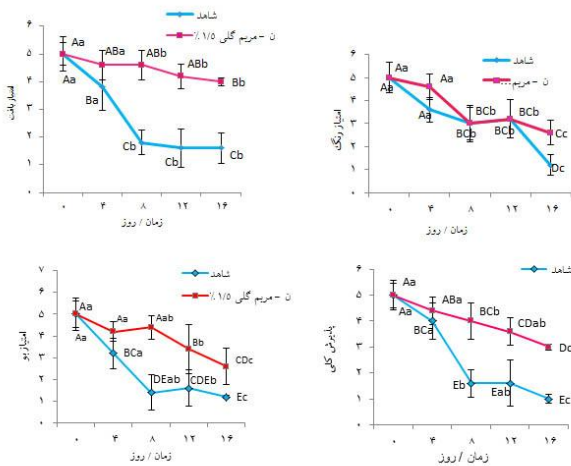
تعداد باکتری های کل فیلهای ماهی

نتایج شمارش باکتری های کل در طی دوره نگهداری ۱۶ روزه در شکل ۲ مشاهده می شود. تعداد باکتری های کل در همه تیمارها در طی دوره نگهداری افزایش معنی داری ($p < 0.05$) داشت. نتایج نشان داد که ماهی پوشش داده شده با نانوکامپوزیت حاوی ۱/۵ درصد اسانس مریم گلی در برابر باکتری ها در مقایسه با ماهی بدون پوشش، قدرت بازدارندگی معنی داری ($p < 0.05$) داشته است. نمونهی شاهد از نظر تعداد باکتری ها غیر قابل شمارش (بیشتر از ۳۰۰) بود. نمونه پوشش داده شده با نانوکامپوزیت حاوی اسانس فساد میکروبی را ۴ روز به تاخیر انداخت و با توجه به شکل دیده می شود که از روز صفر تا روز ۴ نگهداری از نظر تعداد باکتری های کل در نمونهی پوشش داده شده تغییر معنی داری ایجاد نشد.



شکل ۲: بار باکتریایی کل تیمارهای مختلف در طی زمان نگهداری در یخچال (شاهد: نمونه ماهی بدون پوشش، ن - مریم گلی ۱/۵٪: ماهی دارای پوشش نانوکامپوزیت حاوی اسانس ۱/۵٪)، (a, b, c حروف کوچک در هر شکل نشان دهنده اختلاف معنی دار بین زمان نگهداری در سطح $p < 0.05$ و A, B, C, D, E حروف بزرگ در هر شکل نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح ($p < 0.05$))

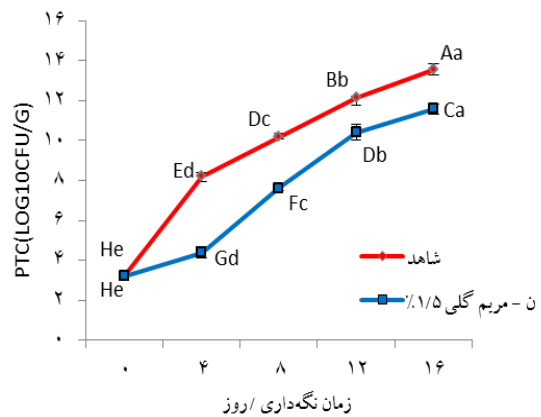
این کاهش در تیمار شاهد از تیمار دارای پوشش بیشتر بود به گونه‌ای که در روز ۴ نگهداری تمامی امتیازها برای تیمار شاهد به کمتر از ۴ کاهش یافت. تیمارهای پوشش داده شده به‌طور معنی‌داری از روز ۴ نگهداری در همی خصوصیات ارزیابی شده بهتر از تیمار شاهد بودند.



شکل ۴- امتیاز ارزیابی حسی در تیمارهای مختلف فیله ماهی قزل‌آلا در طی زمان نگهداری (a, b و c حروف کوچک در هر شکل نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان نگهداری در سطح $p < 0.05$ و A, B, C, D, E و حروف بزرگ در هر شکل نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح $p < 0.05$)

تعداد باکتری‌های سرمادوست فیله ماهی

مقادیر شمارش شده برای باکتری‌های سرمادوست در شکل ۳ مشاهده می‌شود. میزان باکتری‌های سرمادوست فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول دوره نگهداری به‌صورت معنی‌داری ($p < 0.05$) در هر دو تیمار افزایش یافت که در نمونه‌های دارای پوشش اختلاف معنی‌داری با نمونه‌ی بدون پوشش داشت، به گونه‌ای که در پایان دوره نگهداری میزان باکتری‌های سرمادوست در تیمار شاهد $10^{13.55}$ cfu/g و در نمونه‌های دارای پوشش نانوکامپوزیت حاوی اسانس $10^{11.63}$ cfu/g بوده است.



شکل ۳: جمعیت باکتری‌های سرمادوست تیمارهای مختلف در طی زمان نگهداری در یخچال (شاهد: نمونه ماهی بدون پوشش، ن - مریم گلی: ماهی دارای پوشش نانوکامپوزیت حاوی اسانس ۱/۵٪)، (a, b و c حروف کوچک در هر شکل نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان نگهداری در سطح $p < 0.05$ و A, B, C, D, E, G و حروف بزرگ در هر شکل نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح $p < 0.05$)

ارزیابی حسی

نتایج امتیاز ارزیابی حسی نمونه‌ها طی مدت نگهداری ۱۶ روزه در یخچال در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود امتیاز رنگ و بو در هر دو تیمار به‌طور معنی‌داری ($p > 0.05$) کاهش یافت. سرعت

جدول ۴: شناسنامه دارو استاندارد گیاه مریم گلی

	Test	Specification	Test Result	Method
Physicochemical Tests	Appearance	Clear Liquid	Conform	In-House
	Color	Colorless	Conform	In-House
	Odor	Characteristic	Conform	In-House
	Specific gravity	0.890 - 0.925	0.916	USP39-NF34
	Refractive Index	1.456 - 1.466	1.463	USP39-NF34
	Assay (Alpha & Beta Thujone)	20.00 - 60.00 %	28.00	BP, 2015 (GC)
Microbiology Limit Tests	Total Bacterial Count	Max. 10^5 cfu/ml	Conform	USP39-NF34
	Total Mould and Yeasts	Max. 10^3 cfu/ml	Conform	USP39-NF34
	<i>E. Coli</i>	Max. 10 cfu/ml	Conform	USP39-NF34
	<i>Salmonellae</i>	Absence/10 mL	Conform	USP39-NF34

بحث

جذب آب با افزودن اسانس به فیلم نانوکامپوزیت به طور معنی داری کاهش یافت؛ این کاهش با افزودن اسانس ۱/۵٪ با شدت بیشتری بود. در تحقیق Peng & Li (۲۰۱۴) نیز نتایج مشابه با تحقیق حاضر مشاهده شد. کاهش در جذب آب می تواند به دلیل طبیعت آبگریز اسانس و یا تاثیر آن بر افزایش میزان آبگریزی فیلم ها باشد که از جذب آب به درون شبکه بیوپلیمری فیلم ممانعت کرده است (Abdollahi *et al.*, 2012).

Wang و همکاران (۲۰۱۳) یافتند که افزودن اسانس آویشن و میخک باعث کاهش مقاومت کششی فیلم کیتوزان شد. در تحقیق حاضر، کاهش استحکام کششی احتمالاً به دلیل توانایی نرم کنندگی اسانس مریم گلی است. افزودن اسانس بیش از حد به پلیمر غالباً منجر به ایجاد ساختار ناهمگن در فیلم از جمله ناپیوستگی و یا بی نظمی در ساختار فیلم می گردد (Ahmad, *et al.*, 2012). در تحقیق Pelissari و همکاران (۲۰۰۹) با افزودن اسانس به فیلم کیتوزان-نشاسته از مقاومت کششی کاسته و درصد افزایش طول زیاد شد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نداشت. گزارش شده است که افزودن لیپید یا

Ojagh و همکاران (۲۰۱۰)، Abdollahi و همکاران (۲۰۱۲) و Peng & Li (۲۰۱۴)، به نتایج متفاوت با این تحقیق دست یافتند. نفوذپذیری به بخار آب با افزودن اسانس به فیلم شاهد بطور کلی افزایش معنی داری نشان داد و بالاترین میزان آن $(7/36 \text{ g/mPa})$ در فیلم های حاوی ۱/۵٪ اسانس مشاهده شد. از آنجایی که اسانس ها در دمای اتاق مایع هستند و با حضور در ساختار فیلم به راحتی می توانند تغییر شکل داده و باعث انعطاف پذیری و تحرک زنجیره های مولکولی می شوند. در نتیجه ی تحرک بیشتر، انتقال مولکول های آب از طریق فیلم تسهیل می شود. علاوه بر آن افزایش در میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب به دلیل تخریب ساختار فیلم و ایجاد ترک و منفذ در فیلم های حاوی ۱/۵ و ۲٪ اسانس می باشد (Rodríguez, *et al.*, 2006; Fabra, *et al.*, 2008;) (Ahmad, *et al.*, 2012; Yan, *et al.*, 2013). جذب آب از خواص مهم فیلم های زیست تخریب پذیر است چرا که بر پایداری فیلم در برابر آب به خصوص در محیط مرطوب تاثیر می گذارد (Peng & Li, 2014). با توجه به شکل ۱،

فیلم نانوکامپوزیت فاقد اسانس فاقد اثر مهار کنندگی روی سه باکتری فوق بود که با نتایج Rhim و همکاران (۲۰۰۷) و Abdollahi و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی داشت.

گوشت ماهی حاوی ترکیبات مناسبی برای رشد باکتری‌ها می‌باشد، بنابراین حضور باکتری‌هایکی از دلایل کاهش کیفیت فیله ماهی در طول دوره نگهداری می‌باشد. کمیته بین المللی تعیین ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذایی (ICMSF، 1986) حد مجازی را برای میزان بار باکتریایی کل در ماهی خام تعیین کرده است که این میزان ۷ Log10CFU/g می‌باشد. میزان اولیه بار باکتریایی به عوامل متعددی از جمله دست‌کاری حین تهیه فیله، بهداشت افراد، آلودگی وسایل به‌کار رفته بستگی دارد. بار باکتریایی کل برای نمونه‌های مورد بررسی در روز صفر ۴/۴۷ Log10CFU/g بود که نشان‌دهنده کیفیت نسبتاً مناسب ماهی می‌باشد. در پایان روز ۸ نگهداری میزان بار باکتریایی کل برای نمونه شاهد به ۱۰/۱۸ Log10CFU/g رسید و نمونه پوشش داده شده به ۷/۴۸ Log10CFU/g رسید که در تیمار شاهد از حد مجاز مصرف خیلی بالاتر رفته بود. به‌طور کلی مشخص شد که در نمونه‌های پوشش داده شده با نانوکامپوزیت حاوی اسانس ۱/۵ درصد، میزان بار باکتریایی کل به‌طور معنی‌داری کم‌تر از نمونه‌ی فاقد پوشش بود.

تغییرات تعداد باکتری‌های سرمادوست (PTC) تیمارهای مختلف در طی زمان نگهداری در یخچال در شکل ۳ مشاهده می‌شود. میزان بار باکتریایی سرمادوست در روز صفر ۳/۱۹ Log10CFU/g بود که از میزان بار باکتریایی کل ۴/۴۷ Log10CFU/g پایین‌تر بود اما در طول دوره با سرعت بیشتری در مقایسه با باکتری‌های کل افزایش یافت به‌گونه‌ای که در نمونه شاهد در روز ۴ نگهداری میزان بار باکتریایی سرمادوست به بیش از حد مجاز مصرف رسید. این نتایج با نتایج سایر محققان پیرامون بار باکتری‌های سرمادوست در سایر گونه‌های طی نگهداری در سرما مطابقت داشت (Duan, et al., 2010; Mohan, et al., 2012; Abdollahi, et al., 2012). این امر نشان‌دهنده این است که فلور باکتریایی غالب نمونه‌ها را

روغن در فیلم‌های بر پایه پروتئین یا پلی‌ساکاریدی فعل و انفعالات بین زنجیره‌ها را به تاخیر می‌اندازد و انعطاف پذیری در فیلم را فراهم می‌کند (Limpisophon, et al., 2010). به‌طور کلی ترکیبات گیاهی اعم از اسانس رفتار متفاوتی را در ترکیب با بیوپلیمر کیتوزان در بررسی خواص مکانیکی از خود نشان داده‌اند. در نتایج حاصل از تحقیقاتی گزارش شده است که اسانس دارچین موجب افزایش مقاومت کششی و کاهش درصد طول فیلم‌های کیتوزانی شد که در واقع به نوعی با اثر اسانس بر کاهش مقاومت کششی فیلم‌ها در این تحقیق مطابقت دارد (Ojagh, et al., 2010; Sánchez-González, et al., 2011). در تحقیق Li و Peng (۲۰۱۴) درصد افزایش طول با افزودن اسانس کاهش یافت.

نتایج مشابه در تحقیق Phillips و Fisher (۲۰۰۶) در مورد اسانس لیمو و Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) در مورد اسانس دارچین گزارش شد. بیش‌تر مطالعات روی اثر بازدارندگی اسانس‌های روغنی روی باکتری‌های عامل فساد غذایی و باکتری‌های بیماری‌زای زابوده که باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی نسبت به اسانس‌ها اندکی حساس‌ترند (Burt, 2004). این تفاوت به حضور غشای خارجی نسبتاً نشت ناپذیر دیواره سلولی باکتری گرم منفی مربوط می‌شود که انتشار ترکیبات آب‌گریز را از طریق پوشش لیپوپلی‌ساکاریدی خود، محدود می‌کند (Burt, 2004; Sánchez-González, et al., 2011). با توجه به تنوعی که در ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها وجود دارد، بنابراین خواص ضد میکروبی آن‌ها نمی‌تواند به یک مکانیسم مشخص و خاص مربوط باشد. یک خصوصیت بارز اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها آب‌گریزی آن‌ها می‌باشد که آن‌ها را قادر می‌سازد ساختارها را تخریب نموده و نفوذپذیری آن‌ها را افزایش دهد. ساختار شیمیایی ترکیب اسانس بر مکانیسم دقیق عمل اسانس و فعالیت ضدباکتریایی آن اثر می‌گذارد (Burt, 2004). فعالیت ضدباکتریایی اسانس مریم‌گلی عمدتاً مربوط به حضور ترکیباتی همانند ۸۰۱- سینئول ۱،۸ و بورنه‌اول، توژون و کامفور می‌باشد (Delamare, et al., 2007).

ماندگاری ماهی قزل آلا را در مقایسه با تیمار بدون پوشش افزایش دهد. این افزایش ماندگاری را می توان به خواص ممانعتی پوشش ها در برابر اکسیژن، خواص ضد میکروبی و ضد اکسیداسیونی اسانس و کیتوزان نسبت داد که از طریق کاهش اکسیداسیون چربی و نیز ممانعت از رشد باکتری ها به طور فزاینده ای موجب حفظ خواص نمونه گردیده است. افزایش هیدرولیز چربی تجمع اسیدهای چرب آزاد را در پی دارد که روی ثبات پروتئین ها تاثیر دارد و از طریق واکنش با پروتئین ها موجب تخریب بافت می شود (Rodríguez, et al., 2008). رشد میکروبی در فیله ها به دلیل تخریب پروتئین باعث ایجاد بوی نامطبوع و فرار می شود که فساد و بوی نامطبوع را در فیله ها سبب می شود. نتایج مشابهی پیرامون حفظ خواص حسی ماهی توسط پوشش های خوراکی حاوی ترکیبات ضد میکروب و اسانس ها توسط سایر محققان گزارش گردید (Fan, et al., 2009; Ojagh, et al., 2010; Abdollahi, et al., 2012).

نتیجه گیری و توصیه ترویجی

فیلم های حاوی ۱/۵ درصد اسانس مریم گلی به دلیل فعالیت بازدارندگی بیش تر و بهبود برخی خواص فیلم، به عنوان پوشش ضد میکروبی برای نگهداری فیله ماهی قزل آلا ی رنگین کمان به مدت ۱۶ روز در یخچال مورد استفاده قرار گرفتند. سنجش باکتری های عامل فساد و بار باکتریایی کل نشان داد، فیلم نانوکامپوزیت حاوی اسانس ۱/۵٪ مریم گلی با به تاخیر انداختن فساد میکروبی قادر به افزایش عمر ماندگاری فیله ماهی قزل آلا ی رنگین کمان است و همچنین به عنوان یک پوشش باعث کاهش رشد باکتری های عامل فساد در ماهی شد. به همین دلیل در کارخانجات بسته بندی آبزیان و سایر فرآورده های غذایی قابلیت بررسی و کاربرد خواهد داشت.

باقری، م، گل پرور، ا.ر، شیرانی راد، ا.ح، زینلی، ح. و جعفرپور، م، ۱۳۸۷. بررسی اثرات تاریخ کاشت و مقادیر مختلف کود نیتروژن بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه

باکتری های سرمادوست و مقاوم به سرما تشکیل می دهند. بار باکتریایی نمونه ی پوشش داده شده با نانوکامپوزیت حاوی اسانس تا روز ۸ نگهداری در حد مجاز مصرف بود. مهار رشد باکتریایی به وسیله پوشش نانوکامپوزیت حاوی اسانس را می توان به اثر پوششی آن و ممانعت از نفوذ اکسیژن نسبت داد. نتایج مشابهی در مورد اثر پوشش های زیست تخریب پذیر بر باکتری های گونه های مختلف ماهی طی نگهداری توسط سایر محققان گزارش شده است (Fan, et al., 2009; Ojagh, et al., 2010; Abdollahi, et al., 2012). اثر ضد میکروبی کیتوزان نیز به اثبات رسیده است، یک مکانیزم آن ظاهرا به برهم کنش بار مثبت مولکول های کیتوزان و بار منفی غشای سلول باکتری ها مرتبط است (No, et al., 2007) که در نهایت موجب گسیختگی غشای سلول باکتری و خروج مواد ضروری سلول و در نهایت مرگ آن می شود (Jeon, et al., 2002). کیتوزان هم چنین به عنوان عامل شلاته کننده عمل کرده و به صورت انتخابی با فلزات نادر پیوند ایجاد کرده و از این رو از تولید سموم و رشد میکروبی جلوگیری می کند (Rabea, et al., 2003)

نتایج ارزیابی حسی مربوط به بررسی چهار ویژگی بافت، رنگ، بو و پذیرش کلی نشان داد (شکل ۴) که ابتدا تمامی تیمارها ظاهری قابل قبول و شفاف داشتند و بوی اسانس از نظر هیچیک از ارزیابان تند و نامطبوع ارزیابی نشد. این موضوع نشان دهنده ی این است که به کارگیری اسانس در قالب فیلم و پوشش خوراکی زیست تخریب پذیر اثر نامطلوبی بر خواص حسی محصول ندارد. با گذشت زمان ویژگی های حسی تیمار شاهد بعد از ۴ روز به سرعت کاهش یافت و به امتیاز کم تر از ۴ که حد قابل قبول برای مصرف انسانی نیست رسید (Fan, et al., 2008). در صورتی که ویژگی های حسی تیمار پوشش داده شده با نانوکامپوزیت حاوی اسانس ۱/۵ درصد مریم گلی بعد از ۸ روز به امتیاز پایین تر از ۴ رسید ولی امتیاز مربوط به بافت تیمار پوشش داده شده تا پایان مدت زمان نگهداری، ۴ بود. در مجموع می توان گفت که نتایج ارزیابی حسی نشان داد که نانوکامپوزیت حاوی اسانس توانست تقریبا تا ۸ روز

- Azeredo, H., 2009. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, 42: 1240-1253.
- Bosquez-Molina, E., Tomás, S.A. and Rodríguez-Huezo, M.E., 2010. Influence of CaCl on the water vapor permeability and the surface morphology of mesquite gum based edible films. *LWT-Food Science and Technology*, 43: 1419-1425.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International journal of food microbiology*, 94: 223-253.
- Chen, C.H. and Lai, L.S., 2008. Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsoa leaf gum films in the presence of plasticizer. *Food Hydrocolloids*, 22: 1584-1595.
- Cole, M.F. and Bergeson, L., 2006. Regulatory report FDA, Regulation of food packaging produced using nano technology. *Food safety magazine*.
- De Castro, F.A.F., Pinheiro Sant'Ana, H.M., Campos, F.M., Costa, N.M.B., Silva, M.T.C., Salaro, A.L. and Franceschini, S.D.C.C., 2007. Fatty acid composition of three freshwater fishes under different storage and cooking processes. *Food chemistry*, 103: 1080-1090.
- Delamare, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L. and Echeverrigaray, S., 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food chemistry*, 100: 603-608.
- Duan, J., Jiang, Y., Cherian, G. and Zhao, Y., 2010. Effect of combined chitosan-krill oil coating and modified atmosphere packaging on the storability of cold-stored lingcod
- دارویی بابونه آلمانی در شرایط اصفهان. *مجله پژوهش در علوم کشاورزی*. دوره ۴. شماره ۱. صفحات ۲۹-۴۰.
- رسولی، ا. و رضایی، م.ب.، ۱۳۷۹. بررسی فعالیت ضد میکروبی و ترکیبات شیمیایی اسانس گل‌های اسطوخدوس و مریم گلی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان*. دوره ۷. شماره ۴. صفحات ۱۷۳-۱۸۱.
- Abdollahi, M., Rezaei, M. and Farzi, G., 2012. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111: 343-350.
- Adame, D. and Beall G.W., 2009. Direct measurement of the constrained polymer region in polyamide/clay nanocomposites and the implications for gas diffusion. *Applied Clay Science*, 42: 545-552.
- Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T. and Agustini, T.W., 2012. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids*, 28: 189-199.
- Anonymous., 1991. A Focus on Gum building in texture, stability and emulsification are just some of ways in which gums did product development. *Food technology*, 45: 122-123.
- Arora, A. and Padua, G.W., 2010. Review: nanocomposites in food packaging. *Journal of Food science*, 75: 43-49.
- Arrieta, J., Reyes, B., Calzada, F., Cedillo-Rivera, R. and Navarrete, A., 2001. Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianun*. *Fitoterapia*, 72: 295-297.
- ASTM., 2002. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Annual book of ASTM Standards. Designation D882-02. Philadelphia: American Society for Testing Materials.

- cinnamon essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33: 727-743.
- Jeon, Y.J., Kamil, J.Y. and Shahidi, F., 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5167-5178.
- Kuorwel, K.K., Cran, M.J., Sonneveld, K., Miltz, J. and Bigger, S.W., 2011. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. *Journal of food science*, 76: 164-177.
- Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P. and Buonocore, G.G., 2010. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82: 291-298.
- Limpisophon, K., Tanaka, M. and Osako, K., 2010. Characterisation of gelatin–fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. *Food Chemistry*, 122: 1095-1101.
- Mohan, C.O., Ravishankar, C.N., Lalitha, K.V. and Srinivasa Gopal, T.K., 2012. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. *Food Hydrocolloids*, 26: 167-174.
- Nollet, L.M. and Toldrá, F., 2010. *Handbook of seafood and seafood products analysis*. CRC Press. 928 p.
- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H., 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122: 161-166.
- Pelissari, F.M., Grossmann, M.V.E., Yamashita, F. and Pineda, E.A.G., 2009. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil (*Ophiodon elongates*) fillets. *Food Chemistry*, 122: 1035-1042.
- Fabra, M.J., Talens, P. and Chiralt, A., 2008. Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85: 393-400.
- Fan, W., Chi, Y. and Zhang, S., 2008. The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice. *Food chemistry*, 108: 148-153.
- Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y. and Chi, Y., 2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, 115: 66-70.
- Fisher, K. and Phillips, C., 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1232-1240.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P., 2010. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27: 889-896.
- Holley, R.A. and Patel, D., 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22: 273-292.
- Hosseini, M.H., Razavi, S.H. and Mousavi, M.A., 2009. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and

- Seydim, A.C. and Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food research international*, 39: 639-644.
- Wang, L., Dong, Y., Men, H., Tong, J. and Zhou, J., 2013. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food hydrocolloids*, 32: 35-41.
- Weiping, W., Phillips, G.O. and Williams, P.A., 2000. *Tragacanth and karaya*. Handbook of hydrocolloids, pp: 231-246.
- Yan, Q., Zhang, J., Dong, H., Hou, H. and Guo, P., 2013. Properties and antimicrobial activities of starch–sodium alginate composite films incorporated with sodium dehydroacetate or rosemary extract. *Journal of Applied Polymer Science*, 127: 1951-1958.
- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 7499-7504.
- Peng, Y. and Li, Y., 2014. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36: 287-293.
- Rabea, E.I., Mohamed, E.T.B., Stevens, C.V., Smagghe, G. and Steurbaut, W., 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4: 1457-1465.
- Rehbein, H. and Oehlenschläger, J., 2009. *Fishery Products: Quality, Safety and Authenticity*: Wiley-Blackwell.
- Rhim, J.W. and Ng, P.K., 2007. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47: 411-433.
- Rodríguez, M., Oses, J., Ziani, K. and Mate, J.I., 2006. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39: 840-846.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. and Cháfer, M., 2011. Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, 3: 1-16.
- Sathivel, S., Liu, Q., Huang, J. and Prinyawiwatkul, W., 2007. The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 83: 366-373.
- Schirmer, B.C., Heiberg, R., Eie, T., Møretrø, T., Maugesten, T., Carlehøg, M. and Langsrud, S., 2009. A novel packaging method with a dissolving CO₂ headspace combined with organic acids prolongs the shelf life of fresh salmon. *International journal of food microbiology*, 133: 154-160.

Investigation of nanocomposite film quality incorporated with *Salvia* essential oils (*Salvia officinalis L.*) as a preservative coating on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet during refrigerated storage

Ojagh M.^{1*}; Shariatmadari F.¹; Kordjazi M.¹; Abdollahi M.²

¹Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

²Department of Biology and Biological Engineering-Food and Nutrition Science, Chalmers University of Technology, Gothenburg SE 412 96, Sweden

Abstract

In order to improve the physical and mechanical properties, reduce permeability to water vapor, antimicrobial properties and increase hydrophobicity, *Salvia officinalis* essential oils were combined with the chitosan-tragacanth-clay film. The combination of nanocomposite with three levels of *S. officinalis* essential oil (1, 1.5 and 2%) in order to choose the best coverage for using in the maintenance of rainbow trout were studied. The best properties of film (Mechanical and antibacterial properties and water absorption) were showed in 1.5 % *S. officinalis* essential oil in combination with nanocomposite. Samples coated with this bionanocomposite, showed the lowest amount of total bacterial load and psychrotrophic bacteria when compared to the control during 16 days storage period ($p < 0.05$). According to the results, the combination of chitosan-tragacanth-clay with *S. officinalis* essential oil, can improve the physical and mechanical properties of chitosan in the film, moreover it can improve its ability to seafood preservation like trout.

Keywords: Chitosan, Tragacanth, Nanoclay, *Salvia officinalis* essential oil, Trout.

*Corresponding author: mahdi_ojagh@yahoo.com