فصل اول

مقدمه و کلیات

1-1 مقدمه و کلیات

ماهی و نرم تنان منابع مهم پروتئین برای مصارف انسانی هستند. همچنین حاوی مقادیر بالای ویتامین های محلول در آب و محلول در چربی، مواد معدنی، اسیدهای چرب غیر اشباع[1] امگا-3 می باشند. بدن انسان توانایی ساخت اسیدهای چرب چندغیراشباع امگا-3 و امگا-6 را ندارد و اینها باید از جیره غذایی (به ویژه با مصرف ماهی) تامین شوند. اسیدهای چرب امگا-3 و به ویژه ایکوزاپنتانوئیک اسید[2] و دوکوزاهگزانوئیک اسید[3] در ماهیان یافت شده و در سلامتی انسان نقش بسیار مهمی دارند. اسیدهای امگا-3 ماهی می توانند باعث کاهش تری گلیسریدهای خون، تنظیم ضربان قلب، تنظیم فشار خون و مانع لخته شدن خون گردند. انجمن قلب آمریکا مصرف حداقل دو بار در هفته ماهیان چرب را به عنوان یک روش سالم و موثر برای داشتن قلب سالم و برخوردار شدن از مزایای اسیدهای چرب امگا-3 توصیه می کند(de Castro و همکاران،2007؛ Haliloglu و همکاران، 2004؛ Alasalvar و همکاران، 2002؛ Özogul و همکاران، 2005؛ Ibrahim Sallam، 2007). از طرفی فرآورده های دریایی در مقابل فساد کیفی ناشی از اکسیداسیون اسیدهای چرب چند غیر اشباع حساس هستند که البته حضور غلظت های بالای ترکیبات هماتین و یون های فلزی عضله ماهی موجب تسریع آن نیز می شود (Jeon و همکاران، 2002). این امر امکان استفاده گسترده و طولانی مدت ماهیان را محدود می سازد بنابراین استفاده از روش های مناسب و ایجاد تمهیدات لازم در هنگام حمل و نگهداری موقت ماهیان ضرورت می یابد.

---

[1] PUFA
[2] EPA
[3] DHA

منظور از فساد ماهی، فساد شیمیایی (اتولیز) و میکروبی (آلودگی با میکروارگانیزم ها و رشد آنها) است. در اثر فساد شیمیایی و میکروبی ارزش غذایی (از دست رفتن اسیدهای چرب ضروری و ویتامین های محلول در چربی) و خواص اولیه پروتئین و کیفیت ماهی کاهش یافته و طعم نامطلوب و ترکیبات نامطلوب و بعضاً سمی در آن شکل می گیرد. در فساد ماهی بیش از همه چربی ماهی (تری آسیل گلیسرول ها و فسفو لیپید) به دلیل داشتن مقدار قابل توجهی از اسید های چرب با چند پیوند دوگانه[1] دچار آسیب گردیده و ترکیبات فرار حاصل از شکسته شدن، واکنش اکسیداسیون و واکنش هیدرولتیک چربی ها (هیدرو پراکسیدها، آلدئیدها و کتون ها و...) موجب ایجاد طعم نامطلوب[2] و غیر قابل مصرف شدن ماهی می گردند (Jeon و همکاران، 2002؛Tall و Harris، 1995).

اتولیز ماهی منجر به تشکیل پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد (مواد مغذی مناسب برای رشد میکروبی و تولید آمین های بیوژن) می شود که این ترکیبات به عنوان عوامل اثر گذار بر ایمنی (سلامتی) گوشت ماهی شناخته شده اند (Jeon و همکاران، 2002).

در طی سالیان گذشته اقداماتی در جلوگیری و یا به تعویق انداختن فساد گزارش شده است که می توان به کنترل درجه حرارت و کاهش آن، کنترل های لازم در محل فرآوری، بسته بندی تحت خلاء[3]، بسته بندی در اتمسفر اصلاح شده[4] و همچنین افزودن آنتی اکسیدان اشاره نمود(Tall and Harris, 1995).

هر چند نگهداری ماهی در سرما و عمل انجماد روش مناسبی برای نگهداری ماهیان است اما همیشه به طور کامل از فساد کیفی محصولات دریایی جلوگیری نمی کند و ممکن است واکنش هایی که منجر به تغییرات اکسیداسیونی و آنزیمی و فساد پروتئین می شوند، تحت شرایط نگهداری در سرما و انجماد نیز ادامه یابند (Sathivel و همکاران، 2007؛ Jeon و همکاران، 2002). از اینرو نگهدارنده های مصنوعی مانند هیدروکسی آنیزول بوتیله[5] و هیدروکسی تولوئن بوتیله[6]، عوامل کلاته کننده و ترکیبات ضد میکروبی ممکن است جهت بهبود تازگی مواد غذایی به آنها اضافه شوند (Sathivel و همکاران، 2007؛ Jeon و همکاران، 2002). با این وجود مصرف کنندگان تمایل بیشتری برای استفاده از نگهدارنده های طبیعی به جای نگهدارنده های مصنوعی نشان می دهند و این امر باعث شده تا

[1] Poly-Unsaturated Fatty Acid
[2] off-flavour
[3] Vacuum packaging
[4] Modified atmosphere packaping
[5] BHA
[6] BHT

مطالعات بیشتری در این زمینه صورت پذیرد. به دلیل افزایش تقاضای مصرف کنندگان به استفاده از نگهدارنده های طبیعی، امروزه تحقیقات گسترده ای جهت شناسایی و جایگزینی ترکیبات آنتی اکسیدان و آنتی باکتریال با منشاء گیاهی در حال انجام است. برای مثال فعالیت آنتی باکتریایی عصاره ها و اسانس ها[1] در شرایط آزمایشگاهی در برابر باکتری های بیماری زا با منشاء غذایی مانند *E. coli O157:H7*، *L. monocytogenes* ، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhimurium*، *Vibrio parahaemolyticus* مطالعه شده است(Shan و همکاران، 2007؛ Zhang و همکاران، 2008؛ Elgayyar و همکاران، 2001؛ Juven وهمکاران، 1994؛ Mahrour و همکاران، 1998؛ Koga و همکاران، 1999). همچنین اثر بازدارنده اسانس ها در برابر باکتری های عامل فساد گوشت و ماهی در شرایط آزمایشگاهی مانند *Pseudomonas fluorescens*، *Serratia liquefaciens*، *Brochothrix thermosphacta*، *Lactobacillus curvatus*، *Lactobacillus sake*، *Lactobacillus plantarum* مطالعه شده است(Ouattara و همکاران، 1997). پاره ای از مطالعات نیز به استفاده از اسانس ها در نگهداری و بالا بردن ماندگاری ماهی پرداخته اند(Harpaz و همکاران، 2003). اسانس های گیاهی جزء مهمترین منابع آنتی اکسیدان های طبیعی شناخته شده اند. اسانس مرزنگوش، رزماری، آویشن، مریم گلی، ریحان، زردچوبه، زنجبیل، سیر، جوز هندی، میخک، جوز بویا، مرزه، رازیانه، دارچین و غیره به تنهایی و یا در ترکیب با روش های دیگر نگهداری به منظور بهبود خواص حسی و افزایش ماندگاری مواد غذایی استفاده شده اند(Ahn و همکاران، 2002؛ Botsogloua و همکاران، 2002؛ Braganolo و همکاران، 2007؛ Bruni و همکاران، 2005؛ Coronadoa و همکاران، 2002، Estevez و همکاران، 2007؛ Estevez و همکاران، 2004؛ Gachkarو همکاران، 2006؛ Georgantelis و همکاران، 2007؛ Goulas و Kontominas و همکاران، 2007؛ Jayathilakan و همکاران، 2007؛ Kikuzaki و همکاران، 1993؛ Kulisic و همکاران، 2004؛ McCarthy و همکاران، 2001؛ Milos و همکاران، 2000؛ Politeo و همکاران، 2000؛ Ruberto و Baratta، 2000؛ Sebranek و همکاران، 2005؛ Singh و همکاران، 2005؛ Tepe و همکاران، 2005a؛ Tepe و همکاران، 2005b؛ Tomaino و همکاران، 2005؛ Yu و همکاران، 2002؛ Du و Li، 2008). اسانس دارچین توسط محققین زیادی به عنوان منبع مناسب از ترکیبات ضد قارچی و باکتریایی شناخته شده است(Ranasinghe و همکاران، 2002؛ Alzoreky و Nakahara، 2003؛ Oussalah و همکاران، 2007؛ Gurib-Fakim، 2006). Matan و همکاران

[1] essential oils

(2006) نشان داده اند که ترکیب اسانس دارچین قادر است که از رشد میکروارگانیزم‌های اصلی فاسد کننده ی غذاهای با رطوبت متوسط پیشگیری کند.

از اینرو می توان از اسانس های مختلف در نگهداری آبزیان و فرآورده های دریایی نیز بهره جست. با این وجود کاربرد مستقیم مواد آنتی باکتریال بر روی مواد غذایی اثرات سودمند آن را به دلیل خنثی شدن و یا انتشار سریع آن به داخل ماده غذایی محدود می سازد(Ouattara و همکاران، 2001). امروزه روش های جدیدی توسعه یافته که در آن ترکیبات ضد باکتریایی می توانند به داخل پوشش ها و یا روکش های[1] خوراکی افزوده شوند تا غلظت های بالای ماده نگهدارنده را روی سطح ماده غذایی برای مدت طولانی تری حفظ کنند. به دلیل نگرانی های زیست محیطی، پوشش های خوراکی تهیه شده از پلی ساکاریدها، پروتئین ها و لیپیدها به عنوان حامل مواد آنتی اکسیدان و ضد باکتریایی مختلف استفاده می شوند و از آنها می توان برای پوشش فیله های ماهی جهت جلوگیری از تغییرات کیفی در طی نگهداری استفاده نمود (Sathivel و همکاران، 2007؛ Ouattara و همکاران، 2001). مطالعاتی نیز جهت تولید پوشش ها و روکش های ضد باکتریایی از کیتوزان صورت پذیرفته که غالباً از ترکیب اسانس های گیاهی جهت تقویت پاره ای از خواص کیتوزان استفاده شد (Zivanivic و همکاران، 2005؛ Pranoto و همکاران، 2005).

کیتوزان[β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glocopyranasose] به عنوان بیوپلیمری با کاربرد وسیع در صنایع غذایی شناخته شده است. در واقع کیتوزان فراوان ترین پلیمر طبیعی پس از سلولز است. کیتوزان از کیتین موجود در اسکلت خارجی بندپایان مانند حشرات، خرچنگ ها، میگوها، لابسترها و و دیواره سلولی نوع خاصی از جلبک ها، تولید می شود (Sathivel و همکاران، 2007؛Shahidi و همکاران، 1999).

اثرات ضد میکروبی، ضد سرطانی و کاهندگی کلسترول کیتوزان به اثبات رسیده است (No و همکاران، 2006؛ No و همکاران، 2003؛ Sagoo و همکاران، 2002). استفاده از کیتوزان در مواد غذایی به ویژه به علل زیست سازگاری بالا[2] و غیر سمی بودن، تجزیه زیستی و بی طعم بودن، به عنوان یک عامل عایق، جاذب سطحی[3] و شفاف کننده[4] و فیبر رژیمی رو به افزایش می باشد. در سال 1992 اداره بهداشت ژاپن، کیتین و مشتقاتش را به عنوان اجزای تشکیل دهنده مواد غذایی تصویب کرد (Sathivel و همکاران، 2007؛ No و همکاران، 2007؛ Jeon و همکاران، 2002). در مولکول

[1] film
[2] biocompatibility
[3] adsorbent aids
[4] clarifying agent

کیتوزان تعداد زیادی گروه های آمین و هیدروکسیل وجود دارد. این ساختار منجر به توانایی بالقوه کیتوزان در تشکیل کمپکس های قوی با فلزات می شود (Wang و همکاران، 2003). توانایی کیتوزان در اتصال به یونهای فلزی مانند مس، کروم، روی، وانادیوم و آهن به اثبات رسیده است (Jeon و همکاران، 2002).

کیتوزان به دلیل خواص تشکیل روکش و خواص منحصر به فرد افزایش ویسکوزیته به محض آبگیری، قابلیت استفاده در بسته بندی مواد غذایی به ویژه به عنوان پوشش و یا روکش خوراکی را دارا می باشد. برای روکش های کیتوزان تعدادی از خواص کاربردی شامل خواص آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، نفوذ ناپذیری در برابر عبور اکسیژن گزارش شده است (Sathivel و همکاران، 2007). به علاوه روکش های کیتوزان سخت و با دوام ولی انعطاف پذیر و مقاوم در برابر پاره شدن هستند. بیشتر خواص مکانیکی روکش های کیتوزان قابل مقایسه با بیشتر پلیمر های تجاری با مقاومت متوسط[1] می باشند (Jeon و همکاران، 2002).

در هر حال استفاده از روکش های بیوپلیمری با خواص ترکیبی شان به دلیل حساسیت ذاتی به آب و مقاومت و سختی نسبتا کم به ویژه در محیط های مرطوب با محدودیت مواجه شده است (Rhim و همکاران، 2006). مشکل اساسی روکش کیتوزانی حساسیت بالای آن به رطوبت است و بنابراین ممکن است برای استفاده در زمانی که در تماس مستقیم با غذا است و یا به طور مستقیم دستکاری می شود، مناسب نباشد (No و همکاران، 2007؛ Rhim و همکاران، 2006). بیشتر مطالعات تحقیقی به منظور بهبود خواص فیزیکی روکش های بیوپلیمری بر روی کاهش ضریب آب دوستی و بهبود خواص مکانیکی آن متمرکز شده است. ابزارهای فیزیکی و شیمیایی متعدد جهت اصلاح و بهبود خواص فیلم های بیوپلیمری مورد آزمایش قرار گرفته است (Rhim و همکاران، 2006). از جمله راهکارهای مناسب به منظور بهبود خواص آبگریزی فیلم های کیتوزانی استفاده از برخی اسانس های گیاهی مثل اسانس دارچین می باشد (Hosseini و همکاران، 2009). با این وجود تحقیقات بیشتری نیاز است تا روکش های کیتوزانی ضد میکروبی با حساسیت کمتر به رطوبت تولید شوند.

افزودنی های مختلفی جهت تغییر دادن نفوذ پذیری روکش های کیتوزان مورد آزمون قرار گرفته اند که می توان از اسانس ها نام برد که نه تنها خواص ضد میکروبی روکش را افزایش داده اند بلکه همچنین نفوذپذیری به بخار آب را نیز کاهش داده و در نهایت اکسیداسیون چربی محصولی را که روکش در آن استفاده شده است را کم کرده اند (Yanishlieva و همکاران 1999). تعدادی از

[1] medium-strength

ترکیبات شیمیایی مهم اسانس ها شامل: الکل ها، استرها، اترها، فنول ها و ترپن ها می باشند. گرچه هر نوع اسانس بیش از 100 ترکیب است، معمولاً تنها تعداد کمی از آنها غالب هستند مثلاً بیش از 90 درصد اسانس انیسون را آنتول[1] تشکیل می دهد (Zivanovic و همکاران، 2005). به طور کلی فنول ها و ترپن ها عوامل اصلی اثرات ضد باکتریایی اسانس ها هستند. پاره ای از مطالعات به رابطه خوب میان حضور مونو ترپن ها[2]، اوجنول[3]، سینامالدهید[4]، کارواکرول[5] و تیمول[6] و فعالیت ضد باکتریایی بالا گزارش نموده اند. اسانس های گیاهی مانند اسانس ریحان، زیره سیاه، میخک، دارچین، مرزنجوش، اکلیل کوهی و آویشن و غیره فعالیت ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی بالایی دارند (Zivanovic و همکاران، 2005؛ Du و Li، 2008). روغن پوست دارچین غنی از سینامالدهید است. علاوه براین بتاکایوفیلین[7]، لینالول[8] و ترپن های دیگری نیز دارد (Ranasinghe و همکاران، 2002). از طرفی گزارش شده که اسانس های گیاهی مانند دارچین در بهبود خواص آبگریزی روکش های کیتوزانی می توانند موثر باشند (Hosseini و همکاران، 2009). در تحقیق حاضر ضمن تولید پوشش های مقاوم به رطوبت با خواص آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی بالا از ترکیب کیتوزان و اسانس دارچین، در نگهداری ماهی قزل آلای رنگین کمان در شرایط نگهداری در یخچال و انجماد استفاده شد تا محصولی با کیفیت بالاتر و ایمن تر بتوان تولید نمود.

لذا با عنایت به مجموعه مطالب فوق، اهداف، سوالات و فرضیه های زیر برای تحقیق حاضر متصور شد:

اهداف تحقیق:

1- بررسی تولید روکش کیتوزانی با خواص آبگریزی بالا و کاهش حساسیت آن در مقابل رطوبت با کمک اسانس دارچین و تعیین خواص مکانیکی روکش زیستی تولیدی

2- مشخص نمودن اثر ضد میکروبی روکش کیتوزان و روکش کیتوزان غنی شده با دارچین در برابر باکتری های *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas flouorescens*، *Lactobacillus plantarum*، در شرایط آزمایشگاهی

---

[1] anethol
[2] monotropens
[3] eugenol
[4] cinamaldehyde
[5] carvacrol
[6] thymol
[7] β-caryophyllene
[8] linalool

3- بررسی اثر روکش کیتوزانی غنی شده با دارچین بر تعداد باکتری های کل[1]، تعداد باکتری های اسید لاکتیک[2]، تعداد اینتروباکترها[3] و تعداد باکتری های سرما دوست[4] فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان

4- بررسی توانایی روکش کیتوزانی غنی شده با دارچین در کاهش فساد اکسیداسیونی فیله ماهی قزل آلا به واسطه فعالیت آنتی اکسیدانی و نفوذناپذیری در برابر اکسیژن

سولات تحقیق:

1- اسانس دارچین تا چه میزان توانایی کاهش آبدوستی روکش کیتوزانی را دارد؟

2- توانایی روکش کیتوزانی غنی شده با اسانس دارچین در کاهش فعالیت باکتری *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas flouorescens*، *Lactobacillus plantarum* چگونه است؟

3- اثر بازدارندگی روکش کیتوزانی غنی شده با اسانس دارچین بر تعداد باکتری های کل، تعداد باکتری های اسید لاکتیک، تعداد اینتروباکترها و تعداد باکتری های سرما دوست فیله ماهی قزل آلا چگونه است؟

4- توانایی روکش کیتوزانی غنی شده با اسانس دارچین در کاهش فساد اکسیداسیونی فیله ماهی قزل آلا چگونه است؟

فرضیه‌ها / پیش فرض‌ها:

1- اسانس دارچین به شکل معنی داری کاهش آبدوستی و حساسیت به رطوبت را در روکش کیتوزانی ایجاد خواهد نمود.

2- روکش کیتوزانی غنی شده با دارچین به شکل معنی داری موجب کاهش فعالیت باکتری های *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas flouorescens*، *Lactobacillus plantarum* خواهد شد.

[1] Total bacterial count
[2] Lactic acid bacteria
[3] Entrobacteria
[4] Psychrophilic count

3- اثر بازدارندگی روکش کیتوزانی غنی شده با اسانس دارچین بر تعداد باکتری های کل، تعداد باکتری های اسید لاکتیک، تعداد اینتروباکترها و تعداد باکتری های سرما دوست فیله ماهی قزل آلا در نمونه های تیمار شده نسبت به شاهد معنی دار است.

4- توانایی روکش کیتوزانی غنی شده با اسانس دارچین در کاهش فساد اکسیداسیونی فیله ماهی قزل آلا معنی دار است.

فصل دوم

مروری بر منابع

2-1 مروری بر مطالعات انجام شده

در سال‌های اخیر، موارد زیادی از فساد مواد غذایی و بیماری‌های با منشاء غذایی از میکروارگانیزم ها در سراسر جهان گزارش شده است(Mead و همکاران، 1999؛ Shan و همکاران، 2007). تلاش‌های زیادی مانند استفاده از مواد شیمیایی مصنوعی جهت کنترل رشد میکروبی و کاهش شیوع مسمومیت‌های غذایی و فساد صورت پذیرفته است. در هرحال، به دلیل اثرات سوء این ترکیبات مصرف کنندگان نگران بوده و لذا نیاز به مواد ایمن‌تر برای جلوگیری و کنترل میکروارگانیزم‌های بیماری زای مواد غذایی وجود دارد(Shan و همکاران، 2007a). افزایش مقاومت برخی میکروب‌های بیماری‌زای مواد غذایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از دیگر دغدغه ها می باشد(Meng و همکاران، 1998). لذا گرایش زیادی جهت استفاده از انواع جدید ترکیبات ضد میکروبی طبیعی مانند عصاره ی ادویه ها و گیاهان برای نگهداری مواد غذایی وجود دارد. تعدادی از ادویه ها و ترکیبات گیاهی که امروزه استفاده می شوند به دلیل فعالیت ضدمیکروبی و اثرات دارویی و نیز کیفیت عطر و طعم ارزشمند هستند. ترکیب عصاره های بیشتر گونه‌های گیاهی در سال‌های اخیر شناسایی شده و تلاش برای شناسایی اجزای زیست فعال آن ها برای مقاصد دارویی مختلف و عمل‌آوری مواد غذایی شتاب گرفته است. فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره های گیاهی، اساس کاربردهای مختلفی مانند نگهداری مواد غذایی خام و فرآوری شده، کاربردهای داروسازی، طب سنتی و درمان طبیعی را تشکیل می دهند(Shan و همکاران، 2007b).

مطالعات گسترده ای فعالیت آنتی باکتریایی عصاره ها و اسانس های گیاهی را بر میکروب های بیماری زا و عامل فساد و نیز خواص آنتی اکسیدانی آنها را بررسی نموده اند که از جمله می توان به چند مطالعه زیر اشاره نمود.

فعالیت ضد باکتریایی عصاره 46 ادویه مورد استفاده در مواد غذایی و نیز گیاهان دارویی در برابر باکتری های با منشاء غذایی شامل، *Bacillus cereus*، *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Salmonella anatum* نشان داد که به طور کلی باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی حساس تر بودند(Shan و همکاران، 2007). در این مطالعه *S. aureus* حساس ترین باکتری و *E. coli* مقاومترین باکتری مورد مطالعه بود. نتایج این مطالعه بیانگر

آن بود که فعالیت آنتی باکتریایی عصاره های مورد استفاده رابطه نزدیکی با ترکیبات فنولی آنها داشت. عصاره متانولی و اتانولی *Punica granatum* در برابر *Bacillus cereus*، *E. coli* و *S. aureus* موثر بوده اند(Negi و Jayaprakasha، 2003؛ Voravothikunchai و Kitpipit، 2005). عصاره و اسانس *Eugenia caryophylata* و *Origanumvulgare* و *Cinnamomum burmannii* خواص بازدارندگی قابل توجهی در برابر *S. aureus*، *E. coli* و *Listeria monocytogenes* نشان دادند(Shan و همکاران، 2007 b). Kokska و همکاران (2002) گزارش نمودند که عصاره های اتانولی *Sanguisorba officinalis* فعالیت آنتی باکتریایی بالایی در برابر *Bacillus cereus* و *E. coli* داشتند. Kim و همکاران (2005) مشاهده نمودند که عصاره *polygonum cuspidatum* به شکل موثری از رشد *Bacillus cereus*، *E. coli* و *S. aureus* جلوگیری می نماید.

فعالیت آنتی باکتریایی اسانس میخک، دارچین، فلفل[1]، رزماری، سیر، فلفل سیاه، مرزنگوش، زیره سبز و آویشن در مقابل شش باکتری عامل فساد گوشت مطالعه شد(ouattara و همکاران، 1997). اسانس میخک، دارچین، فلفل، و رزماری بیشترین فعالیت آنتی باکتریایی را نشان دادند. رقت 1/100 این اسانس ها به خوبی توانست 5 باکتری از 6 باکتری مورد مطالعه را مهار کند. بین اثرات بازدارندگی اسانس ها و حضور اوجنول و سینامالدهید ارتباط مستقیمی مشاهده شد.

فعالیت آنتی باکتریایی، حداقل غلظت بازداری(MIC[2]) و حداقل غلظت کشندگی(MBC[3])عصاره دارچین(cinnamon stick) در مقابل 5 باکتری بیماری زا با منشاء غذایی *B. cereus*، *L. monocytogenes*، *E. coli* و *S. aureus* حاکی از اثر ضد باکتریایی قابل ملاحظه عصاره دارچین بود. در میان باکتری های گرم مثبت *S. aureus* حساس ترین باکتری به عصاره مورد مطالعه بود و *B. cereus* مرحله بعدی قرار داشت. *L. monocytogenes* مقاومترین باکتری بود. در میان باکتری های گرم منفی *S. aureus* حساس تر از *E. coli* بود. به طور کلی باکتری های گرم مثبت حساس تر از باکتری های گرم منفی بودند. غلظت کمتری از عصاره دارچین توانست *B. cereus* را از بین ببرد(MIC: 625 و MBC: 2500 میکروگرم/میلی لیتر)، MIC و MBC عصاره دارچین برای 4 باکتری دیگر بالاتر از 2500 میکروگرم/میلی لیتر به دست آمد(Shan و همکاران،a 2007).

افزایش ماندگاری ماهی پس از صید تحت شرایط مختلف و استفاده از روش های مختلف موضوعی است که مورد توجه محققین قرار گرفته است. استفاده از اسانس آویشن و مرزنگوش در غلظت

---

[1] pimento
[2] Minimum inhibitory concentration
[3] Minimum bactricidal concentration

0/05 درصد (حجمی/حجمی) در طی 33 روز نگهداری در 2–0 درجه سانتیگراد توسط Harpaz و همکاران (2003) در نگهداری و افزایش ماندگاری ماهی سی باس(*Lates calcarifer*) استفاده شد. نتایج ارزیابی حسی و میکروبی نمونه ها نشان داد که هر دو اسانس به شکل قابل ملاحظه ای از فساد نمونه ها جلوگیری نمودند. بطوریکه نمونه های تیمار شده پس از 33 روز نگهداری هنوز جهت مصارف انسانی مناسب بودند.

در مطالعه Du و Li (2008) مشاهده شد که اسانس دارچین[1] در طی فرآیند سرخ کردن گوشت گوساله اثر آنتی اکسیدانی مناسبی داشته و از اکسیداسیون چربی به میزان قابل توجهی جلوگیری نمود. فعالیت ضد میکروبی کیتوزان در برابر دامنه وسیعی از میکروارگانیزم ها مانند قارچ ها و تعدادی از باکتری ها مشاهده شده است(Robea و همکاران، 2003؛ Tsai و همکاران، 2002؛ Simpson و همکاران، 1997). Wang(1992) مشاهده کرد که غلظت های بالایی از کیتوزان (1/5 – 1 درصد) برای غیر فعال سازی کامل *S. aureus* نیاز است. Simpson و همکاران(1997) اثر آنتی باکتریایی غلظت های مختلف کیتوزان را بر کشت های مختلف باکتریایی روی میگوی خام بررسی نمودند و اختلافاتی در درجه حساسیت به کیتوزان باکتری های مختلف مشاهده کردند. بر اساس یافته های آنها غلظت کیتوزان مورد نیاز برای ازبین بردن *B. cereus* ، 0/02 درصد بود درحالیکه *E. coli* و *Proteus vulgaris* در غلظت 0/005 درصد، کمترین رشد را نشان دادند.

با مشخص شدن فعالیت ضد باکتریایی پوشش ها و روکش های کیتوزانی (Pranoto و همکاران،2005؛Zivanovic و همکاران، 2005)، افزودنی های مختلف جهت تقویت خواص ضد باکتریایی روکش ها استفاده شد. Pranoto و همکاران(2005) از اسانس سیر جهت افزایش فعالیت ضد باکتریایی روکش کیتوزانی استفاده نمودند. این مطالعه در برابر باکتری های با منشاء غذایی شامل *B. cereus*، *S. aureus*، *E. coli*، *L. monocytogenes* و *Salmonella typhymurum* انجام شد. نتایج مطالعه این محققین بیانگر اثر ضد باکتریایی بالای روکش تولیدی در غلظت 100 میکروگرم در میلی گرم اسانس سیر در مقابل *B. cereus*، *S. aureus* و *L. monocytogenes* بود. در این سطح غلظت، مقایسه خواص فیزیکی و مکانیکی روکش شاهد و روکش حاوی اسانس سیر نشان داد که اثر منفی بر روی شاخص های بررسی شده ندارد.

خواص ضد میکروبی و فیزیکوشیمیایی روکش های کیتوزانی و روکش های کیتوزانی غنی شده با اسانس های رازیانه، ریحان، گشنیز و مرزگوش در شرایط آزمایشگاهی[2] و روی گوشت فرآوری شده

[1] cassia
[2] in vitro

بررسی شد(Zivanovic و همکاران، 2005). فعالیت آنتی باکتریایی اسانس ها به تنهایی و در ترکیب با کیتوزان تفاوتی نشان نداد. میزان فعالیت ضد باکتریایی اسانس های مورد مطالعه به ترتیب از بالا به پایین شامل مرزنگوش، گشنیز، ریحان و رازیانه بود. نمونه های ژامبون[1] با کیتوزان و کیتوزان حاوی مرزنگوش پوشش شده و در 10 درجه سانتیگراد به مدت 5 روز نگهداری شدند. نمونه های حاوی کیتوزان *L. monocytogenes* را تا 2 logs کاهش دادند درحالیکه روکش های حاوی 1 و 2 درصد مرزنگوش تعداد *L. monocytogenes* را به میزان 3/6 و 4 logs کاهش داد. ضخامت روکش کنترل 89 میکرومتر بود، درحالیکه با افزایش 1 و 2 درصد اسانس مرزنگوش ضخامت روکش به ترتیب تا 220 و 318 میکرومتر افزایش یافت. افزایش مرزنگوش به روکش نفوذ پذیری به بخار آب، نیروی کششی را کاهش داد اما الاستیسیته فیلم را افزایش داد.

روکش های کیتوزانی به تنهایی و در ترکیب با اسانس آویشن، میخک و دارچین از نظر خواص ضد باکتریایی، فیزیکی و مکانیکی مورد مقایسه قرار گرفتند(Hosseini و همکاران، 2009). نتایج آزمون میکروبی بیانگر فعالیت آنتی باکتریایی بالای روکش های حاوی اسانس آویشن بود. افزایش اسانس آویشن و میخک به داخل روکش ها موجب افزایش میزان رطوبت، حلالیت در آب، نفوذپذیری در برابر بخار آب و افزایش طول در لحظه پاره شدن روکش ها شد. درحالیکه افزایش اسانس دارچین به روکش ها باعث افزایش نیروی کششی و کاهش میزان رطوبت و حلالیت در آب روکش ها شد. این محققین بیان داشتند که نیاز به مطالعات بیشتری جهت بهینه نمودن تولید روکش های کیتوزانی حاوی اسانس دارچین با حساسیت کمتر به رطوبت وجود دارد.

به طور کلی فرآورده های غذاهای دریایی به میزان زیادی به فساد کیفی به دلیل اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع حساس هستند. کیفیت غذاهای دریایی به میزان زیادی از اتولیز، آلودگی و رشد میکروارگانیزم ها و کاهش خواص کاربردی پروتئین متاثر می شود(Jeon و همکاران، 2002). استفاده از پوشش ها و روکش های خوراکی در افزایش ماندگاری و بهبود کیفیت مواد غذایی تازه و منجمد روشی است که در طی سالیان اخیر مورد توجه فراوان واقع شده است(Shahidi و همکاران، 1999؛ No وهمکاران، 2007)

علی رغم کاربردهای بالقوه و فراوان کیتوزان، مطالعات پایه ای و اساسی روی پوشش کیتوزانی ماهی و غذاهای دریایی نادر هستند (Jeon و همکاران، 2002؛ Sathivel و همکاران، 2007). از طرفی

[1] bologna

دیگر اثرات کیتوزان به عنوان یک ماده پوششی در ترکیب با نگهدارنده های دیگر کمتر مطالعه شده است.

مقایسه فعالیت ضد باکتریایی کیتوزان و الیگومرهای کیتوزان نشان داده که کیتوزان اثرات ضد باکتریایی بیشتری دارد (Jeon و همکاران،2001). نتایج غوطه وری در محلول کیتوزان (0/1، 0/5 و 1 درصد با وزن های مولکولی 5، 30 و 120 کیلودالتون) گوشت خوک نشان داد ماندگاری گوشت و فساد اکسیداسیونی خوک با فرو بردن در محلول 1 درصد کیتوزان 30 و 120 کیلودالتونی افزایش یافت (Cheong وهمکاران،2001). همچنین نتایج Rao و همکاران(2005) نشان داد اثر کیتوزان(1 درصد در اسید استیک 1 درصد) پرتودهی شده در دوز (4-KGy(Kilo Gray در Cobalt-60 Gamma cell-200 بر فرآورده های گوشتی (مانند کباب گوشت گوسفند و ژامبون)، میزان تیوباربیتوریک اسید[1] کمتری نسبت به نمونه های پرتودهی شده بدون پوشش را برای حداکثر 4 هفته نگهداری در دمای اتاق موجب می شود.

Simpson و همکاران(1997) از کیتوزان در نگهداری میگو استفاده نمودند. آنها میگوی کامل و سر زده را در محلول کیتوزان غوطه ور نموده و سپس برای 20 روز در دمای 7-4 درجه سانتیگراد نگهداری نمودند. کیتوزان اثر ضد باکتریایی بالایی بر میکروارگانیزم های مورد مطالعه در این تحقیق داشت و تشکیل بازهای ازته فرار را کاهش داد.

نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی کیتوزان های با ویسکوزیته های متفاوت (360، 57 و 14 سانتی پوآز با وزن مولکولی متناظر 1800، 960 و 660 کیلو دالتون) در غلظت های (200 ppm، 100 و 50) بر گوشت چرخ شده هرینگ (*Clupea harengus*) در طی نگهداری در 4 درجه سانتی گراد نشان داد، کیتوزان با ویسکوزیته 14 سانتی پوآز موثرترین تیمار در جلوگیری از اکسیداسیون چربی بود (Kamil و همکاران، 2002). به طور مشابه kim و Thomas (2007) مشاهده کردند کیتوزان 30 کیلو دالتونی بیشترین فعالیت فرونشانی در مقایسه با کیتوزان های 90 و 120 کیلودالتونی در نگهداری گوشت سالمون داشت.

Jeon و همکاران(2002) اثر کیتوزان با 3 ویسکوزیته متفاوت 360، 57 و 14 سانتی پوآز با وزن مولکولی متناظر 1800، 960 و 660 کیلودالتون را در افزایش ماندگاری فیله های کاد اطلسی *Gadus morhua* و هرینگ *Clupea harengus* تا پایان 12 روز نگهداری در دمای یخچال(4 درجه سانتی گراد) مطالعه کردند. پوشش کیتوزانی به شکل معنی داری اکسیداسیون چربی، فساد شیمیایی و

[1] Thiobarbituric acid reactive substances

رشد میکرو ارگانیزم ها را در هر دو ماهی در مقایسه با نمونه های غیرپوششی، کاهش داد. به طور مشابه Tsai و همکاران (2002) مشاهده کردند که ماندگاری فیله های سالمون غوطه ور شده در محلول (41/1 کیلودالتونی) کیتوزان (1 درصد در اسید کلریدریک 0/1 نرمال) از 5 روز تا 9 روز افزایش یافت. اثرات کیتوزان به عنوان پوشش خوراکی بر کیفیت فیله های سالمون صورتی پوست زدایی شده (*Oncorhynchus gorbucha*) در طی 3 و 8 ماه نگهداری در انجماد ارزیابی شد. پوشش های کیتوزانی از کاهش رطوبت فیله ها به میزان حدود 50 درصد در مقایسه با فیله های غیر پوششی (شاهد) جلوگیری کرده و در تاخیر اکسیداسیون چربی موثر بوده است. همچنین فیله های پوششی با کیتوزان پس از انجماد زدایی بازده محصول بیشتری نسبت به فیله های غیر پوششی نشان دادند. (Sathivel، 2005؛ Sathivel و همکاران 2007).

اثر ترکیبی پرتودهی با اشعه گاما و پوشش ضد باکتریایی بر ماندگاری میگوی پیش پخته[1] در دمای 4±1 درجه سانتیگراد بررسی شد(Ouattara و همکاران، 2001). پروتئین سویا و آب پنیر همراه با غلظت های مختلف آویشن و ترانس سینامالدهید به عنوان ترکیب پوشش استفاده شدند. نتایج حاکی از اثر سینرژیستی پرتودهی با اشعه گاما و تیمار پوششی در کاهش تعداد باکتری های هوازی و *Pseudomonas putida* بود بطوریکه منجر به افزایش ماندگاری به مدت 12 روز شد.

Fan و همکاران (2009) اثر پوشش کیتوزانی برکیفیت و ماندگاری کپور نقره ای را مورد مطالعه قرار دادند. نمونه های ماهی با محلول 2 درصد کیتوزان تیمار شده و به مدت 30 روز در 3- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. و در فواصل زمانی 5 روزه به مطالعه میکروبی، شیمیایی و ارزیابی حسی نمونه ها پرداختند. نتایج حاکی از کیفیت مناسب نمونه های پوششی با کیتوزان و افزایش ماندگاری این نمونه ها در مقایسه با نمونه شاهد در تمام طول دوره نگهداری بود.

به دلیل تقاضای مصرف کنندگان به مواد غذایی سرد شده تازه و با ماندگاری بالا تحقیقات قابل ملاحظه و جهت داری در استفاده از استراتژی های مختلف نگهداری برای حفظ و طولانی نمودن تازگی انجام شده است تا ایمنی مواد غذایی مانند محصولات شیلاتی را تضمین نمایند. در واقع در طی نگهداری کیفیت ماهی به دلیل فرآیندهای پیچیده فیزیکی، شیمیایی و میکروبی کاهش می یابد. معمولاً واکنش های آنزیمی و شیمیایی عامل اولیه(آغازین) کاهش تازگی هستند، درحالیکه فعالیت میکروبی عامل فساد قابل توجه بوده و لذا تعیین کننده تازگی محصول هستند. مقادیر بالای اسیدهای چرب چند غیر اشباع در چربی ماهیان موجب حساسیت بالای آنها به اکسیداسیون می شود. از طرفی فساد

[1] pre-cooked

اکسیداسیونی یک شاخص ارگانولپتیکی برای رد یا پذیرش ماهی پس از یک دوره طولانی نگهداری می باشد. در چنین شرایطی استفاده از روش های عمل آوری مناسب و تعیین نقاط بحرانی خطر[1]، در تولید، نگهداری، توزیع و فروش مواد غذایی سرد شده[2] ضروری است (Ibrahim Salam، 2007).

لذا با توجه به تقاضای مصرف کنندگان به دسترسی به مواد با کیفیت بالا و نگرانی آنها به دلایل مشکلات ناشی از مصرف نگهدارنده های مصنوعی و نیز نگرانی های زیست محیطی ناشی از تجمع پلیمرهای مصنوعی، ایده استفاده از پوشش های زیست تخریب پذیر با خواص آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی بالا به عنوان جایگزین مناسبی قوت گرفت.

با عنایت به مطالب فوق از ترکیب کیتوزان و اسانس دارچین می توان در ایجاد پوششی با خواص ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی و با حساسیت کمتر به رطوبت استفاده نمود و از طرفی با توجه به حساسیت بالای گوشت ماهیان در مقابل فساد باکتریایی و اکسیداتیو می توان از تکنولوژی تولید پوشش های کیتوزانی غنی شده با اسانس دارچین در پوشش فیله قزل آلای رنگین کمان جهت افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت آن در طی زمان نگهداری در یخچال و انجماد بهره برد تا بتوان محصولی با کیفیت بالاتر به دست مصرف کنندگان رساند.

[1] HACCP
[2] refrigerated

فصل سوم

مواد و روش کار

3-1 مواد و وسایل مورد استفاده

3-1-1 مواد مورد نیاز

3-1-1-1 مواد مصرفی مورد استفاده در تولید روکش های کیتوزانی:

کیتوزان (شرکت سیگما)، اسید استیک گلاسیال، گلیسرول، توئین 80 درجه مطلق آزمایشگاهی، نیترات منیزیوم، کلرید سدیم، کلرید کلسیم (شرکت مرک آلمان)، اسانس آویشن(شرکت زردبند، استخراج و فرآوری کننده مواد موثره گیاهان دارویی)، باکتری های *Listeria monocytogenes* PTCC1163، *Escherichia. coli* PTCC1399، *L. plantarum* PTCC1058، *L. sakei* PTCC1272 تهیه شده از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران و *Pseudomonas Fluorescens* تهیه شده از دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

محیط کشت Brain Heart Infusion Agar و Brain Heart Infusion Broth، MRS Broth(deMan Rogosa and Sharp)، MRS Agar و Violet-Red-Bile Agar(VRBG-Agar) تهیه شده از شرکت مرک آلمان

3-1-1-2 مواد مصرفی مورد استفاده در آزمون های شیمیایی تعیین ماندگاری ماهی:

ماهی قزل آلای رنگین کمان، یدید پتاسیم، تیوسولفات سدیم، متانول، کلروفرم، سود، اتانول، اسید استیک، 1- بوتانل، معرف TBA، معرف فنل فتالئین، معرف نشاسته، اکسید منیزیم، اسید بوریک، متیل رد، اسید سولفوریک، تری فلوراید بور(BF3)، n- هگزان، کاغذ صافی بدون خاکستر (Ash less) واتمن 42، کاغذ فویل آلومینیومی(سلفون)، آب مقطر(مواد شیمیایی از شرکت مرک و حلالها از شرکت شارلو تهیه شدند).

3-1-2 وسایل و دستگاه ها

انکوباتور شیکردار از نوع Stuart® ساخت کشور انگلستان، ترازوی دیجیتال با دقت 0/0001 گرم ساخت کشور ژاپن، همزن مغناطیسی ساخت کشور انگلستان، دستگاه ایجاد خلاء، مخلوط کن با دور بالا از نوع Braun ساخت کشور آلمان، آون، کاغذ صافی Whatman شماره 3 و کاغذ صافی معمولی، سلول اندازه گیری نفوذ پذیری، دستگاه رنگ سنج از نوع Konica Minolta، مدل CR-400، ساخت کشور ژاپن، میکرومتر و کولیس از نوع Mitutoyo ساخت کشور ژاپن، دستگاه اندازه گیری خواص

مکانیکی از نوع Testometric، مدلM350-10CT، ساخت انگلستان، شیشه آلات آزمایشگاهی نظیر ارلن، استوانه مدرج، بشر، قیف، لوله های آزمایش ساده و درب دار، شیشه ساعت، پیپت، همزن شیشه ای، دکانتورهای 250 و 500 میلی لیتری شرکت PYREX. ترازوی دقیق با دقت یک ده هزارم ADAM(ADP 360L)، آون Heraeus(D-63450)، دسیکاتور، بن ماری Imemmert،، هیتر Pars Teb، اسپکتروفتومتر JENWAY 6305، روتاری، دماسنج جیوه ای، ، پلیت شیشه ای با قطر 14/5 سانتیمتر، قاب های شیشه ای 27*27.

3-2 مراحل انجام پژوهش

3-2-1 تهیه اسانس دارچین و انجام آزمایش های مربوطه

3-2-1-1 اسانس دارچین

اسانس دارچین از شرکت زردبند (استخراج و فرآوری کننده مواد موثره گیاهان دارویی) به روش استخراج صنعتی تقطیر با بخار آب[1] تهیه شد و در ظرف دربسته تیره رنگ دور از نور و در یخچال نگهداری شد.

3-2-1-2 شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس دارچین با دستگاه GC/MS موجود در پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی انجام پذیرفت(مدل Hewlett Packard (II) 6890). مشخصات و تنظیمات دمایی دستگاه به صورت زیر بود:

برای آنالیز نمونه اسانس دارچین از دستگاه گازکروماتوگراف متصل شده با طیف‌سنج جرمی[2] مدل، Trace مجهز به ستون کاپیلاری DB-5 به طول 60 متر و قطر داخلی 0/25 میلی متر استفاده شد. دمای آون از 60 درجه سانتیگراد تا 250 درجه سانتیگراد با سرعت 5 درجه سانتیگراد بر دقیقه افزایش یافت و به مدت 10 دقیقه در 250 درجه سانتیگراد نگه داشته شد. از گاز حامل هلیوم با سرعت جریان 1/1 میلی لیتر بر دقیقه استفاده شد و از انرژی یونیزاسیون 70 الکترون ولت استفاده گردید. نسبت Split 1 به 50 و حجم تزریق یک میکرولیتر بود.

---

[1] steam distilation
[2] Thermoquest-Finnigan