



بررسی اثر ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی پوشش خوراکی کازئینات سدیم حاوی اسانس رزماری  
(*Rosmarinus officinalis*) بر کیفیت و ماندگاری قزل آلائی رنگین کمان  
(*Oncorhynchus mykiss*) در مدت نگهداری در یخچال

سکینه یگانه<sup>۱\*</sup>، مرجان زرگر<sup>۲</sup>

۱- استاد گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۲- دانشجوی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	هدف از این مطالعه، بررسی اثرات پوشش خوراکی کازئینات سدیم غنی شده با اسانس رزماری بر کیفیت و ماندگاری قزل آلائی رنگین کمان در مدت ۲۰ روز نگهداری در یخچال می باشد. بدین جهت، محلول های کازئینات سدیم (SC) به شکل ۴ تیمار SC فاقد اسانس و SC با اسانس رزماری در سه غلظت (۰/۲۵٪، ۰/۵٪ و ۱٪ (حجمی/وزنی)) تهیه شده، به عنوان پوشش بر روی ماهی قزل آلا اعمال شدند و به مدت ۲۰ روز در یخچال نگهداری شده و هر ۴ روز یکبار، آزمایشات شیمیایی (اندازه گیری پی اچ، بازهای ازته فرار، تیوباریتوریک اسید و پراکسید)، میکروبی (شمارش باکتری های کل و سرماگرا) بر روی آنها انجام شد. نتایج نشان داد که نمونه های شاهد در حدود روز ۱۲ از حد قابل قبول مقادیر میکروبی، شیمیایی تجاوز کردند، در حالی که نمونه های تیمار حاوی ۱٪ اسانس رزماری پس از ۱۶ روز از نظر بار میکروبی، از حد قابل قبول فراتر رفتند ( $p < 0.05$ ) و حتی پس از ۲۰ روز از حد مجاز پراکسید و تیوباریتوریک اسید تجاوز نکردند. این مطالعه نشان داد که پوشش کازئینات سدیم دارای خاصیت سدکنندگی در برابر اکسیژن بوده و استفاده از اسانس رزماری در ترکیب پوشش کازئینات سدیم، باعث کاهش فساد اکسیداتیو، شیمیایی و میکروبی قزل آلائی رنگین کمان می شود.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳	
کلمات کلیدی: ماهی قزل آلائی رنگین کمان، ماندگاری، پوشش خوراکی، کازئینات سدیم، <i>Rosmarinus officinalis</i>	
DOI: 10.52547/fsct.18.120.4 DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.120.4.6 * مسئول مکاتبات: s.yeganeh@sanru.ac.ir	

## ۱- مقدمه

ماهی با دارا بودن اسیدهای چرب غیراشباع امگا ۳ و همچنین اسیدهای آمینه ضروری با قابلیت هضم بالا، کلسیم، فسفر و ویتامین، منبع غذایی مهمی در رژیم غذایی جوامع بشری است [۱]. قزل‌آلای رنگین‌کمان، یک ماهی سردابی است که به دلیل کیفیت بالای گوشت آن و سهولت پرورش در بسیاری از کشورهای جهان پرورش می‌یابد و ایران نیز در این خصوص با تولید حدود ۱۸۲ هزار تن در سال ۱۳۹۸، یکی از بزرگترین تولیدکنندگان می‌باشد [۲]. غذاهای دریایی تازه، در مقابل فساد کیفی ناشی از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع حساس هستند و به دلیل فعالیت‌های آنزیمی و باکتریایی که بعد از مرگ رخ می‌دهد، غذایی فسادپذیر با ماندگاری کوتاه می‌باشند [۳]. بسته‌بندی با مواد پلی‌اتیلن یا سایر مواد پلاستیکی، با محافظت در برابر اکسیداسیون، آلودگی‌های احتمالی نظیر میکروارگانیسم‌ها، آلانده‌های شیمیایی، از دست دادن رطوبت و ... باعث بهبود پایداری و ایمنی غذاهای گوشتی می‌شود [۴]، اما تجدیدنپذیر بودن منابع آن، مشکلات زیست‌محیطی و نیز تمایل مصرف‌کننده به غذاهای سالم‌تر با بسته‌بندی کوچکتر، راحت‌تر و ماندگاری بیشتر، صنعت را مجبور به یافتن جایگزین‌هایی با منابع قابل احیاء کرده است [۵]. پیشرفت‌های اخیر نشان‌دهنده امکان استفاده و کاربردهای تجاری انواع پلیمرهای زیستی تجدیدپذیر، بادوام و قابل استفاده برای غذاهای گوشتی است. پوشش‌های بیوپلیمری به دسته کلی یعنی پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، لیپیدها و پلی‌استرها تقسیم می‌شوند [۴]. یکی از موادی که در ساخت پوشش‌های خوراکی پروتئینی مورد استفاده قرار می‌گیرد کازئین است که ۸۰٪ پروتئین‌های شیر را در برمی‌گیرد [۶]. فیلم‌های خوراکی با پایه کازئین به دلیل کیفیت بالای تغذیه‌ای، خواص بسیار خوب حسی، پتانسیل مناسب جهت محافظت کافی از فرآورده‌های غذایی، همچنین شفافیت و انعطاف‌پذیری برای استفاده در صنایع غذایی مورد توجه هستند [۷]. کازئینات سدیم (SC)<sup>۱</sup>، پلیمری محلول در آب به دست آمده از ترسیب اسیدی کازئین، پروتئین اصلی در شیر گاو، می‌باشد [۸] که دارای طعم خوشایندی بوده، به میزان زیادی محلول است و به راحتی می‌تواند فیلم تشکیل دهد [۹]. فیلم‌های پروتئینی، به خوبی به سطوح آبدوست چسبیده، مانعی در برابر

اکسیژن و دی‌اکسیدکربن ایجاد می‌کنند، اما به دلیل طبیعت آبدوستشان به شدت به آب نفوذپذیر هستند [۱۰] که در این خصوص اسانس‌ها (EOs)<sup>۲</sup> به دلیل طبیعت آبگریزشان، می‌توانند خاصیت ضدآب بودن فیلم‌ها را بهبود ببخشند [۱۱] ضمن اینکه آثار مثبت دیگری مانند ممانعت از رشد باکتری‌ها و فساد چربی دارند [۱۲].

عصاره رزماری به عنوان منبع ترکیب روغن‌های فعال، نه تنها برای بهبود طعم محصول، بلکه برای حفظ کیفیت و ایمنی میکروبی آن نیز محبوبیت زیادی در صنایع غذایی دارد [۱۳]. ترکیبات اصلی عصاره رزماری شامل ۸۰-سینئول، کامفور، آلفا پینن، لیمونن، کامفن و لینالول است. اسانس رزماری در برابر باکتری‌های گرم مثبت اثر ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارد [۱۴]. فعالیت ضد میکروبی آن در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکولای و سودوموناس آئروژینوزا [۱۵] اثر نگهدارندگی رزماری در ممانعت از تغییر رنگ گوشت چرخ شده گاو و افزایش کیفیت حسی آن [۱۶] افزایش عمر ماندگاری قزل‌آلای رنگین‌کمان در یخچال [۱۷] و کپور علفخوار در فریزر [۱۸] اثبات شده است. فیلم‌های کازئینی به عنوان ماده پوشاننده طعم، دارو، پوشش میوه‌جات، سبزیجات و پنیر کاربرد دارند [۹]. اثر آنتی‌اکسیدانی بسته‌بندی فیلم کازئینات سدیم برگوشت پخته بوقلمون توسط Caprioli و همکاران (۲۰۱۱) تأیید شده است [۱۹]؛ اما در زمینه استفاده از فیلم‌های کازئینی حاوی اسانس، برای افزایش ماندگاری غذاهای دریایی، اطلاعات کمی در دسترس است [۲۰]. بنابراین، اهداف این مطالعه تعیین تغییرات فیزیکیوشیمیایی و میکروبی قزل‌آلای رنگین‌کمان پوشش داده شده با روکش خوراکی کازئینات سدیم غنی شده با اسانس رزماری در مدت ۲۰ روز نگهداری در یخچال می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱ تولید نمونه‌های ماهی دارای پوشش

#### خوراکی کازئینات سدیم

#### ۲-۱-۱ آماده‌سازی ماهی

قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط ۶۰۰ گرم، به صورت زنده از استخر پرورش ماهیان سردآبی در کرج (استان البرز)

## ۲-۲- آنالیز باکتریایی

تعداد باکتری‌های کل (TVC)<sup>۳</sup> و سرماگرا (PTC)<sup>۴</sup> به روش رقت‌های متوالی و پورپلیت بر روی محیط کشت (PCA، مرک، آلمان) در شرایط استریل و پس از انکوباسیون به ترتیب به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ °C و ۷ روز در ۱۰ °C، تعیین شد. تعداد سلول‌های باکتری (cfu)<sup>۵</sup> به صورت  $\log 10$  cfu/g بیان شد [۲۳].

تعداد کلونی × عکس ضرب رقت = cfu

## ۳-۲- آنالیز شیمیایی

### ۱-۳-۲- اندازه‌گیری بازهای ازته فرار (TVB-N)<sup>۶</sup>

بازهای ازته فرار با استفاده از تقطیر به روش کلدال جمع‌آوری و با اسید سولفوریک ۰/۱ N (شرکت مرک، آلمان) تیتراشد. محتوای TVB-N با توجه به رابطه (۲) که در آن V بیانگر حجم اسید سولفوریک مصرفی و C غلظت آن است، به صورت میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی بیان شد [۲۴].

$$\%mgTVV-N = (V \times C \times 14 \times 100) / 10$$

### ۲-۳-۲- اندازه‌گیری pH

نمونه (۱۰ گرم) با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر همگن شده و pH نمونه همگن، با استفاده از pH سنچ (WPA CD 500، انگلستان) خوانده شد [۲۵].

### ۲-۳-۳- اندازه‌گیری تیوباربتوریک اسید (TBA)<sup>۷</sup>

برای تعیین مقدار تیوباربتوریک اسید به روش Egan و همکاران (۱۹۹۷)، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب نمونه‌ها (As) در ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد آب مقطر (Ab) خوانده شد. با استفاده از رابطه (۳)، میزان TBA به صورت میلی‌گرم مالون‌آلدئید در کیلوگرم گوشت ماهی به-دست آمد [۲۶].

$$TBA = (A_s - A_b) \times 50 / 200$$

### ۲-۳-۴- اندازه‌گیری مقدار پراکسید (PV)<sup>۸</sup>

سنجش مقدار پراکسید به روش Egan و همکاران (۱۹۹۷) و تیتراسیون با محلول تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال انجام شد؛ سپس

خریداری شده، پس از صید، سر زنی، تخلیه امعاء و احشاء و شستشو با آب تمیز، در یخچال یونولیتی حاوی یخ، در مدت ۳۰ دقیقه به آزمایشگاه شیمی دانشکده بیوسیستم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی تهران انتقال داده شدند.

## ۲-۱-۲- تهیه محلول پوشش خوراکی

برای آماده‌سازی محلول پایه، نمک کازئینات سدیم (SC) (سیگما، ایالات متحده) در آب مقطر با نسبت ۸٪ (وزنی/وزنی) روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق حل شد. سپس گلیسرول (مرک، آلمان) با نسبت پروتئین به گلیسرول ۱:۰/۳ (وزنی/حجمی) به آن افزوده شد. در یک بشر دیگر، اسید اولئیک (مرک، آلمان) با نسبت پروتئین به اسید اولئیک ۱:۰/۹۵ و توئین ۸۰ (مرک، آلمان) به میزان ۴۰٪ وزن اسید اولئیک توزین شده و تحت همزنی ملایم در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس مخلوط اسیدچرب و امولسیفایر نیز به محلول پایه اضافه شد. در پایان، اسانس رزماری (گیاه اسانس، گرگان-ایران) با نسبت ۲۵/۰، ۵/۰ و ۱/۰ (حجمی/وزنی) به محلول‌های پایه افزوده شدند و ۳ دقیقه توسط هموژنایزر (Ultraturax T25، آلمان) با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه همزنی شده و با استفاده از پمپ خلأ، حباب‌های هوا حذف شدند [۲۱].

## ۲-۱-۳- تیمار بندی

نمونه‌های ماهی (به شکل ماهی کامل شکم‌خالی) به چهار تیمار (SC، SC+0.25%R، SC+0.5%R، SC+1%R) و شاهد تقسیم شدند. پس از غوطه‌وری در محلول‌های کازئینات سدیم بدون اسانس (SC) و کازئینات سدیم حاوی ۰/۲۵٪ (SC+0.25%R)، ۰/۵٪ (SC+0.5%R) و ۱٪ (SC+1%R) اسانس رزماری، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق آویخته شدند و برای اطمینان از تشکیل پوشش، مجدداً این مرحله تکرار شد. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت آویخته شدند تا لایه پوششی کمی خشک شود، سپس به مدت ۲۰ روز در یخچال در دمای  $4 \pm 1^\circ C$  نگهداری شدند و هر ۴ روز یکبار مورد آزمایشات میکروبی (شمارش باکتری‌های کل و سرماگرا) و شیمیایی (اندازه‌گیری بازهای ازته فرار، پی‌اچ، تیوباربتوریک اسید و پراکسید) قرار گرفتند [۲۲].

3. Total viable count

4. Psychrotrophic count

5. Colony-forming unit

6. Total volatile basic-nitrogen (TVB-N)

7. Thiobarbituric acid (TBA)

8. Peroxide value (PV)

با استفاده از رابطه (۴)، میزان پراکسید محاسبه گردید [۲۶].

وزن نمونه روغن / ۱۰۰ × نرمالیت × حجم تیوسولفات = PV

Kruskal-Wallis و Mann-Whitney U، به کار رفتند.

### ۳- نتایج و بحث

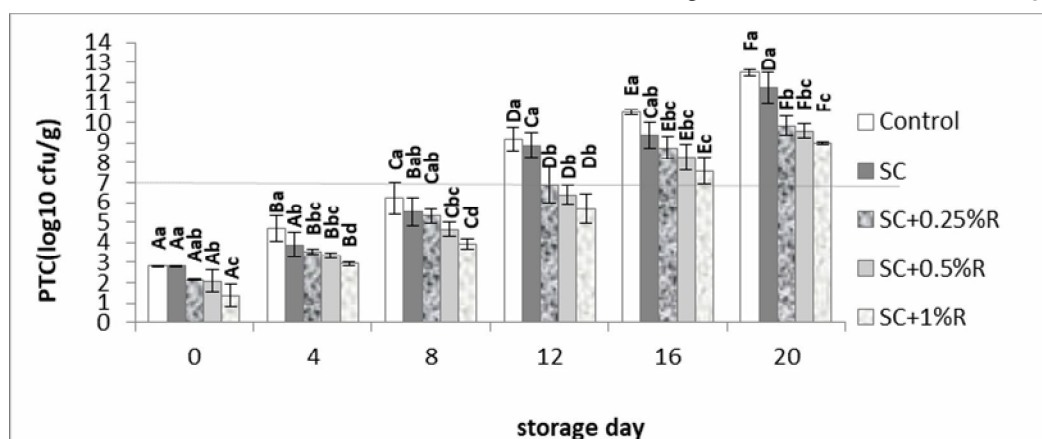
#### ۳-۱- آنالیز میکروبی

##### ۳-۱-۱- تعداد باکتری‌های سرماگرا (PTC)

باکتری‌های سرماگرای گرم منفی (PTC) گروه اصلی میکروارگانیسم‌های مسئول فساد هوازی در گوشت تازه ماهی نگهداری شده در در دمای سرد هستند [۲۳].

#### ۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم افزار SPSS19 در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام پذیرفت. برای کنترل نرمال بودن داده‌ها از آزمون (Shapiro-Wilk)، برای مقایسه میانگین‌ها آزمون Duncan، برای بررسی اثر تیمار و زمان، آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌های به‌دست آمده از آزمون حسی، آزمون‌های



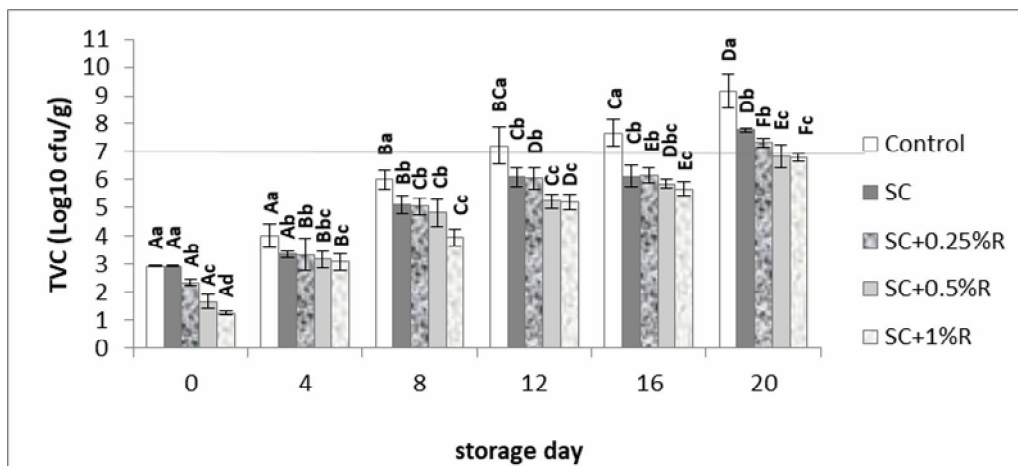
**Fig 1** Changes in psychrotrophic count (PTC) of fish samples - applied with sodium caseinate having no essential oil (SC) and sodium caseinate containing 0.25% (SC + 0.25%R), 0.5% (SC + 0.5%R), and 1% (SC + 1%R) of rosemary essential oil - during refrigerated storage. Each column represents mean values of three measurements  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). <sup>A,B,C</sup> different uppercase letters in each column indicate the effect of time on each treatment and <sup>a,b,c</sup> different lowercase letters in each column indicate the effect of treatment in each time.

Nawaz و همکاران ۲۰۲۰ نیز اثر ضد میکروبی رزماری در پوشش کیتوزانی تأیید شد [۲۷]. Campo و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که در بین مهمترین ترکیبات فنولی موجود در عصاره رزماری، اسید کاروزوزیک در مهار *L. monocytogenes* مؤثرتر است [۲۸]. محتوای فنلی کل ارتباط بسیاری با فعالیت ضد باکتریایی دارد [۲۹]، چراکه آنها می‌توانند دیواره سلولی را تخریب کرده، باعث مختل شدن غشای سیتوپلاسمی و نشت اجزای سلول شوند، اسیدهای چرب و ترکیبات فسفولیپید را تغییر دهند، در نتیجه در سنتز DNA و RNA اختلال ایجاد کرده و انتقال پروتئین را از بین ببرند [۱].

##### ۳-۱-۲- تعداد باکتری‌های کل (TVC)

نتایج حاصل از شمارش باکتری‌های کل در شکل ۲ نشان داده شده است.

شمار اولیه باکتری‌های سرماگرا (PTC) در نمونه‌های شاهد و SC با  $2.7 \pm 0.3 \log cfu / g$  بود که نشان‌دهنده تازگی و کیفیت بسیار خوب بود. مطابق شکل ۲، PTC اولیه تیمارهای حاوی اسانس رزماری کمتر از سایر تیمارها بود که اثر کشندگی اسانس را بر بار اولیه میکروبی و کاهش آن در مقایسه با نمونه‌های فاقد اسانس را نشان می‌دهد. با افزایش زمان نگهداری، بار میکروبی در همه تیمارها افزایش یافت [۱۳]. در ابتدا تعداد باکتری‌ها در تیمار شاهد و SC مشابه بود اما در طول دوره نگهداری، در SC به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از شاهد بود. با توجه به اینکه فیلم‌های کازئینی خواص ضد میکروبی ندارند، ممکن است اثر حفاظتی پوشش SC در برابر آلودگی محیطی علت آن باشد [۴]. در شاهد تعداد باکتری‌های سرماگرا تا روز ۹ از حداکثر حد مجاز ( $\log cfu / g$ ) [۲۳] کمتر بود، درحالی‌که این دوره در SC + 0.5%R تا روز ۱۳ و در SC + 1% R تا روز ۱۵ بود. در مطالعه



**Fig 2** Changes in total viable counts (TVC) of fish samples - applied with sodium caseinate having no essential oil (SC) and sodium caseinate containing 0.25% (SC + 0.25%R), 0.5% (SC + 0.5%R), and 1% (SC + 1%R) of rosemary essential oil - during refrigerated storage. Each column represents mean values of three measurements  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). <sup>A,B,C</sup> different uppercase letters in each column indicate the effect of time on each treatment and <sup>a,b,c</sup> different lowercase letters in each column indicate the effect of treatment in each time.

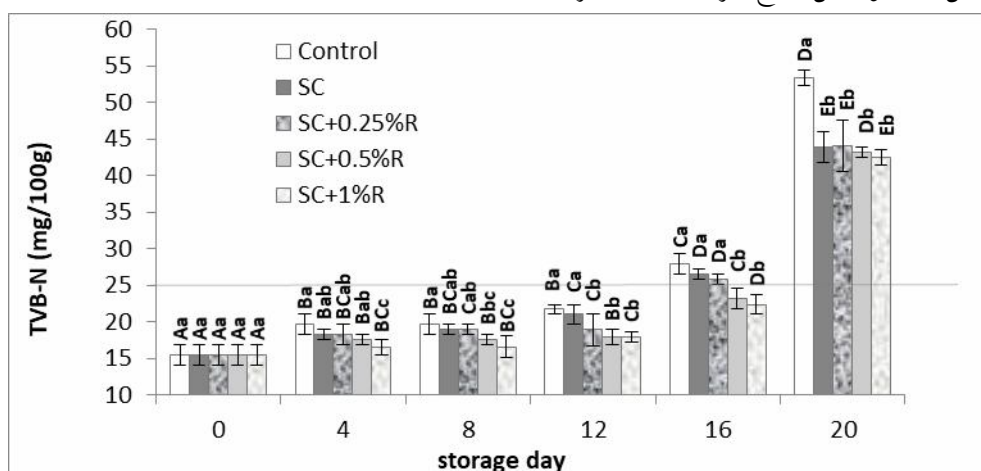
بازدارندگی پوشش کازئینات سدیم غنی شده با اسانس رزماری بر بار باکتریایی کل بود. اثر ضد میکروبی اسانس رزماری برای نگهداری غذاهای دریایی در مطالعات مختلف مورد تأیید قرار گرفته است [۲۷ و ۱۷].

### ۳-۲- آنالیز شیمیایی

#### ۳-۲-۱- بازهای از ته فرار (TVB-N)

تغییرات مقادیر TVB-N در شکل ۳ نشان داده شده است.

مقادیر TVC در ابتدای دوره در هر دو تیمار شاهد و SC،  $2/8 \log_{10} \text{cfu/g}$  بود که نشان دهنده کیفیت بالای ماهی تهیه شده بود و در طول دوره افزایش یافت. در تمام تیمارهای حاوی اسانس رزماری به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) کمتر از شاهد و SC بود. در این مطالعه، تا روز ۱۰، تعداد TVC شاهد کمتر از حد مجاز توصیه شده  $7 \log_{10} \text{cfu/g}$  بود؛ در حالی که در تیمارهای حاوی ۰/۵٪ و ۱٪ اسانس رزماری تا پایان روز ۲۰ و در SC + 0.25%R تا روز ۱۸ پایین تر از این حد بود. این نتایج نیز نشان دهنده اثرات



**Fig 3** Changes in total volatile basic nitrogen (TVB-N) of fish samples - applied with sodium caseinate having no essential oil (SC) and sodium caseinate containing 0.25% (SC + 0.25%R), 0.5% (SC + 0.5%R), and 1% (SC + 1%R) of rosemary essential oil - during refrigerated storage. Each column represents mean values of three measurements  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). <sup>A,B,C</sup> different uppercase letters in each column indicate the effect of time on each treatment and <sup>a,b,c</sup> different lowercase letters in each column indicate the effect of treatment in each time.

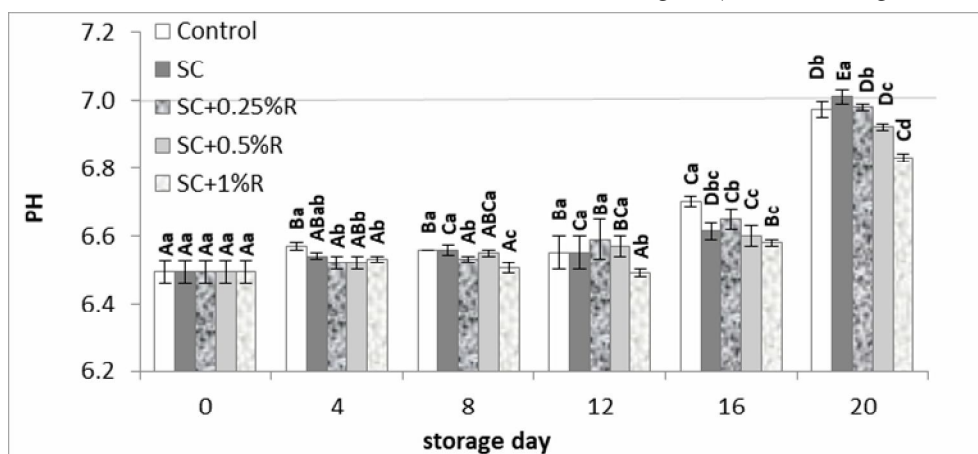
باکتری‌های عامل فساد و آزنیم‌های درونی است [۳۰]  
Gimenez و همکاران (۲۰۰۲) مقدار  $25 \text{ mg N/100g}$  را

مقدار اولیه TVB-N،  $15/1 \pm 4/4 \text{ mg N/100g}$  بود و به تدریج در تمام تیمارها افزایش یافت که علت آن فعالیت

تخریب ساختار فسفولیپیدها، پلی ساکاریدها و اسیدهای چرب میکروارگانیزمها می باشند [۳۳]. کمتر بودن TVN در تیمارهای حاوی اسانس رزماری در مطالعه Abdollahi و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی پوشش بیوانوکامپوزیت کیتوزان/ خاک رس فعال شده با اسانس رزماری بر کپور نقره‌ای [۳۴] و Nawaz و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی عصاره رزماری در ترکیب با کیتوزان بر کیفیت ماهی ماهی [۲۷] نیز دیده شد.

### ۳-۲-۲- مقدار pH

تغییرات در مقادیر pH در مدت نگهداری در یخچال را می‌توان در شکل ۴ مشاهده کرد.



**Fig 4** Changes in pH of fish samples - applied with sodium caseinate having no essential oil (SC) and sodium caseinate containing 0.25% (SC + 0.25%R), 0.5% (SC + 0.5%R), and 1% (SC + 1%R) of rosemary essential oil - during refrigerated storage. Each column represents mean values of three measurements  $\pm$  standard deviation (n = 3). <sup>A,B,C</sup> different uppercase letters in each column indicate the effect of time on each treatment and <sup>a,b,c</sup> different lowercase letters in each column indicate the effect of treatment in each time.

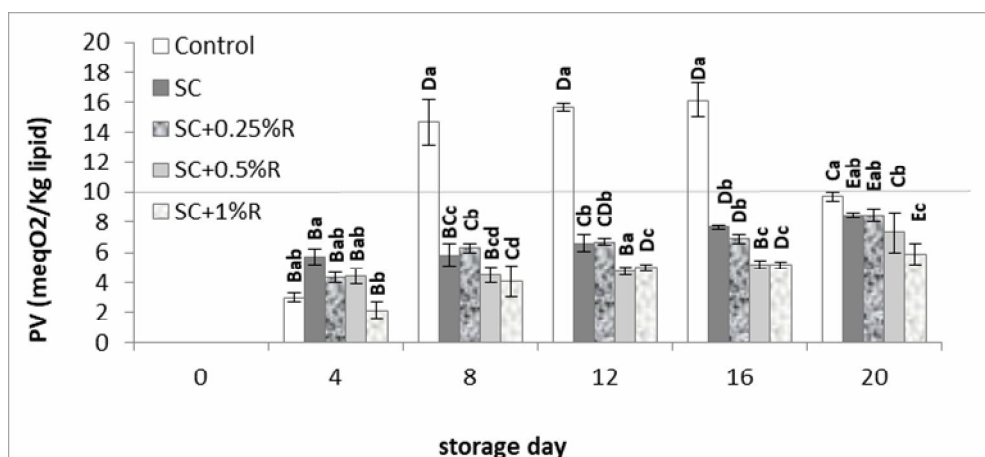
سپس افزایش یافت که توسط Fan و همکاران (۲۰۰۹) و Zargar و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش شده است [۲۰، ۳۵]. ممکن است کاهش pH به دلیل تجزیه گلیکوژن سلولی در شرایط بی‌هوازی و تولید اسیدلاکتیک و افزایش آن به دلیل افزایش بازهای فرار تولید شده، مانند آمونیاک و تری‌متیل‌آمین توسط آنزیم‌های درونی یا فعالیت میکروبی باشد [۳۷]. اگرچه pH نمونه‌های دارای پوشش حاوی اسانس با افزایش زمان نگهداری، افزایش یافت، اما در طول دوره نگهداری کمتر از شاهد بود ( $p < 0.05$ )، که دلیل آن می‌تواند فعالیت ضد میکروبی اسانس رزماری و اثر آن بر تأخیر رشد میکروبی و تجزیه اسیدهای آمینه باشد [۱۵]. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بین

بالاترین سطح قابل قبول TVB-N عنوان کردند [۳۱]. مقادیر نهایی TVB-N در شاهد و SC در روز ۱۳ از حد قابل قبول تجاوز کرد در حالی که در تیمارهای SC + 0.5%R و SC + 1%R در روز ۱۷ از این حد فراتر رفت که با نتایج آنالیز میکروبی مطابقت دارد. محتوای TVB-N در SC + 0.5%R و SC + 1%R به‌طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) کمتر از سایر تیمارها بود. این امر را می‌توان به کاهش سریع جمعیت باکتریایی یا کاهش توان باکتری‌ها برای آمین‌زدایی اکسیداتیو ترکیبات نیتروژنه غیر پروتئینی یا هر دو عامل، مربوط دانست [۳۲] که دلیل آن تأثیر اسانس رزماری بر روی نمونه‌ها بود. اسانس‌ها به دلیل ماهیت آبگریز، با افزایش نفوذپذیری قادر به عبور از دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی و در نتیجه

pH اولیه بسته به گونه ماهی و دیگر فاکتورها بین ۵/۴ تا ۷/۲ متغیر است [۱۸]. در این بررسی، pH اولیه نمونه‌های ماهی  $6.49 \pm 0.03$  بود که با افزایش زمان نگهداری در همه تیمارها افزایش یافت. اگرچه pH به‌تنهایی گزینه مناسبی برای تعیین کیفیت ماهی نیست اما زمانی که با پارامترهای دیگر به کار رود، در تعیین کیفیت ماهی مفید خواهد بود [۱۸]. افزایش pH توسط Fan و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش شده است که نشانه‌ای از رشد باکتری‌های عامل فساد است [۳۵] و منجر به افزایش ترکیبات آمونیاکی قلیایی می‌شود [۳۶]. مقادیر pH بین ۶/۸ و ۷ قابل قبول و مقادیر بالای ۷ به عنوان فاسد تلقی می‌شوند [۱۸]. در این مطالعه، مقادیر pH تا پایان زمان نگهداری کمتر از ۷ بود. pH در میانه دوره نگهداری کاهش و



دوره نگهداری به طرز چشمگیری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). مقدار PV شاهد تا روز ۱۶ افزایش یافت ( $16/1 \pm 1/1$  meqO<sub>2</sub>/Kglipid) و سپس در روز ۲۰ به  $9/0 \pm 7/3$  meqO<sub>2</sub>/Kglipid کاهش یافت. این کاهش می‌تواند ناشی از پیروی از مکانیسم تک‌مولکولی و دوقطبی یا واکنش‌های اکسیداسیون ثانویه و تبدیل پراکسید به ترکیبات اکسیداسیون ثانویه، یعنی ترکیبات کربونیل مانند استالدهید، اسیدهای چرب فرار و گازهای فرار باشد [۳۹].



**Fig 5** Changes in peroxide value (PV) of fish samples - applied with sodium caseinate having no essential oil (SC) and sodium caseinate containing 0.25% (SC + 0.25R), 0.5% (SC + 0.5R), and 1% (SC + 1R) of rosemary essential oil - during refrigerated storage. Each column represents mean values of three measurements  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). <sup>A,B,C</sup> different uppercase letters in each column indicate the effect of time on each treatment and <sup>a,b,c</sup> different lowercase letters in each column indicate the effect of treatment in each time.

طریق هیدروپراکسیدها، که محصولات اولیه واکنش اسیدهای چرب اشباع نشده با اکسیژن هستند، تشکیل می‌شود [۴۲]. تغییرات مقدار TBA در شکل ۶ نشان داده شده است. مقادیر اولیه TBA (mg of malonaldehyde)  $0/01 \pm 0/34$  equivalent/kg fish Fan و همکاران (۲۰۰۹) بود که در طول دوره نگهداری در یخچال به تدریج در همه تیمارها افزایش یافت [۳۵] که دلیل آن می‌تواند افزایش آهن آزاد و پراکسید هیدروژن در عضلات باشد [۴۳]. در این مطالعه تا روز ۲۰، مقادیر TBA در تمام تیمارهای حاوی اسانس کمتر از شاهد و SC بود ( $p < 0.05$ ) و همچنین زیر حد قابل قبول (1 equivalent/kg fish) قرار داشت که با یافته‌های Unalan و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت [۴۴]. در حالی که مقدار TBA در شاهد در روز سیزدهم از حد قابل قبول فراتر رفت [۴۵].

تیمارهای حاوی اسانس، شاهد و SC در روزهای آخر نگهداری، نتایج آنالیز میکروبی را تأیید کرد.

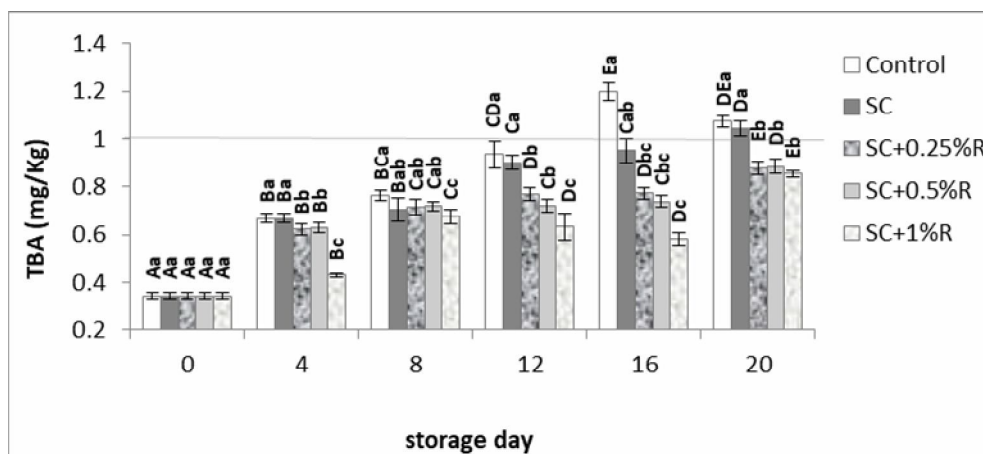
### ۳-۲-۳- مقدار پراکسید (PV)

اندازه‌گیری PV برای تعیین محصولات اولیه اکسیداسیون لیپیدها (هیدروپراکسیدها) به کار می‌رود و اگرچه تولید آن تغییری در خصوصیات حسی ایجاد نمی‌کند، اما می‌تواند خطراتی را برای مصرف‌کنندگان در پی داشته باشد [۳۸]. شکل ۵ تغییرات مقادیر PV را در نمونه‌های ماهی نشان می‌دهد که در آن، مقادیر PV اولیه بسیار ناچیز بوده اما در طول

نتیجه مشاهدات، مقادیر پایین‌تر PV در نمونه‌های پوشش داده شده با SC در مقایسه با شاهد ( $p < 0.05$ ) بود که می‌تواند اثر حفاظتی SC در برابر اکسیژن و اکسیداسیون لیپیدها را تأیید کند [۴]. از طرف دیگر، مقادیر PV در تیمارهای دارای پوشش SC غنی‌شده با رزماری تا روز ۱۶ کمتر از شاهد بود ( $p < 0.05$ ) که می‌تواند مربوط به اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری باشد [۴۰] که با گزارش Formanek و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت داشت [۱۶]. شاپان ذکر است که طبق گزارش Jeong و همکاران (۱۹۹۰)، حد قابل قبول برای PV  $10 \text{ meqO}_2/\text{Kglipid}$  است [۴۱] که در این مطالعه پایین‌تر از حد ذکر شده بود. این نتایج، یافته‌های حاصل از TBA را تأیید می‌کند.

### ۳-۲-۴- مقدار تیوباربتوریک اسید (TBA)

TBA شاخصی از اکسیداسیون لیپید است که مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) را اندازه‌گیری می‌کند. MDA از



**Fig 6** Changes in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of fish samples - applied with sodium caseinate having no essential oil (SC) and sodium caseinate containing 0.25% (SC + 0.25%R), 0.5% (SC + 0.5%R), and 1% (SC + 1%R) of rosemary essential oil - during refrigerated storage. Each column represents mean values of three measurements  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). Each column represents mean values of three measurements  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). <sup>A,B,C</sup> different uppercase letters in each column indicate the effect of time on each treatment and <sup>a,b,c</sup> different lowercase letters in each column indicate the effect of treatment in each time.

شیمیایی (TVB-N) و از حد قابل قبول PV در روز ۶ و TBA در روز ۱۳ تجاوز کردند، در حالی که نمونه‌های تیمار SC + 1%R پس از ۱۶ روز نگهداری، از حد قابل قبول فراتر رفتند و حتی پس از ۲۰ روز نگهداری در دمای یخچال از حد مجاز PV و TBA تجاوز نکردند. از میان ۳ دوز به کار رفته در تیمار بندی، بهترین دوز پیشنهادی، ۰/۵ درصد اسانس است، که با وجود مقدار کمتر، در نتایجی نزدیک نتایج تیمار دارای ۱٪ اسانس بود، چرا که بوی تند و بیش از حد اسانس باعث کاهش کیفیت محصول می‌شود. از آنجایی که پوشش‌های کازئینات سدیم حاوی اسانس مؤثرتر از پوشش فاقد اسانس هستند، برای افزایش خواص فیلم و طعم غذاها، بررسی تأثیر افزودن اسانس‌ها، طعم‌دهنده‌ها، ویتامین‌ها یا مواد معدنی در فیلم‌های SC پیشنهاد می‌شود.

## ۵- تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۳-۱۳۹۰-۰۲ انجام شد که به این وسیله سپاسگزاری می‌شود.

## ۶- منابع

[1] Mei J, Ma X and Xie J, Review on Natural Preservatives for Extending Fish Shelf Life. Foods 2019, 8: 490. Doi: 10.3390/foods8100490

مقادیر پایین‌تر TBA در تیمارهای دارای رزماری را می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی اسانس رزماری بر واکنش‌های آنزیمی باکتریایی مربوط به اکسیداسیون لیپیدها نسبت داد [۷]. نتایج مقدار TBA در SC (شکل ۶) نشان داد که پوشش کازئینات سدیم مانع از اکسیداسیون لیپیدها در گوشت ماهی شد که ممکن است به دلیل خواص سدکنندگی پوشش کازئینات سدیم در مقابل اکسیژن باشد [۲۱]. دلیل کاهش مقادیر TBA در برخی از روزهای نگهداری ممکن است در اثر کاهش هیدروپراکسید و برهم‌کنش بین مالون‌آلدئید و برخی از ترکیبات عضله مانند پروتئین، اسیدهای آمینه و گلیکوزنها ایجاد شود. این امر منجر به کاهش مالون‌آلدئید و به ترتیب کاهش TBA می‌شود، هرچند افزایش فساد ماهی را به دنبال دارد [۴۳].

## ۴- نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که پوشش کازئینات سدیم (SC) می‌تواند باعث تعویق فساد اکسیداتیو شود و این نشان‌دهنده اثر سدکنندگی آن در برابر هوا است که این پوشش را برای بسته بندی‌های سبز مناسب می‌کند. در این تحقیق سعی شد از طریق غنی‌سازی آن با اسانس *Rosmarinus officinalis* در غلظت‌های ۰/۲۵٪، ۰/۵٪ و ۱٪ خصوصیات پوشش SC بهبود یابد. نتایج نشان داد که نمونه‌های شاهد در روزهای ۱۰ و ۱۲ از حد قابل قبول مقادیر میکروبی (TVC, PTC) و



- against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork, Meat Science 2009, 81: 686-692.
- [14] Stojiljkovic J, Trajchev M, Nakov D, Petrovska M, Antibacterial activities of rosemary essential oils and their components against pathogenic bacteria, Adv Cytol Pathol 2018, 3(4): 93-96. Doi: 10.15406/acp.2018.03.00060 Tomasula PM 2002 US Patent 6,379,726, April 30.
- [15] Pintore G, Usai M, Bradesi P, Julino C, Boatto TF, Chessa M, Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* oils from Sardinia and Corsica, Flavour and Fragrance Journal 2002, 17: 15-19.
- [16] Formanek Z, Lynch A, Galvin K, Farkas J, Kerry JP, Combined effects of irradiation and the use of natural antioxidants on the shelf-life stability of overwrapped minced beef, Meat Science 2003, 63(4): 433-40.
- [17] Etemadi H, Rezaii M, Abedian Kenari A, Antibacterial and antioxidant potential of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) on shelf-life extension of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), FSCT 2008, 5 (19): 67-77.  
URL: <http://journals.modares.ac.ir/article-7-9722-fa.html> (in Persian).
- [18] Roomiani L, Ghaeni M, Moarref M, Fallahi R, Lakzaie F, The effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on the quality changes and fatty acids of *Ctenopharyngodon idella*, Iranian Journal of Fisheries Sciences 2019, 18(1): 95-109. Doi: 10.22092/ijfs.2018.117437
- [19] Caprioli I, O'Sullivan M, Monahan FJ, Interference of sodium caseinate in the TBARS assay, Food Chemistry 2011, 124: 1284-1287.
- [20] Zargar M, Yeganeh S, Razavi SH, Ojagh SM, The effect of sodium caseinate coating incorporated with *Zataria multiflora* essential oil on the quality and shelf life of rainbow trout during refrigerated storage, Journal of Aquatic Food Product Technology 2016, 25(8): 1311-1322.
- [21] Atarés L, Bonilla J, Chiralt A, Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils, Journal of Food Engineering 2010, 100: 678-687.
- [22] Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SM, Hosseini SMH, Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of
- [2] Statistical Year Book of the Fisheries organization. 2014-2019. Deputy Director of Planning and Planning Management. Pp, 64. (in Persian)
- [3] Jiang D, Liu Y, Jiang H, Rao S, Fang W, Wu M, Yuan L, Fang W, A novel screen-printed mast cell-based electrochemical sensor for detecting spoilage bacterial quorum signaling molecules (N-acyl-homoserine-lactones) in freshwater fish. Biosen. Bioelectron 2018, 102: 396-402.
- [4] Cutter CN, Sumner SS, Application of edible coatings on muscle foods. In: Gennadios A (Ed.) Protein-based films and coatings. Boca Raton, FL: CRC Press 2002, 467-484.
- [5] Weber CJ, Haugaard V, Festersen R, Bertelsen G, Production and applications of biobased packaging materials for the food industry. Food Additives and Contaminants 2002, 19: 172-177.
- [6] Chen H, Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. Dairy Science 1995, 78: 2563-2585.
- [7] Buonoore GG, Del Nobile MA, Dimartino C, Gambacorta G, La Nott E, Nicoluis L, Modeling the water transport properties of casein-based edible coating, Journal of Food Engineering 2002, 60: 99-106.
- [8] Audic JL, Chaufer B, Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate, European Polymer Journal 2005, 41: 1934-1942.
- [9] Khwaldia K, Perez C, Banon S, Desobry S, Hardy J, Milk proteins for edible film and coatings, Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2004, 44: 239-251.
- [10] Kristo EP, Koutsoumanis KG, Biliaderis C, Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*, Food Hydrocolloids 2008, 22: 373-386.
- [11] Greener IK, Physical properties of edible films and their components, Ph.D. Thesis, University of Wisconsin-Madison, 1992.
- [12] Ahn JH, Kim YP, Seo EM, Choi YK, Kim HS, Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil, Journal of Food Engineering 2008, 84: 327-334.
- [13] Zhang H, Kong BL, Xiong Y, Sun X, Antimicrobial activities of spice extracts

- 108: 148-153.
- [33] Jayasena DD, Jo C, Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science and Technology* 2013, 34(2): 96-108.
- [34] Abdollahi M, Rezaei M, Farzi Gh, Influence of chitosan/clay functional bionanocomposite activated with rosemary essential oil on the shelf life of fresh silver carp, *International Journal of Food Science and Technology* 2014, 49: 811-818.
- [35] Fan W, Sun J, Chen Y, Qiu J, Zhang Y, Chi Y, Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage, *Food Chemistry* 2009, 115: 66-70.
- [36] Campos CA, Rodríguez Ó, Losada V, Aubourg SP, Barros-Velázquez J, Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Food Microbiology* 2005, 103(2): 121-130.
- [37] Ruiz-Capillas C, Moral A, Residual effect of CO<sub>2</sub> on hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in modified and controlled atmospheres, *European Food Research and Technology* 2001, 212: 413-420.
- [38] Olafsdottir G, Martinsdottir E, Oehlenschläger J, Dalgaard P, Jensen B, Undeland I, Methods to evaluate fish freshness in research and industry, *Trend Food Science & Technology* 1997, 8: 258-265.
- [39] Vidya SRG, Srikar LN, Effect of preprocess ice storage on the lipid changes of Japanese threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) mince during frozen, *Asian Fisher Science* 1996, 9: 109-114.
- [40] Martinez L, Castillo J, Ros G, Nieto G, Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary, pomegranate and olive extracts in fish patties, *Antioxidants* 2019, 8(4): 86.
- [41] Jeong BY, Oshima T, Koisumi C, Kanou Y, Lipid deterioration and its inhibition of Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) during frozen storage, *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990, 56 (12): 2083-2091.
- [42] Fernandez JA, Perez-Alvarez JA, Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat, *Food Chemistry* 1997, 59: 345-353.
- [43] Gomes HA, Silva EN, Nascimento MRL, Fukuma HT, Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the refrigerated rainbow trout, *Food Chemistry* 2010, 120: 193-198.
- [23] Ibrahim Sallam K, Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate and sodium citrate in refrigerated sliced salmon, *Food Control* 2007, 18: 566-575.
- [24] Goulas AE, Kontominas MG, Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): Biochemical and sensory attributes, *Food Chemistry* 2005, 93: 511-520.
- [25] Hernández MD, López MB, Álvarez A, Ferrandini E, García García B, Garrido MD, Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage, *Food Chemistry* 2009, 114: 237-245.
- [26] Egan H, Kirk RS, Sawyer R, Pearsons chemical analysis of food. Longman Scientific and Technical (9th ed) 1997, pp: 609-634.
- [27] Nawaz T, Fatima M, Hossain Shah SZ, Afzal M (2020) Coating effect of rosemary extract combined with chitosan on storage quality of mori (*Cirrhinus mrigala*), *Journal of Food Processing and Preservation* 2020, 44: e14833.
- [28] Campo JD, Nguyen-the C, Sergeant M, Amiot MJ, Determination of the most bioactive phenolic compounds from rosemary against *Listeria monocytogenes*: Influence of concentration, pH and NaCl, *Journal of Food Science* 2003, 68: 20662071.
- [29] Kim YS, Hwang CS, Shin DH, Volatile constituents from the leaves of *Polygonum cuspidatum* S. et Z. and their anti-bacterial activities, *Food Microbiology* 2005, 22: 139-144.
- [30] Kyrana VR, Lougovois VP, Valsamis DS, Assessment of shelf life of mari cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice, *Food Science and Technology* 1997, 32: 339-347.
- [31] Gimenez B, Roncales P, Beltran JA, Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout, *Food Agriculture* 2002, 84: 1154-1159.
- [32] Fan W, Chi, Y, Zhang S, The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice, *Food Chemistry* 2008,

- Food Congress Novel Approaches In Food Industry 2011, 189-196. Çeşme-İzmir, Turkey.
- [45] Lakshmanan PT, Fish spoilage and quality assessment. In: Iyer TSG, Kandoran MK, Thomas M and Mathew PT (eds) Quality assurance in seafood processing 2000, Cochin: Society Fisher Techno (India), 26-40.
- measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat, Food Chemistry 2003 80: 433-437.
- [44] Unalan U, Effect of pomegranate (*Punica granatum*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts on shelf-life for chilled Greenland halibut (*Reinhardt tiushippoglossoides*) fillets in modified atmosphere packaging at 2 °C, International



## Evaluation of antimicrobial and antioxidant effect of sodium caseinate edible coating enriched with rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) on the quality and shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during refrigerated storage

Yeganeh, S.<sup>1\*</sup>, Zargar, M.<sup>2</sup>

1. Professor in Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mazandaran, Iran.

2. PhD student in Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Golestan, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b></p> <p>Received 2020/ 07/ 27 Accepted 2021/ 09/ 14</p> <hr/> <p><b>Keywords:</b></p> <p>Rainbow trout, Shelf life, Edible coatings, Sodium caseinate, <i>Rosmarinus officinalis</i>.</p> <hr/> <p><b>DOI:</b> 10.52547/fsct.18.120.4 <b>DOR:</b> 20.1001.1.20088787.1400.18.120.4.6</p> <hr/> <p>*Corresponding Author E-Mail: s.yeganeh@sanru.ac.ir</p>	<p>The aim of this study was to investigate the effects of sodium caseinate (SC) edible coating enriched with <i>Rosmarinus officinalis</i> essential oil on the quality and shelf life of rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) during 20 days of refrigerated storage (4±1 °C). Aqueous solutions of sodium caseinate (SC) 8% (w/w) were prepared in the form of 4 treatments of SC without essential oil and SC with rosemary essential oil in three concentrations (0.25%, 0.5% and 1% (v/w)), then applied as a coating on the rainbow trout and refrigerated for 20 days, and every 4 days, chemical (pH, total volatile basic-nitrogen, thiobarbituric acid and peroxide value) and microbiological (total viable count and psychrotrophic count) analysis were performed on them. The results showed that control samples exceeded the acceptable limit of microbiological and chemical values on around days 12, while SC+1%R samples exceeded the acceptable limit after 16 days of storage and did not exceed the peroxide value and thiobarbituric acid limit even after 20 days of storage. This study showed that Sodium casein coating has an inhibitory property against oxygen and the use of rosemary essential oil in its composition reduces the oxidative, chemical and microbial spoilage of rainbow trout.</p>