

اثر پوشش کیتوزان همراه با ناتامایسین بر کیفیت تخم ماهی سفید دریای خزر

(*Rutilus frisii kutum*) طی نگهداری در دمای یخچال

یاسین مطلبی^۱، سید مهدی اجاق^{۱*}، عباسعلی مطلبی^۲، رضا سفری^۳

*Mahdi_ojagh@yahoo.com

۱- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
 ۲- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
 ۳- گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۵

چکیده

اثر پوشش کیتوزان (با وزن مولکولی متوسط) همراه با ناتامایسین بر کیفیت تخم ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) (تیمار شده با نمک ۴ درصد) طی نگهداری در دمای یخچال (1 ± 4 درجه سانتی گراد) در طی یک دوره ۹۰ روزه مورد بررسی قرار گرفت. محلول کیتوزان ۱٪ وزنی/حجمی و ترکیب کیتوزان-ناتامایسین (۱٪ وزنی/حجمی-۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم تخم) برای پوشش استفاده شد. تیمار شاهد و تیمارهای دارای پوشش در دوره های ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روزه مورد ارزیابی شیمیایی (مجموع ازت فرار، عدد پراکسید و تیوباربتوریک اسید)، میزان نمک باقیمانده و pH قرار گرفتند. نتایج نشان داد که پوشش کیتوزان در مقایسه با نمونه فاقد پوشش کیفیت نگهداری را افزایش داد. پوشش کیتوزان همراه با ناتامایسین نسبت به پوشش کیتوزان برای پارامترهای شیمیایی محافظت بهتری را فراهم نمود. میزان باقیمانده نمک برای تمام تیمارها کمتر از ۲ درصد مشخص شد. این نتیجه حاصل شد که ترکیب پوشش کیتوزان و ناتامایسین ۱۰ میلی گرم بر هر کیلوگرم تخم زمان ماندگاری تخم ماهی سفید را افزایش داد.

کلمات کلیدی: ماهی سفید، کیتوزان، ناتامایسین، زمان ماندگاری

* نویسنده مسئول

مقدمه

ماهی و فرآورده های شیلاتی دارای ارزش تغذیه ای بسیار بالایی بوده و نقش بسزایی در سلامت مردم در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته ایفا می کنند (FAO, 2014). ماهی به لحاظ قابلیت هضم خوب، محتوای بالای اسیدهای چرب غیر اشباع دارای چند پیوند دوگانه (خصوصاً امگا-۳ و امگا-۶) و همچنین پروفایل اسیدهای آمینه قابل مقایسه با سایر مواد غذایی می باشد (Gómez-Estaca *et al.*, 2009). اما با این وجود، ماهی به لحاظ داشتن چربی و پروتئین نسبتاً بالا، pH خنثی و وجود آنزیم های اتولیتیک، پتانسیل فساد شیمیایی و میکروبی را دارا می باشد. بنابراین یکی از دغدغه های اصلی در تولید و فرآوری محصولات شیلاتی مسئله نگهداری و افزایش زمان ماندگاری آن می باشد. در روش سنتی از دمای انجماد (عموماً ۱۸- درجه سانتیگراد) جهت نگهداری ماهی استفاده شده که این فرآیند باعث کاهش ارزش کیفی ماهی مشابه سایر محصولات غذایی شده و از اینرو توجه بیشتر به سمت حفظ تازگی و کیفیت محصول از طریق نگهداری در دمای یخچال و استفاده از آن در کوتاه مدت می باشد که در حالت اخیر موضوع استفاده از مواد نگهدارنده مطرح میگردد. برخی از نگهدارنده های شیمیایی نظیر سوربات، اسید بوریک و بوراکس و متابی سولفیت جهت فرآوری، افزایش زمان ماندگاری و ارتقاء خواص حسی محصولاتی نظیر تخم ماهی خاوباری و قزل آلا و همچنین بافت میگو مورد استفاده قرار میگیرند ولی با این وجود برخی از کشورهای خریدار این محصولات تمایل چندانی به استفاده از مواد نگهدارنده ذکر شده نشان نداده و برخی از کشورها مثل آمریکا اسید بوریک و بوراکس را از لیست مواد نگهدارنده خود خارج نموده اند. یکی از معایب اصلی نگهدارنده های شیمیایی جهش و سرطانزایی بوده که در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است. بنابراین ضرورت استفاده از نگهدارنده بیولوژیک که فاقد عوارض جانبی بوده و از طرف دیگر دارای ویژگیهای ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی باشند احساس میگردد. از مهمترین این نگهدارنده ها میتوان به متابولیت های میکروبی (باکتریوسین ها، لاکتوپراکسیدازها)، عصاره و اسانس های گیاهی اشاره کرد که علاوه بر اثرات

مهارکننده بر رشد باکتریهای گرم مثبت و منفی، فرآیند فساد شیمیایی را به تاخیر انداخته و علاوه بر بهینه نمودن خواص ارگانولپتیک، باعث افزایش زمان ماندگاری فرآورده می شوند.

پوشش ها و فیلم های بسته بندی به طور تجاری مورد مصرف قرار می گیرند و سبب کاهش از دست رفتن رطوبت، ممانعت از آسیب فیزیکی، بهبود ظاهری محصول و حمل مواد سازنده غذا می شوند. فیلم ها و پوشش های ساخته شده از مواد ضد میکروبی طبیعی دارای مزایایی از جمله پخش کامل مواد ضد میکروبی و عدم انتقال آن هستند. مواد ضد میکروبی طبیعی مورد پذیرش صنعت و مصرف کننده هستند و ممکن است محدودیت های کمتری از ترکیبات جدید مورد استفاده در مواد غذایی داشته باشند. بدلیل ترکیب مواد ضد میکروبی، عملکرد این پوشش ها می تواند در حمایت از محصول غذایی در برابر فساد میکروبی و افزایش طول عمر آن مؤثر باشد. بعلاوه، پوشش های ضد میکروبی خوراکی دارای پتانسیل افزایش ایمنی مواد غذایی نیز هستند. امروزه عوامل ضد میکروبی یا به اصطلاح آنتی باکتریال به طور مستقیم به غذاها اضافه می شوند. ولی به دلیل وجود مواد دیگری در غذا ممکن است اثر آنها کمتر شود. با توجه به اینکه اغلب آلودگی ها در سطح مواد غذایی اتفاق می افتد در چنین مواردی استفاده از پوشش ها و فیلم های خوراکی حاوی مواد ضد باکتری می تواند کارایی بالاتری نسبت به افزایش مواد آنتی باکتریال به طور مستقیم بر غذا داشته باشد. انتخاب مواد پوششی مناسب توسط خواص درون زاد (pH، آب فعال و ترکیبات) و فاکتورهای برون زاد (دما، رطوبت نسبی در طول فرآوری و انبار) تحت تأثیر قرار می گیرد. مواد سازنده پوشش که در حال حاضر مورد استفاده قرار می گیرند یا در حال بررسی هستند، شامل پروتئین ها، پلی ساکاریدها، لیپیدها، واکس ها و رزین ها است (Rejane *et al.*, 2009; Ojagh *et al.*, 2010).

کیتوزان یکی از بهترین پلیمرهای زیستی است که تاکنون برای تهیه فیلم ها و پوشش های خوراکی به کار رفته است. این ماده به عنوان یک منبع مهم تجدیدپذیر و دومین پلیمر زیستی طبیعی فراوان بعد از سلولز بوده و از N-استیل زدایی قلیایی جزئی کیتین بدست می آید. کیتوزان

داده و مقدار مصرف قابل قبول روزانه آنرا ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تعیین کرد (JECFA, 2001). ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) یکی از مهمترین گونه ماهیان استخوانی دریای خزر بوده که بیشترین صید دریای خزر را به خود اختصاص می دهد. میزان صید این ماهی (نر و ماده) در سال ۱۳۹۵ در استانهای شمالی ۶۰۱۹۸ قطعه می باشد (سازمان شیلات ایران). تخمدان ماهی سفید بین ۱۵ تا ۲۰ درصد وزن کل ماهی را تشکیل داده که بسته به میزان و مرحله رسیدگی تخمک، وضعیت تغذیه و بارور بودن دو طرف تخمدان حاوی تخمک، متغیر می باشد. با توجه به آمار ذکر شده فوق و همچنین درصد وزن تخمدان، میزان تخم استحصالی ۶۰۳۷ کیلوگرم می باشد که عمدتاً بصورت سنتی مورد استفاده قرار گرفته و یا نمک سود شده و تحت نام "اشپل ماهی" در رستوران های استانهای شمالی خصوصاً گیلان ارائه می گردد.

هدف از انجام این تحقیق ارزیابی ترکیب کیتوزان و ناتامایسین بر روند تغییرات میکروبی و شیمیایی تخم رسیده و فرآوری ماهی سفید در زمانهای صفر تا ۹۰ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد بوده تا با بهره گیری از مواد نگهدارنده بیولوژیک اولاً غلظت نمک سدیم جهت عمل آوری را کاهش داده ثانیاً جایگزین مناسبی جهت نگهدارنده های شیمیایی معرفی نمود.

مواد و روش

تهیه مواد

کیتوزان با وزن مولکولی متوسط و درجه استیل زدایی بیشتر از ۷۵ درصد از شرکت Sigma- Aldrich آلمان، ناتامایسین از شرکت pimaripro اسپانیا و ماهی سفید از شرکتهای تعاونی پره استان مازندران تهیه شدند. سایر مواد شیمیایی با درجه آزمایشگاهی بوده و از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

تهیه پوشش کیتوزان

ابتدا محلول اسیداستیک یک درصد حجمی/حجمی تهیه و سپس محلول کیتوزان یک درصد وزنی/حجمی در اسید مذکور تهیه و به مدت ۳ ساعت با استفاده از هیتر مگنت (فاطر ریزپرداز، ایران) در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد

با ویسکوزیته و وزن مولکولی کمتر و درجه استیل زدایی بالا، خواص میکروبی و آنتی اکسیدانی بسیار خوبی داشته و این ویژگی در pH پایین، مشهودتر می باشد. کیتوزان به دلیل ماهیت غیر سمی، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی، خاصیت تشکیل فیلم، زیست سازگاری (Biocompatibility) و زیست تخریب پذیری (Biodegradability) به عنوان یکی از افزودنیهای غذایی طبیعی مورد توجه قرار گرفته است (Lopez- Caballero *et al.*, 2005; Patria, 2013). فعالیت ضدباکتریایی کیتوزان و مشتقات آن به خوبی اثبات شده است. با اینحال، گرچه چندین مکانیسم پیشنهاد شده، اما مکانیسم عمل دقیق آن هنوز نامشخص است. کیتوزان به خاطر خاصیت بازدارندگی رشد بسیاری از باکتریهای بیماریزا و قارچها در فیلمهای ضد میکروبی و پوششهای خوراکی مورد استفاده قرار می گیرد و توجه زیادی را بعنوان نگهدارنده با منشاء طبیعی به خود جلب کرده است (Papineau *et al.*, 1991). به دلیل خصوصیات ضدباکتریایی و قارچی کیتوزان کاربردهای زیادی از آن در بسته بندیها گزارش شده است. علاوه بر تاثیرات ضد مخمری، ضد قارچی و باکتریهای گرم مثبت تاثیر کیتوزان بر باکتریهای گرم منفی مثل اشریشیاکلی، ویبریو، شیکلا دیسانتریه، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی موریوم نیز گزارش شده است (Sagoo, 2003; Sagoo *et al.*, 2002a; Sagoo *et al.*, 2002b). ناتامایسین یک متابولیت میکروبی است که از باکتری استرپتومایسس ناتالنیسیس ترشح میشود. این ماده در حقیقت یک نگهدارنده بیولوژیک بوده و بطور گسترده بعنوان عامل ضد کپک و مخمر در انواع مواد غذایی مورد استفاده قرار میگیرد. ناتامایسین در دوز پائین تر (۱۰ تا ۲۰ میلی گرم در لیتر) خاصیت میکروب کشی بیشتری را نشان میدهد. ناتامایسین به طور غیر قابل بازگشت به ارگوسترول غشای سلولی قارچها متصل شده و نفوذپذیری آنرا از بین برده و در نهایت باعث مرگ سلولی میشود (Welscher *et al.*, 2008). کمیته تخصصی مشترک FAO/WHO در مورد افزودنیهای مواد غذایی، ایمنی ناتامایسین را در سال ۲۰۰۱ مورد بررسی نهایی قرار

با توجه تیمارهای انتخاب شده (۴ تیمار)، ۳ تکرار، و ۴ زمان (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز)، در مجموع ۴۸ نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت.

پارامترهای مورد بررسی عدد پراکسید (PV^۱)

برای تعیین PV، ابتدا ۱۵ گرم از تخم عمل آوری شده ماهی را به ۳۰ میلی لیتر کلروفرم اضافه کرده و پس از تکان دادن نسبی، مجدداً ۳۰ میلی لیتر کلروفرم و سپس ۶۰ میلی لیتر متانول به مخلوط اولیه اضافه گردید. مخلوط نهایی به مدت ۲۴-۱۲ ساعت در شرایط آزمایشگاه (۲۳±۲ درجه سانتی گراد) قرار داده شده و پس از آن، ۳۶ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شده و برای ۲ ساعت دیگر تا تشکیل ۳ فاز مجزا، در شرایط اولیه قرار داده شد. ۲۰ میلی لیتر از فاز پایین، به ظرف دیگر انتقال داده شده و ۲۵ میلی لیتر از اسید استیک کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسید استیک ۳:۲)، ۰/۵ میلی لیتر محلول یدور پتاسیم اشباع و ۳۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شده و به مدت ۱ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. در مرحله بعد، ۰/۵ میلی لیتر معرف نشاسته ۱٪ به آن اضافه شده و به شدت تکان داده شد. ید آزاد شده، باعث تغییر رنگ محلول شده که با محلول تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال، تا بی رنگ شدن محلول یا ظهور رنگ شیری و شفاف شدن فاز بالایی روغن تیتیر شد (Egan et al., 1997). سپس با استفاده از رابطه زیر، میزان پراکسید (بر حسب میلی اکی والان گرم در کیلوگرم چربی) مشخص گردید.

$$PV = \frac{100 \times \text{نرمالیت} \times \text{حجم مصرفی تیوسولفات}}{\text{وزن نمونه روغن}}$$

تیوباربتوریک اسید (TBA)

برای اندازه گیری TBA^۲، ابتدا ۲۰۰ میلی گرم از تخم ماهی به بالن ۲۵ میلی لیتری منتقل و با استفاده از ۱- بوتانول به حجم رسانده شد. بعد از این مرحله، ۵ میلی لیتر از مخلوط فوق به لوله فالدکون منتقل و ۵ میلی لیتر از معرف TBA به آن افزوده شد. سپس لوله‌ها در حمام آب

شیک گردید. پس از این مرحله، گلیسرول به میزان ۰/۷۵ گرم به ازاء هر گرم کیتوزان به محلول اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه دیگر در دمای اتاق شیک شد. سوسپانسیون حاصله با استفاده کاغذ صافی واتمن شماره ۳ صاف شده و در مرحله نهایی نیز ناتامایسین با دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر از یک درصد کیتوزان، به محلول اولیه اضافه شده و در دور ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه با استفاده از دستگاه هموژن کننده با دور بالا (IKA T25 digital Ultra- Turrax, Germany) هموژن گردید (Ojagh et al., 2010).

عمل آوری تخم ماهی سفید

پس از خارج نمودن تخمدان از ماهی سفید، ابتدا با استفاده از الک پرده تخمدان جدا شده و با آب سرد (۱۰ درجه) شستشو داده شده و آب اضافی از آن خارج گردید. بر اساس وزن تخم ماهی، نمک سدیم به مقدار ۴ درصد اضافه شده (با توجه به تستهای اولیه انجام شده) و کاملاً با تخم مخلوط شده و شوراب آن خارج شد. در مرحله بعد تخم عمل آوری شده، به مدت یک دقیقه در سوسپانسیون های تهیه شده از کیتوزان و ناتامایسین شناور شده تا مواد مذکور بخوبی جذب تخم شوند. پس از این مرحله نیز سوسپانسیون اضافی خارج شده و تخم حاصله به قوطیهای ۵۰ گرمی اضافه شد. در این مرحله هواگیری با استفاده از دستگاه وکیوم انجام شده و قوطیها در دمای ۴ درجه به مدت ۳ ماه از نظر پارامترهای شیمیایی و میکروبی مورد آزمایش قرار گرفتند (Fajardo et al., 2010; Ojagh et al., 2010).

تیمارهای مورد استفاده

- ۱- تخم عمل آوری با نمک ۴ درصد + سوسپانسیون کیتوزان یک درصد
- ۲- تخم عمل آوری با نمک ۴ درصد + سوسپانسیون کیتوزان یک درصد + ناتامایسین ۵ میلی گرم بر کیلوگرم
- ۳- تخم عمل آوری با نمک ۴ درصد + سوسپانسیون کیتوزان یک درصد + ناتامایسین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم
- ۴- تخم عمل آوری شده با نمک ۴ درصد بدون هیچگونه ماده نگهدارنده

¹ Proxide value

² Thiobarbituric acid

متر دیجیتالی (TOA pH meter, HM 20S, Japan) اندازه گیری شده است (Abdollahi *et al.*, 2014).

شوری

برای اندازه گیری باقیمانده، ۲۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره ۰/۱ نرمال و ۲۰ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ به ۱ گرم از تخم ماهی سفید اضافه گردید. محتویات مذکور به مدت ۱۵ دقیقه به آرامی جوشانده شده سپس سرد شده و به آن ۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۵ میلی لیتر معرف فریک اضافه شد. محلول حاصله با تیوسیانات آمونیوم ۰/۱ نرمال تا ایجاد رنگ قهوه ای تیترا گردید (استاندارد شماره ۱۸۶، ۱۳۷۱). باقیمانده نمک در نمونه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$W = \frac{(A - T) \times 0.00585 \times 100}{W}$$

کلرید سدیم تخم ماهی

A: میلی لیتر نیترات نقره مصرفی ۰/۱ نرمال برای میزان نمک موجود

B: میلی لیتر تیوسیانات آمونیوم مصرفی

W: وزن نمونه

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله با نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام گرفت. ابتدا بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف - اسمیرنوف و همگنی واریانس داده‌ها با آزمون لون انجام شده و به منظور ارزیابی پارامترهای مختلف شیمیایی و میکروبی در زمانهای مختلف از تست‌های آنالیز واریانس یک طرفه و جهت مقایسه واریانس‌ها و ارزیابی معنی‌دار بودن داده‌ها، از تست دانکن استفاده شد.

نتایج

pH

گرم با دمای ۹۵°C، به مدت ۲ ساعت قرار داده شده و بعد از آن در دمای محیط سرد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر، میزان جذب آنها (As) در ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد آب مقطر (Ab) قرائت شد. با استفاده از رابطه زیر، میزان TBA (بر حسب میلی گرم در هر کیلوگرم از تخم) محاسبه گردید (Egan *et al.*, 1997; Namulema *et al.*, 1999)

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

As: میزان جذب

Ab: شاهد آب مقطر

مجموع ازت فرار (TVB-N)

برای اندازه گیری TVB-N^۳، ابتدا ۲ گرم از اکسید منیزیم به ۱۰ گرم تخم فرآوری شده ماهی اضافه شده و سپس ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر و ۲ قطره اکتانول به محتویات اولیه افزوده شد. سیستم کج‌دال نصب شده و در محل خروجی آن، یک ارلن حاوی ۲۵ میلی لیتر از اسید بوریک ۲٪ دارای ۲-۳ قطره معرف متیل رد قرار داده شد. گازهای متصاعد شده، به صورت تغییر رنگ محلول از ارغوانی به زرد نمایان شده که در نهایت این محلول با اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیترا شده تا محلول مجدداً ارغوانی گردد. میزان TVB-N با استفاده از رابطه زیر (بر حسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم تخم) محاسبه گردید (Jeon *et al.*, 2002)

$$TVB-N = A - B \times 1.4 \times 100 / W$$

A: یک میلی لیتر اسید ۰/۱ نرمال مصرفی نمونه

B: یک میلی لیتر اسید ۰/۱ نرمال مصرفی شاهد

W: گرم وزن نمونه

pH

برای اندازه گیری pH، ابتدا ۵ گرم از تخم ماهی در ۴۵ میلی لیتر از آب مقطر با استفاده از دستگاه هموژنیزه کننده با دور بالا، در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه هموژن شده و سپس pH با استفاده از دستگاه pH

³ Determination of total volatile basic nitrogen

جدول ۱: نتایج (میانگین \pm انحراف معیار) تغییرات pH در تخم ماهی سفید دارای پوشش کیتوزان و ناتامایسین در زمان های مختلف

Table 1: Results (mean \pm SD) change in pH in salted kutum (*Rutilus frisii kutum*) roe coated with chitosan and Natamycin at different times

زمان (روز)	۰	۳۰	۶۰	۹۰	تیمار
۱	۶,۲۶ \pm ۰,۰۱ bA	۶,۳۴ \pm ۰,۱۱ aC	۶,۳۴ \pm ۰,۱۰ aB	۶,۳۶ \pm ۰,۰۲ aAB	
۲	۶,۲۰ \pm ۰,۰۲ bB	۶,۳۸ \pm ۰,۰۸ aBC	۶,۳۴ \pm ۰,۰۸ aB	۶,۳۶ \pm ۰,۰۹ aAB	
۳	۶,۲۷ \pm ۰,۰۴ cA	۶,۴۱ \pm ۰,۱۲ bB	۶,۵۶ \pm ۰,۰۴ aA	۶,۴۲ \pm ۰,۱۹ bA	
۴	۶,۲۳ \pm ۰,۰۲ cA	۶,۴۸ \pm ۰,۰۸ aA	۶,۲۷ \pm ۰,۰۵ cC	۶,۳۸ \pm ۰,۰۷ bA	

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ردیف و ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

شوری

جدول ۲: نتایج (میانگین \pm انحراف معیار) تغییرات شوری (ppt) در تخم ماهی سفید دارای پوشش کیتوزان و ناتامایسین در زمان های مختلف

Table 2: Results (mean \pm SD) change in salinity (ppt) in salted kutum (*Rutilus frisii kutum*) roe coated with chitosan and Natamycin at different times

زمان (روز)	۰	۳۰	۶۰	۹۰	تیمار
۱	۱۳۸ \pm ۰,۰۵ bA	۱,۳۹ \pm ۰,۱۰ bC	۱,۴۴ \pm ۰,۰۸ aB	۱,۴۶ \pm ۰,۱۵ aB	
۲	۱,۲۸ \pm ۰,۰۳ bB	۱,۴۰ \pm ۰,۰۷ aB	۱,۳۱ \pm ۰,۰۵ bC	۱,۳۸ \pm ۰,۰۴ aC	
۳	۱,۳۲ \pm ۰,۰۹ bB	۱,۳۳ \pm ۰,۰۳ bC	۱,۳۷ \pm ۰,۱۳ bC	۱,۴۶ \pm ۰,۱۴ aB	
۴	۱,۴۳ \pm ۰,۰۷ bA	۱,۵۵ \pm ۰,۰۶ aA	۱,۵۴ \pm ۰,۰۹ aA	۱,۵۷ \pm ۰,۰۶ aA	

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ردیف و ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

عدد پراکسید (PV)

جدول ۳: نتایج (میانگین \pm انحراف معیار) تغییرات عدد پراکسید (meq/kg) در تخم ماهی سفید دارای پوشش کیتوزان و ناتامایسین در زمان های مختلف

Table 3: Results (mean \pm SD) change in peroxide value (meq / kg) in salted kutum (*Rutilus frisii kutum*) roe coated with chitosan and Natamycin at different times

زمان (روز)	۰	۳۰	۶۰	۹۰	تیمار
۱	۰,۵۳ \pm ۰,۰۴ dA	۰,۸۷ \pm ۰,۰۴ cB	۱,۴۵ \pm ۰,۰۸ bB	۲,۳۲ \pm ۰,۱۰ aB	
۲	۰,۴۶ \pm ۰,۰۲ dA	۰,۹۰ \pm ۰,۰۴ cB	۱,۳۲ \pm ۰,۰۴ bC	۲,۳۱ \pm ۰,۰۶ aB	
۳	۰,۴۶ \pm ۰,۰۵ dA	۰,۸۱ \pm ۰,۰۱ cB	۱,۲۶ \pm ۰,۰۴ bC	۲,۳۲ \pm ۰,۰۲ aB	
۴	۰,۵۸ \pm ۰,۰۱ dA	۱,۳۹ \pm ۰,۱۴ cA	۲,۵۴ \pm ۰,۰۸ bA	۳,۷۴ \pm ۰,۳۸ aA	

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ردیف و ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

مجموعه ازت فرار (TVB-N)

جدول ۴: نتایج (میانگین \pm انحراف معیار) بر تغییرات مجموع ازت فرار (mg) در تخم ماهی سفید دارای پوشش کیتوزان و ناتامایسین در زمان های مختلف

Table 3: Results (mean \pm SD) change in total volatile nitrogen (mg) of salted kutum (*Rutilus frisii kutum*) roe coated with chitosan and Natamycin at different times

زمان (روز)	۰	۳۰	۶۰	۹۰
تیمار	۱	۲	۳	۴
۱	۱۰,۴۴ \pm ۰,۱۵ dA	۱۳,۳۶ \pm ۰,۰۹ cB	۲۱,۷۹ \pm ۰,۶۱ bB	۲۷,۵۱ \pm ۱,۱۷ aB
۲	۱۰,۴۴ \pm ۰,۰۹ dA	۱۳,۰۲ \pm ۰,۵۴ cB	۲۱,۶۳ \pm ۱,۴۳ bB	۲۷,۷۳ \pm ۰,۷۱ aB
۳	۱۰,۵۲ \pm ۰,۵۱ cA	۱۲,۳۶ \pm ۰,۰۹ cB	۱۸,۸۳ \pm ۰,۳۹ bC	۲۴,۷۴ \pm ۰,۶۴ aC
۴	۱۰,۴۲ \pm ۰,۲۵ dA	۱۷,۱۰ \pm ۱,۲۳ cA	۲۷,۸۲ \pm ۱,۳۲ bA	۳۵,۰۰ \pm ۱,۳۲ aA

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ردیف و ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

تیوباربیتریک اسید (TBA)

جدول ۵: نتایج (میانگین \pm انحراف معیار) تغییرات تیوباربیتریک اسید در تخم ماهی سفید دارای پوشش کیتوزان و ناتامایسین در زمان های مختلف

Table 3: Results (mean \pm SD) change in thiobarbituric acid of salted kutum (*Rutilus frisii kutum*) roe coated with chitosan and Natamycin at different times

زمان (روز)	۰	۳۰	۶۰	۹۰
تیمار	۱	۲	۳	۴
۱	۰,۳۲ \pm ۰,۰۱ dA	۰,۶۵ \pm ۰,۱۱ cB	۰,۷۳ \pm ۰,۰۸ bC	۱,۶۰ \pm ۰,۱۱ aB
۲	۰,۳۳ \pm ۰,۰۲ dA	۰,۵۸ \pm ۰,۰۳ cC	۰,۸۶ \pm ۰,۰۴ bB	۱,۴۶ \pm ۰,۱۰ aC
۳	۰,۳۱ \pm ۰,۰۰ dA	۰,۴۸ \pm ۰,۰۵ cD	۰,۶۵ \pm ۰,۰۶ bD	۱,۳۵ \pm ۰,۰۸ aD
۴	۰,۳۳ \pm ۰,۰۱ dA	۰,۹۲ \pm ۰,۸۵ cA	۱,۶۳ \pm ۰,۰۹ bA	۲,۱۷ \pm ۰,۰۶ aA

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ردیف و ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

بحث

pH

کیتوزان/ رس حاوی اسانس رزماری بر ماندگاری ماهی کپور معمولی صورت گرفت مشخص گردید که تغییرات pH در مدت زمان نگهداری نمونه ها افزایش داشته که با مطالعه حاضر مطابقت داشته است. همچنین نمونه های تیمار شده با رس/کیتوزان/اسانس رزماری دارای کمترین pH و نمونه های شاهد دارای بیشترین pH در روز شانزدهم بوده که با مطالعه حاضر مغایرت داشته و بیشترین تغییرات در تیمار کیتوزان و ناتامایسین ppm ۱۰ بوده و تیمار شاهد بعد از آن قرار داشته است. علت احتمالی این مغایرت نوع بافت ماده غذایی و استفاده از نمک در عمل آوری اولیه تخم ماهی بوده که تغییرات pH

نتایج تغییرات pH در تیمار و زمان های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. میانگین pH از زمان صفر تا ۹۰ در تیمارهای مختلف بطور نوسانی روند صعودی داشته ولی بیشترین افزایش آن در تیمار دارای کیتوزان و ناتامایسین ppm ۱۰ بوده و تیمار شاهد پس از آن قرار داشته است. روند تغییرات در زمان های مختلف در اکثر موارد معنی دار بوده است ($p < 0.05$).

در مطالعه ای که توسط Abdollahi و همکاران (۲۰۱۴) بر روی تاثیر بیوانوکامپوزیت عملکردی

عدد پراکسید (PV)

تغییرات PV در جدول ۳ نشان داده شده است. میانگین تغییرات PV از زمان صفر تا ۹۰ روز در تمامی تیمارها روند صعودی داشته ولی بیسترتین افزایش در تیمار شاهد و کمترین تغییر در تیمار حاوی کیتوزان و ناتامایسین 10ppm مشاهده شد. تغییرات این فاکتور در تمامی تیمارها در طی زمان نگهداری معنی دار بوده است ($p < 0.05$). بین تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی دار وجود داشته ولی تیمارهای دیگر نسبت به هم فاقد اختلاف معنی دار بودند.

شاخص پراکسید میزان کل هیدروپراکسیدها را نشان میدهد و یکی از شاخص های اولیه و مهم اندازه گیری فساد چربی ماهیان است. PV و TBA شاخص های شیمیایی اصلی جهت اندازه گیری درجه تندی اکسیداتیوی هستند (Ozogul et al., 2010). نتایج این مطالعه حاکی از روند کند افزایش PV در تیمارهای حاوی کیتوزان بوده است. پوشش کیتوزان به عنوان سدی بین ماده غذایی و محیط اطراف آن عمل کرده و نفوذ اکسیژن به سطح ماده غذایی را به تعویق می اندازد (Jeon et al., 2002). سطح ۲ میلی اکی والان O_2 بر کیلوگرم چربی ماهی حداکثر میزان قابل قبول PV برای مصرف انسان در نظر گرفته شده است (Sikorski, 1990) که نمونه های شاهد در روز ۶۰ روز از دامنه استاندارد خارج شدند که احتمالاً علت طولانی تر شدن نسبی آن وجود نمک در تخم عمل آوری شده بوده است.

در مطالعه ای که توسط Abdollahi و همکاران (۲۰۱۴) بر روی تاثیر بیونانو کامپوزیت عملکردی کیتوزان/رس فعال شده با اسانس رزماری (کیتوزان/رس/اسانس رزماری) بر ماندگاری ماهی کپور نقره ای صورت گرفته مشخص گردید که در تیمارهای ترکیبی، میزان PV پائین تر از سایر تیمارها بوده که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. مطالعه صورت گرفته توسط Ojagh و همکاران (۲۰۱۰) بر تاثیر پوشش کیتوزان غنی شده با اسانس دارچین بر کیفیت فیله ی قزل آلا ی رنگین کمان نشان داد که فیله های پوشش داده شده با کیتوزان نسبت به نمونه شاهد و پوشیده شده با

را تحت تاثیر قرار می دهد. در مطالعه ی صورت گرفته توسط Fan و همکاران (۲۰۰۹) بر روی تاثیر پوشش کیتوزان ۲ درصد بر کیفیت و ماندگاری ماهی کپور نقره ای نگهداری شده به مدت ۳۰ روز در دمای ۳- درجه سانتی گراد نشان داده که pH به آهستگی در نمونه ها هنگام نگهداری تحت شرایط انجماد افزایش یافته که با مطالعه حاضر همخوانی دارد.

شوری

نتایج تغییرات شوری در تیمار و زمان های مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. میانگین شوری از زمان صفر تا ۹۰ در تیمارهای مختلف متفاوت بوده ولی بیشترین افزایش را در تیمار شاهد نشان داد. نتایج تجزیه و تحلیل آماری حاکی از اختلاف معنی دار داده ها از زمان صفر تا ۹۰ روز در هر چهار تیمار بوده ($p < 0.05$) در صورتیکه در زمانهای ۳۰ و ۶۰ اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

غلظت نمک کلرید سدیم اولیه که جهت عمل آوری تخم ماهی سفید مورد استفاده قرار گرفت ۴ درصد بوده که پس از خارج شدن شورابه، غلظت نهایی باقیمانده نمک به زیر ۲ درصد رسیده است. این غلظت از نمک باعث مهار رشد برخی از باکتریهای حساس به نمک شده ولی با این وجود باکتریهایی نظیر سودوموناس ها، شوانلا، موراگلا و میکروکوکها به راحتی در این غلظت از نمک رشد و تکثیر کرده و متابولیتهای مولد فساد را تولید می کنند. بنابراین بایستی اذعان نمود که این غلظت از نمک هر چند که باعث خوش طعم کردن تخم ماهی سفید میشود ولی با این وجود قادر به کاهش بار میکروبی و متعاقب آن تاخیر در فرآیند فساد نخواهد شد. از اینرو لزوم استفاده از نگهدارنده هایی نظیر کیتوزان و ناتامایسین که دارای ماهیت آنتی اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدقارچی می باشند ضروری به نظر می رسد. این مواد در شوری مورد نظر باعث تاخیر در فساد شیمیایی شده و بصورت سینرژیسیم با نمک عمل کرده و به نظر می رسد که نمک باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی کیتوزان و ناتامایسین می شود.

که میزان TVB-N در فیله های تیمار شده بمراتب کمتر از تیمار شاهد بوده که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه انجام شده توسط Fan و همکاران (۲۰۰۹) مشخص گردید که پوشش کیتوزان نقش مثبتی را در نگهداری فیله ی ماهی به وسیله ی مهار فعالیت پروتئازهای درونی داشته و میزان TVB-N در نمونه های پوشش داده شده با کیتوزان به طور معنی داری از نمونه ی شاهد کمتر بوده است.

تیوباربتوریک اسید (TBA)

نتایج تغییرات TBA در تیمارها و زمانهای مختلف در جدول ۵ نشان داده شده است. میانگین تغییرات TBA از زمان صفر تا ۹۰ روز در تمامی تیمارها روند صعودی داشته و مشابه PV و TVB-N، بیشترین افزایش در تیمار شاهد و کمترین تغییر در تیمار حاوی کیتوزان و ناتامایسین ۱۰ppm مشاهده گردید. تغییرات این فاکتور در تمامی تیمارها در طی زمان نگهداری معنی دار بوده است ($p < 0.05$). بین تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی دار وجود داشته و در سایر تیمارها در بیشتر موارد، اختلاف معنی دار مشاهده شد ($p < 0.05$).

TBA شاخصی است که به طور گستره ای برای اندازه گیری اکسیداسیون لیپید به وسیله اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) استفاده می شود (Souza et al., 2010). غلظت TBA در ماهی معمولاً بین ۳ و ۵ میلیگرم MDA در هر کیلوگرم گوشت است و معمولاً به عنوان حد مجاز برای ماهی ذخیره شده در یخ در نظر گرفته می شود (Ozogul et al., 2010). با توجه به استاندارد ذکر شده، تمامی تیمار آزمایش شده در این مطالعه تا ۹۰ روز نگهداری در دامنه استاندارد قرار داشتند. همانطوریکه در نتایج آمده روند تغییرات TBA در تیمارهای حاوی کیتوزان به تنهایی و یا در ترکیب با ناتاماسین کندتر از تیمار شاهد بوده است. زمانی که پوشش کیتوزان با هدف ممانعت کنندگی نسبت به اکسیژن بر روی سطح ماده غذایی استفاده می شود، به عنوان یک سد بین ماده غذایی و محیط اطراف آن عمل کرده که این فرایند سبب به تعویق انداختن اکسیداسیون لیپید با مکانسیم کندسازی نفوذ اکسیژن از اطراف به

کیتوزان + اسانس دارچین به نحو موثری تولید PV را کاهش داد.

مجموع ازت فرار (TVB-N)

نتایج تغییرات TVB-N در تیمارها و زمانهای مختلف در جدول ۴ نشان داده شده است. میانگین تغییرات TVB-N از زمان صفر تا ۹۰ روز در تمامی تیمارها روند صعودی داشته و مشابه PV، بیشترین افزایش در تیمار شاهد و کمترین تغییر در تیمار حاوی کیتوزان و ناتامایسین ۱۰ppm مشاهده گردید. تغییرات این فاکتور در تمامی تیمارها در طی زمان نگهداری معنی دار بوده است ($p < 0.05$). بین تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی دار وجود داشته و در سایر تیمارها، در اکثر موارد، تیمار دارای کیتوزان منفرد و تیمار دارای کیتوزان و ناتامایسین ۵ppm با تیمار دارای کیتوزان و ناتامایسین ۱۰ppm اختلاف معنی دار داشتند ($p < 0.05$).

TVB-N یکی از شاخص های تشخیص تازگی محصولات شیلاتی بوده و دامنه وسیعی از ترکیبات نیتروژنی فرار مثل تری متیل آمین، دی متیل آمین و آمونیاک را شامل می شود (Huss, 1995). علت اصلی افزایش TVB-N، دنا توره شدن پروتئین تخم ماهی سفید بوده که در اثر فعالیت تجزیه کنندگی پروتئازهای باکتریایی و یا سلولی (واکنش هایی نظیر آمین زدایی اسیدهای آمینه آزاد، تخریب نوکلئوتیدها و اکسیداسیون آمین ها) انجام میگیرد (Gill, 1990; Lopez & Caballero, 2004). با توجه به حد قابل قبول TVB-N (۳۰ میلی گرم در صد گرم) (EEC, 1995)، تیمار شاهد در روز ۹۰ از حد استاندارد خارج شده و غیر قابل مصرف بوده است. علت اصلی طولانی شدن زمان ماندگاری تخم ماهی در تیمار شاهد، استفاده از نمک کلرید سدیم در عمل آوری تخم بوده که نشاندهنده اثر مهارکننده نسبی این نمک می باشد. میزان TVB-N در سایر تیمارهای مورد بررسی، تا آخر دور نگهداری، در حد قابل قبول قرار داشتند.

مطالعه صورت گرفته توسط Ojagh و همکاران (۲۰۱۰a) بر تاثیر پوشش کیتوزان غنی شده با اسانس دارچین بر کیفیت فیله قزل آلائی رنگین کمان نشان داد

- of fishery products and specifying the analysis methods to be used. *Official Journal L*. 097: 84-87.
- Egan, H., Krik, R. S. and Sawyer, R., 1997.** *Pearsons Chemical Analysis of Foods*. 9(Edn): 609-634.
- FAO, 2014.** *The State of world Fisheries and Aquaculture*.
- Fajardo, P., Martins, T., Fucioos, C., Pastrana, L. and Teixeira, J.A., 2010.** Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering* 101: 349-356. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.06.029
- Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y. and Chi, Y., 2009.** Effects of chitosan coating on quality and shelf life of Silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, 115(1): 66-70. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.11.060
- Gill, T.A., 1990.** Objective analysis of seafood quality. *Food Review International*, 6: 681-714.
- Gomez-Estaca, J., Lopez DeE Lacey, A., Gomez-Guillena, M.C., Lopez-Caballero, M.E. and Montroa, P., 2009.** Antimicrobial Activity of Composite Edible films Based on Fish Gelatin and Chitosan Incorporated with Clove Essential Oil. *Journal of Aquatic food Product Technology*, 18: 64-52. DOI: 10.1016/j.tifs.2008.10.002
- Huss, H.H., 1995.** Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*, 195 p. ISBN 92-5-103507-5
- سطح ماده غذایی می گردد (Sathivel, 2005). در مطالعه انجام شده توسط Ojagh و همکاران (۲۰۱۰a)، Fan و همکاران (۲۰۰۹) و Abdollahi و همکاران (۲۰۱۴) مشخص گردید که روند تغییرات TBA در تیمارهای ترکیبی بسیار پائین تر از تیمار شاهد بوده است. نتایج مطالعات مذکور تأیید کننده مطالعه حاضر می باشد. بطور کلی نتایج حاصل از تحقیق حاضر بیانگر این می تواند باشد که به هنگام استفاده از کیتوزان به صورت منفرد و یا ترکیب این ماده و ناتامایسین در تخم عمل آوری شده ماهی سفید، روند تغییرات پارامترهای شیمیایی مولد فساد کاهش چشمگیری داشته و با نمونه های شاهد که فاقد نگهدارنده های مذکور بودند اختلاف معنی دار داشته اند. استفاده از نمک کلرید سدیم بعنوان ماده نگهدارنده و طعم دهنده در عمل آوری تخم ماهی سفید، بر کاهش پارامترهای فساد نیز موثر بوده و در برخی از موارد مثل TBA، تا روز ۹۰، نمونه های شاهد در دامنه استاندارد قرار داشتند. با توجه به نتایج بدست آمده می توان از کیتوزان و ناتامایسین در تخم فرآوری شده ماهی سفید و سایر ماهیان از جمله تاسماهیان استفاده کرده و بعنوان یک محصول جدید در کنار خاویار دان ماهیان خاویاری ولی با قیمت بسیار پائین تر و همچنین زمان ماندگاری بالاتر در دمای یخچال به بازار مصرف عرضه نمود.

منابع

- استاندارد شماره ۱۸۶، ۱۳۷۱. خاویار: ویژگی ها و روش های آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. صفحات ۲۷-۱
- Abdollahi, M., Rezaei, M. and Farzi, A., 2014.** 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*, 49: 811-818. DOI: 10.1111/ijfs.12369
- EEC, 1995.** Total volatile basic nitrogen TVBN limit values for ceratin categories

- JECFA, 2001.** Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.
- Jeon, Y.J., Kamil, J.Y.V.A. and Shahidi, F., 2002.** Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50: 5167-5178. DOI: 10.1021/jf011693l
- Lopez-Caballero, M.E., Gomez-Guillen, M.C., Perez-Mateos, M. and Montero, P., 2005.** A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. Food Hydrocolloids, 19: 303-311. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2004.06.006
- Namulema, A., Muyonga, J.H. and Kaaya, N.A., 1999.** Quality deterioration in frozen Nile perch (*Lates niloticus*) stored at -13 and -27 °C. Food Research International, 32: 151-156. DOI: 10.1016/S0963-9969(99)00066-6
- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H., 2010.** Effect of chitosan coatings enriched with cinnamonoil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry, 120(1): 193-198. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.10.006
- Ozogul, Y., Ayas, D., TYazgan, H., Ozogul, F., K.Boga, E. and Ozyurt, G., 2010.** The capability of rosemary extract in preventing oxidation of fish lipid. International Journal of Applied Science and Technology, 45:1717-1723.
- Papineau, A.M., Hoover, D.G., Knorr, D. and Farkas, D.F., 1991.** Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. Food Biotechnol, 5: 45-57. DOI: 10.1080/08905439109549790
- Anshar, P., 2013.** Production and characterization of Chitosan from shrimp shells waste. AACL Bioflux, 6: 4.
- Rejane, C., Goy, Douglas de Britto, Odilio B. and Assis, G., 2009.** A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 19(3): 241-247. DOI: 10.1590/S0104-14282009000300013
- Sagoo, S., 2003.** The antimicrobial action of chitosan. PhD. Thesis, South Bank University, UK.
- Sagoo, S., Board, R. and Roller, S., 2002a.** Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeasts. Lett in Appl. Microbiol. 34: 168–172. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2002.01067.x
- Sagoo, S., Board, R. and Roller, S., 2002b.** Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. Food Microbiol, 19: 175–182. DOI: 10.1006/fmic.2001.0474
- Sathivel, S., 2005.** Chitosan and Protein Coatings Affect Yield, Moisture Loss, and Lipid Oxidation of Pink Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) Fillets During Frozen Storage. Journal of Food Science, 70(8): 455-459 .
- Sikorski, Z.E., 1990.** Seafood: resources, nutritional composition and preservation CRC press.
- Souza, B.W.S., Cerqueria, M.A., Ruiz, H.A., Martins, J.T., Casariego, A.,**

- Teixeira, J.A. and Vicente, A. A., 2010.**
Effect of chitosan-based coatings on the shelf life of salmon (*Salmo salar*).
Journal of Agriculture and Food Chemistry, 58: 11456-11462.
DOI:10.1021/jf102366k
- Welscher, Yvonne, M., Nape Hendrik, T., Balague, and Masia, M., 2008.**
Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol without Permeabilizing the Membrane.
The Journal of Biological Chemistry. 283(10): 6393–6401.
DOI: 10.1074/jbc.M707821200