DOI 10.22092/VJ.2017.116252.1381
شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تاثیر فیلم کیتوزان–ژلاتین همراه با عصاره پوست انار بر خصوصیات کیفی ماهی شوریده بلانگر *(Johnius belangerii)* نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

• **جواهرساکی**
دانشجوی کارشناسی ارشد رشته شیلات گرایش فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
• **آیناز خدا نظری (نویسنده مسئول)**
استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
• **سیدمهدی حسینی**
استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
تاریخ دریافت: ۰۴-۰۹-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۱۸-۰۹-۱۳۹۶
Email: khodanazary@yahoo.com

چکیده

استفاده از فیلم‌های خوراکی زیست-کافت از روش‌هایی می‌باشد که طی سالیان اخیر مورد توجه فراوان قرار گرفته است. قابلیت تشکیل فیلم و خواص حفاظتی ژلاتین و کیتوزان موجب شده که به عنوان فیلم‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار بگیرند. در مطالعه حاضر، تأثیر فیلم (مخلوط و دولایه) تهیه شده از کیتوزان (۱ درصد وزنی/ حجمی) و ژلاتین (۳ درصد وزنی/ حجمی) به همراه عصاره پوست انار در نگهداری فیله ماهی شوریده بلانگر در دمای ۱ ± ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال (به مدت ۱۶ روز) مورد بررسی قرار گرفت. ۵ تیمار شامل تیمار ۱: نمونه شاهد، تیمار۲: فیلم مخلوط، تیمار۳: فیلم دولایه، تیمار ۴: فیلم مخلوط با عصاره پوست انار و تیمار ۵: فیلم دو لایه با عصاره پوست انار بسته‌بندی شدند. آزمون‌های میکروبی (بار باکتریایی کل و سرمادوست) بیانگر تأثیر ضدمیکروبی فیلم‌های کیتوزان-ژلاتین با و بدون عصاره پوست انار بود ($p<۰/۰۵$) اما بین خاصیت ضدمیکروبی انواع مخلوط و دولایه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). بار باکتری انتروباکتریاسه فیله پیچیده شده در فیلم کیتوزان-ژلاتین با عصاره پوست انار به طور معنی‌داری کمتر از دیگر نمونه‌ها بود. آزمون‌های شاخص اکسیداسیون چربی (تیوباربیتوریک اسید، اسید چرب آزاد) نیز حاکی از کمتر بودن میزان اکسیداسیون در نمونه‌های دارای فیلم کیتوزان-ژلاتین نسبت به نمونه شاهد بود. بنابراین، کیتوزان-ژلاتین به عنوان فیلم خوراکی (مخلوط و دولایه)، ماندگاری فیله *Johnius belangerii* طی نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) را افزایش می دهد. بهترین روش پوشش فیله استفاده از فیلم کیتوزان-ژلاتین با عصاره پوست انار بود.

کلمات کلیدی: *Johnius belangerii*، دولایه، مخلوط، ماندگاری

Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 133-139

Effect of chitosan-gelatin film combined with pomegranate peel extract on quality properties of Belanger's croaker *Johnius belangerii* stored at 4 ºC

By: Saki, J., Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. Khodanazary, A., (Corresponding Author) Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. and Hosseini, S.M., Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

Email: khodanazary@yahoo.com

Received: 2017-11-25 **Accepted: 2017-12-09**

Interest in biodegradable films has been intensified in recent years. Chitosan and gelatin are biopolymers with preservative effects film forming ability to form antimicrobial and antioxidant films. In the current study, the effect of chitosan (1% w/v) and gelatin (3% w/v) film (composite and bilayer) incorporated with pomegranate peel extract was investigated on the storage of Belanger's croaker fillet in refrigerator (4±1°C) for 16 days. 5 treatment were packed including 1: control sample, 2: composite film, 3: bi-layer film, 4: composite film with pomegranate peel extract, 5: bi-layer film with pomegranate peel extract. Bacterial experiments (total count and pscychrotrophic bacteria) showed the anti bacacterial effect of chitosan-gelatin coating and film with or without pomegranate peel extract ($p<0.05$) but there was no significant difference between composite and bilayer ($p>0.05$). The count of Enterobacteriaceae bacteria of chitosan-gelatin film with pomegranate peel extract was lower than other samples. Lipid oxidation value experiments (thiobarbituric acid and free fatty acid values) showed lower oxidation value in film wrapped fillets in comparison with control sample. Thus, chitosan-gelatin as edible film (composite and bilayer) would enhance shelf life of *Johnius belangerii* fillet during refrigerated (4 ± 1°C) storage. The best of packaging method was the using of chitosan-gelatin film with pomegranate peel extract.

Key words: *Johnius belangerii*, Bi-layer, Composite, Shelf life

مقدمه

برای حفظ ارزش تغذیه‌ای ماهی از روش نگهداری در سرما استفاده زیادی می‌شود. اما وجود فراوان چربی‌های غیر اشباع و مقادیر بالای ملکول‌های پرواکسیدان باعث می‌شود فساد آنزیمی و غیرآنزیمی در نگهداری در سرما نیز ادامه پیدا کند (۵). از این‌رو نگهدارنده‌های مصنوعی مانند هیدروکسی آنیزول بوتیله و هیدروکسی تولوئن بوتیله، عوامل شلاته کننده و ترکیبات ضدمیکروبی ممکن است جهت افزایش ماندگاری به آن‌ها افزوده شود. با این وجود مصرف‌کنندگان تمایل بیشتری به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی به جای مصنوعی دارند. این امر منجر به مطالعات بیشتری در این زمینه شده است (۱). گیاهان منبع فراهم‌کننده مواد فعال زیستی ارزشمند هستند که به عنوان آنتی اکسیدان‌های طبیعی برای حفظ و بهبود کیفیت کلی گوشت و فرآورده‌های گوشتی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. آنتی اکسیدان‌های طبیعی از گیاهان، به شکل عصاره‌ها، از منابع مختلف مانند میوه (انگور، انار و ...)، سبزیجات (بروکلی، سیب زمینی و ...) و ادویه‌جات (چای، رزماری و غیره) به دست می‌آیند. این عصاره‌ها سرشار از ترکیبات فنولی بوده و جایگزین خوبی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی می باشند (۳).

انار از میوه‌هایی است که در سال‌های اخیر بیشترین تحقیقات بر روی آن صورت گرفته است. مطالعات بسیاری در ارتباط با خاصیت آنتی اکسیدانی، کاهش فشار خون و ضد سرطان آب انار انجام گردیده است. پوست انار که ۴۰ درصد میوه کامل را تشکیل می‌دهد، به عنوان محصول فرعی پس از تولید آب انار می‌باشد. فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضدالتهابی و ضدحساسیت عصاره پوست انار مطالعه شده است (۲). فعالیت‌های ضدمیکروبی عصاره پوست انار در برابر *Listeria monocytogenes*، *Staphylococcus areus*، *Escherichia coli* و *Yersinia enterocolitica* اثبات شده است (۶، ۲). عصاره‌های هیدروالکلی پوست انار از طریق کاهش معنی‌دار میزان گلوکز خون، دارای فعالیت‌های ضد دیابتی می‌باشند (۲). نتایج مطالعات آل ثقف و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داد که فنول‌های پوست انار

می‌تواند به عنوان ماده غذایی زیست فعال چند کاره مورد استفاده قرار گیرد (۳).

یکی از راه‌های افزایش ماندگاری مواد غذایی طی دوره نگهداری در سرما استفاده از لایه‌های محافظتی از مواد طبیعی یا شیمیایی می‌باشد. پوشش‌های خوراکی، لایه‌ای نازک از مواد قابل خوردن می‌باشند که به شکل مایع بوده و با غوطه‌ور کردن محصول مورد نظر به صورت یک پوشش روی آن قرار می‌گیرند. فیلم‌های خوراکی یک لایه نازک از مواد خوردنی می‌باشند که در مرحله‌ای جداگانه به صورت ورقه‌های جامد ساخته شده سپس به شکل لفافی دور غذا پیچیده می‌شوند (۷). مهم‌ترین مواد مورد استفاده در تهیه‌ی فیلم‌ها و پو شش‌های خوراکی، پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و چربی‌ها می‌باشند که می‌توانند به صورت تک لایه از یک یا چند ماده و نیز یه صورت چند لایه تهیه شوند (۲۴). کیتوزان و ژلاتین به دلیل تشکیل لایه‌هایی با ویژگی مکانیکی مناسب و مقاوم در برابر نفوذ هوا مورد توجه بسیاری در این زمینه قرار گرفته‌اند (۲۳). ژلاتین، پروتئینی است که از هیدرولیز کنترل شده کلاژن به دست می‌آید (۴). ژلاتین، فیلم‌هایی با ویژگی مکانیکی مناسب و حفاظت خوب در برابر اکسیژن و بو در رطوبت نسبی کم و متوسط ایجاد می‌کند (۱۷). اما به دلیل آب دوست بودن، نسبت به رطوبت نفوذ پذیر است. از راه‌های غلبه بر این محدودیت می توان ترکیب کردن آن با سایر پلیمرها و تهیه فیلم چند لایه را نام برد (۲۴). کیتوزان، پلی ساکاریدی است که از استیل‌زدایی کیتین به دست می‌آید. اهمیت کیتوزان از جهت خاصیت ضدمیکروبی قوی، تولید فیلم خوب و اندکی خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۱۶). تحقیقات نشان داده‌اند که خواص مکانیکی و فیزیکی فیلم‌های مخلوط و دولایه کیتوزان و ژلاتین بهتر از فیلم‌های هر یک به تنهایی است. این مسئله را می‌توان به تشکیل کمپلکس‌های پلی‌الکترولیتی حاصل از واکنش‌های الکتروستاتیکی بین گروه‌های آمونیوم کیتوزان و گروه‌های جانبی با بار منفی زنجیره‌های ژلاتین یا کلاژن (مثل گروه‌های کربوکسیل) در pH به کار رفته دانست (۱۲). در همین راستا تحقیقات قابل توجهی در توسعه و کاربرد بیوپلیمرهای استخراج شده از فرآورده‌های طبیعی مختلف انجام گرفته است و بیو پلیمرهایی از قبیل نشاسته، مشتقات سلولز، کیتین، کیتوزان، صمغ ها، پروتئین‌ها (با منشأ حیوانی یا گیاهی) و چربی‌ها، جهت تهیه فیلم‌ها و پوشش‌های نازک برای پوشاندن غذاهای تازه و یا عمل‌آوری شده مورد استفاده قرار می‌گیرند. این تکنولوژی علاوه بر داشتن فوایدی مانند قابلیت خوردن، ساختمان ظاهری زیبا، سازگاری با محیط، غیرسمی و ارزان بودن، مواد غذایی را از آسیب‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی حفظ می‌کند. لذا این مطالعه با هدف تعیین تأثیر استفاده از فیلم نگهدارنده کیتوزان–ژلاتین به دو روش مخلوط و دو لایه غنی شده با عصاره پوست انار بر کیفیت و ماندگاری فیله سرد ماهی شوریده بلانگر انجام گردید.

مواد و روش کار

تهیه عصاره پوست انار

پوست انار خشک شده با استفاده از آسیاب خانگی پودر گردید و ۲۰۰ گرم از پوست انار آسیاب شده با اتانول ۵۰ درصد به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. نسبت پودر پوست انار به حلال ۱ به ۱۰ وزنی/ حجمی بود. عصاره با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید و سپس با استفاده از تبخیرکننده دوار، اتانول خارج گردید. عصاره پوست انار به مدت یک شبانه روز در آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود و پودر عصاره پوست انار تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. ۱/۵ درصد عصاره پوست انار مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه محلول کیتوزان

محلول کیتوزان با حل کردن ۱ درصد وزنی/ حجمی کیتوزان (شرکت سیگما، وزن ملکولی متوسط، ویسکوزیته cp ۸۰۰-۲۰۰) در اسیداستیک ۱ درصد حجمی/ حجمی بدست آمد(۲۲). برای حل شدن بهتر کیتوزان، محلول به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق با همزن مغناطیسی هم زده شدند.

تهیه محلول ژلاتین

ژلاتین پوست ماهیان سردآبی (شرکت سیگما) به میزان ۳ درصد وزنی/ حجمی در آب مقطر حل شد. به منظور تورم و انحلال بهتر ابتدا در دمای ۷ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه حرارت قرار داده شد و با همزن مغناطیسی هم زده شد (۱۶).

تهیه فیلم‌های کیتوزان–ژلاتین

فیلم‌ها نیز به دو صورت مخلوط و دو لایه تهیه شدند. فیلم‌های دولایه با دو مرحله قالب‌ریزی در قالب‌های طلقی نچسب و خشک تهیه شدند. بدین ترتیب که ابتدا ۶۰ میلی لیتر محلول ژلاتین را در قالب ریخته و در دمای ۲۰ درجه اتاق قرار داده شد، هنگامی که لایه ژلاتین تقریباً خشک شد، ۴۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان روی آن ریخته و مجدداً در همان دما خشک شد. برای تهیه فیلم مخلوط، به میزان ۱۰۰ میلی لیتر محلول کیتوزان – ژلاتین با نسبت ۴۰ به ۶۰ مخلوط شدند، در قالب‌های مورد نظر ریخته شده و در دمای ۲۰ درجه محیط خشک گردید. عصاره پوست انار ۱/۵ درصد به آن‌ها اضافه شد. فیلم‌ها پس از خشک شدن از قالب، جدا شده و به دور فیله‌ها پیچانده شدند. فیلم‌های دو لایه همگی از سمت کیتوزان به دور فیله‌ها پیچانده شدند.

آماده‌سازی نمونه‌های ماهی

ماهیان به تعداد ۱۵۰ قطعه با میانگین وزن ۴۰۰ گرم به صورت تازه از بازارچه ماهی شهرستان خرمشهر خریداری و به آزمایشگاه فرآوری گروه شیلات دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انتقال داده شدند. ماهیان سر زده و استخوان‌گیری شده و از هر یک دو فیله با وزن متوسط ۱۲۰-۱۰۰ گرم تهیه شدند. ۵ تیمار شامل تیمار۱: نمونه شاهد، تیمار ۲: فیلم مخلوط، تیمار۳: فیلم دو لایه، تیمار ۴: فیلم مخلوط با عصاره پوست انار و تیمار ۵: فیلم دولایه با عصاره پوست انار بسته‌بندی شدند. هر تیمار دارای ۳ تکرار بود. فیله‌های آماده شده به مدت ۱۶ روز در یخچال (دمای ۱ ± ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و در فواصل زمانی ۴ روز یک بار، نمونه‌ها مورد ارزیابی میکروبی (بار باکتریایی کل و بار

باکتریایی سرمادوست، انتروباکتریاسه)، بازهای ازته فرار، تیوباربیتوریک اسید، اسیدهای چرب آزاد و pH قرار گرفتند. اندازه گیری بار میکروبی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی فیله ماهی شوریده بلانگر در هر دوره زمانی مجزا از نمونه‌های دوره‌های زمانی دیگر می‌باشد. تعداد بسته‌ها در هر گروه در هر مقطع زمانی ۳ بسته برای سه تکرار جهت آنالیز میکروبی و ۳ بسته برای سه تکرار جهت آنالیز فیزیکوشیمیایی بود.

آزمون میکروبی نمونه‌ها

بار میکروبی نمونه‌ها با هموژن کردن ۱۰ گرم نمونه در ۹۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم در شرایط استریل آغاز شد. از این محلول جهت تهیه رقت‌های متوالی استفاده گردید. کشت میکروبی مورد نظر با ریختن میزان مشخصی از نسبت‌های به دست آمده در پلیت‌های یکبار مصرف استریل و ریختن محیط کشت نوترینت آگار بر آن صورت گرفت. برای شمارش کلنی‌های میکروبی کل پلیت‌های تهیه شده به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای باکتری‌های سرمادوست به مدت ۷ روز در ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. همچنین محیط کشت VRBG برای شناسایی باکتری‌های انتروباکتریاسه نیز مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های کشت داده شده به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از طی مدت انکوباسیون، کلنی‌ها شمارش شدند. شمارش کلنی‌ها بر مبنای cfu/g log۱۰ بیان گردید (۲۵).

اندازه‌گیری بازهای ازته فرار (TVB- N)

اندازه‌گیری بازهای ازته فرار به روش کلدال و با تیتراسیون عصاره به دست آمده از آن انجام گرفت. بدین منظور۱۰ گرم نمونه به همراه ۲ گرم اکسید منیزیم با افزودن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به بالن کلدال متصل شد و عصاره مورد نظر به محلول متشکل از اسید بوریک ۲ درصد و ۲-۱ قطره متیل رد به عنوان شاخص اضافه گردید. محلول زرد رنگ حاصله با اسید سولفوریک تا حاصل شدن رنگ ارغوانی تیتر شد و به صورت میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی بیان شد (۱۱). میزان بازهای ازته فرار از رابطه ۱محاسبه گردید.

رابطه ۱

۱۴X حجم اسید سولفوریک مصرفی= بازهای ازته فرار (میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی)

اندازه‌گیری pH

بدین منظور ۵ گرم از گوشت چرخ شده به مدت ۱ دقیقه با ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر (دارای pH خنثی) همگن شده و میزان pH آن با دستگاه pH سنج (Metrohm) در دمای اتاق اندازه‌گیری شد (۲۸).

اندازه‌گیری تیوباربیتوریک اسید (TBA)

شاخص تیوباربیتوریک اسید طبق روش سیریپاتراوان و نویفا در سال ۲۰۰۰ (۲۷) اندازه‌گیری می‌شود. بدین صورت که دستگاه تقطیر با افزودن ۱۰ گرم نمونه ماهی هموژن شده با ۹۷/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۴ نرمال بهمراه چند قطره ضد کف و سنگ جوش در ارلن راه‌اندازی شد. ۵ میلی‌لیتر از مایع حاصل از تقطیر این مخلوط را به ۴ میلی‌لیتر معرف تیوباربیتوریک اسید (برای تهیه معرف از مخلوط معرف تیوباربیتوریک اسید با اسید استیک گلاسیال محلول یکنواختی ایجاد می‌کنند) افزوده و در حمام بن ماری ۳۵ دقیقه قرار گرفت. سپس میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۳۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. طبق رابطه۲ میزان تیوباربیتوریک اسید بدست آمد. میزان تیوباربیتوریک اسید بصورت میلی‌گرم مالون آلدهید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه بیان شد.

رابطه ۲

TBAvalue =۷/۸ Abs۵۳۸

Abs۵۳۸ = میزان جذب در طول موج ۵۳۸ نانومتر

اندازه‌گیری اسیدهای چرب آزاد (FFA)

میزان شاخص اسیدهای چرب آزاد با استفاده از روش وویوودا و همکاران در سال ۱۹۸۶ (۲۹) اندازه‌گیری شد. در این روش از ۱۰ گرم نمونه ماهی هموژن شده با کمک کلروفرم/ متانول استخراج روغن صورت گرفت. در ادامه به محلول باقی مانده کلروفرم، متانول و ۲-پروپانول به نسبت ۲:۱:۲ به همراه معرف متاکروزول ارغوانی (جهت تهیه معرف به همراه پودر معرف متاکروزول، سود۰/۰۵ نرمال و آب مقطر اضافه شد.) اضافه شد. تیتراسیون گروه‌های کربوکسیلیک آزاد موجود در آن با سود ۰/۰۵ نرمال تا تغییر رنگ از زرد به ارغوانی ادامه یافت. بدین ترتیب. طبق رابطه ۳ میزان اسیدهای چرب آزاد بصورت درصد اولئیک اسید (Oleic acid) بیان شد.

رابطه ۳

$$FFA = \frac{N \times (V_2 - V_1) \times 2.82}{W}$$

N= میزان نرمالیته سود

(V۱ -V۲) = تفاضل مقدار مصرفی سود (میلی لیتر)

W = وزن چربی (گرم)

تجزیه و تحلیل آماری

تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) بررسی شد و نتایج بصورت میانگین ± خطای معیار بیان شد. تعداد بسته‌ها در هر گروه در هر مقطع زمانی ۳ بسته برای سه تکرار جهت آنالیز میکروبی و ۳ بسته برای سه تکرار جهت آنالیز فیزیکوشیمیایی بود. اختلاف بین تیمارها، زمان‌ها و نیز اثر متقابل آنها با آزمون دانکن در سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ با استفاده از نرم افزار آنالیز آماری SPSS ۲۰ مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

در شکل ۱ تغییرات بار باکتریایی کل، سرمادوست و انتروباکتریاسه نمونه‌های تیمار شده با فیلم کیتوزان-ژلاتین دارای عصاره پوست انار یا فاقد آن در طول نگهداری در یخچال (به مدت ۱۶ روز) مشاهده

می‌شود. میزان اولیه باکتری کل، سرمادوست و انتروباکتریاسه به ترتیب ۱/۳۷، ۱/۸۰ و ۱/۱۷ log۱۰ cfu/g بود. بار باکتری‌های کل، سرمادوست و انتروباکتریاسه نمونه شاهد و تیمار شده طی دوره نگهداری به طور معنی دار افزایش یافتند ($p<0/05$). تعداد باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست فیله ماهی شوریده تیمارها در مقایسه با نمونه کنترل کاهش معنی‌داری نشان دادند، در حالی که هیچ تفاوتی بین فیلم کیتوزان- ژلاتین مخلوط و دولایه با و بدون عصاره پوست انار مشاهده نشد.

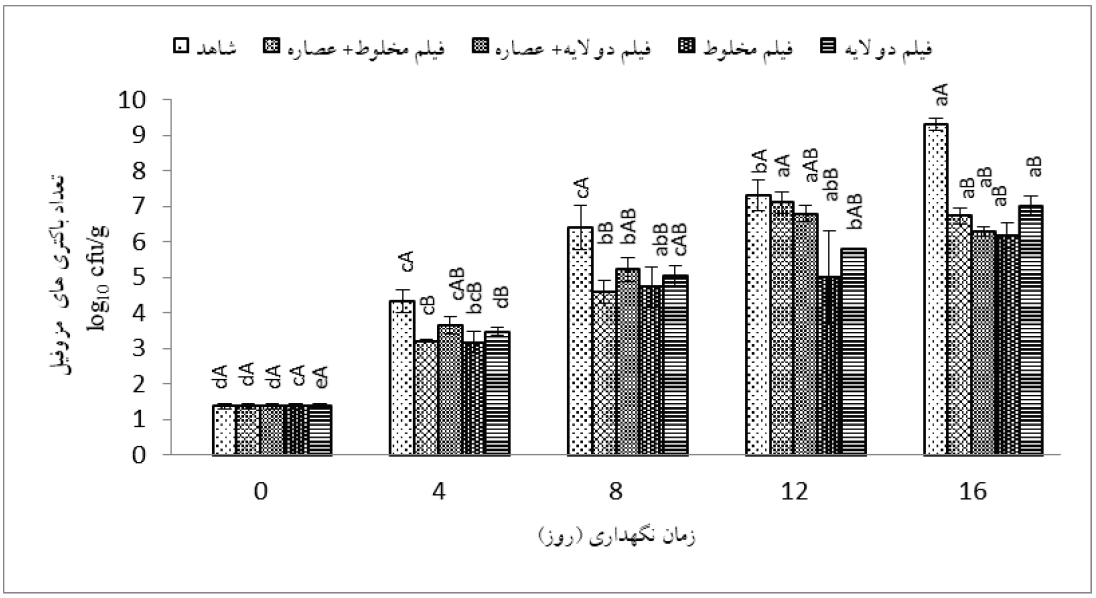
تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه در فیلم مخلوط و دولایه با عصاره پوست انار تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. تعداد باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست در فیله شوریده بلانگر در نمونه شاهد و نمونه غوطه ور شده در عصاره پوست انار بیشتر از ۷ log۱۰ cfu/g بودند که بیشتر از حداکثر محدوده توصیه شده در ماهی خام هستند (۲۵). تعداد باکتری های مزوفیل و سرمادوست در همه تیمارها به جز فیله‌های غوطه‌ور شده در عصاره پوست انار تا ۱۶ روز نگهداری پایین‌تر از حد مجاز بودند. افزایش بار باکتری‌های مزوفیل، سرمادست و انتروباکتریاسه فیله ماهی شوریده بلانگر تیمار شده با کیتوزان-ژلاتین و عصاره پوست انار کمتر از تیمارهای پیچیده شده با فیلم کیتوزان-ژلاتین به تنهایی و تیمار غوطه‌ور شده در عصاره پوست انار بودند که ممکن است به دلیل تأثیر ضدمیکروبی کیتوزان و عصاره پوست انار باشد. عصاره پوست انار به عنوان عامل ضدمیکروبی موثر گزارش شده است (۳، ۳۰) بنابراین عصاره انار به همراه فیلم کیتوزان-ژلاتین می‌تواند رشد باکتری ها را به تأخیر بیاندازد. موهبی و شهبازی در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که فیلم کیتوزان–ژلاتین به همراه عصاره پوست انار می‌توانند ماندگاری غذاهای دریایی طی نگهداری در یخچال را زیاد نمایند (۱۹). فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره پوست انار به حضور ترکیبات زیست فعال مثل آلکولوئید، تاننها، گروه‌های فیتوشیمی (مثل گالونانین‌ها، کاتکین ها، فلاونوئیدها، پروسیانیدها و مشتقات الائیک اسید) می‌باشد (۲، ۱۵). یوآن و همکاران در سال ۲۰۱۶ بیان کردند که فعالیت باکتریایی در میگوی سفید اقیانوس آرام پوشش‌دهی شده با کیتوزان در ترکیب با عصاره پوست انار کمتر از تیمارهای پوشش‌دهی شده با کیتوزان یا تیمار پوشش‌دهی شده باعصاره پوست انار می‌باشد (۳۰). هایرپتیان و همکاران در سال ۲۰۱۳ خاصیت ضد میکروبی عصاره پوست انار را در برابر باکتری Listeria monocytogenes نشان دادند (۱۲). فعالیت ضدمیکروبی عصاره پوست انار احتمالاً مربوط به حساسیت فسفولیپیدهای غشای سلول، سرکوب سیستم‌های آنزیم میکروبی افزایش نفوذپذیری سلول یا نشت بیش از حد مواد داخل سلولی می‌باشد (۳). فرناندز-سایز و همکاران در سال ۲۰۱۳، نوذری و همکاران در سال ۲۰۱۳، زارعی و همکاران در سال ۲۰۱۵، اجاق و همکاران در سال ۲۰۱۰ درباره تأثیرات ضدمیکروبی فیلم و پوشش کیتوزان و ژلاتین در محصولات دریایی گزارش دادند (۹، ۲۱، ۳۱، ۲۲). پوشش دهی مخلوط کیتوزان حل شده در اسید استیک و ژلاتین منجر به تأثیر بازدارنده فلور باکتری‌های گرم منفی کتلت ماهی می‌گردد (۱۶). فاکتورهای متعددی بر فعالیت ضدباکتریایی کیتوزان اثرگذار است. گرچه مکانیسم دقیق آن هنوز به روشنی مشخص نشده اما نظرات متفاوتی برای آن ارائه شده است. نظریه‌ای این اثر کیتوزان را به وجود گروه‌های آمینوی با بار مثبت نسبت داده است که با درشت ملکول‌های دارای بار منفی در سطح سلول میکروبی پیوند ایجاد نموده و منجر به گسیختگی غشای سلول باکتری، نشت مواد درون سلولی و در نهایت مرگ آن می‌شود (۲۰). علاوه بر این مکانیسم عمل کیتوزان می‌تواند بصورت خراشیدن لایه لیپوپلی‌ساکاریدی غشای خارجی باکتری و یا عملکرد آن بصورت سدی در مقابل نفوذ اکسیژن باشد (۲۳،۱۳). جون و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که چگونه رشد باکتریایی در ماهی کاد (*Cod morhua*) و هرینگ (*Cod harengus*) پوشش داده شده با کیتوزان پس از ۶ روز به فاز ساکن رسید (۱۳). پردا و همکاران (۲۰۱۱) هاله بازدارندگی لیستریا مونوسیتوژنز را در محلول فیلم ژلاتینی مشاهده کردند (۲۳). فعالیت ضدمیکروبی محلول ژلاتینی بیشتر به علت وجود زنجیره الیگوپپتیدی حاصل از آبکافت ژلاتین می‌باشد (۲۳). لوپز-کابالرو و همکاران (۲۰۰۵) گزارش دادند که پوشش حاوی کیتوزان و ژلاتین تأثیر ضدمیکروبی خوبی بر فلور باکتریایی گرم منفی در پیراشکی ماهی کاد داشته است (۱۶).

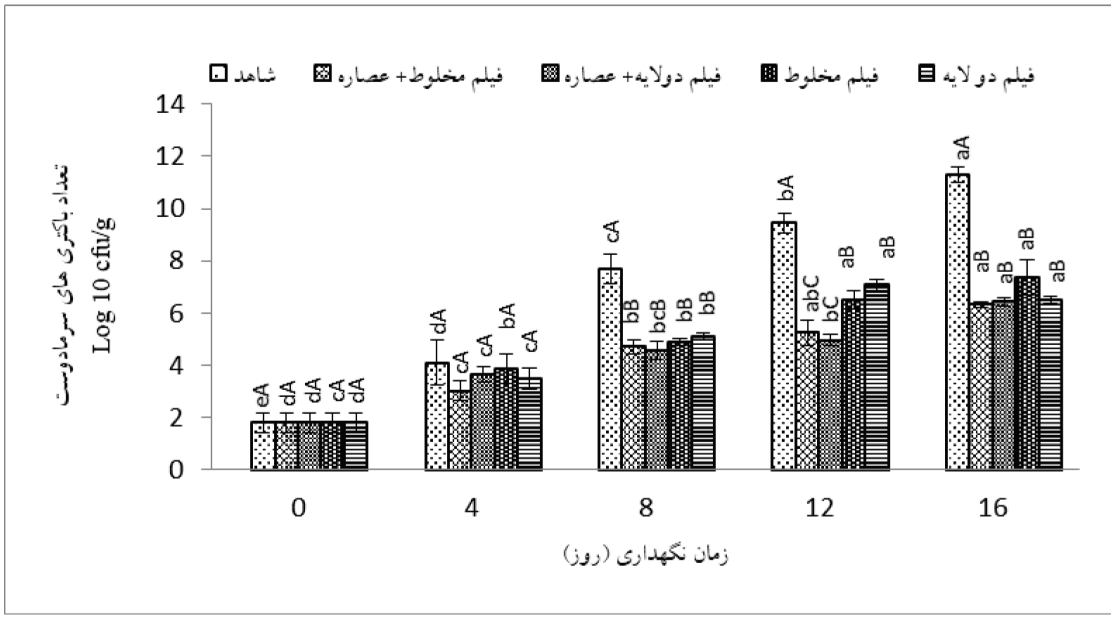
در تحقیق حاضر، محلول پوششی کیتوزان-ژلاتین با و بدون عصاره پوست انار بار باکتریایی کل و سرمادوست را کاهش داد ($p <0/05$). شایان ذکر است که خاصیت ضدمیکروبی محلول کیتوزان-ژلاتین با و بدون عصاره پوست انار در هر دو نوع روش پوشش‌دهی (مخلوط و دولایه) مشابه بودند ($p <0/05$).

در رابطه با خاصیت ضدمیکروبی فیلم‌های خوراکی کیتوزان در تحقیقات مختلف نتایج متناقضی گزارش شده است. گومز-استاکا و همکاران (۲۰۰۷) خاصیت ضدمیکروبی فیلم کیتوزان-ژلاتین را در نگهداری ماهی ساردین (*Sardina pilchardus*) دودی شده سرد مشاهده کردند (۱۰). اجاق و همکاران (۲۰۱۰) اعلام کردند که فیلم خالص کیتوزان در محیط آگار هیچ هاله بازدارندگی نداشته است در حالی که فیلم کیتوزان غنی شده با عصاره دارچین از خود خاصیت ضدمیکروبی نشان داد (۲۲). پردا و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که فیلم خالص کیتوزان ۲ درصد هیچ اثر ضد باکتریایی نداشت در حالی که فیلم کیتوزان-ژلاتین کاهش باکتری اشرشیا کلای را در پی داشته است (۲۳).

تفاوت معنی‌داری بین اثر ضدمیکروبی فیلم مخلوط و دولایه نیز مشاهده نشد ($p <0/05$). ویژگی ضدمیکروبی کیتوزان به شرایط و روش تهیه فیلم، فرمولاسیون ترکیب شده برای ساخت فیلم و همچنین میزان رهاسازی گروه‌های فعال آن بستگی دارد (۱۰).

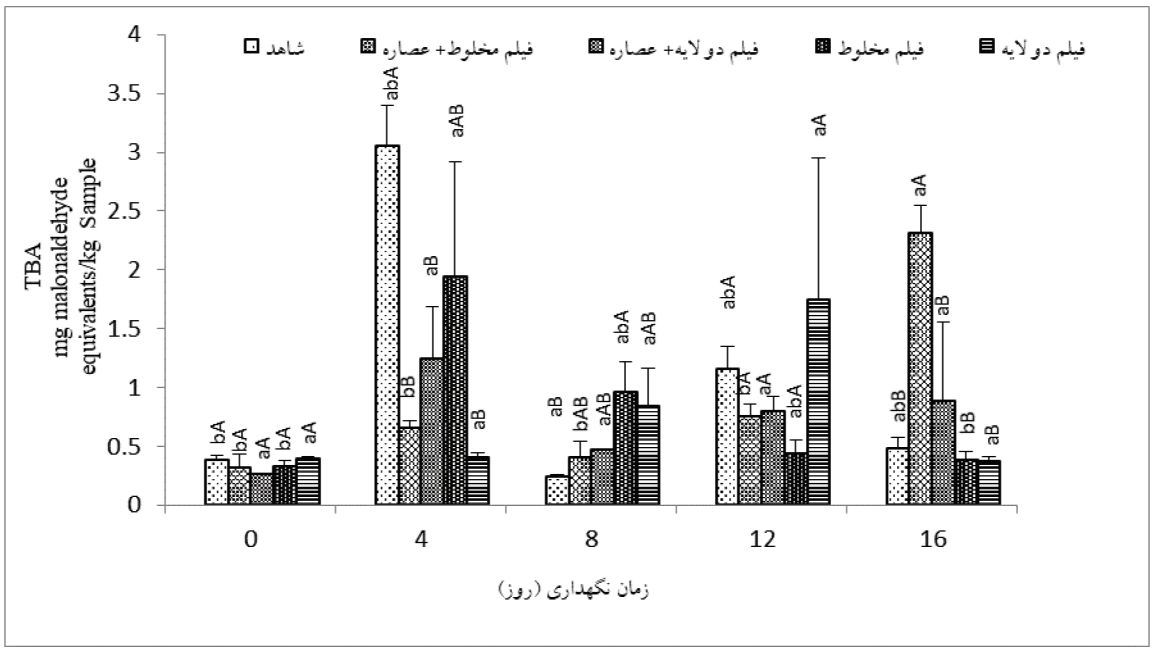
در شکل ۲ تغییرات میزان تیوباربیتوریک اسید (میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم) نمونه‌های تیمار شده با فیلم کیتوزان-ژلاتین دارای عصاره پوست انار یا فاقد آن در طول نگهداری ۱۶ روز در یخچال (۱±۴ درجه سانتی گراد) مشاهده می‌شود. میزان تیوباربیتوریک اسید در تیمارهای مختلف روز چهارم به طور معنی‌دار افزایش یافت سپس از روز ۸ به بعد روند کاهشی داشت. در نمونه شاهد میزان آن از ۰/۳۸ میلی‌گرم مالون آلدهید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه در روز صفر به ۰/۴۸ میلی‌گرم مالون آلدهید اکی والان بر کیلوگرم نمونه در روز ۱۶ افزایش یافت، البته در روز ۴ نگهداری میزان آن به ۳/۰۶ میلی‌گرم مالون آلدهید اکی والان بر کیلوگرم نمونه رسید. در تیمارهای دارای فیلم مخلوط و دولایه کیتوزان-ژلاتین در روز صفر به ترتیب ۰/۳۳ و ۰/۳۹ و در روز ۱۶ به ۰/۳۸ و ۰/۳۷ میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم رسید.





ادامه شکل در صفحه بعد

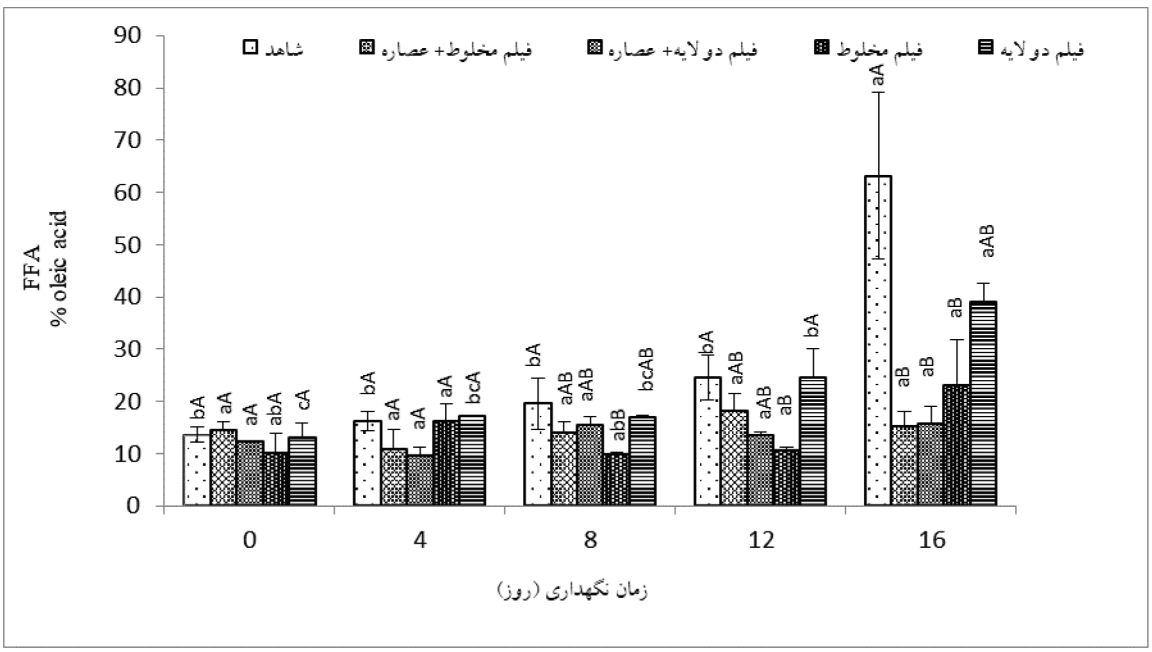
شکل ۱- تغییرات باکتری های مزوفیل، سرمادوست و انتروباکتریاسه در نمونه‌های شاهد و تیمارهای فیلم‌پیچی شده با و بدون عصاره پوست انار طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۶ روز. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می باشد (P<۰/۰۵). حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵).



شکل ۲- تغییرات تیوباربیتوریک اسید در نمونه‌های شاهد و تیمارهای فیلم‌پیچی شده با و بدون عصاره پوست انار طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۶ روز. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می باشد (P<۰/۰۵). حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵).

میزان این شاخص در تیمارهای فیلم مخلوط و دولایه کیتوزان-ژلاتین در ترکیب با عصاره پوست انار در روز صفر به ترتیب ۰/۳۲ و ۰/۲۶ و در روز ۱۶ نگهداری۲/۳۱ و ۰/۸۸ میلی‌گرم مالون آلدهید بر کیلوگرم را نشان داد. تیمارهای غوطه‌ور شده در فیلم دولایه کیتوزان- ژلاتین و تیمارهای غوطه‌ور در عصاره پوست انار همراه با فیلم دولایه کیتوزان-ژلاتین از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($p < ۰/۰۵$). مکانیسم آنتی‌اکسیدانی کیتوزان را می‌توان با فعالیت گروه‌های آمینوی اولیه کیتوزان توضیح داد. این عوامل فعال با گروه‌های آلدهیدی فرار حاصل از شکستن چربی‌ها طی اکسیداسیون (مثل مالون آلدهید) یک میکرواسفر پایدار تشکیل می‌دهد. ظرفیت شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی از دیگر خصوصیات کیتوزان است که آن را به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و طبیعی برای جلوگیری از اکسیداسیون چربی در غذاها در جهت افزایش عمر-ماندگاری آنها معرفی می‌کند (۱۸). لوپز-کابالرو و همکارن (۲۰۰۵) نیز قدرت شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی و یا ترکیب کیتوزان با چربی را علل آنتی‌اکسیدان بودن کیتوزان می‌داند (۱۶). فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پوست انار در کاهش میزان تیوباربیتوریک اسید عمدتاً به واسطه آنتوسیانین‌های موجود در پوست انار می‌باشد که از ترکیبات پلی فنولیکی و مسئول رنگ‌های قرمز، آبی و ارغوانی اکثر گل‌ها و میوه‌ها بوده، در دسته فلاونوئیدها طبقه‌بندی شده و به عنوان گروه مهمی از رنگدانه‌های موجود در طبیعت به حساب می‌آیند. به نظر می‌رسد که مکانیسم عمل آنتوسیانین‌ها در کاهش میزان تیوباربیتوریک اسید از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد و کند شدن فرآیند اکسیداسیون است. دواتکال و همکاران (۲۰۱۴) نیز گزارش کردند که افزودن عصاره پوست انار موجب کاهش اکسیداسیون می‌شود که نشان‌دهنده ارتباط معکوس بین محتوای فنولی و تیوباربیتوریک اسید می‌باشد (۶). لی و همکاران (۲۰۰۶) نیز نشان دادند که عصاره پوست انار ظرفیت آنتی اکسیدانی قابل توجه بالاتر و ظرفیت مهارکنندگی و بازدارندگی بالایی در برابر آنیون سوپر اکسید، هیدروکسیل و رادیکال پروکسی دارد. پیشنهاد شده که حداکثر میزان قابل قبول تیوباربیتوریک اسید برای کیفیت مطلوب ماهی (منجمد، یخچال‌گذاری شده و یا نگهداری شده در یخ) ۵ میلی‌گرم مالون آلدهید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه باشد در حالی که تا ۸ میلی‌گرم مالون آلدهید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه هم قابل مصرف است (۲۵). در بررسی حاضر میزان تیوباربیتوریک اسید برای فیلم مخلوط، فیلم دولایه، فیلم مخلوط به همراه عصاره، فیلم دو لایه به همراه عصاره و نمونه شاهد در انتهای دوره نگهداری به ترتیب ۰/۳۸، ۰/۳۷، ۲/۳۱، ۰/۸۸ و ۰/۴۸ میلی‌گرم مالون آلدهید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه بدست آمد.

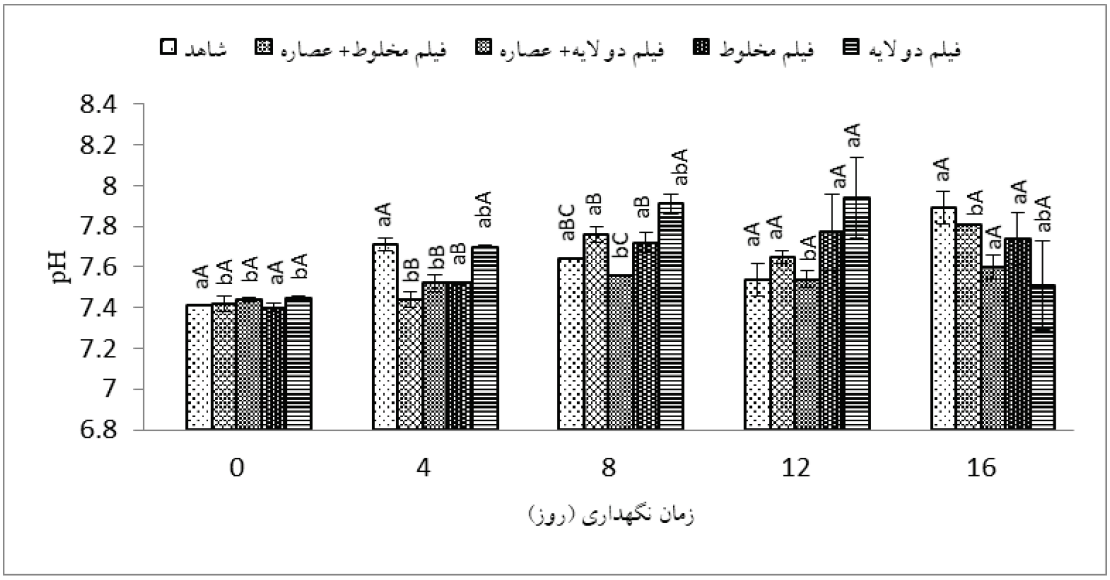
در شکل ۳ تغییرات میزان اسیدهای چرب آزاد (درصد اولئیک اسید) تیمارهای مختلف فیلم‌پیچی شده دارای عصاره پوست انار یا فاقد آن در



شکل ۳- تغییرات اسیدهای چرب آزاد در نمونه‌های شاهد و تیمارهای فیلم‌پیچی شده با و بدون عصاره پوست انار طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۶ روز. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می باشد ($P<۰/۰۵$). حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می باشد ($P<۰/۰۵$).

طول نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سانتی گراد) در مدت ۱۶ روز را نشان می‌دهد. میزان این شاخص در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. در نمونه شاهد میزان اسیدهای چرب آزاد در روز صفر ۱۳/۶۱ درصد اولئیک اسید بود که به ۶۳/۱۱ درصد اولئیک اسید در روز ۱۶ افزایش یافت. تیمارهای دارای فیلم مخلوط و دولایه کیتوزان –ژلاتین به ترتیب دارای ۱۰/۲۰ و ۱۳/۰۶ درصد الوئیک اسید در روز صفر بودند، که در روز ۱۶ به ۲۳/۱۱ و ۳۹/۷۱ درصد الوئیک اسید افزایش یافتند. در روز صفر میزان این شاخص در تیمارهای فیلم مخلوط و دولایه کیتوزان-ژلاتین در ترکیب با عصاره پوست انار به ترتیب ۱۴/۶۲و ۱۲/۳۳ بود که به ۱۵/۳۸ و ۱۵/۸۳ درصد اولئیک اسید در روز ۱۶ نگهداری رسید. میزان متوسط اسیدهای چرب آزاد نمونه شاهد بالاترین میزان را در روزهای مختلف نگهداری نشان داد. دلیل پایین‌تر بودن میزان اسیدهای چرب آزاد در تیمارهای دارای فیلم را شاید بتوان به فعالیت شلاته‌کنندگی کیتوزان نسبت داد چرا که کیتوزان به عنوان عامل شلاته کننده با پاره‌ای از فلزات پیوند یافته و لذا از رشد میکروبی جلوگیری می‌کند، همچنین کیتوزان به عنوان بازدارنده فعالیت آنزیم‌های مختلف شناسایی شده است (۱). اجاق (۱۳۸۹) در تحقیقات خود مشاهده کرد که میزان اسیدهای چرب آزاد فیله‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای پوشش کیتوزان-دارچین در مقایسه با انواع بدون پوشش طی زمان‌های نگهداری در یخچال به شکل معنی‌داری کمتر بود ($p< ۰/۰۵$) (۱). اما گومز-استاکا و همکاران (۲۰۱۰) هیچ تفاوت معنی‌داری بین میزان اسید چرب آزاد نمونه‌های دلفین ماهی (*Coryphaena hippurus*) دارای فیلم کیتوزان-ژلاتین و نمونه شاهد مشاهده نکردند. در بررسی حاضر، بین نمونه شاهد و انواع دارای پوشش و فیلم تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p <۰/۰۵$) اما بین نمونه‌های دارای فیلم و نمونه‌های پوشش‌دهی شده تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. همچنین فعالیت ضدباکتریایی عصاره پوست انار، موجب کاهش فعالیت میکروبی و متعاقباً کاهش ترشح و تأثیر آنزیم‌های آزاد شده از آن‌ها بر روی چربی و لیپیدهای فیله ماهی شده و در نهایت موجب کاهش اکسیداسیون چربی می‌شود. همانطور که اختر و همکاران گزارش کردند که عصاره پوست انار منبع غنی از ترکیبات پلی فنلی از جمله پونیکالاجین A، پونیکالاجین B، اسید گالیک، اسید الاژیک، اسید کلروژنیک، کافئیک اسید، کاتچین، اپی کتیچین، روتین، کوئرستین و گالانگال بوده، که اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی دارند (۲).

در شکل ۴ تغییرات شاخص pH تیمارهای مختلف فیلم پیچی شده با فیلم کیتوزان – ژلاتین با و بدون عصاره پوست انار در مدت ۱۶ روز نگهداری در یخچال را نشان می‌دهد. میزان pH در تیمارهای مختلف با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. pH تیمار شاهد در روز صفر ۷/۴۱ بود که در روز ۱۶ به ۷/۸۹ افزایش یافت. تمام نمونه‌های ماهی مقدار این شاخص در طول دوره افزایش پیدا کرد. افزایش pH با گذشت زمان نگهداری را می‌توان به فعالیت آنزیم‌های اتولیتیک و باکتری‌های پروتئولیتیک فاسد کننده ماهی نسبت داد (۱۴). در بررسی حاضر با افزایش میزان بازهای ازته فرار در طول دوره انتظار چنین روندی برای



شکل ۴- تغییرات pH در نمونه‌های شاهد و تیمارهای فیلم‌پیچی شده با و بدون عصاره پوست انار طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۶ روز. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می باشد ($P<۰/۰۵$). حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می باشد ($P<۰/۰۵$).

pH انتظار می‌رفت. نتایج مشابهی توسط فان و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شد. آنها مشاهده کردند که میزان pH نمونه‌های کپور نقره‌ای دارای پوشش کیتوزان افزایش کندتری نسبت به نمونه‌های شاهد داشت و بیان کردند که وجود کیتوزان، فعالیت پروتئازهای درونی را کاهش می‌دهد که بدین ترتیب تولید بازهای ازته فرار مثل آمونیاک و تری متیل آمین حاصل از آنزیم‌های میکروبی یا درونی خود ماهی کاهش پیدا می‌کند (۸). میزان pH در نمونه شاهد و تیمار شده ماهی شوریده بلانگر تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. موهبی و شهبازی در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که میگو فیلم پیچی شده با کیتوزان-ژلاتین با و بدون عصاره پوست انار از افزایش معنی‌دار میزان pH جلوگیری می‌کنند (۱۹).

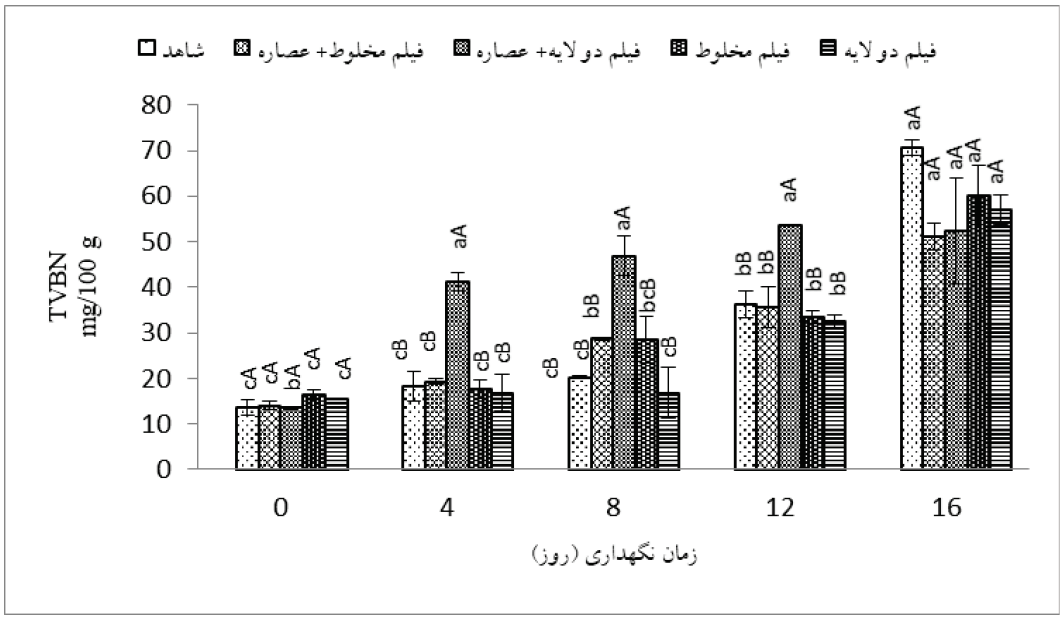
نتیجه‌گیری کلی

با توجه به تقاضای مصرف‌کنندگان برای دسترسی به مواد غذایی با کیفیت بالا و نگرانی آنها به دلایل مشکلات ناشی از مصرف نگهدارنده‌های مصنوعی و نیز نگرانی‌های زیست محیطی ناشی از تجمع پلیمرهای مصنوعی، تکنولوژی استفاده از پوشش‌های با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی بالا می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. لذا در تحقیق حاضر اقدام به تهیه فیلم کیتوزان-ژلاتین نموده و از آن در نگهداری فیله ماهی شوریده بلانگر در شرایط نگهداری در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد تا محصولی با کیفیت بالاتر و ایمن‌تر به دست مصرف‌کنندگان رسانده شود. بطور کلی نتایج تحقیق حاضر به ترتیب زیر بودند:

نتایج مطالعات میکروبی کل، سرمادوست و انتروباکتریاسه حاکی از پایین‌تر بودن تعداد این باکتری‌ها در تیمارهای دارای فیلم کیتوزان-ژلاتین با عصاره پوست انار بود. فیلم دولایه و مخلوط کیتوزان-ژلاتین در مقایسه با نمونه‌های شاهد تأثیر آشکاری بر کاستن از بار آلودگی میکروبی فیله شوریده بلانگر داشته است.

۱- فیلم‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را به همراه عصاره پوست انار را با کمتر بودن شاخص‌های تیوباربیتوریک اسید، اسیدهای چرب آزاد و pH در نمونه‌های دارای فیلم نسبت به نمونه شاهد نشان دادند.

۲- بطور کلی نتایج تحقیق حاضر تکنولوژی استفاده از فیلم‌های خوراکی متشکل از کیتوزان و ژلاتین را در حفظ کیفیت اولیه و افزایش ماندگاری فیله شوریده بلانگر طی نگهداری در یخچال مورد تأیید قرار می‌دهد. لذا ترکیب کیتوزان و ژلاتین چه به عنوان فیلم خوراکی و چه به صورت مخلوط و یا دولایه می‌تواند تقاضای مصرف‌کنندگان به فرآورده‌های دریایی عاری از مواد شیمیایی را تأمین نموده و نیاز آنها به مواد غذایی با کیفیت بهتر و ایمن‌تر را تأمین نماید. از این رو فیلم کیتوزان-ژلاتین نوعی از بسته‌بندی فعال ایجاد می‌کند که می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده ایمن برای ماهی در دوره نگهداری در یخچال عمل کند.



شکل ۵- تغییرات بازهای ازته فرار در نمونه‌های شاهد و تیمارهای فیلم‌پیچی شده با و بدون عصاره پوست انار طی نگهداری در یخچال به مدت ۱۶ روز. حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می باشد ($P<0/05$). حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می باشد ($P<0/05$).

پاورقی‌ها

1 - Butylated hydroxy anisole
2 - Butylated hydroxy toluene
3 - Chelating agents
4 - Swelling
5 - Total bacterial count
6 - Free Fatty Acids (FFA)
7 - Nutrient Agar
8 - Violet Red Bile Glucose Agar
9 - Alkaloids
10 - Tannins
11 - Gallotannins
12 - Catechins
13 - Flavonols
14 - Procyanidins
15 - Ellagic acid
16 - Oligopeptide

منابع مورد استفاده

1- Ojagh, S.M. 2010. Effect of chitosan coating enriched with cinnamon essential oil on shelf life and quality of refrigerated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. A thesis presented for Ph.D degree. Faculty of Natural Resources and Marine Sciences. Tarbiat Modares University. 105 pages.

2- Akhtar, S., T. Ismail, D. Fraternale and P. Sestili. 2015. Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. *Food Chemistry* 174: 417-425.

3- Alsaggaf, M.S., S.H. Moussa and A.A. Tayel. 2017. Application of fungal chitosan incorporated with pomegranate peel extract as edible coating for microbiological, chemical and sensorial quality enhancement if Nile tilapia fillets. *International Journal of Biological Macromolecules* 99: 499-505.

4- Arvanitoyannis, I.S., A. Nakayama and S. Aiba.1998. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate polymers* 37: 371–382.

5- Aubourg, S. P., A. Rodríguez and J. Gallardo. 2005. Rancidity development during frozen storage of mackerel (*Scomber scombrus*): Effect of catching season and commercial presentation. *European Journal of Lipid Science and Technology* 107: 316–323.

6- Devatkal S.K, P. Jaiswal, S.N. Jha, R. Bharadwaj, and K.N. Viswas. 2013. Antibacterial activity of aqueous extract of pomegranate peel against *Pseudomonas stutzeri* isolated from poultry meat. *Journal of Food Science and Technology* 50:555-560.

7- Falguera, V., J.P. Quintero, A. Jimenez, J.A. Munoz and A. Ibarz. 2011. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in food science and technology* 22: 292-303.

8- Fan, W., J. Sun, Y. Chen, J. Qiu, Y. Zhang and Y. Chi. 2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry* 115: 66–70.

9- Fernandez-Saiz, P., J.M. Lagaron and M.J. Ocio. 2009. Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. *Food Hydrocolloids* 23: 913–921.

10- Gomez-Estaca, J., A. Lopez de Lacey, M.E. Lopez-Caballero, M.C. Gomez-Guillen and P. Montero. 2010. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology* 27: 889-896.

11- Goulas, A.E. and M.G. Kontominas. 2005. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (Scomber japonicus): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry* 93: 511–520.

12- Hayrapetyan, H., W.C. Hazeleger and R.R Beumer. 2012. Inhibition of Listeria monocytogenes by pomegranate (Punica granatum) peel extract in meat pate at different temperatures. *Food Control* 23: 66-72.

13- Jeon, C.O., Y.V.A. Kamil and F. Shahidi. 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of Herring and Atlantic Cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5167-5178.

14- Kilincceker, O., I.S. Dogan and E. Kucukoner. 2009. Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. LWT - *Food Science and Technology* 42: 868–873.

15- Li, J., X. He, M. Li, W. Zhao, L. Liu and X. Kong. 2015. Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC. *Food Chemistry* 176: 7-11.

16- Lopez-Caballero, M.E., M.C. Gomez-Guillen, M. Pérez-Mateos and P. Montero. 2005. A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids* 19: 303–311.

17- Martucci, J.F. and R.A Ruseckaite. 2010. Biodegradable three-layer film derived from bovine gelatin. *Journal of Food Engineering* 99: 377–383.

18- Mohan, C.O., C.N. Ravishankar, K.V. Lalitha and T.K. Srinivasa Gopal. 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.

19- Mohebi, E., and Y. Shahbazi. 2017. Application of chitosan and gelatin based active packaging films for peeled shrimp preservation: A novel functional wrapping design. *LWT-Food Science and Technology* 76: 108-116.

20- No, H.K., S.P. Meyers, W. Prnyawiwatkul and Z. Xu. 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. *Journal of Food Science* 72: R87- R100.

21- Nowzari, F., B. Shábanpour and S.M. Ojagh. 2013. Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry* 141: 1667-1672.

22- Ojagh, S.M., M. Rezaei, S.H. Razavi and S.M.H. Hosseini. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry* 120: 193-198.

23- Pereda, M., A.G. Ponce, N.E. Marcovich, R.A. Ruseckaite and J.F. Martucci. 2011. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids* 25: 1372-1381.

24- Rivero, S., M.A. Garcia and A. Pinotti. 2009. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Food Engineering* 9: 531–539.

25- Sallam, K.I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control* 18: 566–575.

26- Shakila, R., G. Jeyasekaran, S. Vijayalakshmi. 2005. Effect of vacuum packaging on the quality characterristics of seer fish (*Scomberomorus commersonii*) chunks during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology* 42:438-443.

27- Siripatrawan, U., and S. Noipha. 2012. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids* 27: 102-108.

28- Suvanich, V., M.L. Jahncke and D.L. Marshall. 2000. Changes selected chemical quality characteristics of channel catfish frame mince during chill and frozen storage. *Food Science* 65: 24-29.

29- Woyewoda, A.D., S.J. Shaw, P.J. Ke and B.G. Burns. 1986. Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. *Canadian Technical Report of Fish and Aquatic Science* 1448.

30- Yuan, G., H. Lv, W. Tang, X. Zhang and H. Sun. 2016. Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. *Food Control* 59: 818-823.

31- Zarei, M., Z. Ramezani, S. Ein□Tavasoly and M. Chadorbaf. 2015. Coating effects of orange and pomegranate peel extracts combined with chitosan nanoparticles on the quality of refrigerated silver carp fillets. *Journal of Food Processing and Preservation* 39: 2180-2187.